神奈川県衛生研究所研究報告　No. 46 (2016)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

感染性胃腸炎患者便からの薬剤耐性菌の検出状況

鈴木美雪，古川一郎，政岡智佳，石原ともえ，相川勝弘，黒木俊郎

Detection of drug-resistant bacteria from stools of patients with infectious gastroenteritis

Miyuki SUZUKI, Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA, Tomoe ISHIHARA, Katsuhiro AIKAWA and Toshiro KUROKI

1　はじめに

近年，細菌性疾患の治療で多用されるセフェム系抗生物質が効かなくなる薬剤耐性菌の出現が問題となっている．基質特異性拡張型βラクタマーゼ（extended spectrum β-lactamase：以下，ESBL）は，それまで感受性を示していた菌に主に第三世代，第四世代セフェム系薬剤耐性を発現させる酵素であり，AmpC型β-ラクタマーゼ（以下，AmpC）は，感受性菌に主に第二世代，第三世代セフェム系薬剤耐性を発現させる酵素である[1)]．ESBL産生菌及びAmpC産生菌は，腸内細菌等のグラム陰性桿菌に認められ，ESBL及びAmpC関連耐性遺伝子の多くはプラスミド上に存在し[2)]，菌種を超えて伝達されるため，市中における蔓延が懸念されている[1－4)]．

そこで本稿では，ESBL産生菌及びAmpC産生菌の保有実態及びこれら薬剤耐性菌の耐性遺伝子の保有状況を調査するため，神奈川県内の医療機関を受診した感染性胃腸炎患者便よりESBL産生菌及びAmpC産生菌を分離し，その耐性遺伝子の保有状況を調査したので報告する．

2　材料及び方法

2013年４月から2016年３月までに，神奈川県内の小児科１医療機関を受診し，感染性胃腸炎と診断された患者便288検体を対象とした．

神奈川県衛生研究所　微生物部
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

（１）薬剤耐性菌の検出

薬剤耐性菌のスクリーニングとして，マッコンキー培地（栄研化学）にセフォタキシム（CTX）(SIGMA）を4 mg/Lになるように添加した培地[5)]，及びマッコンキー培地にセフタジジム（CAZ）(SIGMA）を2mg/Lになるように添加した培地[6)]に，緩衝ペプトン水（Oxoid）にて36℃で18時間増菌培養した患者便を一白金耳塗抹し，36℃で18時間培養後，発育した集落を釣菌し，生化学的性状試験により菌種を同定した．分離した耐性菌について，感受性試験用ディスクCTX（BD）を用い，CLSI（米国臨床検査標準協会）[7)]法に準拠した薬剤感受性試験を実施した．阻止円直径（mm）が≦23mmであった菌株について，AmpC/ESBL鑑別ディスク（関東化学）を用い，ESBL産生菌及びAmpC産生菌の確認試験を行った．

（２）PCR法による遺伝子の検出

分離した菌をアルカリ熱抽出（25mM NaOH溶液100μLに懸濁，100℃，10分間加熱）し，1M Tris-HCl（pH8.0）８μLを添加して，14,000rpmで10分間遠心した上清をDNAテンプレートとし，Taqポリメラーゼ（TaKaRa Taq Hot Start Version（タカラバイオ））を使用し，各種耐性因子を対象としたPCRを実施した．ESBL産生菌の５種類の耐性因子TEM，SHV，CTX-M-1 group，CTX-M-2 group，CTX-M-9 groupの増幅には表１の各プライマー[8)]を用い，94℃で５分後，94℃で１分，53℃で１分，72℃で１分30秒を30回繰り返した後，72℃で７分間の反応を行った．AmpC産生菌の６種類

表１　ESBLの耐性因子増幅用プライマーの塩基配列

耐性因子	プライマー名	塩基配列（5'→3'）	増幅サイズ（bp）
TEM	T1	CCG TGT CGC CCT TAT TCC	824bp
	T2	AGG CAC CTA TCT CAG CGA	
SHV	S1	ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC	1,051bp
	S2	TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC	
CTX-M-1 group	M1	CGG TGC TGA AGA AAA GTG	354bp
	M2	TAC CCA GCG TCA GAT TAC	
CTX-M-2 group	Th1-1	ACG CTA CCC CTG CTA TTT	780bp
	Th1-2	CCT TTC CGC CTT CTG CTC	
CTX-M-9 group	Th2-1	GCA GAT AAT ACG CAG GTG	393bp
	Th2-2	CGC CGT GGT GGT GTC TCT	

表２　AmpC型βラクタマーゼの耐性因子増幅用プライマーの塩基配列

耐性因子	プライマー名	塩基配列（5'→3'）	増幅サイズ（bp）
MOX	MOXMF	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520bp
	MOXMR	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	
CIT	CITMF	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462bp
	CITMR	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	
DHA	DHAMF	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405bp
	DHAMR	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	
ACC	ACCMF	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346bp
	ACCMR	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	
ACT	EBCMF	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302bp
	EBCMR	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	
FOX	FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190bp
	FOXMR	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	

