

9. 神奈川県における基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ及び AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生菌の遺伝子解析

○鈴木 美雪（神奈川県衛生研究所）

【研究の必要性と目的】

セフェム系薬の分解酵素である基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（以下、ESBL）及び AmpC 型 β -ラクタマーゼ（以下、AmpC）を産生する細菌は使用できる抗菌薬の選択肢を狭めることから、感染症の治療において問題となっている。加えて、これら酵素の耐性遺伝子はプラスミドを介して菌種を超えて伝播し得るため、市中における蔓延が懸念されている。しかしながら、これまで神奈川県における薬剤耐性菌のプラスミド解析はほとんどなされてこなかった。そこで本研究では、神奈川県におけるより詳細な ESBL 及び AmpC 産生菌の実態の把握を目的として、これらの分子疫学的解析及びプラスミド解析を行った。

【材料と方法】

1. 分離菌株

2013年4月から2016年3月までに神奈川県内の小児科1医療機関において採取された下痢症患者便288検体から分離された腸内細菌科細菌のうち、AmpC/ESBL鑑別ディスク（関東化学）にてESBL産生菌及びAmpC産生菌と判定された65株（ESBL産生菌39株、AmpC産生菌24株、ESBL及びAmpCの両酵素産生菌2株）を用いた。

2. 薬剤感受性試験

分離菌株について、クロラムフェニコール（CP）、ホスホマイシン（FOM）、ゲンタマイシン（GM）、アミカシン（AMK）、カナマイシン（KM）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、シプロフロキサシン（CPFX）、ストレプトマイシン（SM）、スルファメトキサゾール・トリメトプロム合剤（ST）、テトラサイクリン（TC）、イミペネム（IMP）及びメロペネム（MEM）の13薬剤の薬剤感受性試験を米国臨床検査標準協会（CLSI）法に準拠し、実施した。

3. Multilocus sequence typing（MLST）解析

分離菌株のうち、*Escherichia coli*であった43株についてDNAを抽出し、Enterobase（<https://enterobase.warwick.ac.uk/>）に記載の方法に従い、7つのハウスキーピング遺伝子（*adk*, *fumC*, *gryB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*）をPCRで増幅した。シークエンスにより決定したPCR産物の塩基配列をデータベースに照合し、ST型を決定した。

4. プラスミド及び耐性遺伝子の解析

分離菌株からプラスミドを抽出し、抽出したプラスミドを用いて電気穿孔法によりコンピテントセルに形質転換することによりサブクローニングした。このプラスミド及び形質転換できなかった株については分離株のDNA抽出液を用いて、Carattoliら¹⁾の方法に従い、レプリコンタイピング（Inc groups）を行うとともに、ESBL-CTX-M型について

CTX-M-1 groupはLeflon-Guibout ら²⁾、CTX-M-2 及びCTX-M-9groupはSuzukiら³⁾、TEMはBrasmeら⁴⁾のプライマーを用いて、シーケンス解析により型別を行った。また、AmpCはPerez-Perezらの⁵⁾方法に従い型別を行った。Inc groupsの陽性コントロールの一部は国立遺伝学研究所から提供を受け実施した。

【結果】

1. 薬剤感受性試験

ESBL産生菌41株の各薬剤における耐性率は、CP ; 7.3% (3株)、FOM ; 9.8% (4株)、GM ; 14.6% (6株)、KM;7.3% (3株)、NA;78.0% (32株)、NFLX ; 68.3% (28株)、CPFY ; 75.6% (31株)、SM;31.7% (13株)、ST ; 39.0% (16株)、TC ; 31.7% (13株)となった (表1)。

AmpC産生菌26株の各薬剤における耐性率は、CP ; 7.7% (2株)、FOM ; 11.5% (3株)、GM ; 3.8% (1株)、KM ; 3.8% (1株)、NA ; 7.7% (2株)、NFLX ; 7.7% (2株)、CPFY ; 7.7% (2株)、SM ; 7.7% (2株)、ST ; 11.5% (3株)、TC ; 7.7% (2株)となった (表2)。

