

# 1. 北海道で分離された腸管出血性大腸菌の薬剤耐性に関する研究

○佐藤 凜 (北海道立衛生研究所)

## 【研究目的】

腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC)感染症は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)では3類感染症として届出が義務付けられ、北海道内でも毎年200件前後の届出がある。本感染症は無症状から腹痛、下痢、出血性大腸炎まで様々な臨床症状を呈し、さらには10%前後で溶血性尿毒症症候群(HUS)を合併し死に至ることもある。

EHEC感染症の治療において抗菌薬を使用する場合には、早期のホスホマイシン(FOM)の投与が有効とされているが、国内では、以前よりFOMの耐性株の存在が報告されてきた[1]。北海道内で分離されたEHECにおいても、これまでの当所の調査研究で小児の第一選択薬であるFOMの耐性株を小児患者からすでに確認しているが、その耐性機構については不明である。そこで、道内で分離されたEHECについて計22種類の薬剤に対する感受性を調査し、薬剤耐性の現状を明らかにするとともに、FOM耐性株の耐性機構を検討したので報告する。

## 【研究計画】

### 1. 薬剤感受性試験

2022年および2023年に道内で分離され当所が保有する208株を対象に、Kirby-Bauer法による薬剤感受性試験を行った。また、当所で既に薬剤感受性試験を実施した996株(2010~21年)も併せて、0血清群ごとの薬剤耐性パターンを解析した。FOMに対して非感性であった株については、CLSIに準拠した微量液体希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。

### 2. プラスミド媒介性耐性遺伝子の検出およびPPFテスト

FOMに対して非感性であった株について、PCR法によりプラスミド媒介性耐性遺伝子(*fosA*, *fosA3*, *fosC2*)の検出を行った。PCRのプライマーはHouらの方法に従った[2]。*fosA3*陽性であった2株について、その酵素活性を確認するために、Wachinoらの方法に従いホスホノギ酸(PPF)テストを行った[3]。被検菌を、ミューラーヒントン(MH)培地にグルコース6リン酸(G6P)を25 $\mu$ g/mLになるように添加したMH-G6P培地に塗布した。FOMディスクを2枚配置し、PPFを1mg添加し、一晚培養後、発育阻止円径を測定した。

### 3. 耐性変異の検討

FOMに対して非感性であった株について、サンガーシーケンス法によりFOM耐性に関与

する内在性遺伝子 (*murA*) 変異の有無の検討を行った。プライマーは Takahata らの方法に従った [4]。

#### 4. UhpT 系の機能の評価

FOM に対して非感性であった株について、その輸送系 (UhpT 系) の機能を評価するために、Takahata らの方法に準じて、0.2% の G6P を含む M9 最小培地での発育性を確認した [4]。

##### 【実施内容・結果】

表 1 に主要 0 血清群のディスク拡散法結果を示した。当所に搬入された EHEC 1204 株に対してディスク拡散法を実施した結果、423 株 (35.1%) が 1 剤以上に耐性を示した。最も検査菌株数が多かった 0157 は 443 株中 367 株 (82.8%) が感受性だったのに対し、026 は 283 株中 176 株 (62.2%) で 1 剤以上の耐性が認められ、そのうち 3 剤以上に耐性を示す菌株も 8 割を超えていた。また、0111 では 39 株中 35 株 (89.7%) で 1 剤以上の耐性が認められ、そのうち 3 剤以上に耐性を示す菌株も 9 割を超えていた。

1204 株のうち FOM 非感性株は、R が 10 株、I が 15 株の計 25 株 (2.1%) が認められた。FOM に対して R であった 10 株は全て MIC 値が  $128 \mu\text{g/mL}$  以上であり、そのうち、MIC 値が  $1024 \mu\text{g/mL}$  以上であった 2 株については *fosA3* を保有していた。FosA3 非産生株及び FosA3 産生株の PPF テスト結果を図 1 に示した。FosA3 非産生株については、PPF の添加により FOM ディスク周囲の発育阻止円径の拡大は見られなかった。一方、FosA3 産生株ではどちらも 5mm 以上の拡大が認められた。

FOM に対して非感性であった 25 株中、4 株で *murA* に変異が認められた。このうち、3 株で 254 番目のアラニン (Ala) がトレオニン (Thr) に変化し、1 株で 246 番目のアルギニン (Arg) がシステイン (Cys) に変化していた。また、FOM に対して非感性であった 25 株中、18 株 (72%) が 0.2% の G6P を含む M9 最小培地に発育しなかった (表 2)。

##### 【考察と今後の課題】

主要 0 血清群のディスク拡散法結果から、0157 と比較して、026、0111 は薬剤感受性が低下しやすい可能性が示された。これまでも、026 や 0111 が他の血清群と比較して薬剤感受性が低下しやすい傾向にあるという報告があり [5]、その状況と相違はなかった。

本研究で、FOM 耐性遺伝子の *fosA3* を保有する株が 2 株確認された。PPF テストの結果より、これら 2 株の保有する *fosA3* は酵素活性を有することが示唆された。*fosA3* は伝達性プラスミド上にコードされており、他の EHEC や他菌種にまで水平伝播し、拡大することが懸念される [6]。今後は、全ゲノム解析により *fosA3* を保有した 2 株のプラスミドを比較し、その相同性を確認する必要があると考えられる。

*murA* に変異が認められた 4 株では、MurA 機能が低下し FOM が結合できなくなった結果、非感性になることが示唆された。今後は、*murA* 遺伝子を過剰発現させ MIC 値を測定するなど、さらに検討が必要である。また、18 株で 0.2% の G6P を含む M9 最小培地に発育しなかったことから、これらの株では UhpT を介した FOM の菌体内取り込みが低下し、非感性にな

ることが示唆された。

*fosA3* 保有プラスミドの水平伝播や、*murA* 変異株および UhpT 機能の低下した株が集団感染を引き起こせば治療困難な事例が増加する危険がある。FOM の適正使用等、今後の FOM 耐性頻度上昇に留意する必要があると考えられた。

#### 【参考文献】

- [1] Midori Hiroi *et al.* Jpn. J. Infect. Dis. 65 198-202 2012
- [2] Jianxia Hou *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 56 (4) 2135-2138 2012
- [3] Jun-ichi Wachino *et al.* J. Clin. Microbiol. 52 (10) 3827-3828 2014
- [4] Sho Takahata *et al.* Int. J. Antimicrob. Agents 35 (4) 333-337 2010
- [5] 岩佐奈津美ら 日本食品微生物学会雑誌 35(3) 154-158 2018
- [6] Tsung Ying Yang *et al.* J. Microbiol. Immunol. Infect. 52 (1) 9-21 2019

#### 【経費使途明細】

使 途	金 額
薬剤感受性試験用品(薬剤、培地等)	33,162 円
PCR 用試薬(プライマー22本)	23,958 円
その他試薬(輸送系機能評価試験用試薬、PPF テスト用試薬等)	231,990 円
プラスチック消耗品	6,710 円
振込手数料 (440 円×4、550 円×3、770 円×1)	4,180 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

表 1. 主要 O 血清群のディスク拡散法結果

O 血清群	感受性(株)	耐性(株)												合計(株)
		1 剤	2 剤	3 剤	4 剤	5 剤	6 剤	7 剤	8 剤	9 剤	10 剤	11 剤	12 剤	
0157	367	23	25	15	6	5	2	0	0	0	0	0	0	443
026	107	14	19	8	37	59	35	3	1	0	0	0	0	283
0103	68	2	4	3	1	3	3	0	0	0	0	0	0	84
091	23	24	8	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64
0111	4	1	2	4	17	2	2	1	1	1	0	2	2	39

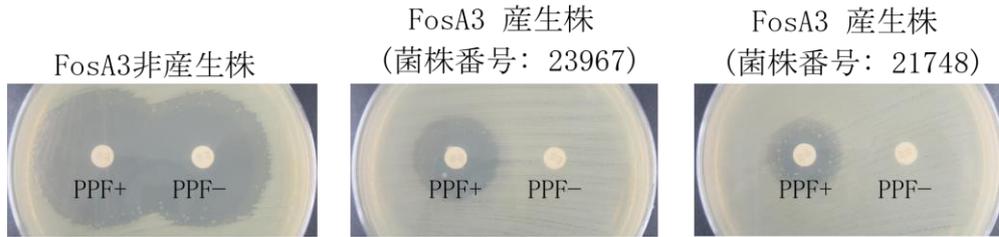


図 1. FosA3 非産生株及び FosA3 産生株の PPF テスト結果

表 2. FOM 非感性株の血清型、薬剤感受性、FOM 耐性遺伝子の保有、*murA* 変異、0.2%G6P 含有 M9 培地での発育

菌株番号	血清型	薬剤感受性		FOM耐性遺伝子の保有	<i>murA</i> 変異	0.2%G6P含有 M9培地での発育
		MIC値 (微量液体希釈法)	ディスク拡散法			
10418	026:H11	64	I	-	-	-
11158	0g183:H18	32	I	-	-	+
12200	026:Hg11	64	I	-	Arg246Cys	-
12203	0g118:H16	64	I	-	Ala254Thr	+
13074	0g49:Hg45	128	R	-	-	-
13538	0157:H7	64	I	-	-	+
14727	026:H11	512	R	-	-	-
15895	026:H11	64	I	-	-	-
15904	026:H11	32	I	-	-	-
17731	026:H11	64	I	-	-	-
18051	091:Hg14	32	I	-	-	+
18345	026:H11	64	I	-	-	-
20743	026:H11	256	R	-	-	-
21455	0gN34:Hg49	256	R	-	-	-
21512	0gN34:Hg49	256	R	-	-	-
21746	0gN34:Hg49	256	R	-	-	-
21748	0103:H2	>1024	R	+ ( <i>fosA3</i> )	-	+
22812	0157:H7	32	I	-	Ala254Thr	+
24180	0gN34:Hg49	256	R	-	-	-
23967	0157:H7	>1024	R	+ ( <i>fosA3</i> )	Ala254Thr	+
24007	0g91:Hg14	128	R	-	-	-
24766	026:H11	64	I	-	-	-
24902	026:H11	32	I	-	-	-
24903	026:H11	32	I	-	-	-
25373	026:H11	32	I	-	-	-