

Ⅲ 調查研究報告

感染症対策事業

秋田県内の医療機関における AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌の 分離状況と薬剤感受性の解析結果

檜尾拓子 熊谷優子 今野貴之 高橋志保 和田恵理子 八柳 潤

AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌のうち AmpC 過剰産生株、プラスミド性 AmpC 産生株は基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌と同様に第 3 世代セフェム系抗生物質等に耐性を示すことから、院内感染原因菌として重要視されている。しかしながら、医療機関で実施可能な AmpC 産生菌の簡便な検査法がこれまで普及していなかったことから、秋田県内の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況は不明であった。近年、AmpC 産生菌を簡便に検出可能な AmpC/ESBL 鑑別ディスクが市販されたので、今回これを使用して秋田県内の AmpC 産生菌の分離状況と薬剤感受性について調査した。その結果、平成 25 年 4 月から平成 26 年 2 月まで、県内の医療機関から第 3 世代セフェム系抗生物質耐性のため ESBL 産生疑い株として送付された 636 株のうち、52 株 (8.2%) が AmpC 産生菌であることが明らかとなった。AmpC 産生菌 52 株のうち *E.coli*、*Enterobacter* 属菌、*Citrobacter* 属菌の計 22 株が第 3 世代セフェム系薬の CTX と CAZ の両方に耐性を示した。そのうち、*Enterobacter* 属菌、及び今回確認された *Citrobacter* 属菌は AmpC 過剰産生株であるか、薬剤の誘導により AmpC 産生量が過剰となった株である可能性が考えられた。また、*E.coli* 16 株のうち 4 株がプラスミド性 *ampC* 遺伝子の一種である *bla*_{CMY-2} 遺伝子を保有する株であることが明らかとなり、秋田県内の医療機関にプラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株が存在することが初めて確認された。由来については、今回確認された AmpC 産生株の 38.5% が尿由来であった。尿は院内感染の重要な感染源であることから、AmpC 産生株が ESBL 産生菌と同様に尿を介して院内感染を引き起こす可能性に留意する必要がある。耐性菌の蔓延防止と適切な抗菌薬治療の確保のために、今後も秋田県における AmpC 産生菌等、耐性菌の検出動向調査を継続する必要がある。

1. 緒言

AmpC 型 β ラクタマーゼ (AmpC) は Ambler の分類により ClassC に分類され、セファロスポリナーゼとも呼ばれる。多くのグラム陰性桿菌に分布し、ペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を加水分解する酵素である。AmpC の構成遺伝子は *ampC* 遺伝子によりコードされ、*ampC* の局在部位の違いにより、非伝達性の染色体性 AmpC と、伝達性のプラスミド性 AmpC に分類される。

染色体性 AmpC 産生株のうち、産生調節機構に関与する遺伝子 (*ampR*, *ampD*) に変異が生じ、調節機構が破綻した株では AmpC が過剰産生され、ESBL 産生株と同様に第 3 世代セフェム系抗生物質に耐性を示す¹⁾。

一方、プラスミド性 AmpC は同様に第 3 世代セフェム系薬に耐性を示すが ESBL と異なり、

セファマイシン、オキサセフェム系抗生物質にも耐性を示す²⁾。加えて、プラスミド性 AmpC は *ampC* 遺伝子をコードするプラスミドが菌種を超えて拡散する可能性があり臨床上大きな問題である。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おり、*Enterobacter* 属由来の ACT-1/MIR-1 型、*Citrobacter freundii* 由来の CMY/LAT 型、*Morganella morganii* 由来の DHA 型、*Hafnia alvei* 由来の ACC 型、及び *Aeromonas* 属由来の CMY/MOX 型と FOX 型の 6 種類が知られている³⁾。これらのうち、国内では CMY/LAT 型に属する CMY-2 の分離頻度が高いとされる^{4, 5)}。染色体性 *ampC* 遺伝子を保有しない *Klebsiella* 属菌、*Proteus mirabilis*、*Salmonella* 属菌等、あるいは染色体性 *ampC* 遺伝子を保有するものの、通常は AmpC 産生量が

非常に少ない *E.coli* 等の菌が薬剤感受性パターンから AmpC 産生が疑われる場合、プラスミド性 AmpC 産生の可能性が考えられることから、プラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出や AmpC 産生の確認が必要となる。

現在、医療現場では第3世代セフェム耐性菌が問題となっている。従って、ESBL 等と併せて AmpC 産生株の動向を把握することが重要であるが、医療機関の検査室で簡便に実施可能な AmpC 産生の確認方法は実用化されていなかった。このため、秋田県内の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況は不明であった。

近年、AmpC の阻害剤と ESBL の阻害剤を組み合わせたディスク法により AmpC 産生と ESBL 産生を簡便に検査可能な AmpC/ESBL 鑑別ディスク（関東化学）が市販され、AmpC 産生の有無を手軽に確認することが可能となった。

そこで今回、秋田県の医療機関における AmpC 産生菌の分離状況と分離株の薬剤感受性、及び *E.coli* を対象としたプラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株の検索を行ったので報告する。

2. 方法

2.1 供試株

平成25年4月から平成26年2月まで、医療機関から ESBL 産生疑い株として当センターに送付された636株のうち、ESBL 遺伝子の一種である CTX-M 陰性であった株について、AmpC/ESBL 鑑別ディスク（関東化学）を使用し、AmpC 産生株と判定された52株（CTX-M 陽性の *M.morganii* 1株含む）を供試した。

2.2 菌種同定

供試株の菌種についてはアピ20E（シスメックス・バイオメリュー）及び16SrRNA シークエンス解析⁶⁾により同定した。

2.3 薬剤感受性試験

米国臨床検査基準委員会（CLSI）標準法のドライプレート‘栄研’（DP31）を用いて微量液体希釈法により最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。供試薬剤は、ピペラシリン（PIPC）、セファゾリン（CEZ）、セフォチアム（CTM）、セフォタキシム（CTX）、セフトジジム（CAZ）、

セフェピム（CFPM）、フロモキシセフ（FMOX）、セフポドキシム（CPDX）、スルバクタム/アンピシリン（S/A）、アズトレオナム（AZT）、ミペネム（IPM）、メロペネム（MEPM）、ゲンタマイシン（GM）、アミカシン（AMK）、ミノサイクリン（MINO）、ホスホマイシン（FOM）、スルファメトキサゾールトリメトプリム（ST）、レボフロキサシン（LVFX）の18薬剤である。

2.4 プラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出と同定

供試株のうち *E.coli* と同定された16株について、Pérez-Pérez らの報告した PCR 法⁷⁾を用いてプラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出を行った。

EBC, CIT, DHA, ACC, MOX, FOX プライマーの6種類の反応系のうち CIT 型が陽性となった株については、*bla*_{CMY-2} 遺伝子の ORF 全長を増幅するプライマー CMY-2F（5'-atg atg aaa aaa tcg tta tgc-3'）と CMY-2R（5'-tta ttg cag ctt ttc aag aat-3'）を用いる PCR により増幅された DNA 断片を精製した後、ダイレクトシーケンスにより増幅断片の DNA シークエンスを決定し、BLAST により *bla*_{CMY-2} 遺伝子と一致するか確認した。

3. 結果と考察

3.1 AmpC 産生株の検出状況（菌種、由来）

医療機関から ESBL 産生疑い株として送付された636株のうち、52株（8.2%）が AmpC 産生株であった。このことから、医療機関で通常実施されている薬剤感受性試験では ESBL 産生株と AmpC 産生株を鑑別し同定することが困難であることが伺われた。

今回確認された AmpC 産生株の菌種を表1に、由来を表2に示す。

52株のうち、*E.coli* と *Enterobacter* 属菌が最も多く、それぞれ16株（30.8%）、*Serratia* 属菌7株（13.5%）、*Citrobacter* 属菌6株（11.5%）、*Morganella* 属菌5株（9.6%）と続いた。

52株のうち41株で由来が明らかであり、そのうち20株（38.5%）が尿由来であった。このことは、AmpC 産生株が県内の医療機関において尿路感染に関与していることを示していた。

秋田県で以前実施した調査⁷⁾では ESBL 産生

表1 供試株の菌種

属名	種名	菌数 (n=52)	
<i>Escherichia</i> 属	<i>E.coli</i>	16	16 (30.8%)
<i>Enterobacter</i> 属	<i>E.aerogenes</i>	7	
	<i>E.cloacae</i>	7	
	<i>E.cloacae</i> complex	1	16 (30.8%)
	<i>E.kobei</i>	1	
<i>Citrobacter</i> 属	<i>C.braakii</i>	3	
	<i>C.freundii</i>	2	6 (11.5%)
	<i>C.murlinae</i>	1	
<i>Serratia</i> 属	<i>S.marcescens</i>	6	7 (13.5%)
	<i>Serratia</i> sp.	1	
<i>Morganella</i> 属	<i>M.morganii</i>	5	5 (9.6%)
<i>Hafnia</i> 属	<i>H.alvei</i>	1	1 (1.9%)
<i>Providencia</i> 属	<i>P.stuartii</i>	1	1 (1.9%)

表2 AmpC産生株 (52株) の由来

由来	株数 (%)
尿	20 (38.5)
喀痰	12 (23.1)
胆汁	4 (7.7)
血液	2 (3.8)
子宮	1 (1.9)
膿	1 (1.9)
創部	1 (1.9)
不明	11 (21.2)

菌が高頻度に尿から検出されており、尿は院内感染の重要な感染源であることが指摘されている。AmpC 産生菌も ESBL 産生菌と同様に尿を介して院内感染を引き起こす可能性が考えられることに留意する必要がある。

3.2 薬剤感受性試験成績

供試薬剤のうち、CLSI においてブレイクポイントが設定されている β ラクタム系抗生物質 10 薬剤に対する供試株の薬剤感受性を表 3 に示す。

Enterobacter 属菌 12 株、*Citrobacter* 属菌 6 株、*E.coli* 4 株が第 3 世代セフェム系抗生物質である CTX と CAZ の両方に耐性を示した。

E.cloacae、*C.freundii* は保有する染色体性

ampC 遺伝子が Pérez-Pérez らの PCR 法で交差反応することから⁷⁾プラスミド性 *ampC* 遺伝子の存在を PCR によって検討することは出来なかった。一方、*E.cloacae*、*C.freundii* 以外で CTX と CAZ に耐性を示した *Enterobacter* 属菌、*Citrobacter* 属菌でのプラスミド性 *ampC* 遺伝子の関与については今後の検討課題であるが、*Enterobacter* 属菌と今回確認された *C.braakii*、*C.freundii*、*C.murlinae* も、染色体性 AmpC を産生する株であることが報告されている⁸⁾。このため、CTX と CAZ の両方に耐性を示した株は AmpC 過剰産生株か、薬剤により AmpC 産生が強く誘導されるタイプの株である可能性が高いと考えられる。*Enterobacter* 属菌と *Citrobacter* 属菌に ESBL 産生株は殆ど認められないが⁹⁾、AmpC の過剰産生などと考えられる機構により第 3 世代セフェム系抗生物質に耐性を示す株が存在することが確認されたことから、県内におけるこれらの株の今後の分離動向に注目する必要がある。

一方、第 4 世代セフェム系抗生物質である CFPM、カルバペネム系抗生物質である MEPM に耐性を示す株は認められず、IPM に耐性を示した株は 52 株中 1 株のみであり、今回確認された AmpC 産生株は第 4 世代セフェムとカルバペネムに対して感受性が保持されていることが確認された。

3.3 プラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株の検出状況と薬剤感受性

*E.coli*16 株について、プラスミド性 *ampC* 遺伝子を検索した結果を表 4 に、*bla*_{CMY-2} 遺伝子陽性 *E.coli* の薬剤感受性を表 5 に示す。

16 株中 4 株 (25%) からプラスミド性 *ampC* 遺伝子が検出された。検出されたプラスミド性 *ampC* 遺伝子は 4 株全て CIT 型であり、シーケンス解析の結果、いずれもプラスミド性 AmpC をコードする *bla*_{CMY-2} 遺伝子であることを確認した。

また、表 5 に示すとおり、4 株の *bla*_{CMY-2} 遺伝子陽性 *E.coli* はいずれも CTX と CAZ に耐性を示すことが確認され、これらの 4 株はプラスミド性 *ampC* 遺伝子を保有しない *E.coli* と比較して第 3 世代セフェム系抗生物質に強い耐性を