2. MLST 解析

E. coli 全 43 株の MLST 解析を実施した結果、42 株は既報の ST に型別でき、1 株は ST131 型と *fumC* が 1 塩基異なる新規 ST 型となった。ST131 が 23 株 (53.5%) と最も多く、次いで ST38 が 5 株 (11.6%) であった (表 1、2)。

3. プラスミドのレプリコンタイピング (Inc groups)

ESBL 産生菌41株のうち30株については、サブクローニングにより得られたプラスミド溶液を用いて、形質転換できなかつた11株については分離株のDNA抽出液を用いてレプリコンタイピングを実施した。*E. coli* 39株中32株がIncFを保有し、うち5株はIncFとともにIncB/O (2株)、IncK/B (1株) またはIncN (2株) を保有し、1 株がIncI1を単独で保有していた。*Citrobacter amalonaticus*はIncI1を保有していた (表1)。

AmpC産生菌26株のうち2株については、サブクローニングにより得られたプラスミド溶液を用いて、残りの24株については分離株のDNA抽出液を用いた。6株がIncFを保有しており、1株はIncI1を保有していたが、19株はどのタイプにも分類されず、Inc groupが決定した菌種7株のうち6株が*E. coli*であった (表2)。

4. ESBL産生菌及びAmpC産生菌の耐性遺伝子型別

上記3のプラスミドのレプリコンタイピングと同様に、サブクローニングにより得られたプラスミド溶液及び形質転換できなかつた株については分離株のDNA抽出液を用いて、ESBL及びAmpCの耐性遺伝子型別を実施した。

ESBL産生菌41株のうち、CTX-M-1 groupは 5株あり、その内訳は、CTX-M-15が2株、CTX-M-1、CTX-M-3及び型別不能株がそれぞれ1株あった。CTX-M-2 group は1株あり、CTX-M-2であった。CTX-M-9 groupは 35株あり、その内訳は、CTX-M-14が12株 (うち5株はTEM-1も保有)、CTX-M-27が21株、CTX-M-65が2株 (2株ともTEM (型別不能) 保有) であった。CTX-M型遺伝子保有41株においてCTX-M-27が51.2%、CTX-M-14が29.3%であった。

菌種は、*C. amalonaticus* (CTX-M-1)1株及び*Proteus mirabilis* (CTX-M-2)1株以外は全て*E. coli*であった(表1)。

AmpC産生菌26株のうち、ACC型が1株(*Hafnia alvei*)、CIT型が11株(*Citrobacter freundii*が8株、*E. coli*が3株)、DHA型が5株(*Morganella morganii*が4株、*E. coli*が1株)EBC型が1株(*Enterobacter cloacae*)及び耐性遺伝子が検出できなかった株が8株(*E. cloacae*が5株、*E. coli*が2株、*Klebsiella aerogenes*が1株)であった(表2)。

【考察と今後の課題】

本研究において、我々がこれまでに神奈川県内の下痢症患者便より分離したESBL産生菌及びAmpC産生菌について、より詳細な薬剤耐性菌の実態を把握することを目的として、薬剤感受性試験、MLST及びプラスミド解析を実施した。

本研究ではESBL産生菌は、2株を除いて全て*E. coli*であった。MLSTの結果、ESBL産生*E. coli* 39株のうちST131は22株(56.4%)と最も多く、このうちCTX-M-27保有株が19株と多数を占めていた。ST131はESBL産生*E. coli*において、現在国内外で多く分離されている。加えて日本では、CTX-M-14、CTX-M-27及びCTX-M-15が多く検出されており、本研究も同様の結果となった⁶⁾。本研究において、ESBL産生*E. coli* ST131は22株全てでキノロン系に耐性を示していた。腸内細菌科におけるキノロン耐性は通常、染色体変異によるものとされているが、*qnr*、*qepA*及び*aac(6)-Ib-cr*の遺伝子獲得によるプラスミド媒介キノロン耐性が報告されている⁷⁾。また、*E. coli* ST131を1型線毛の遺伝子(*fimH*)を用いて細分類すると、フルオロキノロン耐性株はH30Rとされ、ST131とフルオロキノロン耐性との関連が報告されている⁸⁾。今後、本研究でキノロン耐性であった株の*qnr*、*qepA*及び*aac(6)-Ib-cr*の保有状況や、*E. coli* ST131の*fimH*遺伝子解析を検討することにより、さらに詳細な薬剤耐性の獲得機構を明らかにすることができると考えられた。

