

「大腸菌、クレブシエラの薬剤耐性に関する調査報告」

総合報告書

【調査目的】 近年、わが国における大腸菌およびクレブシエラに関する薬剤耐性菌は、基質拡張型- β -ラクタマーゼ (ESBLs) 産生菌の増加が懸念されている。一方、海外では NDM 型メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌や KPC 型カルバペネマーゼ産生菌が検出され、一部の地域・施設ではアウトブレイクも数多く報告されている。

そこで、滋賀県におけるこれらの薬剤耐性菌の状況を把握し、各医療機関が院内感染対策の活用と情報を共有する目的で大腸菌とクレブシエラについて調査を行った。当初、ESBLs とカルバペネマーゼの実施予定であったが、AmpC 産生菌も調査に加えることにした。

【調査方法】

1) 調査対象耐性菌：大腸菌、クレブシエラ

- ①基質拡張型- β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌。
- ②カルバペネマーゼ (CA) 産生菌。
 - ・メタロ- β -ラクタマーゼ産生菌 (MBL：IMP 型、VIM 型、NDM 型)。
 - ・その他のカルバペネマーゼ産生菌 (KPC 型、GES 型)。
- ③AmpC 産生菌。

2) 調査期間：平成 24 年 10 月 1 日から 12 月 31 日までの 3 ヶ月間。

3) 菌株収集方法：薬剤感受性検査を実施した大腸菌、クレブシエラについてセファゾリン (CEZ) またはセフポドキシム (CPDX) に中間または耐性を示す菌株をカジトン培地に保存した。1 患者について同一部位から複数回分離された場合は 1 菌種につき 1 株を収集した。調査期間終了後、菌株を滋賀県立成人病センター 臨床検査部 微生物検査室へ送付願った。

4) 試験・検査の内容：

① ESBL 産生菌の検出

- ・CLSI (Clinical and Laboratory Institute) Document M100-S19 に従った ESBL の検出をディスク拡散法で行った。すなわち、CPDX (セフポドキシム)、CAZ (セフトジジム) および CTX (セフトキシム) の単剤の阻止円直径とそれぞれの CVA (クラブラン酸) を添加した合剤の阻止円直径の大きさを比較していずれかの薬剤で 5mm 以上増大した場合を陽性とした。ただし、ESBL 耐性遺伝子が不検出の場合は、AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学株式会社) も併用し、総合的に判断した。
- ・PCR 法による耐性遺伝子の検出
 - ESBL 耐性遺伝子 (SHV、TEM、CTX-M1、CTX-M2、CTX-M8 および CTX-M9) について、PCR 法を用いて検出した。

②CA 産生菌の検出

- ・ MBL : SMA ディスク (栄研化学) を用い、ディスク拡散法により阻害試験を実施した。CAZ および MEPM (メロペネム) のいずれかの薬剤に阻害帯が形成された場合を陽性とした。陽性株について、耐性遺伝子 (IMP-1、IMP-2、VIM) の検出を、PCR 法を用いて行った。
- ・ その他の CA (NDM、KPC、GES) : CAZ 耐性株を対象に PCR 法を用いて耐性遺伝子の検出を行った。

③AmpC 産生菌の検出

- ・ AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) を用いて、AmpC 産生株をスクリーニングした。陽性株について、PCR 法を用いて耐性遺伝子 (LAT、DHA、MOX、ACC、ACT、FOX) の検出を行った。

④RAPD 法による分子疫学的解析

- ・ Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) によって菌種間の遺伝子レベルの相同性を比較検討した。使用プライマーは ERIC 2 (5-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3) 用いた。

【成績】

1) 参加医療施設

滋賀県の医療施設 59 施設のうち、参加を希望したのは 34 施設 (58%) であった。病床別の参加施設数は 200 床以下が 17 施設、201~500 床が 10 施設、501 床以上が 7 施設であった。

