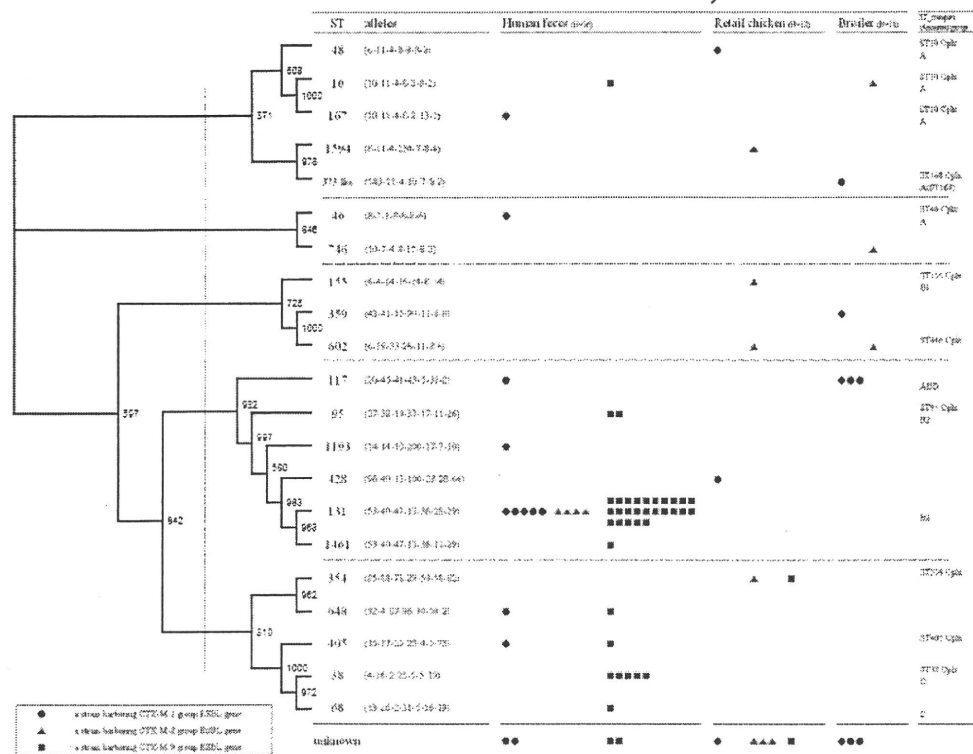


### 各種材料から分離された *E. coli* の ST 型と ESBL 遺伝子型一覧



3. 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、健康なプ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。

#### D. 考察

当初、家畜が保有する ESBL 産生 *E. coli* が処理過程で食材を汚染し、その食材あるいは調理器具を介してヒトが ESBL 産生 *E. coli* に感染しているのではないかと考えていた。しかし、本年度までの検討から、それらの間には直接的な因果関係が認められなかった。すなわち、患者、プロイラー、鶏肉から分離される *E. coli* の主要な遺伝

子型および *E. coli* が産生する主要 ESBL の型には明らかな違いを認めた。この結果は、動物種によって定着する *E. coli* の遺伝子型が異なるというこれまでの報告に合致するものである。

しかし、ヒトに対する定着能が低いプロイラー由来の *E. coli* からヒトへの定着能が高い株あるいは高病原性株に耐性因子をコードする遺伝子の水平伝播が起こっている可能性が否定できない。したがって、患者、プロイラー、鶏肉から分離される *E. coli* のゲノム解析を実施し、プラスミドおよび *E. coli* 染色体の差異について検討する必要がある。その上で、家畜および食材が耐性菌に汚染されることに対するインパクトを検証しなければならないと考えている。

#### E. 結論

患者、ブロイラーおよび鶏肉から CTX-M-型 ESBL 産生 *E. coli* が分離された。しかし、患者由来 *E. coli* が産生する ESBL はブロイラーの糞便および鶏肉から分離された ESBL の型とは異なっていた。さらに、患者から分離された *E. coli* は、ブロイラーの糞便および鶏肉を汚染する菌株とは遺伝学的に異なっていた。すなわち、患者由来 ESBL 産生 *E. coli* が食品を介して感染したと結論付けることは困難であ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

なし

平成22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：家畜由来腸内細菌の疫学的研究

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）  
研究協力者：白井 優（農林水産省動物医薬品検査所）  
研究協力者：比企基高（農林水産省動物医薬品検査所）

研究要旨

食用動物における薬剤耐性食中毒菌のモニタリングを目的に、家畜衛生分野における薬剤耐性菌実態調査システム（JVARM）で収集したサルモネラ及びカンピロバクターの薬剤耐性についての全国動向を調査した。サルモネラでは、医療上重要な成分であるフルオロキノロンに対する耐性は認められなかった。また、セファロスポリン耐性は、鶏由来 *Infantis*（1株）で認められ、CMY-2型産生株であった。カンピロバクターでは、フルオロキノロンに対する耐性は、*C. jejuni*で24%、*C. coli*で41%に認められた。また、エリスロマイシン耐性は、*C. coli*で37%に認められたが、*C. jejuni*では認められなかった。

健康なブロイラー鶏由来セファロスポリン耐性大腸菌の遺伝子型と耐性因子の性状を解析した。β-ラクタマーゼ型は、CMY-2優勢で、ESBL産生株も認められた。また、遺伝子型の解析により、CEZ耐性率の増加が特定のCEZ耐性大腸菌株が拡散したのではないことが示唆された。

A. 研究目的

食用動物に抗菌性物質が使用される中で出現した薬剤耐性菌もしくは耐性遺伝子が、食品を介してヒトの健康へ悪影響をもたらす可能性とその程度を科学的に評価するため、フードチェーンにおけるモニタリングの重要性が国際的に認識されている。これまで、食中毒菌としてサルモネラとカンピロバクターに注目して、家畜由来株の薬剤耐性動向の把握及び耐性菌の疫学的解析を行ってきた。フードチェーンの各段階で分離される食中毒菌が類似していることを示唆してきたが、

家畜由来を含む各段階で分離される株間の本質的な関連性の解明には至っていない。

本研究では、家畜衛生分野における薬剤耐性菌実態調査システム（JVARM）により、全国から収集された家畜由来のサルモネラ及びカンピロバクターの薬剤耐性についての全国動向を解析した。また、人の医療において重要な薬剤である第三代セファロスポリンに耐性を示す大腸菌の性状解析を行った。

B. 研究方法

(1)サルモネラの薬剤感受性：

2009 年度に全国の家畜保健衛生所で病性鑑定材料から分離された 143 株（牛由来 84 株、豚由来 23 株、鶏由来 36 株）を用いた。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。