ESBL及びAmpCが菌種を超えて拡散するのは、 β -ラクタマーゼをコードする遺伝子がプラスミド上に存在することが一因となっている。IncFは、宿主範囲を主に腸内細菌科細菌とし、*E. coli*に広く分布するプラスミドとされており^{7,9)}、本研究でも、*E. coli* 43株中36株がIncFを保有していた。ESBL産生*E. coli*では、IncFとともにIncB/O、IncNやIncK/Bが検出された株及びIncI1単独保有株もあった。IncI1、IncNとIncK/Bは家畜由来のESBL産生*E. coli*株に分布することが報告されており、これら家畜由来プラスミドを介したESBL遺伝子のヒトへの伝播が示唆されている^{7,10)}。これらの関連を明らかにするために、家畜由来の耐性遺伝子との比較など更なる検討が必要と考えられた。

AmpCは*Enterobacter*属(EBC型の由来)、*C. freundii*(CIT型の由来)、*M. morganii*(DHA型の由来)、*H. alvei*(ACC型の由来)などの染色体性のものとプラスミド性のものがあり、プラスミド性AmpC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いる⁷⁾。本研究で*ampC*遺伝子が検出されたこれら菌種のAmpCは、それぞれの染色体由来AmpCと同じ遺伝子型であった。しかし、本研究で用いたプライマーは、プラスミド性*ampC*

遺伝子を検出するとされており、1株についてはサブクローニングより得られたプラスミドから *ampC* 遺伝子が検出された（表 2）。残りの 19 株については形質転換ができなかった。*E. coli* も染色体上に *ampC* 遺伝子を持つが、本研究の AmpC 産生 *E. coli* では他菌種由来の CIT 型や DHA 型の AmpC が検出された。加えて 1 株についてはサブクローニングにより得られたプラスミドから DHA 型が検出されており、他菌種から *ampC* 遺伝子が接合伝達したものと考えられた。しかし、プラスミドの Inc group が決定できたのは *E. coli* の IncF や IncI1、*C. freundii*（CIT 型）の FrepB のみであった。このため、菌種間のプラスミドと耐性遺伝子との関連を明らかにするためには更なる検討が必要と考えられた。

本研究では、国内外の報告^{6,7,9)}と同様に IncF 保有の ESBL 産生 *E. coli* ST131 が神奈川県の中に多く分布していることが確認された。国内外における CTX-M-型の推移と比較するためにも、神奈川県の中に於ける薬剤耐性菌の分布を継続して監視していくことが重要であると考えられた。

【参考文献】

- 1) Carattoli et al., J. Microbiol. Methods., **63**:219-228 (2005)
- 2) Leflon-Guibout et al., Antimicrob. Agents Chemother., **48** (10):3736-3742 (2004)
- 3) Suzuki et al., J. Antimicrob. Chemother., **63**:72-79 (2009)
- 4) Brasme et al., J. Antimicrob. Chemother., **60**:956-964 (2007)
- 5) Perez-Perez et al., J. Clin. Microbiol., **40** (6): 2153-2162 (2002)
- 6) Nakane et al., Appl. Environ. Microbiol., **82** (6):1818-1827 (2016)
- 7) Carattoli, Antimicrob. Agents Chemother., **53** (6):2227-2238 (2009)
- 8) Price et al., MBio., **4** (6):e00377-13 (2013)
- 9) Maherault et al., Antimicrob. Agents Chemother., **63** (10):e01130-19 (2019)
- 10) Wang et al., Front. Microbiol., **4** (2013)

