

[原 著]

表現型試験から AmpC 産生が疑われた *Escherichia coli* における獲得性 ampC 遺伝子の保有状況と微生物学的特徴

新谷知世^{1) 2)}・櫻井亜樹^{3) 4)}・濱岸真奈美^{1) 2)}・松井建二郎^{1) 2)}

清亜樹子⁴⁾・鈴木匡弘⁴⁾・土井洋平^{3) 4)}

¹⁾ 藤田医科大学病院臨床検査部

²⁾ 藤田医科大学病院医療の質安全対策部感染対策室

³⁾ 藤田医科大学医学部感染症科

⁴⁾ 藤田医科大学医学部微生物学講座

(令和6年1月25日受付, 令和6年4月15日受理)

Escherichia coli における AmpC 型セファロスポリナーゼは、プラスミド等を介した獲得性 ampC 遺伝子、もしくは染色体性 ampC 遺伝子の発現亢進に由来する。本研究では、表現型試験から AmpC 産生が疑われた *E. coli* における獲得性 ampC 遺伝子の保有状況と微生物学的特徴を調べるため、1 医療機関で臨床検体から分離された *E. coli* 4,211 株のうち、薬剤感受性検査から AmpC 産生が疑われ、AmpC/ESBL 鑑別ディスクで AmpC 陽性と判定された 45 株を研究対象とし、酵素阻害試験、PCR 法による獲得性 ampC 遺伝子の検出、また一部の菌株に対し全ゲノム解析を実施した。その結果、45 株中 30 株 (67%) で獲得性 ampC 遺伝子を認め、遺伝子型は CIT 型が 21 株 (70%, 21/30)、DHA 型 9 株 (30%, 9/30) であった。CIT 型と DHA 型を比較したところ、後者では AES で ESBL と推定される傾向がみられた。獲得性 ampC 遺伝子非保有 15 株のうち 6 株 (40%) で染色体性 AmpC の産生亢進が疑われた。以上、表現型試験から AmpC 産生が疑われた *E. coli* において高率に獲得性 ampC 遺伝子が検出された。

Key words: AmpC, *Escherichia coli*, 獲得性 ampC 遺伝子

序 文

近年、第三世代セファロスポリン系抗菌薬への耐性を示す *Escherichia coli* が増加傾向にあり問題となっている¹⁾。*E. coli* でみられる広域セファロスポリン系抗菌薬への耐性は、獲得性 β-ラクタマーゼである基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (Extended-spectrum β-lactamase: ESBL) 産生に起因することが多いが、AmpC 型セファロスポリナーゼが原因となっていることもある^{1) 2)}。*E. coli* における AmpC 産生の多くは、プラスミドなどを介した獲得性の ampC 遺伝子に由来し、国内では CIT 型、DHA 型の AmpC 型セファロスポリナーゼの報告が多い^{2) 3)}。一方、通常はごく低いレベルでしか発現していない *E. coli* の染色体性 ampC 遺伝子の転写制御を担う遺伝子領域 (例: プロモーター、アテニュエーター) に変異が加わることで染色体性 AmpC の産生亢進を認めることもある^{4) ~ 6)}。

第三世代セファロスポリン耐性 *E. coli* の中から AmpC 産生菌をみつけだし、さらにその中から院内伝播の可能性がある獲得性 AmpC 産生 *E. coli* を検出することは、抗菌薬選択、

感染対策、ならびに薬剤耐性菌の動向を把握する上で重要である。しかし AmpC 産生株のスクリーニング基準、および明確な判定基準が定まらない中、AmpC 産生 *E. coli* に関する国内外の情報は限られている。

そこで今回我々は、AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) で AmpC 陽性と判定された *E. coli* における獲得性 ampC 遺伝子保有率を調査し、さらに獲得性 ampC 遺伝子保有株・非保有株の特徴を明らかにするための研究を実施した。

