

腸管出血性大腸菌の薬剤耐性について

今野貴之 八柳 潤 齊藤志保子

秋田県においては 1996 年以降、毎年 30 件前後の腸管出血性大腸菌感染事例が報告されている。薬剤耐性菌の存在は、感染症対策上、重要な問題となるが、これまで腸管出血性大腸菌分離株の薬剤耐性に係る知見はほとんど得られていない。そこで、これまで秋田県で分離された腸管出血性大腸菌のうち、特に分離頻度の高い血清型 O157, O26 及び O103 の計 223 株に対して、代表的な 12 種類の抗菌剤を用いて、KB ディスク法にて薬剤感受性試験を行った。その結果、O157 では 21.2%, O26 では 45.8%, O103 では 50.0%が何らかの薬剤に耐性を示すことが明らかとなった。また、供試菌株のうち、2004 年に分離された腸管出血性大腸菌 O103 (EC8960) が、基質拡張型 β -ラクタマーゼを産生する多剤耐性菌であること、2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 O26 (EC11170) が、治療に汎用されるホスホマイシンに耐性を示すことが確認された。

1. はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E.coli* : EHEC) による感染症は、1990 年の埼玉県幼稚園での集団感染事例、1996 年の大阪府堺市での学校給食を原因とした大規模な集団感染事例を契機にその健康被害の重要性が認識されて以来、全国各地で集団、散発感染事例が数多く報告され、その発生は現在まで続いている。EHEC は、ベロ毒素を産生する大腸菌であり、汚染された食物などを経口摂取することによって感染する。数百個の少ない菌数でも感染が成立することから、ヒトからヒトへの二次感染も問題となる。その症状は、無症候性から軽度の下痢、激しい腹痛、頻回の水様便、さらに著しい血便とともに重篤な合併症を起し死に至る場合もある。多くの場合、3～5 日の潜伏期において、激しい腹痛をともなう頻回の水様便の後に、血便となり、有症者の 6～7%において、下痢などの初発症状発現の数日から 2 週間以内に、溶血性尿毒症症候群、または脳症などの重症な合併症が発症する¹⁾。

細菌感染症においては抗菌剤による治療が基本であり、EHEC 感染症においても旧厚生省が抗菌剤による治療指針を提示している²⁾。しかしながら、最近では様々な薬剤耐性 EHEC の出現が報告され始め³⁾、その治療指針において EHEC 感染症の治療に推奨され、実際の治療にも汎用されているホスホマイシンに耐性を示す EHEC の報告も国内で散見されるようになって

きた^{4, 5)}。秋田県においては 1996 年以降、毎年 30 件前後の感染事例が報告されているが、分離株の薬剤耐性に係る知見はほとんど得られていない。薬剤耐性菌を原因とする感染症の治療は困難を伴う場合が多く、その健康被害は多大で社会問題ともなっている。このようなことから、薬剤耐性 EHEC の出現は公衆衛生上重視すべき深刻な問題であり、その侵淫実態及びその耐性化機構の解明が必要である。我々は、これまで秋田県で分離された腸管出血性大腸菌のうち、特に分離頻度の高い血清型 O157, O26 及び O103 の計 223 株に対して薬剤耐性の有無を調査した。

供試菌株のうち、2004 年に分離された EHEC O103 (EC8960) は、アンピシリン、セファロチン、セフォチアム、セフォタキシム、セフェピム、カナマイシン、ストレプトマイシンに耐性を示す多剤耐性 EHEC であること、2006 年に分離された EHEC O26 (EC11170) は、ホスホマイシンに耐性を示す菌株であることが確認された。これらの薬剤耐性は、EHEC における感染症対策上、重大な問題となる可能性があることから、その耐性化機構と耐性の伝達性についての調査結果を報告する。

2. 方 法

2.1 供試菌株

1996 年から 2004 年までに秋田県において分離された EHEC 菌株のうち、特に分離頻度の高

い O157 (137 株), O26 (72 株), O103 (14 株) を対象とした。

2.2 薬剤感受性試験

アンピシリン, セファロチン, セフォチアム, セフトジジム, セフォタキシム, セフェピム, カナマイシン, ストレプトマイシン, テトラサイクリン, ノルフロキサシン, ホスホマイシン及びクロラムフェニコールの 12 種類のセンシ・ディスク (Becton-Dickinson) を用いて, Kirby-Bauer 法により行った。

