

平成29年度病院医学教育研究助成成果報告書

報告年月日	平成30年 4 月 5 日
研究・研修課題名	基質特異性拡張型ベータラクタマーゼ (ESBL) とカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE)
研究・研修組織名 (所属)	検査部
研究・研修責任者名 (所属)	馬庭恭平 (検査部)
共同研究・研修実施者名 (所属)	森山英彦、石飛慎、竹内志津枝 (検査部)

目的及び方法、成果の内容

① 目 的

基質特異性拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生菌は耐性菌の一つであり、近年世界的に急増している。院内だけではなく市中においても感染拡大が危惧され、治療可能な抗菌薬選択が狭まることなどから、治療面や感染対策の面から問題となっている。ESBL 産生菌の中でも特に多いものは大腸菌とされ当院の ESBL 産生菌では 98.6% (2016 年) が大腸菌となっている。また院内感染対策サーベイランス (JANIS) の報告において ESBL を含むような第三世代セファロスポリン耐性大腸菌の島根県の分離率は他県の平均よりも高い数字となっている。さらに、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) も世界的に大問題となっており、その中でも KPC 型や IMP 型といったカルバペネマーゼを産生する耐性菌はプラスミドを介して伝搬することが知られ、他菌種へのさらなる拡散を防ぐ為にも早期に発見することが重要であるとされている。今回、便検体を対象に ESBL 産生菌、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の保菌状況調査を行うこととした。また ESBL 産生大腸菌についての遺伝子型、分子疫学解析の調査を行い当院における検出菌タイプを調べた。

② 方 法

検討対象は検査部に出された便検体の残余 197 検体を用いて行った。検討内容は (1) ESBL 産生菌の保有頻度について、(2) CPE の保有頻度について、(3) ESBL 大腸菌について遺伝子型、分子疫学解析について行う。方法は以下に示す。

(1) ESBL 産生菌の保有頻度について

- ① 便残余検体を ESBL スクリーニング培地 (クロモアガー-mSuperCARBA/ESBL 分画培地) に塗抹し培養を行い、18~24 時間後観察を行う。
- ② スクリーニング培地に発育した菌について菌名の同定と感受性検査を行う。
- ③ ESBL の確認試験を実施し、ESBL の確認を行う。

(2) CPE の保有頻度について

- ① 便残余検体を CPE スクリーニング培地 (クロモアガー-mSuperCARBA/ESBL 分画培地) に塗抹し培養を行い、18~24 時間後観察を行う。
- ② スクリーニング培地に発育した菌について菌名の同定と感受性検査を行う。
- ③ CPE が疑われる菌について PCR で CPE の遺伝子型 (IMP-1 型、VIM 型、KPC 型、NDM 型、OXA-48 型) を確認する。

(3) ESBL 大腸菌の遺伝子型、分子疫学解析について

- ① ESBL 産生菌と判定された大腸菌について PCR で遺伝子型 (TEM 型、SHV 型、CTX-M-1 group、CTX-M-2 group、CTX-M-8 group、CTX-M-9 group) の確認を行う。
- ② 同様に PCR-based ORF Typing (POT) 法を用いて分子疫学解析を行う。

③成 果

1.結果

(1) ESBL 産生菌の保有頻度について

ESBL スクリーニング検査で発育を認めたものは 197 検体中 56 検体であった。そのうち ESBL 産生菌であったものは 26 検体 (13.2%) でありすべて大腸菌であった。

(2) CPE の保有頻度について

CPE スクリーニング検査で発育を認めたものは 197 検体中 21 検体であった。菌種の内訳は表 1 に示す。CPE 培地に発育したものは *Pseudomonas aeruginosa* が 5 件と一番多く、*Enterobacter cloacae complex*、*Enterobacter aerogenes*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、*Stenotrophomonas maltophilia* の順で多い結果であった。発育が認められた検体の中で腸内細菌科細菌である 13 検体に関して PCR を用いて CPE 遺伝子型の解析を行ったところ、全て陰性の結果であった。

