

200939047A

薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及び
サーベイランスシステムの高度化に関する研究

(課題番号：H21-食品-一般-013)

平成21年度総括・分担研究報告書

(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)

研究代表者 渡邊 治雄

国立感染症研究所 副所長

平成22(2010)年4月

目 次

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

1. 平成 21 年度総括研究報告書

薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの
高度化に関する研究…………… 1

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所副所長

2. 平成 21 年度分担研究報告書

(I) 薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの
高度化に関する研究……………12

研究分担者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
関塚 剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

(II) 食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究……………18

研究分担者 倉園 貴至 埼玉県衛生研究所
研究協力者 青木 敦子 埼玉県衛生研究所
砂押 克彦 埼玉県衛生研究所
大塚佳代子 埼玉県衛生研究所
上野 裕之 さいたま市健康科学研究センター

(III) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究……………34

研究分担者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター・微生物部
研究協力者 横山 敬子 東京都健康安全研究センター・微生物部
小西 典子 東京都健康安全研究センター・微生物部
仲真 晶子 東京都健康安全研究センター・微生物部

(IV) 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネジメントに関する研究……………43

研究分担者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
浅井 鉄夫 農林水産省動物医薬品検査所
田口 真澄 大阪府立公衆衛生研究所
甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
研究協力者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
門田 修子 国立医薬品食品衛生研究所
朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所
横山 敬子 東京都健康安全研究センター

小澤真名緒 農林水産省動物医薬品検査所
石井 良和 東邦大学医学部

(V) 家畜由来腸内細菌の疫学的研究.....53

研究分担者 浅井 鉄夫 農林水産省動物医薬品検査所
研究協力者 小澤真名緒 農林水産省動物医薬品検査所
馬場光太郎 農林水産省動物医薬品検査所
石原加奈子 酪農学園大学

(VI) 家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析.....63

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
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
黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

(VII) 食品汚染腸内細菌の薬剤耐性疫学.....68

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 河原 隆二 大阪府立公衆衛生研究所
勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所
原田 哲也 大阪府立公衆衛生研究所
井澤 恭子 大阪府立公衆衛生研究所

(VIII) 伴侶動物由来耐性菌の疫学調査.....78

研究分担者 田村 豊 酪農学園大学獣医学部食品衛生学ユニット
研究協力者 石原加奈子 酪農学園大学獣医学部食品衛生学ユニット

(IX) 薬剤耐性化食中毒菌のヒトおよび家畜由来株のゲノム比較解析.....87

分担研究者 黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第三室
研究協力者 関塚 剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第三室
泉谷 秀昌 国立感染症研究所 細菌一部
小口 晃央 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジー本部

資源情報解析課

3. 研究発表一覧.....96

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金食品の安全・安全確保推進研究事業
総括研究報告書

薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの高度化に関する研究

研究代表者： 渡邊治雄 国立感染症研究所副所長

研究要旨： 1) サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて、動物由来株、愛玩動物由来株、食品由来株、人由来株の菌株の収集、耐性型、耐性遺伝子の解析を行った。サルモネラにおいては、血清型Typhimurium多剤耐性化の傾向が進んでいる現状が明らかになった。ヒト下痢症患者由来株と動物由来株の耐性型が非常に似通っており、その因果関係が強く示唆された。特に牛の下痢便から分離されたERFX耐性 *S. Typhimurium*は、*qnrS1* (伝達性である可能性あり) を保有しており陽性率は0.8%であった。多剤耐性であるDT104株にさらにERFX耐性を付与する形になっていた。また、近年*S. Infantis*の多剤耐性化が上昇しており、特にベータラクタム剤CPDXに対する耐性化が強くなっていた。2) ERFX耐性は、*C. jejuni*と*C. coli*ともに増加傾向が認められた。増加要因として、肉用鶏由来*C. jejuni*及び豚由来*C. coli*におけるERFX耐性の増加に起因していた。3) 近年食肉等に含まれるMRSAの人への感染が注目されている。豚におけるMRSAの分布を調査した結果、欧米で高率に分布するST398の汚染は認められなかったが、ヒトから分離の報告があるST221が分離されたことは注目する必要がある。4) ヒトおよび食品由来の*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Infantis, Typhimurium, およびその他血清型(タイ分離)の薬剤耐性株を中心に計20株の全ゲノム配列を解読した。コアゲノムに存在する1塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)を65,844箇所抽出できた。そのSNPs情報を元に最尤法による系統樹解析を行った結果、血清型固有の特徴的なSNPsを見いだし、また血清型同士の類縁関係も明らかにした。

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

浅井鉄夫 農林水産省動物医薬品検査所

五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

泉谷秀昌 国立感染症研究所

黒田 誠 国立感染症研究所

甲斐明美 東京都健康安全研究センター

田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所

田村 豊 酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室

倉園貴至 埼玉県衛生研究所

A. 研究目的

ヒトの健康を脅かす細菌性感染症の中で、食中毒は最も身近な存在であり、その対策には食品、食材の加工、流通経路、さらには生産者に至るまで様々なレベルでの施策が要求される。近年、食中毒菌においても薬剤耐性の問題が浮上しており、

特に小児、老人等で治療に抵抗する場合が見られ、健康衛生上問題を投げかけている。家畜、家禽等の生産現場における抗菌薬の投与と、家畜および食品から分離される食中毒菌（主にサルモネラ、大腸菌、カンピロバクター）の耐性との関連性、さらには食中毒患者から分離される食中毒菌との耐性との関連性の分析を主眼として、現在までに総合的なサーベイランス（家畜飼育現場；農林省関連機関、食品取り扱い現場；国立医薬品食品衛生研究所及び、医療現場にかかわる機関；国立感染症研究所、地方衛生研究所等との連携において）の導入、および情報の統合化、データベースの構築を行ってきた。それら調査の結果から、家畜、国産・輸入農産物、愛玩動物および食中毒患者から分離される食中毒菌は多剤薬剤耐性化傾向にあり、その薬剤耐性化に歯止めを掛けるには、その起源・発生源を特定し、薬剤耐性化した原因を科学的に把握することが必要であることが分かってきた。本研究においては、各々から分離される耐性菌の耐性遺伝子の構成、その伝達様式等の解析、さらには全ゲノム配列の解読を含む高度の技術を用いての解析を加え、畜産、ペット類の愛玩動物、食品および食中毒患者から分離された耐性菌の連関を遺伝子レベルで明らかにすることを大きな目標にする。具体的には、今まで、または今後収集する耐性菌の PFGE, MLVA 等の遺伝型解析データを元に、共通の遺伝型を示す食中毒菌（患者および家畜由来）の全ゲノム解読を行い、全ゲノム配列から示唆される SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

を用いて感染経路を追跡する。その結果を行政的対策に生かせれば、食中毒菌の耐性化の減少及び食中毒発生時の健康被害の拡大を防ぐことができる。高感度で高速なゲノムシーケンサーを用い、短期間に多くの菌株の全ゲノム配列の比較ができるようになってきた今だからこそできる研究である。

B. 研究方法

家畜飼育現場（農林省関連機関：動物医薬品検査所および動物衛生研究所）、食品取り扱い現場（国立医薬品食品衛生研究所）、医療現場にかかわる機関（国立感染症研究所、地方衛生研究所）との間で縦割り行政を越えての、横の連携をとり、畜産、ペット類の愛玩動物、食品および食中毒患者から分離される主にサルモネラ、カンピロバクター、病原性大腸菌、MRSA を中心とした薬剤耐性菌の現状及び動向について全国レベルの調査を行う。サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて、動物由来株（担当：秋庭、浅井）、愛玩動物由来株（田村）、食品由来株（五十君、山口）、人由来株（甲斐、田口、泉谷）の菌株の収集、耐性型、耐性遺伝子の解析を行う。各菌株の遺伝子型（PFGE, MLVA, MLST 等の分子疫学的解析手法により解析する）の解析結果に基づき（泉谷、浅井、五十君）遺伝型の整理を行い、データベースを構築する（渡邊、泉谷）。解析株数は各菌種、由来ごとに各々3～500株を目標とする。そのデータベースの中から、臨床的に問題となるフルオロキノロン剤あるいは第3、4世代セファロsporin剤の耐性株について由来別に共通する遺伝型株の存在を全

ゲノム配列の比較を行い検討する(黒田)。

薬剤感受性試験：BBL社のセンシディスクを用いて、NCCLSに準拠した方法により試験し耐性を決定した。使用した薬剤はゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ST合剤(SXT)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、オフロキサシン(OFLX)、ホスホマイシン(FOM)、ノルフロキサシン(NFLX)、スルフイソキサゾール(Su)、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)、セフトオフル(CTF)、セフポドキシム(CPFX)、エンロフロキサシン(ERFX)、セファロチン(Cf)、エリスロマイシン(EM)、アモキシシリン/クラバン酸(AMC)であった。最小発育阻止濃度MICはEtestあるいはマイクロタイタープレート(MP)を用いて決定した。家畜由来株にはDSM、OTCが用いられた。

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)：米国疾病管理センター(CDC)により推奨されているパルスネットプロトコールに準じて実施した。MLVA(multilocus variable number-tandem repeat analysis):Lindstedtら(2003)、Liuら(2003)、Ramiseeら(2004)の方法を参考に行った。

薬剤耐性遺伝子の解析：薬剤耐性パターンから推測された遺伝子に関して、既報の類似耐性遺伝子の配列からプライマーを設計し、PCRによるDNAの増幅を行った。定法のアガロースゲル電気泳動によってDNA増幅を確認した後、

Dye-terminator法によって塩基配列の決定を行った。得られた配列に対してBlast等を用いて相同性検索を行った。

次世代シーケンサー Genome Analyzer II(イルミナ社)で解読した(40merを約1,000万本)。S. Typhi CT18株のcomplete genome配列をレファレンス配列とし、イルミナ解読リードをmaq v0.7.1マッピングソフトにて比較解析して遺伝子上に存在するSNPを網羅的に抽出した。公共データベースから取得したゲノム配列から36merの疑似リードを作成し、イルミナ解読リードと同様にmaqでSNP抽出した。株ごとに抽出したSNPsアレルを連結して疑似配列を作成し、アライメント結果を最尤法(RAxMLを使用)にて系統分類・系統樹作成をおこなった。

C. 研究結果概要

I. サルモネラの疫学、解析

1) 家畜、動物由来：

a) 2008年家畜由来サルモネラの薬剤感受性状況

家畜由来サルモネラ株の血清型は、38種類認められ、Typhimurium(71株)、Choleraesuis(36株)、Infantis(12株)が優勢だった。

牛及び豚由来株では、ABPC(44%及び51%)、DSM(70%及び94%)及びOTC(42%及び82%)に対する耐性が高率に認められた。一方、鶏由来株では、DSM(62%)、KM(48%)及びOTC(62%)に対する耐性が高率に認められた。また、豚及び鶏由来株では、TMPに対する耐性も35%及び38%に認められた。全畜種で、ERFXは認められず、CEZ耐性は、牛由来Typhimurium

及び鶏由来Infantisで認められた。

b) 牛由来フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium*

2006-2007年に同一農場の異なる牛の下痢便から分離されたERFX耐性 *S. Typhimurium*は、NA (32 µg/ml) 及びERFX (4 µg/ml) 耐性で、*qnrS1* (伝達性である可能性あり) を保有していた。当該農場で2005年に分離された株とファージ型 (DT104) とPFGE型は同一であった。2002-2007年に分離された*S. Typhimurium* 237株では、*qnrS*遺伝子の陽性率は0.8%であった。

2) 食品由来：

埼玉県内の食肉、食鳥肉、内臓肉及び漬物、計100検体から分離された鶏肉(2検体)、牛肉(1検体)、牛豚合挽肉(1検体)由来の*S. Infantis*がSM・TC・SXT耐性、鶏肉(1検体)由来の*S. Infantis*がSM・TC耐性、豚肉(1検体)由来の*S. Brandenburg*がTC耐性を示した。また、牛肉由来の*S. Orion* 及び鶏肉由来の*S. Schwarzengrund* が供試薬剤すべてに感受性であった。