表 1. 参加状況

病床数	1~200	201~500	501~	TOTAL
対象該当施設数	35	17	7	59
参加施設数	17	10	7	34

2) 耐性菌検査結果

耐性菌検出状況を表 2 に示した。大腸菌は対象となった 2,010 株のうち、CPDX (または CEZ) に中間または耐性を示した株は 268 株であり、このうち ESBL 陽性は 200 株 (9.95%)、CA 陽性は 1 株 (0.05%)、AmpC 陽性は 22 株 (1.08%) であった。また、複数の耐性菌も新たに検出された。ESBL と CA 陽性株は 1 株 (0.05%)、ESBL と AmpC 陽性は 6 株 (0.30%) であった。クレブシエラは 938 株のうち、54 株が CPDX (または CEZ) に中間または耐性を示し、このうち ESBL 陽性は 15 株 (1.60%)、CA 陽性は 3 株 (0.32%)、AmpC 陽性は 1 株 (0.11%) であった。複数の耐性菌は、ESBL と CA 陽性株が 1 株 (0.11%) であった。

表2. 薬剤耐性菌検出状況

菌種	大腸菌		クレブシエラ		合計	
対象株数	2,010		938		2,948	
CPDX耐性株数	268		54		322	
ESBL陽性株数(%)	200 (9.95)		15 (1.60)		215 (7.29)	
CA陽性株数(%)	1 (0.05)		3 (0.32)		4 (0.14)	
AmpC陽性株数(%)	22 (1.08)		1 (0.11)		23 (0.78)	

表3. 病床別検出状況

		病床数						全体	
		1~200		201~500		501~			
施設数		17		10		7		34	
検体数(3ヶ月間)		3,204		11,556		19,786		34,546	
大腸菌	対象株数	282		717		1,011		2,010	
	ESBL(%)	41 (14.54)		65 (9.07)		94 (9.30)		200 (9.95)	
	CA(%)	1 (0.35)		0 (0)		0 (0)		1 (0.05)	
	AmpC(%)	2 (0.71)		8 (1.12)		12 (1.19)		22 (1.09)	
クレブシエラ	対象株数	110		369		459		938	
	ESBL(%)	4 (3.64)		2 (0.54)		9 (1.96)		15 (1.60)	
	CA(%)	0 (0)		0 (0)		3 (0.65)		3 (0.32)	
	AmpC(%)	0 (0)		0 (0)		1 (0.22)		1 (0.11)	
合計	対象株数	392		1,086		1,470		2,948	
	ESBL(%)	45 (11.48)		67 (6.17)		103 (7.01)		215 (7.29)	
	CA(%)	1 (0.26)		0 (0)		3 (0.20)		4 (0.14)	
	AmpC(%)	2 (0.51)		8 (0.74)		13 (0.88)		23 (0.78)	
	耐性菌合計	48		75		119		242	
	耐性菌株数/ 検体数(%)	1.50		0.65		0.60		0.70	

3) 病床別成績

病床別成績を表3に示した。大腸菌のESBL陽性率は200床以下の施設が14.54% (41株)、201～500床が9.07% (65株)、501床以上が9.30% (94株)であり、200床以下の施設において最も高率に検出された。クレブシエラのESBL陽性率は200床以下の施設が3.64% (4株)と最も高い成績であった。

すべての菌種を対象とした場合のESBL陽性率は200床以下の施設が11.48%で最も高い成績となった。一方、検体数を分母とした場合のESBL陽性率は200床以下が1.5%、201～500床が0.65%、501床以上が0.6%となり、200床以下の施設において陽性率が高い成績となった。

4) 入院・外来別成績

入院・外来別の成績を表4に示した。ESBL産生大腸菌200株のうち、入院が135株(67.5%)、外来が60株(30%)であった。クレブシエラ15株のうち、入院が12株(80%)、外来が3株(20%)であった。CA産生菌は4株すべてが入院であった。AmpC産生菌23株のうち、入院が15株(65.2%)、外来が8株(34.8%)であった。

表4. 入院・外来別の成績

耐性菌	菌種	入院	外来	不明	全体
ESBL	大腸菌	135	60	5	200
	クレブシエラ	12	3	0	15
	合計	147	63	5	215
CA	大腸菌	1	0	0	1
	クレブシエラ	3	0	0	3
	合計	4	0	0	4
AmpC	大腸菌	15	7	0	22
	クレブシエラ	0	1	0	1
	合計	15	8	0	23

