

秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況

八柳 潤 今野貴之 齊藤志保子

平成 15 年から 23 年まで、県内の医療機関から受領した 963 株の ESBL 疑い株のうち、680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有 ESBL であった。CTX-M 遺伝子保有株の 51.2%が *Escherichia coli*, 42.2%が *Proteus mirabilis* であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4%を占め、また、66.8%が尿由来であった。181 株の CTX-M 遺伝子を型別した結果、CTX-M9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M2 グループが 68 株と続き、CTX-M1 グループが 36 株であった。36 株の CTX-M1 グループ遺伝子保有株はすべて *E. coli* であり、CTX-M 遺伝子のシークエンスを解析した結果、すべて CTX-M15 であることが明らかとなった。秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。とりわけ、CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 型 ESBL 遺伝子保有 *E. coli* が県内に侵淫していることを県内の医療機関に周知し、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。

1. 緒言

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) とは、主にペニシリンを分解する ClassA β -ラクタマーゼである TEM-1, TEM-2, SHV-1 の基質特異性が、構造遺伝子の「ポイントミューテーション」により拡張し、第三世代のセフェム系抗生物質 (セフトキシム: CTX, セフトジム: CAZ 等) を分解する能力を獲得した β -ラクタマーゼを指す。また、これらと同様の基質特異性を有し、*Kluyvella* 属菌の染色体性 β -ラクタマーゼに由来する CTX-M 型 β -ラクタマーゼも ESBL とされている。ESBL 産生菌は昭和 58 年(1983 年)に世界で初めて Knothe らにより ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* および *Serratia marcescens* として報告された¹⁾。日本においては平成 7 年に石井が Toho-1 型 (CTX-M 型) ESBL 産生 *Escherichia coli* を報告したのが最初である²⁾。日本では欧米と異なり TEM 型, SHV 型の ESBL 産生菌の報告は非常に少なく、CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度が高い。なお、近年、欧米においても TEM-型や SHV-型に代わり、CTX-M 型が ESBL の主流となってきた^{3,4)}。

地方衛生研究所においては、EHEC やサルモネラ、カンピロバクター等の腸管系細菌の侵淫実態や疫学についてはこれまでに各種の調査研

究を実施してきた実績があるが、ESBL を含む薬剤耐性菌の調査研究実績は乏しいのが現状である。

我々は、医療機関検査室からの要望に応じて平成 15 年 1 月から PCR 法による ESBL の確認を実施してきた。今回、平成 15 年 1 月から 23 年 8 月までに実施した ESBL 検査の結果、特に CTX-M 型 ESBL の分離状況等について報告する。

2. 方法

2.1 CTX-M 型 ESBL 遺伝子の検出

平成 15 年 1 月 24 日から平成 22 年 3 月 31 日までに県内の医療機関から合計 963 株の ESBL 疑い株が送付された。これらの株について TEM, SHV, CTX-M 遺伝子を標的とする PCR を実施した。CTX-M 遺伝子の検出には表 1 に示す Pagani ら⁵⁾が報告した CTX-MU1/CTX-MU2 プライマーを使用した。

2.2 CTX-M 遺伝子の型別

平成 22 年 9 月 13 日から 23 年 8 月 1 日に同定した 181 株の CTX-M 遺伝子陽性株について、表 1 に示すプライマーを使用する PCR により、CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループに型別した。CTX-M1 グループの株については、表 1 に示す CTX-M1GFJYM13Fmod ,

CTX-M1GRJYM13Rmod プライマーを使用する PCR により CTX-M 遺伝子全長を増幅し、シーケンスプライマー M13Fmod60, M13Rmod60 を使用して DNA シーケンスを決定し、BLAST により CTX-M 遺伝子の型を特定した。

3. 結果

3.1 秋田県における CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の検出状況

図 1 に平成 15 年 1 月 24 日から 22 年 12 月 31 日の CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況を示す。平成 15 年から 22 年まで、医療機関から合計 963 株の ESBL 疑い株の検査依頼を受け、そのうち 680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性であった。この間、検査依頼数、CTX-M 遺伝子陽性株数共に増加傾向にあった。なお、TEM 型と SHV 型 ESBL 遺伝子陽性株は各 1 株 (TEM-104, SHV-12⁶⁾) 検出されたのみであった。

表 2 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の由来を示す。由来が記載されていた 301 株のうち、206 株 (68.4%) が尿由来株であり、CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株が尿路感染に関与する頻度が高いことが示された。また、19 株が血液由来とされていることから、ESBL 遺伝子陽性株による敗血症患者が発生していることが伺われた。

