

# 研究成果報告書

1. 研究課題名：愛玩動物における薬剤耐性大腸菌の実態把握と耐性遺伝子伝播要因の解明

2. 研究代表者氏名：徳田 杏乃

3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

愛玩動物から検出された第3世代セファロスポリン系薬耐性 *Escherichia coli* の細菌学的及び分子生物学的解析

安井桃音、辰巳滉輝、徳田杏乃、藤社果林、中村竜也：第36回日本臨床微生物学会総会・学術集会

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

## 【背景および目的】

薬剤耐性菌は世界の健康と発展にとって脅威となっており、WHOは、薬剤耐性菌は人類が直面する世界的な公衆衛生上の脅威トップ10のひとつであると宣言した。さらに、薬剤耐性菌は、ヒトのみならず、家畜、愛玩動物、食品、環境などあらゆる領域から分離されており、包括的な対策を講じるワンヘルス概念が推奨されている。ヒトは、愛玩動物と濃厚に接触する機会が多く、それら薬剤耐性菌がヒトに伝播する経路の1つとして考えられ、さらに感染が拡大することが懸念される。薬剤耐性菌の中でも、特に、基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)は、多くの分野で高度に検出されており、ヒトの健康に大きな影響を及ぼすことが考えられる。そこで、愛玩動物における薬剤耐性大腸菌の実態解明について分子生物学的解析を実施し、ヒトへの伝播リスクを明らかにすることを目的とする。本研究の成果は、薬剤耐性菌伝播の抑制、さらには抗菌薬適正使用に繋がることが期待される。

## 【対象】

2024年に京都府および大阪府の動物病院より検出されたESBL産生 *Escherichia coli* (ESBL-EC) 22株

## 【方法】

### 1. ESBL-EC 表現型

ESBL-ECの分離には、Cefotaxime-2μg/mL含有マッコンキー寒天培地に検体を塗布し、35°C, 24時間培養にて発育したコロニーについて質量分析器(Bruker社)および生化学的性状による同定検査を実施した。さらに、オーダープレート(ドライプレート栄研)を用いた微量液体希釈法にて、薬剤感受性検査を実施し、CLSI M100-34thに基づいて判定を行った。また、対象薬剤は以下11薬剤とした(Cefotaxime, Ceftazidime, Cefmetazole, Cefotaxime/Clavulanate, Piperacillin/Tazobactam, Ceftolozane/Tazobactam, Meropenem, Levofloxacin, Amikacin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Fosfomycin, Colistin)。

### 2. NGS 解析

ESBL-Ecと判定された24株を対象とし、NGS解析を実施した。ゲノムDNAは、シガーニアスRトータルDNAプロップキット組織用(関東化学)を用いて抽出した。外注にて、ライブラリー調整はNextera XT DNA Library Preparation Kit(Illumina, San Diego)を用い、iseq100(Illumina, San Diego)で測定した。得られたリードの品質はFastQを用いてクオリティチェックを実施し、トリミング後、SPAdesにより、de novoアセンブリを実施した。

### 3. NGS 解析

Center for Genomic Epidemiology(CGE)内のWebツールを使用し、resfinderおよびPathogenFinder、VirulenceFinderを使用して薬剤耐性因子および病原因子の検出、MLST解析を実施した。

### 4. バイオフィルム産生能

ESBL-Ec株をLBプロスにて24時間培養後に、Biofilm Formation Assay(同仁化学)を使用し測定した。ネガティブコントロールとして、菌を含まないプロスを使用し、Deらの報告( Infection and Drug Resistance, 12:3595-3606, 2019)従い、バイオフィルム産生能について評価した<sup>1</sup>。

## 【結果】

### 1. ESBL-EC 表現型

ESBL-EC 薬剤感受性検査結果を Table 1 に示した。各薬剤における耐性率は LVFX で 72.7%、ST 合剤で 18.2%、FOM で 9.1% であった。国内の臨床由来株における LVFX 耐性率は、ESBL-EC で 87.5%、と非 ESBL-EC で 23.5% と報告されており<sup>2</sup>、本検討における LVFX 耐性株が高率で検出されたことと同様であった。

