

2013/013A・B

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23年度総括・分担研究報告書  
及び

平成21～23年度総合研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金 食品の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24(2012)年4月

## 目次

### 厚生労働科学研究費補助金食品の安全確保推進研究事業

#### 1. 平成 23 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 23 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……………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) ヒトおよび食品由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究……………29

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……………37

研究分担者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

黒田 誠 国立感染症研究所

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                                    | 石井 良和<br>朝倉 宏<br>岡田由美子<br>百瀬 佳香<br>山本 茂貴<br>坂田 竜二<br>吉住あゆみ<br>舘田 一博<br>関塚 剛史 | 東邦大学<br>国立医薬品食品衛生研究所<br>国立医薬品食品衛生研究所<br>国立医薬品食品衛生研究所<br>国立医薬品食品衛生研究所<br>東邦大学医学部微生物・感染症学講座<br>東邦大学医学部微生物・感染症学講座<br>東邦大学医学部微生物・感染症学講座<br>国立感染症研究所 |
| (V) 家畜由来腸内細菌の疫学的研究.....52                |  |   |
| 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<br>臼井 優<br>比企 基高   | 農林水産省動物医薬品検査所<br>農林水産省動物医薬品検査所<br>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.....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<br>岩田 剛敏<br>黒田 誠<br>関塚 剛史<br>中馬 猛久                                     | 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所<br>農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所<br>国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター<br>国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター<br>鹿児島大学農学部                            |
| (VII) 食品汚染腸内細菌の薬剤耐性疫学.....71             |  |   |
| 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<br>原田 哲也<br>勢戸 和子<br>久米田裕子   | 大阪府立公衆衛生研究所<br>大阪府立公衆衛生研究所<br>大阪府立公衆衛生研究所<br>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.....79             |  |   |
| 研究分担者                                    | 田村 豊   | 酪農学園大学獣医学群獣医学類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群獣医学類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.....85 |  |   |
| 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<br>竹内史比古   | 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<br>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  |

|       |          |             |
|-------|----------|-------------|
| 松井 真理 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部       |
| 荒川 宜親 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部       |
| 大西 真  | 国立感染症研究所 | 細菌第一部       |
| 菱沼 昭  | 獨協医科大医学部 | 感染制御・臨床検査医学 |

3. 研究発表一覧.....93

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金食品の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：2011 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 で認められ、特に CMY-2 型産生株の分離率の増加であった。2) 2011 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変化がなかった。国産鶏肉から分離された *C. jejuni* の約 40%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* の約 50%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) ブ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) 患者から NDM-1 耐性大腸菌が分離されているが、調べた限りにおいては動物、食品からは NDM-1 耐性株は分離できなかった。全ゲノム配列及びプラスミド配列の決定から、わが国で分離された NDM-1 遺伝子は、その配列においては既存の NDM-1 遺伝子と同一であったが、その隣接配列において多様性が認められた。IS 配列による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。

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 |
| 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関連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、倉園）、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）。

(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 NDM-1 株の全ゲノム解読と complete 配列の確定：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、blast 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

伴侶動物のイヌ 154 頭、ネコ 47 頭の便を材料として実施し、*S. Nagoya* がネコ 1 頭（2.1%）から分離されたが、供試薬剤全てに感受性であった。また、捕獲された野生化アライグマでは 218 頭中 8 頭（3.7%）の便からサルモネラが分離された。その血清型は *S. Saintpaul* が 1 株、*S. Nagoya* が 6 株、08UT が 1 株であった。薬剤感受性では 8 株とも供試薬剤全てに対して感受性であった。

牛由来株では、ABPC と TC に対する耐性株が約 50% で認められた。その他、KM と CP に対する耐性が約 20% で認められたが、その他は 10% 未満であった。

豚由来株では、TC に対する耐性が高率（71.2%）で、次いで ABPC（37.3%）、ST（33.9%）、KM（22.0%）、GM（20.3%）の順であった。約 50% で認められた。その他は 10% 未満であった。

鶏由来株では、TC に対する耐性が 12.1% で認められたが、その他は 10%

未満であった。

全畜種で、フルオロキノロン (CFX) 耐性は認められず、セファロスポリン耐性サルモネラは、牛由来Typhimurium、鶏由来Infantis及び豚由来O4: i: -で認められた。

