

201033027A

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22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 所長

平成23(2011)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 22 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 所長

#### 2. 平成 22 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……………	11
--	----

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……………	17
-----------------------------------	----

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
	近 真理奈	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
	土井 りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

(III) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究……………	28
--------------------------------	----

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	小西 典子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	下島優香子	東京都健康安全研究センター・微生物部
	横山 敬子	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ージメントに関する研究……………	36
--	----

研究分担者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
	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
研究協力者	石井 良和	東邦大学医学部微生物 感染症学講座

(V) 家畜由来腸内細菌の疫学的研究.....40

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
	臼井 優	農林水産省動物医薬品検査所
	比企 基高	農林水産省動物医薬品検査所

(VI) 家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析.....48

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
	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
	中馬 猛久	鹿児島大学農学部

(VII) 食品汚染腸内細菌の薬剤耐性疫学.....56

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
	原田 哲也	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

(VIII) 伴侶動物由来耐性菌の疫学調査.....64

研究分担者	田村 豊	酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室
研究協力者	石原加奈子	酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室

(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.....73

研究分担者	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
	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	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.....82

平成 22 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 国立感染症研究所所長

研究要旨： 1) サルモネラの疫学、解析：2010 年家畜由来サルモネラの薬剤感受性状況は全畜種で、ERFX 耐性は認められず、CEZ 耐性は、鶏由来 Infantis (1 株) で認められ、CMY-2 型産生株であった。食品からは鶏肉からの分離が多く血清型は Infantis、CPDX 耐性率は 2010 年には 24.6% で近年増加傾向にあった。患者由来では、*S. Enteritidis* が多く CTX 耐性が 1 株分離された。CPDX 耐性の *S. Infantis* が保菌者由来株で 2 株あり、鶏肉由来株との比較が必要であると考えられた。フルオロキノロン耐性株は検出されなかった。2) 2010 年健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクターの耐性状況は昨年と変化がなかった。国産鶏肉から分離された *C. jejuni* の 36.0% がフルオロキノロン耐性であった。患者由来株においても *C. jejuni* の 33.3% がフルオロキノロン耐性であった。EM 耐性率は、ここ数年 *C. jejuni* の 0.5% ~ 数% で横ばいであった。3) プロイラーから分離される *E. coli* で ESBL やセファゾリン耐性菌の分離率が増加している。ESBL は全て CTX-M-型に属する  $\beta$  ラクタマーゼで、CTX-M-9 グループ、CTX-M-1 グループおよび CTX-M-2 グループが多かった。CEZ 耐性株では CMY-2 が最も多く、その多くは接合伝達株であった。4) サルモネラのセフェム系薬剤に耐性を示す *bla*<sub>CMY-2</sub> 遺伝子は一般にプラスミド上に存在するものが多いが、染色体上に存在する場合があることを、遺伝学的解析法を用いて示した。5) *S. Typhimurium* T000240 株のゲノム解読から、薬剤耐性アイランドの存在を明らかにした。特徴的な IS 配列を利用し、薬剤耐性アイランドに種々の耐性遺伝子群が挿入されてきた経緯が分かった。多剤耐性化の背景には今まで言われてきているインテグロンの関与が強いことがはっきりしてきた。*S. Typhimurium* T000240 株は多様な遺伝子の獲得を繰り返し、進化してきたことが判明した。

分担研究者：

分担研究者：		センター	
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	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
浅井鉄夫	農林水産省動物医薬品検査所	田村 豊	酪農学園大学獣医学部 獣医公衆衛生学教室
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所	倉園貴至	埼玉県衛生研究所
泉谷秀昌	国立感染症研究所	A. 研究目的	
黒田 誠	国立感染症研究所	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	
甲斐明美	東京都健康安全研究		

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いる。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

(1) 研究体制：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）との間で横の連携をとり、家畜—食品—ヒト（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、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）、ヒト由来株（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）。そのデータベースの中から、臨床的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）。

（２）薬剤感受性試験：薬剤感受性は、CLSI 法に準じた寒天平板希釈法により実施した。薬剤は、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、ナリジクス酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX)、トリメトプリム (TMP)、の 11 薬剤を用いた。各薬剤の耐性限界値（ブレイクポイント）は、CLSI のガイドライン及び既報 (J Antimicrob Chemother. 53: 266-270, 2004.) に基づいた。

（３）セファゾリン耐性大腸菌の性状解析：健康な家畜から分離された CEZ (MIC $\geq$ 32) 耐性大腸菌を供試した。遺伝子型は、系統分類とパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いて分析した。系統分類は、Clermont らのマルチプレックス PCR により行った。PFGE は、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拠して行った。

（４）ESBL の同定：CHROMagar ESBL medium 上に発育した ESBL 産生大腸菌が疑われた菌株は、BD Phoenix system (日本ベクトン・ディッキンソン、東京) によって菌種同定を実施し、さらに Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が推奨する ESBL 確認試験で表現型の確認試験を行った。ESBL の確認が陽性となった *E. coli* は、定法に従って PCR 法で各菌株が保有する ESBL をコードする遺伝子をサブグループに分類した。サブグループに分けられた ESBL をコードする遺伝子は、構造遺伝子の塩基配列を決定し、保有する

ESBL をコードする遺伝子の特定を試みた。

（５）MLST による *E. coli* の解析：定法に従って MLST の型別を実施した。具体的には、*E. coli* MLST web site (<http://www.mlst.net/>) が定める 7 遺伝子のプライマーを用いて増幅した DNA 産物の塩基配列を同 site のツールを用いて解析した。

（６）薬剤耐性 *Salmonella* Typhimurium T000240 株の全ゲノム解読と complete 配列の確定：T000240 株のゲノム DNA からイルミナ解読用の DNA ライブラリー（平均 500 bp インサート長）を作製し解読した。最終的なアノテーションは NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/pipeline.html>) にて行った。ゲノム配列の図示化等は IMC-GE ソフト (インシリコバイオロジー) を用いた。ゲノム・アイランド (Genomic island: GI) のペアワイズアライメントは、blastn 相同性検索結果を ACT プログラムにて図示化した。

## 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) 2010 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、Typhimurium (43株) が優勢で、次いで Infantis (11株)、Agona (8株) の順であった。

牛由来株では、DSM (92%) に対する耐性株が最も多く、次いで OTC (3%)、ABPC (26%)、KM (21%) の順

であった。豚由来株では、全株がDSMに耐性を示し、OTC (73%)、ABPC (41%)、KM (27%)、CP (23%) 及びTMP (23%) に対する耐性が20%以上に認められた。鶏由来株では、DSM (78%) に対する耐性が最も多く、KM (28%) 及びOTC (25%) に対する耐性が20%以上で認められた。全畜種で、ERFX耐性は認められず、CEZ耐性は、鶏由来Infantis (1株) で認められ、CMY-2型産生株であった。

## 2) 食品由来 :

2010年7月から11月にかけて、埼玉県内の市場等で食肉、食鳥肉、内臓肉及び漬物、計76検体を購入しその結果、サルモネラは鶏挽肉(国産及び輸入)7検体から検出された。検出されたサルモネラの血清型及び薬剤感受性は、*S. Schwarzengrund* がSM・TC・KM耐性、*S. Manhattan* がNA耐性、*S. Infantis* はTC耐性、SM・TC・SXT耐性、SM・TC・KM・SXT耐性がそれぞれ1株ずつ、TC・KM・SXT耐性が2株であった。

大阪市内の食肉調査では、400検体中91検体(22.8%)から106株のサルモネラが分離された。これらのうち105株は国産鶏肉より分離され、1株のみが国産豚肉由来であった。分離された106株の血清型は、*S. Infantis* が65株と最も多く、次いで*S. Schwarzengrund* 25株、*S. Manhattan* 12株が多い血清型であった。供試した106株のうち103株(97.2%)が1剤以上の薬剤に耐性で、そのうち鶏肉由来17株(16.2%)がCPDX耐性菌であった。NA耐性は鶏肉由来21株(20.0%)に認められた。CPDX耐性率は2008年が15.3%、2009年は26.0%、2010年は24.6%で

あった。NA耐性率は2008年11.8%、2009年13.5%、2010年は24.6%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2010年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などから分離されたサルモネラ137株の血清型は39型別で、最も多く分離されたのは、*S. Enteritidis*が40株、次いで*S. Thompson*が9株、*S. Infantis*と*S. Braenderup*が7株の順であった。この137株のうち50株(36.5%)が16薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された*S. Enteritidis*では40株のうち26株(65.0%)が耐性を示し、SM単剤耐性が18株と最も多かった。4剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性株が10株分離され、そのうち第3世代セフェム系薬剤であるCTXに対する耐性菌が3株{*S. Enteritidis*、*S. Heidelberg*、04 UT(04:i:-)}分離された。CPDX耐性の*S. Infantis*が保菌者由来株で2株あり、鶏肉由来株との比較が必要であると考えられた。フルオロキノロン耐性株は検出されなかった。

## II. カンピロバクターの疫学

### 1) 2010年健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクター

昨年度と比較して、*C. jejuni*、*C. coli*に対して全ての薬剤で耐性率の有意な変動は認められなかった。

### 2) 国産肉由来菌株 :

2010年7月から11月にかけて、埼玉県内の市場等で購入した牛レバー15検体及び食鳥肉10検体を対象とした検査でカンピロバクターは牛

レバー2 検体、鶏挽肉（国産及び輸入）8 検体から検出された。分離されたカンピロバクターはすべて *C. jejuni* であり、その薬剤感受性は、牛レバー（2 検体）由来株が TC 耐性、鶏挽肉（1 検体）由来株が NFLX・OFLX、CPFX・NA・TC であった。残りの鶏挽肉（1 検体）由来株は感受性であった。

大阪の国産鶏肉 171 検体中 102 検体（59.6%）からカンピロバクターが分離され、*C. jejuni* は 100 株、*C. coli* は 2 株であった。*C. jejuni* では 36 株（36.0%）、*C. coli* では 2 株すべてがフルオロキノロン耐性であった。

