

Title	拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ産生菌の疫学的調査と検査室における簡易検出法の開発
Author(s)	小松, 方
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45285">https://hdl.handle.net/11094/45285</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	小 松 方 こまつ まさる
博士の専攻分野の名称	博 士 (保健学)
学位記番号	第 18567 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科保健学専攻
学位論文名	拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ産生菌の疫学的調査と検査室における簡易検出法の開発
論文審査委員	(主査) 教授 岩谷 良則 (副査) 教授 山本 容正 教授 土肥 義胤

### 論文内容の要旨

#### 〔目 的〕

拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBLs) は主として大腸菌をはじめとする腸内細菌が産生する酵素で、その治療に汎用されている第三世代セフェムやモノバクタム等の広域  $\beta$  ラクタム剤をも抗菌薬をも加水分解し抗菌薬療法に難治かさせる要因となる。ESBLs の遺伝子は通常 R-プラスミドにコードされ、菌種間を高頻度に伝播する。また菌の特性から病院環境や、患者腸管内に保有されやすいとされ、院内感染の原因菌としても重要である。欧米では既に多くの疫学的データが報告されているが、わが国における ESBLs 産生菌の疫学的データは皆無であった。また検査室における検出においても、1999 年に米国検査標準化委員会 (NCCLS) から大腸菌およびクレブシエラに限定した検出法を提案したが、それがわが国で検出される ESBLs についてどれぐらいの検出精度があるかについても評価がなされていない。今回の研究は 1) 近畿地区の病院で検出された腸内細菌の ESBLs 産生菌の疫学的調査と、2) NCCLS が提唱している ESBLs 検出法の評価および、3) 大腸菌とクレブシエラより耐性度の高い他の腸内細菌 (セラチア等) をも含めた新しい検出法の考案を行った。

#### 〔方法ならびに成績〕

##### 1. ESBLs 産生菌の疫学的調査成績

近畿圏の病院から分離された各種腸内細菌から第三世代セフェムに耐性を示した株を収集し、PCR 法による遺伝子型別を行ったところ、0~2.9%の割合で病院施設内に存在し、また PCR フィンガープリントによる調査では、単一クローンの広がり認めず、散発的に発生していることが明らかとなった。また欧米で検出される遺伝型とは異なり、わが国特有の遺伝型が多く見受けられ、欧米型はわずかに検出されるにすぎないことが明らかとなった。この研究の一環として本邦初の ESBLs 産生クレブシエラによる院内感染例の報告、および本邦初の新しい遺伝子型を持つ ESBLs 産生菌感染症の報告も行った。

##### 2. 既存の ESBL 産生菌検出法の評価

近畿地区の病院から分離された ESBLs 産生菌 10 菌種 91 株および非産生株 46 株を使用して、NCCLS に準拠した ESBLs 検出キットを使用し検出能の評価を行った。NCCLS の ESBLs 検出法は第三世代セフェム薬の内、セフォタ

キシム (CTX) とセフトジジム (CAZ) を使用し、 $\beta$ ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸 (CVA) との阻害反応を検出することを原理とし、検査対象株は大腸菌およびクレブシエラのみと指定している。これらの菌種に対する検出感度は 92% と高かったが、検出対象としていないセラチアやエンテロバクター等の株の検出感度は 52% と低い成績であった。従って、腸内細菌科菌種全般から ESBLs 産生菌を検出するには NCCLS 法では不十分であるということが明らかとなった。またこの要因として、後者の群は染色体性にすでに保有し、ESBLs とはアミノ酸ホモロジーが異なる AmpC 型  $\beta$ ラクタマーゼの過剰産生により、反応がマスクされていることが示唆された。

### 3. ESBL 産生菌簡易検出法の開発

先に指摘した NCCLS の ESBLs 検出法を改善すべく、特に NCCLS が指定していない大腸菌およびクレブシエラ以外の 6 菌種 68 株腸内細菌を対象として検討を行った。方法は、既存の反応原理を応用することで、CTX および CAZ を含む各種抗菌薬を選定し評価を行った。選定した抗菌薬の内、とくに第四世代セフェムとクラブラン酸を組み合わせることで 90% 以上の検出感度に引き上げることに成功した。この要因として第四世代セフェムは染色体性の AmpC  $\beta$ ラクタマーゼに対し、比較的安定なためクラブラン酸との阻害反応にマスクされないということが考えられた。

#### 〔総括〕

本研究により種々の腸内細菌から ESBLs 産生菌を検出し、大病院から開業医レベルまで広く分布していることが明らかとなった。NCCLS 準拠による ESBLs 産生菌の検出法は、菌種によっては十分な検出ができないことが明らかとなったが、研究により腸内細菌科菌種全般に対して高い検出力を有する方法を開発できた。本法は検査室において簡易的に実施できる方法であり、今後適切に利用することで院内感染の抑止や治療薬の適切なアセスメントに活用できるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

拡張型  $\beta$ ラクタマーゼ (ESBLs) 産生菌による感染症は抗菌薬治療で汎用されている各種  $\beta$ ラクタム剤による治療を難治化させ、かつ院内感染の原因菌としても重要である。学位申請者は、近畿圏病院の ESBL 産生菌感染症の実態解明と、臨床検査室における適切な検出法の構築を実施すべく研究を行った。

本研究では、近畿地区基幹病院で分離された各種腸内細菌を分子生物学的手法により解析し、0~2.9% の割合で病院内に存在することを明らかとした。また本邦初の院内感染例を証明し病院検査室での迅速な検出と適切な院内感染対策の重要性について指摘を行った。検査法に関する研究では米国臨床検査標準化委員会 (NCCLS) で提言された ESBLs の検査指針について日本国内で分離された菌株を使用した評価をあらためて実施した。NCCLS 法は、腸内細菌の内大腸菌とクレブシエラについてのみ優れた検出能を示したが、セラチア等の菌種については低い検出感度となることを明らかにした。本研究において、この問題を解消すべく新しい簡易検出法を考案し 90% 以上の感度へ引き上げることに成功した。

本研究は、ESBLs 産生菌感染症の実態を調査し、検査室における ESBLs 検出法の導入の必要性と問題点を明示した。また検査室で実施可能な新たな簡易検出法を検討し、高い検出感度を有する方法を開発した。本研究成果は、今後増加する可能性がある ESBLs 産生菌感染症の抑止に貢献可能な重要な研究であり、博士 (保健学) の学位授与に値すると考えられる。