(2)供試カンピロバクター株：

薬剤感受性動向のとりまとめは、2009 年度に全国の家畜保健衛生所で健康な家畜の糞便から分離したカンピロバクター 233 株（牛由来 51 株、豚 62 株、採卵鶏 56 株、肉用鶏 64 株）を用いた。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。供試薬剤は、ABPC、DSM、GM、OTC、CP、エリスロマイシン（EM）、NA、ERFX の 8 薬剤である。各薬剤の耐性限界値（ブレイクポイント）は、既報（J. Appl. Microbiol. 100: 153-160, 2006）に従い設定した。

(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 118 株（牛由来 3 株、豚由来 2 株、ブロイラー由来 97 株及び採卵鶏由来 16 株）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。

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、ABPC、CEZ、KM、GM、OTC、CL、CP、NA、ERFX、TMP の 11 薬剤を用いた。

$\beta$ -ラクタマーゼ型は、TEM、SHV、CMY 及び CTX-M を対象に PCR 法で調べた。PCR 産物の塩基配列は、ダイレクトシーケンスにより決定した。

ブロイラー由来 CMY-2 産生大腸菌 62 株を用いて混合培養法でプラスミド伝達試験を行った。作出したトランスコンジュガントを用いて、伝達したプラスミドの Inc 型を PCR 法で決定するとともに、微量液体希釈法により薬剤感受性を、ABPC、CEZ、KM、GM、テトラサイクリン（TC）、CL、CP、NA、シプロフロキサシン（CPFX）及び TMP を対象に調べた。

C. 研究結果

1. 2009 年度分離サルモネラの薬剤感受性（表 1, 2）

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 (33%)、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. 2009 年度分離カンピロバクターの薬剤感受性 (表 3)

*C. jejuni*では、OTC (38%) に対する耐性株が最も多く、次いで、NA (27%)、ERFX (24%) の順で、EM に対する耐性は認められなかった。*C. coli*では、OTC (79%) に対する耐性株が最も多く、次いで、DSM (51%)、NA (44%)、ERFX (41%)、EM (37%)、CP (24%) の順であった。その他の薬剤に対する耐性率は、20 未満であった。昨年度と比較して、全ての薬剤で耐性率の有意な変動は認められなかった。

## 3. セファゾリン耐性大腸菌の性状解析 (図 1、図 2、表 4、表 5)

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、プロイラーで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%) と最も多く、CTX-M-2 (5株)、CTX-M-14 (7株)、CTX-M-15 (1株) 及びCTX-M-25 (2株) などのESBL産生株も認められた。

CMY-2産生大腸菌62株を用いて混合培養法でプラスミド伝達試験を行ったところ、46株の接合伝達株が得られた。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

I/O (10株、22%) の順であった。

接合伝達株の薬剤感受性は、A/C型プラスミド保有株ではβ-ラクタム以外の薬剤に耐性を示したが、B/O型とI1型プラスミド保有株では1株を除いてβ-ラクタムのみ耐性を示した。

## D. 考察

近年、健康なプロイラーから分離される大腸菌において、セファロsporin耐性の増加が顕著である。2000~2003 年の期間全体では 3.8% であったが、2004~2007 年では 12.7%、ここ 2 年 (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。

今回の成績から、健康家畜由来 CEZ 耐性大腸菌の遺伝子型の解析では、遺伝子型の多様性が認められ、CEZ 耐性率の増加が特定の CEZ 耐性大腸菌株が拡散したのではないと考えられた。

CEZ 耐性大腸菌の保有するβ-ラクタマーゼ型を同定したところ、CMY-2 が優勢で、人の医療現場で問題となっているCTX-M 型β-ラクタマーゼを含むESBL産生株も分布することが明らかとなった。今年度は、CMY-2産生株を中心に解析を進めたが、CTX-M 型ESBL産生株についても、次年度の本課題で解析を進めていく予定である。

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、国内のプロイラーに3タイプ (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 (ルート) が存在していることを示唆している。薬剤耐性因子のコントロールについても視野に入れた対応が必要である。

また、A/C型は多剤耐性プラスミドであ

ることから、β-ラクタム以外の薬剤を使用したことで、耐性増加につながった可能性も考えられた。一方、B/O型とI1型の大部分は、β-ラクタム耐性のみであった。鶏ではペニシリン系抗菌薬が承認されているが、セファロスポリン系抗菌薬は承認されていない。米国やカナダでは大腸菌症の予防等のために卵内接種（適応外使用）されることがセファロスポリン耐性大腸菌の増加に関与している可能性が危惧されている。現在のところ、国内のブロイラーにおいてセファロスポリン耐性菌が増加している要因は不明であるが、耐性因子（プラスミド）の性状解析を継続すると共に抗菌性物質の使用状況との解析を行う予定である。

#### E. 結論

家畜から分離された大腸菌やサルモネラには、医療上重要なセファロスポリン耐性が分布している。耐性発現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を実施する必要がある。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

1. 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)

2. 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
3. Baba, K., Ishihara, K., Ozawa, M., Tamura, Y., Asai, T. 2010. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from swine in Japan. Int. J. Antimicrob. Agents 36: 352-354.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