東京の食品由来 *S. Typhimurium* 株は、分離された7株全てが耐性菌であった。このうち6薬剤に耐性を示す株が1株、5薬剤耐性株が3株、4薬剤耐性が1株、2薬剤耐性が2株であった。STが分離された食品はササミ、鶏レバー等の鶏肉関連や牛レバー等の牛肉関連であった。

食肉由来菌株：

大阪で分離の160株は、13血清型に型別され、*S. Infantis*が97株と最も多く、次いで *S. Schwarzengrund* 33株、*S. Manhattan* 14株であった。97.5%が耐性菌で、CPDX耐性菌が鶏肉由来で25株

(17.7%)あった。鶏肉由来株を2008年と2009年で比較すると、2008年では *S. Infantis* が68.5%を占めていたが2009年には60.6%に減少した。これに対し、*S. Schwarzengrund* は8.9%から20.9%に増加した。また、*S. Infantis* のCPDX耐性率が15.3%から26.0%に上昇した。

3) 患者由来：

a) 国内発生ヒト由来菌株(フルオロキノロン剤耐性、CPDX耐性株の存在)

埼玉県内で2009年に、散発下痢症患者及び健康者から分離されたサルモネラ134株は35血清型に型別され、最もEnteritidisが27株、次いで *S. Typhimurium*が10株、*S. Infantis*が9株の順であった。このうち41株(30.6%)が12薬剤のいずれかに耐性を示した。*S. Enteritidis*では48.1%が、*S. Typhimurium*では40.0%が耐性を示した。2003年から2008年まで連続して検出されていたCPFYやNFLXなどのフルオロキノロン剤や第3、第4世代セフェム系薬剤に対する耐性菌は、今回は検出されなかった。

東京都ヒト由来 *S. Typhimurium* 株は全て散発事例由来株で、10株中4株(40%)が耐性株：TC, KM, ABPC, NAの4薬剤耐性が2株、TC, SM, SIXの3薬剤およびKM, ABPCの2薬剤耐性株。

大阪分離の45株は7つの血清型に型別され、*S. Enteritidis*が最も多い血清型であった。3事例のみが耐性であり、保菌者では18株中13株(66.7%)が耐性であった。CPDX耐性の *S. Infantis* が保菌者由来株で3株あり、鶏肉由来株との比較が必要であると考えられた。

II. カンピロバクターの疫学

1) 健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクター

*C. jejuni*では、DSM、OTC、NA及びERFXに対する耐性率の低下傾向が認められた。*C. coli*では、ABPC及びEM耐性の増加傾向が認められたが、NA及びERFXに対する耐性の減少傾向が認められた。

2) 国産肉由来菌株：

埼玉県内の食肉、食鳥肉、内臓肉及び漬物、計100検体から分離された鶏肉(1検体)由来の*C. coli*及びレバー(1検体)由来の*C. jejuni*がNFLX・OFLX・CPFX・TC耐性、レバー(2検体)由来の*C. jejuni*がTC耐性であった。レバー(4検体)及び鶏肉(6検体)由来の*C. jejuni*は供試薬剤(NFLX、OFLX、CPFX、NA、TC、EM)すべてに感受性であった。

大阪国産鶏肉由来116株は*C. jejuni*が105株、*C. coli*が11株であった。*C. jejuni*では38.1%、*C. coli*では11株すべてがフルオロキノロン耐性であった。エリスロマイシン耐性は*C. coli*で1株認められた。

3) 患者由来株：

2008年東京で分離された*C. jejuni*206株ではキノロン系薬剤耐性株が78株(37.9%)、EM耐性が8株(3.9%)、感受性株82株(39.8%)であった。一方、*C. coli*では8株全てがいずれかの薬剤に耐性を示す株であった。キノロン系薬剤耐性株は7株(87.5%)であった。

大阪分離*C. jejuni*139株、*C. coli*11株の結果は、*C. jejuni*では散発下痢症患者で34.9%、食中毒患者で50.0%がフルオロキノロン耐性、*C. coli*では散発下

痢症患者で80.0%、食中毒患者で66.7%がフルオロキノロン耐性であった

III. 腸管出血性大腸菌の解析

埼玉県内で2009年に、散発下痢症患者及び健康者から分離された腸管出血性大腸菌は、0157:H7(VT1&2産生)が67株、次いで0157:H7(VT2産生)の17株であった。そのうち、供試した12薬剤のいずれかに耐性であったのは25株(20.7%)であった。SM・TC耐性で6株、次いでSM・TC・ABPC耐性が5株分離された。今回はフルオロキノロン剤や第3、第4世代セフェム系薬剤に対する耐性菌は検出されなかった。

IV. MRSAの検出

1) 豚からのメチシリン耐性ブドウ球菌の分離

ブドウ球菌は、鼻腔スワブ115検体中10検体(8.7%)から、また、糞便115検体中5検体(4.3%)から増菌培養法により分離された。鼻腔スワブからは、*S. aureus*、*S. capitis*、*S. epidermidis*、*S. haemolyticus*、*S. lentus*及び*S. spp.*、*S. ludunensis*、*S. warneri*が、糞便からは、*S. aureus*、*S. haemolityca*及び*S. warneri*が分離されたであった。鼻腔スワブから分離された*S. aureus*(1検体)は、*me cA*を保有していた。MRSAのMLSTは、ヒトから分離の報告があるST221と同じであった。分離されたMRSA株は、アンピシリンとストレプトマイシンに耐性を示し、テトラサイクリンやエリスロマイシンには感受性を示した。

2) 食品分離株

食中毒関連の食品検体から分離された296株の黄色ブドウ球菌のうち1株

(0.3%)がMRSAであった(牛の小腸から)。

国内産豚肉、国内産牛肉(大阪)それぞれ1検体からMRSAを検出した。*mecA* 遺伝子を保有し、*SCCmec* は type IV、TSST-1 および *sec* 遺伝子陽性であった。

3) ヒトの糞便

糞便検体 3,021 件から黄色ブドウ球菌が検出されたのは 308 件 (10.2%) であり、そのうち 5 検体が MRSA であった。

V. ペット由来大腸菌の調査

1) 犬、猫由来:

