

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）

平成 23 年度 分担研究報告書

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

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 東邦大学
朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所
岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所
百瀬 佳香 国立医薬品食品衛生研究所
山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所
坂田 竜二 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
吉住 あゆみ 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
館田 一博 東邦大学医学部微生物・感染症学講座
関塚 剛史 国立感染症研究所

研究要旨

本分担研究では、カンピロバクター・ジェジュニと拡張型 β -ラクタマーゼ（ESBL）産生大腸菌を対象とした。カンピロバクターでは疫学データと PFGE 型から、動物の飼育段階から市販食品とヒト臨床分離株に相関性が認められた。カンピロバクター・ジェジュニの抗生物質への耐性獲得は食品を介して行われ、市販鶏肉からヒトへの伝播と牛肝臓の生食などからヒトへの伝播が主要な2つの経路であると推定された。それぞれの経路の分離株のフルオロキノロン剤（CPFX）の耐性率に着目すると市販鶏肉分離株の42%が耐性であるのに対し、と畜場の牛肝臓分離株では13%であり、これらの耐性状況を反映してヒト臨床分離株での耐性率はそれらの中間的な値である33%を示した。疫学データと菌株の型別によりフルオロキノロン耐性率の低い牛からヒトへの伝播が存在し、ヒト臨床でのフルオロキノロン耐性の割合に影響を与えていると推定された。このような結論を検証するため、食品からヒトへの伝播が想定される主要な菌株を選び、全ゲノム解析を進めた。

ESBL 産生大腸菌に関しては、患者および健常人からしばしば分離されるオキシミノセファロsporin薬耐性大腸菌急増の理由と、それに影響を与えると思われる国産鶏肉から分離される ESBL 産生大腸菌の関連性を検討することを目的として研究を行った。国産鶏肉から分離された大腸菌に、ヒト由来株で頻度の高かった ESBL をコードする遺伝子の

blaCTX-M-27 や、ST131 に属する大腸菌は認められなかったことから、ヒト由来株と国産鶏肉由来株の間には当初想定していた関連性があまりないことが示された。

A. 研究目的

本分担研究では、主にカンピロバクターと近年急増している拡張性β-ラクタマーゼ(ESBL)産生大腸菌に注目して、耐性株の食品を介するヒト臨床への影響に関して研究を行った。

研究班全体の分担研究者や協力研究者により得られた、動物の飼育段階、と殺場段階、市販食品、ヒト臨床といったそれぞれの分離株の提供を受け、カンピロバクターと ESBL 産生大腸菌等の抗菌剤耐性獲得に関するデータと菌株を収集し研究を行うことにより、耐性菌出現防止に関わるリスクマネジメント手法の基礎となり、耐性菌の出現の防止に有効な対策に関する情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

食中毒菌ではカンピロバクターを主な対象とし、常在菌としては ESBL 産生大腸菌に着目し、日本国内の動物の飼育段階、と殺場段階、市販食品、ヒト臨床における情報、菌株、データの収集と菌株の詳しい検討を行い、食品（鶏肉および牛肉）における対象となる細菌の汚染実態と抗生物質耐性獲得状況についてわが国の実態を明らかにする。

①カンピロバクターの検討

菌株収集に関しては、分担研究者、協力研究者に加え、以下の機関のネットワークによるカンピロバクターレファレンスセンターに協力をいただいた。

国立医薬品食品衛生研究所
東京都健康安全研究センター
埼玉県衛生研究所
秋田県衛生科学研究所
群馬県衛生環境研究所
愛知県衛生研究所
大阪府立公衆衛生研究所
広島市衛生研究所
山口県環境保健研究センター
熊本県保健環境科学研究所

カンピロバクター・リファレンスセンターの協力により、各機関の所在地において 2005～2006 年度に得られた臨床分離株について、地域ごとの発生件数およびディスク法による薬剤耐性獲得状況に関する調査結果の提供を受け、国内で分離された飼育段階、と畜場段階、市販食品由来株より得られた結果との比較を行った。

分離株について、平成 21 年度にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により、牛肝臓由来株と電気泳動パターンを比較しゲノムレベルの相関性を調べた。平成 22 年度に、ゲノムパターンを比較した株については、パルスフィールドゲル電気泳動と併せて、各種形質 (Penner 血清型、PCR による遺伝子マーカーの検出、プラスミドの有無等) についての調査も行った。

ゲノム解析については、国立感染症研究所ゲノムセンターにお願いし、あらかじめ行っていた遺伝子型別の情報を基に、需要と思われる菌株を選択して行った。

倫理面への配慮

菌株に係わる臨床データについては、菌

株の性状に関する情報と分離して管理することにより、菌株から直接個人情報が特定されることがないように配慮した。

②ESBL 産生大腸菌の検討

2007年に全国72の医療施設から収集された743株の大腸菌のうち、セフトキシムあるいはセフトジジムに耐性を示し、4 μ g/mLのクラブラン酸が共存した場合に3管以上の最小発育阻止濃度が改善した76株を選択した。76株のうち57株が、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ(Extended-spectrum beta-lactamase: ESBL)をコードする遺伝子を保有していた(検出方法は後述)。さらに、2009年と2010年に東邦大学医学部2年次学生の便から検出された10株のESBL産生大腸菌を加えて67株のヒト由来ESBL産生大腸菌を対象に解析した。国産鶏肉は、2008年に都内48店舗の食肉販売店から購入した。購入した鶏胸肉は、氷冷下東邦大学医学部微生物・感染症学講座まで搬送し、その10~15gを無菌的に秤取りし、Mueller-Hinton培地20mLを加え、35°Cの恒温槽で1晩振盪培養した。約10 μ Lの培養液をCHROMagar™ ESBLに塗抹し、ESBL産生大腸菌を選択した。

ヒト由来オキシミノセファロスポリン耐性大腸菌および分離選択培地上に発育したESBL産生が強く疑われる鶏由来大腸菌を対象にこれらの菌株が保有するESBLをコードする遺伝子は、blaCTX-M-1、blaCTX-M-2、blaCTX-M-8/25、blaCTX-M-9の各グループを検出可能なMultiplex PCR法にて検出した。Multiplex PCRで陽性となった菌株については、各blaCTX-M型ESBL全長の塩基配列決定が

可能な増幅用プライマーを設計し、構造遺伝子全長の塩基配列を決定した。

ESBL産生大腸菌のST型は、定法に従って<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>が定める7つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定してその結果を得た。得られたST型をもとに<http://eburst.mlst.net/v3>により、Clonal complex(CC)を決定した。

倫理面への配慮

事前に本研究に関する説明を東邦大学医学部2年次学生に行い、同意が得られた学生のみが本研究に参加した。全国サーベイランスで菌株を収集するに当たり、全ての参加施設は各施設の規則に従い、倫理委員会あるいはそれに準じる組織の許可を得た。さらに、患者情報の収集に際しては、全データを患者の特定ができないように暗号化した。

C.研究結果

①カンピロバクターの検討

これまでの検討により、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE;制限酵素はKpnIを使用)により、市販鶏肉由来株、牛肝臓由来株はそれぞれに由来動物ごとのクラスターを形成していることが判明しており、同様な解析方法により、生産現場分離株、ヒト臨床分離株につき系統樹を作成した。

菌株数が多いため系統樹は図1、図2と分けて示した。これらの図を統合し、全体像を系統樹として示した(図3)。

また、以前作成した鶏及び牛由来株のPFGE系統樹に、大阪臨床株と東京臨床株それぞれ1株ずつがどのクラスターに入るかを示した(図4)。

②ESBL 産生大腸菌の検討

2007 年に全国から収集された患者由来株 743 株中 57 株(7.7%)が ESBL をコードする遺伝子を保有していることが明らかとなった。2008 年および 2009 年に東邦大学医学部 2 年次の学生から分離された大腸菌のうち、10 株(約 5.6%)が ESBL をコードする遺伝子を保有する大腸菌であった。これら ESBL 産生大腸菌を保有していた学生うちの 8 名は、過去 3 ヶ月以内の抗菌薬投与歴はなかった。

2008 年に購入した国産鶏肉の 48 切中 20 切(約 42%)が ESBL をコードする遺伝子を保有する大腸菌の汚染を受けていた。

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。

D. 考察

①カンピロバクターの検討

カンピロバクター食中毒の直接の原因となる危険性が高いのは、鮮度が高い状態で供給される食用肉や内臓肉であり、生焼けの鶏肉も含まれる。特に、生の喫食を前提としている食肉の場合は、カンピロバクター食中毒の危険性が增大する。わが国において、これらの条件に該当し、既にカンピロバクターによる汚染・感染事例が確認されている食肉として挙げられるものには鶏肉(鮮度が高い状態で供給される場合が多く、時に生あるいは不完全な加熱調理を行って喫食される)および「牛のレバ刺し」(生食を前提に鮮度の高い状態で供給されるため)などがある。熟成期間の存在する牛生食肉などは、カンピロバクターは熟成期間中に死滅してしまうため主な伝播経路とは考えられない。

一般的には、鶏肉がヒトの食中毒の主な原因となっていると考えられている。本研究では、これら 2 種の動物由来株とヒト臨床分離株特徴を比較することにより、生産現場から、食肉さらにヒトへの感染を起こしうるカンピロバクターの菌株の流れと、抗生物質耐性獲得の伝播を効率よく把握できるものと判断した。各種抗生物質に対する耐性菌のリスク分析にあたり特に重要となるのは、医療機関における耐性菌の出現およびその影響に関する予測である。各種抗生物質に対する耐性菌のリスク分析にあたり、ヒトに感染を起こすカンピロバク

一がどのような由来でどのような経路から感染しているかを明らかにすることは重要である。

一般的に飼育の段階で抗菌物質に暴露される可能性が高い鶏肉に由来するカンピロバクター分離株には、抗生物質耐性菌が高頻度に出現することが調査により示されているが、抗生物質への暴露が鶏ほど多くないと思われる牛においては抗生物質耐性株の出現頻度は鶏肉由来に比べ低い。牛舎周辺由来株と鶏舎周辺由来株がヒト臨床株の遺伝子型との相関により、カンピロバクターがどのルートで感染しているかを推定可能と思われ、収集した生産現場分離株、ヒト臨床分離株の遺伝子型の特徴の比較を試みた。

市販鶏肉由来株は牛肝臓由来株に比べて高頻度に耐性を獲得していることを示したが、ヒト臨床分離株の耐性株の割合は鶏分離株の耐性割合より低い傾向がある(表1)。これまでの検討から、市販鶏肉由来株の耐性獲得が高く、牛肝臓由来株の耐性獲得が低値であることも示されており、ヒト臨床分離株が、鶏型と牛型の両者の遺伝子型を示すとすると、カンピロバクター食中毒に牛由来株がある程度寄与していることが示される。

図1～2に示すように東京都と大阪府のヒト臨床由来株のパルスフィールドゲル電気泳動法により遺伝子型分析を試み、遺伝子レベルで由来株の相関を解析した。図5に総合的な分析結果を示す。牛舎周辺由来株は4株分析したが、内1株(18B4)は鶏型と思われ、ヒト臨床株と鑑別できないクラスターを形成した。もう1株(17B8)は、ヒト臨床株とそれほど類似性は高くないが同

一の集団に含まれていた。一方、2株は、臨床株との相関性が低く、牛型の遺伝子型と思われる。

一方、図1～2で17C、18C、17L、18Lで示される鶏舎周辺由来株は、ヒト臨床分離株と同一のクラスターに含まれていた。これらの菌株は鶏型の遺伝子型と思われる。そのほとんどに耐性獲得が見られる。興味深いのはこれらのクラスターに牛舎由来株の1株が認められたことである。

この事実は以前行った鶏肉と牛レバー分離株でも見られた様に、牛と鶏の間である程度の菌株の移行が存在することを示すと思われる。菌株の移行により鶏で耐性を獲得したカンピロバクター菌株が牛へ移行しているものと考えられる。

研究班の研究分担者から、生産現場由来株とヒト臨床分離株の提供を受け、その菌株の特徴は表1～3に示したが、牛舎周辺由来株4株の内、3株は多剤耐性が認められなかった。抗生物質耐性菌の伝播・循環経路を推定し、鶏－牛間および家畜(食肉製品)を介したヒトへの健康影響の評価を検討する上で、重要なデータを取得・提供できたものと思われる。

