

# 宮崎県で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26, O157 の 薬剤感受性と分子生物学的解析

津曲洋明 水流奈己 阿波野祥司 吉野修司 元明秀成

## Analysis of Molecular Biology and Antibiotic-sensitivity in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotype O26 and O157 strains isolated in Miyazaki Prefecture.

Hiroaki TSUMAGARI, Nami TSURU, Shoji AWANO, Shuji YOSHINO, Hidenari GANMYO

### 要旨

宮崎県内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26, O157 の 147 株を用いて 19 薬剤の薬剤感受性試験を実施した。その結果, 74 株 (50.3%) が試験した薬剤のいずれかに耐性 (R) 又は中間 (I) 株であった。多剤耐性株の中には基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生株が 2 株 (1.4%) 含まれ 6 薬剤に耐性であった。この 2 株の ESBL 遺伝子の検出を PCR 法で実施した結果, いずれも CTX-M-9 グループの遺伝子を保有し, プラスミドプロファイルは 2 株とも 43Md, 41Md, 10Md, 4.5Md のプラスミドを保有していた。更に, 試験した菌株の中にはホスホマイシン (FOM) 耐性株も 2 株 (1.4%) あり, 2 株とも 4 薬剤に耐性であった。この FOM 耐性株はいずれも 42Md, 28Md, 13Md, 4.8Md, 2.9Md, 2.3Md のプラスミドを保有していた。今後, EHEC の ESBL 産生株や FOM 耐性株の増加が危惧され, 抗菌薬の適正使用の徹底と患者および食品等の ESBL 産生株・FOM 耐性株の動向をモニタリングする必要があると思われた。

キーワード: EHEC, 薬剤感受性, ESBL 産生, ホスホマイシン耐性, プラスミド

### はじめに

腸管出血性大腸菌 (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) 感染症は, 感染症法の 3 類感染症として届け出が義務づけられ, 宮崎県内でも毎年患者が発生している。本症は重症となると溶血性尿毒症症候群 (HUS) を併発し, 死亡する事例もある<sup>1)</sup>。EHEC の中でも血清型 O26 と O157 は全国同様<sup>2)</sup>, 本県でも毎年, 患者が多い血清型で過去 10 年間に 435 株が分離されている。また近年, 尿路や腸管由来の大腸菌において ESBL 産生株の増加<sup>3)</sup>や EHEC の ESBL 産生株の検出に関する報告<sup>4), 5), 6), 7)</sup>がある。更に EHEC の治療薬である FOM 耐性株の報告<sup>8), 9)</sup>もあり, 本県での検出も懸念される。このため, 血清型 O26 と O157 の EHEC 保存菌株 147 株

を用いて薬剤感受性試験を実施し, 薬剤耐性保有状況を検討した。

また, 検出された ESBL 株と FOM 耐性株については分子生物学的解析ならびに疫学情報解析を実施したので報告する。

### 材料と方法

#### 1 材料

平成 22 年度から平成 26 年度までの 5 年間に分離され凍結保存されていた EHEC O26 と O157 の 147 株を試験に供した。

#### 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

勧告に準拠した市販の感受性ディスク（センシ・ディスク BD 社）を用いたディスク拡散法（K-B 法）にて実施した。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）、セフトリアキソン（CTRX）、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）、スルファメトキサゾール・トリメトプリム（ST）及びカナマイシン（KM）の計 19 薬剤を使用した。

### 3 ESBL 確認試験

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（ $\leq 17$ ）、CAZ（ $\leq 22$ ）、AZT（ $\leq 27$ ）、CTX（ $\leq 27$ ）、CTRX（ $\leq 25$ ）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) により、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。

### 4 ESBL 遺伝子型別試験

ESBL 産生菌と判定された菌株は、TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 グループ、CTX-M-2 グループ及び CTX-M-9 グループのプライマーを用いた PCR 法<sup>10)</sup>で耐性遺伝子の検出を行った。

### 5 供試株のプラスミドプロファイル

ESBL 産生と FOM 耐性と判明した 4 株は、アルカリ SDS 法<sup>11)</sup>の Plasmid Mini Prep Kit (Nippon Gene) を用いてプラスミドを抽出し、プラスミドプロファイルを判定した。なお検出したプラスミドの分子量は、*E. coli* V517 及び *E. coli* NR1 が持つ既知の大きさのプラスミドマーカーと比較して推定した。

