

# 「基質拡張型βラクタマーゼ産生グラム陰性菌に関する調査報告」

## 総合報告書

### 【調査目的】

耐性菌には MRSA や多剤耐性緑膿菌などは以前からよく知られているが、近年では新たにメタローβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性菌、基質拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生グラム陰性菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌などが出現し、その詳細な実態については未だわからない状況にある。滋賀県では毎年1種類の耐性菌についてのサーベイランスを行い各医療施設にデータを還元することにより、有効な院内感染防止対策について支援することを目的として調査を実施した。

### 【調査方法】

- 1) 調査対象耐性菌：基質拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生グラム陰性菌。  
(大腸菌、クレブシエラ、プロテウス・ミラビリス\*)  
\*プロテウス・ミラビリスはプロテウスと略する。
- 2) 調査期間：平成18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、プロテウスについてセファゾリン (CEZ) またはセフポドキシム (CPDX) に耐性を示す菌株をカジッ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 CLSI による基質拡張型βラクタマーゼ産生の検出  
CLSI (Clinical and Laboratory Institute) Document M100-S16 に従い、ディスク拡散法により、CPDX (セフポドキシム)、CAZ (セフトンジム) および CTX (セフトタキシム) 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。
  - ② PCR 法による基質拡張型βラクタマーゼ遺伝子の検出  
ESBL 耐性遺伝子の検出を SHV、TEM、CTX-M1、CTX-M2 および CTX-M9 の遺伝子型について行った。DNA の抽出はハートインフュージョン寒天培地で35℃、24時間培養後、キアゲン DNA Mini-Kit を用いた。PCR 試薬は *rTaq* DNA polymerase を用いた。PCR 反応条件は94℃60秒、60℃60秒、72℃60秒の計30サイクルで増幅し、その産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認した。
  - ③ RAPD 法による分子疫学的解析

Random amplification of polymorphic DNA(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。②で抽出した DNA および PCR 試薬を用い、Mg<sup>2+</sup>濃度は 25mM とした。PCR 反応条件は 94℃60 秒、34℃60 秒、72℃60 秒の計 35 サイクルで増幅し、その産物を 2%アガロースゲル電気泳動で確認した。

## 【成績】

### 1) 参加医療施設

滋賀県の医療施設 61 施設のうち、参加を希望したのは 33 施設であり、そのうち 32 施設が実際にサーベイランスに参加した。病床別の参加施設数は 199 床以下が 15 施設、200～499 床が 11 施設、500 床以上が 6 施設であった。

表1. 参加状況

病床数	1～199	200～499	500～	全体
該当施設数	37	17	7	61
参加希望施設数	16	11	6	33
参加施設数	15	11	6	32

### 2) ESBL 検査結果

ESBL の検出状況を表 2 に示した。大腸菌は対象となった 1,650 株のうち、CPDX (セフポドキシム) に耐性を示した株は 88 株であり、このうち 55 株が ESBL 陽性 (陽性率 3.3%) となった。クレブシエラは 659 株のうち、14 株が CPDX に耐性を示し、このうち 8 株が陽性 (陽性率 1.2%) となった。プロテウスは 241 株のうち、41 株が CPDX 耐性となり、このうち 40 株が陽性 (陽性率 16.6%) となった。菌種別での陽性率を比較するとプロテウスが 16.6%と最も高く、クレブシエラが 1.2%で最も低い成績となった。

表2. ESBL 検出状況

	大腸菌	クレブシエラ	プロテウス	合計
対象株数	1,650	659	241	2,550
CPDX 耐性株数	88	14	41	143
ESBL 陽性株数	55	8	40	103
(%)	3.3	1.2	16.6	4.0