鶏は飼育中に生産性向上のため飼料中に抗菌物質を使用することがあるため、これが鶏由来カンピロバクター分離株に抗生物質耐性菌が高率に出現する一因となりうるという指摘がある。一方、牛については病畜の治療として抗生物質の投与が行われてはいるが、一般的には飼育中に上述のような目的で鶏と同様には抗菌物質を使用しないと思われる。

鶏由来のカンピロバクター分離株と、牛由来のカンピロバクター分離株では、両者

から分離される型と鶏型、牛型と区別できる PFGE パターンがある。PFGE パターンによりある程度、その由来動物が推定可能である。

牛舎周辺由来株の一部は、遺伝子型は鶏型と思われヒト臨床由来株と同一のクラスターを形成していた。牛舎由来株の半数は、遺伝子型は牛型と思われ、ヒト臨床分離株とは遺伝子型がそれほど近くはなかった。鶏舎周辺由来株（産卵系、ブロイラー共）鶏型と思われる遺伝子型は、ヒト臨床由来株と同一のクラスターに含まれている株が多かった（図4）。

またパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型の比較により、牛舎周辺由来株の一部は鶏から移行したものである可能性が示唆された。以前の鶏肉及び牛レバー分離株の検討結果と同様、カンピロバクターの鶏-牛間の移動により、抗生物質耐性株の伝播・拡散があることが示された。

カンピロバクターについては、疫学データと PFGE 型からカンピロバクター食中毒は鶏肉からと牛肝臓の生食からのヒトへの伝播が推定された（図5）。分離株のゲノムレベルでの検討から、牛型と思われる特徴を持った遺伝子型が確認され、フルオロキノロン耐性率の低い牛からヒトへの伝播のルートがヒト臨床でのフルオロキノロン耐性の割合に影響を与えていると思われる（図6）。

②ESBL 産生大腸菌の検討

外来患者から ESBL 産生大腸菌が高率に分離される背景には、健常人の腸管内に ESBL 産生大腸菌の保菌があることが強く示唆された。その理由として、(1) 抗菌薬の

投与歴を有さない学生の便から ESBL 産生大腸菌が検出されたこと、(2) 健常人が保菌する大腸菌の CC 型が類似していたこと、(3) 大腸菌が保有する ESBL をコードする遺伝子が類似していたことが挙げられる。

健常人が ESBL 産生菌を保菌していたことから、食品を介した感染の可能性が考えられた。今回は国産鶏肉を対象に検討を加えた。国産鶏肉は高率に ESBL 産生大腸菌の汚染を受けていたが、大腸菌の CC と blaCTX-M の種類が明らかにヒト由来のものとなっていた。すなわち、ヒト由来株で検出頻度が高かった blaCTX-M-27 保有大腸菌や CC131 は、国産鶏肉からは検出されなかった。一部、国産鶏肉由来およびヒト由来大腸菌に共通の CC が認められたが、保有している ESBL をコードする遺伝子型が異なっていた。したがって、国産鶏肉由来大腸菌がヒトが保菌する ESBL 産生大腸菌に直接的に影響を与えているとは考えられなかった。

一方で、学生から blaCTX-M-8 保有大腸菌が分離された。さらに、データは示していないが blaCTX-M-8 保有 *Enterobacter cloacae* も学生から分離されていた。この blaCTX-M-8 陽性菌による感染症はブラジルからのみ報告されている。日本国内で流通する輸入鶏肉の 90%以上がブラジル産が占めることから、ブラジル産鶏肉の与える影響を排除することはできないと考えている。

また、データは示していないが、CC131 に属する大腸菌の 97.5%、ヒト由来の CC131 以外の大腸菌は約 67%、国産鶏肉由来株の約 20%がフルオロキノロン薬に耐性を示していた。やはり、CC131 に属する大

腸菌はフルオロキノロン薬に耐性を示すことが確認された。

近年急増している ESBL 大腸菌に関しては、患者および健常人から分離頻度されるオキシミノセファロスポリン薬耐性大腸菌急増の理由と、それに影響を与えると思われる国産鶏肉から分離される耐性菌の関連性を検討することを目的として研究を行った。オキシミノセファロスポリン耐性因子として、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (Extended-spectrum beta-lactamase: ESBL) を対象とし、大腸菌の関連性の検討には Multilocus sequence typing を実施した。2007 年に全国 72 施設から収集された患者由来大腸菌および健常人由来大腸菌の主要 ESBL は、(1) 67% が blaCTX-M-9 グループであり、特に blaCTX-M-27 の占める頻度が高いこと、(2) 大腸菌は Clonal complex (CC)131 が 61% を占めることが明らかとなった。世界的に注目されている、blaCTX-M-15 保有株も 14% を占めることが明らかとなった。

一方、国産鶏肉由来大腸菌は、(1) ESBL をコードする遺伝子は blaCTX-M-2 の検出頻度が高く全体の 44% を占め、(2) 大腸菌の CC 型に集積性は認められなかった。国産鶏肉から分離された大腸菌に、ヒト由来株で頻度の高かった ESBL をコードする遺伝子の blaCTX-M-27 や、ST131 に属する大腸菌は認められなかった。今回の研究からヒト由来株と国産鶏肉由来株の間に関連性がほとんどないことが示された。

E. 結論

カンピロバクター・ジェジュニについては、カンピロバクターの鶏-牛間の移動に

より、抗生物質耐性株の伝播・拡散があることが示された。また、疫学データと PFGE 型からカンピロバクター食中毒は鶏肉からと牛肝臓の生食からのヒトへの伝播が推定された。分離株のゲノムレベルでの検討から、牛型と思われる特徴を持った遺伝子型が確認され、フルオロキノロン耐性率の低い牛からヒトへの伝播のルートがヒト臨床でのフルオロキノロン耐性の割合に影響を与えていると推定された。

患者由来大腸菌および健常人由来大腸菌の主要な ESBL は、(1) 67% が blaCTX-M-9 グループであり、特に blaCTX-M-27 の占める頻度が高いこと、(2) 大腸菌は Clonal complex (CC)131 が 61% を占めることが明らかとなった。一方、国産鶏肉由来大腸菌は、(1) ESBL をコードする遺伝子は blaCTX-M-2 の検出頻度が高く全体の 44% を占め、(2) 大腸菌の CC 型に集積性は認められなかった。以上から ESBL 産生大腸菌では、ヒト由来株と国産鶏肉由来株の間に関連性がほとんどないことが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

口頭・ポスター発表

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
- 論文発表
1. 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.
2. 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.