### 6 FOM 耐性株の確認試験

K-B 法による薬剤感受性試験で FOM に R 又は I であった株は確定試験として Etest (シスメ

ックス・バイオメリュ社) を行い、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し決定した。

### 7 疫学情報解析

ESBL 産生と FOM 耐性が判明した 4 株については、過去の疫学情報を基に解析を行った。

## 結果

#### 1 K-B 法による薬剤感受性試験

147 株中 74 株 (50.3%) が試験した 19 薬剤のいずれかに耐性 (R) 又は中間 (I) であった。これらの内訳は単剤に I のみを示した株は 23 株 (15.6%)、単剤 R が 7 株 (4.8%)、2 薬剤以上に R 又は I が 44 株 (30.0%) であった。(表 1)

また、各抗菌薬の耐性株数と検出率 (%) は ABPC 26 株 (17.7)、MINO 23 株 (15.6)、PIPC 22 株 (15.0)、CEZ 19 株 (12.9)、FOM 5 株 (3.4)、CP 5 株 (3.4)、ST 5 株 (3.4)、NA 5 株 (3.4)、CTX 4 株 (2.7)、CTRX 4 株 (2.7)、AZT 3 株 (2.0)、CPDX-PR 3 株 (2.0)、CAZ 2 株 (1.4)、CMZ 1 株 (0.7) であった。(表 2)

#### 2 ESBL 確認試験と疫学調査結果

147 株中 2 株 (1.4%) が ESBL 産生菌と推定され、確認試験の結果、2 株とも ESBL 産生株で、CTX-M-9 グループの遺伝子を保有していた。

(図 1)

この 2 株は 2012 年に A 保育園で発生した集団発生事例と 2013 年に B 保育所で集団発生した園児分離株で、更にプラスミドプロファイルを行い、2 株とも同じプラスミドプロファイルを示し 43Md, 41Md, 10Md, 4.5Md のプラスミドを保有していた。(図 2)

表1 19薬剤の感受性試験結果 (CLSI 法)

結果	感受性と耐性パターン	株数	検出率(%)
感受性(S)	すべてS	73	49.7
耐性(R,I)	1薬剤中間(I)のみ	<u>23</u>	15.6
	1薬剤耐性(R)のみ	7	4.8
2剤(R,I)	<u>CEZ,KM</u>	<u>4</u>	8.8
	<u>MINO,CEZ (1)</u>	3	
	<u>MINO,CEZ (2)</u>		
	<u>FOM,KM</u>	<u>2</u>	
	<u>CP,MINO</u>	<u>1</u>	
	FOM,NA	1	
	AZT, NA	1	
	ABPC,PIPC	1	
3剤((R,I)	ABPC,PIPC,CEZ (6) <u>ABPC,PIPC,CEZ</u>	7	6.8
	<u>AZT,NA,FOM</u>	<u>1</u>	
	AZT,FOM,ST	1	
	<u>NA,FOM,KM</u>	<u>1</u>	
4剤(R,I)	ABPC,PIPC,CEZ,MINO (4) <u>ABPC,PIPC,CEZ,MINO</u>	7	9.5
	ABPC,PIPC,MINO,CEZ	2	
	ABPC,PIPC,CEZ,FOM	2	
	ABPC,PIPC,CEZ, ST	1	
	ABPC,PIPC,CEZ,CTX	1	
	<u>CTR,CAZ,CPDX-PR,CTX</u>	<u>1</u>	
5剤(R)	ABPC,PIPC,ST,CEZ,CTX	1	0.7
6剤(R,I)	ABPC,PIPC,CPDX-PR,CEZ,CP, <u>MINO</u>	<u>1</u>	1.4
	ABPC,PIPC,CPDX-PR,CEZ,CTX,CTR	1	
7剤(R,I)	ABPC,CPDX-PR,CEZ,MINO,ST,CP,FOM	1	1.4
	ABPC,PIPC,CPDX-PR,CEZ,CTX,CTR, <u>AZT</u>	1	
9剤(R,I)	ABPC,AZT,MINO,CP,FOM,NA,ST, <u>PIPC,KM</u>	<u>1</u>	0.7
12剤(R,I)	ABPC,PIPC,CPDX-PR,CEZ,CTX,CTR,CAZ,CMZ, MINO, <u>AZT,FOM,KM</u>	<u>1</u>	0.7
合 計		147	

S : 感性    I : 中間    R : 耐性

表 2. 試験菌株の耐性薬剤と耐性菌株数

No.	薬剤名	耐性(R)株数	検出率(%)
1	ABPC	26	17.7
2	MINO	23	15.6
3	PIPC	22	15.0
4	CEZ	19	12.9
5	FOM	5	3.4
6	CP	5	3.4
7	ST	5	3.4
8	NA	5	3.4
9	CTX	4	2.7
10	CTRX	4	2.7
11	AZT	3	2.0
12	CPDX-PR	3	2.0
13	CAZ	2	1.4
14	CMZ	1	0.7