$\beta$ -ラクタマーゼ型は、牛由来12株中9株及び鶏由来7株中6株がCMY-2であった。ESBL産生株は、牛 (Senftenberg: CTX-M-3) と鶏 (Infantis: CTX-M-2) で1株ずつ認められた。その他の $\beta$ -ラクタマーゼ型は不明であった。

## 2) 食品由来:

285 検体中 34.0%からサルモネラが分離された。なお2009年から2011年の食肉検査数を合計すると1165検体であり、国産鶏肉の陽性率が高く、600検体中323検体(53.8%)が陽性であった。

2011年に分離された103株は、7血清型に型別され、*S. Infantis* が75株と最も多く、次いで*S. Schwarzengrund* 12株が多い血清型であった。

分離サルモネラの97.1%が1剤以上の薬剤に耐性で、そのうち鶏肉由来45株(60.0%)がCPDX耐性菌であった。NA耐性は鶏肉由来36株(48.0%)に認められた。鶏肉由来*S. Infantis* のCPDX耐性とNA耐性を2009年から2011年で比較すると、CPDX耐性率が2009年の28.4%から2010年には25%になり、2011年には53.3%に上昇した。NA耐性率は2009年14.8%、2010年25%、2011年は36%と上昇した。

鶏肉由来CPDX耐性菌の45株は、10株がESBL産生、35株がプラスミド性AmpC型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株であった。そしてヒト由来*S. Infantis* の3株はプラスミド性AmpC

型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株であった。

## 3) 患者由来:

埼玉県内で2011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111株は31血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Enteritidis* が30株、次いで*S. Infantis* が10株であった。*S. Enteritidis* では30株のうち23株(76.7%)が耐性を示し、SM耐性が13株、NA耐性が10株であった。

第3世代セフェム系薬剤であるCTXに対する耐性菌が1株分離された。この株は業態者検便において60代の男性から分離されたものであった。薬剤感受性ではCTX以外に4薬剤に耐性を示す多剤耐性菌で、CTX-M-14およびTEM-1型遺伝子を保有していた。

CPDX耐性の*S. Infantis* が保菌者由来株で3株あった。

## 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

*C. jejuni* では、TC (47%) 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、TC (71%) に対する耐性株が最も多く、次いで、EM (45%)、NA (38%)、ERFX (38%) CP (17%) の順であった。

### 2) 患者由来株:

2011年に食中毒疑いで搬入された臨床材料分離したカンピロバクターは43株で、*C. jejuni* が41株、*C. coli* が2株であった。薬剤感受性試験では*C. jejuni* が41株中24株、*C. coli* が2株とも供試した6薬剤のいずれかに耐性を示した。*C. coli* は2株と株数は少ないものの、供試6薬剤全



てに耐性であった。2010年分離株の耐性率は *C. jejuni* で46.1% (141株中65株), *C. coli* で62.5% (8株中5株) であり, 耐性率はほぼ横ばいであった。2010年のEM耐性率は *C. jejuni* で2.1%(141株中3株), *C. coli* は12.5% (8株中1株) であった。2010年の食中毒患者由来 *C. jejuni* 31株のうち20株(64.5%)がフルオロキノロン耐性であった。*C. coli* は1株のみであったがフルオロキノロン耐性であった (

### III. 糞便大腸菌

患者由来および健常人由来大腸菌が保有する主要なESBLをコードする遺伝子は、blaCTX-M-9グループが45株(68%)、blaCTX-M-1グループが16株(24%)、blaCTX-M-2グループが5株(8%)、blaCTX-M-8/25グループが1株(1%)の順となった。国産鶏肉由来大腸菌が保有する主要なESBLをコードする遺伝子は、blaCTX-M-2グループが50%、blaCTX-M-1グループが20%、blaCTX-M-9グループが20%、blaCTX-M-8/25グループが10%を占めていた。

blaCTX-M型遺伝子で頻度の高いものから順に、ヒト由来大腸菌ではblaCTX-M-27が35%、blaCTX-M-14が23%、blaCTX-M-15が14%であり、国産鶏肉由来大腸菌ではblaCTX-M-2が44%、blaCTX-M-14が22%、blaCTX-M-25とblaCTX-M-28がそれぞれ11%であった。