材料と方法

1. 材料

2019 年 8 月から 2023 年 1 月の期間に藤田医科大学病院検査部で臨床検体から分離された *E. coli* のうち、1) Cefmetazole (CMZ) に非感性 (MIC ≥ 32 μg/mL)、もしくは 2) 自動薬剤感受性測定装置 VITEK2 Blue (バイオメリュー・ジャパン: version 7.01) に装備されている表現型解析システム Advanced Expert System (AES: version 1.9.0) による薬剤耐性機序の推定で「AmpC」のコメントが付記された菌株で、尚且つ AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) により AmpC 陽性と判定されたものを対象とした。菌株のスクリーニングにあたっては VITEK2 感受性カード AST-N228 もしくは AST-N229 から得られた CMZ の MIC 値を使用した。薬剤感受性検査の判定は Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 Ed32 の基準に準拠し、CMZ MIC ≥ 32

著者連絡先: (〒470-1192) 愛知県豊明市掛町田楽ヶ窪 1 番地 98
藤田医科大学医学部感染症科
櫻井亜樹
TEL: 0562-93-2433
FAX: 0562-93-4593
E-mail: aki.sakurai@fujita-hu.ac.jp

μg/mL であった場合に「非感性」と判定した。AmpC/ESBL 鑑別ディスクの検査は添付文書に基づき行った。具体的には McFarland 0.5 に調整した菌液をミュラーヒントン II 寒天培地（日本ベクトンディッキンソン：以下日本 BD）に塗布し、4 種類のディスク（A：Cefpodoxime (CPD) 10 μg, B：CPDX 10 μg + ESBL 阻害剤, C：CPDX 10 μg + AmpC 阻害剤, D：CPDX 10 μg + ESBL 阻害剤 + AmpC 阻害剤）を配置した。35℃ で 18-24 時間培養した後、D-B および C-A の阻止円径が 5 mm 以上、且つ A-B および C-D の阻止円径が 4 mm 以下であった場合に AmpC 陽性と判定した。同一患者からの重複検体を除いた結果、VITEK2 による薬剤感受性試験で CMZ 非感性を示した 29 株、AES のレポートに AmpC を含む 26 株、また両条件を満たす 9 株を含む計 46 株が上記選択基準を満たした。これら菌株の検出部位は尿が 83% (38/46) と過半数を占めており、次いで血液 (8.7%, 4/46)、閉鎖膿 (n=1)、痰 (n=1)、便 (n=1)、腹水 (n=1) であった。対象株に対して以下 2-4 の検査を行った。また以下に述べる PCR 法で獲得性 *ampC* 遺伝子の保有が確認されず、3-アミノフェニルボロン酸を用いた AmpC 表現型確認試験で陽性と判定され、さらに CMZ に対し非感性を示した菌株に対して全ゲノム解析を施行した。

2. 阻害剤を用いた AmpC, ESBL の表現型確認検査

AmpC の表現型確認試験のため、AmpC 阻害剤である 3-アミノフェニルボロン酸を用いた disk potentiation test を実施した⁷⁾。具体的には、3-アミノフェニルボロン酸 (3-aminophenyl boronic acid; 以下 APB, 東京化成工業) を dimethyl sulfoxide (富士フイルム和光純薬) に溶解して 100,000 μg/ml の溶解液を作成した。次に McFarland 0.5 に調整した菌液をミュラーヒントン II 寒天培地（日本 BD）に塗布し、2 枚のセンシ・ディスク Cefotaxime (CAZ) 30 (日本 BD) を配置した。その後速やかに CAZ ディスクの一方に APB 溶解液 (100,000 μg/ml) 3 μl (APB 量として 300 μg) を滴下し、37℃ で 18-24 時間培養した。APB 添加により阻止円径が 5 mm 拡大した場合に AmpC 陽性と判定した⁷⁾。ESBL の確認には、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 ED32⁸⁾ の規定に従い、CAZ と Cefotaxime (CTX) のセンシ・ディスク (日本 BD)、ならびにクラブラン酸 (clavulanic acid: CA) 添加ディスクである KB ディスク CAZ/CA, CTX/CA (栄研化学) を用い、検査ならびに判定を行った。