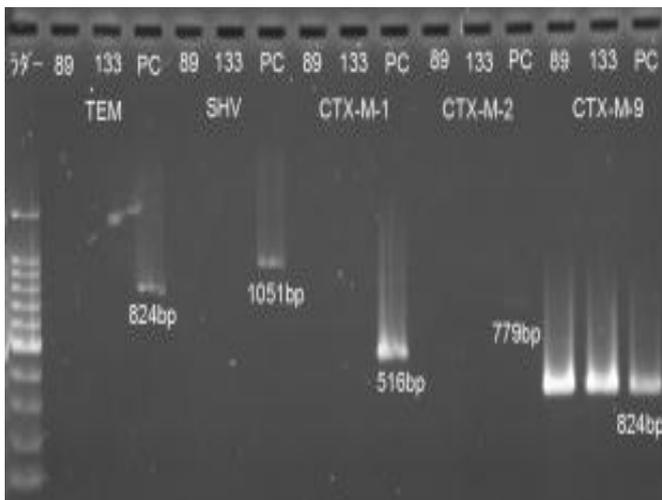


図1 PCR法によるESBL株の遺伝子検出結果

ラダー：100bpDNA

89,133：ESBL株(EHEC O26:H11)

PC：各遺伝子型陽性コントロール

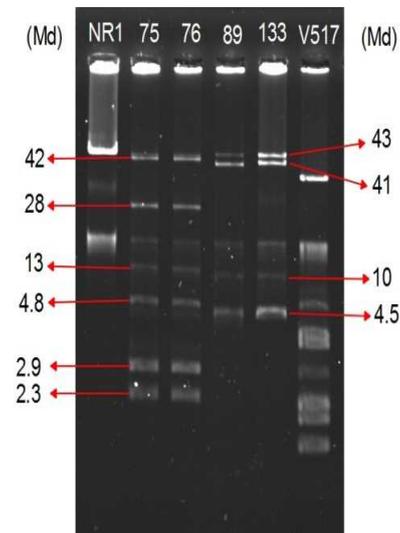


図2 ESBL株とFOM耐性株のプラスミドプロファイル

NR1：E. coli NR1 マーカー株

75：EHEC (O26:H11) FOM 耐性株

76：EHEC (O26:H11) FOM 耐性株

89：EHEC (O26:H11) ESBL 株

133：EHEC (O26:H11) ESBL 株

V517：E. coli V517 マーカー株

### 3 FOM 耐性株の確認試験と疫学調査結果

K-B 法で FOM に R 又は I であった 12 株 (8.2%) について確認試験を行い、2 株が FOM 耐性であった。(表 3)

**表 3 MIC 測定法による薬剤感受性試験結果**

供試菌株 No.	MIC ( $\mu$ g/ml)	最終判定結果
29	8	S
33	8	S
35	8	S
45	24	S
49	0.5	S
66	0.5	S
69	25	S
75	>1024	R
76	>1024	R
80	0.125	S
88	16	S
89	1	S

*E. coli* の判定基準 : S  $\leq$  64

I = 128

R  $\geq$  256

この 2 株は 2012 年 6 月に発生した家族内感染事例分離株で国立感染症研究所のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)で同一株と同定された分離株であった。また薬剤感受性試験により ABPC, PIPC, CEZ, FOM の 4 薬剤に耐性の多剤耐性株であった。更にこの 2 株のプラスミドプロファイルを実施した結果、いずれも 42Md, 28Md, 13Md, 4.8Md, 2.9Md, 2.3Md の 6 つのプラスミドを保有していた。(図 2)

### 考察とまとめ

ESBL 産生 EHEC 株の国内での検出は、今野ら<sup>5)</sup>が 2006 年の報告で 223 株中 1 株(0.4%) O103 を、2012 年に山口ら<sup>6)</sup>は 77 株中 1 株(1.3%) O15:H16 を検出し、更に 2015 年には岩佐ら<sup>7)</sup>は 570 株中 1 株(0.2%) O157 と 83 株中 1

株(1.2%) O26 を検出したと報告している。

今回、我々は 147 株中 2 株(1.4%)に EHEC O26 の ESBL 産生株を検出した。これらの報告より我が国では EHEC の ESBL 産生株は徐々に増加傾向を示している。

今回 ESBL 遺伝子の検出を PCR 法で行った結果、2 株とも CTX-M-9 グループの遺伝子を保有していた。この CTX-M-9 グループ遺伝子の検出報告は、ヒト由来大腸菌の ESBL 産生株を 2009 年に黒崎ら<sup>13)</sup>が ESBL 産生株 60 株中 CTX-M-9 グループを単独保有する株が 48 株(80%)であったとの報告や、本県患者便由来大腸菌でも ESBL 産生株の 48.3%が CTX-M-9 グループであったとの報告<sup>15)</sup>がある。

