

食品，環境水等由来大腸菌の薬剤感受性について（第2報）

阿波野祥司 福留智子 山田亨 萩平敦朗 元明秀成

Drug susceptibility testing of *Escherichia coli* strains isolated from food, water, and like of the environment(II)

Shoji AWANO, Tomoko FUKUDOME, Tohru YAMADA, Atsurou HAGIHIRA, Hidenari GANMYO

要旨

宮崎県内を流通する食品，環境水等から分離された大腸菌について薬剤感受性検査を行い，主に基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)産生菌を目的として，第3世代セファロスポリン系薬剤耐性大腸菌の検出を実施した．その結果，ESBL産生菌83株，AmpC型βラクタマーゼ(AmpC)産生菌10株，その他の耐性菌3株の計96株を検出した．今回検出されたESBL産生菌は，P/T，AMK及びFOMで薬剤感受性率が高く，治療の際の抗菌薬選択の参考になると考えられる．

ESBL産生菌については，PCR法で耐性遺伝子の型別を実施した．その結果，各遺伝子型で薬剤感受性データに違いがみられることが判明した．

キーワード： 薬剤感受性， ESBL産生菌， フルオロキノロン耐性

はじめに

薬剤耐性菌は，院内感染又は抗菌薬投与中に発生する感染症の原因微生物として知られているが，耐性菌感染症は抗菌薬投与歴がない健康人でも発症することがある¹⁾．

2014年の厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS)の情報によると，第3世代セファロスポリン系薬及びフルオロキノロン系薬の大腸菌耐性株が年々増加してきている．

また，近年では家畜から基質特異性拡張型βラクタマーゼ(Extended-spectrum β-lactamase; ESBL)を産生する大腸菌の分離や家禽におけるESBL産生菌以外のAmpC型βラクタマーゼ(AmpC)産生菌の増加が報告されている²⁾³⁾⁴⁾．

このように，薬剤耐性菌の出現はヒトへの抗菌薬使用以外に農畜産物への抗菌薬の使用も原因があると考えられている⁵⁾⁶⁾．

そこで今回，食品，環境水，食中毒(疑い)患者等から分離された第3世代セファロスポリン系薬剤耐性大腸菌について，ESBL産生菌及びAmpC産生菌の分布状況並びに各種抗菌薬に対する薬剤感受性試験を実施したので報告する．

材料と方法

1 材料

平成25年度から27年度末までに当研究所に搬入された，食品，環境水，食中毒(疑い)患者便から分離した第3世代セファロスポリン系薬剤耐性大腸菌96株を検査材料とした．

2 薬剤感受性試験

本試験は米国臨床検査標準協会(Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) M100-S21の勧告に準拠した市販の感受性ディスクを用いて実施した(K-B法)．

供試薬剤は，アンピシリン(ABPC)，セフポドキシム・プロキセチル(CPDX-PR)，セファゾリン(CEZ)，セフォタキシム(CTX)，セフトジジム(CAZ)，セフェピム(CFPM)，セフメタゾール(CMZ)，アズトレオナム(AZT)，タゾバクタム・ピペラシリン(TAZ/PIPC)，アミカシン(AMK)，ゲンタマイシン(GM)，ミノサイクリン(MINO)，クロラムフェニコール(CP)，ホスホマイシン(FOM)，ナリジクス酸(NA)，レボフロキサシン(LVFX)及びスルファメトキサゾール・トリメトプ

リム(ST)の計 18 薬剤を使用した。

3 ESBL, AmpC 確認試験等

CLSI document(M100-S20)による ESBL の検査法(ディスク拡散法)に基づき、阻止円直径(mm)が、CPDX(≤ 17), CAZ(≤ 22), AZT(≤ 27), CTX(≤ 27), CTRX(≤ 25)のいずれかの条件を満たすときに ESBL 産生菌を疑い、確認試験は、Double Disk Synergy Test(DDST)を用い、クラブラン酸(AMPC/CVA)によって酵素活性が阻害され CAZ または CTX の阻止円が単剤に比べクラブラン酸併用で、5mm 以上阻止円の増強が起きたものを ESBL 産生菌とした。

ESBL 産生菌と判定した菌株は、TEM 型, SHV 型, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group 及び CTX-M-9 group のプライマーを用いて PCR 法で耐性遺伝子の型別を実施した⁷⁾。

また、DDST で ESBL 産生菌と判定されなかった菌株は、ボロン酸を用いた DDST(AmpC/ESBL 鑑別ディスク)で AmpC 産生菌の鑑別を行った。

結果

1 薬剤耐性遺伝子分布状況

各薬剤耐性遺伝子分布状況を由来別に示した(表 1)。

事業場排水 32 件中 31 件が食鳥処理施設由来で、食材 35 件中 27 件が鶏肉由来であった。この結果から食品・環境水等から分離される第 3 世代セファロsporin系薬剤耐性大腸菌の大半は、食鳥処理場及び鶏肉由来であることが伺えた。

事業場排水及び鶏肉由来では SHV 型 ESBL 産生菌の割合がそれぞれ 11 検体(34.4%), 11 検体(40.7%)と高い割合であった。

牛・豚肉由来では SHV 型は 2 件(28.6%)であったが、AmpC 産生菌の割合が 4 件(57.1%)と高く、事業場排水及び鶏肉由来とは違う傾向を示した。

患者便由来では、SHV 型の検出は無く、CTX-M-1 が 15 件(17.2%), CTX-M-9 が 14 件(48.3%)と CTX-M 型の割合が高く出た。TEM 型との混合タイプも合わせた CTX-M 型は 27 件(93.1%)で、ヒト糞便から分離される ESBL 産生菌はほとんどが CTX-M 型で、環境中とは ESBL 産生菌遺伝子型の分布状況が大きく異なることがわかった。

2 各遺伝子型別の薬剤感受性

各遺伝子型ごとの薬剤感受性率(%)を表 2 に示

した。

いずれの遺伝子型においても、P/T, AMK 及び FOM の感受性率は良好で、ESBL 感染症治療の際の参考になると考えられる。一方、NA は AmpC 産生菌以外は感受性率が低く、LVFX は CTX-M-1 及び CTX-M-9 で 50%以下の感受性率であった。ST は、TEM, TEM+M-1 で感受性率が低い結果になった。

次に、各遺伝子型別のセファロsporin系薬剤及びモノバクタム系薬剤の感受性率の比較を実施した。

その結果、SHV 型では CTX, CAZ 及び AZT の感受性率が低く、CTX-M-1 と CTX-M-9 の比較では CTX-M-1 の方が、CAZ, CFPM 及び AZT の感受性率が低いことがわかった。

次に、SHV 型と SHV 型以外で発育阻止円の大きさに差が見られたので各薬剤ごとに有意差検定を実施した(表 3)。その結果、CPDX, CEZ, CTX, CTRX 及び CFPM では有意に SHV 型以外の発育阻止円が小さく、CAZ 及び AZT は SHV 型が有意に発育阻止円が小さい結果になった。特に CPDX 及び CEZ については SHV 型以外の遺伝子型はほとんど阻止円の形成が無く、SHV 型は 12~3mm 程度の阻止円が形成されることがわかった。

3 各遺伝子型の由来別薬剤感受性率

各遺伝子型ごとに、環境由来とヒト糞便由来検体での感受性率を表 4 に示した。その結果、CTX-M-1 では NA, LVFX 及び ST は糞便由来の感受性が低く出ることがわかった。CTX-M-9 では、MINO, NA 及び LVFX が環境由来の感受性が低く出ることがわかった。TEM+M-1 では NA と LVFX が、TEM+M-9 では ST において環境由来の感受性が低く出ることがわかった。

まとめ

今回検出した薬剤耐性遺伝子保有菌株は、その大半が事業場排水及び鶏肉由来で、私たちの身近な所に薬剤耐性菌が存在していることが推測された。事業場排水及び鶏肉由来の ESBL 産生菌は、SHV 型が多く、ヒト糞便由来では CTX-M 型が大半を占め SHV 型は検出されなかった。このことから、環境由来の ESBL 産生菌とヒト糞便由来の ESBL 産生菌との関連性は低いものと推測される。

しかし、事業場排水及び鶏肉由来 ESBL 産生菌から CTX-M 型 ESBL 産生菌は検出されており、今後も注意深く監視していく必要があると考えられた。

フッ素非含有キノロン系の NA は AmpC 産生菌で 90.0% の感受性率だったがすべての ESBL 産生菌では 10~40% 台の感受性率で NA 耐性菌が蔓延していることが推測された。

一般的に ESBL 産生菌はフルオロキノロン系 LVFX に耐性を示すことが多いとされているが⁸⁾、ESBL の各遺伝子型ごとで感受性率に差が出た。

また、LVFX 以外にも各遺伝子型を環境由来とヒト糞便由来に分けて解析した結果、薬剤ごとに感受性率が違うことが判明した。

成人の場合の EHEC 感染症における第 1 選択薬は LVFX であるので、ESBL 産生 EHEC であった場合は治療効果が低い可能性が出てくると考えられる。

今後は、環境由来の CTX-M 型 ESBL 産生菌とヒト糞便由来の CTX-M 型 ESBL 産生菌について、LVFX 等の感受性率の関連等各種動向について調査を継続していく予定である。

