

32. 牛における薬剤耐性βラクタマーゼ産生菌の 保有実態に関する包括的調査研究

○荻田 堅一（兵庫県健康生活科学研究所）

【はじめに】

近年、抗菌性物質が効かない薬剤耐性菌（AMR）による感染症の増加が国際的な問題となっている。WHO は 2015 年総会での AMR 問題に対するグローバル・アクション・プランによって、加盟国へ 2 年以内に国家行動計画の策定と実行を要求している。これを受けて、わが国でも 2016 年 4 月に関係閣僚会議において AMR 対策アクションプランが決定され、ワン・ヘルスアプローチの視点から、関係機関が協働して分野横断的に取り組むこととなった。

AMR の中でもヒトに最も脅威とされているものの一つがカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（CRE）で、これは「最後の砦」と言われるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示すため、治療薬の選択に限界が生じていること等が問題となっている。CRE の薬剤耐性に関与するカルバペネマーゼ遺伝子の多くはプラスミド上に存在するため、腸内細菌科の間で菌種を超えて耐性機能が伝達する。この腸内細菌科細菌は、ヒトのみならず牛、豚や鶏などの家畜等に加えて、犬、猫や野鳥などの腸管内に広く常在し、食肉や様々な生活環境からの感染の可能性が指摘されている。

家畜が有する AMR については動物医薬品検査所が 1999 年からモニタリング（JVARM）を行っているが、これにはカルバペネム系薬剤は含まれておらず、また国内における調査報告も少なく、家畜における CRE 保有状況の解明は今後の課題となっている。

AMR 問題において家畜のモニタリングは必須であるものの、多種多様な細菌が共存する腸内容物から薬剤耐性菌を選択的にモニタリングするための標準的な手法は提示されておらず、迅速で省力的なスクリーニング法の開発が期待されている。

【研究の目的】

本研究では、牛の腸内容物からの薬剤耐性遺伝子の効率的なスクリーニング法の検討および兵庫県産牛におけるカルバペネマーゼ遺伝子等の薬剤耐性遺伝子の保有実態の調査を目的とした。

【実施内容】

当初の研究計画の一部を変更して、下記のとおり実施した。

1. 薬剤耐性遺伝子を検出するためのマルチプレックス PCR 法の検討
2. コロニースイープ法による薬剤耐性遺伝子スクリーニング法と抗菌性物質添加培地による薬剤耐性菌スクリーニング法の検討
3. 兵庫県産牛の耐性遺伝子保有状況の調査

【材料および方法】

1. マルチプレックス PCR 法の検討

今回の調査対象とした β ラクタマーゼ遺伝子を、①カルバペネマーゼ遺伝子 5 種類(KPC、NDM、IMP、VIM、OXA-48)、②ESBL 遺伝子 3 種類(TEM、SHV、CTX-M)、③AmpC β ラクタマーゼ遺伝子 6 種類(MOX、CIT、DHA、ACC、EBC、FOX)の 3 グループに分け、それぞれの遺伝子を増幅するプライマーを混合したマルチプレックス PCR 反応系の確立を試みた。国立感染症研究所から分与された DNA テンプレートを用いて、反応条件等を検討し、その結果を表 1 に記載した。

2. コロニースイープ法による薬剤耐性遺伝子のスクリーニング

検体には、兵庫県内で飼育され、平成 27 年 12 月から平成 28 年 3 月にと畜場に搬入された牛 100 頭の腸内容物を用いた。腸内容物約 10 g を 9 倍容量の mEC 液体培地で、37°C で 24 時間増菌培養後、DHL 寒天培地に画線塗抹し、37°C で 24 時間培養した。DHL 寒天培地上のコロニー密集部分のコロニースイープ法による菌塊を、50 mM NaOH 50 μ l に懸濁し、95°C で 10 分加熱した。1M Tris-HCl(pH7.0) 8 μ l を加えて中和し、13000rpm で 5 分遠心分離した上清を PCR 用テンプレートとしてマルチプレックス PCR 法を実施した。ここで耐性遺伝子が増幅された検体は、コロニースイープした菌塊を DHL 寒天培地上で画線分離し、*E.coli* 様コロニーを数個から 30 個程度釣菌し、コロニースイープマルチプレックス PCR 法で検出された耐性遺伝子を個別 PCR で検出した。