5) 診療科別成績

診療科別の成績を表5に示した。ESBL産生大腸菌は内科系が93株(46.5%)、外科系が78株(39%)であり、内科系から比較的多く検出された。ESBL産生クレブシエラは内科系が5株(33.3%)、外科系が7株(46.7%)であった。AmpC産生菌は内科系が16株(69.6%)、外科系が6株(26.1%)であった。

表5. 診療科別の成績

耐性菌	菌種	内科系	外科系	その他・不明	全体
ESBL	大腸菌	93	78	29	200
	クレブシエラ	5	7	3	15
	合計	98	85	32	215
CA	大腸菌	0	0	1	1
	クレブシエラ	1	2	0	3
	合計	1	2	1	4
AmpC	大腸菌	16	6	0	22
	クレブシエラ	0	0	1	1
	合計	16	6	1	23

6) 検査材料別成績

検査材料別の成績を表6に示した。ESBL産生大腸菌では泌尿器系材料(主に尿)が最も多く111株(55.5%)、次いで消化器系材料36株(18%)であった。ESBL産生クレブシエラは泌尿器系材料が7株と最も多く検出された。AmpC産生菌はESBL産生菌と同様に泌尿器系材料が最も多く13株(56.5%)であった。

表6. 検査材料別の成績

耐性菌	菌種	検査材料					全体
		呼吸器系	泌尿器系	消化器系	血液	その他	
ESBL	大腸菌	20	111	36	15	18	200
	クレブシエラ	2	7	1	3	2	15
	合計	22	118	37	18	20	215
CA	大腸菌	0	1	0	0	0	1
	クレブシエラ	1	1	1	0	0	3
	合計	1	2	1	0	0	4
AmpC	大腸菌	1	12	3	3	3	22
	クレブシエラ	0	1	0	0	0	1
	合計	1	13	3	3	3	23

7) 薬剤耐性遺伝子の結果

薬剤耐性遺伝子の成績を表7に示した。ESBL産生大腸菌の耐性遺伝子はCTX-M9型が131株(65.5%)と最も多く、次いでCTX-M1型が37株(18.5%)であった。また、CTX-M1型とM9型の複数の耐性遺伝子を保有した株が16株(8%)に認められた。クレブシエラは15株中8株(53.3%)がCTX-M9型であったが、複数

の耐性遺伝子は認めなかった。今回、薬剤感受性成績から CTX-M 型に分類されるものの、PCR 法で CTX-M1、CTX-M2、CTX-M8 および CTX-M9 に該当しなかった株は CTX-M として表記した。

CA 産生菌では、大腸菌 1 株は IMP-1 型、クレブシエラは 2 株が IMP-1 型、1 株が GES 型であったが、KPC 型、NDM-1 型は認めなかった。AmpC 産生菌では、大腸菌は 22 株が LAT 型、1 株が DHA 型、クレブシエラ 1 株は DHA 型であった。

表7. 耐性遺伝子の成績

耐性菌	耐性遺伝子	菌種		合計
		大腸菌	クレブシエラ	
ESBL	TEM	1	0	1
	SHV	2	0	2
	CTX-M1	37	4	41
	CTX-M2	2	3	5
	CTX-M8	2	0	2
	CTX-M9	131	8	139
	CTX-M1+M9	16	0	16
	CTX-M [*]	9	0	9
	合計	200	15	215
CA	IMP-1	1	2	3
	IMP-2	0	0	0
	VIM	0	0	0
	KPC	0	0	0
	NDM-1	0	0	0
	GES	0	1	1
	合計	1	3	4
AmpC	LAT	21	0	21
	DHA	1	1	2
	ACC	0	0	0
	ACT	0	0	0
	MOX	0	0	0
	FOX	0	0	0
	合計	22	1	23

*CTX-M ; CTX-M1, 2, 8, 9 以外 (CTX-M25 など) の CTX-M グループまたは TEM, SHV 以外のクラス A 型 β -ラクタマーゼ

8) 分子疫学的解析結果 (ESBL 産生大腸菌)

