

研究者 (所属・氏名) : 保健衛生部 永田暁洋

研究課題名 (終了)	福井県におけるペットおよび河川水の薬剤耐性大腸菌に関する研究	コードNO. III B-3
共同研究者 (担当分野)	細菌・ウイルス研究グループ : 横山孝治、岩崎理美、東方美保 (検体収集、薬剤耐性大腸菌の分離および薬剤感受性試験)	
研究期間	平成 30 年度から 令和 4 年度まで (5年間)	
	<p>1. 目的</p> <p>2050 年の薬剤耐性菌による死亡者数は世界で 1,000 万人と推計され、対策が急務となっている。日本においても対応が進められているなかで、犬猫等の薬剤耐性菌がヒトの薬剤耐性菌の増加に与える影響が示唆されているが詳細な報告は少ない。また、ヒト・動物 (家畜および動物)・環境 (河川や土壌) 分野における相互の薬剤耐性菌汚染の可能性も指摘されており、ワンヘルスの考え方に基づいた調査研究が求められている。</p> <p>本研究では、三分野における薬剤耐性の関連を検討するために、犬猫由来、ヒト由来および河川水由来の薬剤耐性大腸菌について、性状および遺伝子型の比較を行った。また、プラスミド (細菌が持つ染色体外遺伝子) による薬剤耐性獲得は菌種を超えた拡散リスクがあることから、県内の薬剤耐性大腸菌におけるプラスミド性耐性遺伝子の実態を把握するため、国内で広く伝播している CTX-M 型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌を主なターゲットとして検出を試みた。これにより、県内における薬剤耐性菌および薬剤耐性遺伝子の実態を明らかにするとともに、薬剤耐性菌の増加対策に寄与することを目的とした。</p> <p>2. 方法</p> <p>2.1 セフォタキシム (CTX) 耐性大腸菌の収集</p> <p>犬猫由来株は、2018 年から 2019 年に県内 5 動物病院から収集した糞便 150 検体および動物愛護センターから収集した糞便 29 検体の 179 検体から分離した。糞便は、第 3 世代セファロsporin系抗菌薬であるセフォタキシム (CTX) を $6.4 \mu\text{g/mL}$ 含む DHL 培地 (CTX-DHL 培地) に塗抹し、37°C で $22 \pm 2\text{hr}$ 培養後、得られたコロニーの生化学性状から大腸菌と同定した。</p> <p>ヒト由来株は、1 医療機関から 2018 年から 2019 年に提供された基質拡張型 βラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌疑いの 128 株を用いた。</p> <p>河川水由来株は、2021 年から 2023 年にかけて、県内 3 ヶ所の下水処理場放流口付近で採水した河川水 21 検体から分離した。河川水 500mL を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターでろ過し、mEC 培地で 37°C、$22 \pm 2\text{hr}$ 培養後、CTX-DHL 培地に塗抹し、犬猫糞便検体と同様に大腸菌を分離した。分離または収集した菌株は、市販の病原大腸菌免疫血清を用いて O 血清群別を行った。</p>	

研究成果
の概要

2.2 β-ラクタム系薬剤耐性遺伝子の検出

収集した菌株のβ-ラクタム系薬剤耐性遺伝子について、3系統のマルチプレックス PCR 法により検出した。対象とした遺伝子型は、基質拡張型β-ラクタマーゼ遺伝子 6 種 (TEM 型、SHV 型、CTX-M-1G、CTX-M-2G、CTX-M-8/25G、CTX-M-9G)、カルバペネマーゼ遺伝子 6 種 (IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型、KPC-2 型、GES 型、NDM-1 型)、AmpC 型β-ラクタマーゼ遺伝子 6 種 (MOX 型、CIT 型、DHA 型、ACC 型、EBC 型、FOX 型) の 18 遺伝子型とした。

2.3 プラスミド型別 PCR

β-ラクタム系薬剤耐性遺伝子のいずれかを検出した菌株は、3 種パネルのマルチプレックス PCR 法により、18 種のプラスミド Inc 型別 (B/O、F I C、A/C、P、T、K/B、W、F I I A、F I A、F I B、Y、I I、Frep、X、H I 1、N、H I 2、L/M) を実施した。