※ JVARM事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

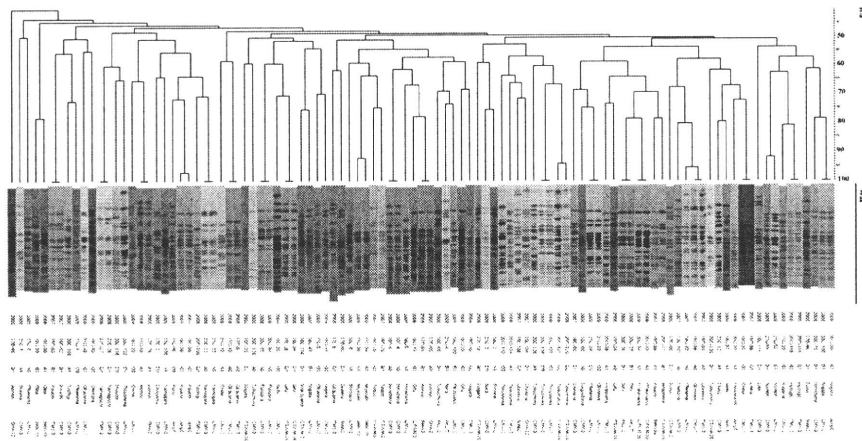


図1 2004～2009年度に分離されたセファロスポリン耐性大腸菌のPFGE像

図2 2004～2009年度に健康家畜から分離されたセファロスポリン耐性大腸菌(n=118)のβ-ラクタマーゼ型

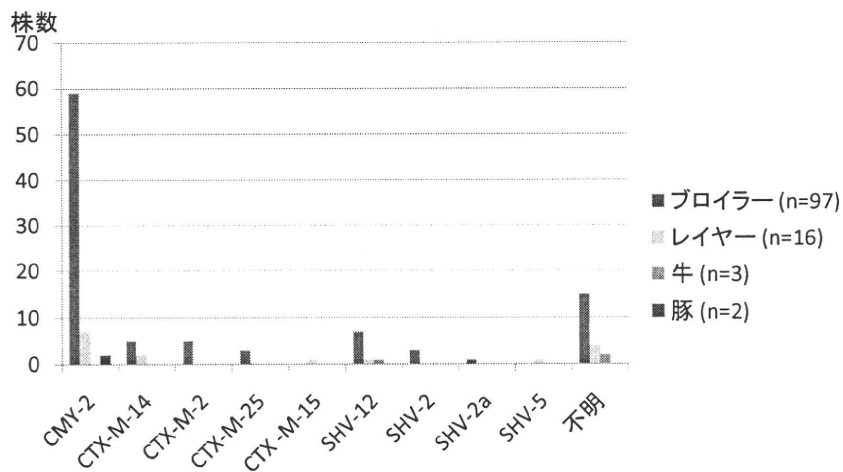


表1 2009 年に家畜から分離されたサルモネラの血清型

血清型	牛	豚	鶏	計
Typhimurium	35	7		43
Infantis	1	1	9	11
Agona	5	1	2	8
O4:d:-	8			8
Braenderup	2		5	7
Thompson	5		2	7
Choleraesuis		5		5
Derby	1	4		5
Enteritidis	2		3	5
Nagoya	2		3	5
Schwarzengrund			4	4
Mbandaka	3			3
London	1	1		2
Montevideo	2			2
その他血清型	17	3	8	28
計	84	22	36	143

表2 家畜由来サルモネラの薬剤耐性の分布 (2009 度)

薬剤	BP	牛 (n=84)			豚 (n=22)			鶏 (n=36)		
		MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)	耐性率(%)	MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)	耐性率(%)	MIC50 (mg/L)	MIC90 (mg/L)	耐性率(%)
ABPC	32	1	>512	26	2	>512	41	1	1	6
CEZ	32	1	4	0	2	4	0	1	2	3
GM	16	2	2	0	1	32	18	2	2	0
KM	64	4	>512	21	4	>512	27	4	>512	28
DSM	32	32	>512	92	>512	>512	100	32	128	78
OTC	16	2	256	33	256	512	73	1	128	25
CP	32	8	8	2	8	256	27	8	8	0
CL	16	2	2	0	1	2	0	2	4	3
NA	32	4	4	1	4	512	14	4	16	3
ERFX	2	≤0.125	≤0.125	0	≤0.125	0.5	0	≤0.125	0.5	0
TMP	16	1	2	0	0.5	>512	27	0.5	>512	22



表3 家畜から分離されたカンピロバクターの薬剤感受性

薬剤	Species (Breakpoint)	2008 年度*				2009 年度*			
		MIC 50 (mg/L)	MIC 90 (mg/L)	耐性 株数	耐性率 (%)	MIC 50 (mg/L)	MIC 90 (mg/L)	耐性 株数	耐性率 (%)
ABPC	<i>C.jejuni</i> (32)	4	64	14	14.0	4	32	21	13.8
	<i>C.coli</i> (32)	4	16	5	8.8	8	8	14	17.3
DSM	<i>C.jejuni</i> (32)	1	2	0	0	1	2	4	2.6
	<i>C.coli</i> (32)	4	>512	27	47.4	64	>512	27	50.6
GM	<i>C.jejuni</i>	0.25	0.5			0.5	1		
	<i>C.coli</i>	0.5	2			1	2		
OTC	<i>C.jejuni</i> (16)	1	128	29	29.0	2	128	57	37.5
	<i>C.coli</i> (16)	128	512	45	78.9	128	512	64	79.0
CP	<i>C.jejuni</i> (16)	2	4	1	1.0	2	4	0	0
	<i>C.coli</i> (16)	4	32	14	24.6	4	32	19	23.5
EM	<i>C.jejuni</i> (32)	1	2	0	0	2	2	0	0
	<i>C.coli</i> (32)	8	>512	27	47.4	8	>512	30	37.0
NA	<i>C.jejuni</i> (32)	4	256	17	17.0	4	256	41	27.0
	<i>C.coli</i> (32)	8	256	22	38.6	16	128	36	44.4
ERFX	<i>C.jejuni</i> (2)	≤0.125	4	16	16.0	≤0.125	4	37	24.3
	<i>C.coli</i> (2)	≤0.125	8	20	35.1	≤0.125	8	33	40.7

\*2008 年度： *C. jejuni* 100 株、 *C. coli* 57 株、2009 年度： *C. jejuni* 152 株、 *C. coli* 81 株

表4 健康家畜から分離された CEZ 耐性大腸菌 118 株の系統分類

Phylogenetic type		No. of isolates (% of phylogenetic groups)									
group	subgroup	Beef cattle		Pigs		Broiler chickens		Layer chickens		Total	
A	A0	0	0.0	2	100.0	16	16.5	0	0.0	18	15.3
	A1	0	0.0	0	0.0	20	20.6	4	25.0	24	20.3
	subtotal	0	0.0	2	100.0	36	37.1	4	25.0	42	35.6
B1	B1	2	66.7	0	0.0	32	33.0	4	25.0	38	32.2
D	D1	1	33.3	0	0.0	8	8.2	7	43.8	16	13.6
	D2	0	0.0	0	0.0	21	21.6	1	6.3	22	18.6
	subtotal	1	33.3	0	0.0	29	29.9	8	50.0	38	32.2
Total		3	100	2	100	97	100	16	100	118	100

表5 ブロイラー由来 CMY-2 βラクタマーゼ産生株をドナーとして作出したトランスコンジュガントの薬剤感受性

Replicon type	Resistance pattern	株数
A/C	TC-CP-	7
	TC-ST-	3
	TC-CP-ST-	2
	GM-KM-TC-CP-	1
B/O	None	9
	TC-ST-	1
I	None	19
N	TC-	1
Others	None	3
Total		46

平成 22 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：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：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  
研究協力者：中馬猛久 鹿児島大学農学部

