

厚生労働科学研究費補助金「地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究」（平成 18 年度～）

秋田県内の医療機関、鶏肉、市中における CTX-M 型基質拡張型

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 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子 齊藤志保子

CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染疫学に関する知見は乏しい。2003 年 1 月 24 日から 2012 年 10 月 5 日に医療機関から送付された 1,427 株中 1,103 株（77.3%）が CTX-M 遺伝子陽性であり、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。秋田市内で購入した鶏肉 35 検体中 18 検体から CTX-M 遺伝子保有株が検出され、そのうち 3 株が D240G 変異を有する CTX-M15、又は CTX-M15/27 遺伝子保有株であった。市中検便計 269 検体中 20 検体から CTX-M 遺伝子保有株が分離され、そのうち 2 株が D240G 変異を有する CTX-M15、又は CTX-M27 遺伝子保有株であった。以上の結果は、秋田県において CTX-M 遺伝子保有株、特に D240G 変異により CAZ 耐性も獲得した CTX-M15 等遺伝子保有株が、医療機関だけではなく、市中にも侵淫していることを示しており、その感染源として鶏肉が重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられた。当該株が今後も鶏肉を介して秋田県内の市中と医療機関への侵淫を拡大する可能性及び当該株が尿路感染を介した院内感染原因菌として今後更に問題となる可能性について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）産生菌とは主にペニシリンを分解する TEM-1、TEM-2、SHV-1 型ペニシリナーゼ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* 属菌の染色体に由来するとされる CTX-M 型 β -ラクタマーゼも ESBL に分類されている。近年、CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度は世界的にも増加し、欧米においても TEM-型や SHV-型に代わり、CTX-M 型が ESBL の主流となってきている^{1,2)}。

我々は前報³⁾で 2003 年から 2010 年までに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 遺伝子陽性菌であることを示し、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を明らかにした。加えて、CTX-M3 がポイントミューテーション（D240G 変異）により CAZ にも耐性

を獲得した CTX-M15 遺伝子を保有する *E. coli* が県内に侵淫していることを初めて確認した。

CTX-M 型 ESBL 産生菌は既に国内の医療機関に広く侵淫していると推察されるものの、国内における CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染疫学に関する知見は乏しい。CTX-M 型 ESBL 産生菌が鶏肉や牛直腸便、外来患者から検出されたとする報告が散見^{4,5)}されることから、CTX-M 型 ESBL 産生菌が食品を介してヒトに感染している可能性や、市中の感染者が感染源となり侵淫を拡大している可能性が考えられるがその詳細は不明である。秋田県においても CTX-M 遺伝子陽性株の医療機関における分離数は我々が調査を開始した 2003 年以降毎年増加し、侵淫が拡大していることは明らかであるものの、その背景と考えられる汚染食品の種別や食品汚染状況、市中への侵淫状況は不明であった。

これらのことから、我々は 2011 年 10 月から 2012 年 12 月にかけて秋田市内で購入した鶏肉、業態者、集団下痢患者等（いずれも市中）について CTX-M 遺伝子陽性株を検索したので、その結果及び分離株の解析結果と、2003 年 1 月 24

日から 2012 年 10 月 5 日に医療機関から ESBL 遺伝子精査依頼をされた 1,427 株の解析結果について報告する。

2. 方法

2.1 供試検体

2003 年 1 月 24 日から 2012 年 10 月 5 日までに県内の医療機関から送付された ESBL 産生疑い株 1,427 株を供試した。2011 年 10 月から 2012 年 10 月に秋田市内のスーパー等で購入した鶏肉 35 検体を食品汚染状況調査に供した。また、2012 年 6 月 (86 検体) と 10 月 (79 検体) に実施した業態者検便計 165 検体、2012 年 8 月から 2013 年 3 月に発生した集団下痢症等患者と家族の検便計 104 検体を市中感染調査に供した。

2.2 鶏肉と業態者・集団下痢症患者等検便からの CTX-M 遺伝子陽性の分離

CTX-M 遺伝子陽性株の分離には CTX を 4 µg/ml 添加したマッコンキー寒天平板を使用し、検便は直接分離培養 (37°C 1 夜) した。鶏肉は 25 g を Buffered Pepton Water 225 ml に投入して攪拌した後、37°C で 1 夜培養し、その培養液を同平板により分離培養 (37°C 1 夜) した。平板上に生じたコロニーを釣菌し、CTX-M 遺伝子の確認に供した。なお、必要に応じて AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学, Mast Diagnostics 製造) を使用して ESBL と AmpC 産生を確認した。