### 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 199 床以下が 2.5% (10 株)、200～499 床が 2.2% (16 株)、500 床以上が 5.5% (29 株) であり、500 床以上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 陽性率は病床数に関係なく、1.2～1.3%の陽性率であった。プロテウスの ESBL 陽性率は 199 床以下が 7.2% (5 株)、200～499 床が 9.3% (5 株)、500 床以上が 25.4% (30 株) であり、500 床以上の施設が高頻度に検出された。すべての菌種を対象とした場合の ESBL 陽性率は 500 床以上の施設が 6.9%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 199 床以下が 0.7%、200～499 床が 0.3%、500 床以上が 0.5%となり、199 床以下の施設での陽性率が高い成績となった。

表3. 病床別成績

		病床数			全体
		1～199	200～499	500～	
施設数		15	11	6	32
検体数(3ヶ月間)		2,601	7,077	13,448	23,126
大腸菌	対象株数	394	731	525	1,650
	ESBL	10	16	29	55
	(%)	2.5	2.2	5.5	3.3
クレブシエラ	対象株数	151	249	259	659
	ESBL	2	3	3	8
	(%)	1.3	1.2	1.2	1.2
プロテウス	対象株数	69	54	118	241
	ESBL	5	5	30	40
	(%)	7.2	9.3	25.4	16.6
合計	対象株数	614	1,034	902	2,550
	ESBL	17	24	62	103
	(%)	2.8	2.3	6.9	4.0
	ESBL/検体数(%)	0.7	0.3	0.5	0.4

#### 4) 入院・外来別成績

入院・外来別の成績を表4に示した。大腸菌は55株のうち、入院が36株(65.5%)、外来が19株(34.5%)であった。クレブシエラは8株すべてが入院であった。プロテウスは40株のうち、38株(95.0%)が入院、2株(5.0%)が外来であり、クレブシエラおよびプロテウスにおいて、入院の頻度が高い成績となった。

表4. 入院・外来別の成績

菌種	入院	外来	全体
大腸菌	36	19	55
クレブシエラ	8		8
プロテウス	38	2	40
合計	82	21	103

#### 5) 診療科別成績

診療科別の成績を表5に示した。大腸菌は内科系が21株(38.1%)、外科系が29株(52.7%)であり、外科系(外科、泌尿器科など)から比較的多く検出された。クレブシエラは内科系が5株(62.5%)、外科系が1株(12.5%)であった。プロテウスは内科系が22株(55.0%)、外科系が10株(25.0%)であり、内科系(内科、総合内科、糖尿病内科、呼吸器内科、消化器内科、神経内科など)から比較的多く検出された。

表5. 診療科別の成績

	内科系	外科系	その他・不明	全体
大腸菌	21	29	5	55
クレブシエラ	5	1	2	8
プロテウス	22	10	8	40
合計	48	40	15	103

#### 6) 検査材料別成績

検査材料別の成績を表6に示した。大腸菌では泌尿器系材料(主に尿)が最も多く24株、次いでその他の材料12株であった。クレブシエラは泌尿器系材料が5株と最も多く検出された。プロテウスは呼吸器系材料(主に喀痰)が最も多く15株、次いでその他の材料11株であった。血液からは大腸菌3株およびプロテウス2株が検出された。

表6. 検査材料別の成績

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	
大腸菌	7	24	9	3	12	55
クレブシエラ	2	5			1	8
プロテウス	15	9	3	2	11	40
合計	24	38	12	5	24	103

## 7) ESBL 耐性遺伝子の結果

ESBL の耐性遺伝子の成績を表 7 に示した。耐性遺伝子は大きく TEM 型、SHV 型、CTX-M 型に大きく分けられ、CTX-M 型はさらに CTX-M1、CTX-M2、CTX-M9 などに分けられる。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 および CTX-M9 に該当しなかった株は CTX-M として表記した。大腸菌は CTX-M9 型が 28 株 (50.9%) と最も多く、次いで CTX-M1 型と CTX-M 型がそれぞれ 10 株 (18.1%) であった。クレブシエラは TEM を除くそれぞれの型に分散した。プロテウスはすべてが CTX-M2 型であった。全体では TEM 型が 2 株 (1.9%)、SHV 型が 3 株 (2.9%) であり、ほとんどが CTX-M1、CTX-M2 および CTX-M9 を含む CTX-M 型であった。

表 7. 耐性遺伝子の成績

耐性遺伝子	菌種			合計
	大腸菌	クレブシエラ	プロテウス	
TEM	2			2
SHV	2	1		3
CTX-M1	10	2		12
CTX-M2	3	1	40	44
CTX-M9	28	1		29
CTX-M*	10	3		13
合計	55	8		103

\*CTX-M ; CTX-M1, 2, 9 以外 (CTX-M8, CTX-M25 など) の CTX-M グループまたは TEM, SHV 以外のクラス A 型  $\beta$ -ラクタマーゼ

## 8) 分子疫学的解析結果

大腸菌について、55 株の RAPD は 45 パターンに分類された。同一パターンを示したのは 3 施設であり、その内訳をクレブシエラ、プロテウスとともに表 8 に示した。施設 No.1 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、外来からも検出された。施設 No.8 は CTX-M9 型の 6 株が同一パターンを示し同じ病棟から検出された。施設 No.28 は CTX-M 型の 2 株が同一パターンを示し同じ病棟から検出された。

クレブシエラは検討した 7 株の RAPD パターンは 6 つに分類された。同一パターンを示したのは 1 施設のみであり、CTX-M 型 2 株が同じ病棟から検出された。

プロテウスについて、40 株の RAPD は 3 パターンに分類された。同一パターンを示したのは 5 施設であり、大腸菌、プロテウスよりも多い成績となった。施設 No.22 および 27 は 10 株以上が同一パターンを示し、同じ病棟から異なる病棟、さらには外来からも検出された。施設 No.32 は 4 株が同一パターンとなり、同じ病棟からの検出であった。

表8. RAPD が同一パターンを示した ESBL の菌種別、施設別成績

菌種	RAPD type	耐性遺伝子 (株数)	施設 No.	所属* (株数)
大腸菌	1	CTX-M9 (4)	1	A (2), B(1), 外来 (1)
	2	TEM	1	C (1)
	3	CTX-M9 (6)	8	D (6)
	4	CTX-M1 (1)	28	外来 (1)
	5	CTX-M9 (1)	28	E (1)
	6	CTX-M9 (1)	28	F (1)
	7	CTX-M9 (1)	28	外来 (1)
	8	CTXM (1)	28	G (1)
	9	CTXM (2)	28	F (2)
クレブシエラ	A	CTXM (2)	10	H (2)
プロテウス	A	CTX-M2 (6)	1	I (1), J (1), K (1), C (2), L (1)
	B	CTX-M2 (1)	1	J (1)
	A	CTX-M2 (11)	22	M (8), N (2), O (1)
	A	CTX-M2 (2)	25	P (1), Q (1)
	A	CTX-M2 (10)	27	R (5), S (2), T (2), 外来 (1)
	B	CTX-M2 (1)	27	外来 (1)
	A	CTX-M2 (4)	32	U (4)

\*所属；実際の所属名ではなく、記号で示した。

【まとめ】今回、滋賀県における耐性菌の動向が不明確であった ESBL について調査を行ったところ、61 施設中 32 施設の参加があり、2,550 株中 103 株 (4.0%) から ESBL が検出された。参加された医療施設の規模、機能はさまざま、施設別の検出率も検査対象株数を分母とした場合の陽性率は 0~10.2% であり、500 床以上の施設で陽性率が高い成績となった。しかし、検体数を分母とした場合の陽性率は 0~3.0% となり、199 床以下の施設で高い成績となった。このことは、500 床以上の施設では検体数が多いことから実際の ESBL 検出数も多くなり、結果的に陽性率も高くなったと考えられる。100 床あたりの 3 ヶ月間の検体数は、199 床以下の施設では 115 件であったのに対し、500 床以上では 345 件となり、199 床以下の 3 倍の検体数であることから説明できる。従って、ESBL の陽性率は病床数に関係なくどの施設であっても検出されると解釈した方が妥当である。