研究要旨

北海道の牛群において 2004 年以降、セフェム系抗菌剤に耐性を示す *Salmonella* Typhimurium が継続的に分離されている。本研究ではこれら菌株のセフェム系抗菌剤耐性を規定する *bla*<sub>CMY-2</sub> 遺伝子の存在様式を明らかにすることを目的として実験を行った。サザンブロット解析及び塩基配列解析の結果から、*bla*<sub>CMY-2</sub> は染色体上の薬剤耐性アイランド (125 kb) に存在することが明らかとなり、これを GI-Cluster VII-6 と命名した。本アイランドは計 11 の薬剤耐性遺伝子を含み、両端の IS26 を介して染色体に連結した複合トランスポゾンと考えられた。GI-Cluster VII-6 の塩基配列はトリメトプリム耐性を規定する *dfra12* 遺伝子を除き、全長に渡って大腸菌由来 IncA/C プラスミド、pAR060302 の配列と相同であり、類似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。また、本アイランドやプラスミド上の薬剤耐性遺伝子は北海道で分離された同じ PFGE 像を示す野外分離株に広く分布していることが明らかとなった。この地域に侵入、あるいは出現した新しいクローンが拡散したものと推察された。

A. 研究目的

家畜、家禽の生産現場における抗菌剤の使用が薬剤耐性菌の選択につながり、それが畜産物を介してヒト食中毒の原因となる可能性が指摘されている。特にヒトの治療に汎用される抗菌剤に対する耐性菌の出現はヒトの健康に重大な影響を及ぼす可能性があるため公衆衛生上、看過できない。本研究ではセフェム系抗菌剤に対する耐性菌に焦点を絞り、その耐性獲得機構を

解析し、行政施策立案のための基礎資料とすることを目的としている。今年度は昨年度に引き続き牛由来セフェム系抗菌剤耐性 *Salmonella* Typhimurium (ST) の解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

北海道の疫学的関連性のない牛からセフェム系抗菌剤に耐性を示す ST が 2004 年以降 26 株分離さ

れている。このうち表1に示す PFGE 型 Cluster VII-6 に属する 22 株を実験に供した。

## 2. 薬剤感受性試験

市販の薬剤感受性ディスクを用いて下記 14 薬剤に対する感受性を調べた。アンピシリン, AMP ; セファゾリン, CFZ ; セフトジジム, CAZ ; セフトキシム, CTX ; 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 ; スルファメチゾール, SUL ; ST 合剤, SXT。

## 3. サザンブロット解析

2004 年、2005 年、及び 2006 年に分離された L-3553、L-3607、及び L-3777 株に加えて ST LT2 株を用いてサザンブロット解析を行った。ホーミング酵素 I-CeuI、S1 ヌクレアーゼ、及び制限酵素 XbaI を用いて供試菌株のゲノム DNA を消化後、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行った。DNA をポジティブチャージメンブレンに転写後、ジゴキシゲニンラベルした各種プローブを用いて目的遺伝子の検出を試みた。

## 4. 塩基配列解析

L-3553 株の染色体上に存在する薬剤耐性アイランドの塩基配列は以下に示す方法で決定した。すなわち、大腸菌の薬剤耐性プラスミド pAR060302 (NC\_12692) の塩基配列を参考にして LA-PCR で増幅したフラグメントの塩基配列を決定した。ギャップは PCR ウォーキング等の手法で解析することで、両端が染色体の特定部位に連結する 1 つのコンティグを得た。コンティグの正確性は全ゲノム塩基配列解析データを用いた short-read マッピングにより確認した。L-3553 株の 130 kb プラスミド、pST3553 上に存在する薬剤耐性遺伝子は ST 由来プラスミド pU302L (AY333434) の塩基配列を参考にして PCR で増幅したフラグメントの塩基配

列を決定すると共に、short-read マッピングにより、その正確性を確認した。

## 5. 薬剤耐性アイランド及び薬剤耐性遺伝子の野外分離株における保有状況の解析

4 で得られた L-3553 株の配列をもとに薬剤耐性アイランドの PCR スキャンニング及び薬剤耐性を規定する遺伝子領域の構造を解析するための PCR マッピングの系を構築し、野外分離株におけるこれら遺伝子領域の保存性を確認した。

## C. 研究結果

### 1. 供試菌株の薬剤感受性

供試 22 株は AMP、CFZ、CAZ、CTX、KAN、STR、TET、CHL、SUL、SXT に耐性を示した。唯一の例外は L-3595 株で、上記 10 薬剤のうち、CHL に感受性を示した (表 1)。

### 2. $bla_{CMY-2}$ は染色体上のみ存在する

制限酵素 I-CeuI は ST 染色体上に 7 コピー存在する 23S rRNA 遺伝子の配列を認識して切断する。したがって、ST 染色体を本酵素で消化すると図 1A に示した 7 種の染色体由来制限断片を生ずる。23S rRNA 遺伝子の方向は一定でないので 23S rRNA 遺伝子を検出するプローブが I-CeuI サイトを挟んで 23S rRNA 遺伝子の 5' 側と 3' 側のどちらにハイブリダイズするかによって検出可能なフラグメントは異なる (図 1A)。本研究では 23S rRNA 遺伝子の 3' 側を標的とする 23S-2 プローブで検出される 2.5 Mb フラグメント上に  $bla_{CMY-2}$  及び  $flaR$  のシグナルが検出されたことから、両遺伝子が染色体上に存在することが示された。L-3553 株では  $bla_{TEM-1}$  も 2.5 Mb フラグメント上に存在することが示された (図 1b)。

S1 ヌクレアーゼはプラスミドを直鎖状に変化させる。これを PFGE で分離することにより、巨大プラスミドのサイズを正確に決定することができる。また、本法により通常の方法では分離できない巨

大プラスミドの検出も可能となる。本実験では130 kb プラスミド以外にプラスミドのバンドは確認できず、また、染色体由来断片以外に *bla<sub>CMY-2</sub>* 及び *floR* のシグナルを検出できなかった。したがって、これらの菌株では両遺伝子が染色体上にのみ存在すると考えられた。L-3553 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が示された (図 2)。

