

# 福井県の犬猫・ヒト・河川水における $\beta$ -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

福井県衛生環境研究センター ○永田暁洋、横山孝治  
岩崎理美、東方美保

## 1 はじめに

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（家畜および愛玩動物）・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いる。また、プラスミドによる薬剤耐性獲得は菌種を超えて拡散するリスクが高い。

そこで本研究では、上記三分野の大腸菌におけるプラスミド性薬剤耐性遺伝子の実態を把握し、ヒトおよび犬猫の薬剤耐性菌汚染の低減に寄与するため、犬猫、ヒトおよび河川水由来のCTX-M型 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子保有大腸菌株を主なターゲットとして、性状および遺伝子型を解析した。

## 2 材料および方法

### 2.1 セフトキシム（CTX）耐性大腸菌

2018年から2019年に県内5ヵ所の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検体を、CTXを $6.4\mu\text{g/mL}$ 含むDHL培地（CTX-DHL培地）に塗抹して大腸菌を分離し、犬猫由来株とした。ヒト由来株は、2018年から2019年に1医療機関由来の基質拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌疑い128株を用いた。また、2021年から2023年に県内3ヵ所の下水処理場放流口付近で採水した河川水21検体（各500mL）を、フィルターでろ過し、mEC培地で培養後にCTX-DHL培地に塗抹して大腸菌を分離し、河川水由来株とした。収集菌株は、市販の病原大腸菌免疫血清を用いてO型別を行った。

### 2.2 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の検出

収集した菌株の $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子（*bla*遺伝子）は、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、ESBL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 $\beta$ -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種とした。

### 2.3 プラスミド型別PCR

*bla*遺伝子のいずれかを検出した菌株は、3系統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 II A、F I A、F I B、Y、I I、Frep、X、HI1、N、HI2、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 *bla* 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

### 3.1 CTX耐性大腸菌の分離および菌株性状

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1~2株を選別した。なお、動物愛護センター由来検体からは分離されなかった。検体情報別のCTX耐性大腸菌陽性率は、動物種（犬猫）、飼養環境（屋内

か野外)、食餌(市販ペットフードかそれ以外)および出生場所(ペットショップ等かノラ)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ありで有意に高かった( $p < 0.01$ )。また、河川水 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 1~2 株を選別した。

血清型別について、犬猫由来株の代表 55 株は、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 128 株は、O25 (92 株)、O1 (8 株)、O86a (7 株) および O153 (2 株) の順であった。一方、河川水由来株の代表 11 株は、O25 (4 株)、O8 (3 株)、O86a (1 株) の順であった。

### 3.2 $\beta$ -ラクタム系薬剤耐性遺伝子の検出

犬猫由来株の CTX-M 型 *bla* 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 株から、AmpC 型は 10 株から検出した。ヒト由来株の CTX-M 型 *bla* 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 株から、AmpC 型は 1 株から検出した。河川水由来株の CTX-M 型 *bla* 遺伝子は、CTX-M-9G : 7 株、CTX-M-1G : 1 株で、TEM 型は 4 株から、AmpC 型は 1 株から検出した。なお、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 55 株、ヒト由来 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、IncF 型や I1 型を主に検出した (第 1 表)。

第 1 表 犬猫由来株、ヒト由来株、河川水由来株から検出したプラスミド Inc 型

由来	Inc 型	検出株数	主な O 血清型(株数)	CTX-M 型 <i>bla</i> 遺伝子(株数)
犬猫	F※	31	25(9)	CTX-M-1G(2), CTX-M-1G+CTX-M-9G (2)
			153(12)	CTX-M-2G(7), CTX-M-1G(3)
			1(1)	CTX-M-1G+CTX-M-9G(1)
	I1	21	25(4)	CTX-M-1G+CTX-M-9G(2)
			153(3)	CTX-M-2G(3)
			1(2)	CTX-M-1G+CTX-M-9G(2)
	B/O	8	153(4)	CTX-M-2G(3), CTX-M-1G+CTX-M-2G(1)
	P	3	153(1)	CTX-M-2G(1)
			25(1)	CTX-M-1G+CTX-M-9G(1)
			86a(1)	CTX-M-9G(1)
K/B	3	153(3)	CTX-M-1G(3)	
ヒト	F※	74	25(55)	CTX-M-1G(12), CTX-M-9G(43)
			1(5)	CTX-M-1G(3), CTX-M-1G+CTX-M-9G(2)
			16(3)	CTX-M-9G(2)
			86a(1)	CTX-M-9G
	I1	11	1(5)	CTX-M-1G(3), CTX-M-1G+CTX-M-9G(2)
			25(1)	CTX-M-9G
	Y	4	1(3)	CTX-M-1G(2), CTX-M-9G(1)
			25(1)	CTX-M-9G
	P	1	UT	CTX-M-9G
	河川水	F※	6	25(3)
8(2)				CTX-M-9G(1)
I1		1	8(1)	not detected
Y		2	25(1)	CTX-M-9G(1)
			86a(1)	CTX-M-9G(1)

