

[ノート]

兵庫県産牛由来大腸菌における β -ラクタマーゼ遺伝子保有実態及び 分子疫学的性状に関する調査

荻田 堅一* 齋藤 悦子 坂野 桂 秋山 由美

Investigation for Prevalence of Harboring β -Lactamase Genes and Characteristics of *Escherichia coli* Isolated from Healthy Cattle in Hyogo Prefecture

Kenichi OGITA*, Etsuko SAITO, Katsura SAKANO and Yumi AKIYAMA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science, 1819-14, Kanno, Kanno-cho, Kakogawa-city 675-0003, Japan

We investigated the prevalence of harboring β -lactamase genes of *Escherichia coli* from healthy cattle in Hyogo Prefecture. While carbapenemase genes were not detected, 6 *E. coli* strains producing CTX-M-type ESBL genes were isolated in intestinal content samples. These results assumed that healthy cattle were not largely involved in the direct dissemination of the drug resistance genes. However, since ESBL producing *E. coli* strains harbored several virulence genes which likely contribute to harm human health, continuous monitoring of *E. coli* from cattle and investigation in more detail were considered to be necessary for public health.

I 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。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、これはグラム陰性菌に対して「最後の砦」と言われるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示し、治療薬の選択に限界が生じているためである。CRE の薬剤耐性に関与するカルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在することが多いため、腸内細菌科細菌の中で菌種を超えて耐性機能が水平に伝達する。このカルバペネム耐性腸内細菌科細菌は、ヒトのみならず牛、豚及び鶏などの家畜等に加えて、犬、猫及び

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ヒトへ伝播する可能性が指摘されている¹⁾。

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²⁾、これにはカルバペネム系抗菌薬に対する耐性菌は含まれておらず、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。そこで今回は、腸内細菌科細菌のうち、大腸菌を調査対象とし、兵庫県産の健康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及び耐性遺伝子を保有する菌株の分子疫学性状を明らかにすることを目的として、調査を行った。

II 材料と方法

1. 大腸菌の分離

兵庫県内で飼育され、2015 年 12 月から 2016 年 3 月及び 2017 年 10 月から 2018 年 2 月に食肉センターに搬

感染症部

*別刷請求先:

〒675-0003 加古川市神野町神野 1819-14

兵庫県立健康科学研究所 感染症部 荻田 堅一

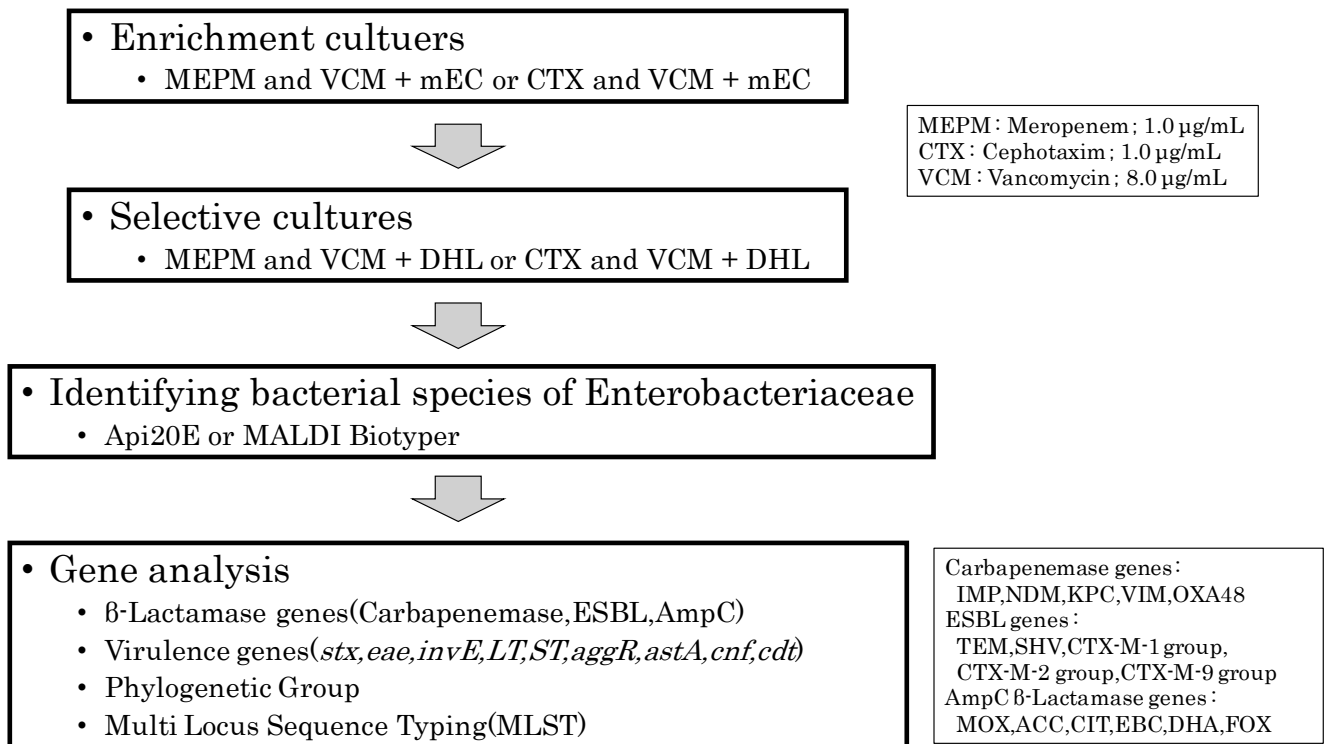


Fig.1 Workflow of method for culturing, identifying and gene analysis

入された牛140頭の腸内容物から大腸菌の分離を試みた。セフトキシム (CTX) 又はメロペネム (MEPM) を1 μ g/ mL, さらに, バンコマイシン (VCM) を8 μ g/mL になるように加えた mEC 液体培地 5 mL に腸内容物を接種し, 37 $^{\circ}$ C で 24 時間増菌培養後, CTX 又は MEPM 及び VCM を同様に加えた DHL 寒天培地に画線塗抹し, 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。大腸菌様の赤色コロニーを釣菌し, API20E (バイオメリュール) 又は MALDI バイオタイパー (ブルカーダルトニクス) を用いて菌種の同定を行った (Fig.1)。大腸菌と同定されたものに対して, 以下に述べる遺伝子検査を実施した。

2. 薬剤耐性遺伝子の検出及び型別

本研究で調査対象とした薬剤耐性遺伝子は, ①カルバペネマーゼ遺伝子 5 種類 (KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48), ②基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 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) である。これらの耐性遺伝子は, 国立感染症研究所のマニュアルに従い³⁾, 大腸菌からアルカリ熱抽出法により抽出した DNA をテンプレートとして PCR 法で検出した。耐性遺伝子が検出された検体は, Big Dye Terminator v3.1 (Thermofisher Scientific) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し, BLAST 検索により遺伝子型別を行った。

3. マルチローカスシーケンスタイピング (MLST) 解析

MLST は, 既報の「Achtman スキーム」に従った⁴⁾。すなわち, ハウスキーピング遺伝子 7 種類 (*adh, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA*) について, それぞれの塩基配列を決定した後, Warwick 大学のオンラインデータベース (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>) に入力して得られた MLST プロファイルからシーケンスタイプ (ST) を決定した。

4. 系統発生群の分類

Clermont らの方法⁵⁾に従い, 2 つの遺伝子 *chuA* 及び *yjaA* と, DNA 断片である TSPE4.C2 を標的とした PCR を行い, その増幅産物の有無により 4 つの系統発生群 (A, B1, B2, D) に分類した。

5. 病原遺伝子の検出

下痢原性に関連する病原因子 (*stx, LT, ST, eae, afaD, cdt, cnf*) について, 遺伝子の有無を PCR 法により調べた⁶⁾。

6. O-genotyping 法による O 血清群同定

井口らの方法に従い, PCR 法により大腸菌の O 血清群を同定した⁷⁾。

III 結果及び考察

1. 兵庫県産牛におけるβ-ラクタマーゼ遺伝子保有状況

本研究では、兵庫県産牛における薬剤耐性遺伝子の保有状況を調査することを目的として、健康牛の腸内容物から分離した大腸菌を対象としたβ-ラクタマーゼ遺伝子の検出を実施した。多種多様な微生物が混在している腸内容物から薬剤耐性遺伝子を保有している大腸菌を効率的にスクリーニングするために、CTX又はMEPMを1 µg/mLずつ添加した培地を使用した。その結果、MEPMを加えた培地からは大腸菌の発育はみられなかった。一方、CTXを加えた培地では、牛140頭中6頭4.3%から大腸菌が分離され、PCRの結果、全ての菌株からCTX-M型のESBL遺伝子が検出された。

分離培地への抗菌薬の添加には、耐性遺伝子を保有した菌の選択性を高める効果がある。本調査の耐性率は、JVARMにおける第3世代セファロスポリン（CTX又はセフトオフル）耐性大腸菌の耐性率と比較してわずかに高い値であり²⁾、健康牛におけるESBL産生大腸菌は、これまでの報告よりも潜在的に多い可能性がある。一方で、抗菌薬の添加には、自然耐性を示す細菌も発育してしまうという欠点がある。今回の調査においても、サイトロバクター属菌やシュードモナス属菌などが分離された検体がしばしばみられた。さらに、自然耐性を示す菌以外にも、本調査では対象としていないエロモナス属菌が分離され、これらはESBL遺伝子を保有していると思われる⁸⁾。このような菌の発育が、大腸菌の発育・分離を阻害することで耐性遺伝子の保有状況が過小評価される可能性も考えられる。今後調査を継続するに当たっては、使用する培地や抗菌薬の種類、添加する濃度等を検討する必要があると思われる。

2. ESBL遺伝子保有大腸菌の分子疫学的性状解析

2.1. β-ラクタマーゼ遺伝子の遺伝子型

今回の調査で分離されたESBL産生大腸菌から検出

されたβ-ラクタマーゼ遺伝子は5株がCTX-M-1グループであり、その内訳は、CTX-M-15が4株、CTX-M-3が1株であった。残りの1株はCTX-M-2グループのCTX-M-14であった。CTX-M-15は、現在、人と動物の両方で世界的な拡大が懸念されている遺伝子型である⁹⁾。Dayらによると、特定のESBL遺伝子型及びプラスミドレプリコンタイプの組み合わせを持つ大腸菌がヒトと動物の両方でみられており、ヒトと動物及び食品間の伝播の可能性のあることを指摘している¹⁰⁾。本調査においてはプラスミドの性状は調べていないが、今後、次世代シーケンサー等を用いて、染色体DNAや多数の薬剤耐性遺伝子を水平伝播する役割を担うプラスミドDNAの詳細な性状を調査することによって、薬剤耐性遺伝子の伝搬様式の解明の一助となることが期待される。

2.2. 系統発生群及びST

今回の調査で分離された大腸菌6株の分子疫学的性状解析の結果をTable 1に示した。5株は系統発生群がA群又はB1群の常在性大腸菌であり、残り1株はD群であった。また、これらの大腸菌のSTは、ST58が3株、ST117、ST361、ST2756がそれぞれ1株ずつであった

(Table 1)。大腸菌の系統発生群分類による4つの主要なグループ(A, B1, B2, D)は病原性遺伝子と関連があり、ヒトや動物の腸管外病原性大腸菌(ExPEC)は主にB2群とD群に分類される⁵⁾。また、B2群とD群はA群やB1群と比較して病原性が強いこと等も知られている¹¹⁾。今回の調査では、健康牛からはD群が1株検出されたのみで、ExPECの大半を占めるB2群は検出されず、これまでの報告と同様の傾向を示した¹²⁾。

MLST解析は、複数の遺伝子領域(通常は6,7種類のハウスキーピング遺伝子領域)のそれぞれ400~500塩基程度の配列を読み、それらを基に菌の型別を行う方法である¹³⁾。MLST解析データはインターネット上で公開されており、世界規模での比較が可能であるため、近年、多くの微生物の進化系統や母集団構造の分析にも応用されている。Mangesは、ヒトのExPECに由来するESBL

Table 1 Characteristics and MLST typing of 6 ESBL-producing *E.coli* strains isolated from healthy cattle feceses

| Strain ID | O-genotype | ESBL types | Phylo-groups | ST | STC | MLST allele profiles | | | | | | | Virulence factors |
|-----------|------------|------------|--------------|------|-----|----------------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-----------------------|
| | | | | | | <i>adk</i> | <i>fumC</i> | <i>gyrB</i> | <i>icd</i> | <i>mdh</i> | <i>purA</i> | <i>recA</i> | |
| C001 | UT | CTX-M-15 | B1 | 58 | 155 | 6 | 4 | 4 | 16 | 24 | 8 | 14 | ND |
| C029 | UT | CTX-M-15 | B1 | 58 | 155 | 6 | 4 | 4 | 16 | 24 | 8 | 14 | ND |
| C061 | UT | CTX-M-15 | B1 | 58 | 155 | 6 | 4 | 4 | 16 | 24 | 8 | 14 | ND |
| C084 | 25 | CTX-M-15 | A | 2756 | - | 6 | 11 | 5 | 8 | 8 | 78 | 2 | ND |
| C085 | 9 | CTX-M-14 | A | 361 | - | 10 | 99 | 5 | 91 | 8 | 7 | 2 | ND |
| C105 | 119 | CTX-M-3 | D | 117 | - | 20 | 45 | 41 | 43 | 5 | 32 | 2 | <i>stx1, cnf, cdt</i> |

UT: untypable, ND: not detected

産生大腸菌の MLST では ST10, 12, 38, 69, 73, 95, 117, 127, 131, 394, 405, 1193 が多く分離されることを報告している¹⁴⁾。今回、1 株 (菌株番号: C105) のみがこれら ExPEC によくみられる遺伝系統に分類された。また、CTX-M-15 遺伝子を保有している O25b:H4-B2-ST131 クローンは世界的に流行している遺伝子型として脅威とされているが、今回の調査ではこのクローンは健康牛から検出されなかった。

本調査における系統発生群と ST の組み合わせでは、半数の 3 株がいずれも CTX-M-15 を保有した B1-ST58 であった。興味深いことに、これらの 3 株は、と畜検査の情報から同じ所有者の 2 か所の農場で飼育されていたことが判明している。同一所有者の他の牛からは ESBL 産生大腸菌は検出されなかったが、同一又は関連のある農場において、特定の遺伝系統の ESBL 産生大腸菌が定着・維持されている可能性が示唆された。

2.3. 病原因子の検出

今回の調査で分離された大腸菌 C105 は、遺伝系統が D 群で、ST が ST117 であった。この遺伝子型はヒト由来 ExPEC からもしばしば分離される型であり¹⁰⁾、実際に、C105 から *iucD* や *papC* 等の病原性関連遺伝子が複数検出されている (データ示さず)。さらに、この株は、下痢原性に関与する病原因子である *stx1*, *cdt*, *cnf* 遺伝子も保有しており、VT1 型のベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌 (EHEC) であった。EHEC と ESBL の関連性の報告は少ないが、2011 年にヨーロッパで大流行を起こした EHEC O104:H4 も ESBL 産生が確認されている¹⁵⁾。本菌株のような病原性の高い ESBL 産生大腸菌がヒトに直接伝播するかどうかはより詳細な調査を必要とするが、ヒトに感染することで健康被害をもたらす可能性は否定できないため、健康牛の継続的なモニタリングが必要であると考えられる。

IV 結 論

兵庫県産の健康牛における β -ラクタマーゼ遺伝子保有状況を調査した。カルバペネマーゼ遺伝子を保有する大腸菌は検出されなかったが、CTX-M 型の ESBL 遺伝子を保有する大腸菌が 6 株分離された。これらの分子疫学的性状解析の結果、健康牛が薬剤耐性遺伝子の感染源や直接的な伝播に関与している可能性は低いと考えられた。しかしながら、人に健康被害をもたらす可能性のある病原因子を複数保有している ESBL 産生大腸菌が検出されたことから、牛保有大腸菌の継続的なモニタリング及びより詳細な調査が必要であると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は、公益財団法人大同生命厚生事業団の地域保健福祉研究助成を受けたものです。また、牛からの検体採取にご協力いただいた県食肉衛生検査センターの皆様方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T. M., Hasman, H., Magiorakos, A. P., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C., Threlfall, J. : Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin. Infect. Dis.*, **56**, 1030-1037 (2013)
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課 : 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2018. 平成 30 年 11 月 29 日 (2018)
- 3) 国立感染症研究所 : 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 (2016)
- 4) Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H. : Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.*, **60**, 1136-1151 (2006)
- 5) Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. : Determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Env. Microbiol.*, **66**, 4555-4558 (2000)
- 6) 秋山由美, 齋藤悦子, 二井洋子, 荻田堅一, 坂江博, 福永真治, 辻英高, 近平雅嗣, 三村昌司 : ウシ由来大腸菌が保有する病原性に関与する遺伝子群の包括的実態調査. *食衛誌*, **56**, 118-122 (2015)
- 7) Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F., Ohnishi, M., Pathogenic *E. coli* Working Group In Japan : *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *J Clin Microbiol.*, **53**, 2427-2432 (2015)
- 8) Hattie, E. W., Marie, B., Henk, C. B., Kendra, K. N., Sophie, A.G. H., Morgan, S., Guy, H. L. : Carbapenem-resistant bacteria recovered from

- faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. *PloS One*, **11**(1), e0147363 (2016)
- 9) Ajiboye, R. M., Solberg, O. D., Lee, B. M., Raphael, E., DebRoy, C., Riley, L. W. : Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.*, **49**, 365-371 (2009)
- 10) Day, M. J., Rodriguez, I., Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Kadlec, K., Schink, A. K., Wu, G., Chattaway, M. A., DoNascimento, V., Wain, J., Helmuth, R., Guerra, B., Schwarz, S., Threlfall, J., Woodward, M. J., Coldham, N., Mevius, D., Woodford, N. : Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *J. Antimicrob. Chemother.*, **71**, 1178-1182 (2016)
- 11) Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A. L. : Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **183**, 78-88 (2001)
- 12) Valat, C., Auvray, F., Forest, K., Metayer, V., Gay, E., Garam, C. P., Madec, J. Y., Haenni, M. : Phylogenetic grouping and virulence potential of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains in cattle. *Appl. Env. Microbiol.*, **78**, 4677-4682 (2012)
- 13) Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R. : Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 3140-3145 (1998)
- 14) Manges, A. R. : *Escherichia coli* and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clin. Microbiol. Infect.*, **22**, 122-129 (2016)
- 15) Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S. F., Henkhaus, J. K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P. M., Moore, R. L., Guenther, S., Rothberg, J. M., Karch, H. : Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PloS One*, **6**(7), e22751 (2011)

(令和2年2月28日受理)