P1

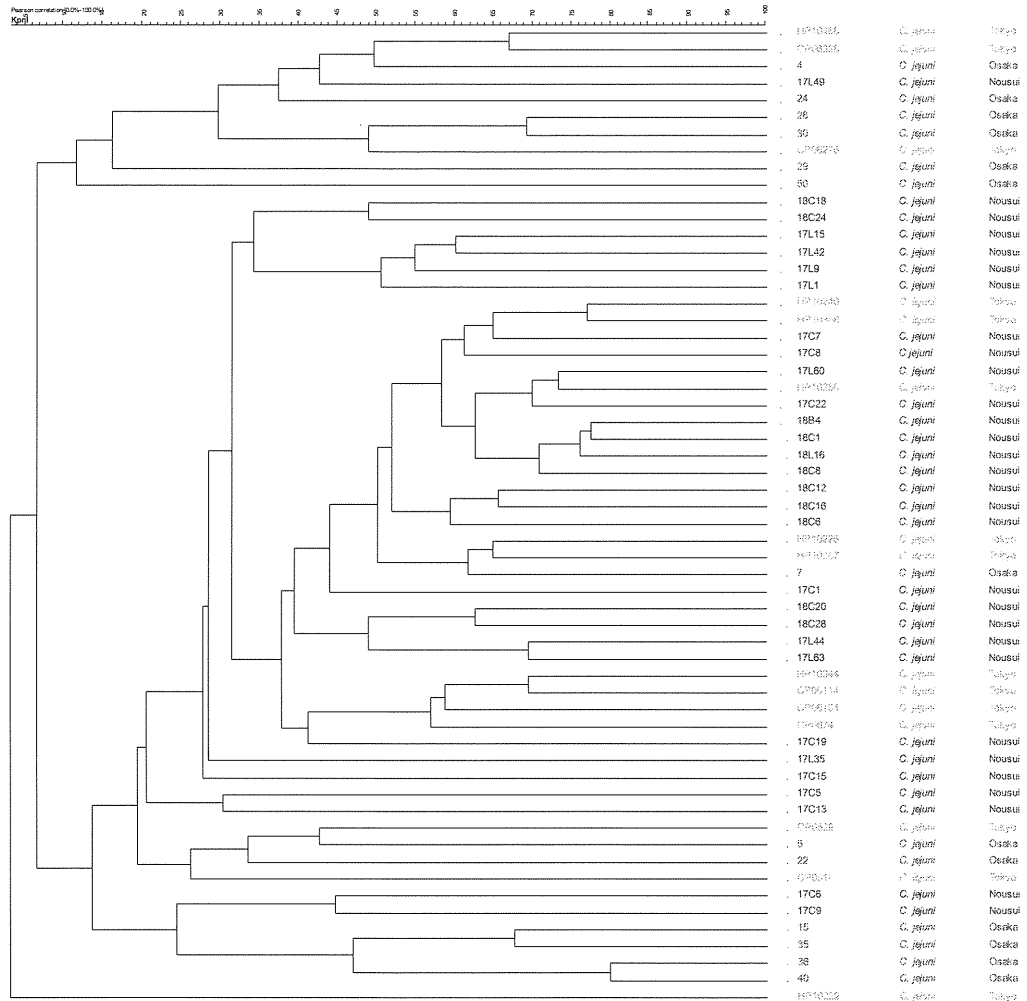


図 1. 環境由来及び臨床由来株の PFGE パターンによる系統樹 (その 1)