ESBL 産生大腸菌のうち、入院由来株、施設の検出数が 5 株以上、CTX-M1+M9 検出株を中心に選定し、検

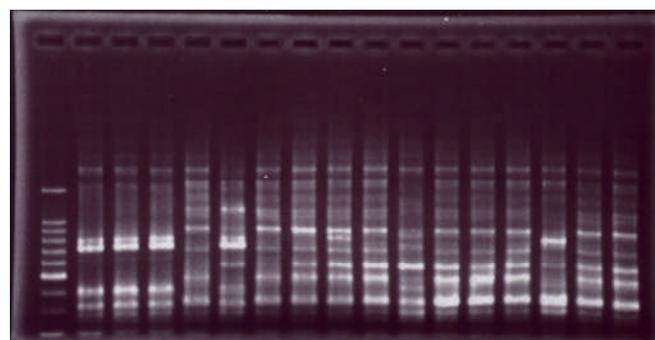
討した株数は 95 株であった。検討した 95 株の RAPD は 62 パターンに分類された。施設ごとで同一パターンを示したのは 9 施設であり、その内訳を表 8 に、その一部を図 1 に示した。施設 No.3 は CTX-M1+M9 型の 3 株が同一パターンを示し、病棟を越えて拡散していた。さらに、施設 No.34 の株も同じパターンを示し、施設を越えて拡散していた。同様に、施設を超えて拡散していたのは、施設 No. 19 と No.29 の CTX-M1+M9 型であった。施設 No.14 は CTX-M9 型の 4 株が同一パターンを示し、病棟を越えて拡散していた。

表 8. RAPD が同一パターンを示した ESBL の菌種別、施設別成績

No.	RAPD type	耐性遺伝子(株数)	施設No.	所属*(株数)
1	a	CTX-M1+M9	3	A(1), B(2)
2	a	CTX-M1+M9	34	U(3)
3	b	CTX-M9	6	C(1), D(1)
4	c	CTX-M9	14	E(3), F(1)
5	d	CTX-M1	14	G(2)
6	e	CTX-M9	18	H(1), I(1)
7	f	CTX-M9	19	J(2)
8	g	CTX-M1+M9	19	K(1), 外来(1)
9	g	CTX-M1+M9	29	T(5)
10	h	CTX-M9	29	P(1), Q(1), R(1), S(1)
11	i	CTX-M9	20	L(1), M(1)
12	j	CTX-M8	27	N(2)
13	k	CTX-M9	27	O(2)

*所属；実際の所属名ではなく、記号で示した。

図 1. RAPD による分子疫学的解析の電気泳動パターン (No. 1~16 の菌株について)



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

<解説>

No.1~3 が同一パターン

No.7,9 が同一パターン

No.11~13,15,16 が同一パターン

(施設番号は省略)

【まとめ】今回、滋賀県において薬剤耐性菌の増加が憂慮されていた ESBL 産生大腸菌とクレブシエラについて調査を行った。同時に、メタロ-β-ラクタマーゼを含むカルバペネマーゼ (CA) および AmpC β-ラクタマーゼ (AmpC) 産生菌の調査も行った。滋賀県の医療機関 59 施設中 34 施設の参加があり、大腸菌では 1,906 株中 200 株 (9.95%)、クレブシエラは 901 株中 15 株 (1.60%) が ESBL であった。ESBL 産生菌の調査は 2006 年にも同様の調査を行い、大腸菌の陽性率は 3.3%、クレブシエラは 1.2% であり、6 年前と比較して大腸菌において約 3 倍増加していた。また、頻度は低いものの CA 産生菌は 4 株 (0.14%)、AmpC 産生菌は 23 株 (0.78%) 検出され、ESBL と CA、ESBL と AmpC などの複数の耐性遺伝子を保有した耐性菌も出現してきた。さらに、ESBL においても CTX-M1 と M9 の複数の耐性遺伝子を保有した株が出現した。今後、このような複数の耐性遺伝子を保有した大腸菌やクレブシエラの増加が懸念されることから、微生物検査室は迅速で適切な耐性菌検出を報告すべきであり、ネットワークも耐性菌検出のための学術的・技術的支援が必要であると考えます。

参加された医療施設の規模、機能はさまざまで、施設別の大腸菌の ESBL 検出率 (対象株数が 20 株以上の施設) も 0~20.4% であり、200 床以下の施設で陽性率が高い成績となった。また、CA や AmpC 産生菌も施設規模に関係なく検出されていたことから、大腸菌とクレブシエラの薬剤耐性はどの規模、機能の医療施設であっても検出されることを念頭に置くべきである。

分子疫学的解析では、同じクローンの耐性菌が同じ病棟、また病棟を越えて、さらには施設を越えて拡散していたと考えられる耐性菌を認めた。2 株では同じ患者のこともある可能性があるため、3 株以上を有意とすると、5 施設で施設内での拡散を認めた。さらに、CTX-M1 と M9 の複数の耐性遺伝子を保有する菌株は、それぞれ 2 施設 (合計 4 施設) で同じクローンと考えられ、施設から施設へ拡散していた可能性のあることが示唆され、今後はパルスフィールドゲル電気泳動などの追加検討も必要であると考えている。

平成 24 年の診療報酬改定では、感染防止対策加算 1, 2 および感染防止対策地域連携加算が新設され、サーベイランスおよび抗菌薬の適正使用の重要性が述べられている。具体的には、地域または全国のサーベイランスへの参加を啓蒙することにより、各医療施設がサーベイランスの情報を共有し、臨床へ還元することが重要となってきており、滋賀県感染制御ネットワークにおける耐性菌サーベイランスでの活動が各施設の院内感染防止への一助になれば幸いである。

調査担当者

西尾 久明 (滋賀県立成人病センター 臨床検査部 微生物検査室)
末吉 範行 (社会保険滋賀病院 検査部 微生物検査室)

報告責任者

浅越 康助 (滋賀県立成人病センター 血液・腫瘍内科)

今回調査した耐性菌の基礎知識

1) ESBLs(Extended-Spectrum β -Lactamases)とは

ESBLs は、本来ペニシリンしか分解しなかった酵素が、突然変異により第三世代も含むセファロスポリン系薬とモノバクタム薬まで基質特異性を拡張した酵素である。現在、TEM 型、SHV 型、CTX-M 型 (-1 型、-2 型、-8 型、-9 型) などおよび OXA 型由来の ESBL として、数多くの酵素が報告されている。ESBLs を産生する菌種としては、肺炎桿菌、大腸菌、プロテウスが多いが、その他セラチアやエンテロバクター、その他の腸内細菌でも報告されている。

2) プラスミド性 AmpC β -ラクタマーゼ(AmpC)とは

AmpC は、ペニシリン系薬とセファロスポリン系薬を効率より分解するのでセファロスポリナーゼとも呼ばれ *ampC* 遺伝子により産生される。大腸菌などの多くのグラム陰性桿菌が染色体上に *ampC* 遺伝子を保有するが、1989 年に韓国で肺炎桿菌からプラスミド性の CMY-1 酵素が最初に報告された。現在、ACT-1/MIR-1 型、CMY/LAT 型、DHA 型、ACC-1 型、CMY/MOX 型、FOX 型の 6 群に分類されている。

3) カルバペネマーゼ(CA)とは

CA とはカルバペネム系薬を分解する酵素の総称である。この中には、メタロ- β -ラクタマーゼ (MBLs: クラス B)、クラス A カルバペネマーゼ、クラス D カルバペネマーゼの 3 種類に大きく分類される。

①プラスミド性メタロ- β -ラクタマーゼ(MBLs: クラス B)

MBLs は、基質特異性が極めて広く、モノバクタム系薬を除くすべての β -ラクタム薬を加水分解することができ、活性に金属イオン (亜鉛) が必要である。代表的な酵素は IMP 型、VIM 型、NDM 型である。

②クラス A カルバペネマーゼ

染色体性には SME 型、NMC 型、IMI 型、プラスミド性には KPC 型、GES 型がある。KPC 型は 1996 年に米国で肺炎桿菌から最初に報告されて以降、世界中で散発的に報告され、本邦でも数例の報告がある。GES 型は 2000 年にアフリカで分離された緑膿菌が最初の報告であり、本邦においても数例の報告がある。

③クラス D カルバペネマーゼ

1985 年にスコットランドでアシネトバクターから OXA-23 型が最初に報告された。他にもアシネトバクターを中心に OXA-24、-48、-50、-51、-55、-58、-60 などの酵素がある。最近、本邦においても OXA-48 型の肺炎桿菌が報告され注目されている。

表 Ambler の分類による β -ラクタマーゼと抗菌薬感受性パターン

分類	ペニシリン	セファロスポリン				セファマイシン	モノバクタム	カルバペネム
		第 1	第 2	第 3	第 4			
クラス A	染色体性	○	○					
	ESBL	○	○	○	○	○	○	
クラス B	○	○	○	○	○	○		○
クラス C	○	○	○	○		○	○	
クラス D	○	○	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)	(○)

○: 耐性を示す。() は酵素によって耐性を示すものがある。

4) 分子疫学的解析の基礎

①分子疫学的解析の目的

医療施設もしくは公衆衛生学（食中毒など）の立場などで効果的な感染対策を行っていくためには、感染症の原因となる微生物の感染源を特定し、その感染経路を遮断することが最も重要なポイントである。これらの感染源・感染経路別対策に役立つ疫学情報として、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）をはじめとするさまざまな分子疫学的解析技術が利用されるようになってきた。

②型別(疫学)解析法の種類

表現型別法：遺伝子産物である蛋白質をもとに特徴づける方法である。広義では生化学的性状、ファージ型別、抗菌薬感受性パターン、蛋白質解析などが含まれる。表現型の欠点は、菌の増殖過程で発現の状況が変わったり、突然変異により蛋白質の構造に変化が起ることである。

遺伝子型別法：微生物の保有する遺伝子の構造や、制限酵素を用いて DNA 切断パターンを解析する方法である。プラスミドプロファイル法、PFGE 法、PCR 法などがこれにあたる。表現型に比べると自然な変化は少ないが、それでも、染色体 DNA への外来遺伝子の取り込みや突然変異による遺伝子配列の変化が起る。

③型別解析法の特徴

現状で完全な型別法はないとされている。下表に型別法の機能面での特徴をまとめた。従来から行われていた表現型別法は遺伝子型別法と比較して、識別能力は劣る。また、RAPD の識別能力は 20～30 型別程度、PFGE では 30～数百と言われており、遺伝子型別法であっても異なる。今回実施した RAPD は迅速性に優れており、DNA 抽出後は約数時間で結果が判明する。同じ型別と判断された場合は、時には PFGE などを用いて詳細に解析する必要がある。

表 主な細菌型別判定法の特徴の比較

型別判定法	適応範囲	再現性	識別能	解釈の難度	実施の難度
バイオタイピング	すべての菌種	比較的良い	やや不良	きわめて容易	きわめて容易
抗菌薬感受性パターン	すべての菌種	良い	やや不良	きわめて容易	きわめて容易
血清型別	特定の菌種	良い	比較的良い	容易	比較的容易
プラスミド型別	特定の菌種	良い	良い	容易	比較的容易
ミニゲルDNA断片長解析	すべての菌種	良い	良い	きわめて容易	比較的容易
DNAプローブ多型解析	すべての菌種	きわめて良い	きわめて良い	容易	煩雑
PFGE	すべての菌種	きわめて良い	きわめて良い	容易	煩雑
RAPD (AP-PCR)	すべての菌種	比較的良い	比較的良い	比較的良い	比較的容易

④RAPD (AP-PCR) : randomly amplified polymorphic DNA analysis (arbitrarily primed-PCR)

1 種類の短いプライマーDNA（通常は 10mec）を用いて緩やかなハイブリダイゼーション条件で PCR を行う方法である。短いプライマーと低いアニーリング温度により、ある程度特異性を犠牲にして複数のランダムな領域に対しプライマーが結合し、挟まれた領域が PCR によって複数増幅される。これらのバンドのサイズを比較することでその多型性を解析する。