

図 4 2010 年 全入院患者部門データ提出状況別の病床数分布

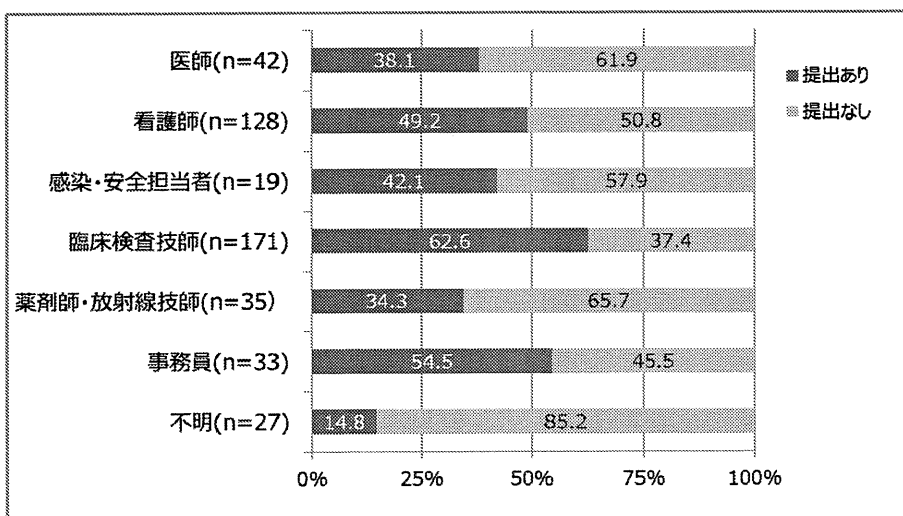


図 5 2010 年 全入院患者部門職種別のデータ提出状況 (期限内)

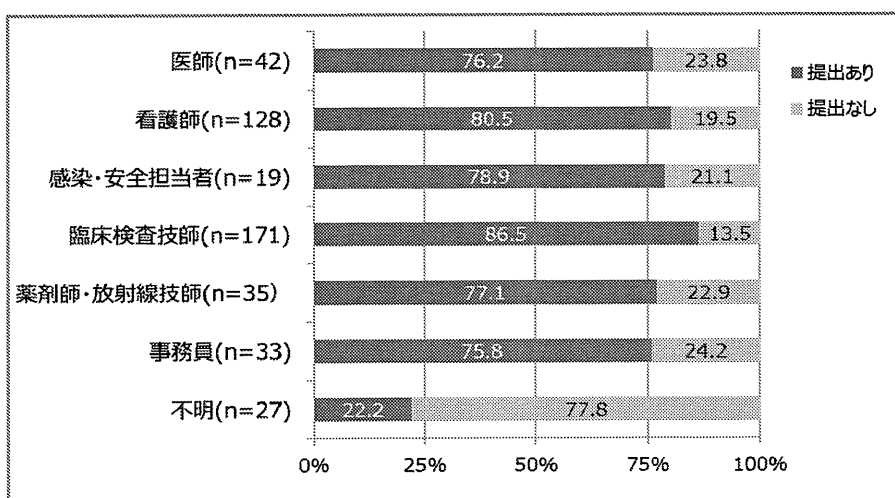


図 6 2010 年 全入院患者部門職種別のデータ提出状況 (督促後)

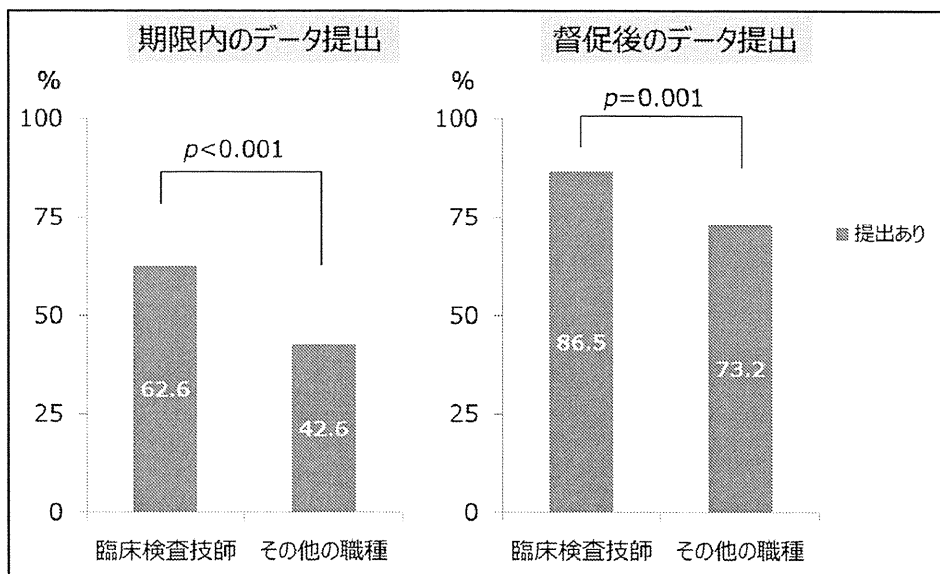


図7 データ提出状況（臨床検査技師とその他の職種の比較）

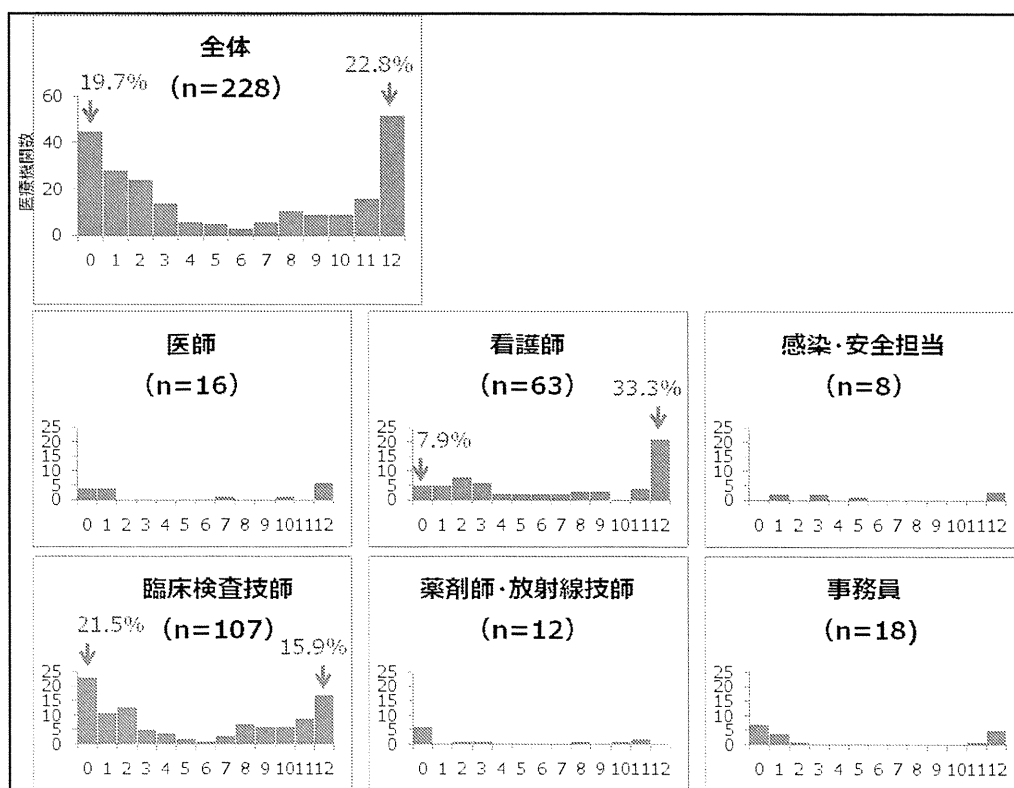


図8 還元情報のダウンロード状況（期限内に提出した228医療機関を対象）

研究分担者 佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所)

秋田県の一医療機関で分離された多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* の分子疫学性状と Class I Integron の解析

研究協力者 八柳 潤 (秋田県健康環境センター)

研究要旨

2003年7月から2006年9月に秋田市内の1医療機関からメタロβラクタマーゼ産生が疑われる14株のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌が送付された。これらの分離株はいずれもIMP-1遺伝子を保有する多剤耐性 *Achromobacter xylosoxidans* であることが判明したので、分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について基礎的な検討を実施した。*Xba*I PFGEパターンから分離株は同一起源と判断し得た。分離株が保有する Class 1 Integron のサイズは、株により約2.5Kb単独、約3Kb単独、約2.5Kbダブレット、約1.3Kbと2.5Kbであった。4株の Class 1 Integron のシーケンスを決定した結果、IMP-1、*aacA4*、*aadA5*を含む Gene Casette が同一 Class 1 Integron 中や、異なる Integron 間で組換え・転移した可能性が示唆された。今回供試した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多くが尿由来株であり、一医療機関において継続的に分離されたことは、*A. xylosoxidans* が院内感染起因菌として重要である可能性を示唆している。今後も秋田県内における多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

A. 研究目的

Achromobacter xylosoxidans は好気性、ブドウ糖非発酵性、グラム陰性桿菌で Immuno-compromised host に敗血症、髄膜炎、肺炎、尿路感染などを惹起¹⁾²⁾する日和見感染菌であり、院内湿潤環境に定着して院内感染を惹き起こすこともある。また、嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) 患者から分離される³⁾。*A. xylosoxidans* は各種の抗生物質に耐性を示す傾向がある⁴⁾がIMP-10⁵⁾、VIM-1⁶⁾、VIM-2⁷⁾、などのメタロβラクタマーゼを産生する株も報告されており、これらの株はカルバペネムを含むβ-ラクタム薬に多剤耐性となる。

2003年7月から2006年9月に秋田市内の1医療機関から14株のIMP-1遺伝子を保有する *A. xylosoxidans* が送付された。これらの株の分子疫学的性状と耐性遺伝子の性状について検討したので、その結果を報告する。

B. 研究方法

表1に14株の *A. xylosoxidans* 供試株を示す。14株中6株は尿由来であるが、残りの株の由

来は不明であった。IMPとVIM遺伝子はPCRにより検出した⁸⁾。分離株の薬剤感受性はKBディスク法とドライプレート(栄研化学)により検討した。

A. xylosoxidans 分離株の *Xba*I PFGEパターンは、Tenaらの報告⁹⁾に従って実施した。

既報⁸⁾のプライマーを使用して Class 1 Integron を増幅し、アガロースゲル電気泳動により増幅されたインテグロンの数とサイズを推定した。また、Mβ-127、140、156、161株については、検出されたインテグロンのDNAシーケンスを決定した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者情報を切り離した臨床分離菌株のみを取り扱っているため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

表1に示すように、*A. xylosoxidans* は秋田市内の某医療機関から2003年7月17日に初めて

89歳女性の尿由来株がメタロβラクタマーゼ遺伝子の確認目的で送付されて以降、2003年に3株、2004年に5株、2005年に3株、2006年に3株と断続的に送付された。14株は全てIMP遺伝子を保有していた。14株のうち、7株について患者の年齢性別が示され、それらはいずれも77歳以上の高齢者であった。14株は全てABPC、CAZ、CET、CFP、CFX、CTX、EM、FOM、IPM、KM、NFLX、TCに耐性であった。2006年8月8日に送付された80歳女性の尿由来Mβ-156株についてドライプレートによりMICを測定したところ、LVFXにのみ中等度耐性である以外、被検抗生物質全てに耐性であることが示された(表2)。

図1に14株のXbaI PFGEパターンと、保有するClass 1 IntegronのSizeを示す。分離株のXbaI PFGEパターンは非常に類似しており、TenoverのCriteria¹⁰⁾では同一起源と判断し得たが、パターンには微妙な違いが認められ、その違いに基づき、パターンをAからDに分類した。分離株が保有するClass 1 Integronのサイズは、約2.5Kb単独(Mβ-72、82、161)、約3Kb単独(Mβ-140、156)、約2.5Kbダブルット(Mβ-31、38)、約1.3Kbと2.5Kb(Mβ-51、61、64、65、85、125、127)であり、PFGEパターンと保有Class 1 Integronの種類に関連は認められなかった。

検出されたClass 1 Integronの構造を詳細に検討するためにMβ-127(約1.3Kb、2.5Kb)、Mβ-140、156(約3Kb単独)、Mβ-161(約2.5Kb)のClass 1 Integronのシークエンスを決定した。表3に示すように、Mβ-127は2,451bpのClass 1 Integron(IntMβ127)と1,295bpのClass 1 Integron(IntMβ127S)を保有し、IntMβ127は5CSと3CSの間にIMP-1とaadA5のGene Cassetteをコードし、また、IntMβ127SはaacA4のGene Cassetteをコードしていた。Mβ161は2,452bpのIntMβ161を保有し、このClass 1 IntegronはIMP-1とaadA5のGene Cassetteを保有していた。Mβ161と同様に約2.5KbのClass 1 Integronを保有するMβ-72とMβ-82株はいずれもPCRでaacA4が検出されたことから、これらの2株はMβ-161と異なるclass 1 Integronを保有する可能性があり、その構造の解明は今後の課題である。Mβ-140とMβ-156はいずれ

も3,055bpのClass 1 Integron(IntMβ-140、IntMβ-156)を保有し、IMP-1、aacA4、aadA5のGene Cassetteをコードしていたが、Class 1 Integronの中のIMP-1とaacA4 Gene Cassetteの順番が異なっていた。

D. 考察

我々は本研究において秋田市内の同一医療機関で2003年から2006年にかけて断続的に分離された*A. xylosoxidans*が全てIMP遺伝子を保有し、β-ラクタム、マクロライド、モノバクタム、カルバペネム、アミノグリコシド、ニューキノロン、テトラサイクリン、ホスホマイシンに耐性を示す多剤耐性菌であることを示した。分離株のうち6株が尿由来であり、これらの*A. xylosoxidans*は当該病院において高齢患者に尿路感染を惹起していたものと推察された。

今回、14株のうち代表株4株についてClass 1 Integronのシークエンスを決定した。その結果は、aacA4、aadA5、IMP遺伝子を含むGene Cassetteが同一Class 1 Integron中や、異なるIntegron間で組換え・転移した可能性を示唆しており興味深い。データは示さないが、供試した14株はMβ-161を除き、いずれもPCRでaacA4、aadA5、IMPが陽性であったことから、これらの株はこの3遺伝子を含むGene CassetteをコードするClass 1 Integronを保有しているものと推察される。今回シークエンスを決定した4株以外の10株についてもClass 1 Integronのシークエンスを決定し、その構造を解明する必要がある。

*A. xylosoxidans*の薬剤耐性機構にはIMP-10⁵⁾、VIM-1⁶⁾、VIM-2⁷⁾、などのメタロβラクタマーゼ、VEB-1 ESBL¹¹⁾、OXA-114¹²⁾などが関与することが報告されているが、*A. xylosoxidans*の多剤耐性機構の詳細は明らかになっていない。今回我々が検討した*A. xylosoxidans*は全て多剤耐性株であったが、今回我々が特定した薬剤耐性遺伝子の存在のみで多剤耐性機構を説明することは困難であると考えられ、広域な耐性スペクトルをもたらす耐性機構が同時に関与する可能性が推察される。*A. xylosoxidans*の多剤耐性機構として、2011年にAmoureuxら¹³⁾は初めてRND型の多剤排出ポンプの関与を報告し