【経費使途明細】

使 途	金額
PCR関連試薬（プライマー）	16,500円
形質転換関連試薬（プラスミド抽出キット、コンピテントセル等）	277,266円
陽性コントロール株	4,140円
事務費（送料及び振り込み手数料）	3,900円
合計	301,806円
大同生命厚生事業団助成金	300,000円

表1 ESBL保有菌株の性状

No.	分離年 -検体No.	菌種 (<i>E. coli</i> の O血清及びST型)	CTX-M -group	ESBL	Inc group	耐性を示した薬剤
1	2016-2	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	1	CTX-M-15	FIA, FrepB	NA, NFLX, CPFX, ST
2	2016-3*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	1	CTX-M-15	FIA, FrepB	NA, NFLX, CPFX, ST
3	2013-10*	<i>E. coli</i> (OUT,ST226)	1	CTX-M-not typed, TEM-1	FrepB	NA, NFLX, CPFX, TC
4	2013-9	<i>E. coli</i> (OUT,ST973)	1	CTX-M-3	FrepB, B/O	CP, KM
5	2016-6*	<i>C. amalonaticus</i>	1	CTX-M-1	I1	TC
6	2014-2**	<i>P. mirabilis</i>	2	CTX-M-2	N.D.	FOM, GM, KM, SM, ST, TC
7	2013-2*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-14	FIA, FIB, FrepB, N	NA, NFLX, CPFX, TC
8	2014-5*	<i>E. coli</i> (OUT,ST38)	9	CTX-M-14 (A545G), TEM-1	N.D.	GM, NA, SM, ST
9	2014-10	<i>E. coli</i> (OUT,ST38)	9	CTX-M-14, TEM-1	FIB, FrepB	GM, NA, CPFX, ST
10	2014-6	<i>E. coli</i> (OUT,ST95)	9	CTX-M-14	FIB, FrepB, B/O	
11	2014-8*	<i>E. coli</i> (O86a,ST450)	9	CTX-M-14, TEM-1	FIA, FIB, FrepB, K/B	GM, NA, CPFX, SM, ST, TC
12	2015-22*	<i>E. coli</i> (OUT,ST538)	9	CTX-M-14	N.D.	
13	2015-23*	<i>E. coli</i> (OUT,ST538)	9	CTX-M-14	N.D.	
14	2015-21**	<i>E. coli</i> (OUT,ST550)	9	CTX-M-14, TEM-1	FIB, FrepB	
15	2015-8**	<i>E. coli</i> (OUT,ST648)	9	CTX-M-14	I1	NA, NFLX, CPFX, ST
16	2014-14	<i>E. coli</i> (O86a,ST38)	9	CTX-M-14	N.D.	FOM, NA, NFLX, CPFX
17	2013-5*	<i>E. coli</i> (OUT,ST38)	9	CTX-M-14	FIA, FIB, FrepB	
18	2015-20	<i>E. coli</i> (OUT,ST38)	9	CTX-M-14, TEM-1	N.D.	GM, NA, CPFX, ST
19	2013-4*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FrepB	NA, NFLX, CPFX, SM, TC
20	2013-12*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
21	2014-7*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
22	2014-11*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
23	2014-16*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX, SM, ST, TC
24	2014-17*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX, SM, ST, TC
25	2015-2**	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
26	2015-3*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
27	2015-4*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
28	2015-7*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
29	2015-9*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
30	2015-11*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
31	2015-15*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
32	2015-16*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX, ST
33	2015-19*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
34	2016-1*	<i>E. coli</i> (O25,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX
35	2016-7*	<i>E. coli</i> (O25,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX, SM, ST
36	2016-8*	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	NA, NFLX, CPFX, SM, ST
37	2016-9	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB, N	NA, NFLX, CPFX, SM, ST, TC
38	2013-8*	<i>E. coli</i> (O25,ST457)	9	CTX-M-27	FIB, FrepB	FOM, GM, KM, NA, NFLX, CPFX, SM, TC
39	2014-4*	<i>E. coli</i> (OUT,ST-new type)	9	CTX-M-27	FIA, FIB, FrepB	FOM, NA, NFLX, CPFX, SM, TC
40	2014-2**1, **4	<i>E. coli</i> (OUT,ST10)	9	CTX-M-65, TEM-not typed	N.D.	CP, SM, ST, TC
41	2015-10	<i>E. coli</i> (OUT,ST2179)	9	CTX-M-65, TEM-not typed	FIB, FrepB	CP, NA, NFLX, CPFX, SM, ST, TC

