

17. 愛知県内の市中における薬剤耐性大腸菌の実態調査

○高橋 佑太、山田 和弘、齋藤 典子、安井 善宏（愛知県衛生研究所）

【研究目的】

ヒトの常在細菌であり、種々の感染症の原因である大腸菌の薬剤耐性率は増加傾向にある。医療機関における薬剤耐性大腸菌サーベイランスは、厚生労働省院内感染対策サーベイランス等により実施されているが、市中における薬剤耐性大腸菌の実態把握には十分ではない。本研究では、食中毒関連患者由来大腸菌の各種抗菌薬への薬剤感受性を調査することで、愛知県内の市中における薬剤耐性大腸菌の実態を明らかにし、愛知県内の薬剤耐性大腸菌対策につなげることを目的とする。

【研究の必要性】

近年、抗菌薬が効かない薬剤耐性菌が世界中で増加しており、何も対策を講じない場合、2050年には世界で年間1,000万人の死亡が想定されるとの報告がある¹⁾。特に大腸菌はヒトの常在細菌である一方で、尿路感染症等の種々の感染症を引き起こすため、薬剤耐性率の増加は公衆衛生上の問題となる。薬剤耐性大腸菌のサーベイランスは、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)や感染症法に基づく発生動向調査事業により実施されている。JANISのデータによると、愛知県内の入院患者検体から分離された大腸菌の第3世代セファロスポリン系及びフルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性率は増加傾向にある²⁾。また、市中の薬剤耐性大腸菌の状況を把握する試みとして、JANISでは2017年より外来検体から分離された大腸菌の抗菌薬感受性も公開しているが、集計は全国の医療機関が対象であり、愛知県内の市中における薬剤耐性大腸菌の蔓延状況を把握するには十分ではない。さらに、これらの薬剤耐性遺伝子はプラスミド上に存在することが多く、水平伝播し、愛知県内で蔓延する危険性がある。そのため、病院等の医療機関だけでなく、愛知県内の市中における薬剤耐性大腸菌の実態を把握することは、愛知県内地域伝播の可能性及び地域特性の有無の確認へつながり、愛知県における薬剤耐性大腸菌対策に重要なデータとなる。

【研究計画】

- ①菌株：2019年から2021年に愛知県内(政令指定都市及び中核市を除く)の食中毒関連患者から分離された食中毒原因菌でない大腸菌計343株を用いた。
- ②薬剤感受性試験：分離菌株について、アンピシリン(ABPC)、セフトジジム(CAZ)、セフトキシム(CTX)、セフェピム(CFPM)、セフメタゾール(CMZ)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEPM)、シプロフロキサシン(CPFX)、ゲンタマイシン(GM)、コリスチン(CL)、ミ

ノサイクリン(MINO)及びフォスホマイシン(FOM)の 12 薬剤の薬剤感受性試験を米国臨床検査標準協会(CLSI)法に準拠して実施した。

③耐性遺伝子を標的とした PCR 及び遺伝子型別:表 1 に示す薬剤に耐性を示した株に対し、PCR 法にて薬剤耐性遺伝子検出を実施した。また、*bla*_{CTX-M} はシーケンス解析を実施し、得られた配列を ResFinder(<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>)(database: EFSA_2021 (2022-07-19))のデータベースに照合して遺伝子型を決定した。

④Multilocus sequence typing(MLST)解析:第 3 世代セファロsporin耐性大腸菌と判定した株に対して Enterobase(<https://enterobase.warwick.ac.uk/>)に記載の方法に従い MLST を実施し、菌株の ST 型を決定した。

表 1 薬剤耐性と検索する薬剤耐性遺伝子

耐性薬剤	薬剤耐性遺伝子	参考文献
ABPC	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	3
CTX	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M-1 group} , <i>bla</i> _{CTX-M-2 group} , <i>bla</i> _{CTX-M-8/25 group} , <i>bla</i> _{CTX-M-9 group}	4
CTX 型別	<i>bla</i> _{CTX-M-1 group} , <i>bla</i> _{CTX-M-9 group}	5
CMZ	<i>bla</i> _{MOX} , <i>bla</i> _{CIT} , <i>bla</i> _{DHA} , <i>bla</i> _{ACC} , <i>bla</i> _{EBC} , <i>bla</i> _{FOX}	6
CPFX	プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子 (PMQR 遺伝子) <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrC</i> , <i>qnrD</i> , <i>qnrS</i> , <i>oqxAB</i> , <i>qepA</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	7
MINO	<i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetC</i> , <i>tetD</i> , <i>tetE</i> , <i>tetG</i> , <i>tetK</i> , <i>tetL</i> , <i>tetM</i> , <i>tetO</i> , <i>tetS</i>	8
FOM	<i>fosA</i> , <i>fosA3</i> , <i>fosC2</i>	9

