

## 19. ヒトおよび肉用鶏から分離された基質特異性拡張型βラクタマーゼ産生菌の関連性の調査

○廣井みどり（静岡県環境衛生科学研究所）  
高橋奈緒美（静岡県環境衛生科学研究所 現所属：静岡県下水道公社）  
飯田奈都子（静岡県環境衛生科学研究所）  
神田 隆（静岡県環境衛生科学研究所）  
杉山寛治（静岡県環境衛生科学研究所）

### 1. 目的

世界的に薬剤が効かない細菌の増加が問題となっており、薬剤耐性菌は環境中を伝播し、循環していると考えられている。近年、医療分野で、ペニシリン系薬から第1～第3世代のセファロスポリン系薬まで分解することのできる基質特異性拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌が増加傾向にあり、治療や術後感染症予防などに広く用いられるセファロスポリン系薬に耐性を示す菌として問題となっている。日本におけるESBL産生菌の主な遺伝子型はCTX-M型となっており、我々が肉用鶏から分離したESBL産生菌の遺伝子型と一致していた<sup>1)</sup>。また、他の機関の報告でも家畜からESBL産生菌が分離されている。我々の調査結果<sup>2)</sup>から、肉用鶏由来ESBL産生菌も、巨大プラスミド上にESBL遺伝子を保有しており、接合伝達により容易に遺伝子を伝達することを確認した。また、肉用鶏糞便の60%（n=30）からESBL産生菌が分離されたことから、食肉の汚染を介してヒトの腸内へESBL産生菌やESBL遺伝子を伝達している可能性が考えられる。薬剤耐性菌は、薬剤を使用することにより動物体内で選択され増加すると考えられるが、現在日本ではセファロスポリン系薬剤の肉用鶏に対する使用は承認されておらず、ESBL産生菌が高率に分離される原因は不明である。ヒトと肉用鶏から多く分離されるESBL産生菌のESBL遺伝子型は類似しているが、ESBL産生遺伝子はプラスミドを介して他の腸内細菌へ伝播すると考えられており、ESBL産生遺伝子の存在するプラスミドの比較を行うことにより、ヒト由来株と肉用鶏由来株の関連性を調査し、発生原因究明の一助とすることを目的とした。

### 2. 材料および方法

#### 1) 菌株

2000～2007年に一医療機関で患者から分離されたESBL産生菌（*Escherichia coli* : CTX-M-2型；7株、CTX-M-14型；10株、*Klebsiella pneumoniae* : CTX-M-2型；2株、*Klebsiella oxytoca* : CTX-M-2型；1株）、2007年に健常人から分離したESBL産生菌（*E. coli* : CTX-M-14型；3株、*K. pneumoniae* : CTX-M-2型；1株）、2005～2007年にブロイラーから分離され

た ESBL 産生菌 (*E. coli*: CTX-M-2 型; 29 株、CTX-M-14 型; 9 株、*K. pneumoniae*: CTX-M-2 型; 1 株) を用いた。

## 2) 接合伝達試験

接合伝達試験は *E. coli* DH5 $\alpha$  (Takara) をリファンピシンを含有した普通寒天 (日水) 上で継代し、高度に耐性を付与した菌株を用い、液体培養法により行った<sup>3)</sup>。1 夜培養のドナー、レシピエントの菌液をそれぞれ 0.1 mL ずつ 1 mL の LB ブロスに加えた。混合液を 1 夜培養した。混合液を 1 エーゼとり 6 分の 1 に区切った選択平板の 1 区画に塗抹した。以上の過程で混合液を塗抹した選択平板は 24 時間 37°C で培養し、トランスコンジュガント (接合伝達株) を得た。接合伝達株を分離するための培地には、リファンピシン (50  $\mu$ g/mL) および CTX (1  $\mu$ g/mL) 含有 BTB Lactose Agar (Merck) を使用した。平板上に発育した無色のコロニーを釣菌し、単離した後、ディスク法により ESBL 産生確認試験を行った。

## 3) プラスミドプロファイル

接合伝達株の plasmid DNA は Kado&Liu の変法<sup>4)</sup>により抽出した。

## 4) 薬剤感受性試験

ESBL は、元来ペニシリン系薬剤を分解していた  $\beta$  ラクタマーゼが変異して基質特異性を拡張したものや、*Kluyvera* 属菌の遺伝子由来のものがあり、第 3 世代セフェム系の CTX やセフトアジジム (CAZ) までも分解することができる酵素で、ESBL 産生菌は、第 3 世代セフェム系薬剤に対する MIC が 2  $\mu$ g/mL 以上を示し、 $\beta$  ラクタマーゼ阻害剤であるクラブラン酸 (CVA) により産生酵素の作用が阻害されることが特徴であることから、接合伝達試験で得られた接合伝達株について、Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) の方法に従って ESBL 産生菌の確認試験を行った。CTX および CTX と CVA の合剤の阻止円を計測し、単剤の阻止円と比較して、 $\beta$  ラクタマーゼ阻害剤の CVA との合剤のディスクの阻止円が 5mm 以上拡大した場合を陽性とした。また、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、ホスホマイシン (FOM)、シプロフロキサシン (CPFX)、ゲンタマイシン (GM)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム (ST) についてもディスク拡散法により薬剤感受性を調査した。