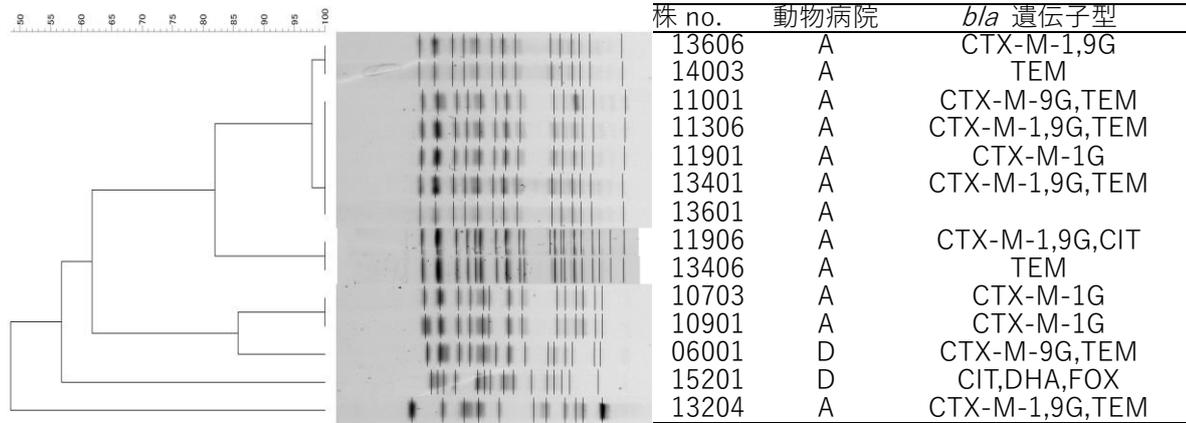
※F I A、F I B、F I C を含む

### 3.4 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

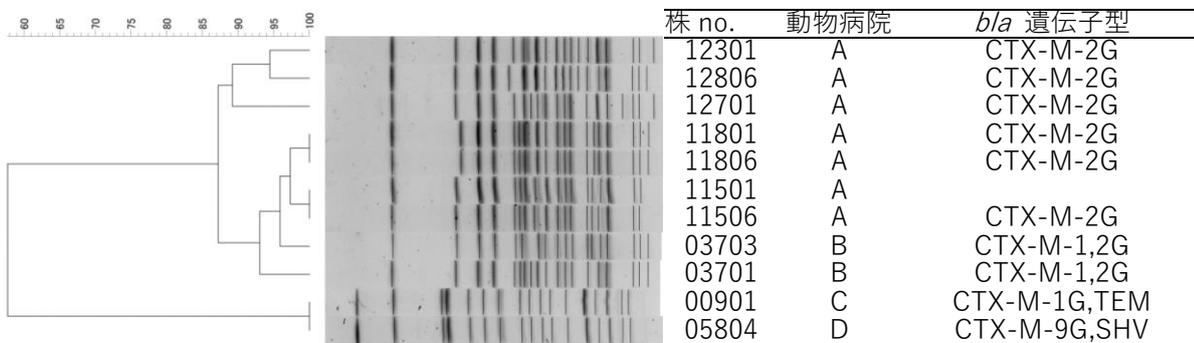
犬猫由来 O25 の PFGE 結果は、ほぼ同じパターンを示す株が同一の動物病院から約 1 か月間にわたり検出された。しかし、保有 *bla* 遺伝子型は必ずしも一致していなかった (第 1 図)。

O153 の PFGE 結果は、ほぼ同じパターンを示す株が、地域の異なる動物病院 (A、B や C、D)

