

7. 神奈川県における ESBL 産生大腸菌の分子疫学的性状とキノロン耐性に関する研究

○鈴木 美雪（神奈川県衛生研究所）

政岡 智佳（神奈川県衛生研究所）

【研究の必要性と目的】

多剤耐性大腸菌は院内感染及び市中感染の一因として世界的に問題となっている。その中でも基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ（以下、ESBL）産生大腸菌は、ESBL 遺伝子を持つプラスミドを獲得することで、セファロスポリン系抗菌薬（CEPs）に耐性を示すようになる。申請者らは、2019 年度の本研究助成において、神奈川県内の下痢症患者便より分離した ESBL 産生大腸菌 39 株中 32 株（82.1%）がキノロン系抗菌薬に耐性を示したことを報告した。大腸菌感染症に対して有用な CEPs とキノロン系抗菌薬が使用できない ESBL 産生キノロン耐性大腸菌（以下、ESBL-QREC）は公衆衛生上問題となる。ESBL-QREC に対する分子疫学的解析として、Multilocus sequence typing (MLST) による Sequence Type (ST) 及びその細分類として細胞付着性に関与する I 型線毛の遺伝子 *fimH* 型を用いた型別が実施されており、ST131-*fimH*30-ESBL 産生大腸菌の世界的な蔓延が報告されている。しかしながら、神奈川県における ESBL-QREC の分子疫学的解析のデータは少なく、さらに ESBL 遺伝子の保有状況とキノロン耐性の関連についても解明されていない。そこで本研究では、神奈川県における ESBL-QREC の分布を把握することを目的とし、ESBL 産生大腸菌の遺伝子解析及びキノロン系抗菌薬の最少発育阻止濃度（MIC）を測定した。

【材料と方法】

1. 分離菌株

2013～2021 年の間に、神奈川県内の小児科 3 医療機関において採取された下痢症患者便 629 検体から分離した ESBL 産生大腸菌 83 株を用いた。

2. ESBL 産生大腸菌の O 血清型別

各分離株の抗原液を作製し、市販の抗血清により O 血清型別を行った。抗血清により型別できなかった株は、DNA 抽出液を用いて、*E. coli* O-genotyping PCR 法¹⁾の Og1、Og7、Og8、Og11、Og16、Og25、Og75、Og86、Og109、Og166 のプライマーを用いて、各 Og 遺伝子の検出を行った。

3. ESBL 産生大腸菌の分子疫学的解析

ESBL 産生大腸菌の DNA を抽出し、multiplex PCR 及びシーケンス解析により下記の遺伝子型別を行った。

(1) MLST 解析による ST

Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) に記載の方法に従い、7つのハウスキ

ーピング遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gryB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) を PCR で増幅した。PCR 産物の塩基配列をデータベースに照合し、ST を決定した。

(2) *fimH* 型別

Roer ら²⁾、Johnson ら³⁾及び Vandemaele⁴⁾らのプライマーを用い、PCR 産物の塩基配列を FimTyper (https://bitbucket.org/genomicpidemiology/fimtyper_db) のデータベースに照合し、*fimH* 型を決定した。

(3) ESBL 遺伝子型別

multiplex PCR⁵⁾にて CTX-M group 型別を実施後、CTX-M-1 group は Leflon-Guibout ら⁶⁾、CTX-M-2 は Suzuki ら⁷⁾、CTX-M-9group は Suzuki ら⁷⁾及び Saladin ら⁸⁾、CTX-M-8group は Chmelnitsky ら⁹⁾のプライマーを用いて、シークエンスにより CTX-M-型別を行った。CTX-123 は CTX-M-1/9 group のハイブリッドであり¹⁰⁾、本研究で用いた CTX-M group 型別のマルチプレックス PCR 法⁴⁾では検出されなかったが、CTX-M-1 group のプライマー⁶⁾で型別可能であった。

(4) キノロン系抗菌薬のMIC測定

フルオロキノロン系抗菌薬 (FQ薬) であるレボフロキサシン (LVFX) 及びシプロフロキサシン (CPF) の2種を用い、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹¹⁾の試験基準及び判定基準に準拠した微量液体希釈法により0.125~256 µg/mL間のMICを測定した。NFLXはMICが ≤ 0.5 µg/mLを感受性 (S) 株、1 µg/mLを中間 (I) 株、 ≥ 2 µg/mLをR株とし、CPFはMICが ≤ 0.25 µg/mLを感受性 (S) 株、0.5 µg/mLを中間 (I) 株、 ≥ 1 µg/mL を耐性 (R) 株とした。