P2

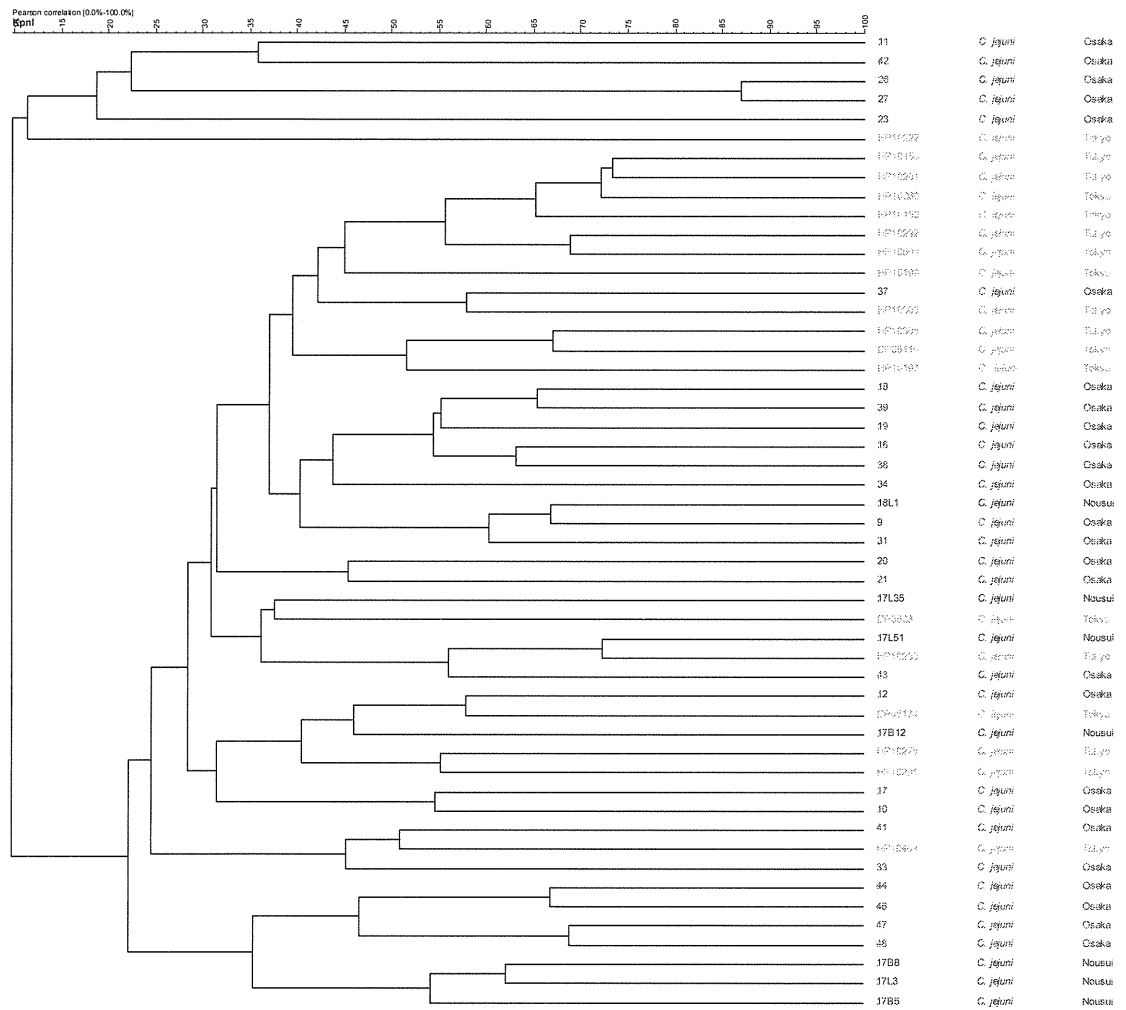


図2. 環境由来及び臨床由来株の PFGE パターンによる系統樹 (その2)

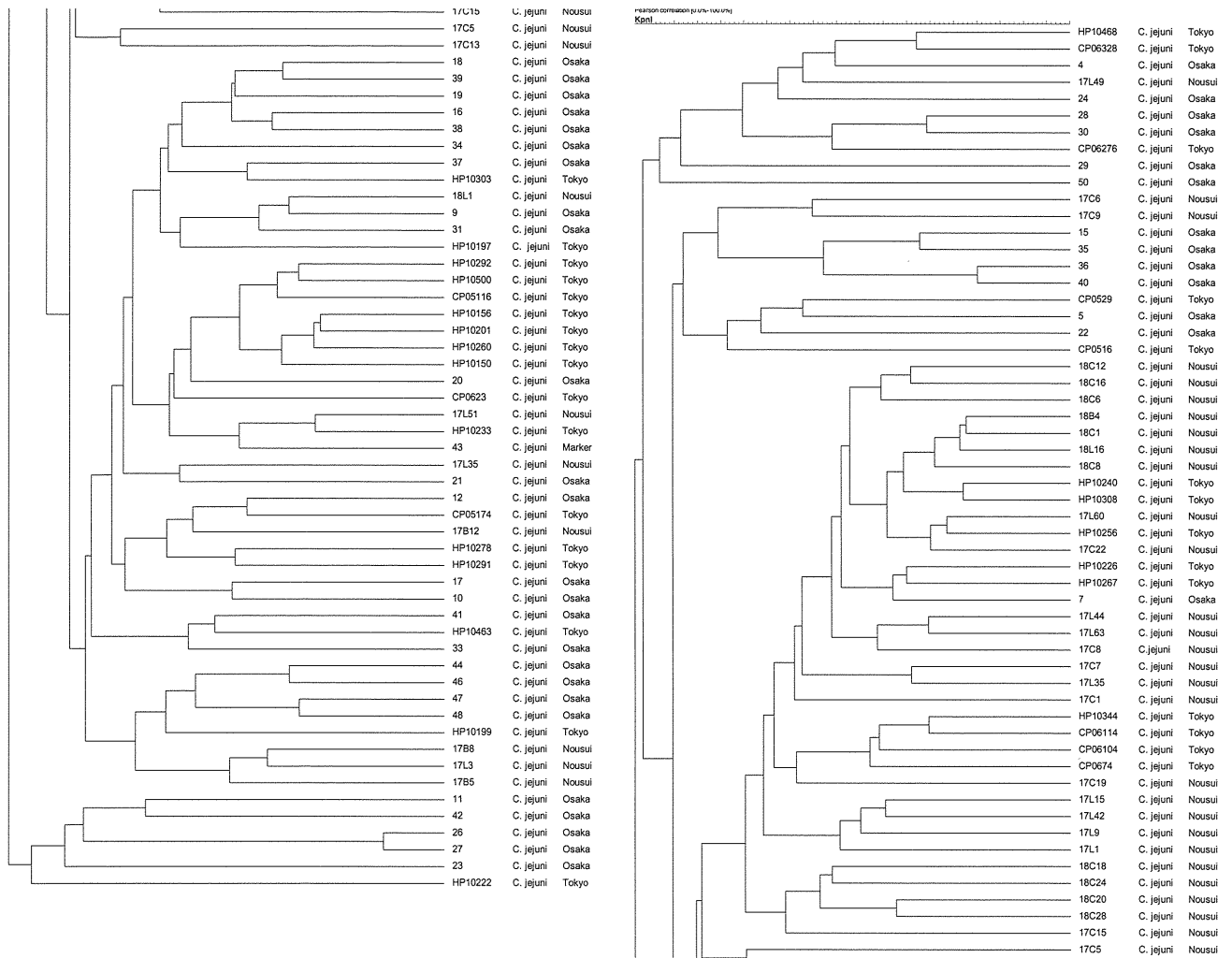


図3. 環境由来及び臨床由来株の PFGE パターンによる系統樹 (図1 と図2 を統合したもの)