の耐性因子MOX，CIT，DHA，ACC，ACT，FOXの増幅には表２の各プライマー[9]を用い，94℃で３分後，94℃で30秒，64℃で30秒，72℃で１分を30回繰り返した後，72℃で７分間の反応を行った．

3　結果

288検体のうち61検体（21.2%）からESBL産生菌及びAmpC産生菌が検出され，うち５検体からは２菌種の耐性菌が検出され，計８菌種（*Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Citrobacter amalonaticus, Morganella morganii, Hafnia alvei, Proteus mirabilis*），66株が分離された．

ESBL産生菌は３菌種42株検出され，そのうちESBL及びAmpCの両方を産生する*E.coli*が２株あった（表３，４）．ESBL産生菌42株のうち，40株（95.2%）は*E.coli*であり，そのうちCTX-M-9グループ保有*E.coli*が35株（CTX-M-1グループ及びTEM型を同時に保有していた株を含む）と最も多く，87.5%を占めた．その他，CTX-M-1グループ保有*C.amalonaticus*が１株，CTX-M-2グループ保有*P.mirabilis*がそれぞれ１株ずつ検出され，SHV型は検出されなかった（表３）．

AmpC産生菌は６菌種26株（このうち*E.coli*　２株はESBL産生菌の耐性因子も保有）が検出された（表３，４）．保有する耐性因子はCIT型が最も多く11株（42.3%），次いでDHA型が５株，ACT型とACC型がそれぞれ１株から検出されたが，MOX型及びFOX型は検出されなかった．また，８株からは６種類の耐性因子のいずれも検出されなかった（表４）．

表３　ESBL産生菌の耐性因子保有状況

菌種	耐性因子	株数
Escherichia coli	CTX-M-1	4
	CTX-M-1, CTX-M-9	1
	CTX-M-1, TEM	1
	CTX-M-9	27*1
	CTX-M-9, TEM	7*2
Citrobacter amalonaticus	CTX-M-1	1
Proteus mirabilis	CTX-M-2	1
計		42

＊1　１株はCIT型も検出
＊2　１株はAmpC型β-ラクタマーゼも検出

表４　AmpC産生菌の耐性因子保有状況

菌種	耐性因子	株数
Escherichia coli	CIT	3*2
	DHA	2
	ND*1	2*3
Enterobacter cloacae	ACT	1
	ND	5
Enterobacter aerogenes	ND	1
Citrobacter freundii	CIT	8
Morganella morganii	DHA	3
Hafnia alvei	ACC	1
計		26

＊1　ND:不検出
＊2　１株はCTX-M-9も検出
＊3　１株はCTX-M-9 及び TEMも検出

4　考察

ESBL産生菌及びAmpC産生菌による薬剤耐性は，抗生物質による治療に影響を及ぼすため，世界的に問題となっており，院内感染だけでなく，市中における蔓延も懸念されている[1,3]．我々は，神奈川県域の医療機関を受診した感染症胃腸炎患者便よりESBL産生菌及びAmpC産生菌を分離し，耐性因子の保有状況を調査した．

ESBL産生遺伝子は，プラスミドにコードされており，菌種を超えて拡散する[5,6,10]．本調査で検出されたESBL産生菌は95.2%が*E.coli*であり，そのうちCTX-M-9グループ保有株が87.5%と半数以上を占めており，既報の結果と一致していた[11]．以前，欧米ではTEM型やSHV型が主流であったが，近年，CTX-M型が増加している[1,3]．本調査では異なる複数のESBLの耐性因子を保有している株，さらに，日本では珍しいとされていた[12,13]ESBLとAmpCの両方を保有している株も検出されており，今後，耐性因子を複数獲得した菌種が増加した場合，多剤耐性化が進み，使用できる薬剤が限定される可能性が考えられる．そのため，耐性因子の保有状況を調査し，国内のESBL産生菌の動向を把握し，迅速に対応できる体制を構築することが今後の課題として挙げられた．

AmpCは染色体性とプラスミド性のものがあり，プラスミド性AmpCの遺伝子は，染色体上に存在する*ampC*遺伝子がプラスミドに転移したと考えられている[4,9,14]．本調査で検出された６菌種は，染色体上に*ampC*遺伝子を持つとされ，*Enterobacter*属（ACT型の由来），*C.freundii*（CIT型の由来），*M.morganii*（DHA型の由来），*H.alvei*（ACC型の由来）は，セファマイシン系薬剤等の使用により，AmpC産生量が増加すると，耐性を示すようになる誘導型である[4,15]．また，*E.coli*は抗生