### 3) 患者由来株：

2009 年分離株のフルオロキノロン耐性率は *C. jejuni* で 33.3%（156 株中 52 株）、*C. coli* では 77.8%（9 株中 7 株）あり、過去 9 年間と比較して耐性率は、ほぼ横ばいであった。EM に対する耐性菌出現状況では、2009 年分離株の耐性率は、*C. jejuni* で 1.9%（156 株中 3 株）、*C. coli* で 44.4%（9 株中 4 株）であった。2000 年から EM 耐性率の推移をみると、*C. jejuni* は 0.5%～数%で横ばいであったが、*C. coli* の耐性率は年々増加している傾向が認められた。

### III. 腸管出血性大腸菌の解析

埼玉県内で 2010 年に分離された 110 株で最も多く分離された血清型は、O157:H7（VT1&2 産生）が 55 株、次いで O157:H7（VT2 産生）が 21 株、O121:H19（VT2 産生）が 10 株の順であった。耐性であったのは 29 株（26.4%）であった。最も多かった耐性は SM・TC・ABPC・Su 耐性で 8 株が

該当し、次いで TC 耐性と SM・TC・Su 耐性がそれぞれ 4 株ずつ分離された。

### IV. MRSA の検出

#### 1) 食品分離株

食品 5,435 検体中黄色ブドウ球菌が検出されたのは 774 検体（14.2%）で、そのうち MRSA は 7 株（0.13%）であった。MRSA が検出された食品は、鶏肉、豚肉、牛内臓肉、車えび、アナゴ、焼鮭、酢の物であり、鶏肉と豚肉、車えび、アナゴおよび酢の物はそれぞれ同一店から収去したものであった。

一方、糞便検体では 7,443 検体中 931 検体（12.5%）から黄色ブドウ球菌が検出され、このうち MRSA は 26 株（0.35%）であった。

### V. 遺伝学的解析

#### 1) 各種材料から分離された *E. coli* が保有する ESBL をコードする遺伝子の種類

検出された ESBL は全て CTX-M-型に属する  $\beta$ ラクタマーゼであった。患者、ブロイラーおよび鶏肉において主要な ESBL は、それぞれ CTX-M-9 グループ（69.6%）、CTX-M-1 グループ（72.7%）および CTX-M-2 グループ（58.3%）であった。

#### 2) 各種材料から分離された ESBL をコードする遺伝子保有 *E. coli* の Sequence Type

患者由来株の 39 株（69.6%）は ST131 との関係性を認めた。そのうちの 72% は *bla*<sub>CTX-M-9</sub> 陽性であった。一方、健康なブロイラーおよび鶏肉から分離された *E. coli* で ST131 と関連性を認めた菌株は、それぞれ 3 株（27.2%）



および1株 (8.3%) であった。

### 3) セファゾリン耐性大腸菌の性状解析

健康な家畜から分離されたCEZ耐性大腸菌のPFGE型は、分離された動物種に関係なく多様であった。系統型は、ブロイラーでA型、B1型及びD型がほぼ均等に分布し、採卵鶏ではD型が50%であった。CEZ耐性株ではB2型は認められなかった。β-ラクタマーゼ型では、CMY-2が68株 (57%) と最も多かった。CMY-2産生大腸菌62株のうち46株が接合伝達株であった。PCRによりレプリコン型を調べた結果、I1 (19株、41%)、A/C (13株、28%)、B/O (10株、22%) の順であった。

### 4) NDM-1 産生菌

研究班内で共通の NDM-1 産生菌スクリーニング用薬剤 (CPFX, AMK, IPM, MEPM) を選び、分離菌株についてスクリーニング試験を実施した。今回は2009年に分離された大腸菌、および2010年分離の大腸菌、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の合計 1,119株についてスクリーニング試験を実施した結果、NDM-1 産生菌を疑う菌は検出されなかった。

### 5) 大腸菌のキノロン耐性: QRDR 変異と FQ 感受性との関係

QRDR {*gyrA*(S83 と D87)、*parC*(S80 と E84)} に 2~3 箇所の変異を持つ株の ERFX の MIC は 16~64 μg/mL、4 箇所の変異を持つ株は 32~256 μg/mL と高い傾向であった。

## VI. セフェム系薬剤に耐性を示す

## *Salmonella* Typhimurium の遺伝解析

サルモネラのセフェム系薬剤に耐性を示す *bla*<sub>CMY-2</sub> 遺伝子は一般にプラスミド上に存在するものが多いが、染色体上に存在する場合があることを、遺伝学的解析法を用いて示した。また、L-3553 という株では *bla*<sub>TEM-1</sub> が染色体とプラスミドの両方に存在することも示した。*Bla* 遺伝子の存在には多様性があることになる。

## VII. 全ゲノム解析: 薬剤耐性 *Salmonella* Typhimurium T000240 株の全ゲノム解読と complete 配列の確定

DT104 株とは異なる系統のフルオロキノロン耐性の多剤耐性株 T000240 株 (耐性プロファイル: ASTCpCSxTmGNSu) の全ゲノム配列を、イルミナ解読リードから *de novo* assembly により解明した。全ゲノム配列から得られた SNVs 系統樹解析結果では、T000240 株は1940年に分離された Typhimurium 代表株である LT2 株と非常に近縁であることが分かり、LT2 類縁株が再び蔓延していることを示唆していた。

