

伴侶動物から分離されたESBL産生大腸菌B2-O25-ST131の分子疫学解析

神門 幸大^a, 小林 甲斐^a, 久保田 寛顕^a, 有吉 司^a, 内谷 友美^a, 横山 敬子^b, 新開 敬行^a, 貞升 健志^c

2016年に策定されたAMR対策アクションプランでは、ワンヘルス・アプローチに基づいた動物や環境等における薬剤耐性菌対策の重要性が示されている。その中で基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamase : ESBL) 産生大腸菌においては、B2-O25-ST131株の世界的な蔓延が報告されている。本研究では、都内の動物病院を受診したイヌ・ネコ由来の大腸菌のうち、血清型O25に型別された20株についてESBL産生菌の検索および分子疫学解析を行った。

供試した20株中5株がESBL産生菌であり、5株すべてがフルオロキノロン耐性であった。全ゲノム解析の結果、これらの5株は、ESBL遺伝子として $bla_{CTX-M-15}$ を染色体上に持つフルオロキノロン耐性B2-O25-ST131株であることが判明した。近年、イヌ、ネコをはじめとする伴侶動物に対する意識の変化に伴い、ヒトと伴侶動物はより緊密な関係が構築されるようになっている。伴侶動物が薬剤耐性菌のリザーバーとなることも危惧され、今後も継続した調査が必要と考えられる。

キーワード : 薬剤耐性菌, 伴侶動物, 大腸菌, ESBL, ST131, 全ゲノム解析, イヌ, ネコ

はじめに

薬剤耐性菌は世界的な問題となっており、2015年に開催されたWHO総会では「薬剤耐性 (AMR) に関するグローバルアクションプラン」が採択された。日本ではWHO国際行動計画を踏まえ、2016年に「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」が策定された¹⁾。これらのアクションプランでは、ヒト、動物、食品、環境等における薬剤耐性問題について、ワンヘルス・アプローチに基づく対策を実施することが示されている。

2000年代初頭より、様々なグラム陰性桿菌の多剤耐性化が進行し、その中でも常在菌でありながら臨床様々な問題となる大腸菌の多剤耐性化が注目された。第三世代セファロスポリン系抗菌薬に耐性を示すCTX-M型ESBL産生大腸菌は、ヒトにおける流行が世界的に報告されており²⁾、その流行にはフルオロキノロン耐性ESBL産生大腸菌B2-O25-ST131株の関与が示唆されている³⁾。

近年、伴侶動物を家庭内で飼育することが一般的になっている一方、動物からヒトへの病原体伝播リスクが懸念されており、薬剤耐性菌においてはすでにそのような事例が報告されている⁴⁾。本研究では、ヒトと密接にかかわる伴侶動物であるイヌおよびネコから分離された血清型O25の大腸菌について、ESBL産生性の確認および薬剤感受性試験を行った。さらに、B2-O25-ST131に型別された菌株について、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム情報を取得し、分子疫学解析を行ったのでその結果を報告する。

方 法

1. 検体

2017年度から2018年度に都内の動物病院を受診したイヌおよびネコの糞便から分離され、当センターに搬入された大腸菌のうち、O血清型別によりO25と判定された20株を検査対象とした。

2. ESBL産生試験

市販のESBL産生試験用ディスク (AmpC/ESBL鑑別ディスク ; 関東化学) を用いて、ESBL産生試験を行った。McFarland 0.5 に調整した菌液をミューラーヒントン寒天培地 (栄研化学) に塗布後、取扱説明書に従って鑑別ディスクを配置し、37°Cで18~24時間培養した。培養後各ディスク周囲に生じた発育阻止円の大きさを計測し、取扱説明書に従って判定を行った。

3. 薬剤感受性試験, H 血清型別, 系統発生群型別および Multilocus Sequencing Typing (MLST) 解析

ESBL産生試験で陽性となった菌株について、薬剤感受性試験, H 血清型別, 系統発生群型別および MLST 解析を行った。

1) 薬剤感受性試験

米国 CLSI 抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づいて試験を行った⁵⁾。 β -ラクタム系薬剤として、アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフォキシチン (CFX) の3剤, β -ラクタム系以外の薬剤としてクロラムフェニコール (CP), テトラサイクリン (TC), ストレ

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

表 1. 伴侶動物由来 ESB� 産生大腸菌の性状

菌株 No.	動物種	系統発生群	Sequence Type	血清型	耐性を示した薬剤
17-90	イヌ	B2	ST131	O25:H4	ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX, KM
17-96	イヌ	B2	ST131	O25:H4	ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX, KM, GM
17-98	イヌ	B2	ST131	O25:NM*	ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX, KM, GM
17-100	ネコ	B2	ST131	O25:H4	ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX
18-104	ネコ	B2	ST131	O25:H4	ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX

* NM: 非運動性

プトマイシン (SM), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), アミカシン (AMK), スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST), ホスホマイシン (FOM), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX), イミペネム (IPM) およびメロペネム (MEPM) の 14 薬剤の計 17 薬剤を用いた。

2) H 血清型別

市販の診断用抗血清 (デンカ生研) を用いて試験管内凝集反応法により H 血清型別を行った。

3) 系統発生群型別および MLST 解析

系統発生群型別は, Clermont らの方法⁶⁾に従って PCR を行い, 4 つのグループ (A 群, B1 群, B2 群, D 群) に分類した。

大腸菌の sequence type (ST) は, 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) を PCR で増幅後精製し, シークエンス解析により解読した塩基配列を, MLST データベース

(<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>) で検索し決定した⁷⁾。

4. 全ゲノム解析

系統発生群型別で B2 群, MLST 解析で ST131 に型別された菌株について, 遺伝子抽出を行い MiSeq (Illumina) および MinION (Oxford Nanopore) を用いて全ゲノムデータを取得した。取得したデータについて, Unicycler Galaxy version 0.4.6.0 (<https://usegalaxy.org/>) を用いて *de novo* アセンブリを行い, 全ゲノム配列を得た。

得られた全ゲノム配列をもとに, Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) の解

析ツールである SerotypeFinder-2.0, VirulenceFinder-2.0, ResFinder-3.1 により, *in silico* 血清型別, 病原因子検索, 薬剤耐性因子検索を行った。また, DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST: <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/>) により染色体ゲノム配列のアノテーション付けを行った。

結 果

1. ESB� 産生菌の検出および性状

供試した 20 株のうち 5 株 (菌株 No.: 17-90, 17-96, 17-98, 17-100, 18-104) で ESB� 産生能が認められた。このうち 17-98 は運動性を示さず H 血清型別が不能であったが, その他の 4 株はすべて H4 に型別された (表 1)。薬剤感受性試験の結果, 17-90 は 7 剤 (ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX, KM) 耐性, 17-96 および 17-100 は 8 剤 (ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX, KM, GM) 耐性, 17-100 および 18-104 は 6 剤 (ABPC, CTX, NA, NFLX, OFLX, CPFX) 耐性であり, いずれの株にもフルオロキノロン耐性が認められた。また, 系統発生群型別および MLST の結果は, すべての株が系統発生群 B2, ST131 であった (表 1)。

2. 全ゲノムデータを用いた解析

1) *in silico* 血清型別, 病原因子・薬剤耐性因子検索

全ゲノムデータをもとに *in silico* 血清型別を行った結果, O 血清型別はすべての株が O25 であった (表 2)。H 血清型別は, 凝集反応で判定不能であった 17-98 を含めすべての株が H4 であった。

病原因子は *iss*, *gad* が 5 株すべてに共通して検出された。また *iha* および *sat* が 4 株から, *ireA* が 3 株から, *cnf1* および *senB* が 2 株から検出された。

表 2. 伴侶動物由来 ESB� 産生大腸菌の全ゲノム解析結果

菌株 No.	<i>in silico</i> 血清型	薬剤耐性因子			病原因子
		β-ラクタマーゼ	β-ラクタマーゼ以外	耐性変異	
17-90	O25:H4	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (3)- <i>lla</i> , <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catB3</i>	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	<i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>iss</i> , <i>cnf1</i> , <i>gad</i> , <i>senB</i>
17-96	O25:H4	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (3)- <i>lla</i> , <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catB3</i> , <i>tet</i> (A)	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	<i>iss</i> , <i>ireA</i> , <i>gad</i>
17-98	O25:H4	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>aac</i> (3)- <i>lla</i> , <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catB3</i>	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	<i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>iss</i> , <i>cnf1</i> , <i>gad</i> , <i>senB</i>
17-100	O25:H4	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>mdf</i> (A)	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	<i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>iss</i> , <i>ireA</i> , <i>gad</i>
18-104	O25:H4	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>mdf</i> (A)	<i>gyrA</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>	<i>iha</i> , <i>sat</i> , <i>iss</i> , <i>ireA</i> , <i>gad</i>

薬剤耐性因子の検索では、 β -ラクタマーゼ遺伝子としてすべての株から *bla*_{CTX-M-15} が検出され、CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌であることが判明した。また、17-90、17-96、17-98 の 3 株で *bla*_{OXA-1} が検出された。 β -ラクタマーゼ遺伝子以外の因子として、マクロライド系、リンコサミド系、ストレプトグラミン系の耐性因子である *mdfA* がすべての株から検出された。また、アミノグリコシド耐性因子である *aac(3)-IIa* および *aac(6')-Ib-cr*、ならびにフェニコール耐性因子である *catB3* がそれぞれ 3 株から検出された。さらに、*gyrA*、*parC*、*parE* におけるキノロン耐性変異がすべての株で認められた (表 2)。

2) 全ゲノム配列の決定

MiSeq により得られたショートリードデータと MinION により得られたロングリードデータを用いてハイブリッドアセンブリを行った結果、17-90 および 17-98 では約 5.26Mb、17-100 および 18-104 では約 5.14Mb の染色体完全長配列を決定した。17-96 では完全長の決定に至らず、約 4.96Mb の染色体ドラフト配列を得た。また、17-90 および 17-98 ではそれぞれ 2 つのプラスミド、17-100 および 18-104 ではそれぞれ 5 つのプラスミドを検出しその完全長を決定した (表 3)。これらの配列に対し DFAST を用いてアノテーション付けを行った結果、*bla*_{CTX-M-15} はすべての株で染色体ゲノム上に存在していた。一方で、検出されたプラスミド上には薬剤耐性因子は存在していなかった。

表 3. 伴侶動物由来 ESBL 産生大腸菌プラスミドの完全長および薬剤耐性因子の有無

菌株 No.	プラスミド数	プラスミド全長の塩基数	薬剤耐性因子
17-90	2	137,518bp, 4,862bp	なし
17-96	ND*	完全長の決定できず	ND*
17-98	2	131,899bp, 92,735bp	なし
17-100	5	29,527bp, 4,236bp, 4,063bp, 3,176bp, 2,113bp	なし
18-104	5	31,751bp, 4,236bp, 4,063bp, 3,176bp, 2,101bp	なし

* ND: No Data

考 察

動物における薬剤耐性菌の調査は、主に家畜衛生分野で行われている。1999年からは農林水産省の「Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM)」によりモニタリングが行われている。一方で、伴侶動物分野における薬剤耐性菌の調査の歴史は浅く、全国的な調査は2017年度に「愛玩動物薬剤耐性 (AMR) 調査に関するワーキンググループ」によって行われた。この調査報告書⁹⁾によると、第三世代セファロ

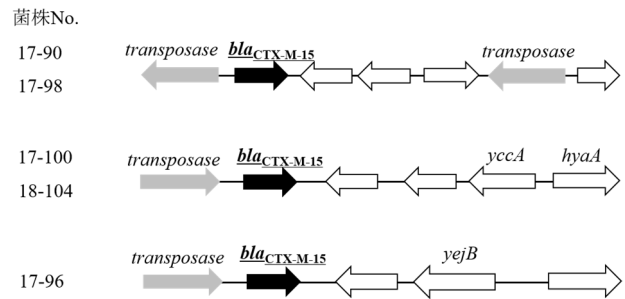


図1. *bla*_{CTX-M-15} 周囲約5,000bpのゲノム配列

ポリン系薬剤であるCTXに対する耐性率は、イヌ由来大腸菌で26.1%、ネコ由来大腸菌で33.8%であった。この報告ではESBL産生性の有無についての情報は無いものの、本研究および他の報告⁹⁾でESBL産生大腸菌が確認されていることから、伴侶動物におけるESBL産生大腸菌の存在は明らかである。

また、本研究で検出した5株のESBL産生大腸菌すべてが、世界的に蔓延するフルオロキノロン耐性B2-O25-ST131株であることが明らかになった。全ゲノム解析による病原因子の検索では、*stx1*、*stx2*、*eae*等は認められず、*iss*や*iha*など腸管外病原性大腸菌に特徴的な病原因子が検出された。B2-O25-ST131株が保有する β -ラクタマーゼ遺伝子には様々な型が報告されているが、主要な型の1つとして*bla*_{CTX-M-15}があげられ²⁾、本研究で検出した5株もすべて*bla*_{CTX-M-15}を保有していた。CTX-M型 β -ラクタマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在することが一般的であるが、この5株の全ゲノム解析の結果、*bla*_{CTX-M-15}はすべての株で染色体上に存在した。また、*bla*_{CTX-M-15}に近接する *Transposase* を起点とする約5,000bpの配列は3つのパターンに分かれた (図1)。この配列のうち *Transposase* および *bla*_{CTX-M-15} を含む約3,000bpについてデータベース上で検索を行った結果、3パターンの配列すべてが、プラスミドあるいは染色体の配列として登録されていた。すなわち、この5株の*bla*_{CTX-M-15}を含む配列は、何らかの形でプラスミドと染色体の間を転移できるものと推測された。プラスミド性の薬剤耐性遺伝子は、接合伝達により他の菌に伝播していく一方で遺伝子の脱落も起こりやすいが、染色体性の薬剤耐性遺伝子は、伝達性は低いものの脱落は比較的起こりにくいと考えられる。この5株のうち、ゲノム完全長を決定できた4株はそれぞれ複数のプラスミドを保有していたものの、薬剤耐性因子はすべて染色体ゲノム上に存在しており、より多剤耐性株として安定していることが示唆された。

2020年の全国犬猫飼育実態調査¹⁰⁾によると、イヌおよびネコの飼育総数は近年ほぼ横ばいであるが、新規飼育者の飼育頭数は2018年より3年連続で増加している。また、コロナ禍による生活スタイルの変化により、この傾向はさらに続くことが予想される。イヌやネコなどの伴侶動物は

「家族の一員」であるという意識はすでに広く浸透しており、飼い主と飼育動物の緊密な関係が築かれている。一方で、密接に関わるがゆえに、病原体を共有してしまうリスクは増加すると考えられる。本研究で検出されたB2-O25-ST131株のヒトへの直接的な影響は明らかではないが、ヒトの臨床において大きな問題となっている薬剤耐性菌に関して、伴侶動物がそのベクターやリザーバーとなってしまう可能性もあり、今後も継続したモニタリング調査が必要である。

ま と め

2017年度から2018年度に都内の動物病院を受診したイヌおよびネコから分離された大腸菌のうち、O血清型別によりO25と判定された20株を検査対象とし、ESBL産生菌の検索および分子疫学解析を行った。

供試した20株のうち5株がESBL産生菌であり、5株すべてにフルオロキノロン耐性が認められた。この5株について全ゲノム解析を行った結果、 β -ラクタマーゼ遺伝子として $bla_{CTX-M-15}$ を持つフルオロキノロン耐性B2-O25-ST131株であることが判明した。このうち、ゲノム完全長を決定できた4株では、すべての薬剤耐性因子が染色体上に存在していることがわかり、多剤耐性株として安定していることが示唆された。

世界的な問題となっている薬剤耐性菌に関して、ワンヘルス・アプローチに基づく動物におけるモニタリング調査が引き続き重要であると考えられた。

謝 辞 本研究を行うにあたり、菌株の収集にご協力頂いた東京都獣医師会の先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省：薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン、
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>（2021年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 2) Canton, R., Coque, T.M.: *Curr. Opin. Microbiol.*, **9**, 466-475, 2006.
- 3) Rogers, B.A., Sidjabat, H.E. and Paterson, D.L.: *J. Antimicrob. Chemother.*, **66**, 1-14, 2011.
- 4) Harada, K., Okada, E., Shimizu, T., *et al.*: *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, **35**, 139-144, 2012.
- 5) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement (M100-S24), 2014, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- 6) Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4555-4558, 2000.
- 7) Wirth, T., Falush, D., Lan, R., *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **60**, 1136-1151, 2006.
- 8) 農林水産省：平成 29 年度 疾病に罹患した愛玩（伴侶）動物（犬及び猫）由来細菌の薬剤耐性モニタリング調査の結果、
<https://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/H29cyousa20181130.pdf>（2021年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）
- 9) Okubo, T., Sato, T., Yokota, S., *et al.*: *J. Infect. Chemother.*, **20**, 243-249, 2014.
- 10) 一般社団法人ペットフード協会：2020年（令和2年）全国犬猫飼育実態調査結果、
<https://petfood.or.jp/topics/img/201223.pdf>（2021年7月12日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性はある）

Molecular Epidemiological Analysis of ESBL-Producing *Escherichia coli* B2-O25-ST131 Isolated from Companion Animals

Yukihiro KODO^a, Kai KOBAYASHI^a, Hiroaki KUBOTA^a, Tsukasa ARIYOSHI^a, Yumi UCHITANI^a,
Keiko YOKOYAMA^a, Takayuki SHINKAI^a and Kenji SADAMASU^a

The 2016 National Action Plan on Antimicrobial Resistance highlights the importance of controlling and implementing measures against multidrug-resistant bacteria in animals and the environment, based on the One Health approach. Among the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*, strains belonging to B2-O25-ST131 have been widespread worldwide.

In this study, we investigated ESBL productivity and performed a molecular epidemiological analysis on 20 strains of *E. coli* O25 isolated from dogs and cats that visited a veterinary hospital in Tokyo. Five of these 20 strains produced ESBL, and all five strains were resistant to fluoroquinolone. As a result of whole genome analysis, these five strains were found to be fluoroquinolone-resistant B2-O25-ST131 strains harboring *bla*_{CTX-M-15} as an ESBL gene located on their chromosome.

In recent years, awareness of companion animals like dogs and cats has changed, and closer relationships have been established between humans and companion animals. As such, companion animals may serve as a reservoir for multidrug-resistant bacteria. Therefore, it is necessary to monitor trends in the prevalence of multidrug-resistant bacteria in companion animals.

Keywords: multidrug-resistant bacteria, companion animal, *Escherichia coli*, ESBL, ST131, genome-wide analysis, dog, cat

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1 Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan