

27. 大阪府内で分離された腸管出血性大腸菌主要 3 血清群 の薬剤感受性と耐性遺伝子の探索

○西嶋 駿弥 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*; EHEC) 感染症は感染症法で三類感染症に位置付けられており、接触者の検査や患者の就業制限などの行政対応が必要となる場合がある。2021年に地方衛生研究所から報告されたEHECの全検出数におけるO157、O26、O111血清群の割合は、それぞれ、47.1%、18.2%、9.3%で合計70%を超えており、この主要3血清群への対応がEHEC感染症を制御する上で重要になる。EHEC感染症治療における抗菌薬の使用について、国際的な統一見解は得られていないものの、我が国ではしばしば抗菌薬が用いられる。特に小児に対しては、重症化を予防する目的で発症早期にホスホマイシン (FOM) を投与することが、国内の感染症治療のガイドラインに示されている [1]。近年、国内で分離されるEHECにおいて、FOMに対して耐性あるいは低感受性を示す株が報告され、重症化や治療の長期化を招くことが懸念されている [2、3]。FOM耐性の機序は、これまでに輸送系 (UhpT系; グルコース6リン酸 [Glucose-6-phosphate; G6P]などを輸送する糖リン酸輸送系、GlpT系; *sn*-グリセロール-3-リン酸輸送系) の変異、標的酵素 (UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase) の変異または過剰産生およびFOM不活化酵素によるものが報告されている [4]。特に、FOM不活化酵素をコードしているFOM耐性遺伝子は、伝達性プラスミド上にコードされているものが多く、水平伝播による拡大が懸念されている。

本研究では、2019年から2021年に大阪府内で分離されたEHEC主要3血清群の薬剤耐性状況を明らかとするため、FOMを含む様々な薬剤に対する感受性を調査した。さらに、FOMの感受性が低下した株については、FOM耐性遺伝子の保有とUhpT系の機能を調べた。

【研究の必要性】

近年、様々な薬剤耐性菌の出現が世界的な問題となっている。また、国内で分離されたEHECについて、FOM耐性菌が散見されるが、それらの耐性機構や遺伝学的関連性について

は不明な点が多い。そこで、大阪府で分離された EHEC の薬剤耐性の状況、特に FOM 耐性菌の実態を調査する必要があると考えられた。

【研究計画】

1. 研究対象の菌株

2019 年 5 月から 2021 年 12 月までに分離された EHEC 0157 (118 株)、026 (35 株)、0111 (4 株)のうち、反復配列多型解析 (Multilocus Variable-number tandem-repeat Analysis; MLVA) の結果から、MLVA 型が異なる 96 株を供試株とした。MLVA は Izumiya らの方法に基づいて実施し [5]、0157 は 81 種類、026 は 12 種類、0111 は 3 種類に型別された。

2. 薬剤感受性試験

供試株について、米国臨床検査標準協会 (CLSI) に準拠した Kirby-Bauer 法 (KB 法、ディスク拡散法) で薬剤感受性試験を実施した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、イミペネム (IPM)、ノルフロキサシン (NFLX)、シプロフロキサシン (CPFX)、ナリジクス酸 (NA)、ST 合剤 (SXT)、メロペネム (MEPM)、セフトジジム (CAZ)、ホスホマイシン (FOM)、クロラムフェニコール (CP)、セフォキシチン (CFX)、アミカシン (AMK)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、セフトジジム/クラブラン酸 (CAZ/CLA) の 18 薬剤を使用した。ただし FOM については、日本 BD から市販されている FOM を 50 µg 含有したディスクを使用した。また、FOM に対する感受性、中間、耐性の判定は製品に添付の判定基準に従った。

FOM の最小発育阻止濃度 (MIC) は、CLSI に準拠した寒天平板希釈法で測定した。CLSI の FOM のブレイクポイントは、尿路感染症由来の大腸菌のみを対象に定められているため、本研究では MIC 値で感受性、中間、耐性の判定を実施しなかった。

3. FOM 耐性遺伝子の検出

FOM の MIC が 16 µg/mL 以上の菌株について、*fosA*、*fosA3*、*fosC2* を PCR 法により検出した。PCR のプライマーは Hou らの方法に従った [6]。

4. UhpT 系の機能の評価

FOM の輸送系の 1 つである UhpT は、G6P の存在下で誘導・産生され、G6P を細胞質内へ能動輸送する。MIC が 16 µg/mL 以上の菌株について、UhpT 系の機能の評価するために、Takahata らの方法に準じて、0.2% の G6P を含む M9 最小培地での発育性を確認した [7]。