MLSTによる解析の結果、ヒト由来大腸菌は61%がCC131、次いでCC38が9%の順となり、CC131以外のCCに集積性は認めなかった。鶏肉由来大腸菌は、CC58が20%、CC10が20%、CC17が10%であったが、特定のCCに集積性は認めなかった。

2011年5月から12月に搬入された鶏肉151検体からESBL産生菌の検出を試みた結果、国産鶏肉50検体中24検体(48%)、輸入鶏肉101検体中70検体(69.3%)からESBL産生菌が検出された。検出されたESBL産生菌は全て大腸菌であった。輸入国は7カ国(ブラジル、アメリカ、フランス、チリ、アルゼンチン、フィリピン、メキシコ)に渡っていたが、多くはブラジル産で、ESBL産生菌の検出率も85.5%と高率であった。

### IV. 腸管出血性大腸菌の解析

2011年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便検査などにおいて健康者から分離された127株で最も多く分離された血清型は、O157:H7(VT1&2産生)が37株、次いでO26:H11(VT1産生)が35株、O157:H7(VT2産生)が27株の順であった。分離127株の薬剤感受性試験の結果、供試した16薬剤のいずれかに耐性であったのは53株(41.7%)であった。耐性株の耐性パターンは7パターンに分かれた。最も多かったのはSM・Su耐性で25株が該当し、次いでSM・ABPC・CTX・Su耐性が10株であった。O157の耐性菌出現状況を2005年分離株から調べた結果、耐性率はそれ程高くはなかった(11.7%~23.4%)。しかし2007年以降の耐性率は11.7%(2007年)、13.5%(2008年)、17.5%(2009年)、23.4%(2010年)と上昇傾向であった。

### V. MRSAの検出:食品分離株

食肉由来MRSAは、全てSCCmecIV型だったが、MLST型はST8(3株)、ST5(1株)、ST88(1株)の3種類で、spa-typeは4種類(t008, t4133, t3525, t1028)認められた。豚由来MSS

A15株中、ST398が6株、ST9が6株、ST5、ST97及びST705に認められた。MSSA ST398ではspa type t034が4株で認められた。

## VI. 愛玩動物

ヒト由来 *oxyAB* 保有株 (HUE1 株) の各種性状は、イヌ由来株 (RE4 株、RE64 株、RE64 株) のそれと異なった性状を示した。すなわち、HUE1 株は、O 血清型別は不能で、各種の FQ 剤に対する MIC もイヌ由来株に比べて低かった。PFGE の相同性も、イヌ由来株と比較して 68%以下であった。一方、イヌ由来株は、分離した 3 株全てが血清型は O1 で、MIC も ERFX に対して 64 ( $\mu\text{g/mL}$ ) で、CPFEX に 16 ( $\mu\text{g/mL}$ )、LVFX と PUFEX に 4 ( $\mu\text{g/mL}$ )、そして STFX に 2 ( $\mu\text{g/mL}$ ) を示した。QRDR の点変異も、*gyrA* で 2 か所、*parC* と *parE* で 1 か所が確認された。しかし、*qnrS* はいずれの株も検出されなかった。PFGE の相同性は、イヌ由来の 3 株で 97%以上を示した。

## VII. 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

大腸菌 46 株は 3~11 薬剤に耐性を示し、保有プラスミド数は 0~11 と多様であった。検出できたレプリコン型は 6 種 (I1-I $\gamma$ 、FIB、K、B/O、FIC、Y) で単一のプラスミドから 2~3 のレプリコン型が検出できる場合が認められた。 $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子は TEM-1、SHV-2、SHV-12、CTX-M-2、CTX-M-14、CTX-M-15、CMY-2 が検出された。XbaI 消化後の PFGE パターンは多様であり、近縁度の高くない株間で同じプラスミドレプリコン型と  $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子の組み合わせ

せが認められる場合があった。

供与株でプラスミドの保有を認めないにも関わらず、CTX-M-2  $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子 (*bla<sub>CTX-M-2</sub>*) が検出され、ESC に耐性を示す株が 2 株認められた。I-CeuI 消化後の PFGE-サブプロット解析では 23S-1 プローブで検出される染色体由来フラグメント上に *bla<sub>CTX-M-2</sub>* シグナルが認められた。

