

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）地方衛生研究所における薬剤耐性菌等に関する細菌学的、疫学的調査解析機能の強化に関する研究

市販食肉から分離された D240G 変異陽性 CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の解析

八柳 潤 檜尾拓子 今野貴之 高橋志保 熊谷優子 和田恵理子

秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫し、多くの場合入院患者に尿路感染を惹起している。CTX-M 型 ESBL 産生菌による院内感染対策のためには感染疫学を解明することが重要であるが、その詳細は明らかではない。今回、県内の医療機関で分離され、世界流行株の可能性がある CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* と、市販鶏肉から分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* について Sequence Type (ST) と Phylogenetic Group (PG)、尿路感染症の病原因子である P 繊維毛の有無について検討した。供試した尿路感染患者由来株はいずれも Pandemic O25b:H4-ST131 clone であることが確認され、秋田県の医療機関に当該 clone が侵淫し、尿路感染症の原因となっていることが初めて確認された。市販鶏肉から分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* 菌株 No.411 株と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* ES1547 株はいずれも Pandemic O25b:H4-ST131 clone とは異なっていた。ES1547 株は P 繊維毛を保有し、尿路感染症の原因となる可能性がある一方、No.411 株は P 繊維毛を保有しないために尿路の上皮細胞に付着する能力を欠き、尿路感染症の原因となり得ないと考えられた。秋田県における CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の感染疫学の詳細を解明するためには、鶏肉から分離される CTX-M 型 ESBL 産生株について尿路感染の発症に関与する病原因子の保有状況を詳細に調査し、CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の感染源としての鶏肉の意義を明確化していくことが重要であることに加えて、CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone の市中と食品における侵淫実態を解明する必要がある。

1. 緒言

CTX-M 型 ESBL 産生菌の分離頻度が世界的にも増加し、欧米においても TEM-型や SHV-型に代わり、CTX-M 型が ESBL の主流となってきた^{1,2)}。我々は 2003 年から 2010 年までに県内の医療機関から受領した 963 株の ESBL 疑い株のうち、680 株が CTX-M 遺伝子陽性菌であることを示し、秋田県内の医療機関に CTX-M 型 ESBL 産生株が広く侵淫し、多くの場合入院患者に尿路感染を引き起こしていること³⁾を明らかにした。更に、CTX-M3 がポイントミューテーション (D240G 変異) により CAZ にも耐性を獲得した CTX-M15 遺伝子を保有する *E. coli* が県内に侵淫していることを初めて確認した³⁾。近年、CTX-M15 を産生する *E. coli* O25b:H4-Sequence Type (ST)131, Phylogenetic Group (PG) -B2 (Pandemic O25b:H4-ST131 clone) が世界的に侵淫を拡大し^{4,5)}、高頻度に尿路感染症を惹起する^{6,7)}ことが報告されている。尿路感染症の原因となる *E. coli* (Uropathogenic *E. coli*:UPEC) は尿管上皮細胞への付着因子として

P 繊維毛を保有⁸⁾することが特徴であり、Pandemic O25b:H4-ST131 clone は P 繊維毛の Variant である *papA*-F10 allele を高頻度に保有する⁷⁾。秋田県でこれまで分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* の多くは尿路感染症由来であるが、Pandemic O25b:H4-ST131 clone であるかどうかは未確認であった。

CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染疫学には不明な点が多い。CTX-M 型 ESBL 産生菌鶏肉から検出されたとする報告が散見^{9,10,11)}されることから、鶏肉が CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染源として重要である可能性が指摘されている一方、鶏肉がヒトへの感染源になっている直接的な証拠はないことも指摘⁹⁾されているなど、CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染源としての鶏肉の意義については議論がある。

我々は既報のとおり、秋田市内で購入した市販鶏肉 35 検体から CTX-M1 グループ遺伝子陽性 *E.coli* を 11 株分離し、そのうち 2 株が D240G 変異を持つ CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* であることを報

告¹²⁾した。今回、県内における Pandemic O25b-clone の侵淫実態と感染源を解明するため、これら鶏肉由来 D240G 変異陽性 CTX-M 遺伝子を保有する *E.coli* と、尿路感染症由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* について ST と PG、尿路感染症の病原因子である P 絨毛の有無について検討したので報告する。

2. 方法

2.1 供試株

2011 年 3 月 2 日から 2011 年 4 月 26 日までに県内の医療機関から送付された尿由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* 8 株と、既報¹²⁾の市販鶏肉由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* No.411 株と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* ES1547 株を供試した。

2.2 P 絨毛関連遺伝子の検出と血球凝集試験

P 絨毛関連遺伝子である *papA*-F10 allele¹³⁾と *papEF*¹⁴⁾遺伝子を PCR により検出した。血球凝集試験は Evans らの報告¹⁵⁾に従いヒト A 型赤血球を使用して実施した。

2.3 ST131, O25b, Phylogenetic Group (PG) の確認

ST131 の確認は *gyrB* SNP を検出する Johnson らの報告した PCR⁷⁾により実施した。O25b O 抗原遺伝子は Clermont らが報告した PCR¹⁶⁾により検出した。*E.coli* の PG は Clermont らの報告¹⁷⁾に従い決定した。

