

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

研究参加者：青木 弘太郎 東邦大学医学部微生物・感染症学講座・助教

研究要旨

ヒト、家畜、食品、および伴侶動物に加えて環境に由来する薬剤耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子を解析し、拡散様式ならびに過程を明らかにすることは、薬剤耐性菌を制御する上で重要な情報である。我々のグループでは、ヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境に由来する第三セファロスポリン系薬耐性あるいはカルバペネム系薬耐性腸内細菌目細菌を対象に、全ゲノム解析により薬剤耐性遺伝子ならびに薬剤耐性伝達因子を解析した。その結果、*bla*_{CTX-M-14} (1996年から2007年に検出)、*bla*_{CMY-2} (1999年から2002年に検出)、および *bla*_{CTX-M-2} (2001年から2004年に検出) は由来および宿主菌が異なるにも関わらず、それぞれ構造が酷似した IncFII プラスミド、IncA/C プラスミド、および IncN プラスミド上に検出された。また、海外渡航がない患者から分離されたカルバペネマーゼ産生大腸菌を解析した結果、*bla*_{NDM-5} は IncX3 プラスミド上に検出され、そのプラスミドは東京湾の海水から分離された大腸菌から検出された *bla*_{NDM-5} 搭載プラスミドと酷似していた。これらの結果から、各薬剤耐性遺伝子のヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境へ拡散はそれぞれ特定のプラスミドが長期に渡り重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

薬剤耐性菌の制御にはその拡散様式および過程を理解することが重要である。ヒト、家畜、食品、および伴侶動物に加えて環境に由来する薬剤耐性菌、特に第三セファロスポリン系薬耐性あるいはカルバペネム系薬耐性腸内細菌目細菌を対象に、全ゲノム解析により薬剤耐性遺伝子ならびに薬剤耐性伝達因子を解析することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境に由来する第三セファロスポリン系薬耐性あるいは

カルバペネム系薬耐性腸内細菌目細菌について、東邦大学医学部微生物・感染症学講座保存菌株 (表 1)、伴侶動物およびその飼い主の糞便分離株 (表 2)、および臨床分離株を対象とした。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。生化学的性状による菌種同定および薬剤感受性検査は BD PhoenixTM M50 (ベクトン・ディッキンソン) および NMIC-208 パネルを用いて行った。

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 (オックスフォード ナノポアテクノロジー) の2機種を組

合せて行った。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の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。プラスミド構造の比較ゲノム解析には、類似するプラスミド塩基配列情報を公共データベース (National Center for Biotechnology Information, NCBI) からダウンロードして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、東邦大学医学部倫理委員会の承認 (申請番号: A18029, 課題名: 伴侶動物をはじめとする動物と同一の空間を共有する人がそれぞれ保有するオキシミノセファロスポリン耐性腸内細菌科細菌の細菌学のおよび遺伝学的特徴を明らかにするための研究) 得て行われた。

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 14 株および 10 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 株が ST68 だった。(図 1)。これらの菌株は共通して *bla*_{CTX-M-14} 搭載 IncFII プラスミドを保有していた。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、2004 年に香港、2007 年にベトナム、2011 年に中国で分離された菌株から検出された *bla*_{CTX-M-14} 搭載 IncFII プラスミドに構造が酷似していた (図 1)。

*bla*_{CMY-2} は異なる ST に属する 4 株のトリ由来大腸菌から検出された。*bla*_{CMY-2} は plasmid

sequence type (pST) 3 に属する IncA/C プラスミドに搭載されていた。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、1998 年、2002 年、および 2013 年に米国でヒトおよびウシから分離された菌株から検出された *bla*_{CMY-2} 搭載 pST3 IncA/C プラスミドに構造が酷似していた (図 2)。

*bla*_{CTX-M-2} はトリの糞便に由来する異なる 3 つの ST に属する大腸菌から検出された。*bla*_{CTX-M-2} は pST5 に属する IncN プラスミドに搭載されていた。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、2014 年に本邦の患者から分離されたカルバペネマーゼ産生肺炎桿菌が保有した *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 3)。

海外渡航歴のない患者から分離されたカルバペネム耐性大腸菌を全ゲノム解析した結果、*bla*_{NDM-5} 搭載 IncX3 プラスミドが検出された。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、東京湾の海水サンプルから分離された大腸菌から検出された *bla*_{NDM-5} 搭載 IncX3 プラスミドと構造が酷似していた (論文投稿中)。

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、菌株の全ゲノムを行う予定である。

D. 考察

本研究では、ESBL および AmpC 産生菌が拡散し始めた時期の菌株を全ゲノム解析することで、それらの遺伝子がどのような伝達性遺伝因子に媒介されてきたのかを明らかにしようとした。*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-2}, および *bla*_{NDM-5} がそれぞれ特徴的なプラスミドに媒介されていたことが明らかになった。さらに、ヒト、動

物、食肉、および環境に由来する遺伝的に関連のない菌株からも構造が酷似したプラスミドが検出されたことから、薬剤耐性遺伝子の幅広い拡散に、それぞれ異なるプラスミドが重要な役割を果たしていたことが示唆された。

