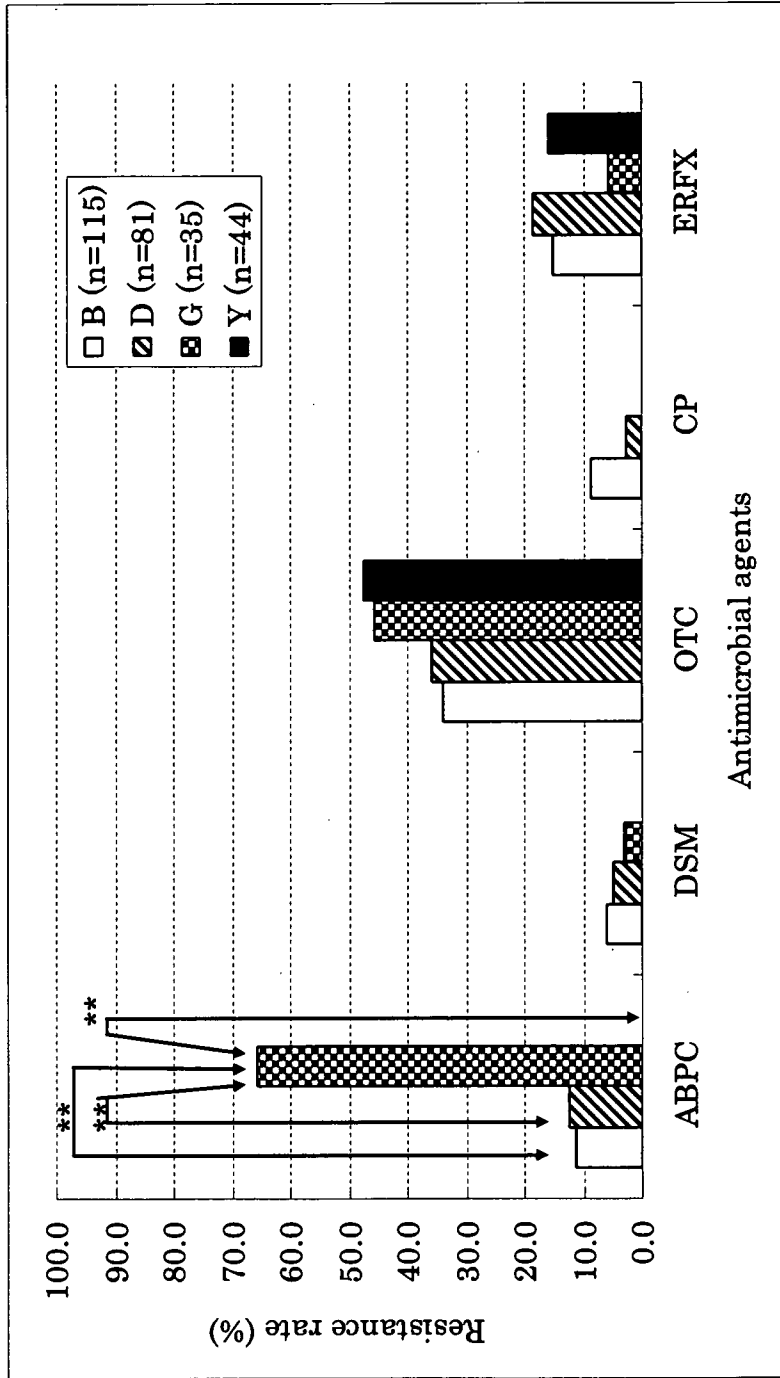


図3 家畜由来 *Campylobacter jejuni* の血清群と薬剤耐性



※ABPCの供試株数: B/D/G/Y:107/72/32/44

図4 血清群別薬剤耐性率の比較

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」
平成 19 年度分担研究報告書

課題名：家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析

分担研究者 秋庭正人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
研究協力者 吉井紀代 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
研究協力者 中澤宗生 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
研究協力者 片岡 康 日本獣医生命科学大学獣医微生物学教室

研究要旨

動物由来腸内細菌の薬剤耐性化機構を解析することを目的として3つの研究を行った。①家畜由来サルモネラの保有する3種薬剤耐性（R）プラスミドの全塩基配列を決定し、アノテーション終了後、DDBJ に登録した。多剤耐性を規定する因子としての R プラスミドの重要性が明らかとなった。②牛由来のセファゾリン耐性 *Salmonella* Typhimurium を解析したところ、全て *bla*_{CMY-2} 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 βラクタマーゼ産生菌であった。また、*bla*_{CMY-2} 遺伝子の拡散には多剤耐性を規定する R プラスミドが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。③日獣大医療センターで細菌感染症と診断されたペットから大腸菌を分離し、12 薬剤に対する感受性を調査した。分離菌の第3世代セフェム及びフルオロキノロンに対する耐性率は高く、小動物医療分野における抗菌剤の使用が公衆衛生上の脅威となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では動物由来腸内細菌の薬剤耐性化機構を解析することを目的としている。今年度は家畜由来サルモネラの保有する3種薬剤耐性（R）プラスミドの遺伝子構造を明らかにすること、牛から分離されたセファゾリン耐性 *Salmonella* Typhimurium (ST) の性状を明らかにすること、及びペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性動向を調査することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1) 薬剤耐性（R）プラスミドの遺伝子構造解析

