

## 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

岸 亮子、熱田純子、穂葉優子、勝部和徳<sup>1)</sup>、黒崎守人、福島 博

キーワード：基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ、ESBL、大腸菌、  
CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、TEM、PCR

### PCR Classification of Extended-Spectrum β-Lactamase Genes Identified in *Escherichia coli* Isolated Clinically in Shimane Prefecture

Ryoko KISHI, Junko ATSUTA, Yuko AKIBA, Kazunori KATSUBE<sup>1)</sup>  
and Morito KUROSAKI

Key word: extended-spectrum β-lactamase, ESBL, *Escherichia coli*,  
CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, TEM, PCR

#### 1. 目 的

近年、医療機関においては薬剤耐性菌の一つである基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamases: ESBL) 産生大腸菌の増加が問題視されるようになってきている。

2001年から2003年かけて、Shibata et al.<sup>1)</sup> が全国の医療機関で分離されたESBL産生グラム陰性菌の菌種同定とESBL産生遺伝子の型判定を実施した。中国5県からは13医療機関が調査に参加し、そのうち5医療機関からCTX-M-1 groupを保有する大腸菌および*Citrobacter koseri*、CTX-M-9 groupを保有する大腸菌および*Klebsiella pneumoniae*が検出されているが、島根県における状況は明らかにされていない。

このESBL産生大腸菌の島根県における浸淫状況を調査するために、県内の医療機関において患者から分離された大腸菌および県東部の医療機関においてESBL産生大腸菌と判定された菌株について、CTX-M型を中心にPCR検査による遺伝子型判定を実施したので、その結果を報告する。

#### 2. 材料および方法

##### 2.1 検体

患者由来大腸菌におけるESBL産生大腸菌の検出率を調査するため、2006年4月から2008年3月までにESBL産生性に関係なく県内医療機関から提供された大腸菌160株 (便由来菌68株、尿由来菌70株、血液等由来菌22株) を薬剤耐性試験に供した。このうち、ESBL

産生大腸菌と確認された菌はESBL産生遺伝子の型別検査を実施した (A群)。

また、2006年4月から2009年3月までに県東部の医療機関において患者から分離されシカペータテスト (関東化学) またはESBLs確認用ディスクにてESBL産生大腸菌と判定された菌株86株 (B群) についても、ESBL産生遺伝子の型判定に供した。通院・入院日数などの調査も併せて行った。

##### 2.2 薬剤耐性試験

ESBL産生性に関係なく県内医療機関から提供された患者由来大腸菌は、クロモカルト培地にて37°C、18~24時間培養後、一白金耳をミューラー・ヒントン・ブロスにて1夜培養後、滅菌生理的食塩水でMcFarland標準濁度0.5程度に懸濁した希釈菌液を作成した。この被菌液をミューラー・ヒントンII寒天培地上に綿棒で均等に塗抹し、薬剤ディスクを以下の組み合わせで同一平板上に置いた。a) KBディスク‘栄研’CPXと

表1. ESBL産生遺伝子検出用プライマー

ESBL 遺伝子型	プライマー	PCR 産物 サイズ	塩基配列 (5'-3')	文献
CTX-M-1 group	CTX-M-1 group-F	516 bp	gct gtt gtt agg aag tgt gc	1)
	CTX-M-1 group-R		cca ttg ccc gag gtg aag	
CTX-M-2 group	CTX-M-2 group-F	779 or 780 bp	acg cta ccc ctg cta ttt	2)
	CTX-M-2 group-R		cct ttc cgc ctt ctg ctc	
CTX-M-9 group	CTX-M-9 group-F	393 bp	gca gat aat acg cag gtg	1)
	CTX-M-9 group-R		cgg cgt ggt ggt gtc tct	
TEM型	TEM-F	824 bp	cgg tgt cgc cct tat tcc	2)
	TEM-R		agg cac cta tct cag cga	
SHV型	SHV-F	1051 bp	att tgt cgc ttc ttt act cgc	2)
	SHV-R		ttt atg gcg tta cct ttg acc	