2.3 CTX-M 型 ESBL 遺伝子の検出と型別

前報³⁾と同様に、CTX-M 型 ESBL 遺伝子の検出と型別には表 1 に示すプライマーを使用した。CTX-M 遺伝子の検出には Pagani ら⁶⁾が報告した CTX-MU1/MU2 プライマーを使用した。検出された CTX-M 遺伝子は CTX-MIG F/R, CTX-M2 G F/T, CTX-M9G F/R プライマーを使用し、CTX-M1 グループ (CTX-M-1G), CTX-M2 グループ (CTX-M2G), CTX-M9 グループ (CTX-M9G) に型別した。CTX-M1G 遺伝子は CTX-M1G FJYM13Fmod, CTX-M1GRJYM13Rmod プライマーを使用する PCR により遺伝子の全長を増幅し、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 遺伝子の型を決定した。

2.4 感受性試験

鶏肉と検便から検出された CTX-M1G 遺伝子陽性株について、ドライプレート栄研 (栄研化学) DPD-1 を使用して CTX と CAZ に対する MIC を測定した。

3. 結果

3.1 医療機関における CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の検出状況

図 1 に 2003 年 1 月 24 日から 2012 年 10 月 5 日までの CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況を示

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

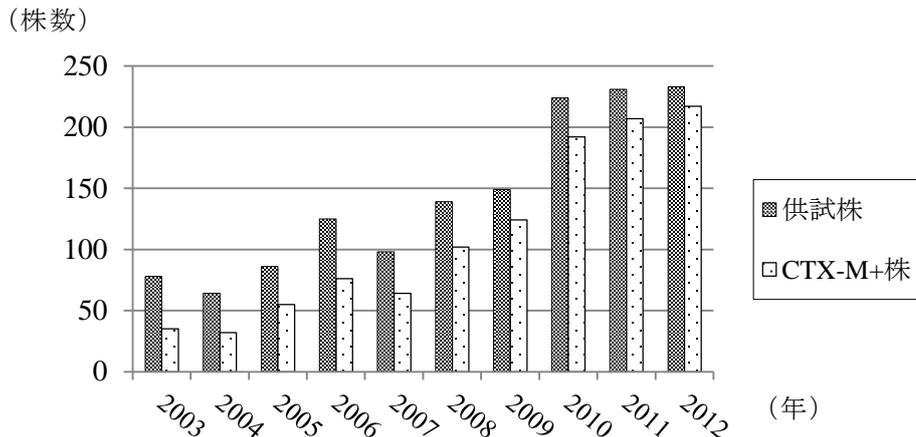


図1 秋田県における CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況 (2003. 1. 24-2012. 10. 5)

す。この期間に医療機関から送付された 1,427 株中 1,103 株 (77.3%) が CTX-M 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。

表 2 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の由来を示す。1,103 株のうち、395 株 (35.8%) が尿由来株であった。これは、由来が記載された 618 株の約 64 株に該当し、CTX-M 遺伝子陽性株が高頻度に尿路感染を惹起していることが示された。また、32 株が血液由来であり、CTX-M 遺伝子陽性株が敗血症の原因となっていることも示唆された。

表 3 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の菌種を示す。1,103 株のうち、*E.coli* が 501 株 (45.4%)、

P.mirabilis が 313 株 (28.4%) であり、この 2 菌種が CTX-M 遺伝子陽性株の 73.8% を占めていた。

3.2 鶏肉と業態者・集団下痢症患者等検便が CTX-M 遺伝子陽性の検出状況

表 4 に鶏肉 35 検体、業態者検便 165 検体、集団下痢症患者等検便 104 検体からの CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況を示す。鶏肉 35 検体中 18 検体から CTX-M 遺伝子陽性株が分離され、その内訳は CTX-M1G 11 株、CTX-M2G 4 株、CTX-M9G 3 株であった。一方、業態者 165 名、集団下痢症患者等 104 名の検便計 269 検体 (市中) 中 20 検体から CTX-M 遺伝子陽性株が分離

表 2 CTX-M 遺伝子陽性株 (1,103 株) の由来

由来	株数	(%)
尿	395	(35.8)
喀痰	77	(7.0)
血液	32	(2.9)
膿	18	(1.6)
その他	96	(8.7)
不明	485	(44.0)

表 3 CTX-M 遺伝子陽性株 (1,103 株) の菌種

菌種	株数	(%)
<i>E.coli</i>	501	(45.4)
<i>P.mirabilis</i>	313	(28.4)
<i>K.pneumoniae</i>	27	(2.4)
<i>Providencia stuartii</i>	4	(0.4)
<i>E.cloacae</i>	3	(0.3)
その他	11	(1.0)
不明	244	(22.1)

表 4 鶏肉と業態者・集団下痢症等検便からの CTX-M 遺伝子陽性株検出状況

検体種別	検体数	CTX-M 遺伝子陽性株数		
		CTX-M1G	CTX-M2G	CTX-M9G
鶏肉	35	11	4	3
業態者	165	1	2	11
集団下痢等	104	1	0	5

され、その内訳は CTX-M1G 2 株、CTX-M2G 2 株、CTX-M9 16 株であった。以上の結果から、秋田県内で市販されている鶏肉中に CTX-M 遺伝子陽性株が存在していること及び CTM-X 遺伝子保有株が秋田県内で市中感染を惹起していることが初めて確認された。

表 5 に鶏肉と業態者・集団下痢症等検便から分離された CTX-M1G 遺伝子保有株の CTX-M 遺伝子型、D240G 変異の有無、CTX と CAZ に対する MIC を示す。鶏肉から分離された 11 株のうち 8 株が D240G 変異を保有しない TX-M1、又は CTX-M1/61 遺伝子を保有する株であった。一方、残り 3 株は D240G 変異を保有する CTX-M15、又は CTX-M15/27 遺伝子を保有する株であった。なお、CTX-M1/61 遺伝子とは、今回実施したシーケンス解析では CTX-M1 か CTX-M61 かを決定できなかった遺伝子を指し、CTX-M15/27 遺伝子も同様に、CTX-M15 か CTX-M27 かを決定出来なかった遺伝子を指す。業態者から分離された 1 株は CTX-M79 遺伝子、集団下痢症患者から分離された 1 株は CTX-M15 遺伝子を保有する株であり、いずれも D240G 変異を保有していた。以上の分離株計 13 株のうち、D240G 変異を有しない CTX-M 遺伝子を保有する 8 株の CAZ に対する MIC は ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ か 2 $\mu\text{g/ml}$ であったのに対して、D240G 変

異を有する CTX-M 遺伝子を保有する 5 株の CAZ に対する MIC は 8, 16, 32 $\mu\text{g/ml}$ であった。

4. 考察

近年、CTX-M 型 ESBL が世界的に ESBL の主流となっている^{1,2)}。前回、我々は秋田県の医療機関に CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が広く浸淫していること、そして分離株数が 2003 年以降、顕著に増加していることを示した。今回示した 2012 年 10 月までの成績においても、秋田県内の医療機関における CTX-M 遺伝子陽性株の増加傾向は続いている。今回示した成績においても、CTX-M 遺伝子陽性株の由来としては尿が最も高頻度であることが示された。尿は院内感染の感染源として重要視されており、CTX-M 遺伝子陽性株による院内感染については、今後さらなる警戒と対策が必要であると考えられる。

今回の成績においても CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株 1,103 株のうち、*E.coli* が 501 株 (45.4%)、*P.mirabilis* が 313 株 (28.4%) を占め、この 2 菌種が CTX-M 遺伝子陽性株の 73.8% を占めることが示された。Shibata らが 2001 年から 2003 年に全国調査をした成績⁷⁾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

表 5 鶏肉と業態者・集団下痢症等検便から分離された CTX-M1G 遺伝子保有株の CTX-M 遺伝子型、D240G 変異、CTX と CAZ に対する MIC

検体	CTX-M 遺伝子型	D240G	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			CTX	CAZ
鶏肉 9/24-3	CTX-M1/61	—	32	≤ 1
鶏肉 9/24-5	CTX-M1/61	—	32	≤ 1
鶏肉 10/1-8	CTX-M1/61	—	16	≤ 1
鶏肉 10/1-9	CTX-M1/61	—	8	≤ 1
鶏肉 10/25-10	CTX-M15	+	>32	8
鶏肉 10/15-11	CTX-M1/61	—	16	2
鶏肉 10/15-13	CTX-M1/61	—	16	≤ 1
鶏肉 10/25-13	CTX-M1	—	32	≤ 1
鶏肉 10/29-17	CTX-M1	—	32	2
鶏肉 10/29-20	CTX-M15/27	+	>32	16
鶏肉 10/29-23	CTX-M15/27	+	32	8
業態者 26	CTX-M79	+	16	8
集団下痢 45	CTX-M15	+	>32	32

った。*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上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⁹⁾されており、今後、尿を感染源とする院内感染起因菌としてその動向に注視する必要があると考えられる。

前報で我々は、CTX-M15型ESBL産生菌が秋田県の医療機関に侵淫していることを示した。CTX-M15はCTX-M3の基質特異性がポイントミューテーション(D240G変異)により拡張し、CAZ加水分解能を獲得したCTX-M型ESBLであり^{10,11)}、近年、ヨーロッパにおいて問題となっている¹²⁾。国内においてもCTX-M15遺伝子保有株の報告^{13,14)}が少数あるものの、現時点では問題視されるには至っていない。しかしながら、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、今後国内において侵淫を拡大すると臨床で大きな問題となると考えられる。