### 3. 薬剤耐性関連遺伝子の塩基配列

染色体上の薬剤耐性アイランドの全塩基配列を決定し、これを GI-Cluster VII-6 として DDBJ に登録した (AB571791)。GI-Cluster VII-6 の全長は 125,122 bp で、両端は IS26 を介して染色体の STM0869 と STM0870 相同遺伝子の間に連結していた。IS26 の染色体側には 8 bp のダイレクトリピート (CTCCACAA) が存在した。薬剤耐性を規定する遺伝子は 3 つの遺伝子領域 (耐性領域 1-3) に計 11 存在した。このうち耐性領域 1 は *dfrA12* 及び *aadA2* を含むクラス 1 インテグロンを構成していた (図 3)。サザンブロット解析の結果から染色体上に存在することが予想された L-3553 株の *bla<sub>TEM-1</sub>* は GI-Cluster VII-6 に含まれなかった。GI-Cluster VII-6 配列の塩基配列は *dfrA12* を除き、全長に渡って大腸菌由来 IncA/C プラスミド、pAR060302 の配列と相同であった (図 4)。

pST3553 上に存在する遺伝子として *aphA7*、*tetA* の他、*bla<sub>TEM-1</sub>* が 2 コピー存在することが明らかとなった。これらの遺伝子がプラスミド上に存在することは S1 ヌクレアーゼ消化後の PFGE-サザンブロット解析で確認した。これら 4 つのコンテイングを DDBJ に登録した (AB571792-5)。

### 4. サザンブロット解析による GI-Cluster VII-6 の挿入部位確認

3 で明らかにした GI-Cluster VII-6 の全塩基配列と ST LT2 株の全ゲノム塩基配列データ (NC\_003197) から予想された通り、XbaI-PFGE 後

のサザンブロット解析で L-3553\_1.021c 及び *bla<sub>CMY-2</sub>* (L-3553\_1.063c) のシグナルはそれぞれ 381 bp 及び 521 bp のフラグメント上に検出された (図 5a, 5b)。また、L-3553 株の染色体上に存在する *bla<sub>TEM-1</sub>* は染色体に由来する 140 kb フラグメント上に存在することが示された (図 5b)。

### 5. 野外分離株における GI-Cluster VII-6 及び薬剤耐性を規定する遺伝子領域の構造解析

PCR スキャンニング系 (図 6a) を構築して野外分離株における GI-Cluster VII-6 の保有状況を調べたところ、PFGE 型 Cluster VII-6 に属する 22 株中、3 株でそれぞれ 1 箇所の非増幅部位を、2 株でサイズの若干異なる増幅を認めたものの、GI-Cluster VII-6 が広く保存されていることが示唆された (図 6b)。

また、PCR マッピング系 (図 7a) を構築して同様に薬剤耐性を規定する遺伝子領域の構造を解析したところ、L-3595 株を除いて全ての領域で増幅が認められた。L-3595 株では *floR* の 5' 側と 3' 側の 2 箇所で非増幅部位を認め、この株が CHL 感受性である事実と相関していた (図 7b)。この株の *floR* 周辺の塩基配列を確認したところ、ダイレクトリピートを介した相同組換えにより、*floR* が脱落した可能性が示唆された。

### D. 考察

Tamamura et al. (Appl. Environ. Microbiol., 2011, *in press*) の詳細な疫学解析によれば、PFGE 型 Cluster VII は 2000 年以降、北海道において牛由来 ST に認められるようになった新しい遺伝子型であり、2009 年までに 165 株が分離されている。Cluster VII に属する ST の多くは CFZ 感受性であったが、2004 年以降、CFZ 耐性の株が出現し、これまでに 26 株が分離されている。26 株中 22 株は PFGE 型 Cluster VII-6 に属しており、互いに識別不能である。これらの ST ではセフェム系抗菌剤耐性

を規定する *bla*<sub>CMY-2</sub> が染色体上に存在する可能性が指摘された。*bla*<sub>CMY-2</sub> は大腸菌やサルモネラの薬剤耐性プラスミド上に存在することが数多く報告されてきた。近年、染色体上に存在する例も報告されたが、その存在様式は明らかにされていない。そこで、本研究では PFGE 型 Cluster VII-6 に属する ST における *bla*<sub>CMY-2</sub> の存在様式を明らかにすることを目的として実験を行った。

本研究において GI-Cluster VII-6 は *bla*<sub>CMY-2</sub> を含む 11 の薬剤耐性遺伝子を座乗した全長 125 kb の薬剤耐性アイランドとして同定された。本アイランドは IS26 を介して染色体に連結していること、IS26 の染色体側に 8 bp のダイレクトリピートが存在すること等から、IS26 を介して染色体に挿入された複合トランスポゾンと推察された。その塩基配列は *dfrA12* を除き、全長に渡って大腸菌由来 IncA/C プラスミド、pAR060302 の配列と相同であったが、複製に関与する複製起点 (*ori*) や *repA* 遺伝子は認められなかった。挿入された環状 DNA がプラスミドで、その後、*ori* と *repA* を含む領域が脱落したのか、*ori* や *repA* を含まない環状 DNA が挿入されたのかは不明である。

GI-Cluster VII-6 は PFGE 型 VII-6 に属する ST に広く保存されていることから、北海道に侵入、あるいは北海道で出現したクローンがこの地域の牛群に拡散したものと推察された。

#### E. 結論

牛由来 ST L-3553 株の染色体上に存在する薬剤耐性アイランド、GI-Cluster VII-6 の全塩基配列を明らかにした。GI-Cluster VII-6 の全長は 125 kb で *bla*<sub>CMY-2</sub> を含む 11 の薬剤耐性遺伝子を座乗する。本アイランドは両端の IS26 を介して染色体に挿入された複合トランスポゾンと考えられた。また、PFGE 型 Cluster VII-6 に属する野外分離株に GI-Cluster VII-6 が広く分布していることから、この地域に侵入、あるいは出現した新しいクローンが拡散したものと推察された。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

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.

表1. Cluster VII-6に属する牛由来セフェム耐性*S. Typhimurium*

L-番号	分離年	PFGE型	プラスミド (kb)	薬剤耐性プロファイル
3553	2004	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3554	2004	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3556	2004	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3593	2004	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3594	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3595	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, SUL, SXT
3597	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3599	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3600	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3605	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3606	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3607	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3608	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3770	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3771	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3772	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3773	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3774	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3775	2005	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3777	2006	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3778	2006	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT
3779	2006	VII-6	130	AMP, CFZ, CAZ, CTX, KAN, STR, TET, CHL, SUL, SXT

