

[原 著]

糞便中における ESBL と MBL 産生腸内細菌科菌の検出状況

吉川耕平¹⁾・長川隼也¹⁾・園田美代子²⁾・嶋谷泰明¹⁾・竹田真未¹⁾・木下幸保¹⁾

¹⁾ 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター臨床検査科

²⁾ 独立行政法人国立病院機構京都医療センター臨床検査科

(平成 25 年 10 月 7 日受付, 平成 26 年 1 月 29 日受理)

我々は基質拡張型 β-ラクタマーゼ (extended spectrum β-lactamase : ESBL) 産生菌, メタロ-β-ラクタマーゼ (metallo-β-lactamase : MBL) 産生菌の腸管内保菌状況を把握するため, 大阪医療センターで提出された糞便 310 検体を対象に ESBL と MBL 産生腸内細菌科菌の検出を行った。選択分離培地として ESBL スクリーニング培地である CHROMagar ESBL 培地 (関東化学), カルバペネム耐性菌スクリーニング培地である CHROMagar KPC 培地 (関東化学) を用いた。培地に発育した菌株について, ESBL の確認試験には clavulanic acid/amoxicillin ディスク, MBL の確認試験には SMA ディスクを用いた double disk synergy test を行った。その結果, ESBL 産生菌が 37 検体 (11.9%) 45 株, MBL 産生菌が 11 検体 (3.5%) 14 株検出された。MBL 産生菌 14 株は全て ESBL の確認試験も陽性となった。ESBL 産生菌 45 株の内訳は *Escherichia coli* 20 株, *Klebsiella pneumoniae* 12 株, *Enterobacter cloacae* 6 株, *Klebsiella oxytoca* 3 株, *Enterobacter aerogenes* 1 株, *Citrobacter freundii* 1 株, *Proteus mirabilis* 1 株, *Morganella morganii* 1 株であった。MBL 産生菌 14 株の内訳は *K. pneumoniae* 7 株, *E. cloacae* 3 株, *K. oxytoca* 2 株, *E. aerogenes* 1 株, *E. coli* 1 株であった。確認試験が陽性となった菌株に対し PCR 法で β-ラクタマーゼ遺伝子を確定した。遺伝子型は ESBL 産生菌において CTX-M-2 型が 11 株と最も多かった。一方, MBL 産生菌は 14 株全て IMP-1 型であった。ESBL, MBL 産生菌が検出された患者背景は, 高齢者で比較的長期の入院患者からの検出が多かった。基礎疾患については ESBL 産生菌では共通したファクターは見つからなかったが, MBL 産生菌では悪性腫瘍を有した患者からの検出が優位であった。

Key words: ESBL, MBL, RAPD-PCR, active surveillance

序 文

近年, 抗菌薬の開発, 進歩に伴い各種の薬剤耐性菌が検出されるようになった。細菌の耐性機構には薬剤作用点の変異, 薬剤透過性の低下, 薬剤能動排出ポンプの亢進, 薬剤不活化酵素の産生などがある¹⁾。その内, 特に問題となっているのは, 薬剤不活化酵素であ

る基質拡張型 β-ラクタマーゼ (extended spectrum β-lactamase : ESBL), メタロ-β-ラクタマーゼ (metallo-β-lactamase : MBL) などの β-ラクタマーゼがあげられる。これらの β-ラクタマーゼはプラスミドにより菌種を超えて他の菌に伝播するため, 院内感染対策上, 非常に重要である²⁾。現在, 薬剤耐性菌による感染は院内だけでなく市中でも問題となっている³⁾。

最近では ESBL 産生菌の市中保菌者増加の報告も多い⁴⁾。ESBL 産生菌はペニシリン系, セファロsporin系, モノバクタム系を加水分解する β-ラクタマーゼを産生する⁵⁾。その増加の背景は, 解明には至っていないが, 石井らは食物を介して健康人の腸管内に保菌されているとの可能性を示唆している⁶⁾。市中保菌者の存在により, 医療機関へ ESBL 産生菌が持ち込ま

著者連絡先: (〒540-0006) 大阪府大阪市中央区法円坂 2-1-14

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター
吉川耕平

TEL: 06-6946-3555 (内線 3535)

FAX: 06-6946-3598

E-mail: k.yoshi@onh.go.jp

れ、院内で伝播しESBL産生菌の増加に繋がる恐れがある。

一方、MBL産生菌は、カルバペネム系薬を含むβ-ラクタム薬を加水分解する強力なβ-ラクタマーゼを産生する⁷⁾。MBL産生菌には感染症治療の切り札的存在であるカルバペネム系薬を使用できない点で、治療上重大な問題となることが考えられる。MBL産生菌は主に *Pseudomonas aeruginosa* などの日和見細菌に多く認められている⁸⁾。

Escherichia coli や *Klebsiella pneumoniae* などの腸内細菌科菌は *P. aeruginosa* と比較し病原性が高く、市中での免疫能が保たれた患者の感染症の起因菌としてしばしば分離される。また、肺炎や敗血症などに進展し死に至る可能性もあるため、腸内細菌科の薬剤耐性菌による感染は治療に大きく影響を及ぼすと考えられる。これまでにESBL産生菌の腸管内保菌調査に関する報告はあるが⁹⁾、MBL産生菌の腸管内保菌調査に関する報告は見当たらない。そこで、我々はESBL産生菌のみならず、MBL産生菌も含め腸管内保菌状況を把握する目的で検討を行った。

材料と方法

1. 材料

大阪医療センターにおいて2011年12月1日から2012年2月29日に起因菌検索目的で提出された糞便286検体(入院128検体, 外来158検体)、および検便目的で提出された糞便24検体(栄養管理室職員24検体)の計310検体(同一患者の重複は省く)を対象とした。

2. 培養方法と同定

糞便をCHROMagar ESBL培地(ESBL培地: 関東化学)、CHROMagar KPC培地(KPC培地: 関東化学)に塗布し、37°Cで24時間および48時間培養した。ESBL培地、KPC培地に発育したコロニーをトリプチケースソイ寒天培地(日本BD)で純培養し、BDフェニックス(日本BD)にてBDフェニックスグラムネガティブNMIC/ID-33パネルを用い菌種の同定試験を行った。なお、ESBL培地、KPC培地の両方の培地に発育し、同様の色調、形状を示したものはTSI寒天培地、LIM寒天培地、シモンズのクエン酸培地にて確認後、性状の一致したものは同一菌として扱いKPC培地に発育した菌株を用いた。

3. ESBL, MBL産生確認試験

ESBL培地、KPC培地に発育し腸内細菌科と同定された菌についてESBL, MBL産生確認試験を行った。ESBLはclavulanic acid/amoxicillin (CVA/

AMPC)ディスク(日本BD)を、MBLはメタロ-β-ラクタマーゼSMA '栄研'(栄研)を用いたdouble disk synergy test (DDST)でそれぞれ確認試験を行った。ESBLのDDSTはMcFarland 0.5に調整した菌液をミューラーヒントン寒天培地(日本BD)に塗布し、培地の中央にCVA/AMPCディスクを置き、各25mmの間隔でceftazidime (CAZ), cefpodoxime, cefotaxime, cefepime (CFPM), ceftazidime (CPR), aztreonamの各ディスクを配置した。37°C, 18時間培養後、CVA/AMPCディスクといずれかのディスクに阻止帯が認められた場合にESBL産生菌と判定した。

MBLについてもMcFarland 0.5に調整した菌液をミューラーヒントン寒天培地に塗布し、培地の中央にSMAディスクを置き、各25mmの間隔でCAZ, CFPM, sulbactam/cefoperazone, imipenem, meropenem, CPRの各ディスクを配置した。37°C, 18時間培養後、SMAディスクといずれかのディスクに阻止帯が認められた場合にMBL産生菌と判定した。KPC培地に発育を認めず、ESBL培地にのみ発育した菌株についても全株MBLの確認試験を行った。

4. PCR法によるβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出

確認試験でESBL, MBL産生菌と判定された菌株についてPCR法でβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出を行った。ESBL, MBLの遺伝子型はShibataらの方法に準じて行い⁹⁾¹⁰⁾、ESBLはCTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, TEM, SHV型を、MBLはIMP-1, IMP-2, VIM-2型について検出を行った。DNAの抽出にはQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用い、方法は添付文書に従った。PCR試薬はTaKaRa Taq (タカラバイオ株式会社)を使用した。反応条件は94°C 60秒, 55°C 60秒, 72°C 90秒を計30 cycleでVeritiサーマルサイクラー (Applied Biosystems)を用いて増幅し、その増幅産物を2%アガロースゲルにて電気泳動し確認した。

5. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCRによるDNA解析

ESBL, MBL産生菌において入院患者から検出された菌株に対しRAPD-PCRを行った。RAPD-PCRはVilaらの方法に準じて行った¹¹⁾。

6. ESBL, MBL産生菌検出患者背景

ESBL, MBL産生菌が検出された入院患者背景(年齢, 入院期間, 基礎疾患, 使用抗菌薬)について、カルテで調査した。

表 1. ESBL 産生菌 45 株の菌種別遺伝子型株数

菌種	株数	遺伝子型別株数										
		CTX-M-1	CTX-M-1 TEM	CTX-M-2	CTX-M-2 TEM	CTX-M-2 SHV	CTX-M-9	CTX-M-9 TEM	CTX-M-9 SHV	CTX-M-9 TEM SHV	TEM	SHV
<i>E. coli</i>	20	2	3 (2)*	2	1		7 (6)*					
<i>K. pneumoniae</i>	12					5			4 (1)*	1		2
<i>K. oxytoca</i>	3	1		2								
<i>P. mirabilis</i>	1			1								
<i>C. freundii</i>	1			1								
<i>E. cloacae</i>	6		1	4								1
<i>E. aerogenes</i>	1							1				
<i>M. morgani</i>	1			1								
計 (%)	45	3 (6.6)	4 (8.9)	11 (24.4)	1 (2.2)	5 (10.0)	7 (15.6)	6 (13.3)	4 (8.9)	1 (2.2)	1 (2.2)	2 (4.4)

* () は外来の検出株数

表 2. MBL 産生菌 14 株の菌種別遺伝子型株数

菌種	株数	遺伝子型別株数					
		IMP-1 CTX-M-2	IMP-1 CTX-M-2 TEM	IMP-1 CTX-M-2 SHV	IMP-1 CTX-M-9 TEM	IMP-1 TEM	IMP-1 SHV
<i>E. coli</i>	1					1	
<i>K. pneumoniae</i>	7	2			5		
<i>K. oxytoca</i>	2			2			
<i>E. cloacae</i>	3		1	2			
<i>E. aerogenes</i>	1						1
計 (%)	14	2 (14.3)	1 (7.1)	4 (28.6)	5 (35.7)	1 (7.1)	1 (7.1)

結 果

1. 検出状況

ESBL 産生菌の検出率は 11.9% (37/310 検体)であった。その内の 7 検体で複数株の検出があり検出株数は 45 株であった。入院、外来、栄養管理室職員別の検出率は、入院患者 21.1% (27/128 検体)、外来患者 5.1% (8/158 検体)、栄養管理室職員 8.3% (2/22 検体)であった。

ESBL 産生菌 45 株の内訳は、*E. coli* 20 株、*K. pneumoniae* 12 株、*Enterobacter cloacae* 6 株、*Klebsiella oxytoca* 3 株、*Enterobacter aerogenes* 1 株、*Citrobacter freundii* 1 株、*Proteus mirabilis* 1 株、*Morganella morgani* 1 株であった。

MBL 産生菌の検出率は 3.5% (11/310 検体)であった。その内の 3 検体で複数株の検出があり検出株数は 14 株であった。外来患者、栄養管理室職員からの検出はなく、全て入院患者からの検出であった。入院患

者の検出率は 8.6% (11/128 検体)であった。

MBL 産生菌 14 株の内訳は *K. pneumoniae* 7 株、*E. cloacae* 3 株、*K. oxytoca* 2 株、*E. aerogenes* 1 株、*E. coli* 1 株であった。MBL 産生菌 14 株は全て ESBL の確認試験も陽性であった。

2. β-ラクタマーゼ遺伝子型

ESBL 産生菌 45 株の菌種別遺伝子型株数を表 1 に示した。ESBL 産生菌において最も優位に検出された遺伝子型は、CTX-M-2 型で 11 株、次いで CTX-M-9 型が 7 株、CTX-M-9+TEM 型が 6 株であった。入院患者では CTX-M-2 型が 11 株で最も多く、CTX-M-2 型の 11 株全てが入院患者からの検出であった。外来患者では CTX-M-9 型が 6 株と最も多かった。

MBL 産生菌 14 株の菌種別遺伝子型株数を表 2 に示した。MBL 産生菌の遺伝子型は全て IMP-1 型であった。ESBL、MBL の同時産生株では CTX-M-2+SHV 型が 5 株で全て *K. pneumoniae* であった。次いで多

表 3. ESBL, MBL 産生菌検出患者背景 (入院患者)

検体 No.	病棟	性別	年齢	基礎疾患	入院日数	使用抗菌薬	菌株 No.	菌種	β-ラクタマーゼ型
1	A	男	51	大動脈瘤	115	DRPM, LVFX, MEPM, TEIC	1	<i>E. coli</i>	CTX-M-9, TEM
2	A	男	77	皮膚潰瘍	146	CEZ, CFDN, MEPM, VCM	2	<i>E. coli</i>	CTX-M-9, TEM
3	B	男	3	外傷	39	CEZ	3	<i>E. coli</i>	CTX-M-1, TEM
4	B	男	36	外傷	103	CEZ, CMZ, MEPM, VCM	4a	<i>E. coli</i>	CTX-M-2
							4b	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2, SHV, IMP-1
5	C	男	38	肺炎	17	CPFEX, FLCZ, ST	5	<i>E. coli</i>	CTX-M-1
6	C	男	50	肺炎	70	FLCZ, ST	6	<i>E. coli</i>	CTX-M-9
7	D	男	78	心不全	30	CFDN, CTRX	7	<i>E. coli</i>	CTX-M-2
8	E	男	60	悪性腫瘍	79	AMK, CMZ, MEPM, VCM	8a	<i>E. coli</i>	CTX-M-9, TEM
							8b	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2, SHV, IMP-1
							8c	<i>M. morgani</i>	CTX-M-2
9	F	女	73	脳血管疾患	64	CEZ, CFDN, TAZ/PIPC, VCM	9	<i>E. coli</i>	CTX-M-1
10	G	男	87	血液疾患	140	AMK, CFPM, MEPM, MINO	10	<i>E. coli</i>	CTX-M-9, TEM
11	H	男	74	悪性腫瘍	455	AMK, DRPM, MINO, VCM	11a	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-9, TEM, SHV
							11b	<i>E. aerogenes</i>	CTX-M-9, TEM, IMP-1
12	H	男	76	悪性腫瘍	23	DRPM, LVFX, LZD, VCM	12	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-9, SHV
13	I	男	81	術後	325	CLDM, CPFEX, SBT/ABPC, VCM	13a	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-9, SHV
							13b	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-2
14	J	男	73	悪性腫瘍	140	AMK, AZM, CPFEX, MEPM	14	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-9, SHV
15	E	男	75	胃潰瘍	48	CTRX, EM, SBT/ABPC, VCM	15	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-2
16	J	男	81	術後	21	CTM, LVFX	16	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-1, TEM
17	F	男	68	脳梗塞	76	CPFEX, CTM, TAZ/PIPC, VCM	17	<i>K. oxytoca</i>	CTX-M-1
18	G	男	77	血液疾患	75	CMZ, CTRX, FLCZ, MNZ	18	<i>C. freundii</i>	CTX-M-2
19	G	男	65	意識障害	74	—	19	<i>P. mirabilis</i>	CTX-M-2
20	B	男	78	熱傷	210	CAZ, LZD, MEPM, SBT/ABPC	20	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2, SHV, IMP-1
21	B	女	19	肺炎	77	CLDM, LZD, MEPM, VCM	21	<i>K. pneumoniae</i>	SHV, IMP-1
22	B	女	74	外傷	188	CEZ, SBT/ABPC, VCM	22	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2, SHV, IMP-1
23	E	男	67	悪性腫瘍	37	FMOX, MNZ	23a	<i>K. pneumoniae</i>	SHV, IMP-1
							23b	<i>E. cloacae</i>	TEM, IMP-1
24	K	男	75	悪性腫瘍	61	CFPM	24	<i>K. pneumoniae</i>	CTX-M-2, SHV, IMP-1
25	E	男	63	悪性腫瘍	69	FMOX	25a	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-2, IMP-1
							25b	<i>K. oxytoca</i>	CTX-M-2, IMP-1
26	I	男	64	悪性腫瘍	44	CMZ	26	<i>E. cloacae</i>	CTX-M-2, IMP-1
27	G	男	79	血液疾患	43	CEZ, CTRX	27a	<i>K. oxytoca</i>	CTX-M-2, IMP-1
							27b	<i>E. coli</i>	CTX-M-2, TEM, IMP-1

AMK : amikacin, AZM : azithromycin, CAZ : ceftazidime, CEZ : cefazolin, CFDN : cefdinir, CFPM : cefepime, CLDM : clindamycin, CMZ : cefmetazole, CPFEX : ciprofloxacin, CTM : cefotiam, CTRX : ceftriaxone, DRPM : doripenem, EM : erythromycin, FLCZ : fluconazole, FMOX : flomoxef, LVFX : levofloxacin, LZD : linezolid, MEPM : meropenem, MINO : minocycline, MNZ : metronidazole, SBT/ABPC : sulbactam/ampicillin, ST : sulfamethoxazole-trimethoprim, TAZ/PIPC : tazobactam/piperacillin, TEIC : teicoplanin, VCM : vancomycin

かった CTX-M-2 型の 4 株は *E. cloacae* 2 株, *K. oxytoca* 2 株であった。

3. ESBL, MBL 産生菌検出患者背景

ESBL, MBL 産生菌が検出された入院患者の背景

(年齢, 入院期間, 基礎疾患, 使用抗菌薬) を表 3 に示した。使用抗菌薬は菌検出より以前に使用されていたものを記載した。

ESBL 検出患者の平均年齢は 65.0 歳であった。60

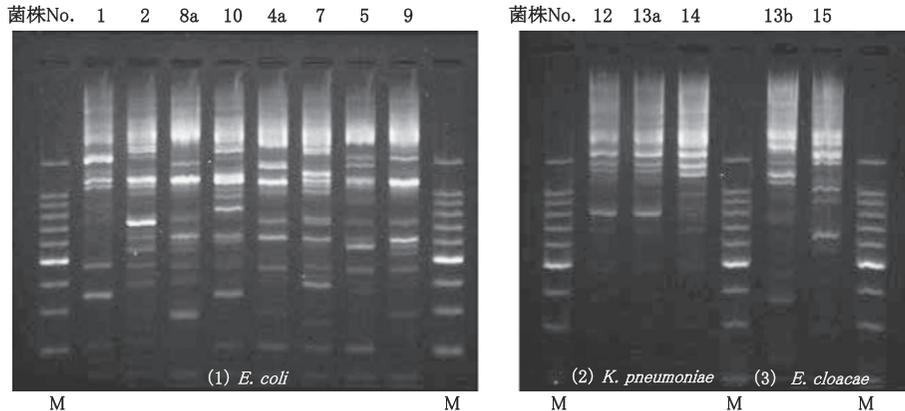


図1. ESBL産生菌における(1) *E. coli*, (2) *K. pneumoniae*, (3) *E. cloacae*のRAPD-PCR解析
Lane: M, 100 bp ladder molecular weight marker. 菌株No.は表3に示す。

歳以上の高齢者からの検出は21例で77.8%であった。平均入院期間は102.6日、基礎疾患は、悪性腫瘍、術後、血液疾患、肺炎、および脳血管疾患が各2例、意識障害、大動脈瘤、胃潰瘍、外傷、心不全、および皮膚疾患が各1例であった。第3、第4世代のファロスポリン系薬の使用例は33.3% (9/27検体)であった。抗菌薬の使用歴がない患者からの検出は1例であった。

MBL検出患者の平均年齢は62.6歳であった。60歳以上の患者からの検出は9例で81.8%であった。平均入院期間は124.0日であった。基礎疾患は、悪性腫瘍が6例、外傷2例、肺炎、熱傷、および血液疾患が各1例で、悪性腫瘍において優位に検出された。カルバペネム系薬の使用は45.5% (5/11検体)と約半数で認められた。

4. RAPD-PCRによるDNA解析

菌種と遺伝子型の一致した株についてRAPD-PCRを行いDNA解析を行った。ESBL産生菌では、すべての *E. coli* がDNAパターンが異なったが、*K. pneumoniae* 2株 (菌株No.12, 13a)のDNAパターンが類似し、*E. cloacae* はDNAパターンが異なった (図1)。MBL産生菌では、*K. pneumoniae* 3株 (菌株No.4b, 8b, 20), *K. oxytoca* 2株 (菌株No.25b, 27a), および *E. cloacae* (菌株No.25a, 26)のDNAパターンが類似した (図2)。

考 察

E. coli や *K. pneumoniae* などの腸内細菌科に属する菌は、ヒトの腸管に常在する代表的な菌種であり、糞便から検出された場合、常在菌として扱われること

が多く、感受性試験まで行われずのが現状である。ESBL, MBLなどのβ-ラクタマーゼは伝達性のプラスミド上に存在しているため、腸内細菌科を含む他のグラム陰性桿菌に比較的容易に伝播し、院内感染対策上問題となる。近年、ESBL, MBL産生菌の分離率は世界的にも増加しており⁸⁾、ESBLとMBL産生腸内細菌科菌の腸管内保菌状況を把握する目的で検討を行った。

今回の検討では、ESBL産生腸内細菌科菌の保菌率は11.9% (37/310検体)であった。中村らの報告⁹⁾の保菌率は9.3%であり、海外でも10%前後の保菌率であることから¹²⁾¹³⁾、約10%の割合でESBL産生菌が腸管内に存在していることが示唆された。ESBLの遺伝子型はCTX-M-2, CTX-M-9型の順で多く検出され、CTX-M型が多いとされる日本における報告例¹⁴⁾と同様の結果であった。また、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型の順で多かったShibataらの報告⁹⁾と同様の結果であった。

本来であればTEM, SHV型についてシーケンス解析が必要であるが大阪医療センターでは、設備上、実施不可能である。したがってTEM, SHV型についてはシーケンス解析を行っていないためESBLであるかは不確定である。特に、*K. pneumoniae* (12株)全てにSHV型が認められ *K. pneumoniae* の染色体上に存在するLEN-1遺伝子とSHV-1遺伝子との交差反応が示唆される結果であった¹⁵⁾。しかしながら、MBL産生株が全てESBL確認試験も陽性であったことから、*K. pneumoniae* 2株 (No.21と23)から検出されたSHV型β-ラクタマーゼと *E. cloacae* (No.23b)か

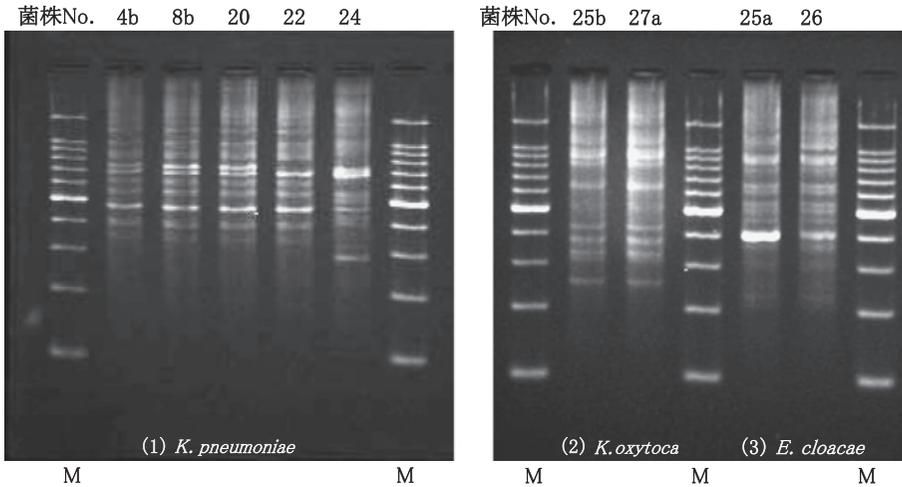


図2. MBL産生菌における(1) *K. pneumoniae*, (2) *K. oxytoca*, (3) *E. cloacae*のRAPD-PCR解析
Lane: M, 100 bp ladder molecular weight marker. 菌株Noは表3に示す。

ら検出されたTEM型 β -ラクタマーゼはESBL酵素である可能性が示唆された。

一方、MBL産生腸内細菌科菌の腸管内保菌率は3.5% (11/310検体)であった。MBLは、*P. aeruginosa*や*Acinetobacter* spp.から検出されることが多く、国内での腸内細菌科菌からの検出率はきわめて低いとされている⁸⁾。また、MBLとESBL同時産生株についても報告が少ない。我が国におけるMBL産生腸内細菌科菌の分離頻度が少ない現状を考えると、今回の検討におけるMBL産生腸内細菌科菌の保菌率は高いと考えられる。また、MBLの遺伝子型は全てIMP-1型であり国内の検出状況⁷⁾と一致する結果であった。

ESBL産生菌が外来患者や栄養管理室職員の糞便から検出されたことから、ESBL産生菌が市中にも拡散していることが考えられる。入院患者の検出率は外来患者の検出率の約4倍であり、院内での拡散による増加が示唆された。

MBL産生腸内細菌科菌が入院患者の糞便からのみ検出されたことから、MBL産生菌の市中での拡散は否定的であり、院内における拡散が示唆された。

ESBL、MBL産生菌ともに60歳以上の高齢者の糞便(検出率:ESBL産生菌77.8%, MBL産生菌81.8%)からの検出が多く、長期入院患者の便からの検出が多かった(平均入院期間:ESBL産生菌102.6日, MBL産生菌124.0日)。ESBL産生菌の検出患者において共通した基礎疾患は認められなかったが、MBL産生菌の検出患者では悪性腫瘍での検出が多く、Hirakataらの報告¹⁶⁾と同様の結果であった。ESBL

やMBLなどを産生する腸内細菌科菌を腸管内に保菌していても、下痢や腹痛などの症状を呈しないため、気がつかれないまま患者間でESBLやMBLの伝播が拡大している可能性がある。使用された抗菌薬については特に優れた薬剤は認められなかったが、抗菌薬の使用により腸管内常在菌が減少することで、耐性菌が選択的に増殖し、伝播しやすい環境にあると考えられる。大阪医療センターでMBL産生菌が伝播した原因については明らかになっていないが、その後のICTラウンドで放射線科透視室での伝播が疑われた。MBL産生菌の検出頻度の高い一部の診療科で、放射線科透視室でのドレーン交換において、手指衛生や防護具(手袋)の正しい装着が出来ていなかったなど、標準予防策の徹底が不十分であったことが分かった。その後は標準予防策の徹底を行い、感染管理に努めている。

院内伝播を把握する目的で入院患者を対象にRAPD-PCRを行った。ESBL産生菌では、*E. coli* 8株はDNAパターンが異なり、同一クローンが院内で伝播しているのではなく、プラスミドを介しての広がりや異なるクローンの持ち込みが考えられた。また、*K. pneumoniae* 2株(菌株No. 12と13a)が類似したDNAパターンを示したが、異なる病棟からの検出であった。一方、MBL産生菌では、*K. pneumoniae* 3株(菌株No. 4b, 8b, および20)、*K. oxytoca* 2株(菌株No. 25bと27a)、および*E. cloacae* 2株(菌株No. 25aと26)で、それぞれDNAパターンの類似した株が存在した。菌株No. 4bと20は同一病棟での検出であり、病棟内での伝播による可能性が示唆されたが、*K. oxy-*

toca 2株と *E. cloacae* 2株は異なる病棟からの検出であった。

MBL産生菌と確定された14株のうち2株 (*E. coli* および *K. pneumoniae*) が、今回の検討で使用したKPC培地で発育せずESBL培地で検出された。KPC培地における偽陰性株の存在は、今後改良が望まれる。

近年、新たな薬剤耐性菌が出現しており、その蔓延は深刻である。ニューデリー・メタロβラクタマーゼ-1 (New Delhi metallo-β-lactamase-1: NDM-1) 産生菌などの新しい薬剤耐性菌による世界規模での急速な拡散が懸念されており、国内での検出頻度は非常に低い、その多くはすでに国内へ流入していると考えられている⁸⁾。今後の分離頻度の上昇や、それに伴う感染症例の増加、院内感染が予想される。薬剤耐性菌の増加を抑えるためには、抗菌薬の適正使用や医療従事者の標準予防策、接触感染予防策の遵守、また医療関連器具の衛生管理を行うことが重要である。また、同時に耐性菌の早期検出が重要であり¹⁷⁾耐性菌を院内で広げないということが大切である。

大阪医療センターの入院患者におけるESBLとMBL産生腸内細菌科菌の検出率は、外来患者と比較し明らかに高い結果であった。今後、ESBL、MBLを対象菌としてアクティブサーベイランスを実践し、院内感染対策に努めていく必要があると考えられる。特にハイリスクグループであると考えられる高齢者で悪性腫瘍などの基礎疾患を有した長期入院患者をターゲットとしESBL、MBL産生腸内細菌科菌のアクティブサーベイランスを行うことは、院内感染対策上重要であると考えられる。

文 献

- 1) 花木秀明, 久保亮一. 2008. 検査や化学療法を混乱させる薬剤耐性菌の狡猾な耐性誘導機構. *The Chemical Times* 207: 11-16.
- 2) Kliebe, C., B.A. Nies, J.F. Meyer, et al. 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 302-307.
- 3) Pitout, J.D.D., P. Nordmann, K.B. Laupland, et al. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 52-59.
- 4) 中村竜也, 清水千裕, 乾佐知子, 他. 2009. 糞便中のESBL産生腸内細菌スクリーニングの有用性. *日臨徴誌* 19: 32-37.
- 5) Bush, K., G.A. Jacoby, A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39: 1211-1233.
- 6) 石井良和. 2010. 家畜および食肉から分離されるESBL産生菌. *The Chemical Times* 216: 9-12.
- 7) 三澤成毅, 小栗豊子, 中村文子, 他. 2007. 臨床材料からのメタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検出状況と薬剤感受性. *日本化学療法学会誌* 55: 211-219.
- 8) 矢野寿一, 平湯洋一, 賀来満夫. 2011. 海外における薬剤耐性グラム陰性桿菌の動向. *日本化学療法学会雑誌* 59: 8-16.
- 9) Shibata, N., H. Kurokawa, Y. Doi, et al. 2006. PCR classification of CTX-M-type β-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 791-795.
- 10) Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5407-5413.
- 11) Vila, J., M.A. Marcos, M.T. Jimenez de Anta. 1996. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J. Med. Microbiol.* 44: 482-489.
- 12) Kader, A.A., A. Kumar, K.A. Kamath. 2007. Fecal carriage of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and asymptomatic healthy individuals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 28: 1114-1116.
- 13) Valverde, A., T.M. Coque, M.P. Sánchez-Moreno, et al. 2004. Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 42: 4769-4775.
- 14) 金森政人, 遠藤英子. 2004. 院内感染起因腸内細菌に拡散・伝播するCTX-M型ESBL遺伝子. *杏林医学雑誌* 35: 205-214.
- 15) Arakawa, Y., M. Ohta, N. Kido, et al. 1986. Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded β-lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM β-lactamase gene mediated by R plasmid. *FEBS Lett.* 207: 69-74.
- 16) Hirakata, Y., K. Izumikawa, T. Yamaguchi, et al. 1998. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-

negative rods carrying the *bla*_{IMP}. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2006-2011.

- 17) 平潟洋一, 柳原克紀, 松田淳一, 他. 2008. 長崎大学医学部・歯学部附属病院検査部におけるメタロ-β-

ラクタマーゼの検出法と1991年から2005年の15年間におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の分離状況. *感染症学雑誌* 82: 285-291.

Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Metallo-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Stools

Kohei Yoshikawa¹⁾, Junya Osagawa¹⁾, Miyoko Sonoda²⁾, Yasuaki Shimatani¹⁾,
Mami Takeda¹⁾, Yukiyasu Kinoshita¹⁾

¹⁾Clinical Laboratory, National Hospital Organization Osaka Medical Center

²⁾Clinical Laboratory, National Hospital Organization Kyoto Medical Center

To grasp a situation of carriers with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and metallo-beta-lactamase (MBL)-producing organisms in the gastrointestinal tract, we conducted a survey on ESBL- and MBL-producing Enterobacteriaceae in 310 stool specimens collected in Osaka National Hospital. CHROMagar ESBL and CHROMagar KPC media were used as selective media for ESBL producers and MBL producers, respectively. Confirmatory tests were also performed on the isolates which grew on the selective media. As confirmatory tests, ESBL production and MBL production were determined by double disk synergy test with clavulanic acid/amoxicillin disk and sodium mercaptoacetic acid disk, respectively. ESBL-producing organisms were isolated from 37 samples (11.9%) including 45 strains; MBL-producing organisms from 11 samples (3.5%) including 14 strains. All of the 14 MBL-producers were also confirmed as positive ESBL. The 45 ESBL-positive strains included 20 strains of *Escherichia coli*, 12 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 6 strains of *Enterobacter cloacae*, 3 strains of *Klebsiella oxytoca*, each strain of *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, and *Morganella morganii*. The 14 MBL-positive strains included 7 strains of *K. pneumoniae*, 3 strains of *E. cloacae*, 2 strains of *K. oxytoca*, 1 strain of *E. aerogenes*, and 1 strain of *E. coli*. β-Lactamase genes were identified from the positive strains by PCR. 11 strains out of the 45 ESBL-producing strains contained CTX-M-2, while all of 14 MBL-producing strains contained IMP-1. Carriers with ESBL- and MBL-producing Enterobacteriaceae tended to be geriatric and inpatient with relatively long periods hospitalization. No underlying conditions were commonly found among the carriers with ESBL-producing organisms; however, some carriers with MBL-producing organisms tended to have malignancies.