【実施内容・結果】

①薬剤感受性試験

2019 年から 2021 年の間に食中毒関連患者より分離された大腸菌 343 株に対し、上記 12 薬剤の薬剤感受性試験を実施した。

その結果、343 株中 138 株(40.2%)が、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示した。薬剤ごとの耐性率は、ABPC(109 株/31.8%)が最も高く、次いで CPFX(66 株/19.2%)、CTX(20 株/5.8%)の順に高かった。IPM、MEPM 及び CL の 3 薬剤に対する耐性株はなかった(表 2)。

表 2 各種薬剤の耐性率

薬剤	ABPC	CAZ	CTX	CFPM	CMZ	IPM	MEPM	CL	GM	CPFX	MINO	FOM
耐性株数	109	3	20	1	1	0	0	0	16	66	6	2
(%)	(31.8)	(0.9)	(5.8)	(0.3)	(0.3)				(4.7)	(19.2)	(1.7)	(0.6)

分離年毎の耐性株検出率は、2019 年が 40.1%、2020 年が 37.6%、2021 年が 43.0%と、40%前後を推移していた。また、薬剤ごとの耐性株検出率は ABPC において、2019 年が 33.1%、2020 年が 31.7%、2021 年が 30.0%と 30%前後を、CTX において 2019 年が 4.9%、2020 年が 7.9%、2021 年が 5.0%と 5%前後を、CPFX において 2019 年が 17.6%、2020