豚由来 *S. Choleraesuis* (SC) の保有する 208 kb プラスミド、pMAK1、牛由来 *S. Dublin* (SD) の保有する 62 kb プラスミド、pMAK2、同じく SD の保有する 40 kb プラスミド、pMAK3 の全塩基配列をショットガンシーケンス法で決定し、アノテーション終了後、DDBJ に登録した。

2) 牛から分離されたセファゾリン耐性 ST の解析

セファゾリンに耐性を示す牛由来 ST を収集し、薬剤耐性を規定する遺伝子領域の構造等を PCR、サザンハイブリダイゼーション、pSTV ベクターを用いた遺伝子クローニング、遺伝子塩基配列決定、エレクトロポレーション等の手法を用いて解析した。薬剤感受性試験は市販の感受性ディスクを用いて CLSI ガイドラインに準拠した方法で実施した。また、セファロスポリナーゼ産生性は市販のキットで確認した。

3) ペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性調査

日本獣医生命科学大学動物医療センターで細菌感染症と診断されたペットから食中毒菌を分離し、その薬剤感受性を 2) と同様に調べた。

なお、研究全体を通じて使用した薬剤とその略称は以下の通りである。アンピシリン, AMP ; セファゾリン, CFZ ; セフォタキシム, CTX ; セフトリアキソン, CRO ; セフチオフル, CTF ; ストレプトマイシン, STR ; ゲンタマイシン, GEN ; カナマイシン, KAN ; テトラサイクリン, TET ; クロラムフェニコール, CHL ; コリスチン, CST ; ナリジクス酸, NAL ; エンロフロキサシン, EFX ; ST 合剤, SXT。

C. 結果

1) R プラスミドの遺伝子構造解析

ショットガンシーケンシング法による塩基配列決定の冗長度は pMAK1、pMAK2、pMAK3 でそれぞれ 12.7、12.4、10.7 であった。DDBJ に登録した各プラスミドの概

要を表 1 に示した。pMAK1 は *S. Typhi* str. CT18 株の保有する IncHI1 プラスミドと類似度が高く、水銀耐性に関与する *merRTPCADE* オペロンの他、11 の薬剤耐性遺伝子を座乗していた。このうち *dfrA12*、*aadA2*、及び *sul1* はクラス 1 インテグロンを構成していた。pMAK2 は pMUR050 (*E. coli* 由来) 及び R46 に近縁な IncN プラスミドで 7 つの薬剤耐性遺伝子を座乗していた。このうち *blaTEM-1* は Tn3 に、*aph*、*ble*、*sph* は Tn5 に、*tetA* は Tn1721 に含まれていた。pMAK3 は *E. coli* 由来 R388 に近縁な IncW プラスミドでクラス 1 インテグロンを構成する 4 つの薬剤耐性遺伝子、*aac(6')-Iae*、*aadA2*、*sul1*、*floR* を座乗していた。

2) 牛から分離された CFZ 耐性 ST の解析

牛から分離された CFZ 耐性 ST はいずれも *bla_{CMV-2}* 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 β ラクターマーゼ産生菌であったが、*bla_{CMV-2}* 遺伝子が染色体上に存在する株とプラスミド上に存在する株が認められた。また、後者の株には第 3 世代セフェムに耐性を示す株も存在した。これら菌株の特徴を表 2 に示した。

A 型菌の *bla_{CMV-2}* 遺伝子は *Xba*I-PFGE で観察される 485 kb フラグメント上に存在することがサザンハイブリダイゼーションの結果から明らかとなった (図 1)。制限酵素 *Eco*RI と *Sa*I を用いたゲノミックサザンの結果、*bla_{CMV-2}* 遺伝子は約 9 kb のフラグメント上に存在することが明らかとなった。そこで、この 9 kb フラグメントを pSTV ベクターにクローニングして塩基配列を決定し、DDBJ に登録した (AB365867)。図 2 に示したように 9 kb

フラグメントには *bla_{CMV-2}* 遺伝子の他に 8 遺伝子が座乗していたが、遺伝子データベースを検索したところ、これらはいずれもプラスミド由来の遺伝子であることが示唆された。*S. Newport* (SN) が保有する IncA/C プラスミド、pSN254 との関連を疑い、Welch ら (PLoS ONE, 2(3): 1-6, 2007) の IncA/C backbone 13 領域の PCR 検出を試みた。その結果、*repA*, region 1, 10, 11 の 4 領域を除く 9 つの領域で陽性コントロールと同じ増幅を認めた。

A 型菌の保有する 140 kb プラスミドは *spvB* 遺伝子陽性であり、かつ AMP, STR, TH, TET、及び KAN 耐性遺伝子が座乗していたことから、いわゆる薬剤耐性/病原性プラスミドであることが明らかとなった。

B 型菌は 180 kb と 95 kb のプラスミドを保有し、第 3 世代セフェムである CTX や CRO にも耐性を示した。95 kb プラスミド上には *spvB* 遺伝子の他、*bla_{CMV-2}* 遺伝子や KAN 耐性遺伝子も座乗しており、薬剤耐性/病原性プラスミドであることが明らかとなった。

180 kb プラスミドのレプリコン型は明らかでないが、AMP, STR, TH, TET, KAN 耐性遺伝子を座乗した R プラスミドであることが示された。

C 型菌は 180 kb と 160 kb のプラスミドを保有し、*bla_{CMV-2}* 遺伝子は 180 kb プラスミド上に存在した。180 kb プラスミドは Welch らの IncA/C backbone PCR で 13 領域全てが増幅陽性であることや、そのサイズ、座乗する薬剤耐性遺伝子 (AMP, CHL, STR, TH, TET, CFZ) から SN 由来の pSN254 と近縁なプラスミドであることが

示唆された。160 kb プラスミドは *spvB* 遺伝子の他、AMP, TH, TET, KAN 耐性遺伝子が座乗する薬剤耐性/病原性プラスミドであることが明らかとなった。

3) ペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性調査

2005 年 4 月から 2007 年 3 月までに日獣大動物医療センターにて、二次診療を受診した犬、猫、小鳥、エキゾチックアニマルなどの症例のうち、910 症例 (2005 年度 581 症例、2006 年度 329 症例) が細菌感染症と診断され、このうち 58 症例 (6.4%) で起因菌として大腸菌が分離同定された。

分離された大腸菌 59 株を用いて 12 薬剤 (AMP, CFZ, CTF, STR, GEN, KAN, TET, CHL, CST, NAL, EFX, SXT) に対する受性を調べたところ、48 株 (81.4%) が何らかの薬剤に耐性を示した。このうち 33 株 (55.9%) は 3 剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。薬剤別では AMP, NAL, EFX, STR の耐性率は 50% を超えていた (表 3)。第 3 世代セフェム系薬剤、CTF とフルオロキノロン系薬剤、EFX の耐性率は、それぞれ 39.0% 及び 54.2% であった。

D. 考察

1) R プラスミドの遺伝子構造解析

サルモネラ由来 3 種 R プラスミドは 4 つ以上の薬剤耐性遺伝子を座乗しており、サルモネラの多剤耐性を規定する因子としての重要性が明らかとなった。

国内の豚から分離された SC の保有するプラスミド、pMAK1 は IncHI1 プラスミドで、このレプリコン型を示す R プラスミドの保有は *S. Typhi* 及び *S.*

ParatyphiA について報告されている。一方、我々の調査によると国内の家畜から分離された血清型 Typhimurium, Dublin, Panama でも類似のプラスミド保有が確認されており（未発表データ）、サルモネラの多剤耐性を規定する因子としての IncHI1 プラスミドの重要性を示唆する成績と考えられた。次年度は、今年度得られた全塩基配列データを利用して PCR マッピングの手法により、これらプラスミドの遺伝子構造を解析する予定である。

S. Dublin (SD) の保有する IncN プラスミド、pMAK2 は本血清型が 1980 年代前半に獲得したプラスミドで、pMAK2 及びその派生プラスミドを保有する株は 1990 年代前半まで最優勢であった。その後、本プラスミドを保有する株の割合は減少し、2000 年代前半における保有率は 15.4% であった（平成 18 年度分担報告書）。1980 年代半ばの NAL 及び 1990 年代前半の EFX（フルオロキノロン）等の動物薬市場導入に伴う、野外での薬剤使用状況の変化が pMAK2 保有率の変化に影響を与えたと考えられる。

pMAK3 は 1990 年代前半に分離された SD の一部が保有していたプラスミドで、1990 年代後半以降の株からは分離されていない（平成 18 年度分担報告書）。

2) 牛から分離された CFZ 耐性 ST の解析

CFZ 耐性 SN による牛サルモネラ症は近年、わが国においても散発的に発生している。一方、ST は牛から最も高率に分離される血清型の 1 つであるが、これまでわが国では牛からの CFZ 耐性 ST の分離報告はなかった。我々は CFZ 耐性 ST を牛から分離したので、その性

状を解析した。

CFZ 耐性は全て bla_{CMY-2} 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 β ラクターマーゼ産生菌であった。文献的には SN や ST の bla_{CMY-2} 遺伝子はプラスミド上に存在することが報告されているので、SN の R プラスミド pSN254 を対照としてサザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、A 型菌では pSN254 で認められる bla_{CMY-2} シグナルがプラスミド上に認められなかった。そこで Xba I-PFGE のゲルを用いたサザン解析を行ったところ、 bla_{CMY-2} 遺伝子は 485 kb フラグメント上に存在することが示され、本遺伝子が染色体上に存在することが示唆された（図 1）。 bla_{CMY-2} 遺伝子の挿入部位を明らかにする目的で本遺伝子を含む 9 kb の染色体由来フラグメントをクローニングし、その塩基配列を決定したところ、これらの遺伝子は全てプラスミドに由来することが示唆され、染色体上の挿入部位特定には至らなかった（図 2）。SN の R プラスミド、pSN254 との関連を疑い、pSN254 の backbone 遺伝子の PCR 検出を試みたところ、全 13 領域中、*repA* を含む 4 領域を除く 9 つの領域で陽性コントロールと同じ増幅を認めた。以上のことから A 型菌の CFZ 耐性は bla_{CMY-2} 遺伝子を座乗した IncA/C プラスミドが ST の染色体上にインテグレートされたものと推察された。

B 及び C 型菌は、それぞれ 2 種類の巨大プラスミドを保有しており、 bla_{CMY-2} 遺伝子はいずれかのプラスミド上に存在した。B 型菌では bla_{CMY-2} 遺伝子は 95 kb の *spvB* 陽性プラスミド上に存在しており、いわゆる血清型特異的病原性プ

ラスミドに多剤耐性を規定するトランスポゾンや R プラスミド等が融合したものと推察された。C 型菌では *bla_{CMY-2}* 遺伝子は 180 kb の IncA/C プラスミド上に存在していた。このプラスミドは他に CHL、STR、TH、TET に対する耐性遺伝子を座乗していることや全ての IncA/C backbone 遺伝子が検出できたことから、SN の pSN254 が ST に伝達したものかも知れない。

以上の成績から *bla_{CMY-2}* 遺伝子の拡散には多剤耐性を規定する R プラスミドが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

3) ペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性調査

食品安全委員会は薬剤耐性菌が出現した場合の代替薬の有無という判断基準に基づいて動物用抗菌剤を系統別に分類した。それによると、第 3、4 世代セフェムとフルオロキノロンは極めて高度に重要であることを示すランク I に分類されている。

日獣大動物医療センターで分離された大腸菌 59 株の薬剤感受性を調べたところ、第 3 世代セフェム系薬剤、CTF とフルオロキノロン系薬剤、EFX に対する耐性率は、それぞれ 39.0% 及び 54.2% であり、公衆衛生上、問題であると考えられた。

患者は一般病院での治療後に医療センターに来院したものである。一般病院での治療歴は明らかでない。医療センターにおいてはフルオロキノロンを含むキノロン系抗菌剤は使用されていないが、セフェム系やペニシリン系抗菌剤での治療は行われている。一般病院における治療

から採材、菌分離までの間隔は 1 ヶ月以上であった。

フルオロキノロン耐性大腸菌の排菌は治療終了後、長続きしないといわれるが、少なくとも 1 ヶ月程度は排菌が維持される場合が多いことを示唆する成績かも知れない。分離菌と治療歴の関係については現在検討中である。

E. 結論

今年度の研究結果から、CFZ 耐性を含むサルモネラの多剤耐性を規定する因子としての R プラスミドの重要性が明らかとなった。また、小動物医療分野における抗菌剤使用がヒトの治療に汎用される抗菌剤に対する耐性菌の増加につながり、公衆衛生上の脅威となる可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1) 秋庭正人、岡崎ひづる、石岡幸子、内田郁夫、吉井紀代、中澤宗生. 2007. わが国の牛から分離されたセファゾリン耐性 *Salmonella* Typhimurium の性状. 第 144 回日本獣医学会学術集会. 2007 年 9 月 2 日. 札幌.

2) Akiba M., Nakaoka Y., Kida M., Ishioka Y., Sameshima T., Yoshii N., Nakazawa M., Uchida I., Terakado N.: 2007. Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Salmonella enterica* serovar Dublin isolated from cattle in Japan from 1976

to 2005. J. Antimicrob. Chemother. 60,
1235-1242.

3) 秋庭正人、中岡祐司、鮫島俊哉、吉
井紀代、中澤宗生、内田郁夫、寺門誠致.

2008. 日本の牛群における *Salmonella*
Dublin の薬剤感受性. 第 81 回日本細菌
学会総会. 2008 年 3 月 24-26 日. 京都

表1. サルモネラ由来3種薬剤耐性プラスミドの概要

プラスミド名	pMAK1	pMAK2	pMAK3
DDBJ登録番号	AB366440	AB366441	AB366442
由来	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>S. Dublin</i>	<i>S. Dublin</i>
サイズ(kb)	208	62	40
ORF数	236	54	52
レプリコン	IncHI1	IncN	IncW
耐性遺伝子	<i>bla</i> TEM-1, <i>catA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA2</i> , <i>aphA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tetA</i> , <i>dfrA12</i> , <i>mphA</i> , <i>merRTPCADE</i>	<i>bla</i> TEM-1, <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sph</i> , <i>tetA</i> , <i>aph</i> , <i>ble</i>	<i>floR</i> , <i>aac(6')-Iae</i> , <i>aadA2</i> , <i>sul1</i>
近縁プラスミド	<i>S. Typhi</i> str. CT18 pHCM1 (218 kb)	<i>E. coli</i> pMUR050 (57 kb) R46 (51 kb)	<i>E. coli</i> R388 (34 kb)

表2. セファゾリン耐性 *S. Typhimurium* 解析結果の概要

菌型	供試菌株	プラスミド(kb)	薬剤耐性	<i>bla</i> _{CMY-2}	IncA/C	<i>spvB</i>
A	WT	140	AMP, CHL, STR, TH, TET, KAN, CFZ, SXT	+	+	+
	TF	140	AMP, STR, TH, TET, KAN	-	-	+
B	WT	180, 95	AMP, STR, TH, TET, KAN, CFZ, CTX, CRO	+	-	+
	TF	180	AMP, STR, TH, TET, KAN	-	-	-
	TF	95	AMP, KAN, CFZ, CTX	+	-	+
C	WT	180, 160	AMP, CHL, STR, TH, TET, KAN, CFZ	+	+	+
	TF	180	AMP, CHL, STR, TH, TET, CFZ	+	+	-
	TF	160	AMP, TH, TET, KAN	-	-	+