IS1 と酷似した IS 配列が染色体上に8カ所散在しており、その1カ所を起点に外来配列 (約 82 kb) が挿入しており、それをゲノム・アイランド GI-DT12 と命名した。ここに Class 1 integron (*intI1*, *dfrA1*, *aadA1*, *qacED1*, *sulI*; *intI1*, *bla*-OXA30, *aadA1*, *qacED1*, *sulI*) と称される薬剤耐性アイランドが存在し、その近傍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。ここは *S. Typhimurium* のプラスミド pUO-StVR2 と非常に酷似した遺伝子

構造をしており、元来プラスミド由来の配列が染色体に挿入したと考えられた。さらに、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、薬剤耐性以外の外来遺伝子群も同定した。この領域は、起源となるバクテリアが不明のプラスミド pRSB107 と酷似していた。この pRSB107 は、下水処理場の活性汚泥から分離された菌がもっていたプラスミドであり、汚泥中の細菌が代謝する重金属関連因子を何らかの方法で外来性に獲得した経緯が伺える。このゲノム解析から、*Salmonella* Typhimurium T000240 株は多様な遺伝子の獲得を繰り返し、進化してきたことが分かる。

#### D. 考察

近年、健康なブロイラーから分離される大腸菌において、セファロスポリン耐性の増加が顕著である。2000～2003 年では 3.8%であったが、2004～2007 年では 12.7%、2008～2009 年では 17.2%の大腸菌でセフトオフル耐性が認められている。これら大腸菌の遺伝型は多様性に富んでいることから、ひとつのクローンが拡散しているのではなく、遺伝型の異なる菌がセファロスポリン耐性遺伝子を獲得してきていることが考えられる。また、鶏、牛等から分離される大腸菌の遺伝型は A, B1, D 型であり、ヒトから主に分離される B2 型と異なる。動物由来の大腸菌はヒトの腸内で定着しにくく、ヒトの大腸菌はヒト間での移動を行っているのかもしれない。

CMY-2 産生株を用いて作出した接合伝達株の性状を調べたところ、国内のブロイラー由来大腸菌では 3 つ

の異なるタイプの不和合性群 (A/C, B/O 及び I1) のプラスミドが、セファゾリン耐性に関与していることが示された。このことは、耐性因子の拡散に関与したプラスミドは、異なる由来であることを示唆している。CMY-2 耐性遺伝子がどのようにして異なるプラスミドに存在するようになったのかは不明であるが、CMY-2 遺伝子が“動く遺伝子”であるトランスポゾンやインテグロンに存在することを考えると、それらの機構を通して異なるプラスミド間を伝播し、その伝達性プラスミドが異なる遺伝型の大腸菌に拡散していったことが推定される。そのような現象が実際に *in vivo* で起こっているのかの検証が求められる。現在、鶏の同じ腸管内におけるセファゾリン耐性の大腸菌およびサルモネラの分離を試みており、分離されればその解析により上記の検証に役立つデータが得られるものと思われる。

*S. Typhimurium* T000240 株のゲノム解読から、薬剤耐性アイランドの存在を明らかにした。特徴的な IS 配列を利用し、薬剤耐性アイランドに種々の耐性遺伝子群が挿入されてきた経緯が分かった。多剤耐性化の背景には今まで言われてきているインテグロンの関与が強いことがはっきりしてきた。それらの外来遺伝子がどこでどのように挿入されているのかの詳細を解明することが求められるが、おそらく動物の腸管内、自然環境のバイオフィーム等の菌のニッチェが関係しているのであろう。更なる動物由来、ヒト由来、あるいは環境由来の細菌の全ゲノム配列の解明により、耐性遺伝子のオリジンに対する情報が蓄積することが期待される。

2009年～2010年に分離された大腸菌，サルモネラおよび腸管出血性大腸菌の合計 1,119 株について NDM-1 産生菌のスクリーニング試験を実施した結果，NDM-1 産生菌を疑う菌株は検出されなかった。今後、我が国で NDM-1 産生菌がどのような経過をたどるのかについては継続して注視する必要がある。

2009年に分離された下痢症患者由来 *C. jejuni* のキノロン剤耐性率は 33.3%であり，例年と同様の耐性率であった。一方，*C. coli* の耐性率は 77.8%であり，*C. jejuni* より耐性率が高い傾向が認められた。EM については，*C. jejuni* では 1.9%であり，ほとんど耐性菌は出現していないが，*C. coli* では，近年耐性率が増加傾向であることが明らかになった。*C. jejuni* のキノロン剤耐性率が近年横ばいである理由は不明であるが、抗菌薬の使用状況との関連性に関してさらなる調査が必要である。

#### E. 結論

家畜から分離された大腸菌やサルモネラに、医療上重要なセファロスポリン耐性菌の割合が増加している。耐性動向を継続的にモニタリングするとともに、耐性因子の伝播も考慮して情報蓄積する必要がある。

フルオロキノロン高度耐性の多剤耐性 Typhimurium T000240 株 (DT12) の全ゲノム配列を確定し薬剤耐性 Class I integron に多くの耐性遺伝子が蓄積していることが明らかになった。多剤耐性化のメカニズムを示唆した。