2.3 最小生育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration : MIC) 測定

アンピシリン, セフトジジム, クラブラン酸加セフトジジム, セフォタキシム, クラブラン酸加セフォタキシム及びホスホマイシンに対する MIC を E-test (アスカ純薬) を用いて測定した。

2.4 薬剤耐性遺伝子の特定

ESBL 遺伝子 (TEM, SHV, CTX-M)⁶⁻⁸⁾, ホスホマイシン耐性遺伝子 (*fosA*, *fosB*, PA1129, *orf1*)⁹⁾ に特異的なプライマーを用いて, PCR 法にて薬剤耐性遺伝子を検出した。PCR 法は 94 °C 5 分, 94 °C 30 秒-55 °C 30 秒-72 °C 1 分を 25 サイクル, 72 °C 2 分の反応条件で行った。増幅断片は pGEM®-T Vector System I (Promega) を用いて TA クローニングし, BigDye (version 3.1) Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) にて反応後, 310 DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて DNA 配列を決定した。また, 薬剤耐性の伝播に関係するインテグロン (*int1*) 及び *ISEcp1* トランスポゼース (*tnpA*) をそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いて, PCR 法にて検出した¹⁰⁾。

2.5 プラスミドプロファイル

EC8960 の持つプラスミドは Kado & Liu 変法によって精製した¹¹⁾。その後, 0.7%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した。

次に, サザン・ブロット法により β -ラクタマーゼ遺伝子の位置を特定した。プローブには, Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection

System (Amersham Biosciences) にてラベルした CTX-M の PCR 増幅断片を用いた。

2.6 プラスミドの接合伝達

プラスミドの接合伝達は液体培養法により行った¹¹⁾。レシピエントとして *E.coli* CSH-2 (ナリジク酸耐性), ドナーとして EC8960 を LB 培地にて 37 °C で一夜培養後, 9:1 の割合で混合し 37 °C で 1 時間培養した。その後, ナリジク酸セフォタキシム加 LB 寒天培地もしくはナリジク酸ホスホマイシン加 LB 寒天培地に塗抹し, 薬剤耐性の伝達性を確認した。

3. 結果と考察

3.1 秋田県における薬剤耐性EHECの侵淫実態

EHEC は, 感染力が強く, 少量の菌数で感染が成立するため, ヒトからヒトへの二次感染が問題となる。そのため, 無症状保菌者に対しても二次感染防止のため, 抗菌剤の使用による除菌が必要とされる。抗菌剤使用の是非に関しては, 当初多くの議論があったが, 厚生科学研究事業で行われた全国調査において, 早期に抗菌剤を使用した場合には HUS の発症率が低かったとの結果が報告されており, 本感染症の治療についても抗菌剤の投与が基本となる。治療のマニュアルでは, EHEC に有効な抗菌剤としてホスホマイシン, ノルフロキサシン, カナマイシンの 3 剤を推奨している。しかしながら, 薬剤耐性を示す EHEC が 1990 年以降増加していることが報告されている。秋田県内における EHEC 分離株の薬剤感受性を調査した結果, 供試した 12 薬剤のうち何らかの抗菌剤に耐性を示した菌株は, O157 で 137 株中 29 株, O26 で 72 株中 33 株, O103 で 14 株中 7 株存在した (表 1)。秋田県においても, 分離される EHEC の約 3 割は何らかの薬剤に耐性を持つことが明らかとなった。これまで EHEC の主要な薬剤耐性パターンはアンピシリン, ストレプトマイシン, テトラサイクリン, クロラムフェニコールのいずれか単剤, もしくはこれらの組み合わせたものが多いとされていた¹¹⁾。秋田県の EHEC の薬剤耐性は, O157 でテトラサイクリン耐性, O26 でアンピシリンとストレプトマイシン耐性が多い傾向を示した。また, 近年では新薬の開発とは別に, ペニシリンに代表される従来型の抗菌

剤が再評価され、臨床での使用が推奨されている。アンピシリンは、大腸菌のようなグラム陰性桿菌にも有効なペニシリン系抗菌剤であるが、EHECの多くが耐性を示したことから、治療に用いる際は留意する必要がある。