## 5) プラスミドの制限酵素切断パターンによる比較

Kado&Liu の変法により抽出した接合伝達株の plasmid DNA を、制限酵素 *EcoR* I、*Sph* I および *Cla* I (Takara) を用いて消化した。その後、0.7% SeaKem Gold Agarose で 100 V、2 時間の条件で電気泳動した。ゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色しトランスイルミネーター下で撮影した。得られた制限酵素切断パターンについて各株間で比較した。

## 6) パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法

プラスミドの制限酵素切断パターンによる比較において、パターンの一致する株について、腸管出血性大腸菌の解析時に用いられるパルスネット・プロトコールに従い PFGE 法による解析を行った。

### 3. 結果および考察

#### 1) 接合伝達試験

患者由来では、CTX-M-2型 *E. coli* で7株中6株、CTX-M-14型 *E. coli* で10株中8株、全ての *K. pneumoniae* および *K. oxytoca* から、供試菌株の接合伝達株が得られた。健常人由来では、CTX-M-14型 *E. coli* で3株中1株、CTX-M-2型 *K. pneumoniae* で1株中1株から、ブロイラー由来では、CTX-M-2型 *E. coli* で29株中13株、CTX-M-14型 *E. coli* で9株中7株、CTX-M-2型 *K. pneumoniae* 1株から、供試菌株の接合伝達株が得られた。患者由来株の接合伝達株を得られた割合は、健常人およびブロイラー由来株から得られた接合伝達株の割合よりも高い傾向にあった。

#### 2) プラスミドプロファイル

接合伝達株の多くは数十 MDa の巨大プラスミドの存在を示す単一のバンドが認められたが、複数のプラスミドが伝達したと考えられる株が6株認められた。再度コロニーを選択し、4株については単一バンドを認める株が得られたが、2株が複数バンドの株しか得られなかったため、単一バンドを認める合計38株について、その後のプラスミド解析および薬剤感受性試験に用いた。

#### 3) 薬剤感受性試験結果

全ての接合伝達株が CTX 耐性であり、ESBL 陽性であった。患者および健常者由来の CTX-M-2 型の接合伝達株は全て TC 耐性を示した。また、そのうち8株はレシピエント株と比べて GM に対する阻止円の縮小が認められた。ブロイラー由来の CTX-M-2 型接合伝達株も13株中10株が TC 耐性を示したが、GM における阻止円の縮小は認められなかった。患者および健常者由来の CTX-M-14 型の接合伝達株は TC および ST 耐性が1株、TC 単剤耐性が1株、GM における阻止円の縮小を示した株が1株認められた。ブロイラー由来の CTX-M-14 型接合伝達株においては、CTX 以外に耐性は認められなかった。それぞれの株の由来および CTX-M 型の違いにより特徴が認められた。

#### 4) プラスミドの制限酵素切断パターンおよび PFGE 法による比較

CTX-M-14 型接合伝達株由来のプラスミドの *Sph I* による切断パターンを示した(図1)。患者および健常人由来プラスミドでは、それぞれ独自のパターンを示した。バンドの一部が類似したものも認められた。ブロイラー由来プラスミドでは、ほぼ同一のパターンを示した。ヒトとブロイラー由来プラスミド間で一致するパターンは認められなかった。*EcoRI* および *ClaI* によるパターンも同様の傾向を示し、ブロイラーのパターンは農場や分離時期の違いを超えて一致しており、同一起源のプラスミドが拡散している可能性が示唆された。また、ヒト由来株では多様なプラスミドが存在することが明らかとなった。

CTX-M-2 型接合伝達株由来のプラスミドの *Sph I* による切断パターンを示した(図2)。全体的な切断パターンは類似しているが、バンドの本数とサイズがやや異なるグループが、ヒト由来およびブロイラー由来株でそれぞれ数種類認められた。また、丸印で示したパターンは全く異なっていた。しかし星印で示したパターンは患者由来株1株とブロイラー由