Chloramphenicol;CP, Fosfomycin;FOM, Gentamicin; GM, Kanamycin; KM, Nalidixic acid;NA, Norfloxacin;NFLX, Ciprofloxacin;CPFX, Streptomycin;SM,

Trimethoprim-sulfamethoxazole;ST, Tetracycline;TC

N.D.: 対象の遺伝子不検出

*1: 精製プラスミドを用いた株, *2, *3: 同一株でAmpCも検出, *4: 同じ検体から別の菌種検出

表2 AmpC保有菌株の性状

No.	分離年 -検体No.	菌種 (<i>E. coli</i> の O血清及びST型)	AmpC	Inc group	耐性を示した薬剤
1	2015-13	<i>H. alvei</i>	ACC	N.D.	
2	2013-1	<i>E. coli</i> (OUT,ST131)	CIT	FIB, FrepB	
3	2014-3	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
4	2014-12	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
5	2014-13	<i>C. freundii</i>	CIT	FrepB	
6	2014-15	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
7	2015-6	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
8	2015-8**	<i>E. coli</i> (OUT,ST648)	CIT	I1	NA, NFLX, CPFX, ST
9	2015-12	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
10	2015-17**4	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
11	2015-18**1	<i>C. freundii</i>	CIT	N.D.	
12	2016-5	<i>E. coli</i> (OUT,ST1193)	CIT	FIA, FIB	GM, KM, NA, NFLX, CPFX, SM, ST, TC
13	2013-3	<i>M. morgani</i>	DHA	N.D.	FOM
14	2013-11	<i>M. morgani</i>	DHA	N.D.	CP
15	2014-1**1	<i>E. coli</i> (OUT,ST38)	DHA	FrepB	ST
16	2015-5**5	<i>M. morgani</i>	DHA	N.D.	FOM
17	2015-21**6	<i>M. morgani</i>	DHA	N.D.	CP, FOM, TC
18	2014-9	<i>E. cloacae</i>	EBC	N.D.	
19	2013-6	<i>E. cloacae</i>	N.D.	N.D.	
20	2013-7	<i>E. cloacae</i>	N.D.	N.D.	
21	2015-1	<i>E. cloacae</i>	N.D.	N.D.	
22	2015-5**5	<i>E. coli</i> (OUT,ST40)	N.D.	FrepB, K/B	SM
23	2015-14	<i>E. cloacae</i>	N.D.	N.D.	
24	2015-17**4	<i>K. aerogenes</i>	N.D.	N.D.	
25	2015-21**2, **6	<i>E. coli</i> (OUT,ST550)	N.D.	FIB, FrepB	
26	2016-4	<i>E. cloacae</i>	N.D.	N.D.	

Chloramphenicol;CP, Fosfomycin;FOM, Gentamicin; GM, Kanamycin; KM, Nalidixic acid;NA, Norfloxacin;NFLX,

Ciprofloxacin;CPFX, Streptomycin;SM, Trimethoprim-sulfamethoxazole;ST, Tetracycline;TC

N.D.: 対象の遺伝子不検出

*1: 精製プラスミドを用いた株, *2, *3: 同一株でESBLも検出, *4, *5, *6: 同じ検体から別の菌種検出