2.4 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

犬猫由来株の主要血清型 (O25、O153) について、制限酵素 *Xba* I を用いた PFGE を実施し、FingerPrinting II により解析を行った。

また、犬猫由来株、ヒト由来株および河川水由来株に共通して検出された血清型 (O25、O86a) のうち、CTX-M 型β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する株についても同様に PFGE および解析を実施した。

3. 結果・成績

3.1 CTX 耐性大腸菌の分離および菌株性状

犬猫糞便検体の内訳は、動物種は「犬」95 頭、「猫」53 頭、飼養環境は「室内飼育のみ」が 84 頭、「野外に出ることがある」が 62 頭、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴 (判明しているもの) は「有り」が 70 頭、「なし」が 63 頭、食餌は、「ペットフード等市販のフードのみ」が 124 頭、「人の食べ物を与えることがある」が 23 頭などであった。

CTX 耐性大腸菌は、動物病院由来の犬猫糞便 150 検体中 37 検体 (陽性率 24.7%) から 386 株を分離し、生化学性状等から各検体の代表株を選別した。なお、動物愛護センター由来検体から CTX 耐性大腸菌は分離されなかった。

検体情報の各要素別に CTX 耐性大腸菌の陽性率を比較したところ、動物種、飼養環境、食餌および出生場所 (「ペットショップ等」か「野良」か) では有意な差は認められなかったが、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴がある検体の陽性率が有意に ($p < 0.01$) 高かった。

河川水検体では、21 検体中 14 検体 (陽性率 66.7%) から CTX 耐性大腸菌 62 株を分離し、生化学性状等から各検体の代表株を選別した。

犬猫由来株から選定した 55 株、ヒト由来の 128 株および河川水由来株から選定した 11 株について、特徴を比較した。血清型別は、犬猫由来株では O25 (12 株)、O153 (8 株)、O1 (2 株) および O86a (1 株) の順であったが、ヒト由来株では、O25 (92 株)、O1 (8 株)、O86a (7 株) および O153 (2 株) の順であった (図 1、2)。一方、河川水由来株は、O25 (4 株)、O8 (3 株)、O86a (1 株) の順であった。

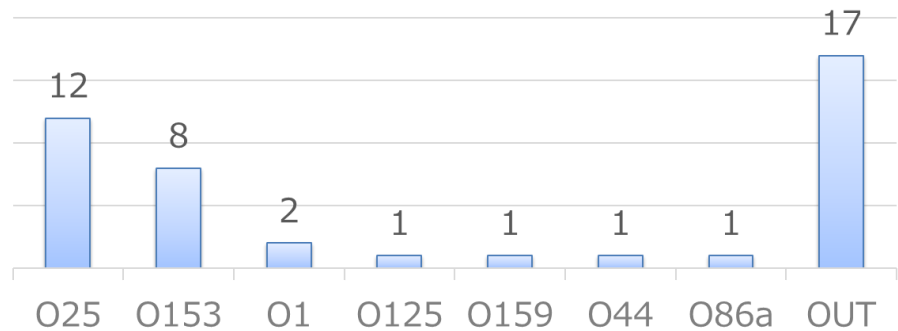


図1 犬猫由来株の血清型

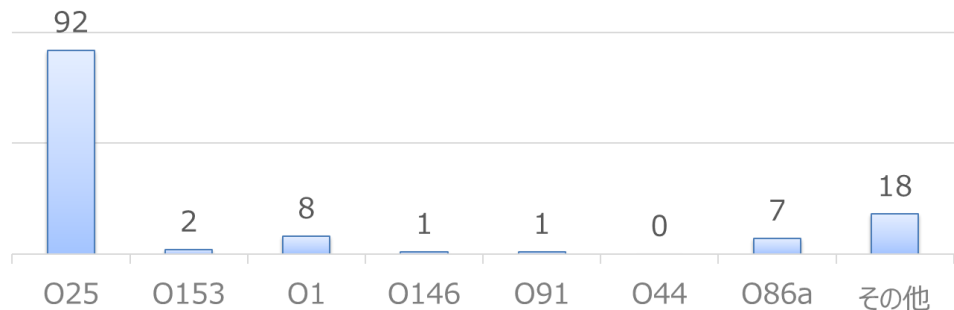


図2 ヒト由来株の血清型

3.2 β-ラクタム系薬剤耐性遺伝子の検出

犬猫由来株から検出した CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子は、CTX-M-1G : 22 株、CTX-M-9G : 17 株、CTX-M-2G : 11 株の順に多かった。TEM 型は 16 株で、AmpC 型は 10 株 (CIT : 9 株、DHA : 4 株、FOX : 3 株) であった。

ヒト由来株から検出した CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子は、CTX-M-9G : 63 株、CTX-M-1G : 28 株、CTX-M-2G : 1 株の順に多く、TEM 型は 36 株であった。一方、AmpC 型はほとんど検出されなかった (DHA 型のみ 1 株)。

河川水由来株から検出した CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子は、CTX-M-9G : 7 株、CTX-M-1G : 1 株で、TEM 型は 4 株、AmpC 型は 1 株のみであった。なお、犬猫由来、ヒト由来、河川水由来のいずれの株からもカルバペネマーゼ型は検出されなかった。

3.3 プラスミド型別 PCR

犬猫由来の 55 株、ヒト由来の 90 株 (CTX-M 型遺伝子保有株) および河川水由来の 11 株のプラスミド Inc 型別の結果、犬猫由来株から IncF 型、I1 型および B/O 型が多く検出され、ヒト由来株から IncF 型、I1 型および Y 型が多く検出された。河川水由来株からは、IncF 型、Y 型および I1 型が検出された (表 1、2、3)。

表 1 犬猫由来 55 株から検出したプラスミド Inc 型

Inc 型	検出株数	主な O 血清型(株数)	CTX-M 型(株数)
F※	31	25(9)	M-1G(2), M-1G+M-9G (2)
		153(12)	M-2G(7),M-1G(3)
		1(1)	M-1G+M-9G(1)
I1	21	25(4)	M-1G+M-9G(2)
		153(3)	M-2G(3)
		1(2)	M-1G+M-9G(2)
B/O	8	153(4)	M-2G(3),M-1G+M-2G(1)
P	3	153(1)	M-2G(1)
		25(1)	M-1G+M-9G(1)
		86a(1)	M-9G(1)
K/B	3	153(3)	M-1G(3)

※F I A、F I B、F I C を含む

表 2 ヒト由来 90 株から検出したプラスミド Inc 型

Inc 型	検出株数	主な O 血清型(株数)	CTX-M 型(株数)
F※	74	25(55)	M-1G(12),M-9G(43)
		1(5)	M-1G(3),M-1G+M-9G(2)
		16(3)	M-9G(2)
		86a(1)	M-9G
I1	11	1(5)	M-1G(3), M-1G+M-9G(2)
		25(1)	M-9G
Y	4	1(3)	M-1G(2),M-9G(1)
		25(1)	M-9G
P	1	UT	M-9G

※F I A、F I B を含む

表 3 河川水由来 11 株から検出したプラスミド Inc 型

Inc 型	検出株数	主な O 血清型(株数)	CTX-M 型(株数)
F※	6	25(3)	M-9G(2),M-1G(1)
		8(2)	M-9G(1)
I1	1	8(1)	not detected
Y	2	25(1)	M-9G(1)
		86a(1)	M-9G(1)

※F I A、F I B を含む

3.4 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

犬猫由来株の主要血清型であった O25 および O153 について、PFGE を行い、検体の疫学情報と合わせて解析したところ、O25 については、ほぼ同じ PFGE パターンを示す株が同一の動物病院からおおよそ 1 か月間にわたり検出されていたが、保有する β ラクタマーゼ遺伝子型は必ずしも一致していなかった (図 3)。

○153のうち、比較的似た PFGE パターンを示し、かつ保有するβラクタマーゼ遺伝子型も一致する株が、地域の異なる動物病院（A、B）から検出された。一方で、地理的に離れた動物病院（C、D）から検出され、ほぼ同じ PFGE パターンを示した2株は、保有するβラクタマーゼ遺伝子が異なっていた（図4）。

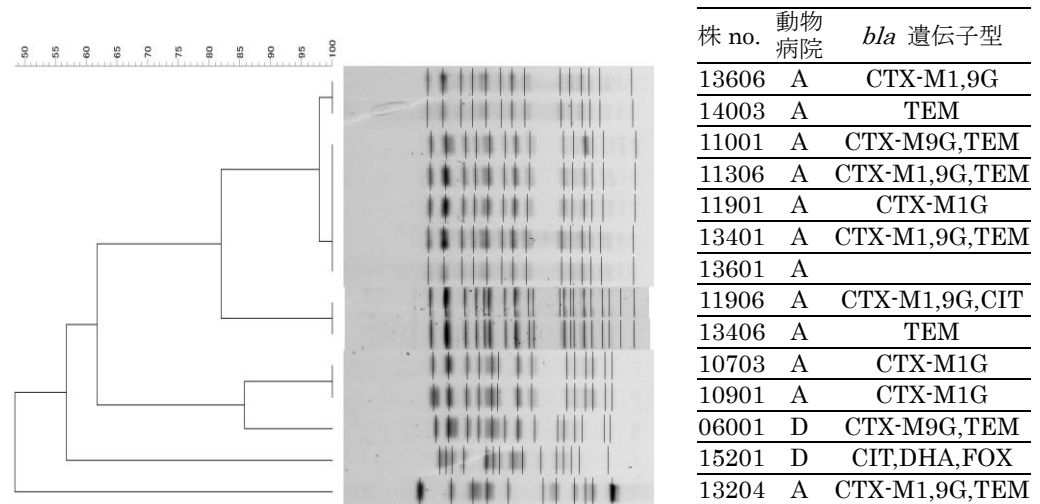


図3 犬猫由来O25のPFGE

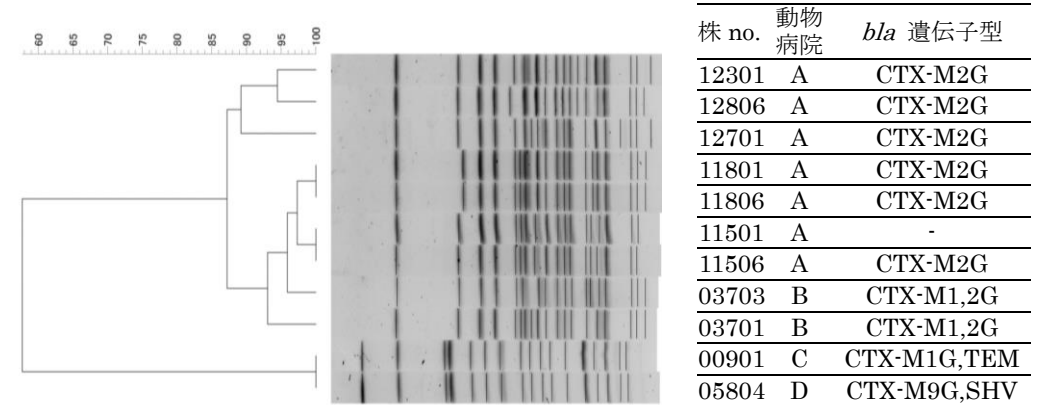
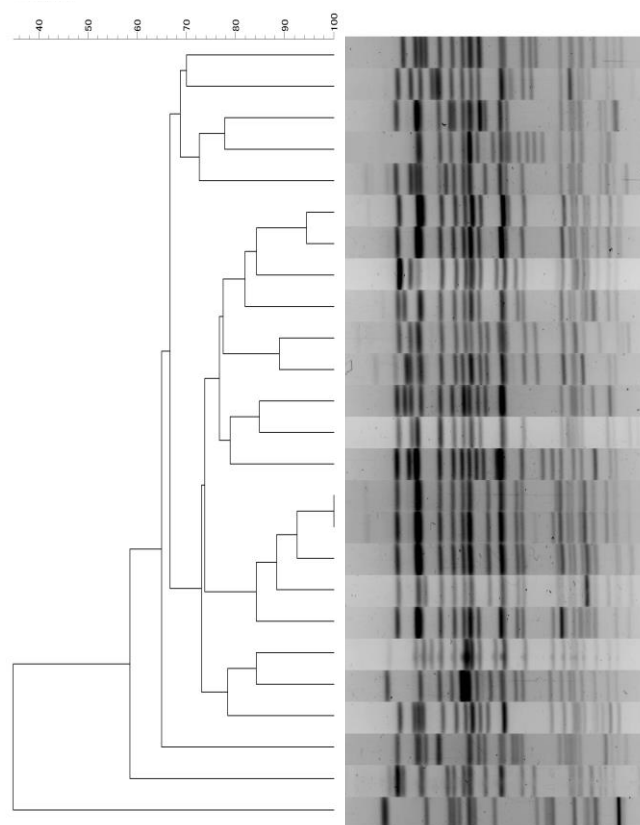


図4 犬猫由来O153のPFGE

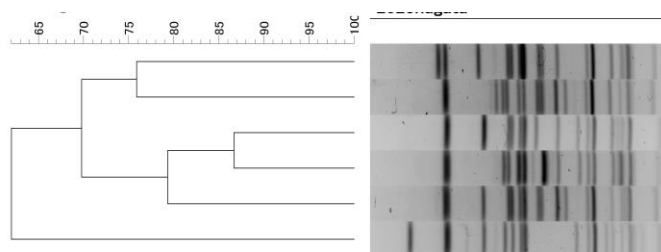
犬猫由来株、ヒト由来株および河川水由来株に共通して検出された、血清型O25でCTX-M型βラクタマーゼ遺伝子を保有する25株のPFGEパターンは、ヒト由来2株が類似していたほかは、類似するものはみられなかった（図5）。

同様に、犬猫、ヒト、河川水から共通して検出された、血清型O86aでCTX-M型βラクタマーゼ遺伝子を保有する6株のPFGEパターンは、類似しなかった（図6）。



株 no.	由来	bla 遺伝子型
R7-1	河川	CTX-M9G
R18-11	河川	CTX-M9G
H317	ヒト	CTX-M1G
R11-1	河川	CTX-M9G
H306	ヒト	CTX-M1G
H220	ヒト	CTX-M1G
H281	ヒト	CTX-M1G
H199	ヒト	CTX-M1G
10901	犬	CTX-M1G
H266	ヒト	CTX-M1G
H276	ヒト	CTX-M1G
H300	ヒト	CTX-M1G
R5-1	河川	CTX-M1G
H304	ヒト	CTX-M1G
11901	犬	CTX-M9G
11906	犬	CTX-M9G
H283	ヒト	CTX-M1G
11001	犬	CTX-M1G
H342	ヒト	CTX-M1G
H214	ヒト	CTX-M1G
H294	ヒト	CTX-M1G
H216	ヒト	CTX-M1G
07601	犬	CTX-M9G
H321	ヒト	CTX-M1G
13204	犬	CTX-M9G

図5 犬猫・ヒト・河川由来O25のPFGE



株 no.	由来	bla 遺伝子型
H269	ヒト	CTX-M9G
H359	ヒト	CTX-M9G
05101	犬	CTX-M9G
H221	ヒト	CTX-M9G
H222	ヒト	CTX-M9G
R13-1	河川	CTX-M9G

図6 犬猫・ヒト・河川由来O86aのPFGE

4. 考察

CTX 耐性大腸菌は、動物病院由来検体の 24.7%から検出した。これは、2009 年に同様の調査を実施した時の陽性率 (11.3%) と比較して増加しており、ヒト同様、県内の犬猫においても第 3 世代セファロスポリン耐性菌が拡がっていることが示唆された。

犬猫由来株の O 血清群は O25 および O153 が主であったが、ヒト由来株では、ほとんどが O25 であった。犬猫由来株の主要血清群は、O1 (2009 年の調査結果) から、O25 にシフトしており、これは福井県内のヒト由来株で過去に見られた血清型シフト (2004~08 年: O1 が主流、2009~10 年: O25 が主流となり O1 の割合が減少) と同様であった。このことから、β-ラクタム系薬剤耐性大腸菌は、ヒトから犬猫に伝播していくことが多い可能性がある。

動物愛護センター由来検体からは、CTX 耐性大腸菌は分離されなかった。収集検体数が少なかったものの、動物病院由来糞便の陽性率 (24.7%) と比較し

	<p>て明らかに低かった。動物愛護センターに収容される犬猫は、いわゆるノラが多く、抗菌剤への暴露機会が少ないことに起因する結果と推測された。</p> <p>ヒト由来株および河川水由来株の CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子は、CTX-M-9G が多数であったが、石畝らが報告した 2004～2008 年のヒト散発下痢症患者便由来株の結果（22 株中 CTX-M-1G は 1 株のみ）と比較すると、ヒト由来株における CTX-M-1G の増加を注視する必要がある。</p> <p>一方で、犬猫由来株は CTX-M-1G が主流で、かつ CTX-M-2G も多く検出されており、ヒト由来や河川水由来とは異なる傾向が見られた。特に、CTX-M-2G は、畠山らの報告（2007 年）や当センターの報告（2011 年）、原田らの報告（2012 年）でも検出されておらず、その動向に注視が必要と考えられた。</p> <p>プラスミドの Inc 型は、ヒト由来株および河川水由来株は似た検出状況であり、関連性が示唆された。犬猫由来株は、主な検出型は IncF 型、IncI1 型でヒト由来株や河川水由来株と同様であったが、CTX-M-2G を保有する O153 で B/O 型や K/B 型が検出されるなど特徴的であった。その意義は明らかではないが、犬猫独自に維持されている可能性があり、薬剤耐性遺伝子のリザーバーとして今後機能していくことも考えられる。</p> <p>犬猫由来 O25 および O153 の PFGE 結果から、動物病院において薬剤耐性大腸菌の院内感染が起こっている可能性が示唆された。一方で、犬猫由来株、ヒト由来株および河川水由来株に共通して分離された O25 および O86a の PFGE パターンは、ヒト由来 2 株が類似したほかは類似するものはなかったことから、同一クローン株による犬猫・ヒト・河川水を跨ぐ拡散は少ないと考えられた。すなわち、犬猫・ヒト・河川水における薬剤耐性菌の拡がりは、プラスミド上の耐性遺伝子がより影響を与えている可能性がある。本研究で明らかにした IncF 型や IncI1 型のプラスミドによる CTX-M 型 βラクタマーゼ遺伝子の拡散に今後も注視し、どのような対策が可能かを考えていくことで、全体としての薬剤耐性菌低減に繋がるものと思われた。</p>		
<p>実現した、または期待される成果</p>	<p>1. 県民生活や産業社会への波及効果</p> <p>犬猫における薬剤耐性菌検出状況を動物病院へフィードバックすることで、抗菌薬適正使用を啓発し、動物由来の薬剤耐性菌の減少に寄与できる。</p> <p>また、犬猫がヒトと共通する薬剤耐性大腸菌を高率に保有していることが判明したことで、動物飼養者に対して、薬剤耐性菌を含めた人獣共通感染症の予防対策を啓発できる。さらに、ワンヘルスの考え方に基づく、ヒト、動物、環境（河川水等）における薬剤耐性菌の関連性を理解する一助となった。</p> <p>2. 業務遂行のレベルアップへの寄与等</p> <p>環境検体（河川水）からの薬剤耐性大腸菌分離法を習得した。</p> <p>大腸菌のプラスミド型別 PCR 法を習得した。</p>		
<p>今後の対応および計画</p>	<p>動物病院獣医師向けの薬剤耐性菌対策チラシを作成し、研究結果を活用した啓発を行っていく。</p>		
<p>外部（県民等）への効果的な発信実績（予定可）</p>	<p>題名</p> <p>・福井県の愛玩犬猫から分離された基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ遺伝子保有大腸菌の分子疫学解析</p>	<p>発信媒体、方法等</p> <p>・獣医学術中部地区学会</p>	<p>発信年月</p> <p>令和 3 年 9 月</p>

	<ul style="list-style-type: none"> ・福井県におけるβラクタマーゼ遺伝子保有薬剤耐性大腸菌のペット等への拡散実態と関連性の解明 ・福井県の犬猫・ヒト・河川水におけるβラクタマーゼ遺伝子保有薬剤耐性大腸菌の分子疫学的解析 	<ul style="list-style-type: none"> ・大同生命地域保健福祉研究助成報告 ・全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会 	<p>令和4年9月</p> <p>令和5年9月</p>
備 考			