

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
薬剤耐性菌サーベイランスとゲノムデータの集約・解析に関する研究

委託業務成果報告（業務項目）
家畜由来腸内細菌の薬剤耐性因子の疫学解析

業務分担者：秋庭正人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
業務協力者：楠本正博 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
業務協力者：岩田剛敏 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
業務協力者：黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
業務協力者：関塚剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

本研究の目的は環境および家畜由来薬剤耐性菌の塩基配列情報を取得し、データベース化することで耐性菌、あるいは耐性遺伝子の動態を監視できるシステムの構築に貢献することである。今年度はインドで採取した汚水処理施設の水や河川水から大腸菌を分離し、その薬剤感受性を調べたところ、その33%が第3世代セファロスポリン系やカルバペネム系抗菌剤に耐性を示した。これら菌株はフルオロキノロンを含む3~11薬剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。また、国内の牛糞便からシガ毒素産生性大腸菌（STEC）を分離し、その薬剤感受性を調べたところ、その30%が1~3剤に耐性を示したが、テトラサイクリンやストレプトマイシンといった古典的な薬剤に対する耐性がほとんどで、第3世代セファロスポリン系やフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株は認められなかった。インド環境水由来大腸菌55株と牛由来STEC45株から染色体およびプラスミドDNA、計393検体を調製し、現在、塩基配列を解析中である。

A．研究目的

薬剤耐性菌の蔓延は世界中で問題となっているが、既存の抗菌剤で対処できないスーパーバグと呼ばれる耐性菌の分布は様でなく、ホットスポットが存在する。これらの地域から主に人の移動に伴い、多剤耐性菌が世界中に拡散している。また、家畜や食糧等の移動に伴う耐性菌の伝播も報告されている。一方、薬剤耐性遺伝子はプラスミド等の可動性因子を介して他の菌に伝達することが知られており、これら菌種を超えた耐性遺伝子の伝播にも注意を払う必要がある。本課題では家畜および環境由来耐性菌に焦点を絞り、その染

色体とプラスミドの塩基配列情報を取得し、データベース化することで、耐性菌、あるいは耐性遺伝子の動態を監視できるシステムの構築に貢献することを目指す。今年度はインド環境および国内牛由来シガ毒素産生性大腸菌（STEC）の分離と性状解析、ならびにDNAの抽出を行った。

B．研究方法

1．インド環境水からの大腸菌分離と薬剤感受性試験
インドで採取した汚水処理施設の水や河川水からクロモカルトコリフォーム寒天培地（メルク社）

を用いて β -ガラクトシダーゼおよび β -グルクロニダーゼ陽性のコロニーを分離し、インドール陽性、オキシダーゼ陰性を確認後、大腸菌として保存した。分離菌の薬剤感受性試験はディスク法で実施した。以下に示す 12 薬剤を供試した；アンピシリン、セファゾリン、セフォキシチン、セフォタキシム、イミペネム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ST 合剤、ナリジクス酸、シプロフロキサシン。

2. 牛糞便からの STEC 分離と薬剤感受性試験

糞便試料 1 g を 9 ml のバンコマイシン (10 μ g/ml) およびセフスロジン (3 μ g/ml) 加 mEC 培地で 42 °C、16 時間培養後、DNA 抽出およびシガ毒素遺伝子 *stx1* および *stx2* を標的とした PCR を行った。*stx* 遺伝子陽性となった培養液をマッコンキー寒天平板に塗抹培養後、コロニーハイブリダイゼーション法によって、*stx* を有するコロニーを分離した。 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、インドール陽性、およびオキシダーゼ陰性を確認後、STEC として保存した。分離菌の薬剤感受性試験はディスク法で実施した。以下に示す 12 薬剤を供試した；アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ホスホマイシン、ST 合剤、ナリジクス酸、シプロフロキサシン。

3. DNA 抽出と塩基配列の解析

S1ヌクレアーゼ消化後のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により得られた染色体およびプラスミドのバンドを切り出し、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターにおいて次世代シーケンサーによる塩基配列解析を実施する。

C. 研究結果

1. インド環境水からの大腸菌分離と薬剤感受性

試験

インド環境水 228 検体から、1 検体当たり最大 10 株までの分離を試みた結果、合計 522 株の大腸菌を得た。このうち、173 株 (33%) がセフォタキシム (第 3 世代セファロスポリン系) とイミペネム (カルバペネム系) のいずれかに耐性を示した。この中から耐性パターンをもとに菌株の絞り込みを行い、計 55 株を解析に供した。これら菌株は供試した 12 薬剤のうち 3~11 薬剤に耐性を示した。イミペネム耐性を示した 12 株中 8 株は 10 剤以上に耐性を示した (図 1)。

2. 牛糞便からの STEC 分離と薬剤感受性試験

牛糞便 551 検体中、130 検体から 148 株の STEC を分離した。1 剤以上に耐性を示した 45 株を塩基配列解析に供した。これら菌株は供試した 12 薬剤のうち、1~3 剤に耐性を示した (図 2)。

3. DNA 抽出と塩基配列の解析

S1-ヌクレアーゼ消化後の PFGE で、供試菌株に複数のプラスミドを認めた (図 3)。全ての染色体由来断片とプラスミド (10~550 kb) を切り出し、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターに送付した。内訳はインド環境水由来が 184 検体、STEC 由来が 209 検体で、STEC の方がプラスミドバンドの数は多い傾向が認められた。これら検体の塩基配列解析は現在、実施中である。

D. 考察

インド環境水由来大腸菌の 33% がヒトの治療に汎用される第 3 世代セファロスポリンやカルバペネムに耐性を示した。これらの多くはフルオロキノロンを含む複数薬剤に耐性を示す多剤耐性菌で、なかでもカルバペネム耐性を示した 12 株中 8 株は 10 剤以上に耐性を示した。インド環境が多剤耐性菌に高度に汚染されていることが示された。

国内の牛から分離された STEC の 30% は 1~3 剤に耐性を示したが、テトラサイクリンやストレブ

トマイシンといった古典的な薬剤に対する耐性のみで、第3世代セファロスポリン系やフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株は認められなかった。すなわち、牛由来 STEC において薬剤耐性はほとんど問題にならないことが示された。

S1-ヌクレアーゼ消化後の PFGE で認められるプラスミドバンドは多い株で7本認められ、インド環境水由来大腸菌より、STEC 由来大腸菌の方が多いう傾向が認められた。しかしながら、全てのバンドが異なるプラスミドに由来するか否かは不明である。プラスミドの状態によっては同じプラスミドが複数のバンドとして観察される可能性も考えられる。この点については塩基配列を決定することで明らかにする予定である。

E . 結論

インド環境水から分離し、重要な β -ラクタム剤に耐性を示した大腸菌 55 株と古典的薬剤に対する耐性を示す国内牛由来 STEC 45 株の染色体およびプラスミド DNA、計 393 検体を調製し、その塩基配列を解析中である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

なし

H . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

| 株名 | AMP | CFZ | FOX | CTX | IPM | CHL | TET | STR | KAN | SXT | NAL | CIP |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| V001 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V003 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V004 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V021 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V023 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V035 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V044 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V046 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V048 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V070 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V085 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V097 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V120 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V123 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V130 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V133 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V139 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V143 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V147 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V150 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V158 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V160 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V228 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V233 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V234 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V242 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V244 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V251 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V252 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V263 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V264 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V266 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V272 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V273 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V274 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V275 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V279 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V293 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V294 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V299 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V300 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V301 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V308 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V313 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V318 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V323 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V408 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V420 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V423 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V431 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V437 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V472 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V475 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V487 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| V512 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

■ : 耐性 □ : 感受性または中間

図 1. インド環境水由来大腸菌の薬剤感受性

AMP, アンピシリン; CFZ, セファゾリン; FOX, セフォキシチン; CTX, セフォタキシム; IPM, イミペネム; CHL, クロラムフェニコール; TET, テトラサイクリン; STR, ストレプトマイシン; KAN, カナマイシン; SXT, ST 合剤; NAL, ナリジクス酸; CIP, シプロフロキサシン

| 株名 | AMP | CFZ | CTX | CHL | TET | STR | KAN | GEN | FOM | SXT | NAL | CIP |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| SEC001 | | | | | ■ | | | | | | | |
| SEC007 | | | | | | ■ | | | | | | |
| SEC021 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC026 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC050 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC081 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC084 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC107 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC110 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC125 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC132 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC133 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC136 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC141 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC147 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC152 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC174 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC187 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC190 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC196 | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC197 | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | ■ | |
| SEC201 | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| SEC219 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC228 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC234 | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| SEC235 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC239 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC243 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC249 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC262 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC264 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC274 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC282 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC302 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC303 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC313 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC316 | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| SEC331 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC334 | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| SEC347 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC348 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC351 | | | | | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| SEC357 | | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC373 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | | | |
| SEC377 | ■ | | | | ■ | ■ | | | | ■ | | |

■ : 耐性 □ : 感受性または中間

図 2. 牛由来 STEC の薬剤感受性

AMP , アンピシリン ; CFZ , セファゾリン ; CTX , セフトキシム ; CHL , クロラムフェニコール ;
TET , テトラサイクリン ; STR , ストレプトマイシン ; KAN , カナマイシン ; GEN , ゲンタマイシン ;
FOM , ホスホマイシン ; SXT , ST 合剤 ; NAL , ナリジクス酸 ; CIP , シプロフロキサシン

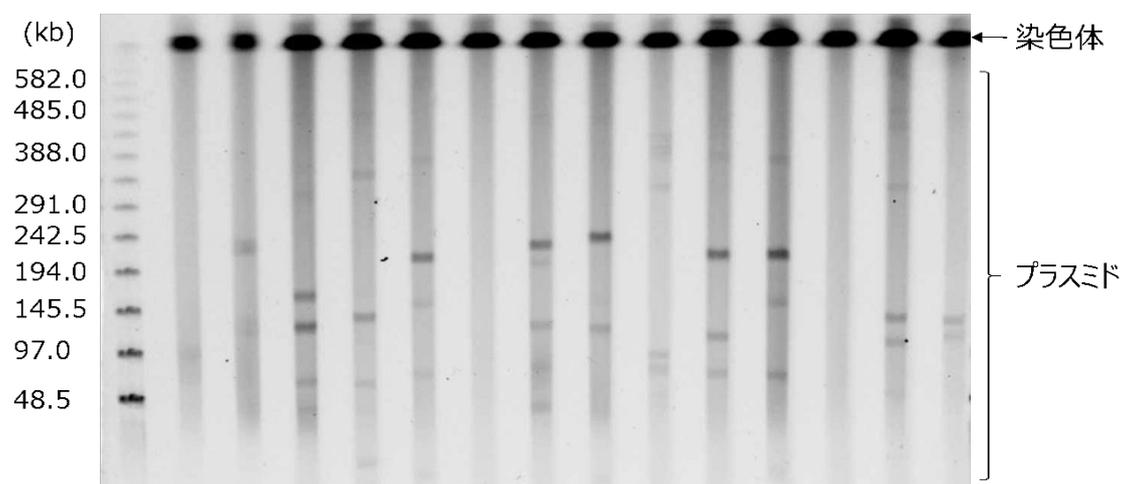


図 3.S1-ヌクレアーゼ消化後の PFGE 像