### 2) ゲノム解析:

(1) プラスミド pNDM-1\_Dok01 の完全長配列

全ゲノム解読と NDM-1 プラスミドの形質転換 DH10B 株を利用して NDM-1 プラスミド (pNDM-1\_Dok01) の完全長配列を決定した。全長 195.5 kb の IncA/C 型レプリコンを有するプラスミドであり、225 個の遺伝子の存在が予測された。pNDM-1\_Dok01 は、大腸菌 AR060302 株の pAR060302 (166.5 kb) および *Salmonella enterica* serovar Newport の pSN254 (176.4 kb) 等の *bla<sub>CMY-2</sub>* 陽性 IncA/C プラスミドと高い保存性を示した。また、pNDM-1\_Dok01 には *bla<sub>CMY-4</sub>* が存在し、香港の大腸菌分離株が保有する IncL/M 型の *bla<sub>NDM-1</sub>* 陽性プラスミド pNDM-HK とは異なっていた。pNDM-1\_Dok01 上の *bla<sub>NDM-1</sub>* は、これまで報告されている NDM-1 陽性プラスミドとは異なり、IS903 に挟まれた新規 composite transposon 内に含まれていた。*bla<sub>NDM-1</sub>* は腸内細菌科の多様なプラスミドに伝播しており、かつ IS を介した伝達ユニットも多様性を示すことが明らかとなった。この composite transposon 内に存在する分子シャペロン *groES/EL* は、GC%が 60%以上と非常に高いことから外来性に獲得した遺伝子であること

が推測された。GroES/EL アミノ酸配列の分子系統解析の結果、植物病原体である *Pseudoxanthomonas* および *Xanthomonas* 属が有する GroES/EL と非常に近縁であることが明らかになった。

#### 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た。2011 年においては、鶏肉の *S. Infantis* の分離菌の約 50%が CPDX 耐性となっていた。鶏肉由来の大腸菌においても同様な結果になっており、セファロスポリン耐性の浸潤が著しい。

セファロスポリン耐性に関与する遺伝子群は ESBL や AmpC 型ベクターラクタマーゼが関与しており、それらの遺伝子がプラスミドを介して伝達している。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。

近年 NDM-1 耐性というカルバペネムにも耐性を示すように進化したベクターラクタマーゼ遺伝子の存在が注目されている。臨床の分野では大腸菌や *Klebsiella* から分離されている。今回、家畜、食品からのサルモネラ、大腸菌における NDM-1 遺伝子の存在を調査したが、幸いにも分離されていない。しかし、諸外国での浸潤状況を加味すると、わが国にいつ入ってきてもおかしくはない状況である。今後さらなるモニタリングの強化を行いその動向に注意を払う必要がある。

わが国で大腸菌から分離された NDM-1 耐性株のゲノム解析を行った結果からは、NDM-1 遺伝子配列は既存ものとは変わらないが、その隣接する遺伝子の配列に多様性があることが判明した。挿入配列等の“動く遺伝子”を介して、多様な遺伝体に挿入を繰り返して進化し続けている状況が推察できる。今後、環境内、動植物の体内での遺伝子交換を経て、多様なプラスミドレプリコン上にその耐性遺伝子が運ばれる可能性は決して低いものではない。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。

#### 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を蓄積する必要がある。臨床上大きな問題を提起している NDM-1 耐性菌は現在の所わが国ではサルモネラ等の強毒菌からは分離さ

れていないが、諸外国の状況を考慮するといつ入ってきてもおかしくはない。監視体制を強化し、動向を注視することが重要である。

#### 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. N. Sithivong, T. Morita-Ishihara, A. Vongdouangchanh, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, B. Khamphongphane, B. Sengkeopraseuth, P. Vongprachanh, O. Keosavanh, K. Southalack, J. Lee, R. Tsuyuoka, M. Ohnishi, and H. Izumiya: Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (11), 2060-2062, 2011.
2. Pinto AF, Todorovic S, Hildebrandt P, Yamazaki M, Amano F, Igimi S, Romão CV, Teixeira M. (2011) Desulforubrythrin from *Campylobacter jejuni*, a novel multidomain protein. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16(3):501-510.
3. Okada Y, Okutani A, Suzuki H, Asakura H, Monden S, Nakama A, Maruyama T, Igimi S. (2011) Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. *J Vet Med Sci.* 73(12):1681-1684.
4. Baba, K., Ishihara, K., Ozawa, M., Usui, M., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T. Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan. *J Vet Med Sci* (in press).
5. Asai, T., Masani, K., Sato, C., Hiki, M., Usui, M., Baba, K., Ozawa, M., Harada, K., Aoki, H., Sawada, T. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 53:52, 2011.
6. 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* 73, 279-282, 2011.
7. M. Sugawara, F. Shahada, H. Izumiya, H. Watanabe, I. Uchida, Y. Tamamura, M. Kusumoto, T. Iwata, M. Akiba: Change in antimicrobial resistance pattern in

- Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates detected in a beef cattle farm. *J. Vet. Med. Sci.* 74: 93-97, 2012.
8. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Ishihara K, Fujii N, Tamura Y: A fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolate without quinolone resistant-determining region mutations found in Japan, *Antimicrobiol Agents Chemother*, 55(8), 3964-3965, 2011.
  9. Ishihara K, Kanamori K, Asai T, Kojima A, Takahashi T, Ueno H, Muramatsu M, Tamura Y: Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from wild mice in a forest of a natural park in Hokkaido, Japan, *J Vet Med Sci*, 73(9), 1191-1193, 2011.
  10. Ishihara K, Hosokawa Y, Makita K, Nod J, Ueno H, Mukai T, Yamamoto H, Ito M, Muramatsu M, Tamura Y: Factor associated with antimicrobial resistant *Escherichia coli* in zoo animals, *Res Vet Sci*, in press.
  11. Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fujii N: Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strain isolated in Japan, *Chemotherapy*, in press.
  12. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, Arakawa Y, Kuroda M. (2011) Complete Sequencing of the *bla*(NDM-1)-Positive IncA/C Plasmid from *Escherichia coli* ST38 Isolate Suggests a Possible Origin from Plant Pathogens. *PLoS one* 2011. 6: e25334.
  13. Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I, Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M (2011) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55: 4114-4121.

## (2) 学会発表

1. Ishii Y, Eto M, Esaki H, Saga T, Harada S, Yoshizumi A, Tateda K, Kuroda M, Igimi S, Rambach A, Yamaguchi K. Characterisation of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from clinical patients, chicken meat and domestic animals. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) & 27th International Congress of Chemotherapy (ICC). Milan, Italy, 2011.5
2. Ishii Y, Yoshizumi A, Saga T, Harada S, Kuroda M, Igimi S, Yamaguchi K, Tateda K.

- Characterization of ESBL producing *Escherichia coli* from patients, healthy students, raw chicken meat and healthy chicken stools. 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy (ICAAC). Chicago, USA, 2011.9
3. F. Shahada, T. Sekizuka, M. Kuroda, M. Kusumoto, D. Ohishi, A. Matsumoto, H. Okazaki, K. Tanaka, I. Uchida, H. Izumiya, H. Watanabe, Y. Tamamura, T. Iwata, M. Akiba: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2  $\beta$ -lactamase gene located on a genomic island involved in multidrug resistance. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月9日, 札幌
  4. Makoto Kuroda, Hidemasa Izumiya, Tsuyoshi Sekizuka, Masumi Taguchi, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi. *IsI*-mediated Horizontal Acquisition Of Multiple Antibiotics Resistance In *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. 51<sup>st</sup> ICAAC Sept. 17-20, 2011. Chicago, USA.
  5. Makoto Kuroda, Hidemasa Izumiya, Tsuyoshi Sekizuka, Masumi Taguchi, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via *IsI* derivatives on the chromosome. IUMS 2011 Bacteriology 2011/9/6 ~ 10. Sapporo, Japan.
  6. Shizunobu Igimi, Akiko Ishiwa, Shuko Monden, Yumiko Okada, Hiroshi Asakura, Tetsuo Asai, Akemi Kai, Masumi Taguchi, Yoshikazu Ishii, Makoto Kuroda and Haruo Watanabe. Antimicrobial Susceptibility Profiles and PFGE Typing of *Campylobacter jejuni* Isolated from Various Sources in Japan. the 16th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms. August 28 - September 1, 2011. Vancouver, Canada.
  7. 小西典子, 尾畑浩魅, 齊木大, 鈴木康規, 門間千枝, 横山敬子, 仲真晶子, 甲斐明美: 腸管出血性大腸菌 0157, 026, 0111 の薬剤耐性株出現状況, 第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 2011 年 7 月, 大阪
  8. 田口真澄、河原隆二、勢戸和子: 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向、第 23 回日本臨床微生物学会総会、2012 年 1 月、神奈川
  9. 田口真澄、勢戸和子、河原隆二、原田哲也、久米田裕子: 2006 年から 2011 年に分離された腸管出血性大腸菌の血清型と薬剤耐性、第 51 回日感染性腸炎研究会総会、2012 年 3 月、東京
  10. Francis Shahada、関塚剛史、黒田誠、楠本正博、大石大樹、松本

