

15. 福井県におけるβラクタマーゼ遺伝子保有薬剤耐性 大腸菌のペット等への拡散実態と関連性の解明

○永田 暁洋、 岩崎 理美、 横山 孝治、 東方 美保

(福井県衛生環境研究センター)

【研究目的および必要性】

「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2020」¹⁾によれば、ヒト由来大腸菌におけるセフトキシム(CTX)などの第3世代セファロスポリン系抗菌薬等への耐性率は引き続き増加傾向にあり、その原因の一つとして挙げられる基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)遺伝子を保有する薬剤耐性菌の増加に対して、公衆衛生上、特に重点的な対策が必要とされている。

福井県においても、ESBL遺伝子保有薬剤耐性大腸菌は、2013年から2016年にヒトから分離された株の66.2%を占めていた²⁾。本研究で、福井県におけるヒト、ペット、汚水等の環境から分離される大腸菌のESBL遺伝子保有等の実態を明らかにし、それらの関連性を疫学的に明らかにすることで、ESBL遺伝子保有大腸菌をはじめとした薬剤耐性菌の減少に向けた具体的な対策の立案と提言に繋げることができる。

本研究期間では、犬猫から分離された大腸菌を重点的に解析するが、研究期間終了後も継続し、ヒト、環境から分離される大腸菌の解析に発展させ、一連の研究成果により、研究目的を達成させる。

【研究計画】

1. 大腸菌の分離

福井県内の複数の動物病院および動物愛護センターから犬猫の糞便を収集し、CTX含有DHL培地等を用いて大腸菌を分離する。また、当研究センターで保存している過去に分離した薬剤耐性大腸菌も用いる。

2. 血清型別

市販の抗血清を用いて、収集した大腸菌の血清型を同定する。

3. 薬剤感受性試験

Kirby-Bauer法(ディスク法)により、12薬剤に対する感受性試験を行い、薬剤感受性プロファイルの確認や多剤耐性菌を検索する。

4. βラクタマーゼ遺伝子の検出

PCR法、シーケンス解析等の遺伝学的解析により、βラクタマーゼ遺伝子(AmpC型、ESBL型、Carbapenemase型)およびプラスミドのInc型別等を実施する。

5. 分子疫学解析

血清型や薬剤感受性プロファイル、保有遺伝子型が類似している菌株については、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）等の分子疫学解析を行う。

【実施内容・結果】

1. 検体収集および大腸菌の分離

福井県内の 5 動物病院から愛玩犬猫糞便 150 検体および検体情報（性別、年齢、セファロスポリン投薬歴、食餌、生活環境、同居動物の有無）を収集した。主な検体情報の内訳は、動物種は犬 95 頭、猫 53 頭、飼養環境は室内飼育のみが 84 頭、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴は有りが 70 頭、なしが 63 頭、食餌は、ペットフード等市販のフードのみが 124 頭、人の食べ物を与えることがあるが 23 頭などであった。

動物病院由来糞便 150 検体のうち、40 検体から 53 株の CTX 耐性大腸菌を分離した。一方、動物愛護センターから収集した犬猫糞便 29 検体から、CTX 耐性大腸菌は分離されなかった。

検体情報の各要素別にみた CTX 耐性大腸菌の陽性率は、動物種、飼養環境、食餌および出生場所（「ペットショップ等」か「ノラ」か）では有意な差は認められなかったが、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴がある検体では有意に ($p < 0.01$) 高い結果であった。また、動物病院別では、動物病院 A の陽性率 (55.0%) が他の動物病院 (0%~17.5%) より有意に ($p < 0.01$) 高い結果であり、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴がある検体のみで比較した場合でも、動物病院 A の陽性率 (70.0%) は有意に ($p < 0.01$) 高かった。

2. 血清型別および薬剤感受性試験

市販免疫血清（病原大腸菌免疫血清「生研」）を用いて O 血清群型別を実施したところ、O25 が 14 株 (27.9%)、O153 が 11 株 (18.6%)、O1 が 2 株 (4.7%)、O125/O159/O44/O86a が各 1 株および OUT が 17 株 (39.5%) であった。12 剤 (ABPC、SM、GM、KM、NA、CP、FOM、CTX、CAZ、CPF、ST および TC) に対する薬剤感受性試験の結果、4 剤から 12 剤耐性を示し、CTX、CPF を含む 10 剤以上に耐性を示す株が 9 株であった。

3. β ラクタマーゼ遺伝子検出およびプラスミド Inc 型別

PCR 法により 17 種類の β ラクタマーゼ遺伝子 (AmpC 型 6 種、ESBL 型 5 種、Carbapenemase 型 6 種) の検索を行い^{3),4)}、16 株から CTX-M-1G が、11 株から CTX-M-9G が、8 株から CTX-M-2G が、12 株から TEM 型が、3 株から SHV 型が、7 株から CIT 型が、2 株から DHA 型が検出された。Carbapenemase 型は検出されなかった。また、CTX-M 型の一部についてダイレクトシーケンス法により型別を行ったところ、CTX-M-2、CTX-M-14、CTX-M-15 および CTX-M-55 などが検出された。

分離株のプラスミド Inc 型別 (18 種) をマルチプレックス PCR 法により実施したところ⁵⁾、O25 では F I B (8 株)、F II (8 株) および I I (3 株) が主に検出された (表 1)。また、O153 では、F I A (6 株)、B/O (4 株)、I I および F I B (各 3 株) が主に検出された (表 2)。

表1 O25株のプラスミド Inc 型別

菌株 No.	動物病院	動物種	<i>bla</i> 遺伝子	I1	B/O	N	P	FIA	FIB	FII
1	D	猫						+	+	+
2	A	猫							+	
3	A	犬	CTX-M1G							
4	A	犬	CTX-M1G							+
5	A	犬							+	+
6	A	犬	CTX-M1G						+	+
7	A	犬	CTX-M1G, CTX-M9G, CIT				+		+	
8	A	犬	CTX-M1G, CTX-M9G, TEM							
9	A	犬							+	+
10	A	犬	TEM	+						
11	A	猫								
12	A	猫		+						+
13	A	猫	TEM	+					+	+
14	D	犬							+	+

表2 O153株のプラスミド Inc 型別

菌株 No.	動物病院	動物種	<i>bla</i> 遺伝子	I1	B/O	N	P	FIA	FIB	FII
15	C	猫	CTX-M1G, TEM							
16	B	犬	CTX-M1G					+		
17	B	犬	CTX-M1G, CTX-M2G		+	+		+		
18	D	犬	CTX-M9G, SHV							
19	A	犬		+						
20	A	犬	CTX-M2G	+						
21	A	犬	CTX-M2G		+			+	+	
22	A	犬	CTX-M2G, SHV, CIT					+		
23	A	犬	CTX-M2G		+			+	+	
24	A	犬	CTX-M2G	+	+		+			+
25	A	犬	CTX-M2G					+	+	

4. 分子疫学解析

犬猫由来株の主要血清群であったO25 およびO153 について、制限酵素 *Xba* I 処理による PFGE を実施したところ、同一検体採取場所（動物病院 A）由来株の PFGE パターンが高い相同性を示した（図 1、2）。これら分離株の由来検体の採取時期や動物種、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴に関連性は認められなかった。

【考察と今後の課題】

CTX 耐性大腸菌の検体陽性率は 26.7%で、2009 年に犬猫糞便を調査した時⁶⁾の検体陽性率 13.5% (31/230) と比較して陽性率が高くなっており、愛玩犬猫においても第3世代セファロスポリン耐性菌が着実に広がっていると思われた。一方、動物愛護センター由来の犬猫糞便 29 検体から CTX 耐性大腸菌は分離されなかった。収集検体数が少なかったものの、愛玩犬猫糞便の陽性率と比較すると明らかに低い。これは、動物愛護センターの収容犬猫はいわゆるノラが多いため抗菌薬への暴露機会が少なかったことなどによると考えられ、こ

の結果は土壌や河川水などの生活環境から犬猫への薬剤耐性菌伝播のリスクが低い可能性を示していると思われた。

検体情報のうち CTX 耐性大腸菌の陽性率と関連が認められたのは、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴だけで、人間と同じ食餌や生活環境からの伝播の可能性は低いと考えられた。また、特定の動物病院の陽性率が他の動物病院より有意に高く、PFGE の結果でも類似パターンが多く見られたことから、動物病院での院内感染の可能性が示唆された。

分離株のO血清群は、O25 が 14 株およびO153 が 11 株で主流であった。この結果を 2009 年に収集した愛玩犬猫由来の CTX 耐性大腸菌 (23 株) の結果 (O1 が 12 株、O153 が 2 株、O25 が 1 株など) と比較すると主要血清群のシフトが認められ、これはヒトの薬剤耐性大腸菌の影響を受けていると示唆された。

今回検出されたβラクタマーゼ遺伝子は多様で、2009 年の分離株からは検出されなかった CTX-M-2G も多く検出されたこと、またプラスミドの Inc 型別の結果で、同一のO血清群であっても保有するプラスミド型に共通性は少なく多様であったことから、福井県においてもβラクタマーゼ遺伝子が、大腸菌単位ではなくプラスミド単位で拡散していることが示唆された。

本研究で、福井県の愛玩犬猫にβラクタマーゼ遺伝子保有大腸菌が複数の原因で拡散していることが示唆されたことから、動物病院等に向けて抗菌薬の適正使用や院内感染対策の徹底などの周知を図っていく必要がある。

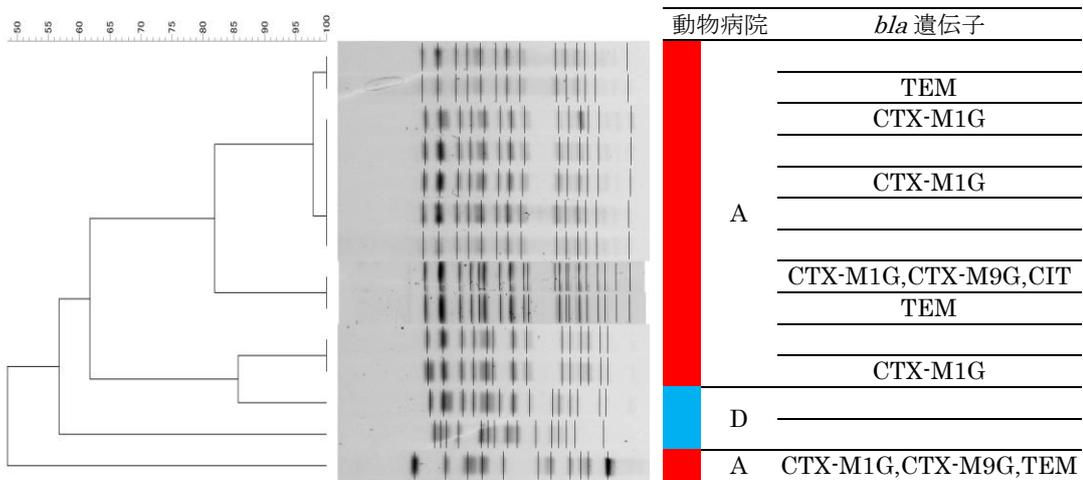


図1 犬猫由来株（血清群O25）のPFGE解析

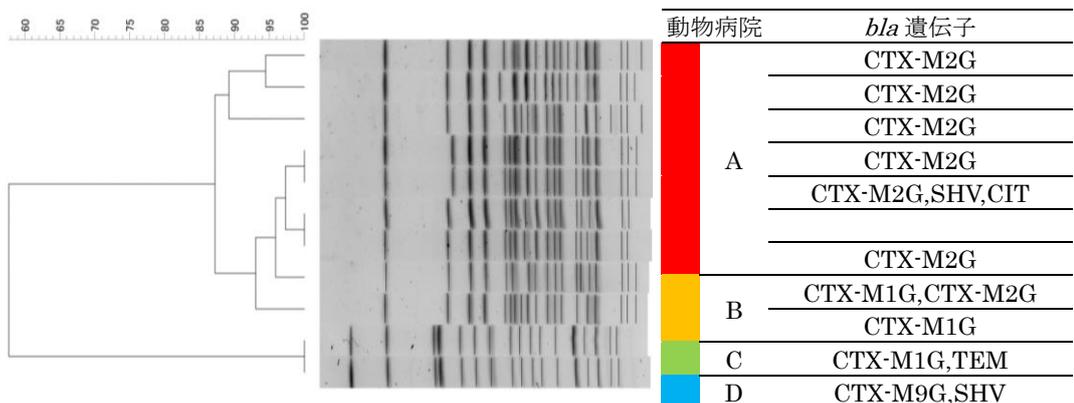


図2 犬猫由来株（血清群O153）のPFGE解析

【参考文献】

- 1) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2020: 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>
- 2) 東方美保ら: 福井県におけるヒト由来薬剤耐性菌の遺伝子解析と耐性遺伝子の伝播状況に関する研究, 福井県衛生環境研究センター年報, 15, 49-54 (2016)
- 3) Nosocomial outbreak of infections by *Proteus mirabilis* that produces extended spectrum CTX-M-2 type β -Lactamase., J Clin Microbiol., 41(12), 5530-5536 (2003)
- 4) Watahiki et al: Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding Enterobacteriaceae carbapenemase., Jpn. J. Infect. Dis., 73, 166-172, (2020)
- 5) Johnson et al: Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. Appl. Environ. Microbiol., 73, 1976-1983 (2007)
- 6) 永田暁洋ら: 福井県内の家庭動物から分離された病原大腸菌、フルオロキノロン耐性大腸菌および CTX-M 型基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子保有大腸菌, 福井県衛生環境研究センター年報, 10, 33-39 (2011)

【経費使途明細】

使 途	金 額
消耗品費 (培地)	8,883 円
検査器材 (培地分注ピペット)	116,875 円
消耗品費 (プライマー)	15,400 円
消耗品費 (シーケンス試薬等)	135,850 円
消耗品費 (マイクロチップ)	18,612 円
消耗品費 (テープ等)	5,170 円
合 計	300,790 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円