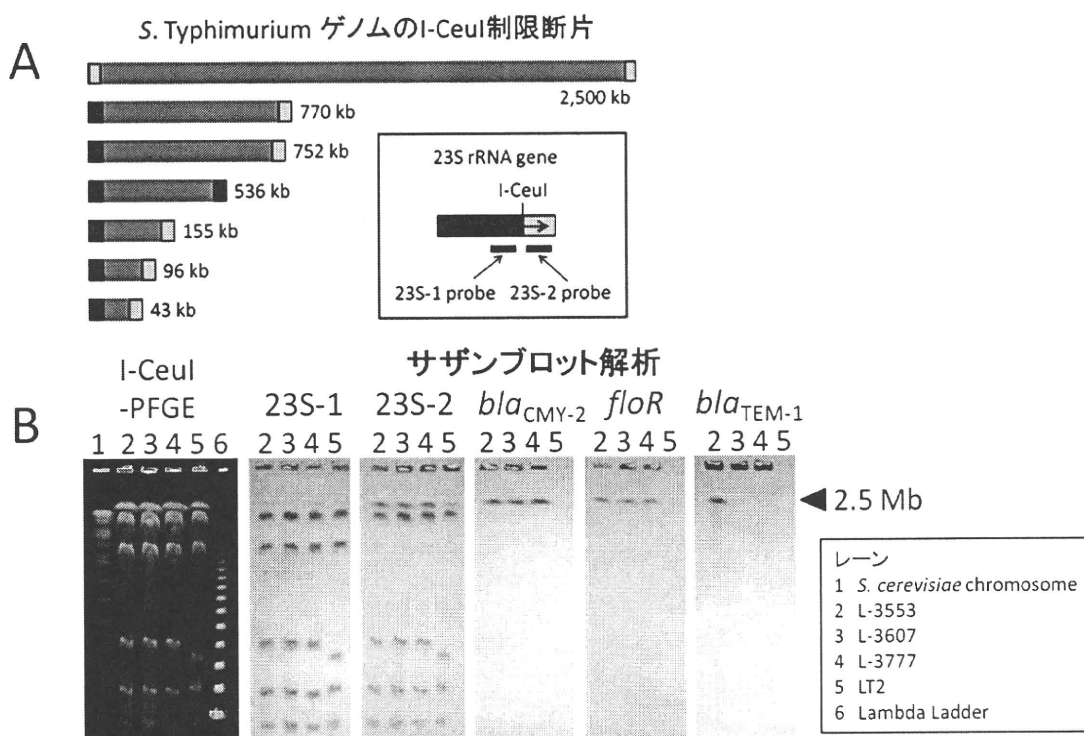


図1. 薬剤耐性アイランドは染色体上に存在する

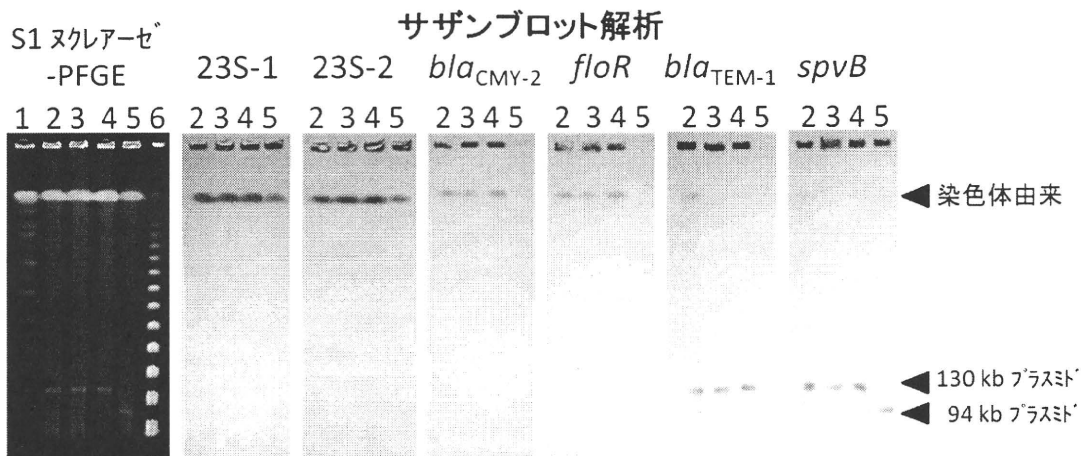


図2. 薬剤耐性アイランドはプラスミド上に存在しない

レーン1, *S. cerevisiae* chromosome; レーン2, L-3553; レーン3, L-3607  
レーン4, L-3777; レーン5, LT2; レーン6, Lambda Ladder