敦子、岡崎ひづる、田中聖、内田  
郁夫、泉谷秀昌、渡邊治雄、玉村  
雪乃、岩田剛敏、秋庭正人。多剤  
耐性ゲノミックアイランドを保有するセファロスポリン耐性  
*Salmonella* Typhimurium の出現。第 152 回日本獣医学会学術集  
会（2011 年 9 月 大阪府立大）

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

2010 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 8,719 名（前年比+30%）であった。このうち、28%にあたる 2,476 名（同+63%）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 および 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 SE17 株を次世代シーケンサー・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) を見出した。そこから代表的な部分を選択し、各箇所 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. リアルタイム MAMA-PCR による SNP 解析：SE17 株のイルミナ解読リード、ならびに既報のゲノム情報 (1 株) の比較解析から SE コアゲノム SNP が 923 箇所同定された。ここから代表的な箇所を約 80 選択し、MAMA-PCR 用のプライマーを設計した。各アリルの判定は 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 2)。まず、ゲノム解析を行った株について試験を実施し、ゲノム情報と比較して結果が合致した部位 79 箇所について、菌株数を拡大して試験を行った。得られたアリル情報を一つの疑似配列と見做して系統解析を行

った。供試菌株は NA 耐性株を中心に計 47 株であった (図 3)。47 株から 35 タイプが得られた。クラスター解析の結果から、SM 耐性株は一つのグループを形成したが、NA 耐性株はいくつかのグループに分かれた。また、鶏肉由来株については、一部産地ごとに異なるグループを形成することが示された。

#### 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きている。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。本法をフェージ型別、薬剤感受性試験、PFGE と併用することで、これまで以上にサルモネラの疫学調査に貢献できることが期待される。

#### E. 研究発表等

- (1) N. Sithivong, T. Morita-Ishihara, A. Vongdouangchanh, T. Phouthavane, K. Chomlasak, L. Sisavath, B. Khamphongphane, B. Sengkeopraseuth, P. Vongprachanh, O. Keosavanh, K. Southalack, J. Lee, R. Tsuyuoka, M. Ohnishi, and H. Izumiya: Molecular subtyping in cholera outbreak, Laos, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (11), 2060-2062, 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。