年が 15.8%、2021 年が 25.0%と 20%前後を推移していた(図 1)。

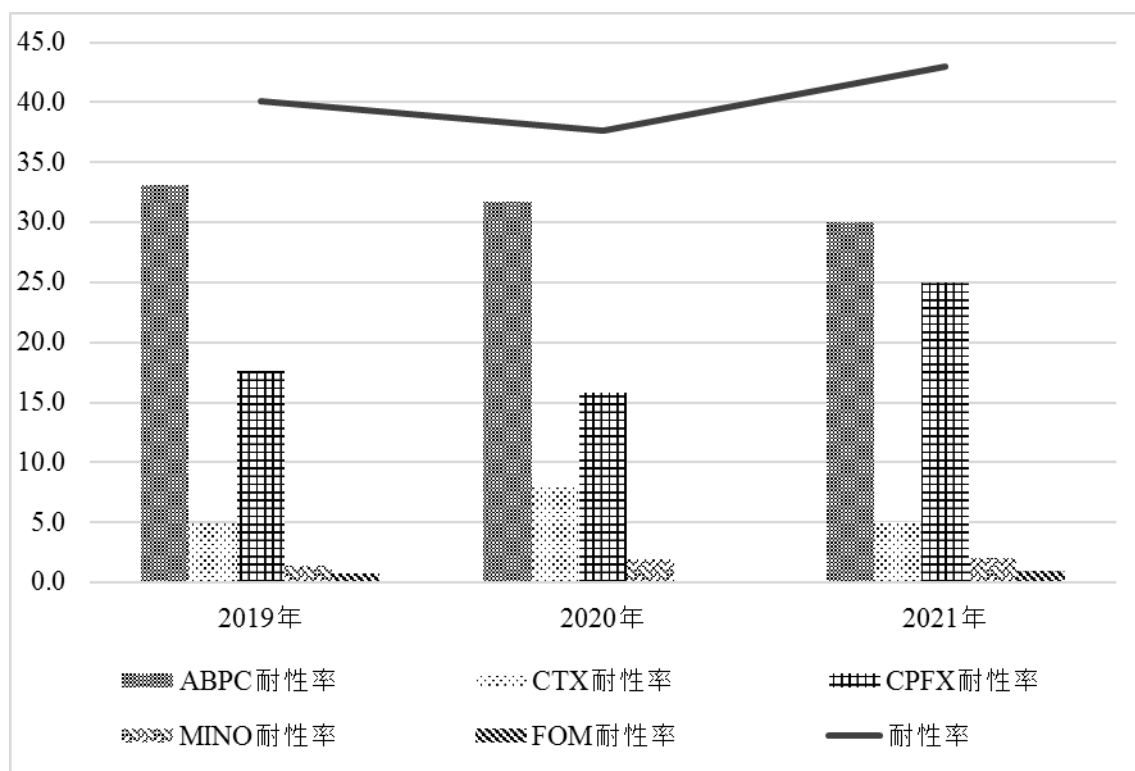


図 1 分離年毎の薬剤耐性率と各種薬剤耐性率

②耐性遺伝子を標的とした PCR 及び遺伝子型別結果

CTX 耐性株を除く ABPC 耐性株 89 株、CTX 耐性株 20 株、CMZ 耐性株 1 株、CPFX 耐性株 66 株、MINO 耐性 6 株及び FOM 耐性株 2 株に対し、表 1 に示す薬剤耐性遺伝子の検出を PCR 法にて実施した。

CTX 耐性株を除く ABPC 耐性株 : 74 株(83.2%)から *bla*_{TEM} が検出され、15 株からは標的遺伝子は検出されなかった。

CTX 耐性株 : *bla*_{CTX-M-1 group} 保有は 4 株(20%)で、遺伝子型の内訳は *bla*_{CTX-M-1} が 1 株、*bla*_{CTX-M-3} が 1 株、*bla*_{CTX-M-15} が 1 株及び *bla*_{CTX-M-55} が 1 株であった。*bla*_{CTX-M-9 group} 保有は 14 株(70%)で、遺伝子型の内訳は *bla*_{CTX-M-14} が 6 株及び *bla*_{CTX-M-27} が 8 株であった。また *bla*_{TEM} 単独保有が 2 株検出された(表 3)。

CMZ 耐性株 : *bla*_{CIT} 及び *bla*_{DHA} が同時に検出された。

CPFX 耐性株 : 1 株(1.5%)から *qnrS* 遺伝子が検出され、65 株(98.5%)からは標的遺伝子は検出されなかった。

MINO 耐性株 : 6 株全てから *tetB* 遺伝子が検出された。

FOM 耐性株 : 1 株から *fosA3* 遺伝子が検出され、もう 1 株からは標的遺伝子は検出されなかった。

③MLST 解析

CTX 耐性 20 株は ST131 が 9 株(45.0%)と最も多く、次いで ST38 及び ST69 がそれぞれ 2 株ずつ検出された(表 3)。

表3 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の薬剤耐性遺伝子とST型

No.	CTX-M-group	CTX-M型	TEM	ST	薬剤耐性
1	1	CTX-M-1	-	101	ABPC、CTX、MINO
2	1	CTX-M-3	+	11495	ABPC、CAZ、CTX、CFPM、CPFX
3	1	CTX-M-15	+	131	ABPC、CTX、CPFX、MINO
4	1	CTX-M-55	+	453	ABPC、CTX、FOM
5	9	CTX-M-14	-	38	ABPC、CTX、CPFX
6	9	CTX-M-14	-	38	ABPC、CTX、CPFX
7	9	CTX-M-14	+	69	ABPC、CTX、GM
8	9	CTX-M-14	+	394	ABPC、CTX
9	9	CTX-M-14	-	648	ABPC、CTX、CPFX
10	9	CTX-M-14	+	13292	ABPC、CTX、GM
11	9	CTX-M-27	-	131	ABPC、CTX、CPFX
12	9	CTX-M-27	-	131	ABPC、CTX、CPFX
13	9	CTX-M-27	-	131	ABPC、CTX、CPFX
14	9	CTX-M-27	-	131	ABPC、CTX、CPFX
15	9	CTX-M-27	-	131	ABPC、CTX、CPFX
16	9	CTX-M-27	-	131	ABPC、CTX、CPFX
17	9	CTX-M-27	+	131	ABPC、CTX
18	9	CTX-M-27	+	354	ABPC、CTX、GM、CPFX
19	N.D		+	69	ABPC、CAZ、CTX、CMZ
20	N.D		+	131	ABPC、CAZ、CTX、GM