Table1 : ESBL-EC 薬剤感受性検査結果

抗菌薬	CTX	CTX/CVA	PIPC/TAZ	CTLZ/TAZ	CFPM	CMZ	MEPM	LVFX	ST	AMK	FOM	CL
耐性率	100.0%	0%	0%	0%	81.8%	0%	0%	72.7%	18.2%	0%	9.1%	0%

### 2. LVFX 感受性と MLST 型の比較

愛玩動物由来 ESBL-EC における LVFX 感受性と MLST 型の比較を Figure 1 に示した。ESBL-EC 全 22 株の LVFX 薬剤感受性検査の結果、S 判定 6 株、I 判定 1 株、R 判定 15 株であり、うち ST131 が 11 株、ST73 が 2 株検出された。ST131 は、LVFX 耐性株で 66.7%、LVFX 感受性株で 16.7% を占めた。

厚生労働省院内感染対策サーベイランス JANIS の報告によれば、臨床由来株の MLST 型は ST131 が最多であり、次いで ST73 と報告されている。本検討株の愛玩動物株においても ST131 が優勢であったことから、MLST 型については臨床由来株と同様の傾向にあることが示唆された。

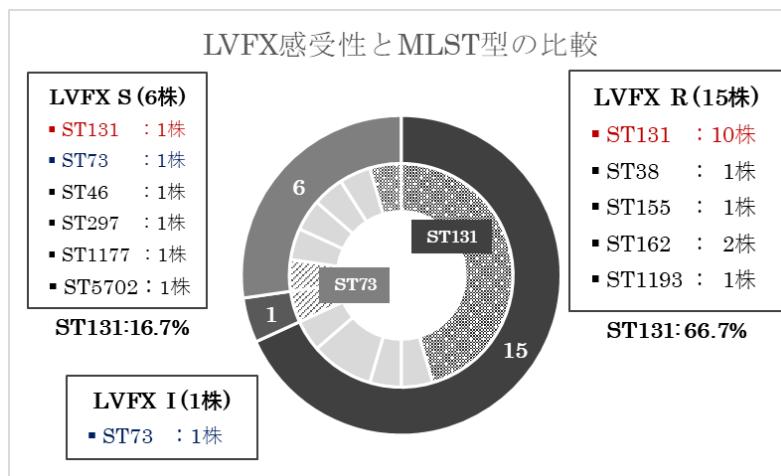


Figure 1 : 愛玩動物由来 ESBL-EC における LVFX 感受性と MLST 型の比較

### 3. CTX-M 型遺伝子の比較

JANIS より、臨床由来株における CTX-M 型遺伝子は、*bla*<sub>CTX-M-1</sub> group が 34.0%、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group が 46.8% と多数を占めている。一方、本検討における愛玩動物由来株においては *bla*<sub>CTX-M-1</sub> group が 45.5%、*bla*<sub>CTX-M-9</sub> group が 36.4% であることから、CTX-M 型遺伝子についても臨床由来株と同様の傾向を認めた (Table2)。

### 4. NGS 解析

ESBL-Ec22 株の phylogenetic relationships、biofilm formation および virulence genotypes 一覧を Table2 に示した。Phylogenetic Group B2 が 63.6% (14/22 株) と半数以上を占め、B1 が 22.7% (5/22 株)、D が 9.1% (2/22 株)、A が 4.5% (1/22 株) を占めた。B2 群には Extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) が属しており、高病原性が報告されている。今回、分離された ST131 (11 株) の全てが B2 群に属していたことから、ST131 が愛玩動物における尿路感染症への関連性が示唆された。

バイオフィルム産生能の評価では、高度産生 Strong adherent が 31.8% (7/22 株) であった。臨床由来の *E. coli* におけるバイオフィルム強産生には、*papC*, *hlyA*, *cnf1* が関与すると報告されている<sup>3</sup>。本検討においてもバイオフィルム強産生株では、1 株を除き上記のいずれかを 2 つ以上保有していたことから、臨床由来株と同様の傾向を認めた。

Table 2 : ESBL-Ec の phylogenetic relationships, biofilm formation および virulence genotypes の一覧

No.	CTX-M	MLST	Plasmid Replicon Typing									phylogenetic Group	Virulence Genes				SeroType	FimH Type	Biofilm
			IncFIA	IncFIB	IncFIC	IncFII	IncI-1	IncI	IncI1	IncI2	IncA/C2		cnaI	hlyA	hlyF	pspC			
1	bla CTX-M-15	131										B2	+				O25 : H4	fimH30	N
2	bla CTX-M-15	131	+	+								156	B2		+	+	O25 : H4	fimH30	M
3	bla CTX-M-14	155			+	+							B1				Not Found	fimH32	W
4	bla CTX-M-15	131	+	+			+					156	B2	+	+	+	O25 : H4	fimH30-like	S
5	bla CTX-M-27	131		+	+							156	B2	+	+	+	O16 : H5	fimH41	S
6	bla CTX-M-15	131	+	+			+					156	B2		+	+	O25 : H4	fimH30	M
7	bla CTX-M-15	1177		+	+			+				EC648	D				O45 : H15	fimH65	W
8	bla CTX-M-55	162		+	+			+					B1		+	+	O9 : H21	fimH32	S
9	bla CTX-M-14	46		+	+								A				O9 : H10	fimH34	N
10	bla CTX-M-27	131	+	+								156	B2				O25 : H4	fimH30	N
11	bla CTX-M-15	131				+							B2				O16 : H5	fimH41	W
12	bla CTX-M-55	5702	+	+	+	+			+		+		B1				O121 : H14	fimH68	W
13	bla CTX-M-14	38				+							D				O86 : H18	fimH5	N
14	bla CTX-M-27	131	+	+		+						156	B2				O25 : H4	fimH30	M
15	bla CTX-M-2	297		+	+							156	B1				O1 : H8	fimH2747	S
16	bla CTX-M-27	131		+	+							156	B2				O16 : H5	fimH89	N
17	bla CTX-M-27	73	+	+		+							B2		+	+	O6 : H1	fimH30	S
18	bla CTX-M-15	131	+	+		+						156	B2				O16 : H5	fimH41	M
19	bla CTX-M-55	73		+	+			+				MG828, 156	B2	+	+	+	O6 : H1	fimH296	S
20	bla CTX-M-15	1193	+	+				+			+	156, pVC	B2				O75 : H5	fimH64	N
21	bla CTX-M-27	131	+	+		+					+	BS512	B2				O25 : H4	fimH30	N
22	bla CTX-M-14	162		+	+	+							B1		+	+	O9 : H9	fimH32	S

### 【今後の展望】

本検討より、愛玩動物由来株においても臨床由来株と同様の傾向を認める株が多数見受けられた。今後、Whole genome sequencing (WGS) 解析により、ヒトと動物での菌株間の相同性や伝播経路の存在を明らかにする必要がある。これは、ワンヘルスの観点から、薬剤耐性菌の拡散制御や公衆衛生上の対策に寄与することが期待される。

### 【参考文献】

- 1) Gabrielle Messias De Souza, Estevan Rodrigues Dos Santos Neto *et al.* Comparative Study Of Genetic Diversity, Virulence Genotype, Biofilm Formation And Antimicrobial Resistance Of Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) Isolated From Nosocomial And Community Acquired Urinary Tract Infections, Infection and Drug Resistance 2019;12 3595-3606.
- 2) M Miyazaki, Y Yamada, K Matsuo *et al.* Change in the Antimicrobial Resistance Profile of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli*, J Clin Res. 2019 Sep 1:11(9)635-641.
- 3) P Naves, G del Prado, L Huelves *et al.* Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains, Microbial Pathogenesis. 2008. 45(2)86-91.