

# ヒト由来 CTX-M 型基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌の性状（平成 23 年度）

石畝 史・永田暁洋・海崎佳史\*1・中嶋裕美子\*2・正木里美\*3・津持文子・大村勝彦

Characterization of CTX-M-type Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing  
*Escherichia coli* isolated from Sporadic Diarrheal Human Cases

Fubito ISHIGURO, Akihiro NAGATA, Yoshifumi KAIZAKI\*1, Yumiko NAKAJIMA\*2,  
Satomi MASAKI\*3, Fumiko TSUJI, Katsuhiko OMURA

## 1. はじめに

近年、ヒトおよび家禽から、基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の分離報告が増加している<sup>1-3)</sup>。ESBL 産生菌は第三、第四世代セファロスポリンに対しても耐性を示し、これらが市中および院内感染の原因菌となった場合、広域セファロスポリンによる治療に抵抗性を示すことから、臨床現場でその動向が警戒されている。ESBL には様々な型が存在するが、特にこの数年は Cefotaxime (CTX) や Ceftriaxone (CTRX) に対しても高い耐性を付与する CTX-M 型が主流を占めつつある<sup>4)</sup>。

ESBL 産生大腸菌への感染源の一つとして鶏肉が重要視されているが<sup>5)</sup>、わが国では鶏肉に関する ESBL 産生大腸菌の調査報告例は少ないことから、我々は平成 19 年～22 年に市販鶏肉から CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の分離を試み、散発下痢症患者由来の同菌と分子疫学的性状について比較した結果を報告した<sup>6-7)</sup>。その中で、O78:H9 において鶏肉由来株とヒト由来株の各性状が類似した株、および多剤耐性で病原性を有することから公衆衛生学的に注目されている CTX-M-15、シークエンスタイプ (ST)、131、系統発生群 B2 の O25:H4<sup>8)</sup>を確認している。今回の報告は、平成 23 年度に確認された人由来株について、新たな知見も含めて報告する。

## 2. 方法

### 2. 1 材料

#### 2. 1. 1 供試患者由来株

平成 23 年 2 月～平成 24 年 1 月に、福井県内の医療機関（主に 2 機関）で散発下痢症患者から分離され、O 血清型が判明し、CTX に中間の感受性または耐性を示した 26 株を用いた。また、医療機関で泌尿器疾患等の患者から ESBL 産生大腸菌として分離され、O 血清型別が判明した 7 株を用いた。さらに、平成 21 年～22 年に分離された株で CTX-M 型 ESBL 産生菌として確認された 4 株も用いた。

### 2. 2 方法

#### 2. 2. 1 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は CTX、Ciprofloxacin(CPFX)、Nalidixic acid(NA)、Ampicillin(ABPC)、Tetracyclin(TC)、

Streptomycin(SM)、Sulfisoxazole(Su)、sulfamethoxazole/Trimetoprim (ST)、Gentamicin(GM)、Kanamycin(KM)、Chloramphenicol(CP)および Fosfomycin(FOM)の 12 種類の薬剤感受性試験用ディスク (BBL) を使用し、Kirby-Bauer (KB) 法により行った。また、CTX に中間の感受性または耐性を示した株に対しては、第三世代セファロスポリンである CTX、CTRX および CAZ、ならびに Fluoroquinolone(FQ)系薬剤である CPFEX、Enrofloxacin(ERFX) の最小発育阻止濃度 (MIC) を、寒天平板希釈法により測定した<sup>9)</sup>。また、第四世代セファロスポリンである Cefpirome(CPR)は Etest で MIC を測定した。

#### 2. 2. 2 ESBL の遺伝子型別および系統発生群別

CTX 耐性株が保有する CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子である *bla*<sub>CTX-M</sub> の PCR による group 型別は Shibata ら<sup>9)</sup>、大腸菌の系統発生群の分類は Clermont ら<sup>10)</sup>の方法に準拠した。

#### 2. 2. 3 病原遺伝子の検索

病原遺伝子の *aggR* (腸管凝集性大腸菌線毛発現活性化遺伝子)、*astA* (腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子)、*eae*、LT および ST 保有状況を、PCR で調べた<sup>11-13)</sup>。

## 3. 結果

### 3. 1 *bla*<sub>CTX-M</sub> group および血清型

CTX-M-1 グループ(以下、G と略す)は 9 株、CTX-M-1G +9G は 1 株および CTX-M-9G は 17 株で、CTX-M-9G が半分を占めた (表 1)。血清型は人便由来株では、O1:H12 が 5 株、O25:H4 が 4 株および O111:H21 が 3 株など、計 8 種類で 20 株であった。このうち、O25:H4 および O1:H6 は計 6 株であり、全体の 30%であった。また、O1:H12 は平成 21 年と 22 年に各 1 株および平成 23 年に 3 株の計 5 株、O111:H21 は平成 21 年に 2 株および平成 23 年に 1 株の計 3 株、および O78:H9 が 1 株確認された。泌尿器疾患等由来株では、O25:H4 が 6 株および O15:HNM が 1 株であった。

### 3. 2 年令区分

患者の年令区分は、便由来株では O1:H12 の 5 株および O111:H21 の 3 株など 9 才以下から 9 株、20～50 歳代から 7 株で、尿・喀痰由来株では 7 株すべて 60 歳以上であった (表 2)。

### 3. 3 系統発生群

O25:H4 は便および尿・喀痰由来 10 株すべて、O1:H12 の 5 株中 4 株、O1:HUT の 2 株など 20 株が B2 で、

\*1 福井県済生会病院

\*2 福井県立病院

\*3 杉田玄白記念公立小浜病院

O111:H21の3株およびO1:H6の1株がB1であった(表1)。

3. 4 病原遺伝子保有状況

O111:H21の3株のうち、2株が *aggR* および *astA* 遺伝子、1株が *aggR* 遺伝子を保有し、その他の株はいずれの病原遺伝子も保有していなかった。

3. 5 薬剤感受性試験結果等

3. 5. 1 KB法による薬剤感受性

便由来株では2~3剤耐性株が半数の10株および8~9剤耐性株が5株、尿・喀痰由来株は3~4剤耐性株が5株であった(表2)。平均薬剤耐性数は、それぞれ4.3剤と5.0剤であった。CPFX耐性株は、O25:H4、O25:H51、O1:H6、O78:H9およびO86a:HNMの5種類14株で確認され、そのうち5種類6株で8剤以上の耐性を示した。また、KM耐性株は、O25:H4、O25:H51およびO1:H12の計6株で、FOM耐性株もO74:H4の1株で確認された。

3. 5. 2 第三、四世代セファロスポリン等のMIC値

第三世代セファロスポリンのうち、CTXおよびCTRは比較的高いMIC値を示したのに対し、CAZは高いMICを示す株は1株のみであった。第四世代セファロスポリンのCPRは12株が24µg/mL以上で、そのうちO25:H4の4株が128µg/mL以上を示した。

表1 ESB�産生大腸菌の分類

由来	血清型	株数	CTX-M-group		
			M-1	M-1+9	M-9
糞便	O1:H6	1	1		
	O1:H12	5	2		3
	O1:HUT	2	1		1
	O25:H4	4	1	1	2
	O25:H51	1			1
	O74:H4	1			1
	O74:H5	1	1		
	O78:H9	1	1		
	O86a:HNM	1			1
	O111:H21	3			3
尿・喀痰	O15:HNM	1			1
	O25:H4	6	2		4
計	27	9	1	17	

FQ系薬剤ではCPFXおよびERFXは同一株に対し、類似した値を示す株がほとんどであった。CPFXが高い値を示したにも拘わらず、ERFXには低い値しか示さなかった株がO25:H4で1株確認された。一方、CPFXが低い値を示したにも拘わらず、ERFXが比較的高い値を示した株はO25:H4およびO111:H21の各1株確認された。CAZを除く5剤に高い値を示した血清型は、O25:H4、O1:H6およびO78:H9の3種類のみであった。

表2 ヒト由来CTX-M型基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ産生大腸菌の各性状

由来	血清型	年齢	CTX-group	系統発生群	KB法											MIC(µg/mL)												
					CTX	ABPC	NA	CPFX	SM	TC	SXT	Su	GM	KM	FOM	CP	CTX	CAZ	CTR	CPR	CPFX	ERFX						
便	O25:H4	37	M-9	B2	R <sup>1?</sup>	R	R	R	R	R	R	R											32	3	64	16	64	256
	O25:H4	57	M-1	B2	R	R	R	R		I <sup>2?</sup>													512	128	512	>256	64	256
	O25:H4	84	M-9	B2	R	R	R	R	R														64	2	128	12	32	256
	O25:H4	83	M-1,9	B2	R	R	R	R	I														256	12	128	256	64	>512
	O25:H51	25	M-9	D	R	R		R	R	R	R	R	R	R									64	0.75	128	32	64	128
	O1:H12	3	M-1	B2	R	R	R																256	8	128	24	<0.25	<0.25
	O1:H12	2	M-1	D	R	R																	32	0.75	32	8	<0.25	<0.25
	O1:H12	2	M-9	B2	R	I	R																32	0.38	32	6	<0.25	<0.25
	O1:H12	11M	M-9	B2	R	R																	128	1.5	128	16	<0.25	<0.25
	O1:H12	2	M-9	B2	R	R																	64	1	128	12	<0.25	<0.25
	O1:H6	23	M-1	B1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I								256	12	128	192	256	128
	O1:HUT	29	M-1	B2	R	R																	256	6	256	32	<0.25	<0.25
	O1:HUT	70	M-9	B2	R	R	R																32	0.5	32	6	<0.25	<0.25
	O74:H4	50	M-9	B2	R	R																	64	12	256	6	<0.25	<0.25
	O74:H5	1	M-1	B2	R	R																	128	8	256	32	<0.25	<0.25
	O78:H9	82	M-1	B2	R	R	R	R	R	R	R	R											512	12	>512	>256	16	16
	O86a:HNM	29	M-9	A	R	R	R	R	R	R	R	R											16	0.5	128	4	8	8
O111:H21	1	M-9	B1	R	R																	16	8	32	8	<0.25	16	
O111:H21	4	M-9	B1	R	R			R	R		R											16	2	32	6	<0.25	2	
O111:H21	9	M-9	B1	R	R			R	R		R											16	2	32	6	<0.25	<0.25	
尿・喀痰	O25:H4	79	M-1	B2	R	R	R	R	R	R	R	R											256	8	128	16	>256	>512
	O25:H4	75	M-9	B2	R	R	R	R															48	2	32	16	>256	>512
	O25:H4	68	M-9	B2	R	R	R	R															>256	16	>256	128	>256	>512
	O25:H4	81	M-1	B2	R	R	R	R	I		R	R											6	1	6	2	>256	>512
	O25:H4	93	M-9	B2	R	R	R	R															>256	2	>256	256	>256	<0.25
	O25:H4	94	M-9	B2	R	R	R	R															128	4	128	48	>256	>512
	O15:HNM	62	M-9	B2	R	R	R																128	1.5	256	24	0.5	4

1)R; 耐性 2)I; 中間の感受性

## 4. 考察

平成 16 年以降、福井県の散発下痢症患者由来大腸菌において、*bla*<sub>CTX-M</sub>陽性株および FQ 系薬剤耐性株が確認されるようになった<sup>6)</sup>。これまでの調査により、O25:H4、O1:H6 および O86a:H18 の 3 種類の血清型が占める割合が、平成 20 年までは 59%<sup>6)</sup>、平成 21~22 年は 43%<sup>7)</sup>であったが、今回の平成 23 年は 30%と減少した。一方、平成 20 年までは確認されていなかった O1:H12、O111:H21、O74 が、それぞれ 5 株、3 株、2 株確認され、およびこのうち 9 株が 9 歳以下の患者から分離されたことも興味深い結果であった。また、これまで泌尿器疾患等由来株で O 血清型が判明していたのは O25:H4 および O78:H9 のみで、それ以外の血清型である O15:HNM が初めて確認された。

O111:H21 の 3 株はともに *aggR* などの病原遺伝子を保有しており、病原遺伝子保有 CTX 型 ESBL 産生大腸菌を当センターで初確認したことになる。昨年の欧州の集団発生事例で分離された EHEC O104:H4 は、CTX-M-15 かつ *aggR* 遺伝子等を保有していたことが注目されたことから<sup>14)</sup>、O111:H21 の今後の動向に留意すべきである。なお、今回の EHEC O104 は、EAggEC (腸管凝集性大腸菌) O104 に *Stx2* 遺伝子を持つフェージが感染することで、毒素産生性を獲得したことが示唆されている<sup>15)</sup>

Ozawa らは我が国で特別な遺伝型の鶏に病原性のある FQ 耐性 O78 が、広く分布している可能性があることを報告している<sup>16)</sup>。ヒト由来株ではスペインにおける CTX-M-14 産生の O78:HNM の報告<sup>17)</sup>がある。また、既報<sup>7)</sup>で、我々は鶏肉および人糞便由来の性状が類似した 4 剤耐性の O78:H9 を分離したと報告したが、今回は鶏肉から検出頻度の高い 8 剤耐性の O78:H9 (CTX-M-1 group) が確認できたことから、今後は、CTX-M 型およびパルスフィールドゲル電気泳動についても調べる必要がある。

また、CTX-M-1 group の O25:H4 が 3 株確認されており、CTX-M-15、ST 131 の可能性もあることから、さらなる解析が必要である。また、O1:H6、O25:H4 および O86a:H18 の 3 種類の占める割合が低くなる傾向がみられるに対し、平成 20 年以前には確認されなかった血清型 O1:H12、O111:H21 および O74 が 2~5 株確認されたことから、今後、CTX-M 型 ESBL 産生菌の血清型の多様性を示す可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Suzuki S *et al.* Change in the prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread, *J Antimicrob Chemother*, 63, 72-79 (2009)
- 2) Warren RE *et al.* Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum- $\beta$ -lactamases in the UK, *J Antimicrob Chemother*, 61, 504-508 (2008)

- 3) Ho PL *et al.* Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to 'critically important' antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10, *J Antimicrob Chemother*, 66, 765-768 (2011)
- 4) Kiratisin P *et al.* Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic, *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2818-2824 (2008).
- 5) Doi Y *et al.* Extended-spectrum and CMY-type  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain, *Clin Microbiol Infect*, 16: 33-38, (2010)
- 6) 石畝 史他, 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, *日獣会誌*, 63, 883-887 (2010)
- 7) 石畝 史他, 鶏肉およびヒト由来 CTX-M 型基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析, *福井県衛環研年報*, 9, 33-37 (2011)
- 8) Nicolas-Chanoine MH *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15, *J Antimicrob Chemother*, 61, 273-281 (2008)
- 9) Shibata N *et al.* PCR classification of CTX-M-type  $\beta$ -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 791-795 (2006)
- 10) Clermont O *et al.* Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl Environ Microbiol*, 66, 555-558 (2000).
- 11) 伊藤文明他, 混合プライマーを用いた PCR による下痢原性大腸菌の病原遺伝子の同時検出法, *日本臨床*, 50, 343-347 (1992)
- 12) 八柳 潤他, 腸管集合性大腸菌耐熱性エンテロトキシン-1 (EAST-1) 遺伝子を保有する, 食中毒事例由来病原血清型大腸菌, *感染症誌*, 70, 73-79 (1996)
- 13) Ratchtrachenchai OA *et al.* Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR, *Bull Dept Med Sci*, 39, 211-220 (1997)
- 14) Januszkiwicz A *et al.* Molecular epidemiology of a household outbreak of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in Poland due to secondary transmission of STEC O104:H4 from Germany, *J Med Microbiol*, 61, 552-558 (2012)
- 15) 大西 真他, ドイツを中心とした EAgg-EHEC O104:H4 による大規模集団事例, *IASR*, 33, 131-132 (2012)
- 16) Ozawa M *et al.* Antimicrobial susceptibilities, serogroups, and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Diseases*, 52, 392-397 (2008)
- 17) Coelho A R *et al.* Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain), *J Antimicrob Chemother*, 66, 517-526 (2010)