

表3 フルオロキノロン耐性*Salmonella* Typhimurium
の耐性機構

株名	由来 (症状)	MIC		QRDRの変異	qnr	CCCPの 影響
		NA	ERFX			
17-PLS-75	牛(下痢)	256	16	GyrA(S83F, D87N), ParC(S80R)	-	-
18-PLS-16	牛(下痢)	32	4	GyrA(D87G)	S1	-
19-PLS-45	牛(下痢)	32	4	-	S1	-

表4 家畜由来*Salmonella* Typhimuriumにおける
qnrS1遺伝子の分布

由来	H14	H15	H16	H17	H18	H19	計	%
牛	0/0	0/22	0/27	0/42	1/23	1/42	2/156	1.3
豚	0/12	0/8	0/8	0/21	0/11	0/14	0/74	0
鶏	0/0	0/0	0/0	0/4	0/2	0/1	0/7	0
計	0/12	0/30	0/35	0/67	1/36	1/57	2/237	0.8

表5 人と豚由来Salmonella Choleraesuisの比較

・ 人由来2株:H19-20年

株名	由来	分離年	生物型	耐性パターン
Sa07027	人	2007	Choleraesuis	ABPC-DSM-GM-KM-OTC-CP-NA-TMP
Sa08003	人	2008	Kunzendorf	DSM-NA

・ 豚由来36株:H18-20年

生物型	薬剤耐性パターン	地域(県)
Choleraesuis	ABPC-DSM-GM-KM-OTC-NA-TMP	関東(2)
	ABPC-DSM-KM-OTC-CP-NA-TMP	関東(4)
	ABPC-DSM-GM-KM-OTC-TMP	東北(2), 関東(7)
	ABPC-DSM-OTC-CP-NA-TMP	関東(2)
	ABPC-DSM-OTC	関東(1)
	DSM-OTC-NA	関東(1)
	DSM-OTC	関東(7)
Kunzendorf	ABPC-DSM-OTC-TMP	九州(4)
	DSM-GM-OTC-TMP	九州(2)
	ABPC-DSM-TMP	北海道(1)
	DSM-KM-NA	関東(1)
	ABPC-DSM	北海道(2)
Decatur	DSM-OTC-CP	関東(1)