2009年に分離された下痢症患者由来 *C. jejuni* のキノロン剤耐性率は 33.3%であり，例年と同様の耐性率で

あった。EM 耐性の *C. jejuni* は 1.9%であり，ほとんど耐性菌は出現していないが，*C. coli* では，近年耐性率が増加傾向であった。

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. M. Morita, N. Takai, J. Terajima, H. Watanabe, M. Kurokawa, H. Sagara, K. Ohnishi, and H. Izumiya: Plasmid-mediated resistance to cephalosporins in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (9), 3991-3992, 2010.
2. H. Izumiya, T. Sekizuka, H. Nakaya, M. Taguchi, A. Oguchi, N. Ichikawa, R. Nishiko, S. Yamazaki, N. Fujita, H. Watanabe, M. Ohnishi, and M. Kuroda: Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob.*

- Agents Chemother. 55(2), 623-630, 2011.
3. Usui, M., Uchiyama, M., Baba, K., Nagai, H., Yamamoto, Y., Asai, T. Contribution of enhanced efflux to reduced Susceptibilities of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis to fluoroquinolone and other Antimicrobials. J Vet Med Sci. (in press)
  4. Asai, T., Sato, C., Masani, K., Masaru Usui, Ozawa, M., Ogino, T., Aoki, H., Sawada, T., Izumiya, H., Watanabe, H. 2010. Epidemiology of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolates from Food-Producing Animals in Japan. Gut Pathog. 2:17
  5. Baba, K., Ishihara, K., Ozawa, M., Tamura, Y., Asai, T. 2010. Isolation of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. Int. J. Antimicrob. Agents 36: 352-354.
  6. Sugawara, M., Komori, J., Kawakami, M., Izumiya, H., Watanabe, H., Akiba, M. Molecular and phenotypic characteristics of CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 345-9, 2011.
  7. Kanako Ishihara, Natsumi Shimokubo, Akie Sakagami, Hiroshi Ueno, Yasukazu Muramatsu, Tsuyoshi Kadosawa, Chie Yanagisawa, Hideaki Hanaki, Chie Nakajima, Yasuhiko Suzuki, Yutaka Tamura: Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital, Appl. Environ. Microbiol., 76(15), 5165-5174, 2010.
  8. Toyotaka Sato, Shin-ichi Yokota, Torahiko Okubo, Tamaki Okabayashi, Kanako Ishihara, Hiroshi Ueno, Yasukazu Muramatsu, Nobuhiro Fujii, Yutaka Tamura: High-level fluoroquinolone resistant are mediated by efflux pump of AcrAB-TolC and related to cephalosporine resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and humans, (投稿中)
  9. 酒見蓉子, 御困雅昭, 篠田浩二郎, 村松康和, 上野弘志, 田村 豊: 北海道石狩地域における牛乳房炎由来 *Escherichia coli* および *Klebsiella* 属菌の薬剤感受性, 日本獣医師会雑誌 63(3), 215-218, 2010.
- (2) 口頭発表
1. 下島優香子, 井田美樹, 猪股光司, 樋口容子, 田端麻里, 河村真保, 畠山薫, 仲真晶子, 甲斐明美: 食肉からの基質特異性拡張型  $\beta$ ラクタマーゼ産生大腸菌の検出, 第31回日本食品微生物学会学術総

- 会, 2010年11月, 滋賀
2. 小西典子, 尾畑浩魅, 齊木大, 上原さとみ, 新井輝義, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美: 食品および糞便から分離されたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌について, 第31回日本食品微生物学会学術総会, 2010年11月, 滋賀
  3. 田口真澄、河原隆二、勢戸和子: 海外旅行者下痢症患者から分離したサルモネラのプラスミド性キノロン耐性、第84回日本感染症学会総会、2010年4月、京都
  4. 田口真澄: 食肉のカンピロバクター汚染実態とイムノクロマト法による検出、第3回日本カンピロバクター研究会、2010年12月、宮崎
  5. 佐藤豊孝, 横田伸一, 大久保寅彦, 石原加奈子, 岡林環樹, 藤井暢弘, 田村 豊: 人および犬由来大腸菌のフルオロキノロン高度耐性とセフェム耐性における Efflux pump の関与, 第78回日本細菌学会北海道支部総会, 2010年9月3日, 北海道
  6. 大久保寅彦, 佐藤豊孝, 石井良和, 石原加奈子, 田村 豊: 犬由来フルオロキノロン-セファロsporin多剤耐性大腸菌の系統発生分類による解析, 第78回日本細菌学会北海道支部総会, 2010年9月3日, 北海道
  7. 佐藤豊孝, 横田伸一, 大久保寅彦, 石原加奈子, 岡林環樹, 藤井暢弘, 田村 豊: 人および犬由来大腸菌のフルオロキノロン高度耐性とセフェム耐性における Efflux pump の関与, 第150回日本獣医学会学術集会, 2010年9月10日, 北海道.
  8. 大久保寅彦, 佐藤豊孝, 石原加奈子, 石井良和, 田村 豊: 犬および人由来セファロsporin耐性大腸菌における耐性因子の比較, 第150回日本獣医学会学術集会, 2010年9月10日, 北海道.