CTX-M遺伝子保有株は国内の医療機関において侵淫を拡大しているが、その背景となる感染源や市中感染の実態などの感染疫学の多くが不明である。特に、D240G変異によりCAZに対する耐性も獲得したCTX-M15等遺伝子保有株の感染疫学は殆ど調査されていない。

今回、我々は医療機関におけるCTX-M遺伝子保有株の分離状況継続調査に加えて、鶏肉と市中感染の調査を実施し、秋田県におけるCTX-M遺伝子保有株の鶏肉汚染実態と市中感染の発生実態の一端を示すデータを初めて得た。今回供試した市販鶏肉からは、県内の医療機関において入院患者から分離されているCTX-M2GとCTX-M9G遺伝子保有株が分離され、加えて、CTX-M15、CTX-M1、CTX-M1/61遺伝子保有株も分離された。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。前報で我々は医療機関で分離されたCTX-M1G遺伝子保有株36株のうち35株がCTX-M15、1株がCTX-M61遺伝子保有株であることを示しており、同じ型のCTX-M遺伝子を保有する株が入院患者と鶏肉から実際に分離されたことは興味深い。加えて、CTX-M2G、

CTX-M9G遺伝子保有株及びCTX-M15遺伝子保有株は市中からも分離された。鶏肉と市中から分離された、CTX-M15、CTX-M15/27、CTX-M79遺伝子保有株は、D240G変異を有さないCTX-M1、CTX-M1/61遺伝子保有株と比較してCAZに対するMICが顕著に高いことが実際に確認された。市中に検出されたCTX-M79は入院患者由来株に確認されていない型であるが、前報ではCTX-M1G株36株についてのみシークエンス解析を実施していないことから、今後さらに多くの株を解析することにより入院患者由来株においてもこの型が確認される可能性がある。

以上の結果は、秋田県においてCTX-M遺伝子保有株が医療機関だけではなく、既に市中にも侵淫していることを示しており、その感染源として鶏肉が重要な役割を果たしている可能性を示唆するものと考えられた。特に、D240G変異を有するCTX-M15等の遺伝子を保有する株が既に市中感染を惹起し、鶏肉からも検出されたことは、当該株が今後も鶏肉を介して秋田県内の市中と医療機関への侵淫を拡大する可能性を示唆するものと考えられる。このため、当該株が尿路感染を介した院内感染原因菌として今後更に問題となる可能性があることについて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。

5. まとめ

CTX-M遺伝子保有株の鶏肉汚染実態と市中感染の発生実態を調査することにより、秋田県におけるCTX-M遺伝子保有株の感染疫学の一端を初めて明らかにすることができた。特に、今回示されたCTX-M15等D240G変異を持つCTX-M遺伝子保有株の感染疫学の一端は、今後の院内感染対策に資する貴重な知見と考えられる。CTX-M15を含むCTX-M遺伝子保有株の市中感染実態、市販食品の汚染調査、さらには動物の保菌調査も併せて今後も感染疫学解明のための調査を継続する必要がある。

参考文献

- 1) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum β-lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob.

- Agents. Chemother., **48**, 2004, 1-14.
- 2) Canton R, Coque TM: The CTX-M β -lactamase pandemic, Current Opinion in Microbiology, **9**, 2006, 466-475.
 - 3) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: 秋田県の医療機関における CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況. 秋田県健康環境センター年報, **6**, 2010, 40-45.
 - 4) 石畝 史, 永田暁洋, 鈴木里和 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 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析. 日本獣医公衆衛生学会誌, **63**, 2010, 883-887.
 - 5) 岸 亮子, 熱田純子, 穂葉優子 他: 島根県の医療機関で分離された基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の遺伝子型別. 島根県保健環境研究所報, **50**, 2008, 66-69.
 - 6) Pagani L, Dell'Amico E, Roberta Migliavacca R, et al: Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 4264-4269.
 - 7) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al : PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. Antimicrob. Agents Chemother., **50**, 2006, 791-795.
 - 8) Rozalski A, Sidorczyk Z , Kotelko K : Potential virulence factors of *Proteus* bacilli . Microbiol Mol Biol Rev, **61**, 1997, 65-89.
 - 9) 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**, 2003, 5530-5536.
 - 10) Karim A, Poirel L, Nagarajan S et al : Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiology Letters, **201**, 2001, 237-41.
 - 11) Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P : Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. J. Antimicrob. Chemother. **50**, 2002, 1031-1034
 - 12) Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al : Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. Int. J. Antimicrob. Agents, **25**, 2005, 157-162.
 - 13) 大隈雅紀, 村谷哲郎, 松本哲朗 他: UOE-1 (CTX-M-15) type β -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**, 2004, 223-227.
 - 14) 村谷哲郎, 小林とも子, 後藤令子 他: 基質特異性拡張型 β -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**, 2004, 556-567.