た。多剤排出ポンプは *Pseudomonas aeruginosa* の多剤耐性機構に関与することも知られており¹⁴⁾、我々が検討した多剤耐性 *A. xylosoxidans* の多剤耐性機構にも多剤排出ポンプが関与するかどうかに興味を持たれる。多剤排出ポンプの関与は MC-04,124 等の Efflux Pump Inhibitor (EPI) を使用することにより証明し得る¹⁴⁾ので、今後検討する必要がある。

今回、我々が得た結果は、*A. xylosoxidans* が院内感染起因菌としても重要である可能性を示唆していると考えられ、多剤耐性 *A. xylosoxidans* の動向に注視する必要があると共に、分離株の多剤耐性機構についてさらなる検討が必要である。

E. 参考文献

- 1)Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Perez-balsalobre M et al : Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans* : report of 9 cases. Scand. J. Infect. Dis., **40**, 2008, 84-87.
- 2)Gomez-Cerezo J, Saurez I, Rios J et al : *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia : a 10-year analysis of 54 cases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **22**, 2003, 360-363.
- 3)saiman L, Siegel J : Infection control in cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev., **17**, 2004, 57-71.
- 4)Sader HS, Jones RN : Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli. Int. J. Antimicrob. Agents, **25**, 2005, 95-109.
- 5)Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A et al : Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. Antimicrob. Agents Chemother., **46**, 2002, 2014 - 2016.
- 6)Riccio ML, Pallecchi L, Fontana R et al : In70 of plasmid pAX22, a *bla*_{VIM-1}-containing integrin carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. Antimicrob. Agents Chemother., **45**, 2001, 1249 - 1253.
- 7)Shin KS, Han K, Lee J et al : Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxidans* carrying *bla*_{VIM-2}-containing class 1 integron. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **53**, 2005, 215-220.
- 8) Jun Yatsuyanagi, Shioko Saito, Seizaburo Harata, et al : Class 1 Integron Containing Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{VIM-2} in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains Isolated in Japan. Antimicrob. Agents Chemother., **48**, 2004, 626 - 628.
- 9)Tena D, Carranza, R, Barbera JR et al : Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **24**, 2005, 727-732.
- 10)Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al : Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J. Clin. Microbiol. **33**, 1995, 2233-2239.
- 11)Neuwirth C, Freby C, Ogier-Desserrey A, et al : VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. Emerg. Infect. Dis., **12**, 2006, 1737-1739.
- 12)Doi Y, Poirel L, Paterson DL, et al. : Characterization of a naturally occurring class D β -lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. Antimicrob. Agents Chemother., **52**, 2008, 1952 - 1956.
- 13)Amoureux BJ, Dues JM, Drabowicz A, et al : First description of a RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*:AxyABM. Antimicrob. Agents Chemother., 2011, E-pub.
- 14)Kriengkauykiat J, porter E, Lomovskaya O, et al : Use of efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 2005, 565 - 570.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

1. その他
特になし

表 1 供試した IMP 遺伝子陽性 *A. xylosoxidans* 一覧

菌株番号 (Mβ-)	受付年月日	年齢性別	由来
31	2003.7.17	89F	尿
38	2003.10.6		尿
51	2003.11.14		
61	2004.1.16	77M	尿
64	2004.2.6	87F	尿
65	2004.2.18	84F	尿
72	2004.4.2	78M	
82	2004.7.7		
95	2005.1.12		
125	2005.9.26		
127	2005.9.29		
140	2006.1.16		
156	2006.8.8	80F	尿
161	2006.9.5	98F	

表 2 Mβ-156 株の薬剤感受性 (MIC μg/ml)

ABPC	>32	FMOX	>32	AMK	>32
PIPC	64	CPDX	>8	MINO	>16
CEZ	>32	AZT	>32	FOM	>32
CTM	>32	IPM	>16	ST	>76/4
CAZ	>32	MEPM	>16	LVFX	4 (I)
CCL	>32	GM	>16	CPFEX	4 R

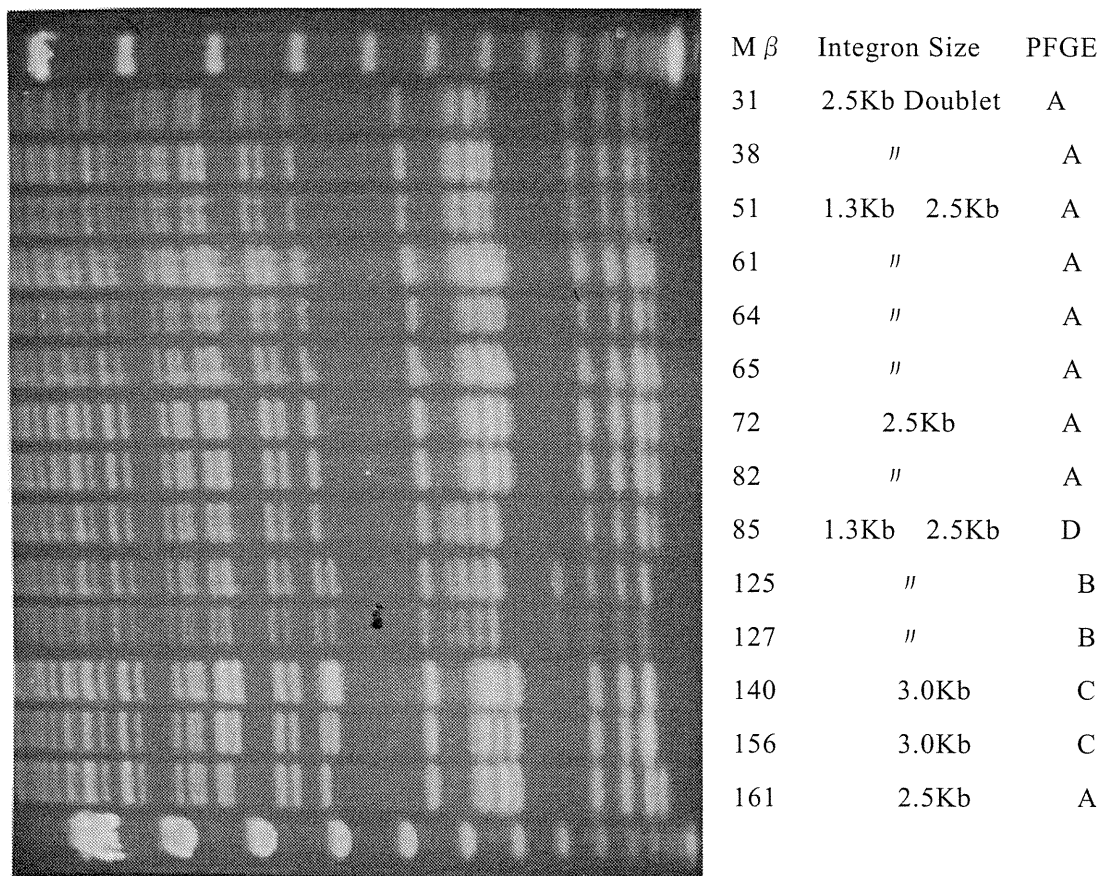


図 1 A. xylosoxidans 14 株の XbaI PFGE パターンと保有するインテグロンの概要

表 3 DNA シーケンス解析から決定したインテグロンの構造

インテグロン			
菌株番号	名称	サイズ	インテグロン構造
Mβ127	IntMβ127	2,451bp	5CS-IMP-1-aadA5-3CS
	IntMβ127S	1,295bp	5CS-aacA4-3CS
Mβ161	IntMβ161	2,452bp	5CS-IMP-1-aadA5-3CS
Mβ156	IntMβ156	3,055bp	5CS-IMP-1-aacA4-aadA5-3CS
Mβ140	IntMβ140	3,055bp	5CS-aacA4-IMP-1-aadA5-3CS