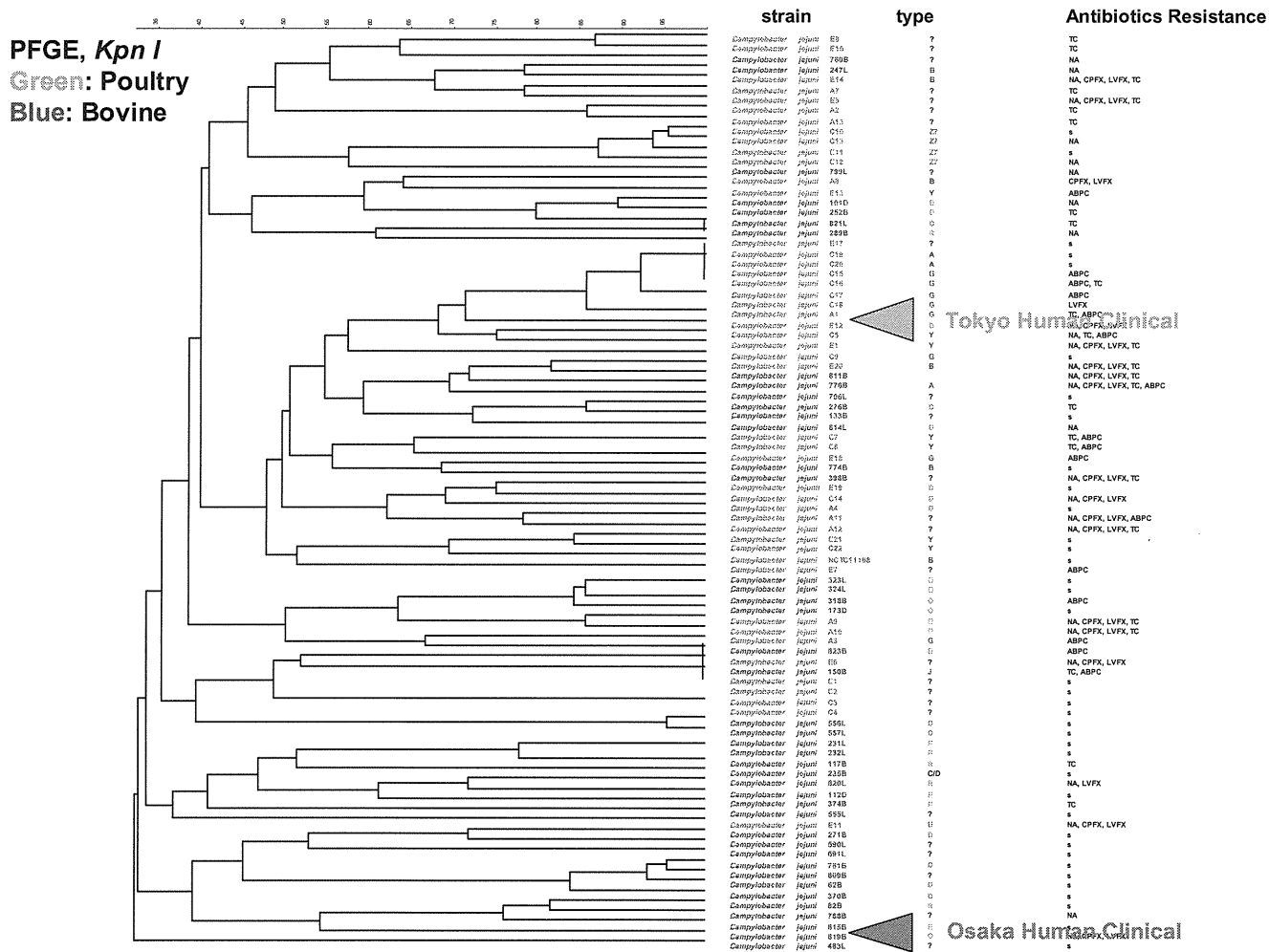


図4. 牛および鶏由来株の PFGE パターンと臨床由来株 2 株の系統樹の位置

表1. カンピロバクターの抗生物質耐性獲得情況比較 (ヒト分離株、市販鶏肉、牛由来株の比較)

	ヒト臨床由来株※ (%)		市販鶏肉由来株* (%)		牛肉由来株* (%)	
分離株総数	655		137		45	
抗生物質						
NFLX耐性	214	(33)	56	(44)	NT**	
OFLX耐性	213	(33)	58	(42)	NT	
CPFX耐性	214	(33)	57	(42)	6	(13)
NA耐性	202	(31)	71	(52)	14	(31)
TC耐性	108	(16)	42	(31)	9	(20)
EM耐性	2	(0)	6	(4)	1	(2)
6薬剤感受性株	330	(50)	47	(34)	24	(53)