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

2009 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 6,700 名であった。このうち、23%にあたる 1,518 名がサルモネラによるものであった。サルモネラ食中毒は 1990 年代と比較して減少しているが、上記データはいまなお本菌が公衆衛生上の重要な位置を占めていることを示している。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。
4. ファージ型別：英国 Health Protection Agency から供与された型別用ファージセットならびにスキームを使用して実施した。
5. リアルタイム MAMA-PCR による SNP 解析：PFGE 型、ファージ型、薬剤耐性パターンなどの特徴を基に選択した SE11 株を次世代シー

クエンサー・イルミナにより解析し、共通なコアゲノムの比較から single nucleotide polymorphism (SNP) 232 箇所を得た。そこから 40 箇所を代表として選択した。各箇所の SNP アリルが2種類(例：AかT、GかCなど)であったことから、PCRによる mismatch amplification mutation assay (MAMA) が可能となるようにプライマーを設計した。どちらのアリルであるかは SYBR Green を使用したリアルタイム PCR で判定を行った。得られた SNP を一つの疑似配列として UPGMA による系統解析を行った。

## 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。近年、感受性株の割合は 80% 前後を推移している。NA 耐性株は 5-10% を推移している (図 1)。

2. *Salmonella* Manhattan の PFGE 型別：鶏肉から分離されるサルモネラとしては SI が多いが、最近 *S. Manhattan* も分離されるようになってきている(他の研究分担者の項目を参照)。そこで、これらの株を収集し、PFGE の有用性を検討した。(図 2)。供試菌株は散发事例由来 4 株、鶏肉由来 18 株であった。これらの由来に特段の共通性はないにもかかわらず、PFGE はほぼ同じか類似のパターンを示した。

3. リアルタイム MAMA-PCR による SNP 解析：SE11 株のイルミナ解読リード比較解析から SE コアゲノム SNP が 232 箇所同定された。

ここから代表的な 40 箇所を選択し、MAMA-PCR 用のプライマーを設計した。各アレルの判定は SYBR Green を用いたリアルタイム PCR によって、PCR 産物の増幅効率の違いに基づいて行った (図 3)。得られたアレルを一つの疑似配列と見做して系統解析を行った。1970 年代の古い株、欧州からの株を含めた 48 株を解析に供した (図 4)。全体的な傾向としては SNP232 箇所による結果と同様であった。すなわち、SNP で作られたグループは MAMA-PCR によっても同じグループに含まれた。また、SNP 解析にも供した NA 耐性株を含め、他のブラジル産鶏肉由来の NA 耐性株も同じグループに含まれた。SM 耐性株はまた別のグループを形成した。一方で、1970 年代の古い株や欧州の株は、本系では同じグループになり、互いを分離できなかった。

#### 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。今年度実施した複数遺伝子座を用いたリアルタイム MAMA-PCR 法は、SE を、コアゲノムからの SNP 解析と同様に解析できることが示唆された。今回本法で分解能が悪かった株についてイルミナで解読し、これらにも対応した SNP を抽出していけば、本法の精度の向上が期待される。また、S. Manhattan の PFGE 解析でも示唆されたようにサルモネラでは PFGE が必ずしも有効ではないので、種々の分子疫学マーカーの検討・開発が必要があることが示された。

#### E. 研究発表等

- (1) M. Morita, N. Takai, J. Terajima, H. Watanabe, M. Kurokawa, H. Sagara, K. Ohnishi, and H. Izumiya: Plasmid-mediated resistance to cephalosporins in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (9), 3991-3992, 2010.
- (2) H. Izumiya, T. Sekizuka, H. Nakaya, M. Taguchi, A. Oguchi, N. Ichikawa, R. Nishiko, S. Yamazaki, N. Fujita, H. Watanabe, M. Ohnishi, and M. Kuroda: Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2), 623-630, 2011.