図1 人由来S. CholeraesuisのXba 1切断PFGE像

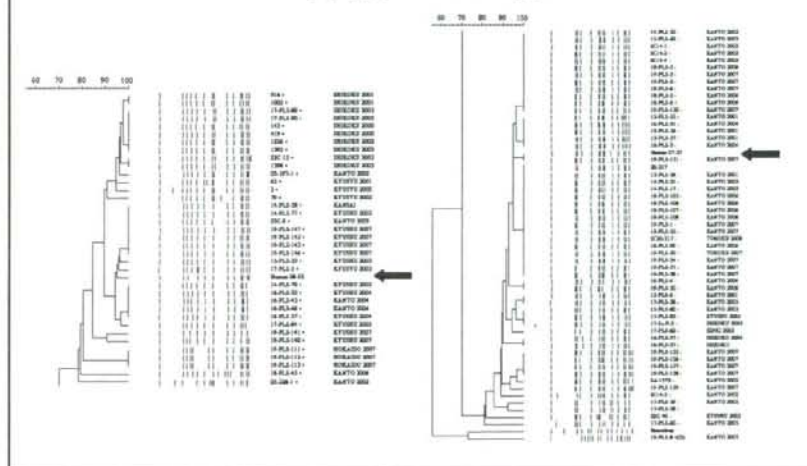


図2 プロイラーと鶏肉由来S. Schwarzengrundの比較

a) XbaI切断像

b) BlnI切断像

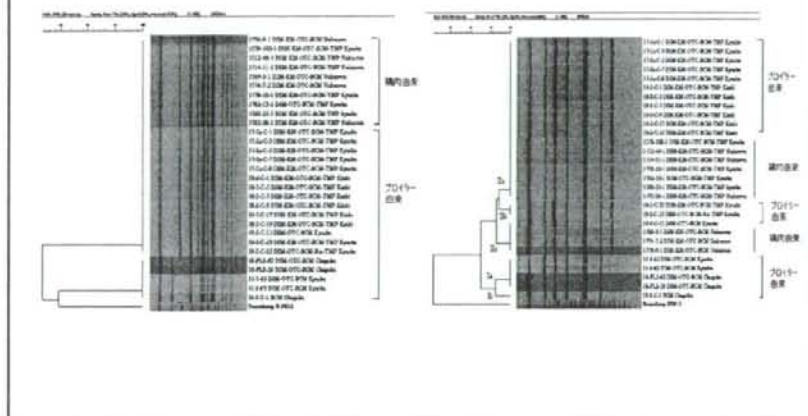


表6 2006~2007年度カンピロバクターの薬剤感受性状況

薬剤	species	2006年度*				2007年度**			
		MIC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC 90 ($\mu\text{g/ml}$)	耐性株数	耐性率 (%)	MIC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	MIC 90 ($\mu\text{g/ml}$)	耐性株数	耐性率 (%)
ABPC	<i>C.jejuni</i>	4	32	6	15.0	8	32	21	15.9
	<i>C.coli</i>	4	16	0	0.0	4	8	1	1.1
DSM	<i>C.jejuni</i>	1	2	4	10.0	0.5	1	6	4.5
	<i>C.coli</i>	512	>512	26	60.5	16	>512	43	47.3
OTC	<i>C.jejuni</i>	32	128	23	57.5	2	128	59	44.7
	<i>C.coli</i>	32	256	27	62.8	64	256	63	69.2
CP	<i>C.jejuni</i>	2	8	2	5.0	4	8	4	3.0
	<i>C.coli</i>	4	32	12	27.9	4	32	31	34.1
EM	<i>C.jejuni</i>	1	4	0	0.0	1	4	0	0.0
	<i>C.coli</i>	4	>512	15	34.9	1	256	30	33.0
NA	<i>C.jejuni</i>	4	256	15	37.5	8	256	34	25.8
	<i>C.coli</i>	8	256	14	32.6	64	256	51	56.0
ERFX	<i>C.jejuni</i>	<0.125	8	15	37.5	<0.125	8	33	25.0
	<i>C.coli</i>	<0.125	4	13	30.2	2	8	49	53.8

*: *C.jejuni* 40株, *C.coli* 43株

** : *C.jejuni* 132株, *C.coli* 91株

表7 *C. jejuni*における血清型別blaOXA₆₁遺伝子の分布

血清群	ABPC 耐性(%)	blaOXA ₆₁	
		+	-
B (n=107)	12 (11.2)	11	1
D (n=72)	9 (12.5)	9	0
G (n=32)	21 (65.6)	20	1
Y (n=44)	0 (0)	0	0

課題名：家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析

研究分担者 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 楠本正博 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 岩田剛敏 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2つの研究を行った。①セファロスポリン耐性を規定する AmpC 型βラクタマーゼ遺伝子(bla_{CM-2})が染色体上に存在する牛由来 *Salmonella* Typhimurium を昨年までに見いだした。今年度は本遺伝子の存在様式とセファロスポリン耐性への関与を明らかにすることを目的として実験を行った。その結果、供試菌株では bla_{CM-2} が染色体に1コピー存在することが明らかとなった。これらの株は第2、3世代セファロスポリンに耐性を示したが、その最小発育阻止濃度は bla_{CM-2} がプラスミド上に存在する株と同じか低い値を示した。②ペットから分離されたフルオロキノロン耐性大腸菌5株のトポイソメラーゼ変異を解析したところ、GyrAの2カ所及びParCの1カ所に共通の変異が認められた。5株中4株にはParCにもう1カ所変異を認めたが、そのパターンは3通り存在した。いずれの変異もこれまでの文献的報告と一致する成績と考えられた。

A. 研究目的

本研究では動物由来食中毒菌サーベイランスの一環として、サルモネラ及び大腸菌の薬剤耐性化機構の一端を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 牛由来セファロスポリン耐性 *Salmonella* Typhimurium の解析

セファロスポリン耐性を規定する AmpC 型βラクタマーゼ遺伝子(bla_{CM-2})が染色体上に存在する *S. Typhimurium* を昨年までに見いだした（平成19年度分担報告書）。これらの株の bla_{CM-2} の存在様式を確認することを目的として以下の実験を行っ

た。

表1に供試菌株とその性状を示した。 bla_{CM-2} が染色体上に存在する株として3553、3601、3609の3株を用いた。対照として bla_{CM-2} 遺伝子がプラスミド上に存在する3687、3695、3714の3株を用いた。これらの株からプラスミドを抽出し、エレクトロポレーション法で大腸菌 JM109 にプラスミドを導入した株をSTRまたはCFZ加LB培地上で選択した。これらの親株とトランスフォーマントについてPCR法による bla_{CM-2} の検出を行った。また、Welchら（PLos ONE, 2: 1-6, 2007）の IncA/C backbone 13 領域の PCR 検出を試みた。さらにゲ

ノム及びプラスミド DNA を用いてサザンプロット解析を行うことで、*bla_{M-2}* の存在様式を明らかにすることを試みた。加えて上記野外分離株の各種セファロスポリンに対する最小発育阻止濃度 (MIC) を Etest (AB Biodisk) により測定した。

2) 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分離したフルオロキノロン (FQ) 耐性大腸菌のトポイソメラーゼ遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) の Quinolone Resistance Determining Region を PCR 増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。これにより FQ 耐性を引き起こしたトポイソメラーゼのアミノ酸置換部位を特定した。

なお、研究全体を通じて使用した薬剤とその略号は以下の通りである。アンピシリン, AMP; セファゾリン, CFZ; セファロチン, CEF; セフォキシチン, FOX; セフロキシム, CXM; セフォタキシム, CTX; セフトリアキソン, CRO; セフトリオフル, CTF; セフトジジム, CAZ; セフボドキシム, CPD; セフェピム, FEP; アズトレオナム, ATM; アモキシシリン, AMX; クルبران酸, CLA; セフォタキシム + クルبران酸, CTL; 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; ナリジク酸, NAL; エンロフロキサシン, EFX; ST 合剤, SXT。

C. 結果

1) 牛由来セファロスポリン耐性 *S. Typhimurium* の解析

bla_{M-2} の存在部位を明らかにする目的で HindIII 消化後のプラスミド DNA を用いてサザンプロット解析を実施したところ、3687、3695、3714 株ではプラスミド上にシグナルを認めたが、3553、