3. 抗菌性物質添加培地による薬剤耐性菌および耐性遺伝子の検出

耐性株スクリーニングには、メロペネム(MEPM)およびセフトキシム(CTX)を、mEC 液体培地および DHL 寒天培地にそれぞれ 1 μ g/ml 添加、同時に、グラム陽性菌の発育抑制にバンコマイシンを 8 μ g/ml 添加した。コロニースイープ PCR 法に使用した培地上の菌塊の一部を抗菌性物質添加 mEC 液体培地に接種し、37°C で 24 時間培養した。菌の発育が確認された液体培地は、抗菌性物質添加 DHL 平板上に画線塗抹し、37°C で 24 時間培養した。平板上の *E.coli* 様のコロニーについて、PCR による耐性遺伝子の検出を行った。

4. シークエンシングによる薬剤耐性遺伝子型別

PCR 増幅した耐性遺伝子 DNA は、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定し、BLAST 検索により遺伝子型を決定した。

5. 菌種の同定

耐性遺伝子が検出された菌株は、TSI、LIM 等の鑑別培地や細菌同定検査キット(アピ 20)により生化学性状を調べ、菌種を同定した。

【結果】

コロニースイープ法及び抗菌性物質添加培地によるスクリーニングの結果を表2に示した。カルバペネマーゼ遺伝子および AmpC β ラクタマーゼ遺伝子は全ての検体で検出されなかった。コロニースイープ法では ESBL 遺伝子の内、CTX-M 型及び SHV 型がそれぞれ 3 検体から、TEM 型

が 58 検体から検出された。TEM 型では、58 検体の内 19 検体から遺伝子を保有した菌株が分離され、全て *E.coli* であった。DNA の塩基配列から、これらの TEM 型は全て TEM-1 と判明した。CTX-M 型及び SHV 型についても菌分離を試みたが、これらの遺伝子を保有する菌株は分離できなかった。

1 $\mu\text{g/ml}$ の MEPM を添加した mEC 液体培地では全ての検体で菌の発育が認められず、1 $\mu\text{g/ml}$ の CTX を添加した mEC 液体培地および DHL 寒天培地では 7 検体で菌の発育が確認された。この 7 検体は、PCR による薬剤耐性遺伝子の検出の結果、5 検体で CTX-M 型が陽性となった。これらの塩基配列から 4 株は CTX-M-15、1 株は CTX-M-14 と判明した。これら 5 株は全て *E.coli* であった。残りの 2 検体からは耐性遺伝子は検出されなかった。

【考察】

海外では、CRE は家畜および環境からの散発的な検出例が報告されているものの、国内における家畜の CRE 保有実態についてはほとんど報告がなされていない。一方、厚生労働省の院内感染サーベイランス(JANIS)によると、ヒトにおける主要な腸内細菌科細菌の MEPM に対する耐性率は 0.2 から 1.3%と低値であるが、緑膿菌のように 14.4%と比較的高値を示す菌種もある⁵⁾。今回の我々の牛 100 頭の調査では、コロニースイープ法および抗菌性物質添加培地による培養法の両方でカルバペネマーゼ遺伝子は検出されなかった。ただ、耐性菌または耐性遺伝子が、ヒトから家畜へと菌種を超えて伝達する可能性があることから、継続的なモニタリングにより新たな耐性菌の出現を監視する必要がある。

コロニースイープ法は、通常の検査法と比べて *E.coli* の病原遺伝子の検出において優位性が認められており⁴⁾、特に、様々な菌種が多数共存している便などから、特定の遺伝子を持った少数の菌を検出する場合に有効と考えられる。今回の薬剤耐性遺伝子のスクリーニングにおいて、コロニースイープ法で CTX-M 型遺伝子が 100 検体中 3 検体(3%)から検出された。JVARM の報告によると、農場または畜場における牛から分離された *E.coli* の CTX に対する耐性率は、0 から 4.2%とされており⁶⁾、我々の調査結果と大きく乖離していないことから、コロニースイープ法をスクリーニングに応用できるものと思われるが、更なるデータの追加による確認が必要である。

一方、CTX 添加培地によるスクリーニング法では、5 検体から CTX-M 型遺伝子を持った ESBL 産生菌が検出されたものの、そのうち、コロニースイープ法でも CTX-M 型遺伝子が検出されたのは 1 検体だけであり、コロニースイープ法の限界が明らかになった。その反面、コロニースイープ法では CTX-M 型遺伝子を有することが確認されたにもかかわらず、1 $\mu\text{g/ml}$ の CTX を添加した培地では発育しないものが 2 検体あった。これは、耐性機能に関与する他の遺伝子、例えば転写の調節因子などの変異による現象とも思われるが、このような、表現型から薬剤耐性を疑うことが難しい菌をいかに広く検出するかが AMR 対策に重要であると思われる。

【今後の課題】

今回の調査で、牛の腸内容物における薬剤耐性遺伝子のスクリーニング法として、コロニースイ

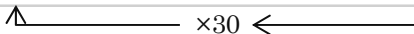
ープ法の有用性を検討した結果、多種類の耐性遺伝子を一齐に検査することができ、簡便性、迅速性に優れていること、また、耐性遺伝子を保有しているにもかかわらず、薬剤耐性を示さない菌を検出できる可能性があることから、スクリーニング法として応用可能であることが示唆された。しかしながら、抗菌性物質添加培地では耐性遺伝子が検出されたものの、コロニースイープ法では検出されなかった検体もあり、検出感度を高める方法を検討していく必要がある。

また、今回の調査では、抗菌性物質添加培地において、ESBL 産生細菌が 100 検体中 5 検体から検出されており、これまでの報告よりも健康牛に定着している可能性があるため、今後もモニタリングを継続していく必要があると思われる。

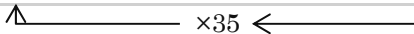
表1 対象遺伝子の種類とプライマーおよび反応条件

遺伝子型	プライマー配列(5'→3')	PCR産物 サイズ	参考文献	遺伝子型	プライマー配列(5'→3')	PCR産物 サイズ	参考文献
SHV	ATGCGTTATATTCGCTGTG	747	2	MOX	GCTGCTCAAGGAGCACACAGGAT	520bp	1
	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA				CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
TEM	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445	2	CIT	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	462bp	1
	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT				TTTCTCCTGAACGTGGTGGC		
CTX-M	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593	2	DHA	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405bp	1
	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG				CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
VIM	GTTTGGTTCGATATCGCAAC	389	3	ACC	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp	1
	AATGCGCAGCACCAGGATAG				TTCGCCGAATCATCCCTAGC		
OXA48	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	3	EBC	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302bp	1
	CATCAAGTTCAACCCAACCG				CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
IMP	CAYGGTTTGGTGGTTCTTGTA	527	オリジナル	FOX	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp	1
	GTAMGTTTCAAGAGTGATGCGT				CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
NDM	CGGGCCGTATGAGTGATTG	657	オリジナル				
	GTTGGCGATCTGGTTTCC						
KPC	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	1				
	TTTTCAGAGCCTTACTGCC						

①ESBL遺伝子

95°C 15min → 94°C 30sec → 60°C 30sec → 72°C 2min → 72°C 10min


②カルバペネマーゼ遺伝子

95°C 10min → 95°C 45sec → 57°C 45sec → 72°C 1min → 72°C 8min


③AmpCβラクタマーゼ

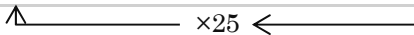
94°C 3min → 94°C 30sec → 60°C 30sec → 72°C 1min → 72°C 5min


表2 スクリーニング結果

コロニースイープ法	カルバペネマーゼ 遺伝子	ESBL遺伝子			AmpC遺伝子
		CTX-M	SHV	TEM	
スクリーニング	0	3	3	58	0
分離菌株からのPCR		0	0	19	
抗菌性物質添加培地	MEPM+DHL	CTX+DHL			
スクリーニング	0	7			
分離菌株からのPCR		5			

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人大同生命厚生事業団に心より感謝いたします。また、牛腸内容物の採取にご協力いただいた兵庫県食肉衛生検査センターの皆様には厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1)平成 24 年度薬剤耐性菌研修会 資料国立感染症研究所「PCR 法による β -ラクタマーゼ遺伝子の検出」, 国立感染症研究所
- 2)Marthie M. E. et al.,:Detection of blaSHV,blaTEMandblaCTX-Mantibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens fromthe Steve Biko AcademicHospital,FEMS Immunol. Med. Microbiol.,**56**,191-196(2009)
- 3) Diana D. et al.:Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases,J.Clin. Microbiol.,**50**,3877-3880(2012)
- 4)馬場愛, 他:福岡市における下痢原性大腸菌による食中毒 2 事例について, 福岡市保健環境研究所報 29 号(2003)
- 5)院内感染対策サーベイランス(JANIS) 検査部門, 公開情報 2014 年 1 月~12 月 年報 (全集計対象医療機関)【CLSI 2012 試行版】
- 6)動物医薬品検査所 HP,<http://www.maff.go.jp/nval/index.html>
- 7)Jean-Yves M. et al.:Prevalence of Fecal Carriage of Acquired Expanded-Spectrum Cephalosporin Resistance in *Enterobacteriaceae* Strains from Cattle in France,J.Clin. Microbiol.,**46**,1566-1567(2008)

【助成金使用明細】

実験器具および消耗品(電動ピペット、チューブラック等)	101,062
細菌培養関連消耗品(培地、シャーレ等)	93,970
PCR 関連消耗品	39,906
薬剤感受性試験関連試薬	68,364
旅費	1,080
振込手数料	648
大同生命厚生事業団助成金	300,000