【実施内容・結果】

1. KB 法の結果と寒天平板希釈法による FOM の MIC 分布

表 1 に 0 血清群ごとの薬剤耐性パターンを示した。0157 (81 株) では、1 剤以上に耐性を示した株は 16 株で、うち 2 剤以上に耐性を示した株は 13 株であった。0111 (3 株) では、供試株のすべてが 1 剤以上に耐性を示し、うち 2 株は 4 剤以上に耐性を示した。026 (12 株) では 1 剤以上に耐性もしくは中間を示した株は 5 株で、うち 2 剤以上に耐性を示した株は 2 株であった。026 では他の 0 血清群と異なり、FOM に対して耐性もしくは中間を示す株が合計 3 株確認された。0157、0111、026 のいずれもニューキノロン系、およびセフェ

ム系薬剤に耐性を示さなかった。

図1に各0血清群におけるFOMのMIC分布を示した。0157、0111ではすべての株のMICが4 µg/mL以下になった。一方で、026では6株で16 µg/mL以上を示し、0157、0111と比較して、MIC値が高い株が多かった。MICが512あるいは512 µg/mL以上を示した2株は、KB法で耐性と判定された。また、32 µg/mLを示した1株は、KB法で中間と判定された。

図3に026のMLVA結果と各菌株の薬剤耐性パターンをMinimum Spanning Tree (MST)で示した。EHECのMLVAでは、2遺伝子座違いまでであれば遺伝学的関連性が高いと考えられるが、FOMのMICが16 µg/mL以上の6株はすべて、4遺伝子座以上異なり、関連性はないと考えられた。

2. FOM耐性遺伝子の検出とUhpTの機能の評価

PCRにより、FOMのMICが512 µg/mL以上を示した2021H010から*fosA3*が検出された。また、本菌株は0.2%のG6Pを含むM9培地に発育が確認された。その他の5株は、*fosA*、*fosA3*、*fosC2*をいずれも保有しなかったが、0.2%のG6Pを含むM9培地に発育しなかったことから、G6Pの取り込みが阻害されていると考えられた(表2)。

【考察と今後の課題】

2015年から2021年に国内で分離されたヒト由来EHECの薬剤耐性率は、20~30%程度で推移している[8]。2019年から2021年に大阪府で分離されたEHEC主要3血清の薬剤耐性率は26%であり、国内の状況と相違はなかった。また、0血清群ごとのFOMのMIC分布から、0157、0111と比較して、026はFOMに対する感受性が低下しやすい可能性が示された。これまでも、026はFOMのMIC値が他のEHECと比較して高い傾向にあるという報告があり、本研究でも同様の結果となった[2、3]。また、MLVAの結果から、FOMのMICが16 µg/mL以上の株について、それぞれ遺伝的関連性は低いと考えられた。今後は、耐性機構の調査やより詳細な分子系統解析を実施することで、026でFOM耐性株や感受性の低下した株が出現する原因を明らかにする必要がある。

本研究で、FOM耐性遺伝子である*fosA3*を保有する株が確認された。*fosA3*は、*fosA* subtypesの中で最も頻繁に検出される。*fosA3*を保有する大腸菌は、尿路感染症患者やペット、家畜、食肉から分離されているが[9]、これまで国内で*fosA3*を保有するEHECは、我々が知る限り報告されていない。既報では、*fosA3*は伝達性プラスミド上にコードされていることが知られており、他のEHECに水平伝播することが懸念される[9]。今後は、今回検出された*fosA3*がプラスミド上にコードされているかを確認した上で、プラスミドの構造解析および他の菌株への接合伝達能を確認する必要がある。また、耐性遺伝子非保有株が0.2%G6Pを含むM9最小培地に発育しなかったことから、UhpT系になんらかの障害があり、FOMの菌体への取り込みが阻害されている可能性が示唆された。今後、G6Pの能動輸送系をコードする遺伝子(*uhpT*)の発現量が低下しているかを確認する必要があると考えられた。また、GlpT系の変異や標的酵素の変異、過剰発現の有無を解析することで、EHEC 026におけるFOMの耐性化や低感受性化の要因を究明する予定である。

【参考文献】

- [1] 大西健児ら 日本化学療法学会雑誌 64 (1) 31-65 2015
 [2] 白鳥浩美ら 愛知衛所報 72 11-17 2022
 [3] Midori Hiroi *et al.* Jpn. J. Infect. Dis. 65 198-202 2012
 [4] Vincent Cattoir *et al.* Future Microbiol. 13 (16) 1693-1696 2018
 [5] Hidemasa Izumiya *et al.* Microbiol. Immunol. 54 (10) 569-577 2010
 [6] Jianxia Hou *et al.* Antimicrob. Agents Chemother. 56 (4) 2135-2138 2012
 [7] Sho Takahata *et al.* Int. J. Antimicrob. Agents 35 (4) 333-337 2010
 [8] 厚労科研（食品の安全確保推進研究事業）令和3年度分担研究報告書 ワンヘルスに基づく食品由来薬剤耐性菌のサーベイランス体制強化のための研究
 [9] Tsung-Ying Yang *et al.* J. Microbiol. Immunol. Infect. 52 (1) 9-21 2019

