

集団下痢症事例由来ヒト糞便からのバンコマイシン耐性腸球菌および基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌の検出の試み

島山 薫*, 奥野 ルミ*, 遠藤 美代子*, 柳川 義勢*

Attempt of Detection of Vancomycin Resistant *Enterococcus* and Extended-spectrum β lactamase -producing *Enterobacteriaceae* from Human Stools Related with Outbreak cases

Kaoru HATAKEYAMA, Rumi OKUNO, Miyoko ENDO
and Yoshitoki YANAGAWA,

Keywords : 薬剤耐性菌 drug resistant bacteria, バンコマイシン耐性腸球菌 Vancomycin resistant *Enterococcus*
基質特異性拡張型βラクタマーゼ Extended-spectrum β lactamase

はじめに

バンコマイシン耐性腸球菌 (*Vancomycin resistant Enterococcus*, 以下VREと略す) および基質特異性拡張型βラクタマーゼ (extended-spectrum β- lactamase, 以下ESBLと略す) 産生菌は, 院内感染の原因菌として重要視されている薬剤耐性菌である。

VREは, 腸球菌 (*Enterococcus*) がバンコマイシン (以下VCMと略す) 等のグリコペプチド系抗生物質に対して高度耐性を獲得したものであり, ESBL産生菌はグラム陰性桿菌が第三世代セフエム系をも分解するβラクタマーゼを産生するようになったもので, *Klebsiella pneumoniae* や *Escherichia coli* などが知られている¹⁾。

これら薬剤耐性菌は, 健康者が感染しても健康上何ら問題を起ささないが, 慢性疾患で長期に渡って抗生物質投与を受けている患者や, 抵抗力の弱っている患者が感染すると, 敗血症や髄膜炎などの重篤な症状を引き起こすことがある。

これまで, 病院内での臨床材料等からの薬剤耐性菌の分離成績は数多く報告^{2,3)} されているが, ヒトの薬剤耐性菌の保有状況調査は, あまり行われていない。そこで, 薬剤耐性菌の保有状況調査の一環として, 集団下痢症事例由来ヒト糞便を対象にVREおよびESBL産生菌について調査を行ったので, その成績を報告する。

実験方法

1. 調査期間および検体

平成17年6月1日から8月31日の間に健康安全研究センターに搬入された, 集団下痢症患者糞便 800件およびその関係者糞便 671件計 1,471件を対象とした。

2. 分離方法

VREは, 塩化ナトリウム濃度を6.5%にした普通ブイヨ

ン培地 (栄研化学) に糞便を添加し, 37°C18時間増菌培養を行った。培養液をVCMを8μg/ml加えたエンテロコックセル培地 (BBL) に塗布し, 37°C48時間培養を行い, 発育してきたコロニーをトリプトソイブイオン (OXOID) に接種し, 45°C18時間の発育試験を行った。

ESBL産生菌の検出は, 糞便をセフトキサシム(以下CTXと略す) を1μg/ml添加したマッコンキー培地 (栄研化学) に塗布し, 37°C18時間培養を行った。培地に発育してきたコロニーについて, 生化学的性状試験により菌種の同定を行った。

3. VCM耐性遺伝子検査法

45°C発育試験陽性の菌株は, Table.1 に示すプライマーを用いたPCR法により, VCM耐性遺伝子である *VanA* 遺伝子および *VanB* 遺伝子の検出を行った⁴⁾。

4. ESBL産生確認試験

1) 薬剤感受性試験

ダブルディスク法⁵⁾ により薬剤感受性試験を行った。すなわち, MacFarland 0.5 に調整した菌液をミュラーヒントン寒天培地 (栄研化学) に塗布後, Fig.1の左図に示したようにアモキシシリン-クラブラン酸 (A/C) 20/10μg ディスクを平板中央に置き, 中央とのディスク間距離を25mm離して5方向にセフポドキシム (CPDX) 10μg, セフトジジム (CAZ) 30μg, セフトリアキソン(CRX) 30μg, アズトレオナム(AZT) 30μg, セフトキサシム (CTX) 30μgの各ディスクを置いた。37°C18時間培養後, 阻止円の形状を観察し, アモキシシリン-クラブラン酸と各薬剤の間で阻止円の増強 (エッジの伸張等) が認められればESBL産生菌と判定した (Fig.1 右図)。25mmで変化が認められない場合は, ディスク間を20mmとし, 再度試験を行った。

*東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

*Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

Table 1. Primer sequences and predicted lengths of PCR amplification products for VRE and ESBLs

Amplified gene		Primer sequence(5'to3')	Fragment size (bp)
VRE^a			
VanA	A1	5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3'	732bp
	A2	5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'	
VanB	B1	5'-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3'	635bp
	B2	5'-GAT TTC GTT CCT CGA CC-3'	
VanC1	C1	5'-GGT ATC AAG GAA ACC TC-3'	822bp
	C2	5'-CCT CCG CCA TCA TAG CT-3'	
VanC2/3	D1	5'-CTC CTA CGA TTC TCT TG-3'	439bp
	D2	5'-CGA GCA AGA CCT TTA AG-3'	
ESBL^b			
TEM	T1	5'-CCG TGT CGC CCT TAT TCC-3'	824bp
	T2	5'-AGG CAC CTA TCT CAG CGA-3'	
SHV	S1	5'-ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC-3'	1,051bp
	S2	5'-TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC-3'	
CTX-M-1 (MEN)	M1	5'-CGG TGC TGA AGA AAA GTG-3'	393bp
	M2	5'-TAC CCA GCG TCA GAT TAC-3'	
CTX-M-2 (Toho-1)	Th1-1	5'-ACG CTA CCC CTG CTA TTT-3'	780bp
	Th1-2	5'-CCT TTC CGC CTT CTG CTC-3'	
CTX-M-9 (Toho-2)	Th2-1	5'-GCA GAT AAT ACG CAG GTG-3'	354bp
	Th2-2	5'-CGC CGT GGT GGT GTC TCT-3'	

^areactions were run for 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 54°C and 1 min at 72°C

^breactions were run for 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 53°C and 1.5 min at 72°C

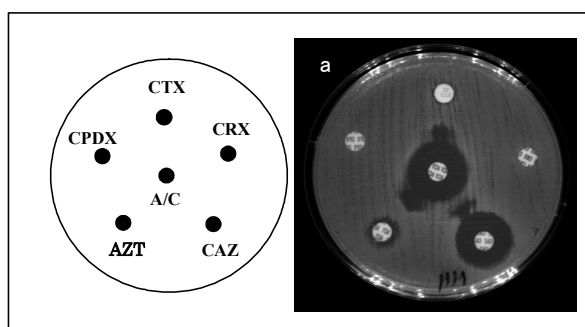


Fig.1 Double-disc test

a: *Escherichia coli* 15-220 CTX-M2 (Toho1) type

2) プラスミド接合伝達試験

接合伝達試験は broth法⁶⁾ により行った。接合伝達株は *E.coli* Rif+ 株および *E.coli* NA+ 株から随時選択し使用した。方法は、分離株と接合伝達株をそれぞれ別々に Luria Bertani (以下LBと略す) 培地 (日本製薬) で 37°C 18 時間培養後、両培養液を 100 μ l ずつ新たな LB 培地に添加し、再び 37°C 18 時間培養した。培養後、CTX を 2 μ g/ml およびリファンピシン (RIF) 1 mg を加えたミュラーヒントン寒天培地 (栄研化学) あるいは、CTX を 2 μ g/ml およびナリジクス酸 (NA) を 500 μ g/ml 添加したミュラーヒントン培地 (栄研化学) に塗布した。37°C 18 時間培養後、発育した菌を R プラスミド伝達陽性株とした。

3) PCR法によるESBL遺伝子の型別

薬剤感受性試験およびプラスミド接合試験により ESBL 産生菌と判定された菌株は、Table 1 に示すプライマー⁷⁾ を用いて ESBL 遺伝子の検出を行った。

5. 大腸菌の病原遺伝子の確認

ESBL 産生が確認された *Escherichia coli* は、PCR 法により病原遺伝子の確認を行った⁸⁾。

結果及び考察

1. VRE 検出状況

VCM 加エンテロコッカセル培地を用いた分離培養において、糞便 1,471 件中 562 件からコロニーの発育が確認され、うち 447 件で 45°C 発育試験が陽性となったが、*VanA* 遺伝子、*VanB* 遺伝子を保有するものはなかった (Table 2)。

Table 2. Number of VRE and ESBLs positive

	Number of samples	Number of positive			
		VRE	(%)	ESBLs	(%)
Diarrearial patients	800	0	-	10	(1.3%)
Healthy persons	671	0	-	21	(3.1%)
Total	1,471	0	-	31	(2.1%)

2. ESBL 産生菌の検出状況

CTX 添加培地を用いた分離培養において、糞便 1,471 件中 133 件からコロニーの発育が確認された。それらについて、薬剤感受性試験を実施した結果、ESBL 産生を疑う菌株は 39 件 42 株であった。次いで、プラスミド接合試験を行ったところ、39 件 42 株中 31 件 33 株でプラスミド伝達が認められた。ESBL 産生菌の菌種は、*Escherichia coli* 30 件 32 株、*Klebsiella pneumoniae* 1 件 1 株であった。

また検出された *Escherichia coli* 32 株については、下痢原性大腸菌の病原遺伝子を保有する株はなかった。

小松らは、ESBL 産生菌が健康なヒトの 2 % 前後から検出されると報告している⁹⁾。今回の対象者は集団下痢症患者およびその関係者と限定されたものであるが、陽性例を

対象別にみると Table 2 のように、下痢症患者 800 件中 10 件 (1.3%)、関係者 671 件中 21 件 (3.1%) であり、下痢症状の無い健康と思われる関係者からのほうが検出率は高かった。

ESBL 産生菌 33 株について、PCR 法により ESBL 遺伝子検出を行った結果、Table 3 に示すように、CTX-M9 (Toho2) 型が最も多く 11 株、次いで CTX-M2 (Toho1) 型 6 株、TEM+CTX-M1(MEN) 6 株と日本での分離が多いと言われている⁷⁾ CTX-M 型が多かった。

Table 3. Classification of isolates carrying the ESBLs

ESBL types	Number of strains
CTX-M-9 (Toho2)	11
CTX-M-2 (Toho1)	6
TEM+CTX-M-1 (MEN)	6
TEM+CTX-M-2 (Toho1)	3
TEM	3
SHV	2
TEM+CTX-M9 (Toho2)	1
CTX-M-1	1
Total	33

VRE および ESBL 産生菌は、ともにその薬剤耐性遺伝子が伝達性プラスミド上にコードされており、同菌種間ではもとより、*K.pneumoniae* から *E.coli* というように異なる種間に伝達される。今回検出された ESBL 産生菌は、*E.coli* および *K.pneumoniae* のみであったが、最近では *Enterobacter cloacae*、*Proteus mirabilis* など多菌種にわたる ESBL 産生菌が報告されている^{10,11)}。今後菌種はさらに増える傾向にあり、その動向に注意すべきである。

ま と め

平成 17 年 6 月 1 日～8 月 31 日の 3 ヶ月間に下痢症患者 800 件および関係者 671 件、計 1,471 件の糞便からの VRE および ESBL 産生菌の検出を行った。

- 1) 今回の調査では、*VanA* 遺伝子、*VanB* 遺伝子を保有した VRE は検出されなかった。
- 2) ESBL 産生菌は、31 件 33 株検出され、保菌率は 2.1% であった。

文 献

- 1) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, et al.: *FEMS Microbiology Lett*, **184**, 53-56, 2000.
- 2) 川上小夜子, 斧 康雄, 山本美和, 他: 感染症学雑誌,

- 74, 24-29, 2000.
- 3) Rafael Canton, Antonio Oliver, Teresa M.Coque *et.al.*: *J Clin Microbiol*, **40**, 1237-1243, 2002.
- 4) Duka-malen S, Evers S, Courvalin P: *J Clin Microbiol*, **33**, 24-27, 1995.
- 5)小松 方：メディカルテクノロジー, **27**(4), 353-358, 1999.
- 6)中林 林太郎：Rプラスミドの分子遺伝学的実験方法, 1983, 菜根出版, 東京
- 7) 八木哲也, 黒川博史, 柴田尚宏, 荒川宜親：臨床と微生物, **26**, 709-716, 1999.
- 8) 畠山 薫, 奥野ルミ, 小西典子, 他：東京健安研七周年報, **57**, 77-81, 2006.
- 9)小松 方, 相原雅典, 島川宏一, 他：感染症学雑誌, **74**, 250-258, 2000.
- 10) 堀口祐司, 橋北義一, 岡 陽子, 他：感染症学雑誌, **78**, 1-9, 2004.
- 11) J.M.Bell, J.D.Turnidge, R.N.Jones *et.al.*: *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 3989-3993, 2003.