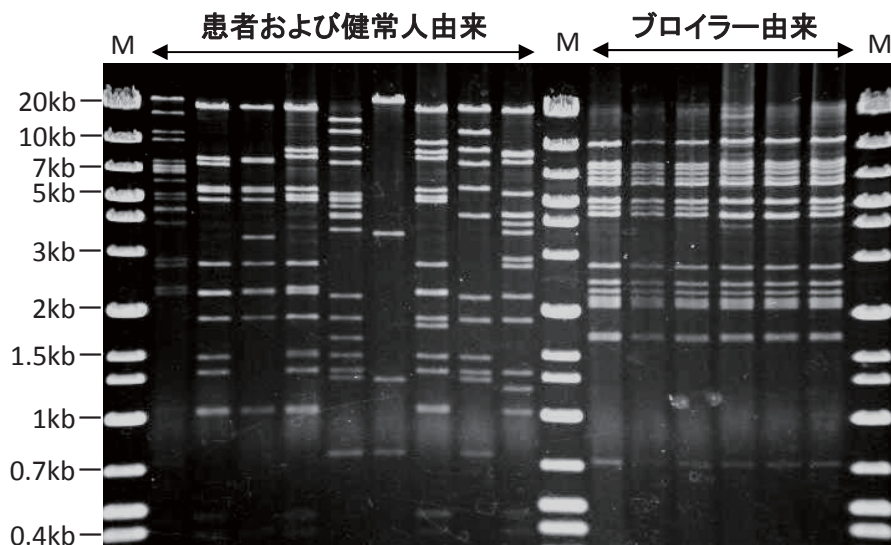


図1. CTX-M-14型接合伝達株由来プラスミドの制限酵素切断パターン

来株 2 株で一致していた。これらの 3 株は、薬剤感受性においても CTX および TC に対し耐性を示し、一致した薬剤感受性パターンを示していた。*EcoRI* および *ClaI* によるパターンも同様の傾向を示した。これらの 3 株の分離年は異なっており、PFGE パターンも異なっていた。CTX-M-2 型のヒト由来株 10 株とブロイラー由来株 13 株の比較において一致するパターンが存在したことは公衆衛生上注視する必要があると考えられる。これらのことから、同一起源のプラスミドが接合伝達などにより大腸菌間を伝播し、患者とブロイラーに分布している可能性が考えられた。オランダでは既に、鶏由来の大腸菌やプラスミドが鶏肉を介してヒトへ伝播している可能性が報告されており<sup>5)</sup>、日本においても ESBL 遺伝子をコードするプラスミドが鶏肉を介してヒトに伝播する可能性が考えられるため、プロ

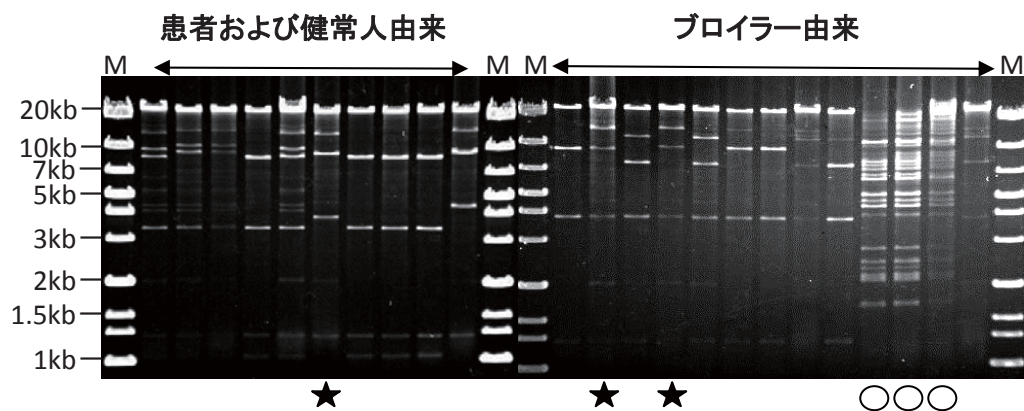


図2. CTX-M-2型接合伝達株由来プラスミドの制限酵素切断パターン  
(制限酵素; *SphI*)

イラーにおける ESBL 産生菌の発生防止対策が必要と考えられる。今後は、ヒト由来およびブロイラー由来でパターン的一致したプラスミドの塩基配列を解析することが必要と考えられる。

#### 4. 参考文献

- 1) Hiroi, M., Harada, T., Kawamori, F., et al. 2011. A survey of  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from farm animals and raw retail meat in Shizuoka prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **64**, 153-155 (2011).
- 2) Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., et al. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J. Vet. Med. Sci.*, 2011 Oct 7. [Epub ahead of print].
- 3) 中谷 林太郎 他著, 日本細菌学会教育委員会 (編) . 1983. R プラスミドの分子遺伝学的実験法 第1版. 根菜出版
- 4) Sasakawa, C., Kamata, K., Sakai, S. et al. 1986. Molecular Alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **51**: 470-475.
- 5) Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., et al. National ESBL surveillance group. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 873-880.

#### 6. 経費使途明細

費目	内訳	金額 (円)	備考	
支出	消耗品	13,965	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ コンピ <sup>®</sup> テントセル	
		13,860	Ligation High Ver.2	
		7,980	<i>Sph</i> I	
		18,900	KOD-Plus-Neo	
		169,436	0.2ml 8連PCRチューブ <sup>®</sup> ほか	
		58,867	カスタムプライマー	
		7,245	クロラムフェニコール30ほか	
		9,786	リザーバー	
		6	文具	タビインデックス
		収入	利息	銀行利息
		計	300,000	