3. 微量液体希釈法による薬剤感受性試験

オーダーメイドのドライプレート「栄研」(96 プレート) (栄研化学) を用い、β-ラクタム系抗菌薬 (cefazolin, CTX, CMZ, CAZ, aztreonam, cefepime, imipenem, meropenem), β-ラクタマーゼ阻害剤配合抗菌薬 (amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, ceftolozane-tazobactam), 非 β-ラクタム系抗菌薬 (ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, amikacin, tobramycin, trimethoprim-sulfamethoxazole) の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。薬剤感受性試験結果の判定は、CLSI (M100 32nd) に基づき実施した⁸⁾。

4. PCR 法による獲得性 *ampC* 遺伝子の検出

AmpC 型セファロスポリナーゼの遺伝子ファミリーのうち CIT 型, DHA 型, MOX 型, FOX 型を増幅するプライマーを用いたマルチプレックス PCR 法により、*ampC* 遺伝

子の検出を行った⁹⁾。尚、CIT 型には *bla*_{CMY-2} から *bla*_{CMY-7}, *bla*_{LAT-1} から *bla*_{LAT-4}, *bla*_{BIL-1} の遺伝子が、DHA 型には *bla*_{DHA-1} および *bla*_{DHA-2}, MOX 型には *bla*_{MOX-1}, *bla*_{MOX-2}, *bla*_{CMY-1}, *bla*_{CMY-8} から *bla*_{CMY-11}, FOX 型には *bla*_{FOX-1} から *bla*_{FOX-5b} までの遺伝子が含まれる。CIT 型, DHA 型の陽性コントロールには国立感染症研究所から分与された *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1} 保有が確認されている *E. coli* をそれぞれ使用した。MOX 型, FOX 型の陽性コントロールには *bla*_{MOX-like} 遺伝子, *bla*_{FOX-like} 遺伝子をそれぞれ染色体性に保有する *Aeromonas caviae* (GenBank accession no. JAPEHL000000000), *Aeromonas allosaccharophila* (Accession no. JAEFZ000000000) を使用した。因みに、本研究で用いたマルチプレックス PCR 法⁹⁾には、本来 ACC 型, ACT 型を検出するためのプライマーも含まれているが、国内で分離される獲得性 AmpC 産生 *E. coli* から ACC 型, ACT 型の *ampC* 遺伝子が検出されることは稀であること、また適切な陽性コントロール株の入手が困難であったことから、これらの遺伝子型の PCR 法による検出は実施していない。

5. 全ゲノム解析による薬剤耐性遺伝子の検索

Gentra Puregene Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、NextSeq2000 (Illumina) による全ゲノム解析を行った。次世代シーケンサーから得られたデータは SPAdes (version 3.13.1) でアセンブルし contig を作成した。獲得性薬剤耐性遺伝子の検索には AMRFinderPlus (<https://github.com/ncbi/amr/wiki>) を使用した。さらに染色体性 *ampC* 遺伝子のプロモーター・アテニューエーター領域を BLAST で検索し、MEGA11 (<https://www.megasoftware.net/>) でアラインメントした塩基配列をもとに、同領域の遺伝子変異を検索した⁵⁾⁶⁾¹⁰⁾。

6. 統計解析手法

2 群間比較における名義変数の解析には Fisher の正確率検定もしくはカイ二乗検定を用い両側検定における p 値 0.05 未満をもって有意差ありと判定した。解析に Stata version 15.1 を使用した。