3601、3609 株では認められなかった (図1)。

次に 3553、3601、3609 株を用いてゲノミックサザンプロット解析を実施したところ、PstI を除く 14 の制限酵素で *bla_{M-2}* シグナルを 1 本認めたが、PstI では 2 本のシグナルが認められた (図2)。*bla_{M-2}* 配列中には PstI 切断部位が 1 カ所存在するため、この結果は *bla_{M-2}* がゲノム中に 1 カ所存在することを示唆する成績と考えられた。

さらに *bla_{M-2}* が、いわゆるメガプラスミド (1000 kb プラスミド) 上に存在する可能性を排除するため、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 後のゲノム及びプラスミド DNA を用いてサザンプロット解析を実施した。3553、3601、3609 株において約 500 kb の XbaI 消化フラグメントに *bla_{M-2}* シグナルが認められたが、プラスミドサンブルについては XbaI 消化、未消化のいずれの場合もシグナルが認められなかった (図3)。以上の成績は 3553、3601、3609 株では *bla_{M-2}* が染色体上に 1 コピー存在することを示唆する成績と考えられた。

3609 株の 140 kb プラスミドを導入した SMAI 株の解析結果から、本プラスミドには *bla_{M-2}* 遺伝子及び IncA/C backbone は座乗していないことが明らかとなった。一方、3553、3601、3609 株の解析では IncA/C backbone の一部が検出できたことから、これらの株では *bla_{M-2}* を含む IncA/C プラスミドの一部が染色体に挿入された株である可能性が考えられた (表1)。

S. Typhimurium の染色体上に 1 コピー存在する *bla_{M-2}* のセファロスポリン耐性への貢献度は明らかでない。そこで 3553、3601、3609 株の各種セファロスポリンに対する感受性を Etest で調べた。その結果、3 株では第 1 世代の CEF、第 2 世代の CXM、FOX、第 3 世代の CPD には耐性を示したが、CXM 及び FOX の MIC 値は *bla_{M-2}* がプラスミド上に存在する 3687、3695、3714 株と比べて同じか、ま

たは低い値を示した。同様に3553、3601、及び3609株のCTX、CRO、CAZ（全て第3世代）に対するMICも3687、3695、3714株と比べて同じか、または低い値を示した（表2）。

2) 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。耐性菌の出現が特に問題視される第3世代セファロスポリン、CTFとFQ系薬剤、EFXの耐性率は、それぞれ39.0%及び54.2%であった（以上、平成19年度分担報告書）。

EFXに対するMICが512（または512 μ g/ml）を示した5株のトポイソメラーゼにおけるアミノ酸置換部位の同定を試みたところ、全ての株でGyrAの2カ所（Ser83→Leu、Asp87→Asn）及びParCの1カ所（Ser80→Ile）に同じ変異が認められた。加えて、4株ではParCの他の部位に1カ所変異が認められたが、変異のパターンは3つ存在した（表3）。

D. 考察

1) 牛由来セファロスポリン耐性 *S. Typhimurium* の解析

*bla_{CM-2}*は*Citrobacter freundii*の染色体に存在したものがプラスミドに転移し、その後、他の腸内細菌に広がったと考えられている。これまで報

告されているサルモネラの*bla_{CM-2}*のほとんどはプラスミド上に存在する。Zigotaら（Antimicrob. Agents Chemother., 2008, 61: 1389-1399）は*bla_{CM-2}*がプラスミドと染色体の両方に存在する株を報告しているが、この株における染色体上の*bla_{CM-2}*コピー数は不明である。*bla_{CM-2}*が染色体にのみ存在するサルモネラに関する報告はない。

我々は*bla_{CM-2}*が染色体上に存在する *S. Typhimurium* を昨年までに見いだした（平成19年度分担報告書）。そこで今年度はその*bla_{CM-2}*の存在様式を確認すると共に、それら菌株の各種セファロスポリンに対する感受性を検討した。

ゲノム及びプラスミドDNAを用いて行ったサザンプロット解析の結果から3553、3601、3609株において*bla_{CM-2}*は染色体上に1コピー存在することが示唆された。このような菌株のセファロスポリン感受性は明らかでないので調査したところ、3553、3601、3609株はCEF、CXM、FOX、CPDに対して耐性を示したが、CXM、FOXに対するMICは*bla_{CM-2}*がプラスミド上に存在する3687、3695、3714株と比べて同じか、または低い値を示した。同様に3553、3601、3609株のCTX、CRO、CAZに対するMICも3687、3695、3714株と比べて同じか、または低い値を示した。3553、3601、3609株において*bla_{CM-2}*は染色体上に1コピー存在するのに対し、3687、3695、3714株では*bla_{CM-2}*がプラスミド上に存在するため、そのコピー数は複数と考えられ、これがセファロスポリン感受性の差につながった可能性が考えられた。

3609株ではInca/C backboneの一部がPCR検出できるのに対し、3609株の140 kb プラスミドを導入したSMA1株ではそれが検出できないことや、*bla_{CM-2}*がInca/Cプラスミドの一部と隣接している（平成19年度分担報告書）ことから、3553、3601、3609株は*bla_{CM-2}*を含むInca/Cプラスミドの一部が染色体に挿入されたものと推察された。3609株

はCHL及びSXTに耐性であるのに対し、SMA1株は感受性であることから、IncA/Cプラスミド上に存在した両薬剤に対する耐性遺伝子も bla_{Ox-2} と共に染色体に挿入された可能性が考えられた。この領域は複数の薬剤耐性遺伝子が存在する新規のgenomic islandかも知れない。今後はこの領域の染色体における挿入部位と構造を明らかにする必要がある。

2) ペットからの食中毒菌分離と薬剤感受性調査
細菌感染症と診断されたペットから分離されたエンロフロキサシン高度耐性大腸菌5株のトポイソメラーゼ変異を解析したところ、いずれの株もGyrA2カ所とParCの1カ所に同じ変異が認められた。加えて5株中4株ではParC遺伝子にも変異が認められたが、変異のパターンは3つ認められた。3カ所認められた共通の変異はFQ耐性大腸菌野外分離株で高頻度に観察されることが文献的に報告されている。さらに、5株のトポイソメラーゼにおける変異の総数が3または4個であることも野外分離株に関する文献的報告と一致していた。

E. 結論

今年度の研究結果から、染色体上に1コピー存在する bla_{Ox-2} が*S. Typhimurium*のセファロスポリン耐性に寄与することが明らかとなった。この遺伝子領域は新規のgenomic islandである可能性がある。また、ペット由来FQ耐性大腸菌のトポイソメラーゼ変異は野外分離大腸菌に関する文献的報告と一致することが明らかとなった。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1) M. Akiba, T. Sameshima, I. Uchida, M. Nakazawa: Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. Food Additives and Contaminants. 25, 1076-1079, 2008.

2) M. Sugawara, D. Fukamizu, H. Okazaki, K. Tanaka, I. Uchida, H. Izumiya, H. Watanabe, M. Kusumoto, T. Iwata, M. Akiba: Chromosomal location of bla_{Ox-2} in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its contribution to cephalosporin resistance. 2009. Submitted for publication.

3) 秋庭正人: 動物に対するキノロン系抗菌剤の使用と耐性菌選択との関連。動物用抗菌剤研究会報、30、29-33、2008。

4) 秋庭正人: わが国の牛群における *Salmonella* Dublin 薬剤感受性の変化。畜産技術、643、6-10、2008。

5) 菅原克、深水大、岡崎ひづる、石岡幸子、岩田剛敏、内田郁夫、秋庭正人: 国内の牛から分離されたセファロスポリン耐性サルモネラにおける bla_{Ox-2} 遺伝子の存在様式。第146回日本獣医学会学術集会、2008年9月25日、宮崎。

6) 秋庭正人: 家畜・家禽のサルモネラ感染症の動向と薬剤耐性株の分離。第82回日本細菌学会総会、2009年3月12日、名古屋。

表1. セファロスポリン耐性*S. Typhimurium*及び関連菌株の性状

株名	種名	由来	分離年	プラスミド (Kb)	<i>bla_{CMY-2}</i>	PCR 結果 ^a												
						<i>repA</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3553	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2004	140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3601	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2005	140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3609	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2005	140	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3687	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2007	95, 180	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3695	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2007	150, 180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3714	<i>S. Typhimurium</i>	cattle	2006	95, 210	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JM109	<i>E. coli</i>	Takara Bio Inc.		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMA1	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3609 plasmid		140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA1	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3687 plasmid		95	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMA2	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3695 plasmid		180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CMA3	<i>E. coli</i>	JM109 transformant of 3714 plasmid		210	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a+, 増幅陽性; -, 増幅陰性

^bWelch ら (2007)

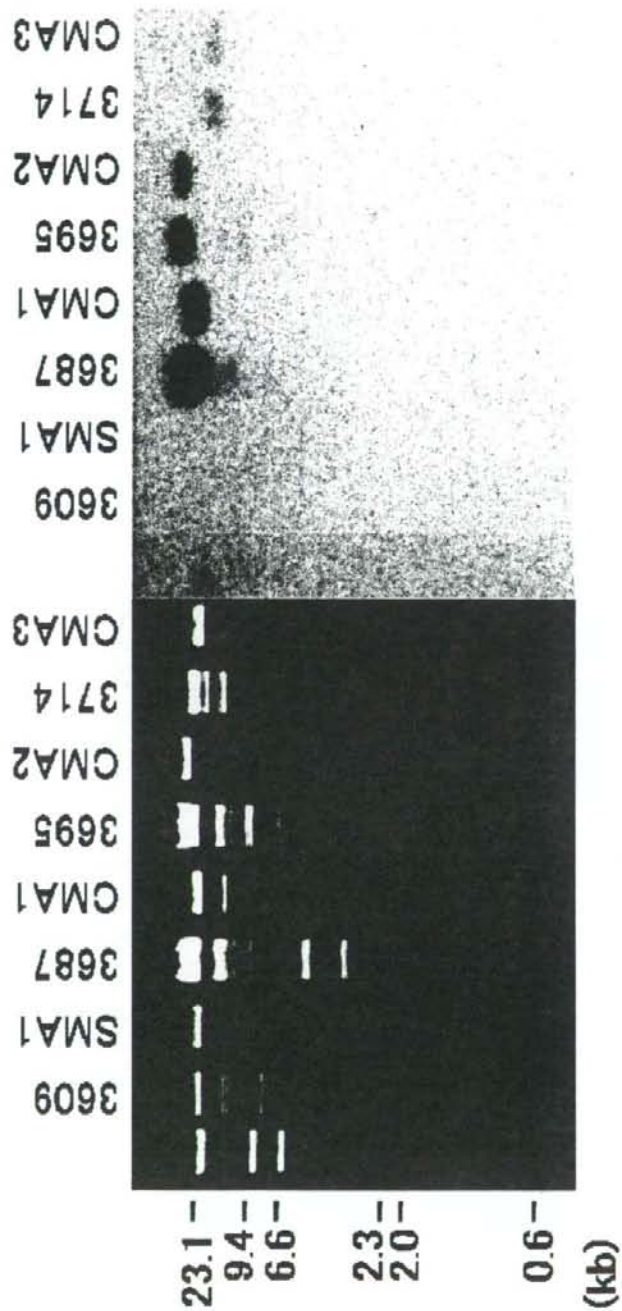


図1. *S. Typhimurium*プラスミドのサザンブロット解析結果

HndIII消化後のプラスミド泳動像(左)と*bIa*_{CMY-2}プローブを用いて実施したサザンブロット解析結果(右).

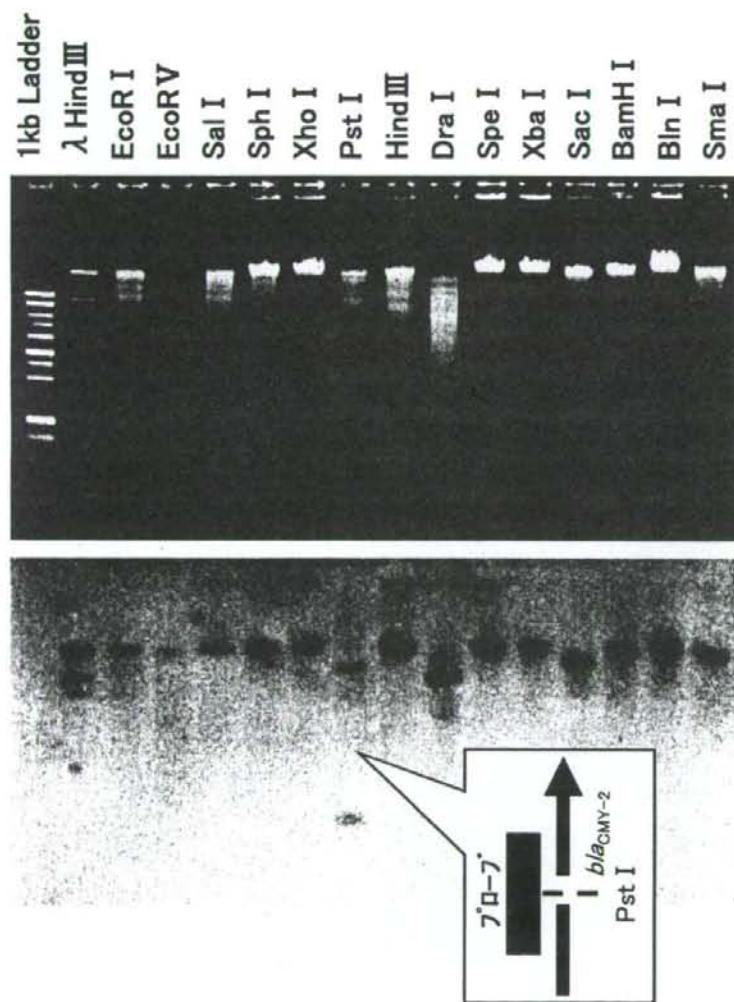


図2. ゲノミックサザンブロット解析結果

制限酵素消化後の *S. Typhimurium* 3609株ゲノムDNA(右)と *bla*_{CMY-2}プローブを用いて実施したサザンブロット解析結果(左).

