

21. 人および伴侶動物から分離される薬剤耐性菌（ESBL） についての研究

○永井 佑樹 （三重県保健環境研究所）

楠原 一 （三重県保健環境研究所）

赤地 重宏 （三重県保健環境研究所）

【研究目的】

近年、薬剤耐性（AMR）の一つである基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌が増加しており、社会的にも大きな問題となっている。本研究では、犬猫由来の ESBL 産生菌の伝播状況を調査し、さらに人由来 ESBL 産生菌との関連性を調べることで、これまで明らかになっていない ESBL 産生菌拡散の要因や伝播経路における犬猫の役割などを明らかにすることを目的とする。

【研究の必要性】

近年、抗菌薬が効かなくなる AMR 感染症が世界的に拡大しており、社会的にも非常に大きな問題となっている。AMR の一つである ESBL は、主にペニシリン系薬を分解するクラス A のβラクタマーゼ遺伝子に変異が起こることにより、第三世代セファロスポリンやモノバクタム系の抗菌薬を分解する能力を獲得したβラクタマーゼである。近年この ESBL を産生する菌が院内のみならず市中感染症の起原菌としても増加しており深刻な問題となっているが、その急激な増加要因については明らかになっていない。またこの ESBL 産生菌はヒトだけでなく動物からも分離されており、ヒトと動物間での耐性菌（耐性遺伝子）の伝播も懸念されている。動物から分離される耐性菌においては、食用動物や畜産動物についての調査はこれまでに多数報告されているが、伴侶動物における調査はあまり実施されていない。さらに国内では伴侶動物における耐性菌のサーベイランスシステム自体が構築されておらず、伴侶動物における耐性菌の拡がりを調査することは、AMR 対策を進めるうえでも必要不可欠と考えられる。

【研究計画】

県内の保健所に収容された犬猫および、三重県感染症発生動向調査等で搬入された人の糞便または直腸ぬぐい液を検体として ESBL 産生菌の分離を試みる。ターゲットとする薬剤耐性遺伝子として ESBL 遺伝子（CTX-M-1, M-2, M-9, M-8 group）および plasmid 性 AmpC 遺伝子（pAmpC; MOX, CMY-2, DHA, ACC, EBC, FOX）について PCR を実施する。PCR で ESBL 遺伝子陽性となった検体についてはダイレクトシーケンスにより variant 型を決定する。また分離された ESBL/pAmpC 産生菌について、細菌学的性状および下記の遺伝子解析を実施し、犬猫および人由来 ESBL 産生菌の比較を行う。

- ① 菌の分子疫学解析として PCR-based open reading frame typing (POT) 法を実施する。
- ② plasmid 解析として replicon typing を行う。
- ③ 菌の系統群解析として phylogenetic group typing を行う。
- ④ パンデミッククローンである B2-ST131 を検出する。

【実施内容・結果】

1-A. 人から分離された ESBL/pAmpC 産生菌

2016 年 3 月から 8 月にかけて感染症発生動向調査等で県内の医療機関から提供された 256 検体を使用した（対象：小児の感染性胃腸炎患者）。検査対象となった 256 名のうち 32 名（12.5%）から ESBL 産生菌が分離された。また pAmpC である CMY-2 (CIT) 産生株 3 株（*E. coli* ; 2 株、*Serratia liquefaciens* ; 1 株）、DHA 産生株 1 株（*E. coli*）が確認された（Table 1）。

1-B. 犬猫から分離された ESBL/pAmpC 産生菌

2015 年 4 月から 2017 年 12 月にかけて県内の保健所に収容された犬猫由来の 116 検体（犬：83 検体、猫：33 検体）を対象に検査を実施した。その結果 116 検体中、ESBL 産生菌が 10 検体（8.6%：犬 9 検体、猫 1 検体）、pAmpC 産生菌が 2 検体（1.7%：犬 1 検体、猫 1 検体）確認され、pAmpC は 2 検体とも CMY-2 産生菌であった（Table 2）。

2. ESBL 遺伝子の遺伝子型別

人由来 32 株の ESBL 遺伝子型は CTX-M-14 が 14 株、CTX-M-27 が 7 株、CTX-M-55 が 4 株、CTX-M-15 が 3 株、CTX-M-79 が 3 株、CTX-M-65 が 1 株であった。また犬猫由来 10 株の遺伝子型は、CTX-M-14、CTX-M-1、CTX-M-44 がそれぞれ 2 株、CTX-M-65、CTX-M-15、CTX-M-79 および CTX-M-8 が 1 株ずつ確認された（Table 1）。

3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の供試薬剤はクロラムフェニコール（CP）、テトラサイクリン（TC）、ストレプトマイシン（SM）、カナマイシン（KM）、スルファメトキサゾールトリメトプリム（ST）、ナリジクス酸（NA）、ノルフロキサシン（NFLX）、ゲンタマイシン（GM）、ホスホマイシン（FOM）、シプロフロキサシン（CPF）、イミペネム（IPM）の 11 薬剤を用いた。人由来 ESBL 産生菌の各薬剤における耐性率は CP ; 3.1%(1/32), TC ; 34.4%(11/32), SM ; 37.5%(12/32), KM ; 6.3%(2/32), ST ; 31.3%(10/32), NA ; 75%(24/32), NFLX ;

Table 1. Distribution of ESBL and other β -lactamases isolated from pediatric patients with gastroenteritis

Species	ESBL						Other β -lactamases		
	CTX-M-9 group			CTX-M-1 group			TEM	p-AmpC	
	CTX-M-14	CTX-M-27	CTX-M-65	CTX-M-55	CTX-M-15	CTX-M-79	TEM-1	CMY-2	DHA
<i>Escherichia coli</i>	14	7		3	3	3	9	2	1
<i>Citrobacter freundii</i>			1						
<i>Citrobacter koseri</i>				1					
<i>Serratia liquefaciens</i>								1	

Table 2. Characterization of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* isolated from dogs and cats in Mie Prefecture

Isolates	<i>Enterobacteriaceae</i>	Origin	Area	CTX-M type β -lactamase	Other β - lactamase	Phyloge- netic group	Replicon typing	POT number
A	<i>Escherichia coli</i>	dog	Matsusaka	CTX-M-65		A	HI2	26-16-9
B	<i>Escherichia coli</i>	dog	Matsusaka	CTX-M-14	TEM-1	D	ND	16-18-11
C	<i>Escherichia coli</i>	dog	Ise	CTX-M-44		A	ND	26-148-32
D	<i>Escherichia coli</i>	dog	Ise	CTX-M-44		A	ND	24-148-32
E	<i>Escherichia coli</i>	dog	Kumano	CTX-M-1		A	I1	10-1-0
F	<i>Escherichia coli</i>	dog	Kumano	CTX-M-1		A	I1	10-1-0
G	<i>Escherichia coli</i>	dog	Suzuka	CTX-M-15		B1	I1, FIA, FIB	8-1-28
H	<i>Escherichia coli</i>	dog	Suzuka	CTX-M-14		D	F	17-16-135
I	<i>Enterobacter cloacae</i>	cat	Suzuka	CTX-M-8		NT	B/O, I1	NT
J	<i>Escherichia coli</i>	dog	Suzuka	CTX-M-79		B1	I1, FIB	10-17-0
K	<i>Escherichia coli</i>	cat	Ise	-	CMY-2	B1	I1	8-32-0
L	<i>Citobacter freundii</i>	dog	Matsusaka	-	CMY-2	NT	ND	NT

50%(16/32), GM ; 21.9%(7/32), FOM ; 0%(0/32), , CPFX ; 50%(16/32), IPM ; 0%(0/32)であった。また犬猫由来 ESBL 産生菌の耐性率は TC、NA、SM で 50%(5/10)と高い傾向がみられた。

4. 系統発生群および分子疫学解析

系統発生群解析は Clermont ら¹⁾の方法により実施した。解析した人由来大腸菌 30 株のうち、B2 群が最も多く 15 株 (50%)、次いで D 群 13 株 (43.3%)、A 群 2 株 (6.7%) であった。一方、犬猫由来の ESBL 産生大腸菌 9 株では A 群が最も多く 5 株 (55.6%)、B1 群と D 群がそれぞれ 2 株 (22.2%) であった。分子疫学解析として実施した POT 法では、人由来大腸菌 30 株のうち、POT 型は全部で 26 種類確認された。同一 POT 型が複数検出されたものは 2 種類あり、最も多く検出された POT 型は (49-58-83) の 4 株で ST131 クローンであった (Table 3)。一方で犬猫由来大腸菌では、全部で 8 種類の POT 型が確認され、同一 POT 型は 1 種類 (10-1-0) の 2 株であった。また POT ナンバー1のみ異なる株が 2 株確認され (sample C、D)、これら 2 株はともに CTX-M-44 を産生し同じ保健所内に収容されていた犬由来の株であった。

5. ST131 およびサブクローン H30

Johnson ら²⁾の報告に従い、ST131-specific PCR を実施した結果、人由来 ESBL 産生大腸菌 30 株のうち 10 株が ST131 クローンと判定された (Table 3)。また ST131 と同定された 10 株については、Colpan ら³⁾の方法に従い ST131 のサブクローンである H30 (allele 30 of *fimH*) を検出し、さらに H30 サブクローンのうちキノロン耐性株については H30R と定義した。今回検出された ST131 クローン 10 株の ESBL 型は、CTX-M-27 が 6 株と最も多く、次いで CTX-M-14 が 2 株、CTX-M-15 と CTX-M-79 がそれぞれ 1 株ずつであった。また ST131 では 10 株のうち 7 株が H30R であった。一方、犬猫由来の大腸菌では ST131 クローンは確認されなかった。

Table 3. Characterization of *Escherichia coli* ST131 clone isolated from pediatric patients with gastroenteritis

No	type	POT Number	Phylogenetic Group	Replicon typing	ST131 subclone	Quinolone Resistance	Drug resistance
C1	CTX-M-27	49-56-81	B2	FIA, FIB, I1	H30	R	NA, NFLX, CPFX
C2	CTX-M-14	49-62-43	B2	FIA, FIB, Frep	H30	R	NA, NFLX, CPFX
C3	CTX-M-27	49-58-23	B2	FIA, FIB, Frep	H30	R	NA, NFLX, CPFX, TC, SM
C4	CTX-M-27	49-58-83	B2	FIA	H30	R	NA, NFLX, CPFX
C5	CTX-M-14	49-56-73	B2	FIA, FIB	non-H30	S	NA, TC, SM, ST
C6	CTX-M-27	49-58-83	B2	FIA, FIB	H30	R	NA, NFLX, CPFX
C7	CTX-M-27	49-58-83	B2	FIA, FIB	H30	R	NA, NFLX, CPFX, TC, SM, ST
C8	CTX-M-27	49-58-83	B2	FIA	H30	R	NA, NFLX, CPFX, SM, ST
C9	CTX-M-15	49-21-56	B2	FIB, I1	non-H30	S	NA
C10	CTX-M-79	49-57-8	B2	FIA, FIB, I1	non-H30	R	NA, NFLX, CPFX, GM

6. replicon typing

耐性遺伝子を担うプラスミドのレプリコンタイプを解析したところ人由来 ESBL 産生菌 32 株のうち 22 株が IncF グループ (FIA, FIB) のプラスミドを保有していた。その他には 8 株が IncI を保持しており、5 株はどのタイプにも分類されなかった。また ST131 クローンの 10 株は全て IncF プラスミドを保有し、*H30R* サブクローンの 7 株については全て FIA を保有していた (Table 3)。一方で犬猫由来 ESBL 産生菌では、5 株が IncI1、3 株が IncF グループを保有しており、3 株はいずれのタイプも検出されなかった (Table 2)。