【結果】

ESBL 産生大腸菌を O 血清型-ST-*fimH* 型-ESBL 遺伝子型で分類し、その MIC を示した (表 1)。CPFの方がLVFXのMICよりも1管大きくなる傾向にあったが、2種の抗菌薬に大きな差はなかった。ESBL産生大腸菌83株中LVFXに耐性を示したのは54株(65.1%)で、CPFに耐性を示したのは59株(71.1%)で、ESBL産生大腸菌はFQ薬に耐性を示す割合が高かった。

O25 (Og25) -ST131-*fimH*30-ESBL産生大腸菌が31株 (37.3%) と最も多く検出され、全ての株でLVFX及びCPFに耐性を示した。一方、同じST131であっても、Og16-ST131-*fimH*41-ESBL産生大腸菌は、6株中1株のみLVFXに中間値及びCPFに耐性を示したが、CPFのMICは1 µg/mLであり、高度耐性は示していなかった。その他の5株は、LVFX及びCPFに感受性であった。

6株中5株がLVFX及びCPFに感受性もしくは中間値を示した。CPFに耐性を示した1株もMICは1 µg/mLであり、高度耐性は示していなかった。

O86 (Og86) -ST38-*fimH*5-CTX-M-14-ESBL産生大腸菌は、3株全てがLVFX及びCPFに

耐性を示した。同じST38と*fimH5*であってもOUT-ST38-*fimH5*-CTX-M-14-ESBL産生大腸菌は3株全てがLVFXに中間値を示し、CPFXに耐性を示したものの、MICは3株全て1 µg/mLであり、高度耐性は示してはいなかった。他のOUT-ST38-*fimH5*-ESBL産生大腸菌及びOUT-ST38-*fimH24*-ESBL産生大腸菌では3株全てLVFX及びCPFXに感受性を示した。

ST648-ESBL産生大腸菌5株は、O血清型についてO1 (Og1)、O25であり、*fimH*型について*fimH27*の1株以外は、本研究で用いたプライマーによるPCRでは*fimH*の増幅が確認できなかった。しかしながらいずれの株もLVFX及びCPFXに耐性を示した。

Og75-ST1193-*fimH64*-ESBL産生大腸菌4株及びOUT-ST1193-*fimH64*-ESBL産生大腸菌1株はLVFX及びCPFXに耐性を示した。

ST457は、O25-ST457-*fimH145*-CTX-M-27-ESBL産生大腸菌は、LVFX及びCPFXに耐性を示したのに対し、Og11-ST457-CTX-M-15-ESBL産生大腸菌はLVFXに中間値を示し、CPFXに耐性を示したがMICは1 µg/mLで高度耐性は示しておらず、Og11-ST457-CTX-M-8-ESBL産生大腸菌はLVFX及びCPFXに感受性であった。

ST10は、Og8-ST10-*fimH41*-CTX-M-55-ESBL産生大腸菌はLVFX及びCPFXに耐性を示したのに対し、OUT-ST10-*fimH24*-CTX-M-65-ESBL産生大腸菌ではLVFX及びCPFXに感受性であった。

前述以外の株については、表1のとおりであった。

【考察と今後の課題】

本研究では、調査年を拡げ、ESBL産生大腸菌をO血清型-ST-*fimH*型-ESBL遺伝子型のパターンごとのMICを見ることで神奈川県内のESBL-QRECの分布状況を把握し、キノロン系抗菌薬との関連を示す重要な基礎データを得ることができた。

保有しているESBL遺伝子によりFQ薬耐性に大きな差はなかったが、同じSTでFQ薬耐性株が4株以上検出されているのは、O25-ST131-*fimH30*、O25-ST648-*fimH* not detected、O1-ST648-*fimH27* または *fimH* not detected、及びO75-ST1193-*fimH64*の遺伝子型の組合せであった。一方、ST131であってもO16-ST131-*fimH41*の遺伝子型になるとFQ薬に感受性であった。同様に、ST38では、O86a-ST38-*fimH5*はFQ薬耐性だが、OUT-ST38-*fimH5*では感受性・中間値または高度耐性は示しておらず、ST457では、O25-ST457-*fimH145*はFQ薬耐性だが、O11-ST457-*fimH145*では感受性または高度耐性は示しておらず、同じSTであってもO血清型が変わることでFQ薬の耐性に差があった。*fimH*型も同様に、*fimH5*や*fimH145*はO血清型によりFQ薬耐性に差があった。このようにO血清型-ST-*fimH*型の組合せでFQ薬への耐性度が変化した。ST131大腸菌は、経時的進化が特徴で、O血清型O16、O25と*fimH41*、22、30が関連しており、*fimH41*から*fimH22*への組換えの後、段階的なキノロン耐性決定領域(QRDR)変異、プラスミド等を獲得し、*fimH22*から*fimH30*に変化し、さらにはQRDRの変異とプラスミドの獲得により、CTX-M型ESBL遺伝子を獲得したと報告されている^{12,13)}。本結果でも、O16-ST131-*fimH41*-ESBL産生大腸菌はFQ薬に感受性で

あったが、O25-ST131-*fimH30*-ESBL 産生大腸菌は FQ 耐性であった。

O25-ST131-*fimH30*-ESBL 産生大腸菌は、FQ 薬や CEPs を含む多剤耐性腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) のハイリスククローンであり、世界的な蔓延が報告されている^{12,13)}。本研究でも 31 株 (37.3%) と最も多く検出された。保有していた ESBL 遺伝子は、CTX-M-27 が 23 株、CTX-M-14 が 5 株、CTX-M-15 が 3 株であり、国内の分離状況と同様であった¹⁴⁾。O75-ST1193-*fimH64*-ESBL 産生大腸菌は、ST131 に次ぐハイリスククローンとして近年注視されており、基礎的及び臨床的な研究が急がれている^{12,13)}。当該クローンが保有する ESBL 遺伝子は、CTX-M-15、CTX-M-14、CTX-M-27 及び CTX-M-55 が報告されており^{12,13)}、本研究でも CTX-M-15 以外の ESBL 遺伝子が検出された。国際的に拡散している ExPEC ハイリスククローンとして ST648、ST38 も挙げられており¹²⁾、ST457 は新規ハイリスククローンとして報告されている¹²⁾。しかしながら、これらクローンの O 血清型や *fimH* 及び ESBL 遺伝子に関するデータは少なく、データの蓄積及び解析の継続が必要であると考えられる。

FQ薬耐性に影響を及ぼす因子を明らかにするために、O25-ST131-*fimH30*-と Og16-ST131-*fimH41*-大腸菌等について ESBL 遺伝子以外の病原因子の差を比較する必要があると考えられた。また、FQ薬が作用する QRDR の *gyrA* や *parC* 等の変異、*aac(6')-Ib-cr* 等のプラスミド性キノロン耐性遺伝子の検出及び他の抗菌薬の MIC を測定することにより、ESBL 産生大腸菌のキノロン系抗菌薬耐性の耐性機序の解明につなげたいと考える。

本研究では、O25-ST131-*fimH30*-ESBL 産生大腸菌だけでなく、Og75-ST1193-*fimH64*-ESBL 産生大腸菌のハイリスククローンも神奈川県内に分布していることが明らかとなった。引き続き神奈川県の中における薬剤耐性菌の分布を継続して監視していくことで、Og75-ST1193-*fimH64*-ESBL 産生大腸菌の検出率の変化や新しいハイリスククローンの多剤耐性 ExPEC をいち早く探知し、拡散予防・対策をしていくことが重要であると考えられた。

【参考文献】

- 1) 井口純, Jpn. J. Food Microbiol., 2017;34(4):189-201.
- 2) Roer L, *et al.*, J Clin Microbiol. 2017;55(8):2538-2543.
- 3) Johnson JR, *et al.*, J Infect Dis. 2000;181:261-272.
- 4) Vandemaele F, *et al.*, Vet Res. 2003;34(2): 153-163.
- 5) Phong LQ, *et al.*, Foodborne Pathog Dis. 2015;12: 719-725.
- 6) Leflon-Guibout *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48(10):3736-3742.
- 7) Suzuki *et al.*, J. Antimicrob. Chemother. 2009;63:72-79.
- 8) Brasme *et al.*, J. Antimicrob. Chemother. 2007;60:956-964.
- 9) Chmelnitsky I, *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. 2005;57(8):4068-4071.
- 10) He D, *et al.*, Antimicrob Agents Chemother. 2013;49(11):4745-4750.
- 11) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 30th ed. (2020);

12) Kocsis B, *et al.*, Life.2022;12.

13) Pitout JDD, *et al.*, Antimicrob Agents Chemother.2022;66(7).

14) Fukushima Y, *et al.*, Journal of Global Antimicrobial Resistance.2021;27:150-155.

表1 ESBL産生大腸菌の型別試験の結果とレボフロキサシン(LVFX)及びシプロフロキサシン(CPFX)の最少発育阻止濃度(MIC)(µg/mL)

O血清型	ST型	fimH型	CTX-M-型	株数	LVFXの各MIC(µg/mL)の菌株数											CPFXの各MIC(µg/mL)の菌株数																															
					S		I		R							S		I		R																											
					≤0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256	≤0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256																						
O25 or Og25	ST131	fimH30	CTX-M-27	23						6	1	16										4	3	16																							
O25 or Og25	ST131	fimH30	CTX-M-14	5						1	1	3											2	3																							
O25 or Og25	ST131	fimH30	CTX-M-15	3						1		2										1		1																							
Og16	ST131	fimH41	CTX-M-27	3	3																	3																									
Og16	ST131	fimH41	CTX-M-14	2	1	1																1																									
Og16	ST131	fimH41	CTX-M-55	1	1																	1																									
O86a or Og86	ST38	fimH5	CTX-M-14	3						2		1										1	1	1																							
OUT	ST38	fimH5	CTX-M-14	3 ^{*2}			3 ^{*2}															3 ^{*2}																									
OUT	ST38	fimH5	CTX-M-27	1	1																	1																									
OUT	ST38	fimH5	CTX-M-24	1	1																	1																									
OUT	ST38	fimH24	CTX-M-14	1	1																	1																									
O1	ST648	fimH27	CTX-M-15	1								1												1																							
O1 or Og1	ST648	Not detected ^{*1}	CTX-M-14	3						1	1	1										1	1	1																							
O25	ST648	Not detected ^{*1}	CTX-M-55	1							1												1	1																							
Og75	ST1193	fimH64	CTX-M-27	2						1		1										1	1																								
Og75	ST1193	fimH64	CTX-M-14	1								1												1																							
Og75	ST1193	fimH64	CTX-M-55	1							1												1																								
OUT	ST1193	fimH64	CTX-M-27	1						1												1																									
O25	ST457	fimH145	CTX-M-27	1							1												1																								
Og11	ST457	fimH145	CTX-M-15	1																		1																									
Og11	ST457	fimH145	CTX-M-8	1	1																	1																									
Og8	ST10	fimH41	CTX-M-55	1							1											1																									
OUT	ST10	fimH24	CTX-M-65	1	1																	1																									
OUT	ST167	fimH54	CTX-M-15	1								1												1																							
OUT	ST226	fimH41	CTX-M-15	1							1												1																								
O1	ST354	fimH27	CTX-M-14	1								1												1																							
O86a	ST450	fimH34	CTX-M-14	1							1											1																									
Og1	ST1177	fimH65	CTX-M-2	1							1											1																									
OUT	ST2179	fimH32	CTX-M-65	1								1											1																								
Og8	ST3944	fimH54	CTX-M-123	1								1											1																								
Og25	Not typed	fimH30	CTX-M-27	1							1												1																								
OUT	ST206	fimH54	CTX-M-27	1	1																	1																									
Og1	ST95	fimH16	CTX-M-14	1	1																	1																									
O1	ST95	fimH41	CTX-M-14	1	1																	1																									
OUT	ST538	fimH20	CTX-M-14	2	2																	2																									
O127a	ST40	fimH30	CTX-M-14	1	1																	1																									
O25	ST68	fimH49	CTX-M-55	1	1																	1																									
Og25	ST69	fimH27	CTX-M-27	1	1																	1																									
O166	ST349	fimH93	CTX-M-14	1	1																	1																									
OUT	ST550	fimH54	CTX-M-14	1	1																	1																									
Og11	ST973	fimH95	CTX-M-3	1	1																	1																									
OUT	ST1056	fimH31	CTX-M-14	1	1																	1																									
OUT	ST6949	fimH9	CTX-M-2	1	1																	1																									
Og109	Not typed	fimH31	CTX-M-14	1	1																	1																									
計				83	24	5	0	0	4	16	1	5	28	0	22	2	5	0	0	1	3	7	11	27	5																						
				S, I及びR株の合計株数の%											R株(計54株):65.1											R株(計59株):71.1																					
				28.9											6.0											26.5											2.4										

OUT:O型別不能

*1: fimHの増幅産物なし

*2: うち1株はCTX-M-14: p.Asp182Gly

【経費使途明細】

使 途	金額
ドライプレート '栄研'	135,850円
抗菌薬 (NA, LVFX, CPFX, CTX, CPR)	38,918円
0.85%滅菌生理食塩	13,387円
ミューラーヒントンIIブロス	13,882円
MIC測定用器材 (菌液トレイ、プレート用フタリザーバー、マイクロプレート、マイクロプレート用フタ)	72,556円
PCR等関連試薬 (SapphireAmp® Fast PCR Master Mix、プライマー)	25,608円
事務費 (振込み手数料等)	3,850円
合 計	304,051円
大同生命厚生事業団助成金	300,000円