犬由来株では 24%の株に *qnr* 遺伝子が検出され、内訳は *qnrA* が 12%、*qnrB* が 9%、*qnrS* が 3%であった。人由来株では 27%が *qnr* を保有し、内訳は犬由来株と良く似ていた。猫由来株からは *qnrA* のみが検出された。第三世代セファロスポリンである CPDX 耐性大腸菌における *qnr* 遺伝子保有率を調べたところ、CPDX 耐性大腸菌の 44%が *qnr* 遺伝子を保有し、CPDX 感受性株では *qnr* 保有率が 19%に過ぎなかった ($p < 0.05$)。

犬由来大腸菌 147 株中 53 株 (36%) がセフェム剤耐性菌であり、その内、43 株 (81%) が FQ 耐性菌であった。猫由来大腸菌では 70 株中 7 株 (10%) がセフェム剤耐性菌であり、その内、3 株 (43%) が FQ 耐性菌であった。人由来大腸菌は全て FQ 耐性菌であるものの、118 株中 40 株 (34%) がセフェム剤耐性大腸菌であった。犬由来セフェム剤耐性菌 53 株中、7 株 (13%) がクラス A 型、26 株 (49%) がクラス C 型を産生すると推定された。猫由来セフェム剤耐性菌 7 株では、クラス A とクラス C 産生株がそれぞれ 1 株であった。*bla*CTX-M-14、*bla*CTX-M-27、*bla*CMY-2、

*bla*LAT-1、CMY-like が分離された

VI. Genotyping

1) 遺伝型別比較

S. Enteritidis (SE) の次に鶏肉からの分離頻度の高い *S. Infantis* (SI) について、これまで行われている型別法を、D 値および型別された型数に基づいて評価した。MLVA は SE、SI どちらの血清型でも 20 以下の型しか検出できず、D 値も 0.7 未満と、高いものではなかった。PFGE (XbaI 消化による) については SE では 48 型、D 値が 0.86 に留まったが、SI では 102 型、D 値 0.95 と比較的高い分解能を示した。また、SE でも BlnI を使用した場合には、型数で 80、D 値で 0.90 と上昇した。

2) CRISPR 解析

CRISPR は 29 塩基の direct repeat、および各リピート間に存在する 32-34 塩基のスペーサー配列、上流のリーダー配列および CRISPR associated (CAS) gene から成る。スペーサー配列はそれぞれ異なり、ファージ様の配列からなる。最近ではこれらのスペーサー配列が発現することによってファージの感染を阻害する新たな機構として注目されている。ゲノム配列の解析から SE では 2 箇所 CRISPR 領域が存在することが知られている。今回、その 2 箇所の配列のバリエーションを調査した。ファージ型の異なる株を含めて 24 株の SE を供試した。その結果、1 株 (ファージ型 6a、アンピシリン耐性) において CRISPR に変異が観察された。分解能としては低いものの、CRISPR が何らかの形で変異しうることが明らかとなった。

VII. セフェム系薬剤に耐性を示す

Salmonella Typhimurium の遺伝解析

国内一部地域の牛からセフェム系薬剤に耐性を示す *Salmonella* Typhimurium (ST) が 2000 年代半ば以降、継続的に分離されている。今後、ヒトで類似の株が分離された場合に株の異同を検証する解析系が必要となる。そこでセフェム耐性 ST L-3553 の *bla*_{CMY-2} を含む挿入配列の構造解析を実施した。複製遺伝子を欠いたプラスミド pAR060302 配列と *bla*_{CMY-2} の他、SM、TC、CM、サルファ剤等の 14 の薬剤耐性遺伝子が染色体上に存在した。また病原性プラスミド pSLT (NC_003277, 94 kb) にサルモネラの病原性に関与する *spvRABCD* オペロンと AP、SM、KM、TC、サルファ剤に対する耐性遺伝子が含まれていた。L-3553 の染色体上に存在する挿入配列は conjugative transposon である可能性が示唆された。また、本株が保有する 140 kb プラスミドは病原性-薬剤耐性プラスミドである可能性が示唆された。

VIII. 全ゲノム解析

1) *Salmonella enterica* の血清型と SNPs

血清型特有のコアゲノムを系統的に保持しているかどうか検討するために、計 65,844 箇所の SNPs locus を比較した。Typhi, Paratyphi A の高病原性タイプと比較した結果、Enteritidis, Infantis, Typhimurium 等は血清型間でクラスターを形成した。例外として、Saintpaul の 2 株は同じ血清型にも関わらず異なるクラスターに分類されたことから、必ずしも血清型がコアゲノムと同様の系統関係を示すのではないことが分かった。

2) *Salmonella* Infantis (SIN) の SNP 系

統分類

Infantis コアゲノムから新たに全 SNP 情報を抽出し、計 913 箇所の SNPs を選別した。薬剤耐性株は感受性 SIN 株とは大きく異なる系統関係を示し、数十カ所の SNPs を用いれば耐性株間を識別できることを示唆した。PFGE・MLVA 解析では Infantis の株間の分類が困難であることから、得られた SNPs 情報が系統分類に使用可能である。

3) *Salmonella* Enteritidis の SNP 系統分類

Enteritidis コアゲノムから新たに全 SNP 情報を抽出し、計 232 箇所の SNPs を選別した。薬剤耐性 3 株 (E980560, E981123 E070163) は分離場所・年・耐性プロファイルに違いがあるにも関わらず、同じクラスターに分類された。PFGE プロファイルによる UPGMA 系統樹と SNPs 系統樹に相関性が認められ、薬剤耐性株はそれに特徴的な SNPs で鑑別できることを示唆していた。薬剤耐性化の経緯において、IS の挿入が頻繁に見られ、耐性株・感受性株の鑑別に有用な配列情報になっていた。