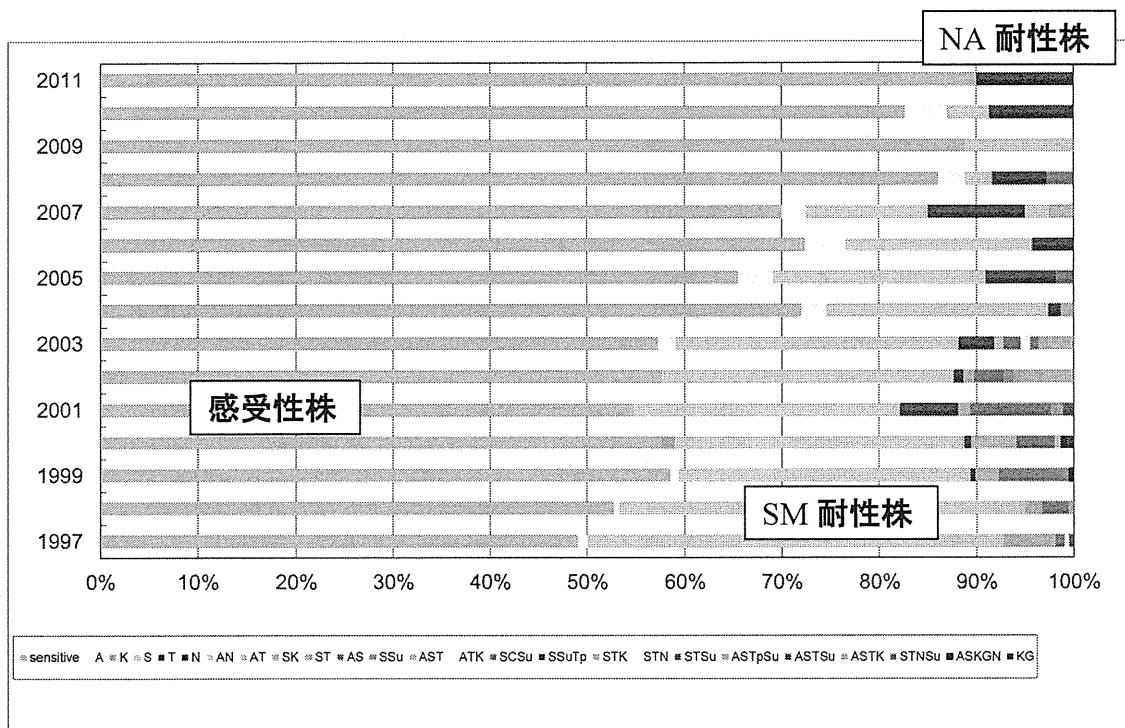


図 1. SE 集団事例関連株薬剤耐性パターンの推移 (1997-2011 : 2012 年 1 月現在)。

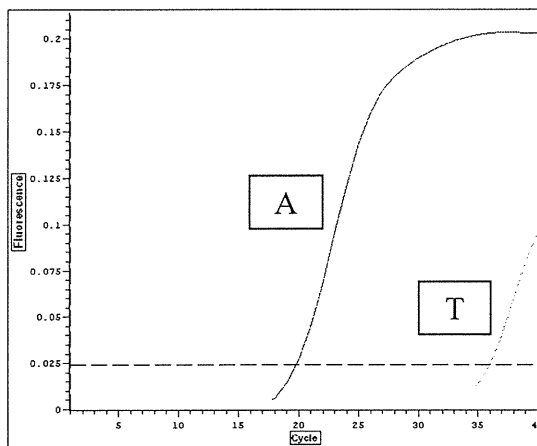
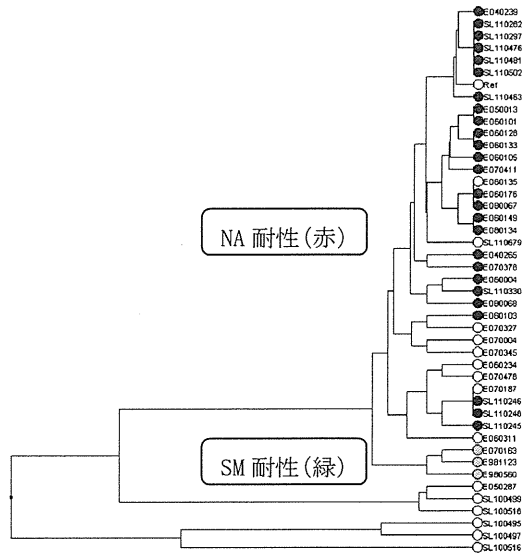


図 2. リアルタイム MAMA-PCR によるアリル検出例。図の場合、当該アリルは A となる。

A)



B)

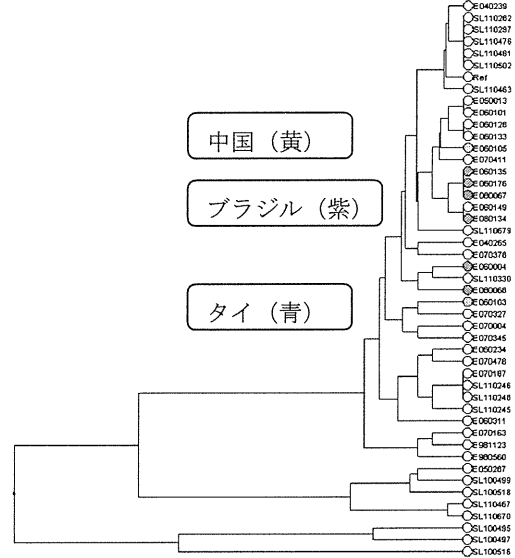


図3. MAMA-PCRの結果に基づく79箇所のアリルによる系統樹。(A)耐性パターンによる比較。(B)鶏肉由来株の産地による比較。