研究分担者 佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）

市販鶏肉からの CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子保有株の分離と分離株の解析

研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）

研究要旨

CTX-M 遺伝子は *Kluyvera* 属菌の染色体遺伝子に由来すると考えられているが、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する報告はほとんどみあたらない。我々は、市販鶏肉を対象として CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌の検出を試みた。秋田市内のスーパーで購入した鶏肉 16 検体を供試し、CTX-M2 Group 遺伝子陽性 *E. coli* 1 株と、これまでに報告されていない CTX-M1 Group 遺伝子を保有する *K. cryocrescens* 2 株を分離した。分離された *K. cryocrescens* 2 株の CTX-M 遺伝子の周辺には、CTX-M 遺伝子の転移に関与するとされる *ISEcp1* により認識され得る遺伝子構造が存在していた。我々の成績は *Kluyvera* 属菌が CTX-M 遺伝子自体のジーンプールとなっている可能性を示すと共に、鶏の腸管が CTX-M 遺伝子保有大腸菌などの発生に関与する可能性を示唆するものと考えられた。今後も鶏が保有する *Kluyvera* 属菌とプラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する腸内細菌の遺伝子を解析し、CTX-M 遺伝子の起源に関する知見を集積する必要がある。

A. 研究目的

CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBL）は、近年、国内外共に ESBL の主流となっている¹⁾。*Escherichia coli* や *Proteus mirabilis* などの腸内細菌科に属する臨床分離株において、CTX-M 遺伝子は 7Kb から 160Kb の伝達性プラスミド上にコードされている¹⁾。この CTX-M 遺伝子は、*K. gerogiana*、*K. ascorbata*、*K. cryocrescens* などの *Kluyvera* 属菌の染色体遺伝子に由来すると考えられている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。とりわけ、Rodriguez らは CTX-M3 遺伝子を染色体に保有する *K. ascorbata* を環境材料から分離し、CTX-M3 遺伝子が CTX-M1 Group 遺伝子の起源である可能性を指摘している⁶⁾。一方、市販鶏肉が大腸菌などの CTX-M 型 ESBL 産生菌に汚染されていることが報告されており⁷⁾⁸⁾、鶏肉が CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染源となる可能性が指摘⁸⁾されているが、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する報告はほとんどみあたらない。我々は、*Kluyvera* 属菌の Reservoir に関する知見を得ることを目的として、市販鶏肉を対象として CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌の検出を試みた。

B. 研究方法

鶏肉からの CTX-M 型遺伝子保有株の分離

2010 年 6 月と 7 月に秋田市内のスーパーで購入した鶏肉 16 検体を供試した。鶏肉 25g を BPW 225ml に接種し、35°C で 1 夜培養した。培養液を 1% Cellobiose 加マッコンキアガーに CTX 4 μ g/ml、またはセファロチン 2 μ g/ml を加えた分離平板で 37°C 1 夜分離培養した。菌苔の濃厚発育部分からアルカリ法で抽出した DNA をテンプレートとして、表 1 に示す Pagani ら⁹⁾が報告した CTX-MU1/CTX-MU2 プライマーを使用する PCR により CTX-M 遺伝子保有株のスクリーニングを実施した。陽性となった平板は、発育した個々のコロニーについて同 PCR により CTX-M 遺伝子保有株を特定した。特定された CTX-M 遺伝子保有株については、表 1 に示すプライマーを使用して CTX-M 遺伝子を群別した。また、16S リボゾーマル RNA のシーケンスを決定¹⁰⁾し、BLAST 解析を行うと共に、API20E により菌種を同定した。

分離株の薬剤感受性はドライブプレート DPD1 と DP21（栄研化学）により検討した。

鶏肉から分離された *K. cryocrescens* #4 と #8 の CTX-M 遺伝子を含む染色体 DNA 断片のクロ

ーニングと解析

鶏肉から分離された、CTX-M 遺伝子陽性 *K. cryocrescens* #4 と #8 から QIAamp DNA minikit(Quiagen)を使用して染色体 DNA を分離・精製し、BamH1 で消化した。得られた DNA 断片を、あらかじめ BamH1 で消化した pBCKS ベクター (Stratagene) にライゲートし、Competent JM109 を Transform した。0.008% X-gal、14.75mg/ml IPTG、30 µg/ml CP、2µg/ml CEZ を加えた L Agar Plate を使用して、CTX-M 遺伝子を含む Transformant を選択し、JM109 4-1 と JM109 8-1 を得た。

JM109 4-1 と JM109 8-1 から QIAquick spin mini kit (Quiagen)を使用してプラスミド p4-1 と p8-1 を調製し、T3、T7、CTX-MU1、CTX-MU2 プライマーを使用して、クローニングされた DNA 断片 (インサート 4-1、インサート 8-1) のシーケンスを決定した後、プライマーウォーキング法によりインサート 4-1 は約 3.3Kb、インサート 8-1 は約 3.7Kb の DNA シークエンスを決定した。

C. 研究結果

鶏肉からの CTX-M 型遺伝子保有株の分離

表 2 に鶏肉から分離された CTX-M 遺伝子陽性株を示す。6 月 24 日に購入した岩手県産純白鶏モモ (検体番号 4) 及び 7 月 8 日に購入した岩手県産若鶏モモ挽肉 (検体番号 8) から、CTX-M1 Group 遺伝子陽性 *K. cryocrescens* が分離された (菌株番号: #4-1 と #8-1)。一方、7 月 1 日に購入した岩手県産若鶏モモ挽肉 (検体番号⁷⁾ から CTX-M2 Group 遺伝子陽性 *E. coli* が分離された (菌株番号 #7-5-3)。

分離株の薬剤感受性を表 3 に示す。*K. cryocrescens* は #4-1 株、#8-1 株いずれも ABPC に耐性、CTX、CAZ、IPM、AMK、MINO、LVFX に感受性であった。また、#4-1 株は AZT 感受性であったのに対して、#8-1 株は AZT 中等度耐性であった。一方、*E. coli* #7-5-3 株は ABPC、CTX、IPM、AZT、AMK 耐性、CAZ、MINO、LVFX 感受性であった。

以上の結果から、鶏肉から分離された *K. cryocrescens* 2 株は、CTX-M1 Group 遺伝子を保有するものの CTX に耐性を示さないことが

示された。一方、CTX-M2 Group 遺伝子を保有する *E. coli* #7-5-3 株は CTX 耐性 CAZ 感受性という、CTX-M 型 ESBL 産生株に典型的な耐性パターンを示し、IPM、AZT、AMK にも耐性を示すという、特徴的な多剤耐性傾向にあることが明らかとなった。

K. cryocrescens #4 と #8 の CTX-M 遺伝子を含む染色体 DNA 断片の解析

T3 プライマーと T7 プライマーを使用した検討により、p4-1 には *K. cryocrescens* #4 の染色体に由来する約 23Kb の DNA 断片、p8-1 には *K. cryocrescens* #8 の染色体に由来する約 5Kb の DNA 断片が組み込まれていることが判明した。プライマーウォーキング法により p4-1 のインサート 3,296bp、p8-1 のインサート 3,742bp の DNA シークエンスを決定し、解析した結果を図 1 に示す。インサート 4-1、8-1 の *bla*_{CTX-M} 遺伝子周辺の遺伝子構造はほぼ同一で、Asparatate amino transferase、*bla*_{CTX-M}、orf477 (Reverse strand)、そして orf1 の順にコードされていることが明らかとなった。

CTX-M1 Group に属する、プラスミド性 CTX-M3 遺伝子の Start Codon 上流部とインサート 4-1、8-1 の CTX-M 遺伝子の上流部の DNA シークエンスを比較した結果を図 2 に、プラスミド性 CTX-M15 遺伝子の Stop Codon 下流部とインサート 4-1、8-1 CTX-M 遺伝子の下流部の DNA シークエンスを比較した結果を図 3 にそれぞれ示す。インサート 4-1、8-1 CTX-M 遺伝子の上流部と下流部の DNA シークエンスはほぼ同一であり、シーケンスの保存性が高いことが明らかとなった。CTX-M 遺伝子の Start Codon から -127bp の領域は、プラスミド性 CTX-M3 遺伝子の Start Codon 上流部のシーケンスとほぼ一致していたが、プラスミド性 CTX-M3 遺伝子では -128bp 以遠が *ISEcp1* 遺伝子の IRR1¹⁾ となり、インサート 4-1、8-1 の CTX-M 遺伝子の上流部のシーケンスとはこの部分から異なった (図 2)。一方、CTX-M 遺伝子の Stop Codon 下流域の DNA シークエンスは *ISEcp1* 遺伝子の Putative IRR⁶⁾ の 3' 末端まではプラスミド性 CTX-M15 遺伝子、インサート 4-1、8-1 遺伝子ともにほぼ一致していたが、Putative IRR3' からさらに下流ではプラスミド

性 CTX-M15 遺伝子の DNA シークエンスは Insert 4-1、4-8 の DNA シークエンスと異なっていた。

*bla*_{CTX-M4-1} と *bla*_{CTX-M8-1} の DNA シークエンスをアミノ酸配列に翻訳し、Protein BLAST 解析した結果を表 4 と表 5 にそれぞれ示す。CTX-M4-1 タンパク、CTX-M8-1 タンパク共に、同一の配列を持つ CTX-M タンパクは報告されていない。CTX-M 4-1 タンパクはアミノ酸残基 291 個中 290 個が CTX-M3 と CTX-M30 とに一致し、これらとの相同性が最も高いこと、一方、CTX-M 8-1 タンパクはアミノ酸残基 291 個中 290 個が CTX-M68 と一致し、CTX-M68 と最も相同性が高いことが明らかとなった。

D. 考察

今回、我々は CTX-M2 Group 遺伝子を保有する大腸菌と CTX-M1 Group 遺伝子を保有する *K. cryocrescens* を秋田市内で市販されていた鶏肉から初めて分離した。CTX-M 型 ESBL 産生菌（腸内細菌、plasmid 性）を市販鶏肉から分離した報告は国内においても散見されるが、市販鶏肉から染色体性 CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌を分離した報告はみあたらない。*Kluyvera* 属菌のうち、*K. georgiana* は CTX-M9 Group²⁾、CTX-M8 Group³⁾、*K. ascorbata* は CTX-M3⁶⁾、KLUA(CTX-M2 Group)¹⁾⁵⁾、*K. cryocrescens* は KLUC-1⁴⁾ 遺伝子を染色体にコードしていることが報告されている。そして、大腸菌等の腸内細菌が保有するプラスミド性 CTX-M 遺伝子は、*Kluyvera* 属菌の染色体性 CTX-M 遺伝子に由来すると考えられている¹⁾。Decousser らが報告⁴⁾した *K. cryocrescens* の KluC-1 遺伝子は、CTX-M1 Group に近縁ではあるものの、CTX-M1 との相同性は約 85% に過ぎず¹⁾、CTX-M1 Group とは別群に属すると提唱されている。これに対して、今回我々が鶏肉から分離した *K. cryocrescens* が保有する CTX-M 遺伝子は CTX-M1 Group に属し、一株が CTX-M3 と CTX-M30、もう一株が CTX-M68 とアミノ酸レベルで約 99.6% の相同性を示すことが明らかとなった。以上の結果は、*K. georgiana*²⁾³⁾、*K. ascorbata*¹⁾⁵⁾⁶⁾ と同様に、*K. cryocrescens* も複数種類の CTX-M 遺伝子を染色体にコードしていることを示しており、同一種の *Kluyvera* 属

菌が複数の CTX-M 遺伝子を染色体にコードしている実態が伺われる。

Kluyvera 属菌の染色体にコードされている CTX-M 遺伝子が、大腸菌などの腸内細菌のプラスミドに転移する機構には、*ISEcp1* が関与することが指摘¹¹⁾されている。実際、In Vitro で *Kluyvera ascorbata* の染色体性 CTX-M 遺伝子が *ISEcp1* により大腸菌のプラスミドに転移することが実験的に証明されている¹²⁾¹³⁾。*ISEcp1* は CTX-M8 Group を除くプラスミド性 CTX-M1、2、9、25 Group 遺伝子と共存していることがこれまでに報告されていることと併せて¹²⁾、CTX-M 型 ESBL 産生株の世界的な浸淫には *ISEcp1* による CTX-M 遺伝子のプラスミドへの転移が関与していると考えられる。なお、CTX-M2 遺伝子の転移には Putative transposase とされる orf513 が関与するという報告¹⁴⁾もあり、このことは *Kluyvera* 属菌の染色体性 CTX-M 遺伝子が腸内細菌に拡散する機構には複数の転移機構が関与していることを示唆している。なお、*ISEcp1* は CTX-M 遺伝子発現の強力なプロモーターとして機能することが報告¹¹⁾されている。実際、染色体性 CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera* 属菌には *ISEcp1* が共存せず、CTX に対する MIC は 0.06 から 0.25 μ g/ml であるのに対して、*ISEcp1* が共存する、プラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する大腸菌の CTX に対する MIC は 4 から 512 μ g/ml であることが報告¹⁾されている。我々の成績においても、鶏肉から分離された *K. cryocrescens* は 2 株とも CTX-M 遺伝子の上流には *ISEcp1* が存在せず、CTX に対する MIC はそれぞれ \leq 1 と 4 μ g/ml であったのに対して、CTX-M2 group 遺伝子を保有する大腸菌 #7-5-3 株の CTX に対する MIC は >32 μ g/ml であった。

今回、我々が鶏肉から分離した *K. cryocrescens* は 2 株とも CTX-M 遺伝子の上流と下流の DNA シークエンスが非常によく一致していること、そして、CTX-M の Start codon から -127bp までの配列がプラスミド性 CTX-M3 遺伝子の *ISEcp1* 遺伝子の IRR¹¹⁾ までの DNA シークエンスと非常に高い相同性を保っていることが明らかとなった。さらに、CTX-M 遺伝子の Stop codon 下流部の DNA シークエンスは、プラスミド性 CTX-M15 遺伝子の下流部に存在する、

ISEcp1 の Putative IRR(18bp)までの DNA シークエンスと非常に高い相同性を保っていることが明らかとなった。以上の結果は、今回我々が鶏肉から分離した *K.cryocrescens* は 2 株とも、CTX-M 遺伝子周辺に Putative IRR(18bp)を含む ISEcp1 が認識可能な DNA シークエンスを保有していることを示していると考えられ、このことは、これらの株が染色体にコードしている CTX-M 遺伝子が ISEcp1 により認識され、転移し得る可能性を示唆しているものと考えられる。