結 果

研究期間に収集された 46 株のうち、ドライプレートを用いた薬剤感受性試験で CMZ 非感性を確認できなかった 1 株を除外し、選択基準を満たした計 45 株に対する解析を実施した。除外した 1 株に関しては、臨床検体からの分離時に VITEK2 から得られた CMZ の MIC 値は 32 μg/mL と非感性であったものの、凍結保存後にドライプレートで薬剤感受性試験を実施した際には CMZ MIC 8 μg/mL を示していた。菌株の凍結保存・復元の過程で、薬剤耐性遺伝子を媒介するプラスミドなどの可動性遺伝因子が脱落することは珍しくなく¹²⁾、本研究では VITEK2 とドライプレートの CMZ MIC 値に乖離を認めた場合、ドライプレートの値を優先した。以下に述べる CMZ の MIC は、断りがない限りドライプレートを用いた薬剤感受性試験から得られた測定値である。45 株中、36 株 (80%, 36/45) において 3-アミノフェニルボロン酸を用いた阻害試験で AmpC 表現型検査陽性と判定された。ESBL の表現型確認検査は全菌株で陰性であった。

PCR 法により、30 株 (67%, 30/45) において獲得性 *ampC*

表 1. 獲得性 *ampC* 遺伝子保有株・非保有株における微生物学的特徴の比較

特徴	全体 (n = 45) Total	獲得性 <i>ampC</i> 遺伝子保有株 (PCR 陽性)			獲得性 <i>ampC</i> 遺伝子 非保有株 (n = 15)	P 値 ^{*1}
		全体 (n = 30)	CIT 型 (n = 21)	DHA 型 (n = 9)		
Cefmetazole 非感性株 ^{*2}	32 (71%)	25 (83%)	16 (76%)	9 (100%)	7 (47%)	0.011
AES レポートに AmpC を含む株	26 (58%)	17 (57%)	17 (81%)	0	9 (60%)	0.83
AES による薬剤耐性機序の推定						
AmpC	7 (16%)	1 (3%)	1 (5%)	0	6 (40%)	
AmpC or ESBL	16 (36%)	16 (53%)	16 (76%)	0	0	
AmpC or IRT or OXA	3 (7%)	0	0	0	3 (20%)	
ESBL	18 (40%)	12 (40%)	4 (19%)	8 (89%)	6 (40%)	
ESBL or Carbapenemase ^{*3}	1 (2%)	1 (3%)	0	1 (11%)	0	
Cefmetazole 非感性 ^{*2} かつ AES レポートに AmpC を含む株	13 (29%)	12 (40%)	12 (57%)	0	1 (7%)	0.02
ボロン酸を用いた阻害試験陽性	36 (80%)	28 (93%)	20 (95%)	8 (89%)	8 (53%)	0.002
各抗菌薬への非感性株						
Cefazolin	43 (96%)	28 (93%)	20 (95%)	8 (89%)	15 (100%)	0.31
Cefotaxime	37 (82%)	30 (100%)	21 (100%)	9 (100%)	7 (47%)	<0.001
Ceftazidime	35 (78%)	29 (97%)	20 (95%)	9 (100%)	6 (40%)	<0.001
Cefepime	1 (2%)	1 (3%)	1 (5%)	0	0	0.47
Aztreonam	22 (49%)	16 (53%)	13 (62%)	3 (33%)	6 (40%)	0.40
Amoxicillin-clavulanate	45 (100%)	30 (100%)	21 (100%)	9 (100%)	15 (100%)	NA
Piperacillin-tazobactam	17 (38%)	11 (37%)	7 (33%)	4 (44%)	6 (40%)	0.83
Ceftolozane-tazobactam	8 (18%)	7 (23%)	4 (19%)	3 (33%)	1 (7%)	0.17
Imipenem	1 (2%)	1 (3%)	0	1 (11%)	0	0.47
Meropenem	0	0	0	0	0	NA
Ciprofloxacin	17 (38%)	14 (47%)	11 (52%)	3 (33%)	3 (20%)	0.082
Levofloxacin	19 (42%)	16 (53%)	12 (57%)	4 (44%)	3 (20%)	0.033
Gentamicin	4 (9%)	4 (13%)	2 (10%)	2 (22%)	0	0.14
Amikacin	0	0	0	0	0	NA
Tobramycin	3 (7%)	3 (10%)	1 (5%)	2 (22%)	0	0.20
Trimethoprim-sulfamethoxazole	15 (33%)	14 (47%)	8 (38%)	6 (67%)	1 (7%)	0.007

IRT, inhibitor-resistant TEM β -lactamase ; OXA, OXA-type β -lactamase ; AES, VITEK2 advanced expert system.