3. 結果と考察

表に示すように、2011 年 3 月 2 日から 2011 年 4 月 26 日までに県内の医療機関から送付された尿由来 CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* 8 株は全て O25b PCR と ST131 PCR が陽性となり、PG は B2, P 絨毛関連遺伝子として *papA*-F10 allele を保有したことから、これらの株は Pandemic O25b:H4-ST131 clone であることが確認され、秋田県の医療機関に CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone が侵淫し、尿路感染症の原因となっていることが初めて確認された。

一方、市販鶏肉から分離された CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* No.411 株と CTX-M15/27 遺伝子陽性 *E.coli* ES1547 株はいずれも O25b, ST131

陰性であった。また、No.411 株は PG B1, ES1547 株は PG D であった。これらの結果は、No.411 株と ES1547 株はいずれも Pandemic O25b:H4-ST131 clone とは異なることを示していた。次に、これら 2 株の鶏肉由来 CTX-M 遺伝子保有 *E.coli* がヒトに尿路感染症を発症し得るかどうかについての知見を得るために、P 絨毛関連遺伝子の有無について検討した。その結果、ES1547 株は P 絨毛関連遺伝子である *papEF* 遺伝子を保有していることが明らかとなった一方、No.411 株は *papEF* 遺伝子を保有せず、血球凝集試験においても Mannose-Sensitive Hemmagglutination (MSHA) が観察されることが示された。MSHA は Type 1 絨毛を保有する株が示す表現型であり、Type 1 絨毛と尿路感染症の関連については疑問視する報告が多い⁸⁾。以上の結果から、今回供試した鶏肉由来 CTX-M 遺伝子保有 *E.coli* 2 株のうち、ES1547 株は P 絨毛を保有してヒトの尿路感染症の原因となる可能性がある一方、No.411 株は P 絨毛を保有しないために尿路の上皮細胞に付着する能力を欠き、ヒトの尿路感染症の原因となり得ない株であると考えられた。

鶏肉からの CTX-M 型 ESBL 産生株の分離報告は海外¹⁰⁾のみならず国内でも散見^{9, 11)}されるが、鶏肉から分離された CTX-M 型 ESBL 産生株がヒトに尿路感染症を発症し得るかどうかについて検討した報告はみあたらない。D240G 変異を有する CTX-M 型 ESBL 産生菌 2 株のみについての検討ではあるものの、今回の我々の結果は、鶏肉由来株がヒトに尿路感染症を発症し得る可能性を示すものであると同時に、鶏肉由来株にはヒトに病原性を示す株と病原性を示さない株が混在する可能性を示すものと考えられる。同一感染源に異なる遺伝的背景を持つ多彩な菌が混在し、そのうちの一部のみがヒトに感染症を惹起する細菌としては、古くからベロ毒素産生性大腸菌 (VTEC) が^{18,19)}知られている。牛は多彩な VTEC を保菌するが、ベロ毒素産生能に加えて、ヒトの感染と発病に関与する病原因子である腸管定着因子などを保有する VTEC のみがヒトに感染して下痢症を引き起こす。我々は、以前の調査において秋田市内で購入した市販鶏肉から CTX-M2 グループ ESBL 産生大腸菌と、CTX-M 遺伝子を保有する *Kluyvera cryocrescens* を分離した²⁰⁾。大腸菌な

表 供試した CTX-M 遺伝子陽性株の解析結果

菌株番号	検体	CTX-M 遺伝子型	D240G	CAZ	Phylogenetic Group	O25b	P 絨毛関連遺伝子	ST131
ES1024	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1031	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1032	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1036	患者尿	CTX-M15	+	I	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1038	患者尿	CTX-M15	+	S	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1049	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1060	患者尿	CTX-M15	+	R	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
ES1067	患者尿	CTX-M15	+	I	B2	+	<i>papA</i> -F10 allele	+
411	鶏肉 10/25-10	CTX-M15	+	S	B1	—	(MSHA)*	—
ES1547	鶏肉 10/29-20	CTX-M15/27	+	I	D	—	PapEF	—

*血球凝集試験

どが保有しているプラスミド性 CTX-M 型遺伝子のオリジンは、*Kluyvera* 属が染色体に保有する CTX-M 型遺伝子である²¹⁾と考えられていることから、鶏は *Kluyvera* 属や *E.coli* など多彩な CTX-M 遺伝子保有株を保菌し、鶏の中では異なる菌種間での CTX-M 遺伝子の伝播が発生しているものと推察される。今回の我々の結果は、鶏肉に混在する多彩な CTX-M 遺伝子保有株のうち、ヒトへの感染と発病に関与する病原因子を併せ持つ株のみがヒトに感染して尿路感染症を引き起こす可能性を示唆していると考えられ、CTX-M 型 ESBL 産生菌の感染疫学を理解する上で、この点を考慮に入れることが不可欠である。尿路感染症由来大腸菌は P 絨毛の他、adhesin, Toxin, Shiderphore, Capsule 等の病原因子を保有する事が報告⁷⁾されている。今後、鶏肉から分離される CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌についてこれらの病原因子の保有状況を詳細に調査し、尿路感染症の原因となる ESBL 産生大腸菌の感染源としての鶏肉の意義を明確化していく必要がある。

今回我々が確認した CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone の秋田県における感染疫学を解明することは、O25b:H4-ST131 による院内感染対策の基礎となることから重要であるが、その詳細には不明な点が多い。その解明には市中の人の保菌実態に加えて、鶏肉等の食品における O25b:H4-ST131 の汚染実態を解明することが必要である。我々が既報で市販鶏肉から分離した CTX-M15 遺伝

子陽性 No.411 株¹²⁾は、O25b:H4-ST131 とは異なる株であることが今回確認された。市販鶏肉からは多彩な CTX-M 遺伝子保有株が分離され¹²⁾るが、CTX-M15 などの D240G 変異を有する CTX-M 遺伝子保有株の分離頻度は高くない¹²⁾。従って、O25b:H4-ST131 の感染疫学解明のためには、食品や市中の無症状保菌者から O25b:H4-ST131 を効率良く分離するための選択分離培養法を使用して調査を実施する必要がある。O25b:H4-ST131 は D240G 変異のために Ceftazidime に対する感受性が低下している傾向があることに加えて、Ciprofloxacin 耐性も獲得している⁶⁾ことから、Cefotaxime, Ceftazidime, Ciprofloxacin を選択剤とすることにより、より効率良い選択分離培養が可能となると考えられる。

4. まとめ

今回、秋田県の医療機関に CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone が侵淫していることを初めて確認した。秋田県における CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌の感染疫学の詳細を解明するためには、鶏肉から分離される CTX-M 型 ESBL 産生株について尿路感染の発症に関与する病原因子の保有状況を詳細に調査し、ESBL 産生大腸菌の感染源としての鶏肉の意義を明確化していくことが重要であることに加えて、CTX-M15 遺伝子陽性 *E.coli* Pandemic O25b:H4-ST131 clone の市中と食品における侵淫実態を解明する必要がある。

参考文献

- 1) Bonnet R: Growing group of Extended-Spectrum β -lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **48**, 2004, 1-14.
- 2) Canton R, Coque TM: The CTX-M β -lactamase pandemic, *Current Opinion in Microbiology*, **9**, 2006, 466-475.
- 3) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: 秋田県の医療機関における CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況, 秋田県健康環境センター年報, **6**, 2010, 40-45.
- 4) Lavollay, M. et al.: Clonal dissemination of a CTX-M-15 β -lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, in Tunis and in Bangui, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 2006, 2433-2438.
- 5) Nicolas-Chanoine M.H. et al.: Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M15. *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 2008, 273-281.
- 6) Cerquetti, M. et al.: Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infection in Italy, *Clin. Microbiol. Infect.*, **16**, 2010, 1555-1558.
- 7) Johnson, J.R. et al.: Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of Antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **53**, 2009, 2733-2739.
- 8) Johnson, J.R.: Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection, *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, 1991, 80-128.
- 9) 石畝 史, 永田暁洋, 鈴木里和 他: 福井県内における人および鶏肉由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の分子疫学的解析. 日本獣医公衆衛生学会誌, **63**, 2010, 883-887.
- 10) Doi, Y. et al.: Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from clinical samples and retail meat from Pittsburg, USA and Seville, Spain, *Clin. Microbiol. Infect.*, **16**, 2009, 33-38.
- 11) 下島優香子 他: 食肉からの基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌の検出, 東京都健康安全研究センター年報, **62**, 2011, 145-150.
- 12) 八柳 潤 他: 秋田県の医療機関, 鶏肉, 市中における CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離状況, 秋田県健康環境センター年報, **8**, 2012, 38-43.
- 13) Johnson, J.R., et al.: Analysis of the F antigen-specific *papA* alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay, *Infect. Immun.*, **68**, 2000, 1587-1599.
- 14) Johnson, J.R., et al.: Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise, *J. Infect. Dis.*, **181**, 2000, 261-272.
- 15) Evans, D.G., et al.: Hemagglutination of human group A erythrocytes by Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: Correlation with colonization factor, *Infect. Immun.*, **18**, 1977, 330-337.
- 16) Clermont, O., et al.: The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup, *J. Antimicrob. Chemother.*, **61**, 2008, 1024-1028.
- 17) Clermont, O., et al.: Rapid and simple detection of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *App. Environ. Microbiol.*, **66**, 2000, 4555-4558.
- 18) Wells, J.G et al.: Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle, *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1991, 985-989.
- 19) Montenegro, M.A., et al.: Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle, *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1990, 1417-1421.
- 20) 八柳 潤, 今野貴之, 齊藤志保子: 市販鶏肉からの CTX-M 型基質拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) 遺伝子保有株の分離と分離株の解析, 秋田県健康環境センター年報, **6**, 2010, 33-39.
- 21) Humeniuk C, et al.: β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 2002, 4038-4040.