我々の成績は *Kluyvera* 属菌が CTX-M 遺伝子自体のジーンプール (Reservoir) となっている可能性を支持すると考えられる。*Kluyvera* 属菌から腸内細菌に CTX-M 遺伝子が転移する場に関する知見は殆ど報告されていないが、今回の我々の成績は鶏の腸管が CTX-M 遺伝子保有大腸菌などの発生に関与する可能性を示唆するものと考えられ、この点に関して更なる検討が必要である。一方、CTX-M15 の起源は明らかではないが、その Progenitor であると考えられている CTX-M3 遺伝子にポイントミューテーションが生じて CTX-M15 となった可能性に加えて、CTX-M15 が *Kluyvera* 属菌の染色体に元々存在していた可能性も考えられ、この点の解明は今後の課題である。今後も鶏が保有する *Kluyvera* 属菌とプラスミド性 CTX-M 遺伝子を保有する腸内細菌の遺伝子を解析し、CTX-M 遺伝子の起源に関する知見を集積する必要がある。

E. 参考文献

- 1)Bonnet R : Growing group of Extended-Spectrum β -lactamase. Antimicrob. Agents. Chemother., **48**, 2004, 1-14.
- 2)Olson AB, Silverman M, Boyd DA, et al : Identification of a progenitor of the CTX-M9 group of Extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. Antimicrob. Agents. Chemother., **49**, 2005, 2112-2115.
- 3)Poirel L, Kampf P, Nordmann P : Chromosome-encoded ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitor of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob. Agents. Chemother., **46**, 2002, 3045-3049.
- 4)Decousser JW, Poirel L, Nordmann P : Characterization of a chromosomally encoded extended-spectrum class A β -lactamase from *Kluyvera cryocrescens*. Antimicrob. Agents. Chemother., **45**, 2001, 3595-3598.
- 5)Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, et al : β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob. Agents. Chemother., **46**, 2002, 4038-4040.
- 6)Rodriguez MM, Power P, Radice M, et al : Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata* : a possible origin of Plasmid-Borne CTX-M-1-derived Cefotaximases. Antimicrob. Agents. Chemother., **48**, 2004, 4895-4897.
- 7)石畝 史、永田暁洋、鈴木里和 他 : 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析. 日本獣医公衆衛生学会誌, **63**, 2010, 883-887.
- 8)石原ともえ、古川一郎、黒木俊郎 他 : 市販鶏肉および市中病院外来患者における ESBL 産生菌の検出状況. 本食品微生物学雑誌, **28**, 2011, 123-127.
- 9)Pagani L, Dell'Amico E, Roberta Migliavacca R, et al: Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 4264-4269.
- 10)Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Abachin E, et al : Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. J. Clin. Microbiol., **40**, 2002, 3793-3797.
- 11)Poirel P, Decousser JW, Nordmann P : Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene. Antimicrob. Agents. Chemother., **47**, 2003, 2938-2945.
- 12)Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, et al : In Vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. Antimicrob. Agents.

Chemother., **50**, 2006, 1282-1286.

13) Nordmann P, Lartigue MF, poirel L : β -lactam induction of ISEcp1-mediated mobilization of the naturally occurring *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene of *Kluyvera ascorbata*. FEMS Microbiol. Lett., **288**, 2008, 247-249. 特になし
G. 研究発表
1. 論文発表
特になし

14) Arduino SM, Roy PH, Jacoby GA et al : *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 Integron (In35) which includes orf513. Antimicrob. Agents. Chemother., **46**, 2002, 2303-2306. 2. 学会発表
特になし

F. 健康危険情報

表1 CTX-M 遺伝子検出と型別用プライマー

名称	配列 (5' → 3')	増幅断片
CTX-MU1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT	
CTX-MU2	TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA	593bp
CTX-M1GF	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CG	
CTX-M1GR	TTA CAA ACC GTA GGT GAC	876bp
CTX-M2GF	ATG ATG ACT CAG AGC ATT CGC C	
CTX-M2GR	TCA GAA ACC GTG GGT TAC	876bp
CTX-M9GF	ATG GTG ACA AAG AGA GTG CAA	
CTX-M9GR	TCA CAG CCC TTC GGC GAT	876bp

表2 鶏肉から分離された CTX-M 遺伝子陽性株

検体番号	品名	購入月日	検出株	CTX-M 遺伝子	菌株番号
4	岩手県産純白鶏モモ	6/24	<i>K. cryocrescens</i>	CTX-M1 Group	#4-1
7	岩手県産若鶏モモ挽肉	7/1	<i>E. coli</i>	CTX-M2 Group	#7-5-3
8	岩手県産若鶏モモ挽肉	7/8	<i>K. cryocrescens</i>	CTX-M1 Group	#8-1

表3 鶏肉から分離された CTX-M 遺伝子陽性株の薬剤感受性

菌株番号	MIC μ g/ml							
	ABPC	CTX	CAZ	IPM	AZT	AMK	MINO	LVFX
<i>K. cryocrescens</i> #4-1	32	≤ 1	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	2	1	≤ 0.5
<i>E. coli</i> #7-5-3	>32	>32	1	>16	>32	>32	≤ 0.5	4
<i>K. cryocrescens</i> #8-1	32	4	4	≤ 0.5	16	2	≤ 0.5	≤ 0.5

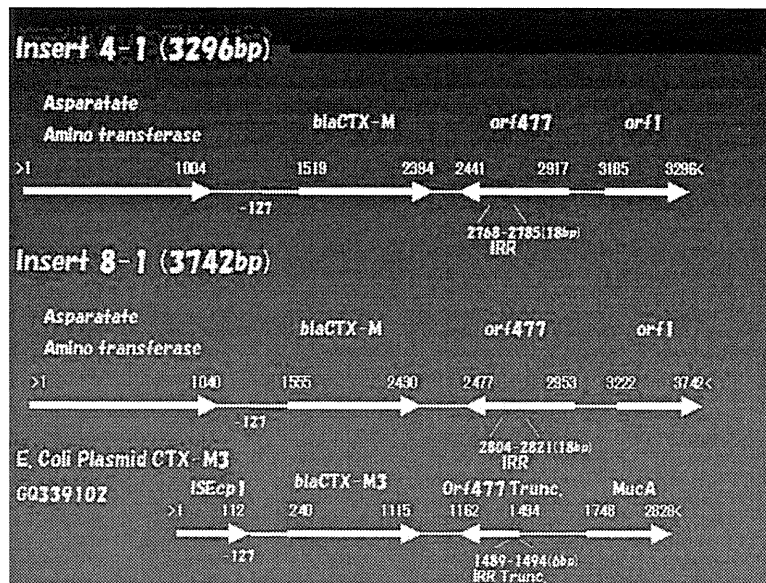


図1 Insert 4-1 と Insert 8-1 の DNA シークエンス解析結果

-127

```

4-1
ATTCATTCCGGTAATAAATTTGATTCTGGCGACGTCCGTATTTGCCTTTCCGAAGCATAA
8-1
ATTCATTCCGGTAATAAATTTGATTCTGGCGACGTCAGAATTTGCCTTTCCGAAGCATAA
CTX-M3
ACACACGTGGAATTTAGGTTTCATTCTGGCGACGTCCGTATTTGCCTTTCCGAAGCATAA
      IRR ISEcp1 *****
4-1
AATCGGACGCGTTGTGGCTCGCTTCAGGTAAAATATTGACTATTCATGTTGTTGTTAATT
8-1
AAGCGGACGCTTTGTGGCTCGCTTCAGGTAAAATATTGACTATTCATGTTGTTGTTATTT
CTX-M3
AATCGGACGCGTTGTGGCTCGCTTCAGGTAAAATATTGACTATTCATGTTGTTGTTATTT
*****
4-1          CGTCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCATG
8-1          CGTCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCATG
CTX-M3      CGTCTCTTCCAGAATAAGGAATCCCATG
                ***** CTX-M Start Codon

```

図2 Insert 4-1、8-1 CTX-M 遺伝子上流部と Plasmid CTX-M3 遺伝子上流部のシークエンス比較

4-1

TAATAGCGGAAACGGAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAA

8-1

TAGTTGCGGAAACGGAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCACCTCAGACGGCAA

E.coli plasmid CTX-M15

TAATAGCGGAAACGGAATGGGGAAACTCATTCCGTTTTTGTATTATCGCCTTAGACGGCAA

** * ***** **

361

4-1

GAGGGTGTCGGTGCGGGCGCACGTAGGTCCCTGGTCCCATGGCAATAGCCAGACGTTG
G

8-1

GAGGGTGTCGGTGCGGGCGCACATAGGTCCCAGGTTCC-ATGGCAATGGCCAGACGTTG
G

E.coli plasmid CTX-M15

GAGGGTGTCGGTGCGGGCGCACGTAGGTCCCAGGTCATATTCCTTCCGGCGTCCGGCAT
T

***** **

Putative IRR from ISEcp1

図 3 Insert 4-1、8-1 CTX-M 遺伝子下流部と Plasmid CTX-M15 遺伝子下流部のシーケンス比較

表 4 blaCTX-M4-1 の Protein BLAST 解析結果

blaCTX-M	Amino Acid identities
CTX-M3	290/291
CTX-M30	290/291
CTX-M15	289/291
CTX-M22	289/291

表 5 $b/a_{\text{CTX-M8-1}}$ の Protein BLAST 解析結果

blaCTX	Amino Acid Identities
CTX-M68	290/291
CTX-M10	289/291
CTX-M37	288/291
CTX-M34	288/291
CTX-M3	287/291

研究分担者 佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所)

秋田県内の医療機関における CTX-M 基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況

研究協力者 八柳 潤 (秋田県健康環境センター)

研究要旨

2003 年から 2010 年まで県内の医療機関から受領した 963 株の ESBL 疑い株のうち、680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有 ESBL であった。CTX-M 遺伝子保有株の 51.1%が *Escherichia coli*、42.2%が *Proteus mirabilis* であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4% を占め、66.8%が尿由来であった。181 株の CTX-M 遺伝子を型別した結果、CTX-M9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M-2 グループが 68 株と続き、CTX-M-1 グループが 36 株であった。36 株の CTX-M-1 グループ遺伝子保有株はすべて *E. coli* であり、CTX-M 遺伝子のシーケンスを解析した結果 35 株が CTX-M-15、1 株が CTX-M-61 であることが明らかとなった。秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 型 ESBL 遺伝子保有 *E. coli* が県内に侵淫していることが注目され、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。

A. 研究目的

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は 1983 年に世界で初めて Knothe らにより ESBL 産生 *Klebsiella pneumoniae* および *Serratia marcescens* として報告され¹⁾、日本においては 1995 年に石井が Toho-1 型 (CTX-M 型) ESBL 産生 *Escherichia coli* を報告したのが最初である²⁾。日本では欧米と異なり TEM 型、SHV 型の ESBL 産生菌の報告は非常に少なく、CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度が高い。しかし、近年、欧米においても TEM-型や SHV-型に代わり、CTX-M 型が ESBL の主流となってきている³⁾⁴⁾。

我々は、医療機関検査室からの要望に応じて 2003 年 1 月から PCR 法による ESBL の確認を実施してきた。今回、2003 年 1 月から 2011 年 8 月までに実施した ESBL 検査の結果、特に CTX-M 型 ESBL の分離状況等について報告する。

B. 研究方法

CTX-M 型 ESBL 遺伝子の検出

2003 年 1 月 24 日から 2010 年 3 月 31 日までに県内の医療機関から合計 963 株の ESBL 疑い

株が送付された。これらの株について TEM、SHV、CTX-M 遺伝子を標的とする PCR を実施した。CTX-M 遺伝子の検出には表 1 に示す Pagani ら⁵⁾が報告した CTX-MU1/CTX-MU2 プライマーを使用した。

CTX-M 遺伝子の型別

2010 年 9 月 13 日から 2011 年 8 月 1 日に同定した 181 株の CTX-M 遺伝子陽性株について、表 1 に示すプライマーを使用する PCR により、CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループに型別した。CTX-M1 グループの株については、表 1 に示す CTX-M1 GFJYM13Fmod、CTX-M1 GRJYM13Rmod プライマーを使用する PCR により CTX-M 遺伝子全長を増幅し、シーケンスプライマー M13Fmod60、M13Rmod60 を使用して DNA シーケンスを決定し、BLAST により CTX-M 遺伝子の型を特定した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者情報を切り離した臨床分離菌株のみを取り扱っているため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

秋田県における CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の検出状況

図 1 に 2003 年 1 月 24 日から 2010 年 12 月 31 日の CTX-M 遺伝子陽性株の検出状況を示す。2003 年から 2010 年まで、医療機関から合計 963 株の ESBL 疑い株の検査依頼を受け、それらのうち 680 株が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性であった。この間、検査依頼数、CTX-M 遺伝子陽性株数共に増加傾向にあった。なお、TEM 型と SHV 型 ESBL 遺伝子陽性株は各 1 株 (TEM-104、SHV-12⁶⁾) 検出されたのみであった。

表 2 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の由来を示す。由来が記載されていた 301 株のうち、201 株 (66.8%) が尿由来株であり、CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株が尿路感染に関与する頻度が高いことが示された。また、19 株が血液由来とされていることから、ESBL 遺伝子陽性株による敗血症患者が発生していることが伺われた。

表 3 に CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の菌種を示す。菌種が記載されていた 502 株のうち、*E.coli* が 257 株 (51.1%)、*P.mirabilis* が 212 株 (42.2%) であり、この 2 菌種が CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の 93.4% を占めていた。

CTX-M 遺伝子の型別結果

表 4 に 181 株の CTX-M 遺伝子の型別結果を示す。CTX-M9 グループが 69 株と最も多く、CTX-M2 グループが 68 株と続き、CTX-M1 グループが 36 株であった。また、今回使用したプライマーの CTX-M2 グループと CTX-M9 グループ両者に反応する株が 4 株、そしていずれとも反応しない型別不能の UT 株が 3 株認められた。CTX-M 型の分布には菌種により特徴的な傾向がみられ、*P.mirabilis* は 46 株中 45 株が CTX-M2 グループの ESBL 遺伝子を保有していたのに対して、*E.coli* では CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループ、CTX-M2/9 グループ、UT の全てが確認された。

CTX-M1 グループ 36 株中 35 株が CTX-M15、1 株が CTX-M61 であった。

D. 考察

我々は秋田県の医療機関に CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が広く侵淫していること、そして分離株数が 2003 年以降、顕著に増加していることを示した。供試株に占める CTX-M 型 ESBL 遺伝子陽性株の割合は、2003 年には約 45% であったのに対して、2010 年には約 86% となった。これは、ESBL 産生株が薬剤耐性菌として注目された 2003 年当時は、医療機関において未だバイテックなどの自動同定装置による ESBL のスクリーニング検査法が普及していなかったことに起因すると推察される。現在は、クラブラン酸の阻害効果を利用した ESBL スクリーニング検査法が医療機関検査室に普及し、ESBL 産生疑い株を効率よく特定できると考えられる。なお、ESBL 産生が疑われながら、TEM、SHV、CTX-M 遺伝子のいずれも検出されなかった株の菌種は *Serratia marsecens*、*Enterobacter cloacae*、*Citrobacter freundii* などであり、これらは AmpC の過剰産生など、ESBL 産生とは異なる機構により CTX、CAZ などに耐性を示すと考えられる。