【経費使途明細】

使 途	金 額
薬剤感受性試験用の試薬類	107,837 円
PCR 試薬	74,624 円
プラスチック製品	44,730 円
その他の試薬	69,905 円
振込手数料	2,904 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円

表 1. KB 法による主要 3 血清群における薬剤耐性パターン

薬剤耐性パターン	0157	026	0111	合計
ABPC, KM, NA, SM, TC			1	1
ABPC, SXT, CP, SM, TC	1			1
ABPC, CP, SM, TC	2		1	3
ABPC, SXT, SM, TC		1		1
SXT, CP, SM, TC	6			6
ABPC, SM, TC	1			1
ABPC, SXT, SM	1			1
CP, SM, TC	1			1
ABPC, SM	1			1
FOM, CP		1		1
SM	3			3
TC		1		1
FOM		1 (1)		1 (1)
CP			1	1
合計	16	4 (1)	3	23 (1)

() は中間の株数を示す。

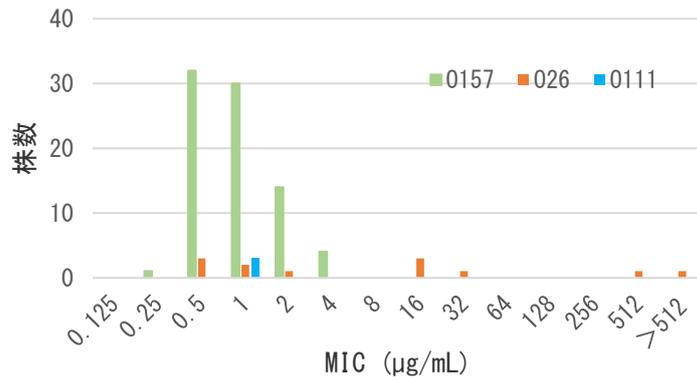


図1. 主要3血清群におけるFOMのMIC分布

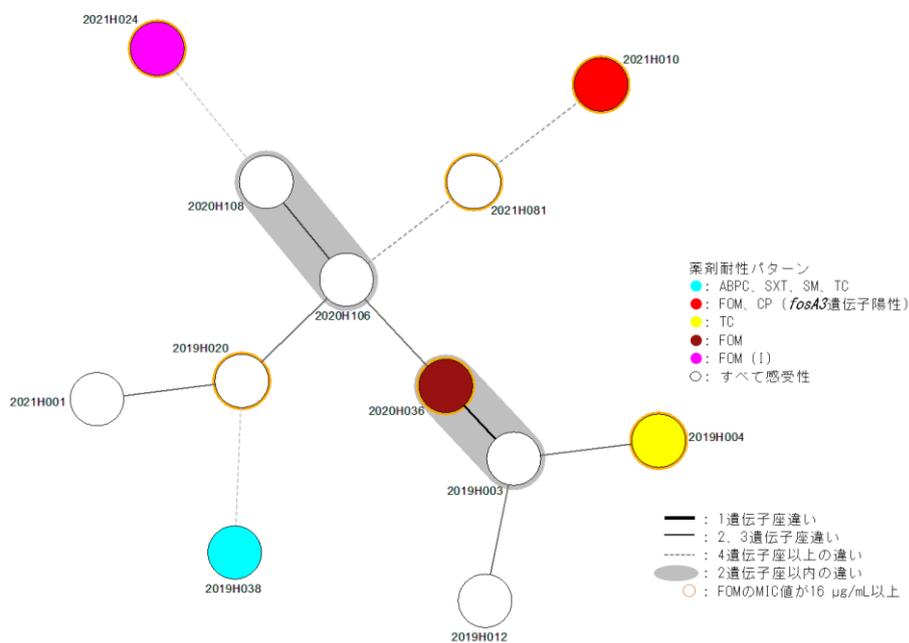


図2. 血清群026のMLVAに基づくMST

表2. FOMのMICが16 μg/mL以上を示した菌株の0血清群および薬剤耐性パターン、FOMのMIC、0.2%G6P含有M9培地への発育性、FOM耐性遺伝子 (*fosA*, *fosA3*, *fosC2*) の保有状況

菌株番号	0血清群	薬剤耐性パターン (KB法)	FOMのMIC (μg/mL)	0.2%G6P含有M9培地での発育	FOM耐性遺伝子の保有
2019H004	026	TC	16	-	-
2019H020	026	すべて感受性	16	-	-
2020H036	026	FOM	512	-	-
2021H010	026	FOM、CP	>512	+	+ (<i>fosA3</i>)
2021H024	026	FOM (I)	32	-	-
2021H081	026	すべて感受性	16	-	-

NT: Not Tested (I): 中間