E. 結論

*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-2}, および *bla*_{NDM-5} が広く拡散し始めた時期に分離された菌株を含めて全ゲノム解析を実施したことにより、それぞれの薬剤耐性遺伝子が媒介されてきたプラスミドの特徴を明らかにした。

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
<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	10	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} 搭載 IncFII プラスミド完全長構造比較

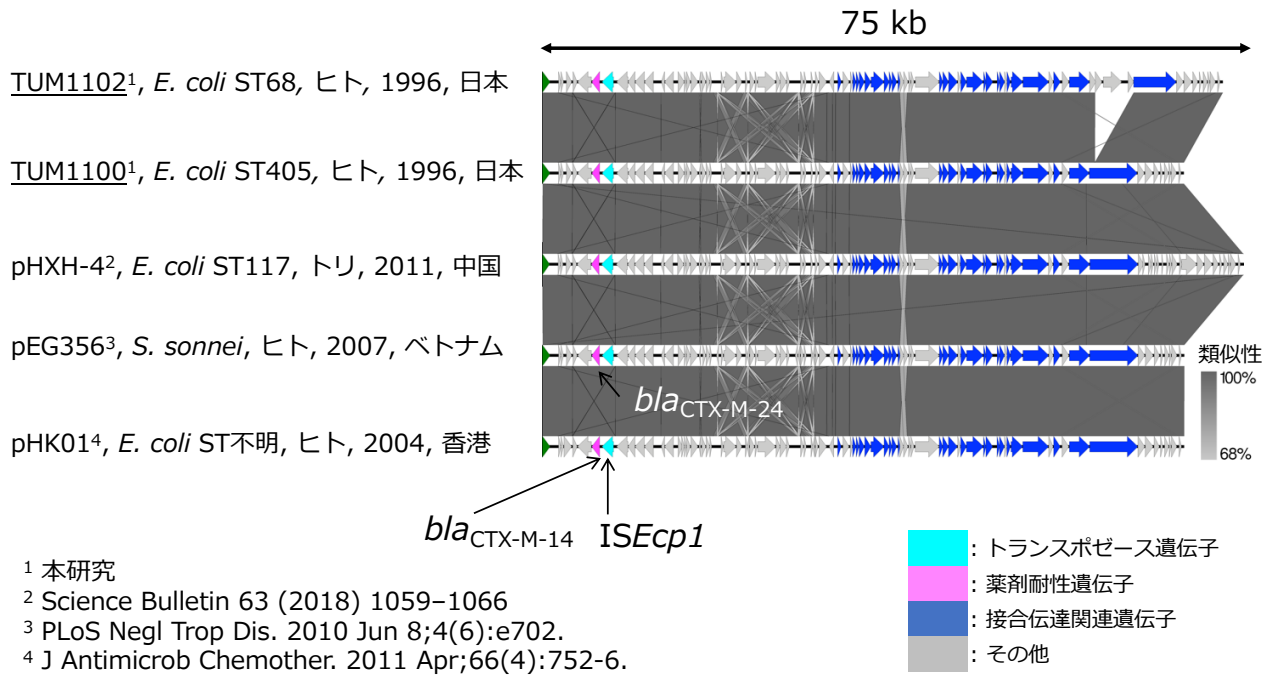


図 2. *bla*_{CMY-2} 搭載 IncA/C-ST3 プラスミド完全長構造比較

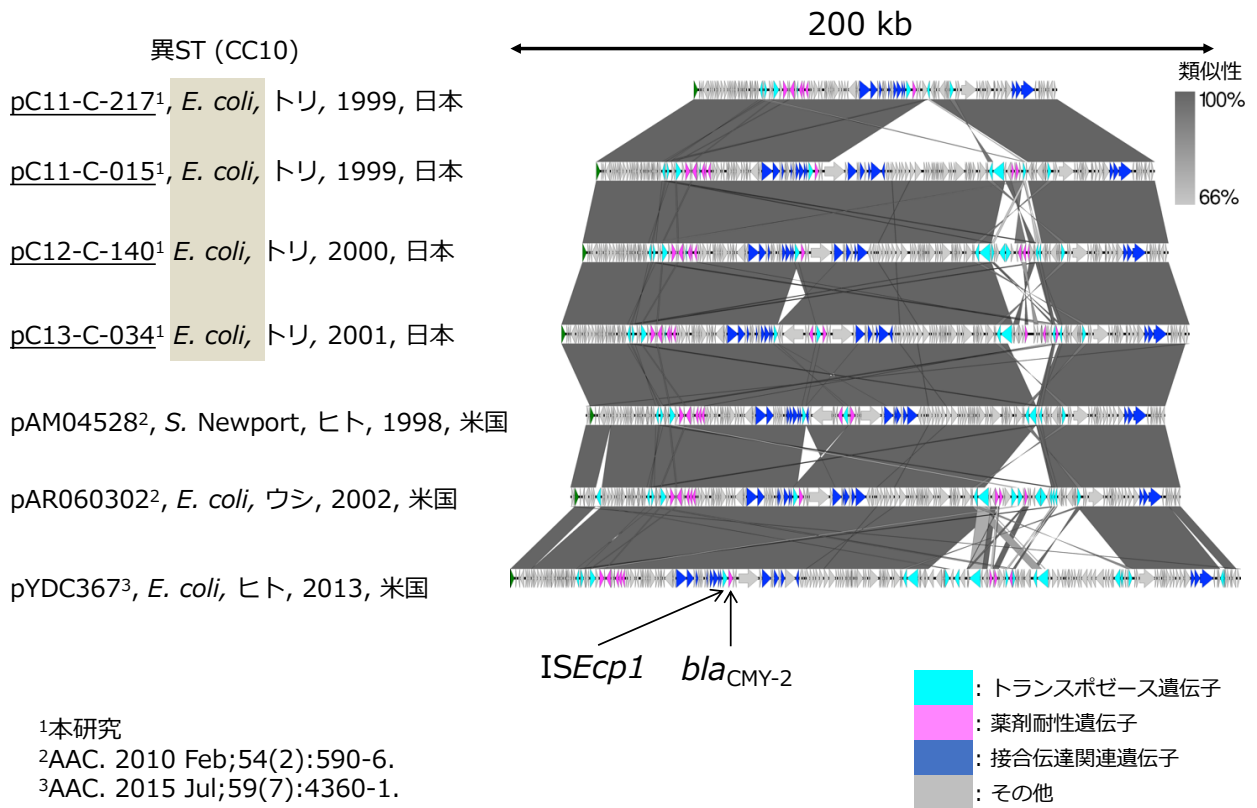


図 3. *bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-pST5 プラスミド完全長構造比較

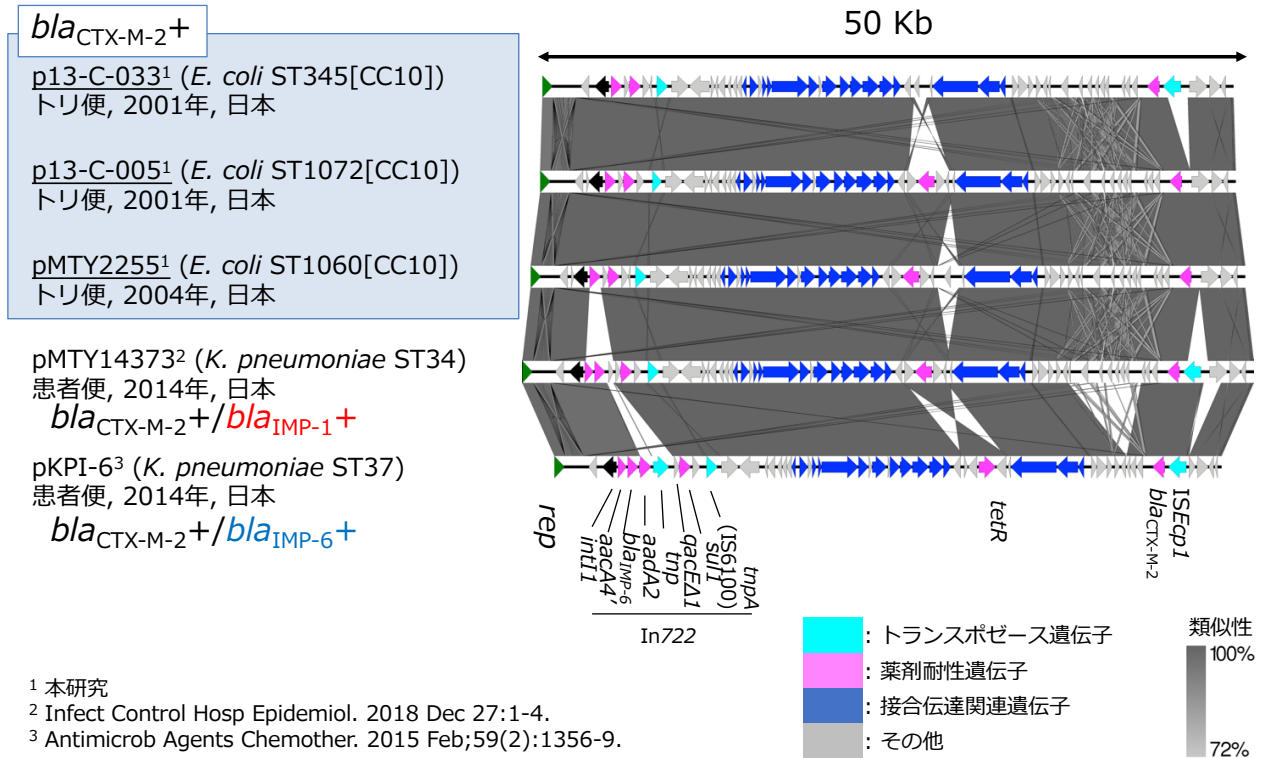


図 4. *bla*_{NDM-5} 搭載 IncX3 プラスミド完全長構造比較 (論文投稿中)