*1. 獲得性 *ampC* 遺伝子保有株 (全体) と非保有株を比較した p 値を示した。

*2. 微量液体希釈法 (ドライプレート) から得られた Cefmetazole の MIC 値を判定に使用した。

*3. Modified carbapenem inactivation method (mCIM 法) を用いたカルバペネマーゼのスクリーニング検査は陰性であった。

遺伝子が検出された。AmpC の遺伝子型としては CIT 型 (70%, 21/30) が最多であり、残りを DHA 型 (30%, 9/30) が占めた。表 1 に獲得性 *ampC* 遺伝子保有株と獲得性 *ampC* 遺伝子非保有株 (以下、非保有株) の微生物学的特徴、ならびに両群を単変量解析で比較した結果を示す。獲得性 *ampC* 遺伝子保有株では非保有株と比べ、ボロン酸による阻害確認試験での陽性率 (93% vs. 53%) ならびに CMZ への非感性率 (83% vs. 47%) が有意に高い結果が得られた。一方、AES のレポートに「AmpC」を含む割合に関して、両群に有意な違いはみられなかった。さらに、獲得性 *ampC* 遺伝子保有株では CTX, CAZ, Levofloxacin, Trimethoprim-sulfamethoxazole への非感性率が非保有株と比較し有意に高い結果が得られた。

次に、獲得性 *ampC* 遺伝子保有株のうち CIT 型と DHA 型で比較したところ、CIT 型では AES のレポートに AmpC を含む割合が有意に高いのに対し ($p < 0.001$), DHA 型の全株で AES により ESBL と推定される特徴がみられた。その他、薬剤感受性結果において両者に有意な違いはみられなかった。

表 2 に PCR で獲得性 *ampC* 遺伝子が検出されなかった 15 株の微生物学的特徴を示す。15 株中、ボロン酸による阻害確認試験ならびに CMZ への非感性パターンから 6 株 (40%, 6/15) において AmpC 産生が強く疑われた。表 2 の菌株番号 10-15 にあたるこれら 6 株に対し全ゲノム解析を行ったところ、獲得性 β -ラクタマーゼ遺伝子は検出されず、過去の研究で染色体性 *ampC* 遺伝子の発現に影響を与えることが報告されているプロモーター領域の点変異 (例: -35 ボックスにおける A-32T, -10 ボックスにおける C-11T)⁵⁾⁽¹¹⁾ や挿入 (例: -35 と -10 ボックス間の一塩基挿入)⁶⁾、もしくはアテニューエーター領域の点変異 (例: C24T)¹⁰⁾ のいずれかを全ての菌株で認めた。以上の結果より、上記 6 株においては染色体由来 AmpC の産生亢進が表現型に関連している可能性が示唆された。染色体 AmpC 産生亢進が疑われる 6 株全てにおいて AES による薬剤耐性の推定で ESBL のコメントが付記されていた。

考 察

本研究では CMZ への非感性、もしくは AES による薬剤

表 2. 獲得性 *ampC* 遺伝子非保有株の微生物学的特徴

菌株番号	CMZ への薬剤感受性 ^{*1}	CMZ MIC (μg/mL) ^{*2}	AES による薬剤耐性機序の推定	ボロン酸を用いた阻害試験 ^{*3}	各抗菌薬への薬剤感受性					
					CFZ	CTX	CAZ	ATM	AMC	TZP
1	—	4	AmpC	(-)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
2	—	8	AmpC	(-)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
3	—	4	AmpC	(-)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
4	Non-S	32	AmpC	(-)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
5	—	16	AmpC	(-)	Non-S	Non-S	—	—	Non-S	—
6	—	16	AmpC or IRT or OXA	(-)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
7	—	4	AmpC or IRT or OXA	(-)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
8	—	4	AmpC or IRT or OXA	(+)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
9	—	16	AmpC	(+)	Non-S	—	—	—	Non-S	—
10	Non-S	>32	ESBL	(+)	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S
11	Non-S	>32	ESBL	(+)	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S
12	Non-S	>32	ESBL	(+)	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S
13	Non-S	>32	ESBL	(+)	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S
14	Non-S	>32	ESBL	(+)	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S
15	Non-S	>32	ESBL	(+)	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S	Non-S

CMZ, cefmetazole ; CFZ, cefazolin ; CTX, cefotaxime ; CAZ, ceftazidime ; ATM, aztreonam ; AMC, amoxicillin-clavulanic acid ; TZP, piperacillin-tazobactam ; IRT, inhibitor-resistant TEM β-lactamase ; OXA, OXA-type β-lactamase ; AES, VITEK2 advanced expert system. 各抗菌薬へ非感性を示す株を Non-S, 感性を示す株を一で示した。

*1. 微量液体希釈法 (ドライプレート) から得られた Cefmetazole の MIC 値を判定に使用した。

*2. 微量液体希釈法 (ドライプレート) から得られた Cefmetazole の MIC 値を示した。

*3. ボロン酸を用いた阻害試験で陽性と判定された株を (+), それ以外を (-) で示した。

耐性推定から AmpC 産生が疑われ, ESBL/AmpC 鑑別ディスクで AmpC 陽性と判定された *E. coli* において高い頻度で獲得性 *ampC* 遺伝子の保有を認めることが確認された。

広域セファロスポリン耐性 *E. coli* において AmpC 産生菌が占める割合は国・地域のみならず, 研究ごとにも大きく異なる²⁽³⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾。2002 年から 2008 年に国内の 17 施設で行われた研究では, Cefazolin MIC >16 μg/mL かつ AmpC の表現型確認試験である 3D test が陽性であった *E. coli* 290 株中, 17 株において獲得性 *ampC* 遺伝子を認めた³⁾。一方, 最近報告された Japan Antimicrobial Resistant Bacterial Surveillance (JARBS) のデータに基づく研究によると, 2019-2020 年に国内 175 施設から収集された第三世代セファロスポリンへの耐性もしくは Meropenem への低感受性 (MIC ≥ 0.25 μg/mL) を示す *E. coli* のうち, ESBL 産生菌が 1,488 株であったのに対し, 獲得性 AmpC 産生菌は 397 株検出されている²⁾。本研究では, 研究期間に臨床検体より分離された総計 4,211 株 (1 患者 1 株) の *E. coli* のうち ESBL 産生菌が 841 株 (分離率 20%, 841/4,211) であったのに対し, 獲得性 *ampC* 遺伝子保有株の検出は 30 株 (分離率 0.71%, 30/4,211) にとどまった。しかし本研究では, 獲得性 *ampC* 遺伝子保有の調査対象を, 菌株選択の一次条件 (CMZ MIC ≥ 32 μg/mL もしくは AES による「AmpC」推定) および二次条件 (AmpC/ESBL 鑑別ディスクによる AmpC 陽性判定) を満たす株に限定しており, その検出数および分離率を過小評価している可能性がある。実際, 過去の研究から獲得性 AmpC 産生 *E. coli* の中には CMZ MIC ≤ 16 μg/mL を示すものや AmpC/ESBL 鑑別ディスクで AmpC 陰性と判定される株が存在することが報告されている¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。したがって, 本研究で採用した選択条件で捕捉しきれなかった獲得性 *ampC* 遺伝子保有

株が存在する可能性は高く, その点を踏まえた上で本研究の結果を解釈する必要がある。

本研究で得られた獲得性 AmpC の遺伝子型に関しては CIT 型が最多で, 次に DHA 型が多くみられた。これは国内外で報告されている *E. coli* における獲得性 *ampC* 遺伝子の分子疫学データと同様の所見であり, CIT 型で代表的な *bla*_{CMY-2}, また DHA 型に含まれる *bla*_{DHA-1} の *E. coli* における広い分布を反映していると考えられる²⁾⁽¹⁷⁾。獲得性 *ampC* 遺伝子である *bla*_{CMY-2} は強力なプロモーターとしての役割もはたす Insertion sequence (例: *ISEcp1*) とともに, また *bla*_{DHA-1} では調節遺伝子 *ampR* とともにプラスミド上に挿入されていることが多く, 前者では遺伝子の構成的な発現が, 後者では誘導性の発現がみられるとされる¹⁷⁾。今回の研究で得られた CIT 型・DHA 株はいずれも, これらの発現様式を反映し, 第三世代セファロスポリン抗菌薬ならびに CMZ への高い非感性率を示した。一方, 両者における有意な違いとして検出されたのは AES による薬剤耐性推定のコメントのみであった。AES では, VITEK2 で得られた各種抗菌薬への MIC 値の組み合わせから対象菌種における薬剤耐性機序の推定を行うが, *E. coli* における AmpC 推定精度に関する情報は不足している^{18)~20)}。また今回の研究では検体数が限られており CIT 型と DHA 型株における薬剤感受性パターンの明確な差異を捉えることはできなかった。しかし, いずれにしても AES では DHA 型 AmpC, さらに染色体性 AmpC 過剰産生が「ESBL」と推定される傾向がみられており, AES の結果を解釈する上で留意すべきと考えられる。

以上, 表現型試験から AmpC 産生が疑われた *E. coli* において高率に獲得性 *ampC* 遺伝子が検出された。院内伝播の可能性のある獲得性 AmpC 産生 *E. coli* の分離状況を把握す

ることは感染対策上も重要と考えられる。

謝辞：本研究の遂行にあたり御協力を賜りました藤田医科大学臨床検査部 伊藤 弘康先生，東本 祐紀先生に御礼を申し上げます。

利益相反：土井洋平は Gilead Sciences, Inc., Moderna, Inc., GSK plc, AbbVie Inc., ファイザー株式会社，塩野義製薬株式会社より顧問料を受けている。鈴木匡弘は関東化学より受託研究費を受けている。

文 献

- 「検査部門公開情報 2022 年 1～12 月年報」(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/report/kensa.html> 2024 年 1 月 9 日現在.
- Kayama, S, K Yahara, Y Sugawara, et al. 2023. National genomic surveillance integrating standardized quantitative susceptibility testing clarifies antimicrobial resistance in Enterobacterales. *Nat Commun* 14 (1): 8046 doi: 10.1038/s41467-023-43516-4.
- Yamasaki, K, M Komatsu, N Abe, et al. 2010. Laboratory Surveillance for Prospective Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in the Kinki Region of Japan. *J Clin Microbiol* 48 (9): 3267-3273 doi: 10.1128/JCM.02111-09.
- Jaurin, B, T Grundström, T Edlund, S Normark. 1981. The *E. coli* beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 290 (5803): 221-225 doi: 10.1038/290221a0.
- Caroff, N, E Espaze, D Gautreau, H Richet, A Reynaud. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing ampC. *J Antimicrob Chemother* 45 (6): 783-788 doi: 10.1093/jac/45.6.783.
- Siu, LK, PL Lu, JY Chen, FM Lin, SC Chang. 2003. High-level expression of ampC beta-lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (7): 2138-2144 doi: 10.1128/AAC.47.7.2138-2144.2003.
- Yagi, T, Jun-ichi Wachino, H Kurokawa, et al. 2005. Practical Methods Using Boronic Acid Compounds for Identification of Class C β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (6): 2551-2558 doi: 10.1128/jcm.43.6.2551-2558.2005.
- CLSI. 2022. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition. CLSI guideline M100, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Pérez-Pérez, FJ, ND Hanson. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (6): 2153-2162 doi: 10.1128/jcm.40.6.2153-2162.2002.
- Caroff, N, E Espaze, D Gautreau, H Richet, A Reynaud. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 ampC promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45 (6): 783-788 doi: 10.1093/jac/45.6.783.
- Peter-Getzlaff, S, S Polsfuss, M Poledica, et al. 2011. Detection of AmpC Beta-Lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of Three Phenotypic Confirmation Assays and Genetic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 49 (8): 2924-2932 doi: 10.1128/JCM.00091-11.
- Smith, MA, MJ Bidochka. 1998. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can J Microbiol* 44 (4): 351-355 doi: 10.1139/w98-020.
- Pascual, V, G Ortiz, M Simó, et al. 2015. Epidemiology and risk factors for infections due to AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (3): 899-904 doi: 10.1093/jac/dku468.
- Lee, K, M Lee, JH Shin, et al. 2006. Prevalence of Plasmid-mediated AmpC β -Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Microbial Drug Resistance* 12 (1): 44-49 doi: 10.1089/mdr.2006.12.44.
- Matsumura, Y, M Yamamoto, M Nagao, et al. 2016. In vitro activities and detection performances of cefmetazole and flomoxef for extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 84 (4): 322-327 doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.12.001.
- Al Mamari, AMK, Z Al Jabri, H Sami, et al. 2023. Evaluation of six commercial and in-house phenotypic tests for detection of AmpC β -lactamases: is routine detection possible? *JAC Antimicrob Resist* 5 (5): dlad101 doi: 10.1093/jacmr/dlad101.
- Jacoby, GA. 2009. AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (1): 161-182 doi: 10.1128/CMR.00036-08.
- Livermore, DM, M Struelens, J Amorim, et al. 2002. Multi-centre evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System for interpretive reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother* 49 (2): 289-300 doi: 10.1093/jac/49.2.289.
- Barry, J, A Brown, V Ensor, et al. 2003. Comparative evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System (AES) in five UK hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (5): 1191-1202 doi: 10.1093/jac/dkg234.
- Chan, E, M Leroi. 2021. Evaluation of the VITEK 2 Advanced Expert System performance for predicting resistance mechanisms in Enterobacterales acquired from a hospital-based screening program. *Pathology* 53 (6): 763-767 doi: 10.1016/j.pathol.2021.01.009.

The prevalence of acquired *ampC* genes in *Escherichia coli* suspected to produce AmpC β -lactamase based on phenotypic testing and their microbiological profile

Chiyo Shintani^{1) 2)}, Aki Sakurai^{3) 4)}, Manami Hamagishi^{1) 2)}, Kenjiro Matsui^{1) 2)}, Akiko Sei⁴⁾, Masahiro Suzuki⁴⁾,
Yohei Doi^{3) 4)}

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Fujita Health University Hospital

²⁾Division of Infection Control, Department of Quality and Safety in Healthcare, Fujita Health University Hospital

³⁾Department of Infectious Diseases, Fujita Health University School of Medicine

⁴⁾Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine

This study aimed to investigate the prevalence of acquired *ampC* genes in *Escherichia coli* isolates which were suspected to produce AmpC β -lactamase based on susceptibility testing and AmpC/ESBL differentiation disk results. Of 4211 *E. coli* strains isolated from clinical samples in a single facility during the study period, 45 isolates demonstrating cefmetazole (CMZ) MIC ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ or inferred to produce AmpC as a possible resistance mechanism by VITEK2 advanced expert system (AES), and showing a positive test result for AmpC by the AmpC/ESBL differentiation disk were included. Phenotypic confirmatory testing of AmpC using boronic acid, susceptibility testing, and detection of acquired *ampC* genes by PCR were conducted. As a result, 30 study isolates (67%, 30/45) harbored acquired *ampC* genes belonging to the CIT family (70%, 21/30) and DHA family (30%, 9/30). The non-susceptibility rates to CMZ and third-generation cephalosporins were significantly higher in isolates with acquired *ampC* genes than in those without. DHA-producing isolates were often inferred to produce ESBL by AES. Of 15 isolates without acquired *ampC* genes, 6 (40%, 6/15) were presumed to overproduce chromosomal AmpC. In conclusion, the prevalence of acquired *ampC* genes was high in *E. coli* isolates in which AmpC production was suspected based on the susceptibility testing and AmpC/ESBL differentiation disk results.