4) 薬剤耐性 Typhimurium T000240 株の complete ゲノム配列

ニューキノロン高度耐性株 T000240 株 (耐性プロファイル: ASTCpCSxTmGNSu) はイルミナ解読リードから *de novo* assembly により環状の染色体 DNA (4,966,609 bp)、環状のプラスミド 2 つ (94,715 bp, 8,670 bp) で構成されることが明らかになった。耐性遺伝子群は 2 つの Class I integron (*intII*, *dfrAI*, *aadAI*, *qacED1*, *sull*; *intI1*, *bla*, *aadA1*,

qacED1, sul) にあり、その間にはゲンタミシン耐性(*aac(3)-II*)、テトラサイクリン耐性(*tetA* class B)、クロラムフェニコール耐性(*cat*)が散在していた。その上流下流には鉄獲得系(aerobactin 合成系、Sit 鉄輸送体)と重金属排泄系(*mer* オペロン)を獲得しており、薬剤耐性以外の生存戦略に關与する外来遺伝子群も集まっていた。

D. 考察

サルモネラ感染症は小児や高齢者には全身感染症として時に致死的になる。その治療に使われる薬剤はフルオロキノロン系及び第3, 4世代セファロスポリン系の薬剤であり、これらに耐性の菌による感染の場合には治療に抵抗性になることが危惧されている。そのためWHO等はそれらの耐性菌の出現およびその拡散を防ぐ手段を世界的に画策している。わが国においても、耐性菌の獲得状況を把握するために、農場の家畜から分離される菌の耐性状況から、食肉および下痢患者からの分離菌の耐性状況までを横断的に把握できるサーベイランス体制の確立を図ってきている。今回の班研究においてそのサーベイランス体制が軌道に乗り出し、いくつかの重要な所見が明らかになってきた。家畜由来のサルモネラにおいても、フルオロキノロン耐性とセファロスポリン耐性が2000年初めから継続的に分離されている。これまでの調査で、フルオロキノロン耐性は、2001年に病豚由来 *S. Choleraesuis* で認められたが、2005年以降に病牛由来 *S. Typhimurium* で毎年確認されている。2005~2007年に分離された *S. Typhimurium* 3株の耐性機

構を調べたところ、DNA gyrase に変異のある高度耐性株および *qnrS1* 遺伝子をプラスミドにもつ低度耐性株によるものが分離されている。今回の調査では、DNA gyrase に変異のある高度耐性株は幸い分離されていないが、*qnrS1* 遺伝子をプラスミドにもつ低度耐性株の広がり認められた。特に *qnrS* は一般にプラスミド上に局在することから、他のサルモネラの血清型や他菌種への浸潤が起る可能性があり、今後これらの拡大が起るのかのさらなる調査が必要である。

セファロスポリン耐性サルモネラは、2006年以降、牛及び肉用鶏由来 Newport、Typhimurium、Infantis、Senftenberg など多様な血清型で認められている。これまで、健康家畜由来大腸菌においても、肉用鶏由来株を中心に全ての畜種で認められていることから、国内の家畜間に広く浸潤していることが推察される。健康保菌者から CPDX 耐性 Infantis が分離されていることから、既にヒトへの健康危害を起こすことが懸念される。鶏肉由来とヒト由来の CPDX 耐性 Infantis のゲノムレベルの比較を行うことにより、伝播経路を解明する必要がある。

カンピロバクターもフルオロキノロン耐性菌が世界的に問題となっている。注目すべき点は、健康家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性の動向として、2000~2003年に比べて2006~2008年においてERFX耐性が、*C. jejuni* と *C. coli* ともに増加傾向にあるということである。その原因に関して特に薬剤使用量との関連性の究明が重要である。*C. jejuni* においては臨床的に使用されるエリスロマイ

シン耐性率が低いことは幸いであるが、今後も動向を追う必要がある。

近年食肉等に含まれる MRSA の人への感染が注目された。豚における MRSA の分布を調査した結果、欧米で高率に分布する ST398 の汚染は認められなかったが、ヒトから分離の報告がある ST221 が分離されたことは注目する必要がある。MLST のデータベースによると、ST221 に属する株は、フランスとスコットランドの病院で分離されたメチシリン感受性株とメチシリン耐性株であった。その他に、韓国の病院で SCCmec II 型の MRSA ST221 が分離されている。分離された MRSA ST221 株は、10 薬剤中アンピシリンとストレプトマイシンの 2 剤にのみ耐性を示した。欧米からの報告でも豚由来 MRSA は特にテトラサイクリンに高率で耐性を示している。一般的に院内感染型の MRSA は多剤耐性といわれている。本調査において豚の鼻腔スワブから分離された ST221 は、これまで人から分離されている系統の株であること、養豚場で使用されるテトラサイクリンに感受性である。このことから、今回豚から分離された MRSA 感染源及び汚染状況については、継続的な調査が必要である。

耐性菌の伝播経路を明らかにするため、今回から耐性菌の全ゲノム解析を始めた。O 抗原・H 抗原検査により血清型は判別されるが、その抗原性とコアゲノムとの関係は解析されていない。それらは *S. enterica* の伝播および病原性と宿主域 (tropism) 等にも関連性が深いと想定され、今回の研究で *Salmonella enterica* 血清型の SNPs 系統

解析により、コアゲノムの全 SNPs を用いれば、血清型の特徴が分類できる可能性が示唆され、本研究で示した系統関係から血清型の特徴をより明確に分類し位置づけることができた。より広範な血清型の解析を加え、血清型に起因する病原性・薬剤耐性等を検討していく予定である。

E. 結論

家畜に分布するサルモネラとカンピロバクターの薬剤感受性状況を調査した結果、医療上重要なフルオロキノロン剤やセファロスポリンに対する耐性が依然として認められている状況である。その上に、鶏肉由来の *S. infantis* が伝達性の CPDX 耐性を獲得し、それが保菌患者由来株の中にも認められてきた。今後のその関連性をゲノムレベルで行う必要がある。また、プラスミド性キノロン耐性因子 (qnr) が、農場に分布した Typhimurium DT104 に伝播した可能性が示唆された。今後その広がりを注意深く調査していく必要がある。豚における MRSA の分布を調査した結果、欧米で高率に分布する ST398 の汚染は認められなかったが、ヒトから分離の報告がある ST221 が分離されたことは注目する必要がある。全ゲノム配列の比較を行い、*Salmonella enterica* 血清型の SNPs 系統解析により、コアゲノムの全 SNPs を用いれば、血清型の特徴が分類できる可能性が示唆された。今後活用できる可能性がある。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 健康危害情報

家畜に分布するサルモネラとカンピロ

バクターにおいて医療上重要なフルオロキノロン剤やセファロスポリン系薬剤に対する耐性が増加している傾向が認められた。治療に抵抗する事例もあるので、臨床的に注意を喚起する必要がある。今後の耐性菌の動向とその拡散を調査し、そのデータを公表していく必要がある。

H. 研究発表

(1) 論文発表

1. H. Niwa, T. Anzai, H. Izumiya, T. Morita-Ishihara, H. Watanabe, I. Uchida, T. Tozaki, and S. Hobo: Antimicrobial resistance and genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* isolated from horses in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71 (8), 1115-9, 2009.
2. H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. *J. Med. Microbiol.* 58 (11), 1486-1491, 2009.
3. Harada, K., Ozawa, M., Ishihara, K., Asai, T., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Prevalence of antimicrobial resistance among serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates from cattle and poultry in Japan. *Microbiol. Immunol.* 53:107-11.
4. Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 198-200.
5. Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, M., Asai, T., Tamura, Y. National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 2009 51:35-40.
6. Masumi Taguchi, Ryuji Kawahara, Kazuko Seto, Kiyoshi Inoue, Akihiro Hayashi Nobuaki Yamagata, Kazumasa Kamakura, and Etsuro Kashiwagi : Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* isolated from patients with overseas travelers diarrhea in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62:312-314, 2009.
7. Kojima A., Asai T., Ishihara K., Morioka A., Akimoto K., Sugimoto Y., Sato T., Kijima M., Tamura Y. and Takahashi T.: National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan, *J. Vet. Med. Sci.*, 7:1301-1308, 2009.
8. 泉谷秀昌：サルモネラ食中毒について。月間 HACCP、第 16 巻第 2 号、100-103、2010.

(2) 口頭発表

1. Igimi, S., Ishiwa, A., Yamasaki, M., Okada, Y., Monden, S., Asakura, H., Yamamoto, S. Antimicrobial

- resistance and genotyping of the pulsed-field gel electrophoresis of *Campylobacter jejuni* isolated from bovine and poultry. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related Organisms (2009.9) (Niigata)
2. 五十君静信。カンピロバクターによる食中毒について。食品の安全・安心に関するリスクコミュニケーション。(2010.1.21)千葉市
 3. 河原隆二、田口真澄、勢戸和子、笠井正志、中矢秀雄：第三世代セフェム耐性腸内細菌における各種β-ラクタマーゼの保有状況について、第83回日本感染症学会総会、2009年4月、東京
 4. 勢戸和子、田口真澄、河原隆二：大阪府における毒素原性大腸菌(ETEC)分離状況-2004~2008年、第83回日本感染症学会総会、2009年4月、東京
 5. 勢戸和子、田口真澄、原田哲也、河原隆二：中国旅行者下痢症の原因菌調査と分離株の薬剤耐性、第49回感染性腸炎研究会総会、2010年3月、東京
 6. 横田伸一、佐藤豊孝、大越康雄、岡林環樹、桑原理、田村豊、藤井暢弘：ヒト臨床検体から分離されたキノロン耐性大腸菌分離株の分子疫学的解析、第77回日本細菌学会北海道支部学術総会、2009年9月、札幌。
 7. 齋藤美恵子、石原加奈子、上野弘志、村松康和、前谷茂樹、田村豊：伴侶動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学調査、第77回日本細菌学会北海道支部学術総会、2009年9月、札幌。
 8. 石原加奈子、齋藤美恵子、上野弘志、村松康和、前谷茂樹、田村豊：伴侶動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の疫学解析、第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月、鳥取。
 9. 齋藤美恵子、石原加奈子、上野弘志、村松康和、前谷茂樹、田村豊：伴侶動物病院におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の分子疫学調査、第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月、鳥取。

分担研究報告書

研究分担者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	寺嶋淳	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	黒田誠	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者	関塚剛史	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨：本研究班では、ヒトの健康への脅威となる食品由来細菌感染症に関して、主として薬剤耐性菌に着目し、薬剤耐性食中毒菌による健康被害の発生動向を把握するための監視体制に関して、ヒト、食品、環境および家畜といった多方面からの情報整備をすることを目的とする。そのための基礎研究として上記耐性菌を含め、さまざまな菌の解析手法を開発しサーベイランスシステムに組み込むことで上記情報整備の拡充、高度化を図る。本分担研究においては、特に、細菌性食中毒の原因物質の第 1 に挙げられるサルモネラをはじめ、食品汚染を介した細菌感染症に着目して上記目的のための新規解析技術の検討を行う。

A. 研究目的

2008 年厚生労働省食中毒統計における細菌性食中毒の患者総数は 10,331 名であった。このうち、25%にあたる 2,551 名がサルモネラによるものであり、本菌の公衆衛生上の重要性を示している。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるが、中でも *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*、以下 SE) による患者数は 1990 年代に急増し、現在もなお血清型別での検出頻度で第一位を占めている。

同じく *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*、以下 ST) は、SE が台頭してくる以前は血清型別で最も多く検出されていた。ST は現在でもなお、血清型別検出頻度の上位を占めている。

近年では *S. Infantis* (以下 SI) が鶏肉から高率に分離され、またヒトからの分離頻度も血清型別の上位にランクしている。

食中毒細菌における菌株の耐性化の傾向は異なっており、SE における耐性株の報告は少ないものの、ST おとび SI においては多剤耐性化が顕著であると言われている。

本研究では、これら食中毒細菌の感受性菌と耐性菌の動向を調査するとともに、耐性機序、あるいは菌株を分類するのに有用なマーカー等について探索、検討を行うことで、食中毒細菌の情報基盤を高度化し、耐性化の広がり状況を明らかにすることを目指す。

(倫理面への配慮)

食中毒事例に関し、ヒトの臨床情報等を扱

う場合には、事前に研究倫理委員会の承認を得た上で、個人情報の取り扱いに注意し、研究を遂行する。分離した菌株に関しては、匿名化を図り、特定の個人に不利益が生じないように配慮する。

B. 研究方法

1. 供試菌株：全国の地方衛生研究所等および動物医薬品検査所等の協力により得られたサルモネラ分離株を使用した。

2. 薬剤感受性試験：BD社のセンシディスクを用いて、CLSIに準拠した方法により試験し耐性を決定した。使用した薬剤はアンピシリン (A)、ストレプトマイシン (S)、テトラサイクリン (T)、シプロフロキサシン (Cip)、カナマイシン (K)、セフォタキシム (Ct)、クロラムフェニコール (C)、ST 合剤 (Sx)、ゲンタマイシン (G)、ナリジクス酸 (N)、サルファ剤 (Su)、ホスホマイシン (F) の12剤であった（場合によってセファロチン (Cf) も使用）。最小発育阻止濃度 MIC は Etest もしくは微量液体希釈法を用いて決定した。

3. 遺伝子型別：パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)：米国疾病管理センター (CDC) により推奨されているパルスネットプロトコールに準じて実施した。multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)：既報の遺伝子座を組み合わせ約 20 遺伝子座を使用して行った。

4. 型別法分解能の解析：分解能の解析には Simpson's Index of Diversity (D) を使用した。D およびその 95% 信頼区間 (Confidential Intervals; CI) は既報 (Grundmann, H., et al., J. Clin. Microbiol.

39, 4190-4192, 2001.) に従って計算した。

4. 薬剤耐性遺伝子の解析：薬剤耐性パターンから推測された遺伝子に関して、既報の類似耐性遺伝子の配列からプライマーを設計し、PCR による DNA の増幅を行った。定法のアガロースゲル電気泳動によって DNA 増幅を確認した後、Dye-terminator 法によって塩基配列の決定を行った。得られた配列に対して Blast 等を用いて相同性検索を行った。

6. CRISPR 構造解析：

Clustered, Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) の配列を、<http://crispr.u-psud.fr/crispr/CRISPRdatabase.php>より取得し、周囲のゲノム配列からプライマーを設計、リピート構造の配列を決定した。

C. 研究結果および考察

1. SE 集団事例関連株における薬剤耐性の傾向：SE 集団事例関連株に関して薬剤耐性の傾向を調査した。感受性株の割合の上昇が見られ、80%以上を占めた一方で、SM 単剤耐性株が大きく減少した。また NA 耐性株は 5-10%を推移している状況にあった (図 1)。

2. サルモネラ型別法の分解能：上記 SE、鶏肉からの分離頻度の高い SI について、今後、型別法の高度化が望まれる。そこで、これまで行われている型別法を、D 値および型別された型数に基づいて評価した。調査した菌株数は、血清型および型別法によって異なるが、概ね 250 以上を使用した。

解析の結果をまとめたものを表 1 に示す。MLVA はどちらの SE、SI どちらの血清型でも

20以下の型しか検出できず、D値も0.7未満と、高いものではなかった。

PFGE (XbaI 消化による) については SE では 48 型、D 値が 0.86 に留まったが、SI では 102 型、D 値 0.95 と比較的高い分解能を示した。また、SE でも BlnI を使用した場合は、型数で 80、D 値で 0.90 と上昇した。

SE については従来からよく使われているファージ型別があり、本法についても同様に分解能を調べたところ、型数 29、D 値 0.87 であった。遺伝子型別では菌株数の増加に伴い型数も増加するので、D 値も高くなりやすいが、ファージ型別は型数に上限がある。それにも拘らず PFGE と同等の D 値を示すということは、型別法としては未だに有効であると推測される。

SE および SI の PFGE 解析で見られる現象として、同じパターンを示す株が相当数あることがある (図 2)。ファージ型別によってこうしたグループをさらに分けることも可能であるが、より精度の高いマーカーの開発が (特に SI では) 望まれる。

3. CRISPR 解析の検討

CRISPR は 29 塩基の direct repeat、および各リピート間に存在する 32-34 塩基のスペーサー配列、上流のリーダー配列および CRISPR associated (CAS) gene から成る。スペーサー配列はそれぞれ異なり、ファージ様の配列からなる。最近ではこれらのスペーサー配列が発現することによってファージの感染を阻害する新たな機構として注目されている。ゲノム配列の解析から SE では 2 箇所 CRISPR 領域が存在することが知られている。今回、そ

の 2 箇所の配列のバリエーションを調査した。ファージ型の異なる株を含めて 24 株の SE を供試した。その結果、1 株 (ファージ型 6a、アンピシリン耐性) において CRISPR に変異が観察された。ゲノム株では CRISPR1 では 8 リピート、CRISPR2 では 10 リピートの存在が知られているが、上記菌株ではそれぞれ 9 リピート (+1)、8 リピート (-2) であり、CRISPR1 において発見されたりピートは CRISPR データベース上にない配列のようであった。

分解能としては低いものの、CRISPR が何らかの形で変異しうるということが明らかとなった。

D. 結論

細菌感染症において菌の耐性化は、非常に重要な問題であり、その耐性機序および伝播形式を調査する上で、より精度の高い、高度な菌株解析手法が求められるようになっていく。これまでに行われているファージ型、PFGE による遺伝子型別でもある程度の分解能を有することが明らかとなった。一方で、上記方法で同じグループに分類される菌株も少なくない状況にある。例えば、NA 耐性 SE についても同様である。より詳細な解析のためには更にマーカーを開発していく必要があることが示された。

E. 研究発表等

(1) H. Niwa, T. Anzai, H. Izumiya, T. Morita-Ishihara, H. Watanabe, I. Uchida, T. Tozaki, and S. Hobo: Antimicrobial resistance and genetic characteristics of *Salmonella typhimurium* isolated from horses in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci.

71 (8), 1115-9, 2009.

(2) H. Izumiya, Y. Tada, K. Ito, T. Morita-Ishihara, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. *J. Med. Microbiol.* 58 (11), 1486-1491, 2009.

(3) 泉谷秀昌：サルモネラ食中毒について。月間 HACCP、第 16 巻第 2 号、100-103、2010。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

※解析に使用した菌株を提供していただいた全国の地方衛生研究所、動物医薬品検査所、動物衛生研究所等の諸先生方に深謝いたします。

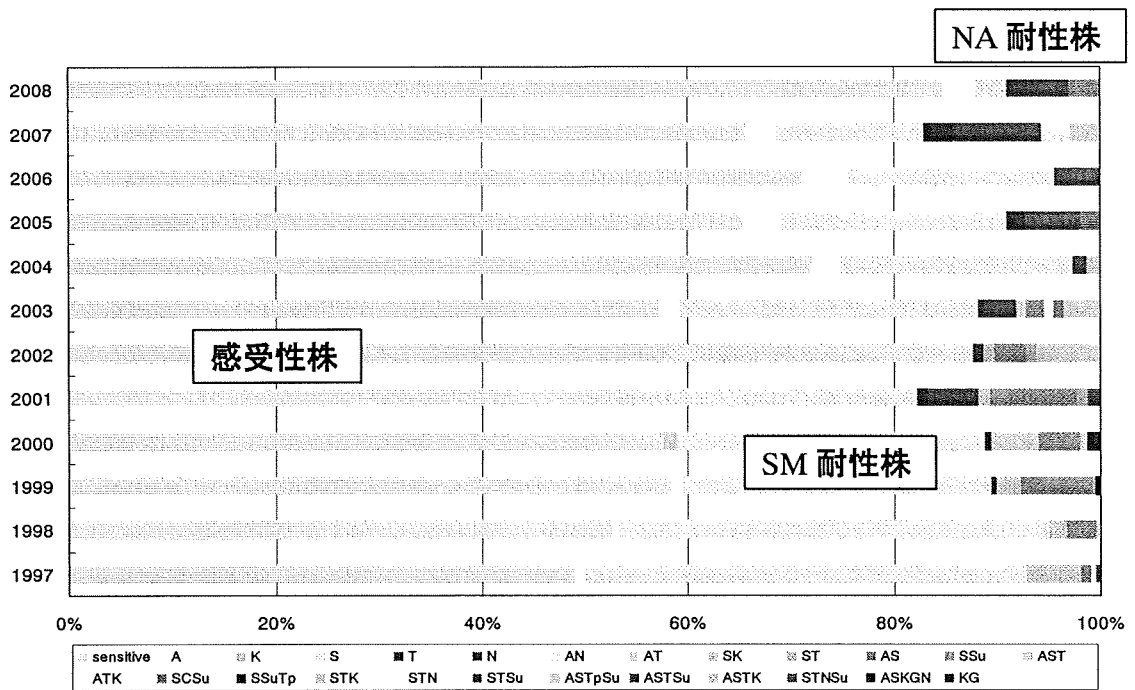


図 1. SE 集団事例関連株薬剤耐性パターンの推移 (1997-2008)。

	XbaI-PFGE (BlnI)	MLVA	ファージ型別
SE	0.862 (0.899) 48 types (80 types)	0.631 15 types	0.866 29 types
SI	0.948 102 types	0.657 19 types	NA

表 1. SE および SI に関する各型別法の分解能。上段は D 値。下段は型数を表す。PFGE カッコ内は BlnI による成績を示す。ファージ型別は SI では利用できない (not available)。

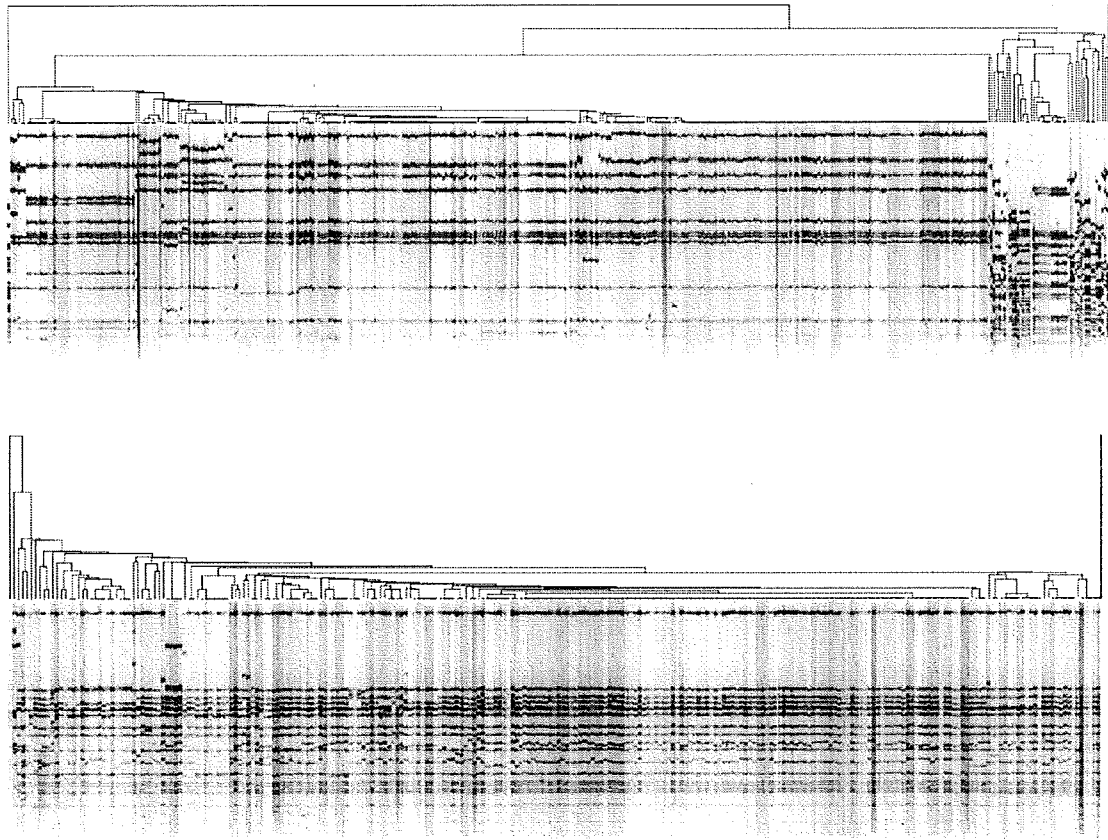


図 2. (上) SE の BlnI-PFGE によるクラスター解析。(下) SI の XbaI-PFGE によるクラスター解析。