また、同じクローンの耐性菌が同じ病棟、さらには病棟を越えて拡散していたと考えられる施設を認めた。

2株では同じ患者のこともある可能性があるので、3株以上を有意とすると、大腸菌では2施設、プロテウスでは4施設に施設内での拡散を認めた。特に、プロテウスでは検出された40株のうち38株が入院であり、35株が耐性遺伝子（CTX-M2）とRAPDパターンが同一であったことから、施設から施設へ拡散していた可能性もあり、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。

CDCは1996年に公開された「隔離予防策のガイドライン」の改訂版の一部を2006年に「医療現場における多剤耐性菌対策のためのCDCガイドライン」として公開された。今や耐性菌の監視はMRSAだけをすれば良いという時代ではなく、多剤耐性緑膿菌（MDRP）、ESBL産生グラム陰性桿菌、バンコマイシン耐性腸球菌、メタローβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌など数多くの耐性菌の監視と対策が必要となってきている。また、急性期病院から長期療養型病院、さらには在宅などすべての医療現場が重要であるため、CDCでは耐性菌の予防と制御はすべての医療施設および政府機関が責任を持つ必要があると述べており、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

井上 徹也（社会保険滋賀病院 血液内科）

## ESBL（基質拡張型βラクタマーゼ）産生菌についての基礎知識

### 1) ESBL とは

ESBLとは「Extended-Spectrum β-Lactamase」の略称であり、第三世代セファロsporin系である、セフトジジム（CAZ）やセフトキシム（CTX）などを分解する酵素の総称である。それらは、主として肺炎桿菌や大腸菌などが保有する伝達性プラスミドに媒介されている TEM 型、SHV 型ペニシリナーゼ遺伝子が突然変異することにより、酵素のアミノ酸配列が一部変化し、CAZ や CTX を分解する能力を獲得した新型の β-ラクタマーゼである。現在、TEM 型、SHV 型の他、近縁の CTX-M 型由来の ESBL として、100 種類以上のバリエーションが確認されている。ESBL を産生する菌種としては、肺炎桿菌、大腸菌が多いが、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産生する株が報告されている。

### 2) ESBL 産生菌の性格と臨床的意義

ESBL 産生菌は尿、喀痰などから分離されることが多く、CAZ や CTX などの第 3 世代セフェム系抗菌薬で治療しても効果がない場合に疑われる。感染症そのものは通常の大腸菌と何ら変わらず、治療すべき抗菌薬が異なる。

### 3) ESBL の早期発見と院内感染対策

ESBL 産生菌は治療薬の選択を間違わなければ、臨床的に大きな問題となることは少ないが、大腸菌などの ESBL 産生菌は腸管内に保菌し、糞便中に排泄される場合が多く、時には医療従事者の手指を介して院内感染を起こす可能性があるため注意が必要である。感染対策としては標準予防策に加え、接触予防策が必要である。

### 4) ESBL と鑑別すべき β-ラクタマーゼ

ESBL と識別が必要な β-ラクタマーゼとそれぞれの酵素が分解できる β-ラクタム薬（耐性を示す）を系統別に表に示す。β-ラクタマーゼは一般的に Ambler の分類が用いられ、ESBL はクラス A に属する酵素であり、クラス B（主にメタロー β-ラクタマーゼ）やクラス C と鑑別する必要がある。クラス B は現在、メルカプト化合物による阻害試験により鑑別できる。クラス C についてはボロン酸を添加することにより判定できる。しかし、複数の β-ラクタマーゼを保有している場合は判定困難となるため注意が必要である。

分類	ペニシリン	セファロsporin				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。