【考察と今後の課題】

本研究の結果、人の ESBL 産生菌の保菌率は 12.5%、犬猫の保菌率は 8.6% となり、犬猫では既報よりやや低い傾向がみられた⁴⁾。その要因として、本研究では保健所に収容された健康な犬猫を対象にしていることが考えられる。また ESBL 産生菌の遺伝子型は、人では CTX-M-14 や CTX-M-27 が多くみられ、犬猫では CTX-M-8 など人ではあまりみられない遺伝子型が確認された。人と犬猫で共通した遺伝子型は、CTX-M-14、CTX-M-15、CTX-M-65、CTX-M-79 の 4 種類みられたが、POT 法による分子疫学解析では共通した POT 型は確認されなかった。また今回の調査では、人で流行しているパンデミッククローン ST131 は、犬猫では確認されず、大腸菌の系統発生群では人および犬猫で明らかな違いが認められた。すなわち人では、病原性が高いとされる B2、D 群が大多数 (93.3%) を占めるのに対し、犬猫では commensal な A、B1 群が優勢 (77.8%) であった。以上から、人および犬猫由来 ESBL 産生大腸菌は本来それぞれ異なる遺伝系統であり、現時点では、人と健康な犬猫間で菌が伝播している可能性は低いと考えられた。しかしながら、プラスミドの replicon type では IncFIB や IncI1 など人と犬猫で共通した type がみられることや、最近の研究で ESBL を産生する ST131 クローンが既に動物病院の犬猫で確認されていることから⁴⁾、今後、市中の健康な犬猫の間でも、人と同じように ST131 クローンが急激に拡散し、人への感染源となりうる可能性が示唆された。また今回猫から IncI1 プラスミドを保有する CTX-M-8 産生株が 1 株確認された (Table 2, sample I)。近年の研究で、この CTX-M-8 を仲介する IncI1 プラスミドは、ニワトリを起源とし、鶏肉を介して人に

伝達された可能性が指摘されており⁵⁾、今後さらなる調査が必要である。

本研究では、三重県の犬猫における ESBL 産生菌の保有状況を初めて明らかにすることができた。しかしながら、犬猫の検体数が少ないことや治療歴が不明な点など課題も多い。また、市中にいる健康な犬猫と動物病院の犬猫の耐性菌保有状態の違い等、不明な点も多いことから、今後も引き続き犬猫の検体を収集しサーベイランスを継続していくことが重要であると思われた。

【参考文献】

- 1) Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. **66**, 4555-4558.
- 2) Johnson JR, Clermont O, Johnston B, et al (2014) Rapid and specific detection, molecular epidemiology, and experimental virulence of the O16 subgroup within *Escherichia coli* sequence type 131. J Clin Microbiol. **52**,1358-1365.
- 3) Colpan A, Johnston B, Porter S, et al (2013) *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. Clin Infect Dis. **57**,1256-1265.
- 4) Kawamura K, Sugawara T, Matsuo N, et al (2017) Spread of CTX-Type Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates of Epidemic Clone B2-O25-ST131 Among Dogs and Cats in Japan. Microb Drug Resist. **23**,1059-1066.
- 5) Norizuki C, Wachino JI, Suzuki M, et al (2017) Specific blaCTX-M-8/IncI1 Plasmid Transfer among Genetically Diverse *Escherichia coli* Isolates between Humans and Chickens. Antimicrob Agents Chemother. **24**,61(6).

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団に深謝致します。

【経費使途明細】

研究用消耗品費	
3130pop-7ポリマー	146,000
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	135,500
5 × Sequencing Buffer	7,000
Big DyeXterminator	26,400
小計	314,900
消費税	25,192
合計	340,092