#### 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。



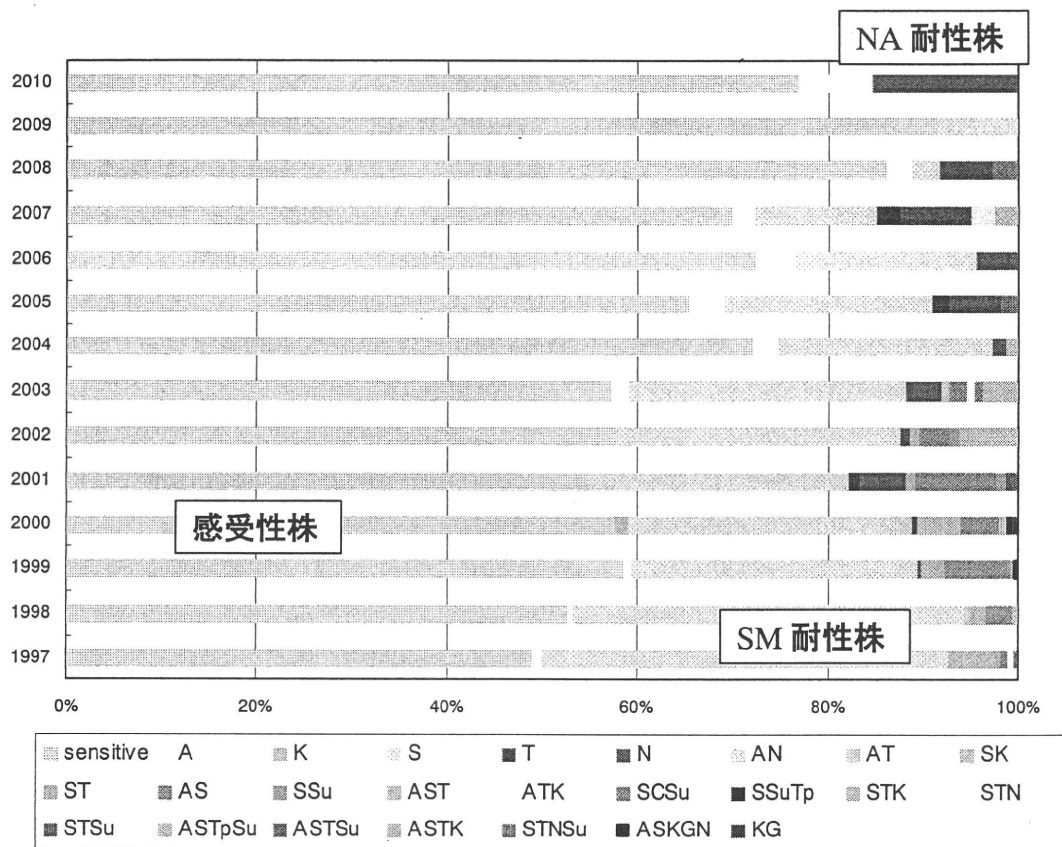


図 1. SE 集団事例関連株薬剤耐性パターンの推移 (1997-2010 : 2011 年 1 月現在)。

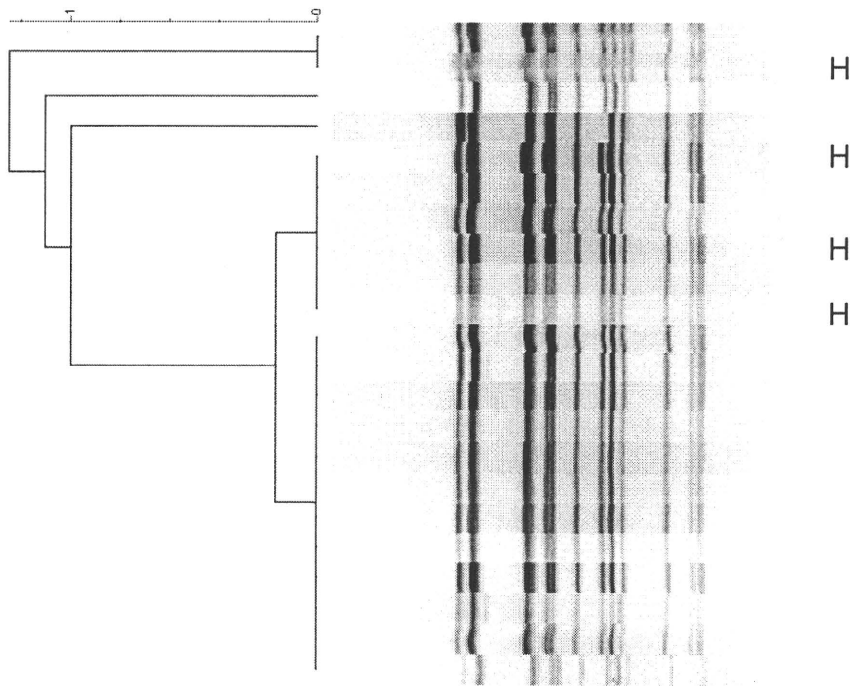


図 2. *S. Manhattan* の PFGE 解析。使用制限酵素は *Xba*I。解析条件：UPGMA、トレランス 1.2%。上の数字は異なるバンドの本数を表す（計算上のもの）。右にある H は散発事例由来であることを示す。