ESBL 産生菌感染のリスクファクターは疾病の重症度、ICU および長期入院、気管内挿管、人工呼吸、カテーテルの挿入などであることが指摘されている⁷⁾。今回、我々は ESBL 遺伝子保有株の由来として尿が最も高頻度であることを示した。尿由来とした株の多くがカテーテル尿由来であり、患者の多くが高齢の長期入院患者であると推察され、我々のこの結果も、これらの患者が ESBL 産生株感染のハイリスク群であることを裏付けると考えられる。

今回の成績から秋田県では CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株の 51.1% を *E.coli*、42.2% を *P.mirabilis* が占め、これら 2 菌種が全体の 93.4% を占めることが示された。Shibata らが 2001 年から 2003 年に全国調査をした成績⁸⁾においても類似の傾向がみられ、CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株のうち分離数が多い菌種は上位から *E.coli*、*P.mirabilis*、*Klebsiella pneumoniae* であり、CTX-M 型 ESBL 産生菌の中で *P.mirabilis* が *E.coli* に次いで分離頻度が高い。*P. mirabilis* は主に尿路感染症を引き起こす病原微生物である⁹⁾が、ampicillin をはじめとする β -lactam 薬に対する感受性が良好であること、重篤な感染症の原因菌となる頻度が低いこ

となどから臨床上あまり重要視されてこなかった。しかし、CTX-M2型 ESBL 産生 *P. mirabilis* による院内感染も報告¹⁰⁾されており、今後院内感染起因菌としても注目すべき菌種と考えられる。

CTX-M 遺伝子はアミノ酸配列の相同性から CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M8 グループ、CTX-M25 グループ、そして CTX-M9 グループに分類される³⁾。これらのうち、CTX-M8 グループには 1 種類、CTX-M25 グループには 2 種類の型しか属さない。このため、我々は CTX-M1、M2、M9 グループと特異的に反応するプライマーを設計して、2010 年 9 月 13 日から 2011 年 8 月 1 日に同定した CTX-M 遺伝子陽性株 181 株について CTX-M 遺伝子を型別した。その結果、*P. mirabilis* は 46 株中 45 株が CTX-M2 グループ遺伝子を保有していた。Shibata らの報告⁸⁾においても、供試した *P. mirabilis* 71 株全てが CTX-M2 グループ遺伝子を保有することが示されている。一方、大腸菌には CTX-M1 グループ、CTX-M2 グループ、CTX-M9 グループに加えて、今回供試したプライマーのいずれとも反応しない株 (UT) がみられた。これらのうち、UT となった株の遺伝子は CTX-M8 グループか CTX-M25 グループに属する可能性があり、その同定は今後の課題である。また、CTX-M2/9 となった遺伝子についても、遺伝子型を特定するために全長をシーケンスする必要がある。

一方、CTX-M1 グループに型別された 36 株のうち 35 株が CTX-M15、1 株が CTX-M61 であることが判明した。CTX-M15 は CTX-M3 がポイントミューテーション (D240G 変異) により基質特異性が拡張し、CAZ 加水分解能を獲得した CTX-M 型 ESBL であり¹¹⁾¹²⁾、近年、ヨーロッパにおいて問題となっている¹³⁾。国内においても少数の報告¹⁴⁾¹⁵⁾があるが、現時点では問題視されるには至っていない。今回我々の検討により、CTX-M15 型 ESBL 産生菌が秋田県に既に侵淫していることが示された。この菌は臨床に汎用されている CAZ に耐性を示すことから、通常の CTX-M 型 ESBL 産生菌よりも臨床上問題となる。確認された CTX-M15 型 ESBL 産生菌は全て大腸菌であり、県央の医療機関において最も多く分離されて

いるが、県北、県南、本荘由利地区の医療機関においても分離されていることから、県内に広く侵淫していることが明らかとなった。CTX-M15 遺伝子保有株の CAZ 耐性は株により異なる傾向がみられた。その原因は明らかではないが、CTX-M15 遺伝子保有株は *ISEcp1B* 遺伝子を保有し、これがプロモーターとして機能し、CTX-M15 遺伝子の発現に関与している¹⁶⁾ことから、この調整機構がその耐性発現の違いに関与する可能性も考えられ、今後の検討が必要である。一方、CTX-M61 は CAZ 耐性に関与する D240G 変異を保有しない。

秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫していることが明らかとなった。CTX-M 型 ESBL 産生菌は主として尿路感染を惹起していたことから、今後も院内感染起因菌として注目する必要がある。とりわけ、CTX だけではなく CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 型 ESBL 遺伝子保有株が県内に侵淫していることを周知し、より適切な院内感染防止策の必要性を提起する必要がある。また、CTX-M15 を含む CTX-M 型 ESBL 遺伝子保有株が健康人に侵淫しているかどうか、そして市販食品に分布しているかどうかなど、感染症学解明のためのさらなる検討が必要である。

E. 参考文献

- 1) Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al: Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **11**, 1983, 315-317.
- 2) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **39**, **1995**, 2269-2275.
- 3) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum beta-lactamase. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 2004, 1-14.
- 4) Canton R, Coque TM: The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, **9**, 2006, 466-475.
- 5) Pagani L, Dell'Amico E, Roberta Migliavacca R, et al: Multiple CTX-M-Type

Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. J. Clin. Microbiol., **41**, 2003, 4264-4269.

6)今野貴之, 八柳 潤, 齊藤志保子, 小沼 譲他 : 秋田県において初めて確認された SHV-12 型 ESBL 産生大腸菌について, 病原微生物検出情報, **31**, 2010, 2010.

7)Pena C, Pujol M, Ricart A, et al : Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. J. Hosp. Infect., **35**, 1997, 9-16.

8)Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al : PCR classification of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. Antimicrob. Agents Chemother., **50**, 2006, 791-795.

9) Rozalski A, Sidorczyk Z, Kotelko K : Potential virulence factors of *Proteus* bacilli . Microbiol Mol Biol Rev, **61**, 1997, 65-89.

10)Nagano N, Shibata N, Saitou Y, et al : Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended spectrum CTX-M-2 type beta-lactamase. J Clin Microbiol., **41**, 2003, 5530-55366.

11) Karim A, Poirel L, Nagarajan S et al : Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. FEMS Microbiology Letters, **201**, 2001, 237-41.

12)Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P : Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally

related β -lactamase CTX-M-3. J. Antimicrob. Chemother. **50**, 2002, 1031-1034

13)Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al : Evolution of CTX-M-type β -lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. Int. J. Antimicrob. Agents, **25**, 2005, 157-162.

14) 大隈雅紀、村谷哲郎、松本哲朗 他 : UOE-1 (CTX-M-15) type β -lactamase 産生 *Escherichia coli* による敗血症患者の臨床経過と細菌学的検討 . 日本化学療法学会雑誌, **52**, 2004, 223-227.

15)村谷哲郎、小林とも子、後藤令子 他 : 基質特異性拡張型 β -lactamase 産生 *Escherichia coli* に対する各種抗菌薬の抗菌力. 日本化学療法学会雑誌, **52**, 2004, 556-567.

16)Poirel L, Decousser JW, Nordman P : Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} β -lactamase gene. Antimicrob. Agents Chemother. **47**, 2003, 2938-2945.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし