

研究課題名：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題名：ヒト・家畜・食品等由来耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子の解析及び伝達過程の関連性の解明

研究分担者：石井 良和 東邦大学医学部微生物・感染症学講座・教授

研究協力者：青木 弘太郎（東邦大学医学部微生物・感染症学講座）

研究要旨

患者・家畜・食品および伴侶動物由来の薬剤耐性菌から検出される薬剤耐性伝達因子の伝達過程を明らかにすることは、それらの拡散制御方法を策定する上で重要な情報である。我々のグループでは、本邦において第三セファロスポリン系薬剤耐性大腸菌が広く拡散する以前の菌株を対象として、薬剤耐性伝達因子を塩基配列レベルで明らかにした。また、ペットおよび飼主の糞便から同一遺伝子型の基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼが陽性の大腸菌を分離した。

A. 研究目的

近年、国内外において、患者、家畜、食肉、および伴侶動物からプラスミドに媒介される基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) およびコリスチン耐性遺伝子陽性腸内細菌科細菌が分離され、問題となっている。本研究では、ヒト・家畜・伴侶動物間での薬剤耐性遺伝子の伝達過程を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

大きく以下の 2 つの方法により本研究を実施した。

[1] 本邦で ESBL が拡散する以前の ESBL 産生大腸菌保存菌株を対象とした全ゲノム解析 (表 1)

[2] 伴侶動物およびその飼い主の糞便を対象に分離・収集した ESBL/AmpC 産生大腸菌の全ゲノム解析 (表 2)

全ゲノム解析は次世代シーケンサーの MiSeq (イルミナ) および MinION (オックスフ

ード ナノポアテクノロジー) により行った。2 機種から出力された塩基配列を *in silico* で組み合わせた *de novo assembly* により、完全長ゲノム (各複製単位で環状化) 塩基配列の取得を試みた。得られたゲノムを分子疫学および分子生物学的見地から解析し、得られた結果について解釈した。

糞便からの大腸菌および ESBL/AmpC 産生大腸菌の分離培養には、クロモアガー-ECC およびクロモアガー-ESBL (関東化学) を用いた。

(倫理面への配慮)

人を対象とする医学系研究に関する倫理指針および病原体等安全管理規程を遵守して本研究を行った。

C. 研究結果

1996 年~2001 年に臨床材料および健常ブロイラーより分離された ESBL あるいは AmpC 型 β -ラクタマーゼ陽性大腸菌それぞれ 12 株および

16株を対象に全ゲノム解析を行った(表1)。その結果、臨床材料から分離された大腸菌は全株が *bla*_{CTX-M-14} 陽性だった。一方、健常ブロイラー由来 ESBL 陽性大腸菌は11株が *bla*_{CMY-2} 陽性、5株が *bla*_{CTX-M-2} 陽性だった。*bla*_{CTX-M-14} 陽性株のうち、9株が sequence type (ST) 405, 1株ずつに ST10, ST62, および ST68 だった(図1)。*bla*_{CMY-2} 陽性株はすべてが異なる ST に属する大腸菌だった。うち3株は *bla*_{CMY-2} が plasmid sequence type (pST) 3 に属する不和合性グループ IncA/C プラスミドに搭載されていた(図2)。それらのプラスミドは過去に米国でヒトおよびウシから検出されたプラスミドと骨格構造が酷似していた(図3)。5株のうち3株から検出された *bla*_{CTX-M-2} 搭載 pST5 に属する IncN プラスミドは、2009年に検出された *bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{IMP-6} 搭載プラスミドに骨格が酷似していた(図4)。ペットおよびその飼主の糞便サンプルは、40組のボランティアに採便キットを送付し、22組分回収された(表2)。そのうち1組でペットおよび飼主から *bla*_{CTX-M-9} グループが共通して陽性の大腸菌が検出された。さらに、飼主のみから *bla*_{CTX-M-9} グループ陽性大腸菌が検出された組、猫のみから *bla*_{CTX-M-1} グループ陽性大腸菌が検出された組が認められた。今後、残りの18組の採便キットの回収および、分離菌の全ゲノム解析を実施する。

D. 考察

第三世代セファロスポリン系薬耐性大腸菌から検出された ESBL/AmpC 遺伝子型は、由来別に明らかに偏っていた。近年、特定の薬剤耐性遺伝子を媒介する流行プラスミド骨格が報告されつつあるが、*bla*_{CMY-2} は IncA/C-pST3 プラスミ

ドにより広く拡散したことが強く示唆された。また、*bla*_{CTX-M-2} が大阪地域における *bla*_{IMP-6} 陽性腸内細菌科細菌の大規模アウトブレイクの原因となった菌株から検出された IncN-pST5 プラスミドから検出されたことは、流行プラスミドの観点から極めて興味深い。

E. 結論

薬剤耐性遺伝子ごとに媒介するプラスミドの特徴が異なっていた。本研究の結果から、薬剤耐性遺伝子のみならず、それらを媒介するプラスミドの拡散にも注意を向ける必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 供試大腸菌の保有薬剤耐性遺伝子、由来および分離年次

ESBL/AmpC	年次	ヒト由来 (株)	動物由来 (株)
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	1996	9	0
	1999	1	0
	2001	2	0
<i>bla</i> _{CMY-2}	1999	0	2
	2000	0	6
	2001	0	1
	2009	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	2001	0	3
	2004	0	1
	計	12	15

表 2. ペットおよびその宿主糞便から分離された ESBL 産生大腸菌

ペット種	ペア数	ESBL 産生大腸菌	
		宿主	ペット
犬	14	2 (<i>bla</i> _{CTX-M-9G})*	1 (<i>bla</i> _{CTX-M-9G})*
猫	8	0	1 (<i>bla</i> _{CTX-M-1G})
未返送	18	-	-
計	40	2	2

*1 株が同一ペア由来

図 1. *bla*_{CTX-M-14} 陽性大腸菌の遺伝的背景と薬剤耐性遺伝子の周辺構造

CTX-M-14 (MiSeqのみ)

大腸菌遺伝的背景と*bla*_{CTX-M-14}の周辺構造

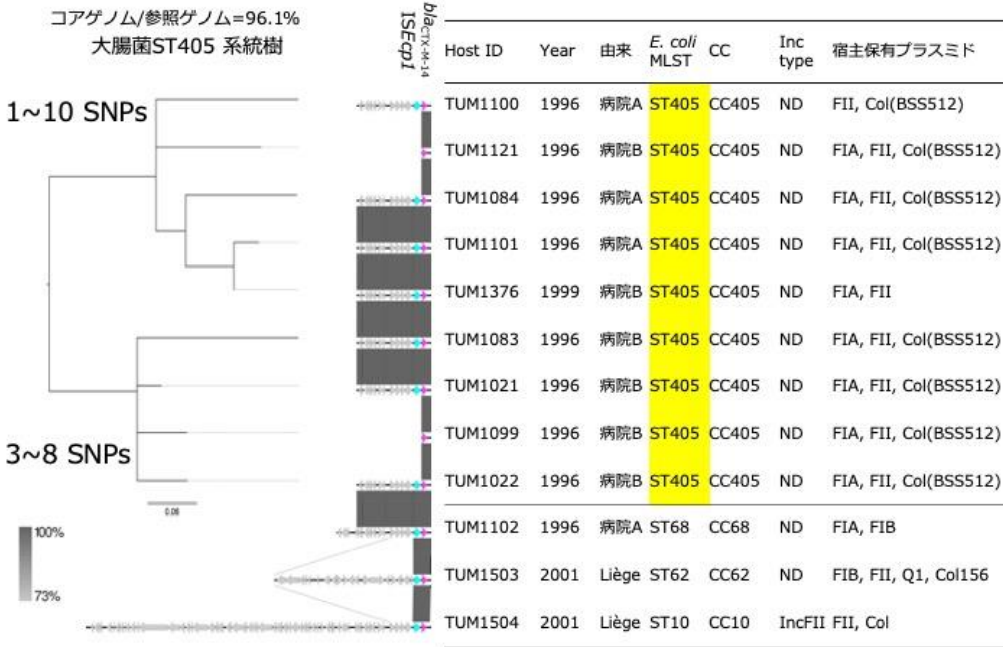


図 2. *bla*_{CMY-2} 周辺構造と宿主大腸菌の関係

CMY-2 (MiSeq+MinION)

*bla*_{CMY-2} 周辺領域と宿主大腸菌の関係

約98.5Kb 部分配列

図 3. *bla*_{CMY-2} 搭載 IncA/C-pST3 プラスミドの構造比較

CMY-2 (MiSeq+MinION)

*bla*_{CMY-2} 搭載 IncA/C-ST3 プラスミド

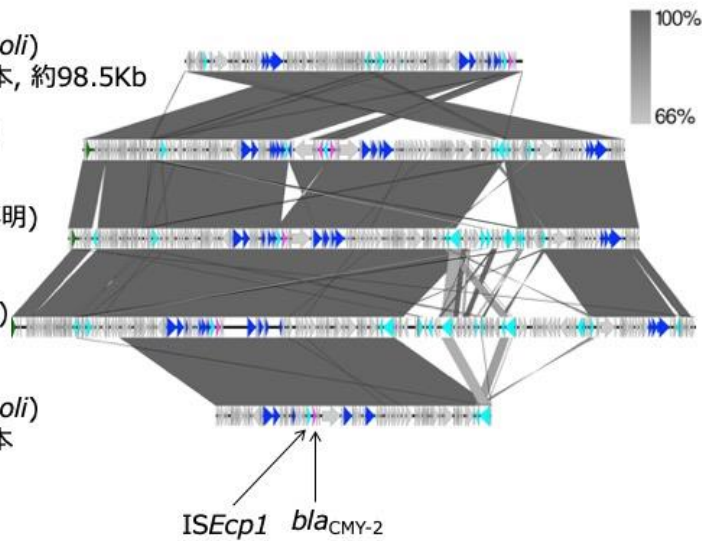
pC11-C-217¹ Partial (*E. coli*)
健康プロイラー, 1999, 日本, 約98.5Kb

pAM04528² (*S. Newport*)
ヒト, 1998, 米国

pAR060302² (*E. coli* ST不明)
ウシ, 2002, 米国

pYDC367³ (*E. coli* ST不明)
ヒト, 2013, 米国

pC12-C-140¹ Partial (*E. coli*)
健康プロイラー, 2000, 日本



¹本研究

²AAC. 2010 Feb;54(2):590-6.

³AAC. 2015 Jul;59(7):4360-1.

水色：トランスポゼース遺伝子
青：接合伝達関連遺伝子

図 4. *bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-pST5 プラスミドの構造比較

CTX-M-2 (MiSeq+MinION)

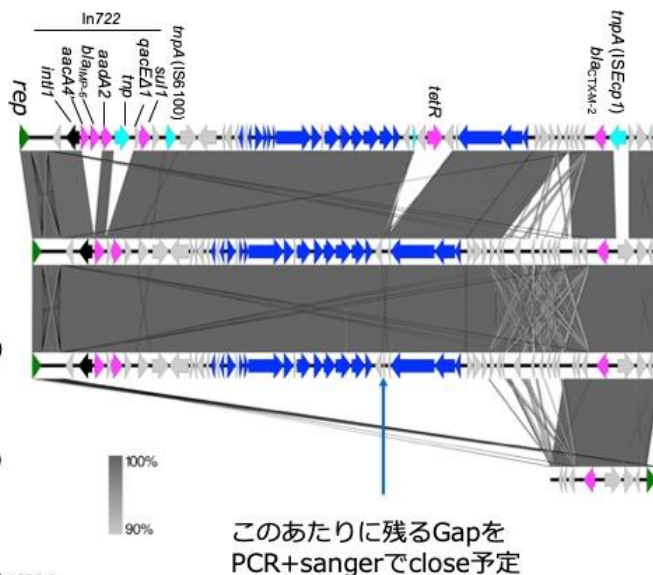
*bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-ST5 プラスミド

pKPI-6¹ (*K. pneumoniae*)
ヒト, 2009, 日本 (約47kb)

p13-C-033 (*E. coli* ST345[CC10])
健康プロイラー, 2001, 日本
環状(仮)

p13-C-006 (*E. coli* ST1072[CC10])
健康プロイラー, 2001, 日本
環状(仮)

pMTY2255 (*E. coli* ST1060[CC10])
健康プロイラー?, 2004, 日本
水色：トランスポゼース遺伝子
青：接合伝達関連遺伝子



¹ Antimicrob Agents Chemother. 2015 Feb;59(2):1356-9.