<sup>1)</sup> 島根県食肉検査所 Shimane Meat Inspection

ESBL-CPX/CVA ‘栄研’、b) KBディスク ‘栄研’ CAZ とESBL-CAZ/CVA ‘栄研’、c) KBディスク ‘栄研’ CTXとESBL-CTX/CVA ‘栄研’。この薬剤ディスクを置いた平板を35℃、16～18時間培養した。完全に菌の発育が阻止されている阻止円直径を計測・比較し、単独薬剤ディスクの阻止円直径とクラブラン酸（CVA）を添加含有した薬剤ディスクの阻止円直径に5 mm以上の差が認められた場合、その被菌液をESBL産生大腸菌と判定し、PCR検査によるESBL産生遺伝子の型別に供した。

### 2.3 ESBL産生遺伝子の型別判定

クロモカルト培地に発育した大腸菌コロニー—白金耳を滅菌蒸留水1 mlに浮遊し、100℃、10分間加熱後、10,000 rpm、5分間遠心分離し、その上清をPCR検査のテンプレートとして用いた。

ESBL産生遺伝子型別は、CTX-M-1 group (CTX-M-1、CTX-M-3等を含む、以下CTX-M-1と略す)、CTX-M-2 group (Toho-1、CTX-M-2等を含む、以下CTX-M-2と略す)、CTX-M-9 group (CTX-M-9、CTX-M-14等を含む、以下CTX-M-9と略す)、TEM型、SHV型のプライマーを用いてPCR検査にて行った(表1)。各遺伝子の増幅は、初期変性94℃ 2分1サイクルの後、熱変性94℃ 1分、アニーリング55℃ 1分、伸長72℃ 1分30秒を30サイクル行い、72℃ 5分で最終伸展させた。増幅産物の確認は2%アガロースゲルによる電気泳動しエチレンブロマイド染色によって確認した。

## 3. 結 果

### 3.1 患者由来大腸菌におけるESBL産生大腸菌の検出率

ESBL産生性に関係なく県内医療機関から提供された大腸菌160株のうち16株(10.0%)がESBL産生大腸

菌であった(表2)。ESBL産生大腸菌の検出率は、便(直腸ぬぐい液を含む)由来菌68株中6株(8.8%)、尿(中間尿を含む)由来菌70株中6株(8.6%)、血液(静脈血および動脈血)由来菌16株中4株(25.0%)であった。その他の検体(手術創部膿など)6株からは検出されなかった。

### 3.2 ESBL産生遺伝子の型別判定

ESBL産生大腸菌の遺伝子型別判定を、医療機関から提供され当所でESBL産生大腸菌と確認された16株(A群)および医療機関でESBL産生大腸菌と確認された86株(B群)、計102株について実施した(表3)。

A群16株はすべての菌株がCTX-M-9を保有し、CTX-M-9を単独で保有している菌が7株(4.4%)、TEM型も保有する(CTX-M-9+TEM型)株が9株(5.6%)であった。検体採取部位別では、便由来ESBL産生大腸菌6株はCTX-M-9(単独保有:3株、CTX-M-9+TEM型:3株)であった。尿由来菌6株はCTX-M-9(単独保有:3株、CTX-M-9+TEM型:3株)であった。血液由来菌ではCTX-M-9が4株(単独保有:1株、CTX-M-9+TEM型:3株)であった。

B群86株ではCTX-M-9が67株(単独保有:50株、CTX-M-9+TEM型:17株)で最も多かった。A群のESBL産生大腸菌では検出されなかったCTX-M-1+

表2 患者由来大腸菌のESBL産生大腸菌の検出率(2006.4～2008.3)

検体	総数	ESBL
便	68	6 (8.8)
尿	70	6 (8.6)
血液	16	4 (25.0)
その他	6	0 (0.0)
計 (%)	160	16 (10.0)

表3 検体採取部位とESBL産生大腸菌の遺伝子型別

群	検体	総数	CTX-M-1		CTX-M-2		CTX-M-9		TEM	保有せず	
			+TEM	小計	単独	+TEM	小計	単独			+TEM
A	便	6					6	3	3		
	尿	6					6	3	3		
	血液	4					4	1	3		
	小計	16					16	7	9		
B	尿	42	1	5	3	2	30	23	7	3	4
	痰	16					14	13	1	2	
	便	8					8	4	4		
	血液	3					3	3			
	その他	8	3				5	4	1		
	不明	8					7	3	4		1
	小計	86	4	5	3	2	67	50	17	5	5
計 (%)	102	4 (3.9)	5 (4.9)	3 (2.9)	2 (2.0)	83 (81.4)	57 (55.9)	26 (25.5)	5 (4.9)	5 (4.9)	

TEM型4株、CTX-M-2 5株（単独保有:3株、CTX-M-2+TEM型:2株）、TEM型5株が検出された。

A群およびB群を併せた102株を検体採取部位別に見ると尿（中間尿、カテーテル尿を含む）由来菌48株、痰（喀痰、吸引痰を含む）由来菌16株、便由来菌14株、血液由来菌3株、その他（解放膿など）由来菌8株、由来不明菌8株であった。このうち97株（95.1%）が今回検査したESBL産生遺伝子を保有し、CTX-M-9が83株（単独保有:57株、CTX-M-9+TEM型:26株）で最も多かった。

検体採取時期とESBL産生遺伝子の型別判定では表4に示すように、通院から入院2日目までの患者からもCTX-M-9 10株（単独保有:9株、CTX-M-9+TEM型:1株）、TEM型2株が検出された。

#### 4. 考 察

島根県におけるESBL産生大腸菌の浸淫状況を確認するために、県内の医療機関にて分離された大腸菌におけるESBL産生大腸菌の検出率の調査およびESBL産生遺伝子の型別判定をPCR検査にて実施したところ、医療機関から提供された大腸菌のうち10%がESBL産生大腸菌であった。また、ESBL産生大腸菌の遺伝子型別判定ではCTX-M-9が最も多かったが、CTX-M-1、CTX-M-2、TEM型も検出され、島根県内のESBL産生大腸菌が多様であることが示唆された。

島根県において医療機関から提供された大腸菌160株のうちESBL産生大腸菌の検出率は10.0%（16株）で、すべてがCTX-M-9（単独保有もしくはCTX-M-9+TEM型）であった。

ESBL産生大腸菌102株の遺伝子型別では、表3に示したようにCTX-M-9が83株（単独保有:57株（55.9%）、CTX-M-9+TEM型:26株（25.5%））と最も多く、このほかCTX-M-1+TEM型4株（3.9%）、TEM型5株（4.9%）およびCTX-M-2 5株（単独保有:3株（2.9%）、CTX-M-2+TEM:2株（2.0%））が確認され、SHV型は全く認められなかった。

ESBL産生大腸菌102株を検体採取部位別に見ると、尿由来大腸菌が48株（47.1%）と便由来大腸菌14株（13.7%）と比較して明らかに多く、ESBL産生大腸菌は便からよりも尿から多数分離される傾向があると推測された。また、喀痰や血液からも分離されていることから、ESBL産生大腸菌による感染症が広範囲に広がっていることが推測された。

Shibata et al.<sup>1)</sup>が2001年から2003年までに全国132医療機関において分離されたグラム陰性菌1,456株の分離同定とCTX-M型別を実施したところ、CTX-M型ESBL産生グラム陰性菌のうちESBL産生大腸菌が最も多く分離され、このうち89株（53.0%）がCTX-M-9であった。中国5県では13医療機関がこの調査に参加し、5医療機関からCTX-M-1を保有する大腸菌および*Citrobacter koseri*、CTX-M-9を保有する大腸菌および*Klebsiella pneumoniae*が検出されている。