表 3 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の菌種を示す。菌種が記載されていた 502 株のうち、*E.coli* が 257 株 (51.2%)、*P.mirabilis* が 212 株 (42.2%) であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4% を占めていた。

3.2 CTX-M 遺伝子の型別結果

表 4 に 181 株の CTX-M 遺伝子の型別結果を示す。CTX-M9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M2 グループが 68 株と続き、CTX-M1 グループが 36 株であった。また、今回使用したプライマーの CTX-M2 グループと CTX-M9 グループ両者に反応する株が 4 株、そしていずれとも反応しない型別不能の UT 株が 4 株認められた。CTX-M 型の分布には菌種により特徴的な傾向がみられ、*P.mirabilis* は 46 株中 45 株が CTX-M2 グループの ESBL 遺伝子を保有していたのに対して、*E.coli* では CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループ、CTX-M2/9 グループ、UT の全てが確認された。

CTX-M1 グループ 36 株について遺伝子全長の

シーケンスを決定して CTX-M 遺伝子の型を特定したところ、35 株の遺伝子が CTX-M15、1 株の遺伝子が CTX-M61 であることが判明した。データは示さないが、CTX-M15 型遺伝子保有株には KB 法による CAZ ディスクに対する阻止円の直径が 0 mm の株から 21 mm の株までが認められ、CTX-M15 遺伝子保有株の CAZ 耐性は、株により異なることが示された。

4. 考察

近年、CTX-M 型 ESBL が世界的に ESBL の主流となっている^{3,4)}。今回、我々は秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が既に広く侵淫していること、そして分離株数が平成 15 年以降、顕著に増加していることを示した。供試株に占める CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の割合は、平成 15 年には約 45% であったのに対して、22 年には約 86% となった。これは、ESBL 産生株が薬剤耐性菌として注目された平成 15 年当時は、医療機関において未だバイテックなどの自動同定装置による ESBL のスクリーニング検査法が普及していなかったことに起因すると推察される。現在は、クラブラン酸の阻害効果を利用した ESBL スクリーニング検査法が医療機関検査室に普及し、ESBL 産生疑い株を効率よく特定できると考えられる。なお、ESBL 産生が疑われながら、TEM, SHV, CTX-M 遺伝子のいずれも検出されなかった株の菌種は *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* などであり、これらは AmpC の過剰産生など、ESBL 産生とは異なる機構により CTX, CAZ などに耐性を示すと考えられる。

ESBL 産生菌感染のリスクファクターについて、Pena らは疾病の重症度、ICU および長期入院、気管内挿管、人工呼吸、カテーテルの挿入などが関与することを指摘している⁷⁾。今回、我々は ESBL 遺伝子保有株の由来として尿が最も高頻度であることを示した。尿由来とした株について、医療機関から菌株に添付された情報を詳細にみると、その多くがカテーテル尿由来である。尿道カテーテル留置患者の多くは高齢の長期入院患者であると推察され、我々の結果もこれらの患者が ESBL 産生株感染のハイリスク群であることを裏付けると考えられる。

今回の成績から秋田県では CTX-M 型 ESBL 遺

伝子保有株の 51.2%を *E.coli*, 42.2%を *P.mirabilis* が占め、これら 2 菌種が全体の 93.4%を占めることが示された。Shibata らが平成 13 年から 15 年に全国調査をした成績⁸⁾においても類似の傾向がみられ、CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株のうち分離数が多い菌種は上位から *E.coli*, *P.mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* であり、CTX-M 型 ESBL 産生菌の中で *P.mirabilis* が *E.coli* に次いで分離頻度が高い。*P. mirabilis* は主に尿路感染症を引き起こす病原微生物である⁹⁾が、ampicillin をはじめとする β -lactam 薬に対する感受性が良好であること、重篤な感染症の原因菌となる頻度が低いことなどから臨床あまり重要視されてこなかった。しかし、CTX-M2 型 ESBL 産生 *P. mirabilis* による院内感染も報告¹⁰⁾されており、今後院内感染起因菌としても注目すべき菌種と考えられる。

CTX-M 遺伝子はアミノ酸配列の相同性から CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M8 グループ、CTX-M25 グループ、そして CTX-M9 グループに分類される³⁾。これらのうち、CTX-M8 グループには 1 種類、CTX-M25 グループには 2 種類の型しか属さない。このため、我々は CTX-M1, M2, M9 グループと特異的に反応するプライマーを設計して、平成 22 年 9 月 13 日から 23 年 8 月 1 日に同定した CTX-M 遺伝子陽性株 181 株について CTX-M 遺伝子を型別した。その結果、*P.mirabilis* は 46 株中 45 株が CTX-M2 グループ遺伝子を保有していた。Shibata らの報告⁸⁾においても、供試した *P.mirabilis* 71 株全てが CTX-M2 グループ遺伝子を保有することが示されている。一方、大腸菌には CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループに加えて、今回供試したプライマーのいずれとも反応しない株 (UT) がみられた。これらのうち、UT となった株の遺伝子は CTX-M8 グループか CTX-M25 グループに属する可能性があり、その同定は今後の課題である。また、CTX-M2/9 となった遺伝子についても、遺伝子型を特定するために全長をシーケンスする必要がある。

一方、CTX-M1 グループに型別された 36 株のうち、35 株が CTX-M15 であること、1 株が CTX-M61 であることが判明した。CTX-M 型 ESBL 産生株は通常、CTX に耐性を示すが CAZ には感受性である。しかし、CTX-M15 は CTX-M3

がポイントミューテーション (D240G 変異) により基質特異性が拡張し、CAZ 加水分解能を獲得した CTX-M 型 ESBL であり^{11,12)}、近年、ヨーロッパにおいて問題となっている¹³⁾。国内においても少数の報告^{14,15)}があるが、現時点では問題視されるには至っていない。今回我々の検討により、CTX-M15 型 ESBL 産生菌が秋田県に既に侵淫していることが示された。この菌は臨床に汎用されている CAZ に耐性を示すことから、通常の CTX-M 型 ESBL 産生菌よりも臨床問題となる。確認された CTX-M15 型 ESBL 産生菌は全て大腸菌であり、県央の医療機関において最も多く分離されているが、県北、県南、本荘由利地域の医療機関においても分離されていることから、県内に広く侵淫していることが明らかとなった。CTX-M15 遺伝子保有株の CAZ 耐性は株により異なる傾向がみられた。その原因は明らかではないが、CTX-M15 遺伝子保有株は *ISEcp1B* 遺伝子を保有し、これがプロモーターとして機能し、CTX-M15 遺伝子の発現に関与している¹⁶⁾ことから、この調整機構がその耐性発現の違いに関与する可能性も考えられ、今後の検討が必要である。なお、CTX-M61 は CAZ 耐性に関与する D240G 変異を保有せず、CTX-M1 遺伝子に 1 か所の変異が生じて派生したタイプである。

5. まとめ

秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。CTX-M 型 ESBL 産生菌は主として尿路感染を惹起していたことから、今後も院内感染起因菌として注目する必要がある。とりわけ、CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 型 ESBL 遺伝子保有株が県内に侵淫していることを県内の医療機関に周知し、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。

CTX-M15 を含む CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が県内の健常人に侵淫しているかどうか、そして市販食品に分布しているかどうかなど、感染疫学解明のためのさらなる検討が必要である。

参考文献

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al.: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin,

- cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*, *Infection*, **11**, 6, 1983, 315-317.
- 2) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al.: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **39**, 10, 1995, 2269-2275.
 - 3) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum beta-lactamase, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 1, 2004, 1-14.
 - 4) Canton R, Coque TM: The CTX-M beta-lactamase pandemic, *Current Opinion in Microbiology*, **9**, 5, 2006, 466-475.
 - 5) Pagani L, Dell'Amico E, Roberta Migliavacca R, et al.: Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum beta-Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, **9**, 2003, 4264-4269.
 - 6) 今野貴之, 八柳 潤, 齊藤志保子, 小沼譲 他: 秋田県において初めて確認された SHV-12 型 ESBL 産生大腸菌について, 病原微生物検出情報, **31**, 7, 2010.
 - 7) Pena C, Pujol M, Ricart A, et al.: Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit, *J. Hosp. Infect.*, **35**, 1, 1997, 9-16.
 - 8) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al.: PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2, 2006, 791-795.
 - 9) Rozalski A, Sidoreczyk Z, Kotelko K: Potential virulence factors of *Proteus* bacilli, *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 1, 1997, 65-89.
 - 10) Nagano N, Shibata N, Saitou Y, et al.: Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended-spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase, *J Clin Microbiol.*, **41**, 12, 2003, 5530-5536.
 - 11) Karim A, Poirel L, Nagarajan S et al.: Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1, *FEMS Microbiology Letters*, **201**, 2, 2001, 237-41.
 - 12) Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P: Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3, *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 6, 2002, 1031-1034
 - 13) Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al.: Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **25**, 2, 2005, 157-162.
 - 14) 大隈雅紀, 村谷哲郎, 松本哲朗 他: UOE-1 (CTX-M-15) type beta-lactamase 産生 *Escherichia coli* による敗血症患者の臨床経過と細菌学的検討, 日本化学療法学会雑誌, **52**, 4, 2004, 223-227.
 - 15) 村谷哲郎, 小林とも子, 後藤令子 他: 基質特異性拡張型 beta-lactamase 産生 *Escherichia coli* に対する各種抗菌薬の抗菌力, 日本化学療法学会雑誌, **52**, 10, 2004, 556-567.
 - 16) Poirel L, Decousser JW, Nordman P: Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} beta-lactamase gene, *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 9, 2003, 2938-2945.

表 1 CTX-M 遺伝子検出，型別，シーケンス用プライマー

名称	配列 (5'→3')	増幅断片
CTX-MU1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	593 bp
CTX-MU2	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	
CTX-M1GF	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CG	876 bp
CTX-M1GR	TTA CAA ACC GTA GGT GAC	
CTX-M2GF	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CGC C	876 bp
CTX-M2GR	TCA GAA ACC GTG GGT TAC	
CTX-M9GF	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA	876 bp
CTX-M9GR	TCA CAG CCC TTC GGC GAT	
CTX-M1GFJYM13Fmod	TT AC TGT AAA ACG ACG GCC AGT ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGY C	920 bp
CTX-M1GRJYM13Rmod	TT AC CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTA CAA ACC GTC GGT GAC GAT	
M13Fmod60	AC TGT AAA ACG ACG GCC AGT	—
M13Rmod60	AC CAG GAA ACA GCT ATG ACC	—

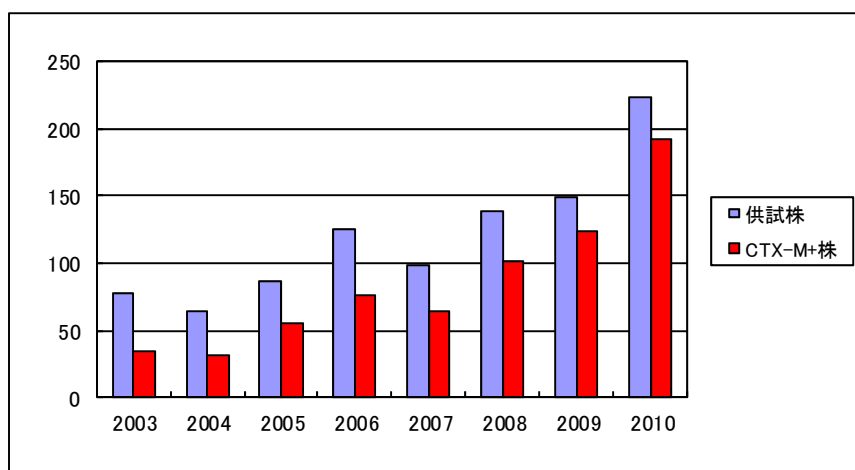


図 1 秋田県における CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況 (2003. 1. 24-2010. 12. 31)

表 2 CTX-M 遺伝子陽性株 (680 株) の由来

由来	株数	由来	株数
不明	379	膿	3
尿	206	腹水	3
喀痰	41	胆汁	2
血液	19	咽頭	1
膿	11	子宮	1
便	4	耳漏	1
創部	4	髄液	1
浸出液	3	泌尿器	1

表 3 CTX-M 遺伝子陽性株（680 株）の菌種

菌種	株数	菌種	株数
菌種不明	178	<i>K.oxytoca</i>	1
<i>E.coli</i>	257	<i>E.aerogenes</i>	1
<i>P.mirabilis</i>	212	<i>Providencia spp.</i>	1
<i>K.pneumonia</i>	22	<i>Klebsiella spp.</i>	1
<i>P.stuatii</i>	4	<i>C.broakii</i>	1
<i>P.vulgaris</i>	1	<i>M.morganii</i>	1

表 4 CTX-M 遺伝子の型別結果

菌種	CTX-M 型					計
	1	2	9	2/9	UT	
<i>E. coli</i>	36	12	49	4	2	103
<i>P. mirabilis</i>		45			1	46
<i>K. pneumoniae</i>		3				3
<i>C. broakii</i>		1				1
<i>M. morganii</i>		1				1
菌種不明		6	20		1	7
計	36	68	69	4	4	181