N.D : Not Detected

【考察と今後の課題】

ABPC、CTX及びフルオロキノロンの2019年から2021年の愛知県入院検体由来の耐性率は、それぞれ平均51.6%、28.0%、39.8%であり、全国外来検体由来の耐性率は、それぞれ平均39.9%、17.9%、30.4%と報告されている²⁾。本研究において、ABPC、CTX及びCPFXの耐性率は、それぞれ30%前後、5%前後、20%前後を推移しており、3薬剤全てで愛知県入院検体由来の耐性率及び全国外来検体由来の耐性率よりも低い結果となっており、愛知県内市中において薬剤耐性大腸菌は大きく拡散されていないと考えられた。

第3世代セファロスポリン耐性遺伝子の $bla_{CTX-M-14}$ 及び $bla_{CTX-M-27}$ は、国内で多く報告されている型であり¹⁰⁾、本研究においても、 $bla_{CTX-M-14}$ 及び $bla_{CTX-M-27}$ がCTX耐性株から高頻度(70%)に検出された。また、 $bla_{CTX-M-27}$ は、 $bla_{CTX-M-14}$ の一塩基多型であり、2010年以降にST131において、国内で急速に拡大している型である¹¹⁾。本研究でも既報と同様に $bla_{CTX-M-27}$ 保有株のSTは1株を除きST131であり、市中においても広がっている可能性が示唆された。

CPFX耐性株からプラスミド由来と考えられる遺伝子($qnrS$ 遺伝子)が検出されたのは、1株(1.5%)のみであり、今回供試した株のCPFX耐性は、染色体上の $gyrA$ 遺伝子または

parC 遺伝子のキノロン耐性決定領域の点変異による可能性がある。キノロン耐性決定領域の点変異は ST131 で多く報告されていること¹²⁾、O 血清型によりフルオロキノロン耐性率が異なるとの報告もあることから¹³⁾、今後 CPFY 耐性株について ST の型別及び O 血清型の決定を実施していく必要があると考えられた。

本研究によって、愛知県内市中における薬剤耐性大腸菌の拡散状況の実態が明らかとなった。愛知県内市中における大腸菌の薬剤耐性率は、全国データと比して高くないことから、大きく拡散されていないと考えられる。しかし、本研究において探索した薬剤耐性遺伝子は、全てプラスミド上に存在するとされており、水平伝播する可能性があることや、耐性率は低いものの CTX 耐性等の医療上重要となりうる薬剤耐性が検出されていることから、今後も耐性遺伝子を含めた継続的な薬剤耐性菌のサーベイランスを行い、耐性率を注視していくことが重要であると考えられた。

【参考文献】

- 1) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations
- 2) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業ホームページ (<https://janis.mhlw.go.jp/report/index.html>)
- 3) T. Yagi et al. FEMS Microbiol Lett. 184(1):53-56(2000)
- 4) AMED 日本医療研究開発機構研究費(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究」
- 5) R.A.Horton et al. Appl Environ Microbiol. 77(11):3715-3719(2011)
- 6) Pérez-Pérez FJ et al. J Clin Microbiol. 40(6):2153-2162(2002)
- 7) H Ciesielczuk et al. J Med Microbiol. 62(12):1823-1827(2013)
- 8) M Gholami-Ahangran et al. Iran J Vet Res. 22(4):337-341(2021)
- 9) Jianxia Hou et al. Antimicrob Agents Chemother. 56(4):2135-2138(2012)
- 10) K. Nakane et al. Appl Environ Microbiol. 82(6):1818-1827(2016)
- 11) Y. Matsumura et al. Emerg Infect Dis. 22(11):1900-1907(2016)
- 12) Nicolas-Chanoine MH et al. Clin Microbiol Rev. 27(3):543-574(2014)
- 13) T. Matsumoto et al. J Infect Chemother. 28(11):1445-1451(2022)

【経費使途明細】

使 途	金 額
薬剤感受性試験用試薬 (BD センシ・ディスク)	73,425 円
PCR 試薬 (KAPATaq Extra PCR Kit, QIAGEN Multiplex PCR Kit)	121,990 円
プラスチック製品 (シャーレ、PCR チューブ・プレート)	69,605 円
実験器具 (NGS MagnaStand)	33,660 円
振込手数料 (660 円×2)	1,320 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円