表 3 薬剤感受性試験結果

菌種 (菌株数)	耐性菌数 ^{a)} (%)									
	PIPC*	CEZ	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	S/A*	AZT	IPM	MEPM
<i>Escherichia</i> 属 <i>E.coli</i> (16)	3(18.8)	13(81.3)	4(25)	4(25)	0(0)	13(81.3)	6(37.5)	1(6.3)	0(0)	0(0)
<i>Enterobacter</i> 属 (16)	5(31.3)	16(100)	14(87.5)	12(75)	0(0)	16(100)	15(93.8)	13(81.3)	0(0)	0(0)
<i>E.aerogenes</i> (7)	1(14.3)	7(100)	5(71.4)	4(57.1)	0(0)	7(100)	6(85.7)	5(71.4)	0(0)	0(0)
<i>E.cloacae</i> (7)	4(57.1)	7(100)	7(100)	6(87.5)	0(0)	7(100)	7(100)	6(87.5)	0(0)	0(0)
<i>E.cloacae</i> complex (1)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>E.kobei</i> (1)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>Citrobacter</i> 属 (6)	2(33.3)	6(100)	6(100)	6(100)	0(0)	6(100)	6(100)	6(100)	0(0)	0(0)
<i>C.braakii</i> (3)	1(33.3)	3(100)	3(100)	3(100)	0(0)	3(100)	3(100)	3(100)	0(0)	0(0)
<i>C.freundii</i> (2)	0(0)	2(100)	2(100)	2(100)	0(0)	2(100)	2(100)	2(100)	0(0)	0(0)
<i>C.murlinae</i> (1)	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	1(100)	1(100)	1(100)	0(0)	0(0)
<i>Hafnia</i> 属 <i>H.alvei</i> (1)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Morganella</i> 属 <i>M.morganii</i> (5)	5(20)	5(100)	2(40)	0(0)	0(0)	5(100)	2(40)	0(0)	1(20)	0(0)
<i>Providencia</i> 属 <i>P.stuartii</i> (1)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Serratia</i> 属 (7)	1(14.3)	7(100)	3(42.9)	0(0)	0(0)	6(85.7)	7(100)	1(14.3)	0(0)	0(0)

^{a)}: CLSI 判定基準に準拠

*: PIPC 64 µg/ml で発育, S/A 8/16 µg/ml で発育したもの

示す傾向が認められた。

なお、プラスミド性 *ampC* 遺伝子を保有していなかった 12 株の *E.coli* も AmpC/ESBL 鑑別ディスクにより AmpC 産生が陽性であることが示された株である。これらの株は *ampC* 遺伝子のプロモーターの変異などにより染色体性 AmpC の産生量が増加したため、鑑別ディスクで AmpC 産生を確認できたものと思われる。

今回の調査により、秋田県内の医療機関においてプラスミド性 AmpC の 1 種である CMY-2 を産生する *E.coli* が初めて確認された。これら CMY-2 産生の 4 株は CTX, CAZ に耐性を示した。また、4 株中 1 株が尿から分離された株、もう 1 株が血液から分離された敗血症起因菌と考えられる株であった。このようなことから、プラスミド性 AmpC 産生 *E.coli* も ESBL 産生菌と同様に院内感染対策や臨床上問題となる可能性が懸念される。

染色体性 *ampC* 遺伝子とは異なり、プラスミド性 *ampC* 遺伝子はプラスミドの接合伝達により菌種を超えて拡散することが問題である。今回確認されたプラスミド性 AmpC 産生株は *E.coli* のみであったが、今後プラスミドの拡散により他菌種にもプラスミド性 AmpC 産生株が出現する可能性があることから、県内における検出動向を注視する必要がある。

これまで AmpC 産生菌の簡便な検査法がな

表 4 プラスミド性 *ampC* 遺伝子の検出状況

<i>E.coli</i> (16株) 菌株No.	遺伝子	由来
4	—	不明
5	—	不明
6	—	気管内採痰
8	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	不明
10	—	採尿カテーテル
13	—	採尿カテーテル尿
14	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	尿
23	—	尿
28	—	喀痰
29	—	動脈血
37	—	カテ尿
38	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	血液
39	—	胆汁
40	CIT型 <i>bla</i> _{CMY-2}	不明
49	—	尿
50	—	子宮内容物