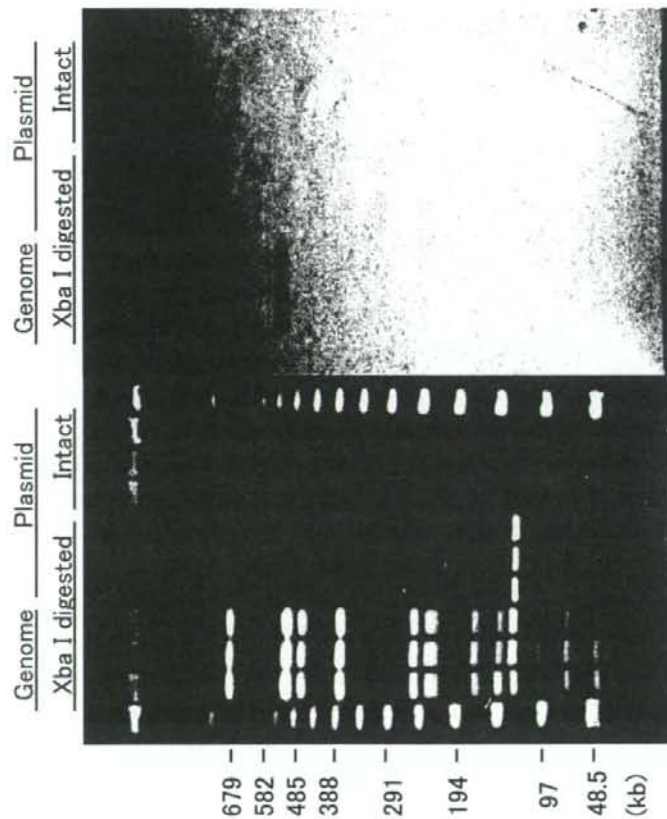


図3. ゲノム及びプラスミドDNAのサザンブロット解析結果

S. Typhimurium 3553、3601、3609株のゲノム及びプラスミドDNAのPFGE像(左)と *bla*_{CMY-2} プローブを用いて実施したサザンブロット解析結果(右).

表2. セファロスポリン耐性*S. Typhimurium*及び関連菌株の薬剤感受性

株名	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																		
	AMP	CEF	FOX	CXM	CTX	CRO	CAZ	CPD	FEP	ATM	AMX/CL A	ESBL test		CHL	STR	KAN	GEN	TET	SXT
												CTX	CTL						
3553	256<	256<	48	32	12	32	16	256<	0.125	1.5	48	16<	1<	96	256	256<	0.25	96	256<
3601	256<	256<	48	64	16	32	48	256<	0.38	4	48	16<	1<	256<	384	256<	0.25	96	256<
3609	256<	256<	32	64	12	32	24	256<	0.25	1.5	48	16<	1<	96	512	256<	0.25	96	256<
3687	256<	256<	256<	256<	48	64	256<	256<	1	12	128	16<	1<	4	48	256<	0.25	128	0.19
3695	256<	256<	256<	256<	32	96	256<	256<	0.75	8	32	16<	1<	256<	1024<	256<	24	192	0.5
3714	256<	256<	96	64	16	48	96	256<	0.5	4	64	16<	1<	4	24	256<	0.25	128	0.19
JM109	2	8	4	3	0.032	0.032	0.125	0.38	0.023	0.047	3	<0.25	0.032	6	1	1	0.125	1	0.032
SMA1	256<	8	4	3	0.032	0.032	0.125	0.5	0.023	0.047	4	<0.25	0.032	6	96	256<	0.125	32	0.094
CMA1	256<	256<	192	32	12	32	48	256<	0.25	4	96	16<	1<	6	1	1	0.125	2	0.032
CMA2	256<	256<	192	32	12	32	48	256<	0.25	4	96	16<	1<	256<	128	1.5	6	32	0.19
CMA3	256<	256<	96	32	8	24	48	256<	0.25	4	48	16<	1<	6	6	256<	0.19	64	0.047

表3. エンフロキサシン耐性大腸菌のトポイソメラーゼ変異

菌株	MIC(μ g/ml)	GyrA蛋白の変異	変異の個数	ParC蛋白の変異	変異の個数
06-118	512	Ser83→Leu Asp87→Asn	2	Ser80→Ile	1
06-171-1	512<	Ser83→Leu Asp87→Asn	2	Ser80→Ile Glu84→Gly	2
06-176-1	512<	Ser83→Leu Asp87→Asn	2	Ser80→Ile Glu84→Gly	2
06-372	512	Ser83→Leu Asp87→Asn	2	Ser80→Ile Glu84→Val	2
06-382	512<	Ser83→Leu Asp87→Asn	2	Ser80→Ile Ala108→Thr	2

平成 20 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

研究分担者	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	井上 清	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	山形晃明	関西空港検疫所
研究協力者	鎌倉和政	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い、さらに食肉中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌汚染状況も調査した。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 8 株、AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生が 7 株認められた。海外渡航者下痢症患者由来サルモネラではニューキノロン耐性菌が 2 株、ニューキノロン低感受性で *qnr* 遺伝子を保有している株が 25 株認められた。*C. jejuni* の鶏肉由来菌株では 26.6%、散発下痢症患者では 37.0%、食中毒患者 23.9% 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い、さらに食肉中のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)汚

染状況も調査した。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：

2008 年に大阪府内で流通している食肉 375 検体(検体の内訳は表 1 に示した)から

分離した 131 株（国産鶏肉由来 124 株、国産豚肉由来 3 株、外国産鶏肉由来 1 株、外国産豚肉由来 1 株、外国産合鴨肉由来 2 株）を供試した。

(2)国内発生ヒト由来菌株:

2008 年に大阪府内で発生した食中毒事例（17 事例）および散発下痢症患者由来 55 株と食品従事者など保菌者から分離した 26 株の合計 81 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 2001 年 1 月～2007 年 3 月に分離した 302 株について、キノロン耐性を調べた。

腸管出血性大腸菌 O157

2008 年に大阪府内の患者および健康者 54 事例から分離された 109 株を供試した。

カンビロバクター

(1)食肉由来菌株:2008 年に大阪府内で流通している国産鶏肉 201 検体から分離した 84 株を供試した。

(2)ヒト由来菌株:2008 年に大阪府内で発生した食中毒事例（30 事例）の患者由来 68 株および散発下痢症患者由来 105 株の合計 173 株を供試した。

MRSA

2008 年に大阪府内で流通している食肉 392 検体から分離した 4 株を供試した。1～7 月は黄色ブドウ球菌検出後、MRSA を検索した。8～12 月は MRSA のみ検索した。

2. 薬剤感受性試験

サルモネラ、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）、ホスホマイシン（FOM）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPFX）、セフトキシム（CTX）、セフトキシム（CPDX）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）または E-test（AB Biodisk）を使用して測定した。

カンビロバクター

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/クララン酸（AMC）、GM の 9 剤で、センシディスクを用いて行った。

MRSA

MIC はドライプレートで測定した。

3. 薬剤耐性遺伝子の解析

CPDX に耐性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。

染色体上のキノロン耐性決定領域（QRDR）の変異は、Giraud らの方法に従い、*gyrA* 遺伝子上の QRDR の 81 位、83 位、87 位と *parC* 遺伝子上の QRDR の 80 位の変異を調べた。プラスミド性キノロン耐性（PMQR）遺伝子の検出は、*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、および *aac(6)-Ib* 遺伝子に対する PCR で行った。得られた増幅産物が PMQR 遺伝子であるかは塩基配列を決定して確認した。

C. 研究結果

1. サルモネラ

(1)食肉由来菌株:

375 検体検査し 115 検体（30.7%）からサルモネラが分離された。その中の 14 検体から

は複数の血清型の菌株が分離された。国産鶏肉は201検体検査し109検体(54.2%)からサルモネラが分離された(表1)。国産鶏肉由来の124株は、10血清型に型別され、*S. Infantis*が85株(68.6%)と最も多かった(表2)。

薬剤感受性試験結果は125株(95.4%)が耐性菌であった。その中でCPDX耐性菌が国内産鶏肉由来で15株(12.1%)あった。これらの株についてβ-ラクタマーゼの検索を行った結果、8株がESBL産生、7株がAmpC型β-ラクタマーゼ産生であった。ESBL産生株は*S. Infantis*6株(耐性遺伝子型CTX-M-2、CTX-M-14、TEM-52、SHV-5-2a)、*S. Manhattan*1株(TEM-52)および*S. Typhimurium*(CTX-M-2)であり、AmpC型β-ラクタマーゼ産生株は7株とも*S. Infantis*(CMY-2)であった(表3)。NA耐性菌は国産鶏肉18株(14.5%)、外国産合鴨肉で1株認められた。

(2)国内発生ヒト由来菌株:

81株は17の血清型に型別され、*S. Enteritidis*が最も多い血清型であった(表4)。薬剤感受性試験結果は食中毒事例では4事例のみが耐性であり、保菌者では26株中11株(42.3%)が耐性であった。NA耐性菌は患者で3事例(14.3%)、保菌者で5株(19.2%)認められた。CPDX耐性の*S. Infantis*が保菌者由来株で1株あり、AmpC型β-ラクタマーゼ産生、*bla*CMY-2保有株であった。

(3)海外渡航者下痢症患者由来菌株:

センチ・ディスクで行った結果、NA耐性(R)が76株、中間(I)が14株認められ、それらの株について、NAおよびCPFXのMICをE-testを用いて測定した。NAのMIC測定結果は、16~64μg/mLが28株、256以上の高度耐性株が62株であった。CPFX

のMIC測定結果は0.064~2μg/mLが88株、32μg/mL以上の高度耐性株は2株認められた(表5)。この高度耐性2株のQRDRの変異は、2001年分離の*S. Schwarzengrund*では*gyrA*遺伝子の83位のSerがPhe、87位のAspがGlyに、*parC*遺伝子の80位のSerがArgに変異していた。2004年分離の*S. Singapore*では*gyrA*遺伝子の83位のSerがPhe、87位のAspがAsnに変異していた(表6)。

また、CPFXのMICが0.064~2.0μg/mLの範囲に含まれる株が28株あり、このようなNAおよびCPFXに対する感受性が同時に低下した菌がPMQR遺伝子を保有しているとの報告があることから、PMQR遺伝子の検索を行い、さらにQRDRの変異を調べた。その結果、CPFXのMICが0.25~2.0μg/mLを示した25株が*qnr*遺伝子を保有しており、そのうち21株が*qnrS1*で4株が*qnrS2*であった(表7)。QRDRの変異は28株全てで認められなかった。*qnrS2*保有株は*S. Agona*1株、*S. Alachua*1株、*S. Braenderup*2株であった。*qnrS1*保有株は*S. Corvallis*17株、*S. Typhimurium*2株、*S. Braenderup*1株、*S. Montevideo*1株であった。最も多かった血清型の*S. Corvallis*は調べた18株中17株(94.4%)が*qnrS1*保有株であり、さらに*qnrS1*保有株のうちで81%を占めていた。

2. 腸管出血性大腸菌 O157

耐性菌は15事例(21.7%)から検出された。β-ラクタマーゼ産生菌およびNA耐性菌は検出されなかった(表8)。

3. カンピロバクター

(1)国産鶏肉由来菌株:

国産鶏肉 201 検体を検査し 84 検体 (41.8%) からカンピロバクターが分離された。*C. jejuni* では 79 株中 21 株 (26.6%) がキノロン耐性であった。