他方、食品からの ESBL 産生株は 2008 年に松下ら<sup>12)</sup>が鶏肉由来の大腸菌 179 株中 17 株(9.5%)検出し 2011 年に下島ら<sup>14)</sup>は東京都内に流通する食肉のうち、ESBL 産生株は国産鶏肉由来大腸菌が最も多く CTX-M-9 グループの遺伝子が 19 株中 11 株(57.9%)であったとの報告がある。これらの報告からヒト及び市販鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌では CTX-M-9 グループの遺伝子が多く検出されている。

ESBL 遺伝子はプラスミドを介して腸内細菌間で接合により伝達可能であるため、EHEC 患者の ESBL 産生株の増加が今後も危惧される。

今回の調査で宮崎県内も 2012 年には EHEC 患者に ESBL 産生株が含まれていることが明らかとなった。更に、多剤耐性株の EHEC 中には FOM 耐性株が家族内感染患者分離株 EHEC O26:H11 の 2 株に検出された。

臨床医は第一選択薬として FOM を投与することが多いが、FOM が効かず重症となるケースも懸念され、病院での的確な薬剤感受性試験結果による治療薬の選定がますます重要になると考えられる。

今後、EHEC 患者の ESBL 産生株や FOM 耐性株の増加が危惧され、抗菌薬の適正使用や患者および食品等の ESBL 産生株や FOM 耐性株の動向をモニタリングすることが重要と思われる。

渡邊ら<sup>16)</sup>は鶏肉の中でブロイラーと地鶏に ESBL 産生株の検出率が突出して高いが、国内においてセファロsporin系薬剤は使用が禁止されているため、農場内に常在する腸内細菌が新たな ESBL 産生遺伝子を獲得するのは困難であると述べている。今後、雛、農場、飼料等の詳細な調査に基づく肉用鶏における ESBL 産生菌の

発生防止策を積極的に講ずることが必要であるとも述べており、食品生産部門の研究の進展と改善策並びに県内医療機関患者治療時の抗菌薬の適正使用が ESBL 産生株や FOM 耐性株などの多剤耐性株の増加を防止するためには重要であると思われた。

## 文献

- 1) Karmali, M.A.: Infection verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev, **2**, 15-18, (1989)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報 腸管出血性大腸菌, IASA Vol. **35**, 117-118, (2014)
- 3) 豊福明和 他：尿路由来の基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の検出状況. 感染症学雑誌, **88**(5), 739, (2013)
- 4) 三輪良雄 他：腸管出血性大腸菌 157 の薬剤感受性および薬剤感受性とプラスミドの関連について, 感染症学雑誌, **76**(4), 258-290, (2002)
- 5) 今野貴之 他：腸管出血性大腸菌の薬剤耐について, 秋田県健康環境センター年報, **2**, 72-75, (2006)
- 6) 山口友美 他：基質特異拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼを産生する腸管出血性大腸菌 O15 の遺伝子解析, 宮城県保健環境センター年報, **30**, 27-30, (2012)
- 7) 岩佐奈津美 他：過去 10 年間に於ける福岡県内で発生した腸管出血性大腸 (O157, O26) 薬剤感受性の動向, 九州衛生環境技術協議会研究発表, 54-55, (2015)
- 8) Ishii Y. et al.: Extended-spectrum beta-lactamase-producing shiga toxin gene (Stx1)-positive *Escherichia coli* O26:H11 : a new concern, J. clin. Microbiol. ; **43**, 1072-1075 (2005)
- 9) Kon M. et al.: Cefotaxime-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 isolated from a patient with diarrhea, kansenshougakuzasshi, 161-168, (2005)
- 10) 国立感染症研究所細菌第 2 部： $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出 (ESBL SOP ver3.0), 40-52, (2007)
- 11) 中山広樹, 西方啓人：バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎, 秀潤社発行, 19-21, (1997)
- 12) 松下 秀 他：食品由来大腸菌におけるフルオロキノロン系薬剤耐性菌および基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の動向, モダンメディア, **54**, 10-17, (2008)
- 13) 黒崎守人 他：島根県における食肉の基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の汚染状況及び食肉由来株とヒト由来株との比較, 島根保環, **51**, 45-47, (2009)
- 14) 下島優香子 他：食肉からの基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の検出, 東京健安研 7 年報, **62**, 145-150, (2011)
- 15) 阿波野祥司 他：食品、環境水等由来大腸菌の薬剤感受性について (第 2 報), 宮城県衛生環境研究所年報, 第 **27** 号, 73-76, (2015)
- 16) 渡邊朋美 他：肉用由来および人由来の基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌群の関連性に関する研究, 静岡県環境衛生科学研究所報告, **55**, 31-36, (2012)