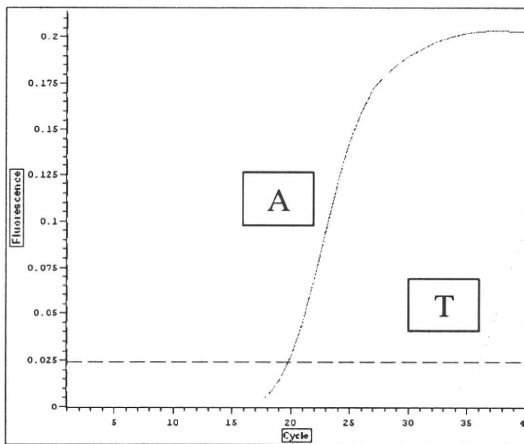


図 3. リアルタイム MAMA-PCR によるアリル検出例。図の場合、当該アリルは A となる。

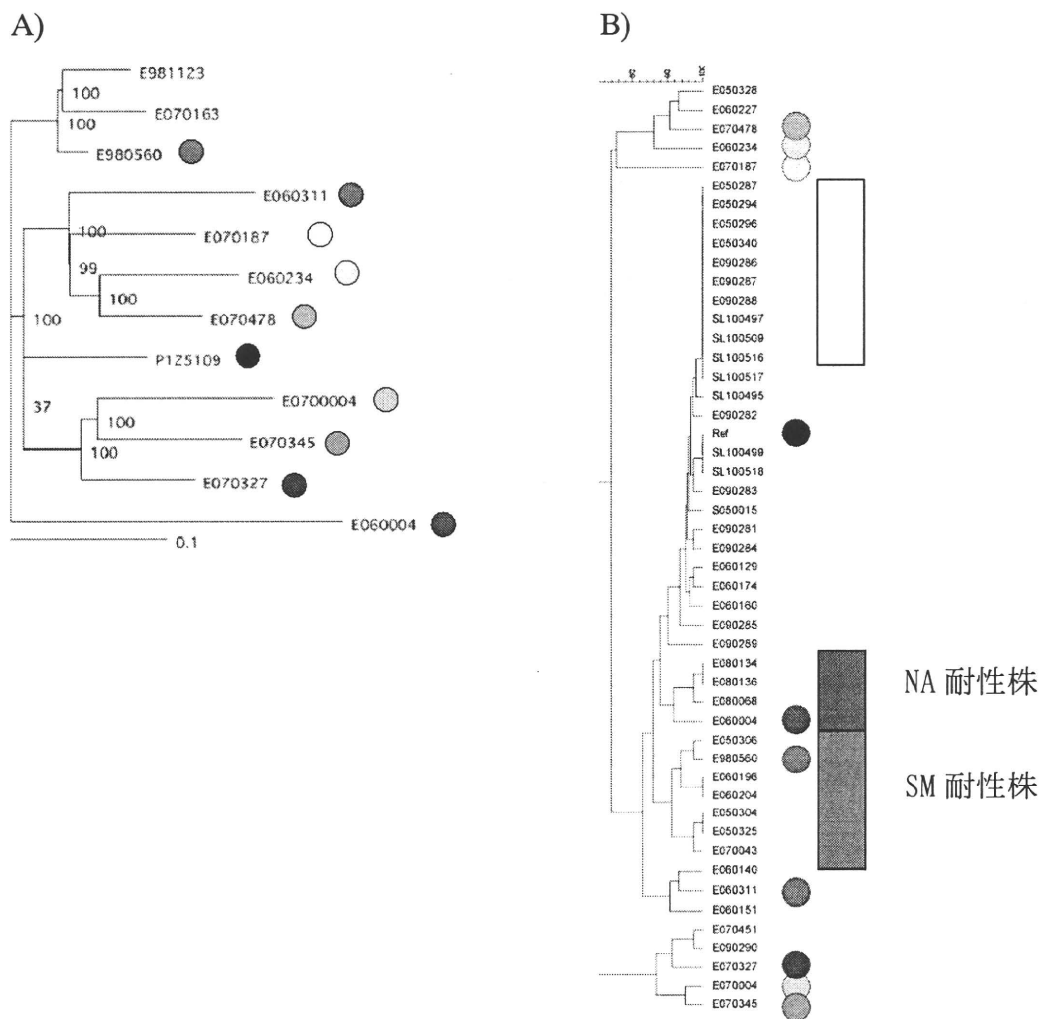


図4. (A) コアゲノム 232 箇所からの系統樹。(B) MAMA-PCR からの 40 箇所のアレルによる系統樹。左右同じ色の丸が付してあるのは同じ株である。(B) 中央から下部にあるバーはそれぞれ NA 耐性株、SM 耐性株のグループを表す。上部にあるバーは古い株および欧州の株が占めるグループを示す。

平成 22 年度厚生労働省 食品・安全確保研究事業 分担研究報告書

課題名：「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」

分担研究報告書

分担課題名：食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究

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
研究協力者	砂押克彦	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近真理奈	埼玉県衛生研究所
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター
研究協力者	土井りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

## 研究要旨

近年、ヒトに関係する感染症細菌の中でも最も身近な存在である食中毒細菌において、従来有効であった治療薬剤に抵抗を示す耐性菌の出現や増加が問題となっている。そこで、ヒト、食品および伴侶動物等から分離される食中毒菌、特にサルモネラ及び腸管出血性大腸菌などを対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。

埼玉県内で 2010 年に分離され、供試したヒト（散発下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 137 株で 39 血清型に型別された。薬剤耐性では 50 株（36.5%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示した。三世代セフェム系薬剤である CTX に対する耐性株が 3 株分離された。また、動物由来株として、伴侶動物のイヌ 121 頭、ネコ 57 頭および野生アライグマ 288 頭の検査を行い、アライグマ 5 頭からサルモネラが分離されたが、分離株はすべて感受性であった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 110 株が分離され、薬剤感受性試験では、110 株中 29 株（26.4%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示したが、フルオロキノロン剤や第三世代セフェム系薬剤に対する耐性株は分離されなかった。

赤痢菌では、インド渡航歴のある患者からフルオロキノロン耐性株が 1 株分離され、その血清型は *S. sonnei* であった。

食品の汚染実態調査では、76 検体中 7 検体（9.2%）からサルモネラ 8 株が、カンピロバクターは 25 検体中 10 検体（40.0%）から 10 株が分離され、腸管出血性大腸菌と MRSA は分離されなかった。薬剤感受性ではサルモネラは分離株すべてが、カンピロバクターでは 10 株中 3 株が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。フルオロキノロン耐性株がカンピロバクターで 1 株分離された。

食鳥肉のフキトリ調査では、46 検体中 1 検体（2.2%）からサルモネラ 1 株が、カン