表1 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性パターン

ABPC:ampicillin, TC:tetracycline, SM:streptomycin, KM:kanamycin, CET:cefalotin, CTM: cefotiam, CTX:cefotaxime, CFPM:cefepime, CP:chloramphenicol FOM:fosfomycin

Serogroup	Number of strains	Number of resistant strains(%)	Resistance patterns of strains(%)
O157	137	29(21.2)	ABPC
			4 (13.8)
			TC
			12 (41.4)
			ABPC, TC
			1 (3.4)
O26	72	33(45.8)	ABPC, SM
			3 (10.4)
			TC, SM
			8 (27.6)
			TC, SM, CP
			1 (3.4)
O103	14	7(50)	ABPC
			7 (21.2)
			ABPC, TC
			3 (9.1)
			ABPC, SM
			16 (48.5)
			TC, SM
			1 (3.0)
			KM, SM
			1 (3.0)
			ABPC, TC, SM
			2 (6.1)
			ABPC, TC, KM, SM
			2 (6.1)
			ABPC, TC, SM, FOM
			1 (3.0)
			ABPC, CFPM, CET, CTM, CTX, TC, KM, SM
			1 (14.3)

3.2 多剤耐性EHEC O103 (EC8960) の性状

山本ら^{1,3)}は、EHEC198株について41種類の薬剤について感受性を調査し、アンピシリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、ナリジク酸、クロラムフェニコール、サルファメトキサゾール及びホスホマイシンに対する耐性菌の存在を確認したが、治療に推奨されているニューキノロン系や第三代セフェムを含むセフェム系に関しては供試菌株すべてが高度感受性であったと報告している。

秋田県の分離株では、2004年8月2日に下痢症患者から分離されたEC8960が、セフェム系抗菌剤に強い耐性を示した。

MICの測定結果は、アンピシリンに256 µg/ml以上、セフォタキシムに96 µg/mlであった。セフォタキシムに対する耐性はβ-ラクタマーゼの阻害剤であるクラブラン酸の添加によって抑制された。このことから、クラスA-β-ラクタマーゼの産生が予想された。そこで、クラスA-β-ラクタマーゼ遺伝子に属するTEM, CTX-M, SHVの検出を試みた。その結果、耐性遺伝子として bla_{TEM-1} と $bla_{CTX-M-14}$ を持ち、CTX-M-14型

ESBLを産生することが確認された。また、耐性化に関わる因子としてクラス1-インテグロンは持たないが、一部のCTX-M型ESBL遺伝子の伝播に関与するとされているISEcp1トランスポゼース($tnpA$)^{1,4)}を保持していた。

耐性遺伝子の位置を特定するため、プラスミドプロファイリングを行ったが、プラスミド上には耐性遺伝子は検出されず、染色体上に位置することが確認された。プラスミドの接合伝達においても、レシピエントに耐性は伝達しなかった。

最近になって、Ishiiら⁴⁾とKonら⁵⁾がそれぞれ血清型O26においてESBL産生菌の存在を報告した。ESBLの型は、それぞれCTX-M-18型とCTX-M-3型であり、いずれもRプラスミド上に存在し、他の菌に接合伝達することが確認されている。しかしながら、EC8960のように血清型がO103でESBL遺伝子を染色体上に持ち、トランスポゾンによって耐性化したと考えられるEHECは、我々によってはじめて確認された。

以上のことを考え合わせると、EHECの中で多剤耐性化が進行している可能性があり、今後、多剤耐性菌蔓延防止のための薬剤耐性菌の監視の必要性が示唆された。

3.3 ホスホマイシン耐性EHEC O26 の性状

ホスホマイシンは安全性が高く、腸管への移行性に優れているため、腸炎を伴う感染症に高い抗菌効果を示す。特に小児ではEHEC感染症における治療の第1選択剤とされている。2006年に分離されたEHEC O26の1株は、ホスホマイシンに耐性を示した。MICの測定結果は、192 µg/mlであり、強い耐性を示した。調査対象とした耐性遺伝子($fosA$, $fosB$, PA1129, $orf1$)についてはすべて陰性であり、耐性の伝達性も確認されなかった。ホスホマイシンに耐性を示すEHECは、国内で数例確認されているが^{4,5)}、ほとんどその耐性化機構は明らかとなっていない。しかしながら、ホスホマイシンに対しては試験管内の検討で耐性菌が出現しやすいといった報告^{1,5)}もあることから、今後このような耐性菌が広く出現する可能性があり、大いに危惧される。

4. まとめ

- ・ O157 で 29 株 (21.2%), O26 で 33 株 (45.8%), O103 で 7 株 (50.0%), 合計 69 株が何らかの抗菌剤に耐性を示すという, 秋田県における薬剤耐性 EHEC の侵淫実態を明らかにした。
- ・ 染色体上に *bla*_{CTX-M-14} ESBL 遺伝子と耐性遺伝子の伝達に関与する *ISEcp1* トランスポゼースを持った多剤耐性 EHEC を確認した。
- ・ 臨床面から危惧されるホスホマイシン耐性菌の存在を明らかにした。

5. 文献

- 1) Karmali MA.: Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, *Clin. Microb. Rev.*, **2**, 1989, 15-38.
- 2) 厚生省, 一次、二次医療機関のための腸管出血性大腸菌 (O157 等) 感染症治療の手引き (改訂版), 1997.
- 3) Kim HH., Samadpour M., Grimm L., Clausen CR., Besser TE., Baylor M., Kobayashi JM., Neill MA., Schoenkecht FD., and Tarr PI.: Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State, 1984-1991, *J Infect Dis.*, **170**, 1994, 1606-1609.
- 4) Ishii Y., Kimura S., Alba J., Shioto K., Otsuka M., Hashizume N., Tamura K., and Yamaguchi K.: Extended-spectrum beta-lactamase-producing Shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11: a new concern, *J clin Microbiol.*, **43**, 2005, 1072-1075.
- 5) Kon M., Kurazono T., Ohshima M., Yamaguchi M., Morita K., Watanabe N., Kanamori M., and Matsushita S.: Cefotaxime-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 isolated from a patient with diarrhea, *Kansenshogaku Zasshi*, **79**, 2005, 161-168.
- 6) Perilli M., Dell'Amico E., Segatore B., de Massis MR., Bianchi C., Luzzaro F., Rossolini GM., Toniolo A., Nicoletti G., and Amicosante G.: Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey, *J Clin Microbiol.*, **40**, 2002, 611-614.
- 7) Colom K., Perez J., Alonso R., Fernandez-Aranguiz A., Larino E., and Cisterna R.: Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*_{TEM}, *bla*(SHV) and *bla*_{OXA-1} genes in Enterobacteriaceae, *FEMS Microbiol Lett.*, **223**, 2003, 147-151.
- 8) Pagani L., Dell'Amico E., Migliavacca R., D'Andrea MM., Giacobone E., Amicosante G., Romero E., and Rossolini GM.: Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy, *J Clin Microbiol.*, **41**, 2003, 4264-4269.
- 9) Yatsuyanagi J., Saito S., Konno T., Harata S., Suzuki N., and Amano K.: The ORF1 gene located on the class-1-integron-associated gene cassette actually represents a novel fosfomycin resistance determinant, *Antimicrob Agents Chemother.*, **49**, 2005, 2573.
- 10) Bou G., Cartelle M., Tomas M., Canle D., Molina F., Moure R., Eiros JM., and Guerrero A.: Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain, *J Clin Microbiol.*, **40**, 2002, 4030-4036.
- 11) 日本細菌学会教育委員会: R プラスミドの分子遺伝学の実験法, *細菌学技術叢書*, **4**, 1983.
- 12) Schroeder CM., Meng J., Zhao S., DebRoy C., Torcolini J., Zhao C., McDermott PF., Wagner DD., Walker RD., and White DG.: Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans, *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, 2002, 1409-1414.
- 13) 山本達男, 脇坂紀子: 本邦における抗菌薬耐性腸管出血性大腸菌の出現状況と対策, *日本臨牀*, **56**, 1998, 2718-2729.
- 14) Lartigue MF., Poirel L., and Nordmann P.: Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes, *FEMS Microbiol Lett.*, **234**, 2004, 201-207.
- 15) Nilsson AI., Berg OG., Aspevall O., Kahlmeter G., and Andersson DI.: Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother.*, **47**, 2003, 2850-2858.