く、また、*E.coli* にみられるように、染色体性 *ampC* 遺伝子を保有するにもかかわらず AmpC 産生量が非常に少ない株も存在することから、PCR 法によっても AmpC 産生株を正確に特定することはできなかった。このため、秋田県における AmpC 産生株の検出状況が不明であった。しかし、近年市販された AmpC/ESBL 鑑別ディスクとプラスミド性 *ampC* 遺伝子検出用の PCR 法を用いて実施した今回の調査により初めて AmpC 産生株の秋田県における感染疫学的一端

表5 *E. coli* の β -ラクタム系抗生物質に対する感受性

菌株No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	PIPC	CEZ	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	S/A	AZT	IPM	MEPM
4	64	>16	1	4	≤ 0.5	>4	>8/16	2	≤ 0.25	≤ 0.25
5	32	4	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	1	>8/16	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.25
6	4	8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	>4	4/8	1	≤ 0.25	≤ 0.25
8	32	>16	8	16	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25
10	4	8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	>4	8/16	1	≤ 0.25	≤ 0.25
13	4	4	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	4	4/8	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.25
14	16	>16	8	16	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25
23	32	>16	2	8	≤ 0.5	>4	>8/16	8	≤ 0.25	≤ 0.25
28	16	16	≤ 0.5	4	≤ 0.5	>4	4/8	2	≤ 0.25	≤ 0.25
29	>64	>16	1	4	≤ 0.5	>4	>8/16	2	≤ 0.25	≤ 0.25
37	16	>16	1	2	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25
38	>64	>16	>32	>16	2	>4	>8/16	>16	≤ 0.25	≤ 0.25
39	4	16	2	1	≤ 0.5	>4	8/16	1	≤ 0.25	≤ 0.25
40	>64	>16	32	>16	≤ 0.5	>4	>8/16	8	≤ 0.25	≤ 0.25
49	4	2	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	4	4/8	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.25
50	16	>16	1	2	≤ 0.5	>4	8/16	4	≤ 0.25	≤ 0.25

■ : プラスミド性 *ampC* 遺伝子保有株

を明らかにすることができた。

秋田県内における耐性菌の蔓延防止と適切な抗菌薬治療の確保のために、今後もAmpC/ESBL鑑別ディスクとプラスミド性 *ampC* 遺伝子検出用PCR法によりAmpC産生株の検出動向調査を継続する必要がある。

参考文献

- 1) 山崎勝利,小松方: AmpC 型 β -ラクタマーゼ過剰産生菌,臨床と微生物,**40**,3,2013,5,225-231
- 2) 小栗豊子: 臨床微生物検査ハンドブック,三輪書店,2011,302.
- 3) 中家歩美,山崎勝利,他: 日本赤十字社和歌山医療センターでアウトブレイクが疑われたESBL およびプラスミド性 AmpC 同時産生 *Klebsiella pneumoniae* に関する解析,日本臨床微生物学雑誌,**24**,2,2014,39-45.
- 4) Yamasaki K,Komatsu M,Abe N et al: Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Kinki Region of Japan.J. Clin. Microbiol., **48**,9,2010,3267-3273.
- 5) 山崎勝利,小松方,他: 2011 年に臨床材料から分離したプラスミド性 AmpC β -lactamase 産生腸内細菌の調査,日本臨床微生物学雑誌,**23**,3,2013,20-27.
- 6) Ferroni A.Serment-Gaudelus,Abachin E et al : Use of 16SrRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center J.Clin.Microbiol.,**40**,10,2002,3793-3797.
- 7) Pérez-pérez F.J.,HansonN.D. : Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolated by using multiplex PCR. J.Clin.Microbiol., **40**,6,2002,2153-2162.
- 8) George A. Jacoby : AmpC β -Lactamases,Clin. Microbiology Reviews,**22**,1,2009,161-182.
- 9) 八柳潤,今野貴之,齊藤志保子: 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,秋田県健康環境センター年報,**6**,2010,40-45.