文献

- 1) 石井良和：家畜および食肉から分離される ESBL 産生菌, THE CHEMICAL TIMES, No2(通巻 216 号), 9-12, (2010)
- 2) 石畝史 他：福井県内における人及び鶏肉由来基質特異性 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的検討, 日獣会誌, 63, 883-887, (2010)
- 3) 麻生嶋七美 他：ウシ・ブタ, 市販鶏肉及びヒトから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性状解析, 日本食品微生物学会雑誌, 29(4), 215-220, (2012)
- 4) 下島優香子 他：食肉からの基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌の検出, 東京健安研セ年報, 62, 145-150, (2011)
- 5) 田村豊：動物用抗菌性物質と薬剤耐性菌ー最近の国際動向とわが国の対応ー, モダンメディア, 47, 219-226, (2001)
- 6) 浅井鉄夫：家畜を介した耐性菌汚染ー日本と世界・現状と対策, 臨床と微生物, vol37 No6, 635-639, (2010)
- 7) 国立感染症研究所細菌第 2 部： β -ラクタマーゼ遺伝子の検出法 (ESBL-SOP/ver3.0), (2007)
- 8) 村谷哲朗 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, vol52 No10, 550-567, (2004)

表1 薬剤耐性遺伝子分布状況

各遺伝子型	事業場排水	鶏肉	牛・豚肉	野菜	患者便	計
TEM	2	0	0	0	1	3
SHV	11	11	2	0	0	24
CTX-M-1	5	6	0	0	5	16
CTX-M-2	0	2	1	0	0	3
CTX-M-9	3	1	0	0	14	18
TEM+SHV	5	1	0	0	0	6
TEM+M-1	2	0	0	0	4	6
TEM+M-9	2	1	0	0	4	7
AmpC	2	3	4	1	0	10
その他	0	2	0	0	1	3
計	32	27	7	1	29	96

表2 遺伝子型別感受性率(%)

各遺伝子型	CTX	CAZ	CFPM	CMZ	AZT	P/T	AMK	FOM	NA	LVFX	ST
TEM	66.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7	100.0	33.3
SHV	0.0	8.3	100.0	100.0	12.5	100.0	100.0	100.0	33.3	95.8	87.5
CTX-M-1	0.0	37.5	56.3	100.0	25.0	100.0	100.0	93.8	31.3	43.8	68.8
CTX-M-2	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	33.3	100.0	100.0
CTX-M-9	0.0	88.9	77.8	100.0	72.2	100.0	100.0	94.4	44.4	50.0	72.2
TEM+SHV	0.0	16.7	100.0	100.0	16.7	100.0	100.0	100.0	16.7	50.0	83.3
TEM+M-1	0.0	50.0	16.7	100.0	16.7	100.0	100.0	100.0	66.7	83.3	0.0
TEM+M-9	0.0	100.0	85.7	100.0	57.1	71.4	100.0	85.7	28.6	100.0	57.1
AmpC	30.0	40.0	100.0	40.0	80.0	100.0	100.0	100.0	90.0	100.0	100.0
その他	0.0	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7

表3 セファロスポリン系薬剤発育阻止円の比較(mm)(ESBL)

	CPDX	CEZ	CTX	CTRX	CAZ	CFPM	AZT
SHV型	13.8	12.3	21.0	20.3	17.2	26.1	16.5
SHV型以外	6.7	6.2	11.8	16.0	21.9	19.2	19.9
確率(P)	9.29E-20	3.99E-23	1.04E-15	1.67E-18	1.90E-05	7.24E-10	2.00E-03
t値	15.8	19.3	12.2	14.6	4.79	7.82	3.26

表4 環境由来と人体由来で感受性率に差が見られる薬剤

各遺伝子型	CAZ	CFPM	AZT	MINO	NA	LVFX	ST
CTX-M-1(環境)	45.5	45.5	27.3	81.8	36.4	54.5	72.7
CTX-M-1(人体)	20.0	80.0	20.0	100.0	0.0	20.0	40.0
CTX-M-9(環境)	100.0	75.0	75.0	50.0	0.0	25.0	75.0
CTX-M-9(人体)	85.7	78.6	71.4	100.0	57.1	57.1	71.4
TEM+M-1(環境)	50.0	50.0	50.0	100.0	0.0	50.0	0.0
TEM+M-1(人体)	50.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	0.0
TEM+M-9(環境)	100.0	100.0	100.0	100.0	33.3	100.0	0.0
TEM+M-9(人体)	100.0	75.0	25.0	100.0	25.0	100.0	100.0