(2) ヒト由来菌株：

C. jejuni では散発下痢症患者で 37 株 (37.0%)、食中毒患者で 16 株 (23.9%) がキノロン耐性であった (表 9)。

4. MRSA

国内産鶏肉、国内産豚肉、国内産牛肉、外国産合鴨それぞれ 1 検体から MRSA を検出した。検出率は 1.0% であった (表 10)。4 株のオキサシリンの MIC は 4 μ g/mL 以上であり、*mecA* 遺伝子を保有していた。

D. 考察

本年度の鶏肉由来サルモネラの調査では ESBL 産生が 8 株、AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生が 7 株認められた。感受性ディスクのセットに CPDX を加えたことにより、広域セフェム薬耐性の判別が容易になり、昨年より β -ラクタマーゼ産生菌の検出が増加したと考えられる。遺伝子型も昨年までの CMY 型、CTX-M 型以外に TEM 型および SHV 型が検出され、鶏肉には様々な遺伝子型の広域セフェム薬耐性サルモネラが存在することが明らかになった。

海外渡航者下痢症患者由来サルモネラではニューキノロン耐性菌が 2 株検出された。また、25 株の *qnr* 遺伝子保有が判明したが、これまで日本国内では PMQR サルモネラの調査が進んでおらず、ヒトから分離された *qnr* 遺伝子保有サルモネラの国内報告はこれが初めてであると思われる。キノロン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、今後は海外渡航者の

みならず、国内発生患者や食品由来株についての監視が必要である。

食肉中の MRSA を調べた結果 1.0% の検出率であった。汚染原因は不明であるため、今後も調査を継続することが必要であると考えられる。

E. 結論

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。本年度の研究では鶏肉において多種類の遺伝子型の広域セフェム薬耐性サルモネラの存在が明らかになった。また、海外渡航者下痢症患者からプラスミド性キノロン耐性サルモネラを検出した。

F. 健康危機情報

海外渡航者下痢症患者由来サルモネラからプラスミド性キノロン耐性遺伝子が検出された。今後は海外渡航者のみならず、国内発生患者や食品由来株についての監視が必要である。

G. 研究発表

(学会発表)

田口真澄、河原隆二、勢戸和子、井上 清、林 昭宏、山形晃明、鎌倉和政、柏樹悦郎：海外旅行者下痢症患者から分離したサルモネラの血清型と薬剤耐性、第 48 回感染性腸炎研究会総会、2009 年 3 月、東京

表1 サルモネラ検査数と陽性検体数(2008年)

	検体名	検体数	陽性検体	分離株数*
国産 321検体	鶏肉	201	109(54.2%)	124
	豚肉	55	3	3
	牛肉	60		
	牛豚ミンチ	5		
外国産 54検体	鶏肉	14	1	1
	豚肉	22	1	1
	牛肉	15		
	牛豚ミンチ	2		
	合鴨	1	1	2
合計		375	115(30.7%)	131

*複数の血清型が分離された検体が14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(2008年)

産地	種類	血清型	菌株数計	菌株数	薬剤耐性パターン
国産 (127株)	鶏肉 (124株)	S. Infantis	85	1*	ABPC,SM,TC,CPDX,CTX,NA
				1*	ABPC,SM,TC,KM,CPDX,CTX
				1*	ABPC,SM,TC,ST,CPDX,CTX
				1*	ABPC,SM,TC,KM,ST,CPDX
				2*	ABPC,SM,TC,KM,CPDX
				2*	ABPC,SM,TC,ST,CPDX
				3*	ABPC,SM,TC,CPDX
				1*	ABPC,TC,CPDX
				1*	ABPC,CPDX
				3	ABPC,SM,TC,KM
				1	ABPC,SM,TC
				14	SM,TC,KM,ST
				2	SM,TC,ST,NA
				1	SM,TC,KM
	6	SM,TC,NA			
	27	SM,TC,ST			
	13	SM,TC			
	3	TC,KM			
	1	TC			
	1	NA			
	S. Schwarzengrund	11	4	SM,TC,KM,ST	
			5	SM,TC,KM	
			1	SM,TC	
			1	SM,TC,NA	
	S. Enteritidis	11	7	NA	
			4	感受性	
	S. Manhattan	8	1*	ABPC,SM,TC,CPDX	
			4	SM,TC,NA	
			3	SM,TC	
	S. Hadar	3	1	SM,TC	
			2	SM,TC,NA	
	S. Typhimurium	2	1*	ABPC,SM,TC,CPDX,CTX	
			1	ABPC,SM,TC,ST,NA	
	S. Agona	1	1	TC	
	S. (1)O35:HMN	1	1	感受性	
	S. (1)O4:e,h:-	1	1	SM,TC,KM	
	S. (1)O4:HNM	1	1	SM,TC,KM,ST	
	豚肉	1	1	SM,TC,ST	
				1	ABPC,SM,TC,CP
				1	TC
外国 (4株)	鶏肉	S. Schwarzengrund	1	1	SM,TC
	豚肉	S. Typhimurium	1	1	ABPC,SM,TC,CP
	合鴨	S. Agona	1	1	ABPC,SM,TC,CP,NA
		S. (1)O4:d:-	1	1	感受性

合計131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)、セフトロキジム(CPDX)、セフトキシム(CTX)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)