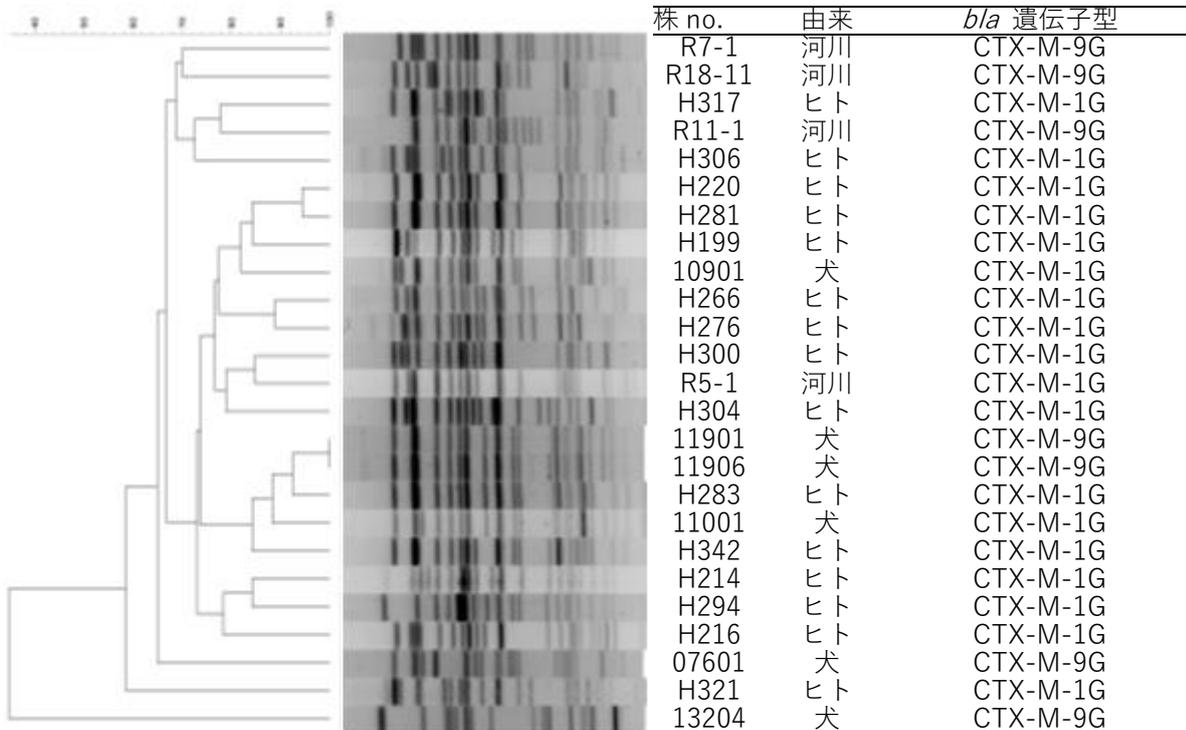
から検出され、保有 *bla* 遺伝子型が一致する株も認められた (第 2 図)。犬猫、ヒトおよび河川水由来株に共通して検出された O25 の 25 株 (CTX-M 型 *bla* 遺伝子保有) の PFGE パターンは、同一犬検体由来の 2 株およびヒト由来 2 株が類似したほかは、異なっていた (第 3 図)。



第 1 図 犬猫由来 O25 の PFGE



第 2 図 犬猫由来 O153 の PFGE



第 3 図 犬猫・ヒト・河川由来 O25 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、2009-2010 年に採取された検体の結果<sup>1)</sup> (11.3%) から増加しており、約 10 年の間に、福井県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散していることが示唆された。一方、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。収集検体数が少ないものの、動物病院由来検体の陽性率と比較して明らかに低かった。動物病院由来検体の陽性率が、セファロスポリン系抗菌薬の投与歴があると有意に高かったことから考えると、動物愛護センターに收容される犬猫は、いわゆるノラが多いため、抗菌剤への暴露機会が少なかったことが影響したものと推測された。

犬猫由来株の血清型は O25 および O153 が主で、2011 年の調査結果<sup>1)</sup> (O1 が主) から、O25 および O153 にシフトしていた。これは、ヒトで見られた血清型シフト<sup>2)3)</sup>と同様であったことから、 $\beta$ -ラクタム系薬剤耐性大腸菌は、ヒトから犬猫に伝播することの方が多く可能性が考えられた。

ヒト由来株および河川水由来株の CTX-M 型  $\beta$ -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<sup>2)</sup> (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。

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<sup>4)</sup>や当センターの報告<sup>1)</sup>、原田らの報告<sup>5)</sup>では検出されておらず、その動向に注視が必要と考えられた。

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、犬猫独自に系統が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の役割を担うことも考えられる。

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。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、犬-犬やヒト-ヒトにおける同一クローン株の感染はあると推察できるものの、同一クローンによる犬猫・ヒト・河川水を跨ぐ拡散は少ないと考えられた。飼い主と飼い犬といった近い関係性での薬剤耐性大腸菌の共有は報告されており<sup>6)</sup>、同一クローン株の拡散に注意することに加え、IncF 型や IncI1 型のプラスミドが CTX-M 型  $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子の拡散に果たす役割は重要であると考えられることから、今後より一層注視していく必要がある。

#### 参考文献

- 1) 永田ら:福井県衛生環境研究センター年報, 10, 33-39 (2011)
- 2) 石畝ら:日本獣医師会雑誌, 63, 883-887 (2010)
- 3) 石畝ら:福井県衛生環境研究センター年報, 9, 33-37 (2010)
- 4) 畠山ら:東京都健康安全研究センター年報, 58, 73-76 (2007)
- 5) Harada K et al. : Microbiology and Immunology, 56(7),480-485 (2012)
- 6) Harada K et al. : Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 35, 139-144 (2012)