物質の使用にかかわらず，常にAmpCを産生している構成型であり，通常その産生量は低いが，*ampC*遺伝子の変異により，AmpCを大量に産生することがある[4,9,16]．誘導型AmpC保有菌種由来の耐性遺伝子が，プラスミドを介して他菌種へ伝達された報告があることから[17]，本調査で検出された*E.cloacae*，*C.freundii*，*M.morganii*，*H.alvei*の耐性因子は他菌種へ伝達される可能性がある．これら誘導型AmpCの耐性因子がプラスミドに転移し，拡散するのを防ぐために，これら菌種に対しては，セフェム系薬剤の使用を避けることが望ましいと考える．また，構成型AmpCを保有する*E.coli*において，プラスミド媒介の耐性因子が国内で検出された報告があり，CIT型が多数検出されている[13]．本調査において検出されたAmpC産生 *E.coli* では，CIT型とDHA型が検出されており，これら耐性因子が他菌種から伝達された可能性が示唆された．国内におけるプラスミド性AmpCの分布に関する情報は少ないが[1,4,13]，世界ではCIT型が主流とされており[4,14]，今後もその動向に注目し，継続して調査することが重要であると考える．

今回の調査の結果，神奈川県内の医療機関を受診した感染性胃腸炎患者便から耐性菌が21.1%と高率に検出され，ESBL産生菌及びAmpC産生菌が確認されたことから，その原因について調査する必要がある．ESBL産生菌及びAmpC産生菌がどのように拡散していくのかは明らかになっていないが，食肉や環境からもESBL産生菌及びAmpC産生菌を分離した報告があり，耐性菌が食品や環境を汚染していること，畜産農場等における抗菌薬の使用等が耐性菌の拡大に関与している可能性が挙げられている[2]．引き続きESBL産生菌及びAmpC産生菌の分布状況を監視するとともに，これら耐性菌の耐性遺伝子の由来及び環境中の汚染源を合わせて調査することにより，適切な薬剤選択だけでなく，これら耐性菌の拡大抑制にもつながると考える．

謝　辞

本調査を実施するにあたり，多大なご協力をいただきましたかみやま小児科クリニックの神山務先生，神山明美先生に深謝いたします．

参考文献

1）石井良和:基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ（ESBL）産生菌,AmpC型β-ラクタマーゼ産生菌,メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌,臨床と微生物，**36**, 615-622（2009）
2）臼井優，田村豊:ESBL/AmpC産生菌の環境からヒトへの伝播，臨床と微生物，**42**, 361-366（2015）
3）R. Canton, T.M. Coque: The CTX-M β-lactamase pandemic, Curr. Opin. Microbiol., **9**, 466-475（2006）
4）山﨑勝利，小松方:AmpC型βラクタマーゼ過剰産生菌，臨床と微生物，**40**, 225-231（2013）
5）A. Manzur, F. Tubau, M. Pujol, L. Calatayud, M.A. Dominguez, C. Pena et al.: Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit, J. Clin. Microbiol., **45**, 2365-2369（2007）
6）C.H.P.M. Silva: Elaboration and evaluation of a new screening medium for detection and presumptive identification of extended-spectrum β-lactamase-producing organisms（ESBL), Braz. J. Microbiol., **31**, 271-274（2000）
7）Clinical and laboratory standards institute: methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline, CLSI document M45-A1, Wayne, Pa.,（2007）
8）畠山薫，奥野ルミ，遠藤美代子，柳川義勢:集団下痢症事例由来ヒト糞便からのバンコマイシン耐性腸球菌および基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌の検出の試み，東京健安研セ年報，**57**, 69-72（2006）
9）F.J. Perez-Perez, N.D. Hanson: Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, J. Clin. Microbiol., **40**, 2153-2162（2002）
10）宮﨑博章:ESBL産生菌，臨床と微生物，**40**, 213-218（2013）
11）S. Suzuki, N. Shibata, K. Yamane, J. Wachino, K. Ito, Y. Arakawa : Change in the prevalence of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread, J. Antimicrob. Chemother., **63**, 72-79（2009）
12）Y. Matsumura, M. Nagao, M. Iguchi, T. Yagi, T. Komori, N. Fujita et al.: Molecular and clinical characterization of plasmid-mediated AmpC β-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteraemia: a comparison with extended-spectrum β-lactamase-producing and non-resistant *E. coli* bacteraemia, Clin. Microbiol. Infect., **19**, 161-168（2013）
13）K. Yamasaki, M. Komatsu, N. Abe, S. Fukuda, Y.

Miyamoto, T. Higuchi et al. : Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC β-lactamases in the Kinki region of Japan, J. Clin. Microbiol., **48**, 3267-3273 (2010)

14) A. Philippon, G. Arlet, G. A. Jacoby: Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases, Antimicrob. Agents. Chemother., **46**, 1-11 (2002)

15) C. Jacobs, L. Huang, E. Bartowsky, S. Normark, J.T. Park: Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β-lactamase induction, EMBO. J., **13**, 4684-4694 (1994)

16) E.C. Nelson, B.G. Elisha: Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*, Antimicrob. Agents. Chemother., **43**, 957-959 (1999)

17) N. Fortineau, L. Poirel, P. Nordmann: Plasmid-mediated and inducible cephalosporinase DHA-2 from *Klebsiella pneumoniae*, J. Antimicrob. Chemother., **47**,207-210 (2001)