今回の調査でも島根県におけるESBL産生大腸菌の遺伝子型別判定で最も多かったのはCTX-M-9であり、Shibata et al.<sup>1)</sup>の報告と同様であった。一方、Shibata et al.<sup>1)</sup>が中国地区では検出していないTEM型5株（4.9%）やCTX-M-2 5株（単独保有:3株（2.9%）、CTX-M-2+TEM型:2株（2.0%））も確認され、島根県内に様々な遺伝子型のESBL産生大腸菌が浸淫していることが示唆された。このような島根県におけるESBL産生大腸菌の検出率および遺伝子型の経年的な変化を把握するために、今後も継続的な調査が必要と考えられた。

医療機関でESBL産生大腸菌と判定されながら今回のPCR検査ではESBL産生遺伝子の保有が確認されなかった大腸菌はCMY型やFOX型など他の薬剤耐性遺伝子を保有している可能性もあり、さらに詳細な検査が必要である。詳細なESBL産生遺伝子の型別はCTX-M型についてはさらにPCR検査が、TEM型およびSHV型についてはシークエンスによる塩基配列の確認が必要となる<sup>3)</sup>。

ESBL産生遺伝子型と検体採取時期の関係では表4

表4 検体採取時期とESBL産生遺伝子の型別

検体採取時期	総数	CTX-M-1		CTX-M-2			CTX-M-9			TEM 保有せず
		TEM	小計	単独	TEM	小計	単独	TEM		
通院	1					1		1		
入院1日目	8					6	6		2	
入院2日目	3					3	3			
入院3日以上 7日未満	1					1	1			
入院1週以上 1ヶ月未満	9					9	7	2		
入院1ヶ月以上	13	4	1	1		7	6	1	1 1	
不明	66		4	2	2	56	34	22	2 4	
計 (%)	102	4 (3.9)	5 (4.9)	3 (2.9)	2 (2.0)	83 (81.4)	57 (55.9)	26 (25.5)	5 (4.9) 5 (4.9)	

に示すように、通院および入院2日目までの患者からも12株のESBL産生大腸菌が検出された。ESBL産生大腸菌の市中感染について、中村 ほか<sup>4)</sup>は外来患者の便からESBL産生大腸菌を検出し、腸管定着菌が市中におけるESBL産生大腸菌の感染源となりうる可能性を示唆している。一方、松下 ほか<sup>5)</sup>は、フルオロキノロン系薬剤耐性菌およびESBL産生菌の媒体として、食品、特に鶏肉の関与があることを示唆している。また船木 ほか<sup>6)</sup>は島根県において飼育されていたウシ直腸便からCTX-M-2のESBL産生大腸菌などの分離を報告している。食品由来の薬剤耐性菌と患者由来のESBL産生大腸菌の関連については未だ不明な点が多く、食品におけるESBL産生大腸菌の汚染状況の把握や食品由来ESBL産生大腸菌と患者由来菌株との関連などを検討する必要がある。

島根県内のESBL産生大腸菌は、分離菌株数の増加傾向や遺伝子型の多様化傾向にあると推測され、今後監視が必要と考える。特に、志賀毒素産生大腸菌O26などでもESBL産生遺伝子の保有と薬剤耐性化が確認されており<sup>7)</sup>、医療機関および食品中の薬剤耐性菌の監

視と予防は、食品衛生および公衆衛生上の大きな課題である。

## 謝 辞

この調査を実施するにあたり、ESBL産生菌を譲渡いただいた国立感染症研究所細菌第二部 荒川宣親先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Shibata, N. et al.: Antimicrob. Agents Chemother., 50, 791 (2006)
- 2) Yagi, T. et al.: FEMS Microbiology Letters, 184, 53 (2000)
- 3) 荒川宣親：日本臨床微生物学雑誌, 13, 150 (2003)
- 4) 中村公則ほか：感染症学会誌, 82, 672, (2008)
- 5) 松下秀ほか：モダンメディア, 54, 202 (2008)
- 6) 船木博史ほか：島根県家畜病性鑑定室報, 12, 13 (2008)
- 7) Ishii, Y. et al.: J. Clin. Microbiol., 43, 1072 (2005)