WT, 親株; TF, トランスフォーマント; AMP, アンピシリン; CHL, クロラムフェニコール; STR, ストレプトマイシン; TH, スルファメチゾール; TET, テトラサイクリン; KAN, カナマイシン; CFZ, セファゾリン; SXT, ST 合剤; CTX, セフトアキシム; CRO, セフトリアキソン

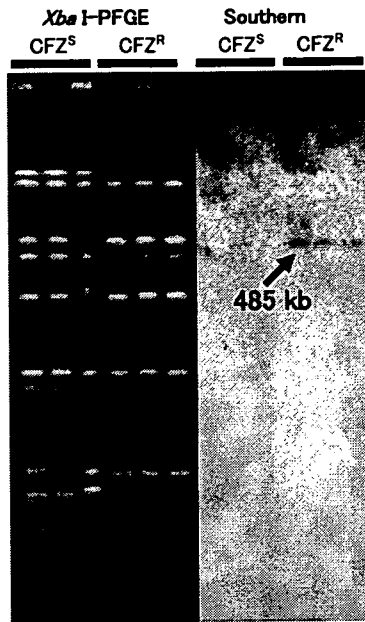


図1. A型 *S. Typhimurium* の *bla*_{CMY-2} 遺伝子は染色体に存在する

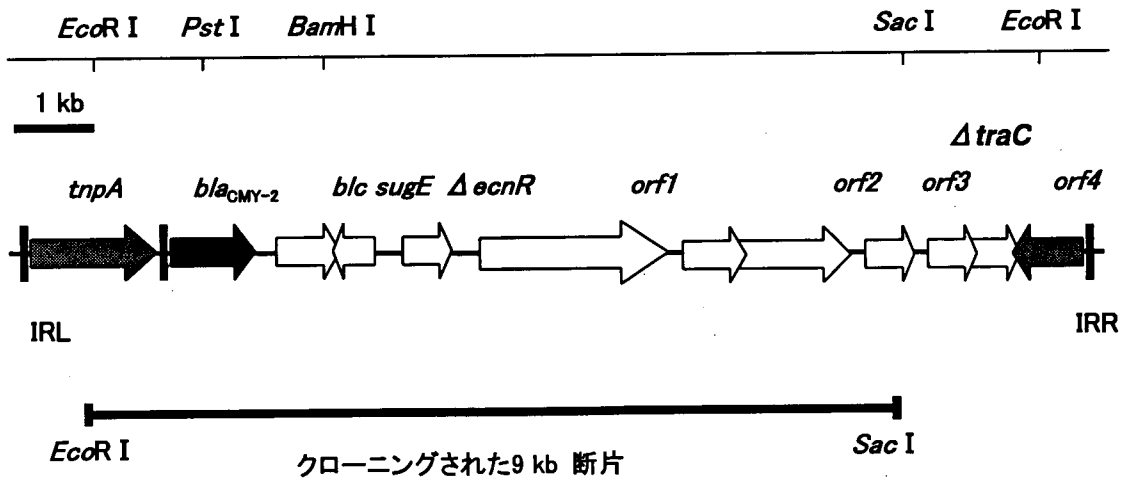


図2. 染色体上のセファゾリン耐性遺伝子領域

表3. ペット由来大腸菌の薬剤感受性

薬剤名	値域 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	ブレーク ポイント	耐性株数	耐性率(%)
AMP	4->512	>512	>512	32	42	71.2
CFZ	1->512	8	>512	32	26	44.1
CTF	0.5->512	2	128	8	23	39.0
STR	8->512	64	>512	32	31	52.5
GEN	1->512	2	512	16	18	30.5
KAN	2->512	8	>512	64	12	20.3
TET	1-512	2	512	16	26	44.1
CHL	4->512	8	>512	32	15	25.4
CST	1-8	2	4	16	0	0
NAL	2->512	>512	>512	32	40	67.8
EFX	≤ 0.125 ->512	32	256	2	32	54.2
SXT	0.5->512	2	>512	-	-	-

AMP, アンピシリン; CFZ, セファゾリン; CTF, セフトオフル; STR, ストレプトマイシン; GEN, ゲンタマイシン; KAN, カナマイシン; TET, テトラサイクリン; CHL, クロラムフェニコール; CST, コリスチン; NAL, ナリジクス酸; EFX, エンロフロキサシン; SXT, ST 合剤

平成 19 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業
「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：食品汚染腸内細菌の薬剤耐性疫学

分担研究者	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	山崎 渉	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	坂田淳子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	井上 清	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	林 昭宏	関西空港検疫所
研究協力者	江田淳二	関西空港検疫所
研究協力者	柏樹悦郎	関西空港検疫所

研究要旨：食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性が、ヒトへどのように影響を与えているかを調べる目的で、サルモネラとカンピロバクターについて、食肉由来菌株とヒト由来菌株の比較を行った。また海外の薬剤耐性菌の現状を把握する目的で、サルモネラと赤痢菌について海外渡航者由来株の薬剤耐性を調べた。そして、腸管出血性大腸菌についても耐性化の動向を調査した。その結果、鶏肉由来サルモネラの調査で ESBL 産生が 3 株、AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生が 5 株認められた。さらにヒト由来の腸管出血性大腸菌 O157 においても AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株が 6 株認められた。またニューキノロン耐性菌は海外渡航者由来 *S. flexneri* 2a で 5 株検出され、海外渡航者由来赤痢菌では NA 耐性菌が 41.4%あった。*C. jejuni* の鶏肉由来菌株では 49.3%、散発下痢症患者では 36.0%、食中毒患者 27.5%がニューキノロン耐性であった。

A.研究目的

近年、特効薬と言われる薬剤に耐性を示す病原菌検出の報告が増加し、食中毒

の主要な原因菌であるサルモネラやカンピロバクターにおいても、多剤耐性菌の増加が国際的な問題となっている。

本研究では食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性が、ヒトへどのように影響を与えているかを調べる目的で、サルモネラとカンピロバクターについて、食肉由来株とヒト由来株の比較を行った。また海外の薬剤耐性菌の現状を把握する目的で、サルモネラと赤痢菌について海外渡航者由来株の薬剤耐性を調べた。そして、腸管出血性大腸菌についても耐性化の動向を調査した。

B.研究方法

1. 供試菌株

サルモネラ

(1)食肉由来菌株:

2007年に大阪府内で流通している食肉413検体(検体の内訳は表1に示した)から分離した111株(国産鶏肉由来107株、国産牛肉由来1株、国産牛豚ミンチ由来1株、外国産鶏肉由来1株、外国産合鴨肉由来1株)を供試した。

(2)国内発生ヒト由来菌株:

2007年に大阪府内で発生した食中毒事例(16事例)および散発下痢症患者由来91株と食品従事者など保菌者から分離した16株の合計107株を供試した。

(3)海外渡航者下痢症患者由来菌株:

関西空港検疫所で2006年4月~2007年3月に分離した60株を供試した。

赤痢菌

2005年4月~2007年3月の2年間に関

西空港検疫所で分離された海外渡航者由来162株を供試した。

腸管出血性大腸菌 O157

2006年および2007年に大阪府内の患者および健康者から分離された腸管出血性大腸菌O157(2006年は81事例114株、2007年は107事例161株)275株を供試した。

カンピロバクター

(1)食肉由来菌株:2007年に大阪府内で流通している国産鶏肉226検体から分離した78株を供試した。

(2)ヒト由来菌株:2007年に大阪府内で発生した食中毒事例(21事例)の患者由来43株および散発下痢症患者由来91株の合計134株を供試した。

2. 薬剤感受性試験

サルモネラ、赤痢菌、腸管出血性大腸菌

CLSIのディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク(Becton Dickinson Microbiology systems, Cockeysville, MD)を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスフォマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)の12剤を使用した。

最小発育阻止濃度(MIC)はドライプレート(栄研)を用いて測定した。供試薬剤は ABPC、ピペラシリン(PIPC)、セファゾリン(CEZ)、セフォキシチン(CFX)、セフトジジム(CAZ)、CTX、セフポドキシム(CPDX)、FOM、アズトレオナム(AZT)、イミペネム(IPM)、GM、アミカシン(AMK)、ミノサイクリン(MINO)、NA、CPFX、STである。

カンピロバクター

供試薬剤はノルフロキサシン(NFLX)、OFLX、CPFX、NA、TC、エリスロマイシン(EM)、ABPC、アモキシシリン/クラバン酸(AMC)、GMの9剤で、センシディスクを用いて行った。

3. 薬剤耐性遺伝子の解析

CTXに耐性または中間を示した菌株について、PCRとシーケンスでβ-ラクタマーゼ耐性遺伝子を決定した

C. 研究結果

サルモネラ

(1) 食肉由来菌株:

413 検体検査し 100 検体(24.5%)からサルモネラが分離された。国産鶏肉は 227 検体検査し 96 検体(42.3%)からサルモネラが分離され、その中の 11 検体からは 2 種類の血清型の菌株が分離された(表 1)。国産鶏肉由来の 107 株は、OUT を含めて 8 つの血清型に型別され、*S. Infantis* が 80

株(74.5%)と最も多かった。国産牛肉由来 1 株は *S. (1)OUT:r:1,5*、国産牛豚ミンチ由来 1 株は *S. Infantis*、外国産鶏肉由来 1 株は *S. Enteritidis*、外国産合鴨肉由来 1 株は *S. Potsdam* であった(表 2)。

薬剤感受性試験結果は 106 株 (95.5%) が耐性菌であった。その中で CTX 耐性菌が 1 株、耐性ではないが通常の感受性菌より阻止円が小さい株が 7 株あった。これら 8 株について MIC 測定と β-ラクタマーゼの検索を行った結果、3 株が ESBL 産生、5 株が AmpC 型 β-ラクタマーゼ産生であった。ESBL 産生株は *S. Infantis* 2 株 (耐性遺伝子 *bla*CTX-M-14) および *S. Manhattan* 1 株 (*bla*CTX-M-2) であり、AmpC 型 β-ラクタマーゼ産生株は 5 株とも *S. Infantis* (*bla*CMY-2) であった(表 9)。NA 耐性菌は国産鶏肉 13 株 (12.1%)、国産牛肉 1 株、外国産鶏肉で 1 株認められた。

(2) 国内発生ヒト由来菌株:

107 株は 13 の血清型に型別され、*S. Enteritidis* が最も多い血清型であった(表 3)。薬剤感受性試験結果は食中毒事例では 1 事例のみが耐性であり、保菌者では 16 株中 9 株(56.3%)が耐性であった。NA 耐性菌は保菌者で 3 株(18.8%)認められた。

(3) 海外渡航者由来菌株:

60 株は 30 の血清型に型別され *S. Enteritidis* が最も多い血清型で、次に *S. Corvallis*、*S. Weltevreden*、*S. Stanley* が多

く分離された(表4)。薬剤感受性試験結果は26株(43.3%)が耐性菌であった。NA耐性菌は60株中8株(13.3%)あった。

赤痢菌

海外渡航者由来赤痢菌162株の内訳は *S. sonnei* 136株、*S. flexneri* 22株、*S. dysenteriae* 2株、*S. boydii* 2株であった(表5)。

薬剤感受性試験結果は155株(95.7%)が耐性でそのうち67株(41.4%)がNA耐性株であった(表6)。その中でフルオロキノロン耐性は5株(いずれも*S. flexneri* 2a)あり、感染国はインドが4例、タイが1例であった。

腸管出血性大腸菌 O157

耐性菌は2006年10事例(12.3%)、2007年31事例(29.0%)から検出され、CTX耐性菌は2006年に1株認められた(表7)。2007年には、CTX耐性ではないが通常感受生菌より阻止円が小さい株が5株あり、この中の3株は同一事例由来株であった。これら6株についてMIC測定とβ-ラクタマーゼの検索を行った結果、いずれもAmpC型β-ラクタマーゼ産生で、*bla*CMY-2遺伝子を保有していた(表9)。

腸管出血性大腸菌 O157でのNA耐性は1株のみに認められ、CPFXのMICが0.25μg/mlのニューキノロン低感受性菌であった。

カンピロバクター

(1) 国産鶏肉由来菌株：

国産鶏肉226検体を検査し78検体(34.5%)からカンピロバクターが分離された。*C. jejuni*では75株中37株(49.3%)がキノロン耐性であった(表8)。

(2) ヒト由来菌株：

*C. jejuni*では散発下痢症患者で32株(36.0%)、食中毒患者で11株(27.5%)がキノロン耐性であった。*C. coli*ではEM耐性株が1株認められた。

D. 考察

近年、患者の治療に用いられる薬剤に耐性を示す病原菌の検出が問題となっていることから、ヒト、食品、環境および食用動物由来株の耐性化の動向が重要視されている。

本年度の鶏肉由来サルモネラの調査ではESBL産生が3株、AmpC型β-ラクタマーゼ産生が5株認められ、広域セフェム薬(ESCs)耐性サルモネラの浸潤が懸念される。またヒト由来の腸管出血性大腸菌 O157においてもAmpC型β-ラクタマーゼ産生株が6株認められ、現状では患者の治療に困難を生じないが、耐性を獲得する状況が存在すると考えられ、今後の監視が必要である。

ニューキノロン耐性菌は海外渡航者由来*S. flexneri* 2aで5株検出された。さらに赤痢菌全体の41.4%がNA耐性であっ

た。NA 耐性菌の多くはニューキノロン低感受性菌を示すことから、耐性菌の調査成績は治療のための重要な情報となると考えられる。

カンピロバクター食中毒の原因食品の多くは生の鶏肉であることから、ヒト由来株の薬剤耐性は鶏肉のカンピロバクターの薬剤耐性動向に連動していると考えられる。本年度の成績では、ニューキノロン剤の耐性率は鶏肉由来株がヒト由来株よりも効率であったが、今後も鶏肉由来株とヒト由来株の薬剤耐性の関連を調査していく必要がある。

E. 結論

(1) 鶏肉由来サルモネラの調査で ESBL 産生が 3 株、AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生が 5 株認められた。

(2) ヒト由来の腸管出血性大腸菌 O157 においても AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株が 6 株認められた。

(3) ニューキノロン耐性菌は海外渡航者由来 *S. flexneri* 2a で 5 株検出された。

(4) 海外渡航者由来赤痢菌では NA 耐性菌が 41.4% あった。

(5) *C. jejuni* の鶏肉由来菌株では 49.3%、散発下痢症患者では 36.0%、食中毒患者 27.5% がニューキノロン耐性であった。

F. 健康危機情報

ヒト由来の腸管出血性大腸菌 O157 において AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生株

が 6 株認められた。現状では患者治療に困難を生じていないが、今後の薬剤耐性獲得状況の監視が必要である。

G. 研究発表

(学会発表)

田口真澄、勢戸和子、河原隆二、坂田淳子、井上 清：大阪府における腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向、第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京

(論文発表)

Wataru Yamazaki-Matsune, Masumi Taguchi, Kazuko Seto, Ryuji Kawahara, Kentaro Kawatsu, Yuko Kumeda, Miyoshi Kitazato, Masafumi Nukina, Naoaki Misawa and Teizo Tsukamoto : Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. J Med Microbiol 56:1467-1473,2007.

表1 サルモネラ検査数と陽性検体数(2007年)

	検体名	検体数	陽性検体	分離株数
国産 347検体	鶏肉	227	96(42.3%)	107*
	豚肉	60		
	牛肉	53	1	1
	牛豚ミンチ	5	1	1
	馬肉	2		
外国産 66検体	鶏肉	13	1	1
	豚肉	24		
	牛肉	25		
	合鴨	4	1	1
合計		413	100(24.2%)	111

*複数の血清型が分離された検体が11検体あった。

表2 食肉由来のサルモネラの血清型と薬剤感受性パターン(2007年)

産地	種類	血清型	菌株数計	菌株数	薬剤耐性パターン	表9No.
国産 (109株)	鶏肉 (107株)	S. Infantis	80	1*	ABPC,SM,TC,KM,NA	1
				2*	ABPC,SM,TC,CP,NA	7,8
				2*	ABPC,SM,TC,NA	2,4
				1*	ABPC,SM,TC	5
				1*	ABPC,TC,ST	6
				1	SM,TC,KM,ST,NA	
				5	SM,TC,KM,ST	
				1	SM,TC,KM,NA	
				8	SM,TC,KM	
				26	SM,TC,ST	
				1	SM,TC,NA	
				17	SM,TC	
				1	SM,ST	
2	TC,KM,NA					
3	TC,KM					
7	TC					
1	感受性					
	S. Schwarzengrund	8	3	SM,TC,KM,ST		
			3	SM,TC,KM		
			2	SM,TC		
	S. Manhattan	4	1*	ABPC,SM,TC,CTX	3	
			2	SM,TC		
			1	感受性		
	S. Typhimurium	3	2	TC,KM		
			1	TC		
	S. Enteritidis	1	1	感受性		
	S. Hadar	1	1	SM,TC		
	S. Havana	1	1	感受性		
	S. (1)OUT:r:1,5	9	1	SM,TC,KM,ST,NA		
			2	SM,TC,KM,NA		
			1	SM,TC,KM		
			1	SM,TC,ST		
			3	SM,TC		
			1	TC		
	牛豚合挽	S. Infantis	1	1	SM,TC,ST	
	牛	S. (1)OUT:r:1,5	1	1	SM,TC,KM,ST,NA	
外国	鶏肉	S. Enteritidis	1	1	NA	
	合鴨	S. Potsdam	1	1	感受性	

合計111株

*: βラクタマーゼ産生株

供試薬剤

アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)

表3 ヒト由来サルモネラの血清型と薬剤耐性パターン(2007年、国内)

血清型	薬剤耐性パターン	食中毒事例 (菌株数)		散发事例	
		患者	保菌者	患者	保菌者
S. Enteritidis	感受性	6	(37)		2
	ABPC,SM,TC,KM,ST,NA				1
	SM,TC,KM,ST				1
S. Infantis	SM,TC,ST				2
	ABPC				1
	感受性				1
S. Schwarzengrund	SM,TC,ST,NA				1
	SM,TC,KM	1	(3)		
S. Saintpaul	ABPC,NA				1
S. Virchow	SM,TC				1
S. Montevideo	感受性	2	(34)		4
S. Litchfield	感受性	2	(6)		
S. Agona	感受性	1	(2)		
S. Newport	感受性	1	(2)		
S. Narashino	感受性	1	(1)		
S. Cerro	感受性				1
S. Typhimurium	感受性			1	
S. (1)O4:eh:-	感受性	2	(5)		
合計	107株	16	(90)	1	16

供試薬剤

アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)

表4 海外渡航者由来サルモネラの血清型と薬剤耐性パターン(2006年)

血清型	菌株数	耐性菌株数	薬剤耐性パターン(菌株数)
<i>S. Enteritidis</i>	8	3	NA(2) TC(1)
<i>S. Corvallis</i>	7	6	SM,TC,NA(1) AM,TC(1) SM,TC(2) NA(2)
<i>S. Weltevreden</i>	6	1	ABPC,SM,TC,KM(1)
<i>S. Stanley</i>	5	3	ABPC,SM,TC(3)
<i>S. Braenderup</i>	3	2	TC,NA(1) NA(1)
<i>S. Anatum</i>	2	2	ABPC,TC(1) TC(1)
<i>S. Rissen</i>	2	2	ABPC,SM,TC,KM,CP,GM(1) ABPC,TC,ST(1)
<i>S. London</i>	2	2	SM,TC(2)
<i>S. Give</i>	1	1	SM,TC(1)
<i>S. Hadar</i>	1	1	TC,NA(1)
<i>S. Kedougou</i>	1	1	ABPC,TC,CP(1)
<i>S. Montevideo</i>	1	1	TC
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	1	TC(1)
<i>S. Loxington</i>	2		
<i>S. Newport</i>	2		
<i>S. Paratyphi B</i>	2		
<i>S. Bareilly</i>	1		
<i>S. Beunei</i>	1		
<i>S. Bovismobificans</i>	1		
<i>S. Chester</i>	1		
<i>S. Hvittingfoss</i>	1		
<i>S. Isagi</i>	1		
<i>S. Javiana</i>	1		
<i>S. Mbandaka</i>	1		
<i>S. O6,8:eh:-</i>	1		
<i>S. Oslo</i>	1		
<i>S. Panama</i>	1		
<i>S. Senftenberg</i>	1		
<i>S. Tennessee</i>	1		
<i>S. Virchow</i>	1		
合計	60	26	

供試薬剤

アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスホマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)