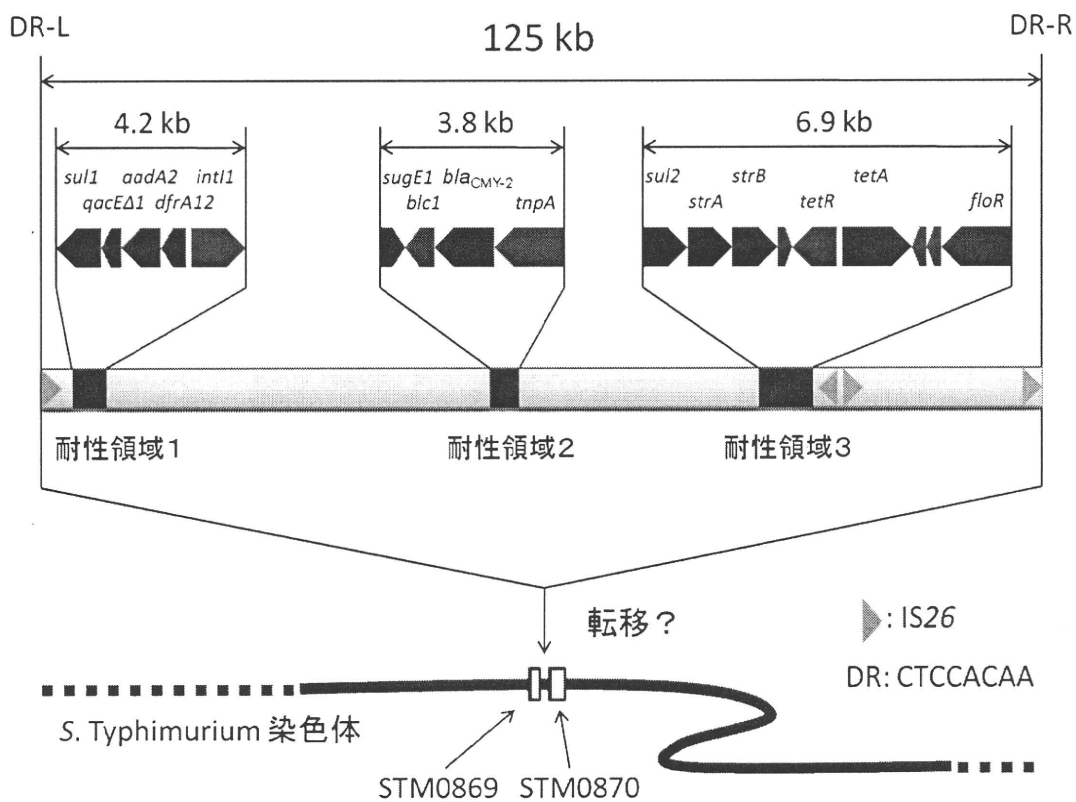


図3. 薬剤耐性アイランド(GI-Cluster VII-6)の構造と挿入部位



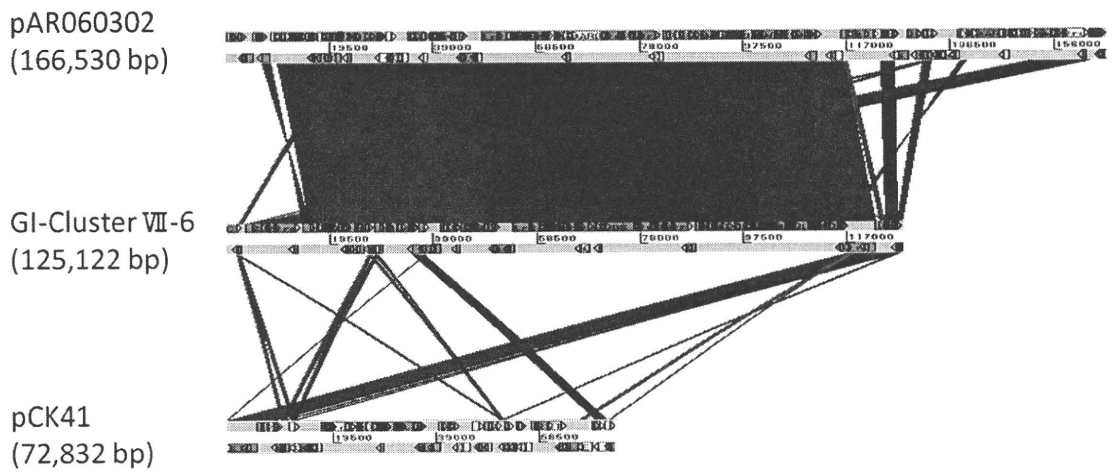


図4. GI-Cluster VII-6はプラスミドに由来する

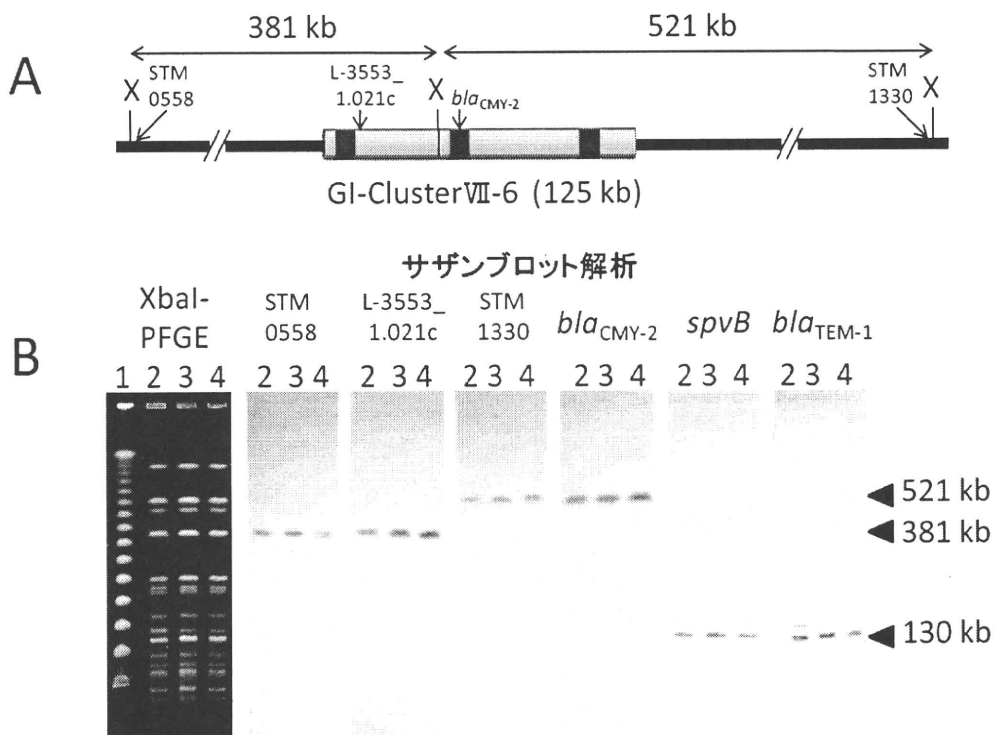


図5. サザンブロット解析によるGI-Cluster VII-6の位置とサイズの確認

レーン1, Lambda Ladder;レーン2, L-3553;レーン3, L-3607;レーン4, L-3777

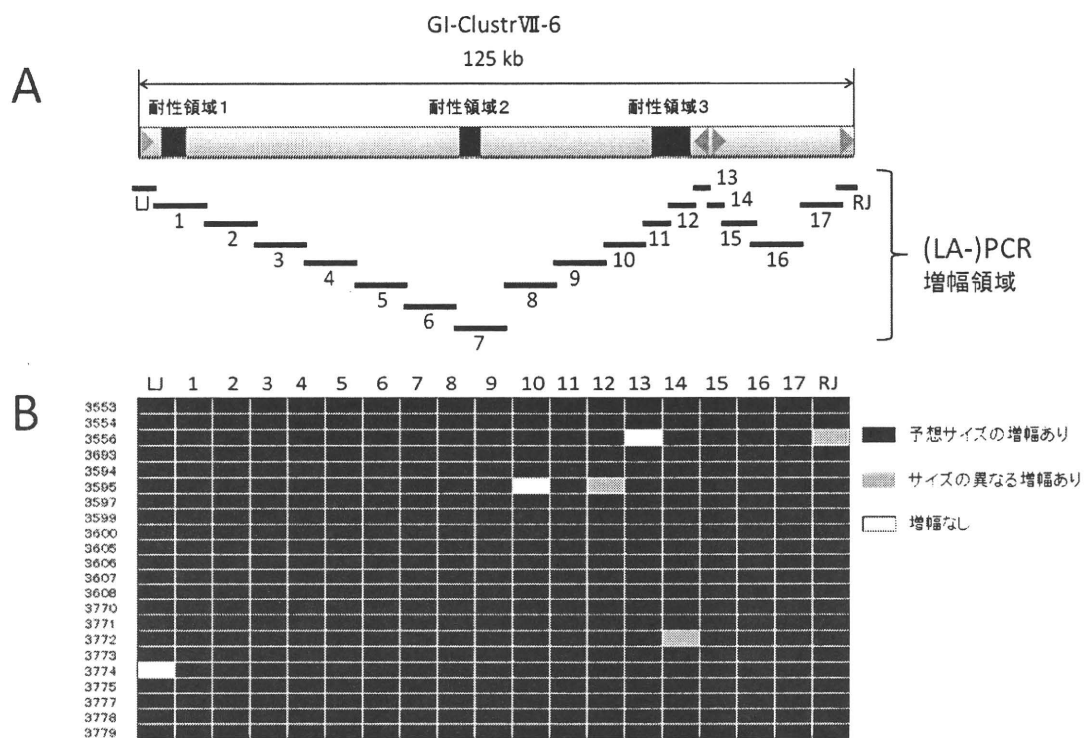


図6. GI-Cluster VII-6は野外分離株に広く分布している

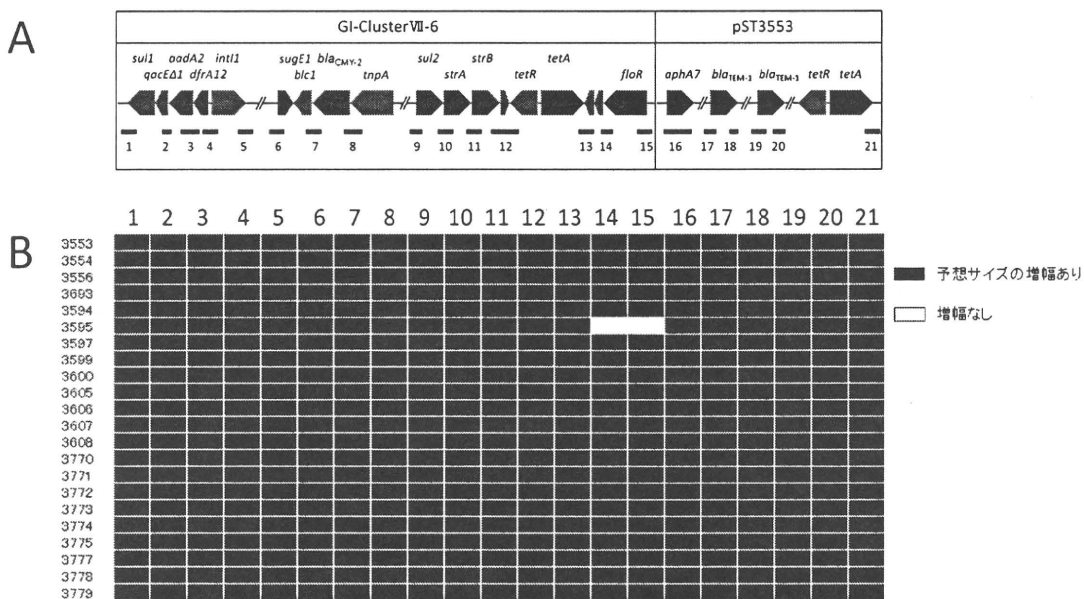


図7. 薬剤耐性遺伝子は野外分離株に保存されている

平成 22 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	河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	原田哲也	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。そしてヒト由来腸管出血性大腸菌 O157 の薬剤耐性を調べた。鶏肉由来サルモネラの調査でセフポドキシム（CPDX）耐性菌が 17 株（16.2%）、ナリジクス酸（NA）耐性菌が 21 株（20.0%）認められた。血清型別では *S. Infantis* の NA 耐性率が昨年より上昇した。ヒト由来株では CPDX 耐性株が 3 株（*S. Infantis* 2 株、*S. Enteritidis* 1 株）あり、NA 耐性菌が 1 株認められた。*C. jejuni* の鶏肉由来菌株では 36.0%、散発下痢症患者では 47.4%がフルオロキノロン耐性であった。

A.研究目的

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出現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。本研究では薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食肉あるいはヒトから分離されたサルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌 O157 の薬剤感受性を比較する。

さらに、サルモネラについてはセフポドキシム（CPDX）ならびにナリジクス酸（NA）の耐

性率、カンピロバクターについてはフルオロキノロンの耐性率の年次変化を調べる。

また、食肉のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）汚染状況を調査する。

B.研究方法

I. 食肉の調査およびヒト由来菌株

1. サルモネラ

(1) 食肉の調査:2010年1月から8月に大阪府内で流通している食肉 400 検体を検査した。

(2) ヒト由来菌株:2010年1月から8月に大阪府内で発生した食中毒事例（6 事例）患者由来

22 株、散発下痢症患者由来 2 株、食品従事者など保菌者から分離した 25 株の合計 49 株を供試した。

## 2. カンピロバクター

(1) 食肉の調査: 2010 年 1 月から 8 月に大阪府内で流通している国産鶏肉 171 検体を検査した。

(2) ヒト由来菌株: 2010 年 1 月から 12 月に大阪府内で発生した散発下痢症患者由来 81 株を供試した。

## 3. 腸管出血性大腸菌 0157

2010 年に大阪府内の患者および健康者から分離された 135 株を供試した。

## 4. MRSA

2010 年に大阪府内で流通している食肉 117 検体を検査した。

## II. 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 (BD) 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)、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。サルモネラについては、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEM)、アミカシン(AMK)、スルフイソキサゾール(Su)も供試した。

### 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、GM の 8 剤で、センシディスクを用いて行った。

## C. 研究結果および考察

### 1. サルモネラ

#### (1) 食肉の調査:

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 (表 1)。なお 2009 年と 2010 年の食肉検査数を合計すると 885 検体であり、国産鶏肉の陽性率が高く、432 検体中 225 検体 (52.1%) が陽性であった (図 1)。

2010 年に分離された 106 株は、6 血清型に型別され、*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 (表 2)。

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。

鶏肉由来 *S. Infantis* の CPDX 耐性と NA 耐性を 2008 年から 2010 年で比較すると、CPDX 耐性率が 2008 年の 15.3% から 2009 年には 26.0% に上昇し、2010 年は 24.6% であった。NA 耐性率は 2008 年 11.8%、2009 年 13.5% であったが、2010 年は 24.6% に上昇した (図 2)。このようにサルモネラの薬剤耐性率の変化が分離年ごとに認められたことから、大阪府内で流通している鶏肉のサルモネラ汚染状況の変化を継続的に把握する必要がある。

#### (2) ヒト由来菌株:

49 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 22 株中 4 株が、保菌者では 25 株中 17 株 (68.0%) が耐性であった。NA 耐性株は保菌者由来 *S. Hadar* で 1 株認められた。CPDX 耐性の *S. Infantis* が保菌者由来株