菌名	件数
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	1
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
* 2 菌種発育したものも含む	

(3) ESBL 大腸菌について遺伝子型、分子疫学解析について

今回発育した ESBL 大腸菌 26 検体の遺伝子型についての結果を表 2、分子疫学解析 (POT 法) の POT 番号についての結果を表 3 に示す。

ESBL 大腸菌 26 検体の遺伝子型は CTX-M9 group が一番多く 22 件、CTX-M9 group と TEM 型は 2 件、CTX-M1 group、CTX-M1 group と TEM 型は 1 件ずつであった。ESBL 大腸菌の分子疫学解析では 18 タイプに分類され、49-58-83 と 20-56-211 が一番多く認められる結果であった。

遺伝子型	件数
CTX-M 9 group	22
CTX-M 9 group+ TEM	2
CTX-M 1 group+ TEM	1
CTX-M 1 group	1

POT番号	件数
49-58-83	4
49-58-19	1
49-56-83	1
49-6-63	1
49-46-35	1
49-26-83	1
20-56-211	4
20-48-211	1
20-8-163	1
20-1-6	1
17-0-3	2
17-32-3	2
17-49-88	1
16-144-3	1
18-0-21	1
53-58-215	1
53-58-83	1
28-32-3	1

2.まとめ

今回調査した中でESBL産生菌は13.2%であった。2014年の川らの報告でも11.9%となっており今回当院でも同程度の検出状況となっているため、約10%の人の腸管にESBLがいるものだということが示唆された。便からのCPEの検出については今回の調査では認められなかったが、今回の調査を通して微生物検査室として遺伝子検査を行える体制が整ったことは大きな成果であったと考えられる。島根県保健環境科学研究所によると2016年9月から2017年4月に島根県東部の3医療機関で患者及び保菌者から分離されたCRE30株を解析した結果CPEは検出されなかったとしている。しかし、中国地方では山口や岡山、広島でIMP-1やIMP-6、鳥取県でもOXA-48といったカルバペネマーゼ産生菌の検出があるため今後も見落とさないように注意していくことが重要であると考えられる。

ESBLの遺伝子型には地域性が認められており、2001-2003年の近畿地方においてCTX-M-2、CTX-M-9型の順で多いと報告があるが、中国地方での報告はCTX-M-9型が多いと報告されており今回の調査でも同様の結果となった。また今回POT法を用いた分子疫学解析を行った。大腸菌のPOT法はマルチプレックスPCRを用い、大腸菌の保有する複数の特定遺伝子領域を増幅し、アガロースゲル電気泳動法によって分離されたバンドパターンを数値化することで、クローン同定および菌株識別を遺伝学的に決定することができる。今回の調査では18パターンに分類された。この中でもPOT1番号が49を示すものは世界的に増加しているとされる大腸菌のST131クローンとされる。今回は34.6% (9/26) でST131が疑われた。ST131クローンはフルオロキノロン系薬に耐性化が進んでいることも知られ、9検体中8検体がフルオロキノロン系薬に耐性となった。フルオロキノロン系薬に感性であった1検体は8検体と異なりESBLの遺伝子型がCTX-M9 groupとTEMを両方持ったものであったため、遺伝子型と菌株識別情報(POT番号)、薬剤の感受性については何らかの関係が示唆され、今後の課題となった。

この研究を行うことで、出雲圏で多いESBL産生菌の特徴や、CPEの出雲圏での保菌状況などを把握することができたと考えられる。ESBL産生菌の特徴や、CPEの状況を知っておくことは今後の拡大を未然に防ぐことや、的確な感染防止対策を講じることにつながると考える。また微生物検査室として遺伝子検査を用いた検査手順を構築できたことで迅速な検査結果を提供できると考える。

参考文献

- 1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業 <https://janis.mhlw.go.jp/index.asp>
- 2) 川耕平, 長川隼也, 園田美代子ら: 糞便中における ESBL と MBL 産生腸内細菌科菌の検出状況. 日本臨床微生物学会誌 24(1): 9-16.2014.