※: ヒト臨床株のデータはカンピロバクター・リファレンスセンターより2006年度のデータの提供を受けた。

*: MP法によりMICおよび耐性・感受性を判定。

** : Not tested

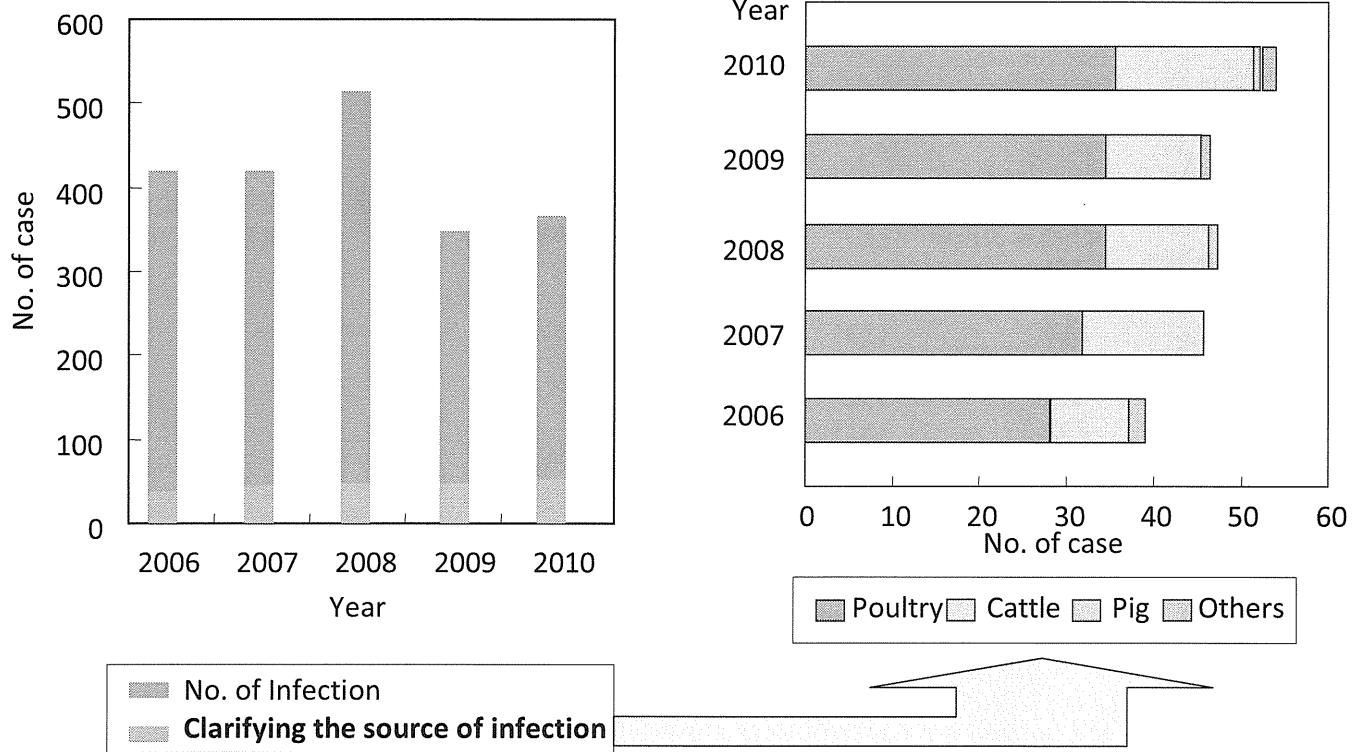
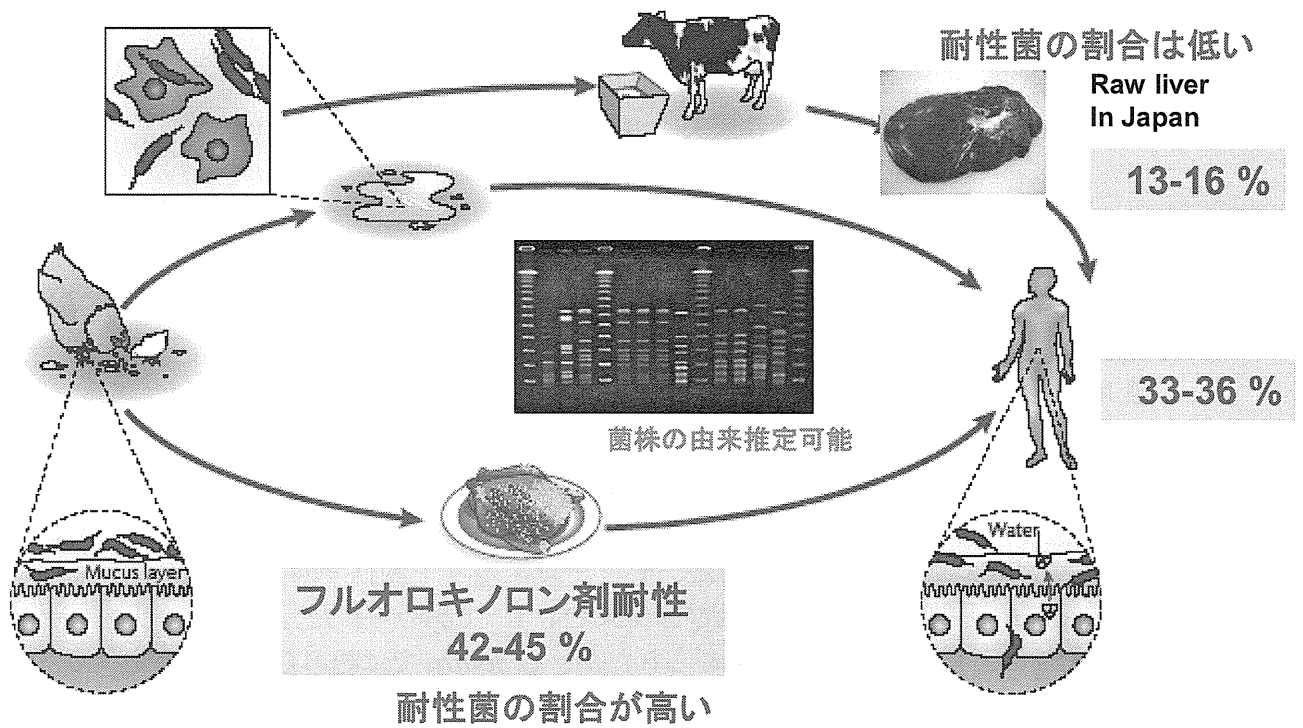


図5. 国内のカンピロバクター食中毒の原因となった食品の由来動物(食中毒統計より)



原図Nat Rev Microbiol. (2007) を基にデータの結果から改変

図6. *Campylobacter jejuni* の伝播とフルオロキノロン剤耐性株の割合に関する考察

平成23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

分担研究者：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：臼井 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分布状況を把握するため、家畜衛生分野における薬剤耐性菌実態調査システム（JVARM）等で収集したサルモネラ及びカンピロバクターの薬剤感受性を調査した。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、サルモネラでは認められなかったが、カンピロバクターでは *C. jejuni* で 24%、*C. coli* で 38% に認められた。また、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。また、エリスロマイシン耐性は、*C. coli* で 45% に認められたが、*C. jejuni* では認められなかった。

家畜由来セファロスポリン耐性サルモネラ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 優勢であった。また、CMY-2 保有プラスミドのレプリコン型は、大腸菌と同じタイプも認められた。

食肉由来 MRSA と豚由来 MSSA の遺伝子型を調べた。MRSA ST398 は認められなかったが、メチシリン感受性株で ST398 が認められた。

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手法について国際的に議論されている。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。

本研究では、国内で収集し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世代セファロスポリンに対する耐性因子の伝播を検討するためサルモネラと大腸菌に由来するプラスミドを比較した。さらに、欧米で家畜関連 MRSA (ST398) が問題となっているため、国内の豚及び食肉由来ブドウ球菌の遺伝子型を調査した。

B. 研究方法

(1)サルモネラの薬剤感受性：

2010 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 186 株（牛由来 94 株、豚由来 59 株、鶏由来 33 株）を用いた。薬剤感受性は、CLSI 法に準じた微量液体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)、セフトキシム (CTX)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、テトラサイクリン (TC)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST) 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 のガイドラインに基づき決定した。

(2) 供試カンピロバクター株 :

2010 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 254 株 (肥育牛由来 54 株、肥育豚由来 62 株、採卵鶏由来 70 株及びブロイラー由来 68 株) を用いた。薬剤感受性は、CLSI 法に準じた微量液体希釈法により実施した。供試薬剤は、ABPC、GM、TC、CP、エリスロマイシン (EM)、NA、CPFX の 7 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) 及び MIC 分布に基づき設定した。

(3) セファゾリン耐性サルモネラの性状解析 :

健康な家畜から分離された CEZ (MIC ≥ 32) 耐性サルモネラ 20 株 (牛由来 12 株、鶏由来 7 株、豚由来 1 株) を供試した。

β -ラクタマーゼ型は、TEM、SHV、PSE、AmpC (groups ACC, FOX, MOX, CIT) 及び CTX-M を対象に PCR 法でスクリーニングを行い、PCR により全長を増幅後、ダイレクトシーケンスにより決

定した。

混合培養法でプラスミド伝達試験を行い、得られたトランスコンジュガントを用いて、Inc 型を PCR 法で決定するとともに、プラスミドの RFLP 型を調べた。

(4) 健康ブロイラー由来大腸菌の MLST 型別 :

2009 年に国内の健康ブロイラーから分離された 78 株を用いて、MLST 型を決定した (<http://mlst.ucc.ie/>) 。

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、セフトフル (CTF)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、KM、GM、オキシテトラサイクリン (OTC)、CL、CP、NA、エンロフロキサシン (ERFX)、TMP の 12 薬剤を用いた。

(4) 食肉由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 及び豚由来メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) の遺伝子型及び各種抗菌性物質に対する感受性 :

2008~2009 年に食肉から分離された MRSA5 株と 2003~2009 年に豚から分離された MSSA15 株の遺伝子型及び各種抗菌性物質に対する感受性を調べた。遺伝子型は、multilocus sequence typing (MLST) 型 (Enright ら 2000) と Spa type (Ridom SpaServer、<http://spa.ridom.de/index.shtml>) を決定した。

抗菌性物質感受性試験は、CLSI 法に準じた寒天平板希釈法により、亜鉛 (ZnCl)、銅 (CuSO₄)、コバルト (CoCl₂) クロルヘキシジン (CHX) 及び塩化ベンザルコニウム (BZKCl) を対象に実施した。

C. 研究結果

1. 2010 年度分離サルモネラの薬剤感受性 (表 1, 2)

収集したサルモネラ株の主な血清型は、Typhimurium (74株)、Choleraesuis (28株)、Enteritidis(15株)、Infantis (13株)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(CPFX)耐性は認められず、セファロsporin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。

2. 2010 年度分離カンピロバクターの薬剤感受性 (表 3)

*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。

3. セファゾリン耐性サルモネラの性状解析(図 1、図 2、表 4、表 5)

β -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 β -ラクタマーゼ型は不明であった。

トランスコンジュガントのプラスミドのInc型に基づいて、大腸菌に由来する同じInc型のものと制限酵素切断像を比較した。IncI1プラスミドでは、サルモネラと大腸菌由来プラスミド間で類似した像は見られなかった(図1)。IncI γ プラスミドでは、サルモネラ由来プラスミドのEcoR1切断像は、一部の大腸菌由来プラスミド(図1 レーン4,5,6,9,10)と類似していたが、Cla1切断像は異なっていた。IncNプラスミドでは、Cla1切断像は類似していたが、EcoR1切断像は異なっていた(図3)。

4. 健康ブロイラー由来大腸菌のMLST型別

同じ薬剤感受性を示した同一個体由来株を除く大腸菌78株を用いて、MLST型別とPhylogenetic型別を実施した。MLST型は、44型に分けられた。ST10が最も多く(12株)、ST155(9株)、ST117(4株)の順であった。

Phylogenetic型は、A群(35株、17MLST型)が最も多く、B1群(28株、17MLST型)、D群(14株、9MLST型)であった。B2群は1株(ST2427)で認められた。

Phylogenetic型に基づいて各種薬剤に対する耐性割合を比較すると、D群でNA耐性の割合が高かった($P < 0.05$)が、その他では認められなかった。

5. 食肉由来MRSA及び豚由来MSSAの遺伝子型及び抗菌性物質感受性

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MSSA15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。

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。家畜由来セファロスポリン耐性大腸菌が保有するβ-ラクタマーゼはCMY-2が優勢であることを示したが、サルモネラにおいても同様に、CMY-2が多く認められた。今回、セファロスポリン耐性プラスミドの大腸菌からサルモネラへの水平伝播を検討するため、プラスミドの制限酵素切断像を比較した。2種類の制限酵素の切断像で一致するものは認められなかったが、一方のものでは一致するものもあった。このことは、同一のプラスミドではないが、近縁な関係を示唆すると考えられる。耐性因子の伝播を明らかにしていく上で、より詳細かつ明確な解析方法が必要である。

現在、食品安全委員会において、鶏用フルオロキノロン剤のリスク評価が行われている。鶏から腸管出血性大腸菌が分離されないことから、大腸菌が新たにハザードとして加えられた。人の臨床分離株では、Phylogenetic型B2が多く認められるが、動物では異なることが知られている。今回、国内の健康なブロイラー由来株を用いて解析したところ、B2はほとんど認められず、これまでと同様な成績であった。しかし、MLST型の解析では、健康なブロイラーにおいて、人の臨

床分離株で認められるMLST型の大腸菌が分布することが明らかとなった。今後、病原因子の保有状況等についても解析を進めていく必要がある。また人の尿路感染症において注目されているMLST型(ST131)は認められなかった。さらに、薬剤感受性との関係では、Phylogenetic型DでNA耐性の割合が高く、系統間で耐性保有に差がある可能性が示唆された。今後、株数を増やしてより詳細な検討を進めていく必要がある。

欧米では家畜関連MRSA ST398が大きな話題となっている。2005年にオランダで家畜、特に豚におけるST398の保菌が問題となり、ヨーロッパで大規模な調査が行われている。また、米国の豚からも分離され、ST398の汚染拡大が懸念されている。アジアでは、シンガポール、タイ、中国でST398が分離されているが、中国やマレーシアの調査ではST398とは異なるMRSA ST9の浸潤が示されている。豚肉を含む食肉由来MRSAにおいてST398は認められなかったが、豚由来MSSAでST398とともにST9が認められた。諸外国の豚由来MRSAのST型と同じであったことから、国内への侵入防止と国内の養豚を含む畜産での実態把握は積極的に行っていく必要があると考えられる。また、ヨーロッパで分離されるMRSAST398の多くが亜鉛耐性を示すことが報告され、養豚における亜鉛の使用とST398の分布との関連が疑われている。ヨーロッパの養豚では、亜鉛は離乳後下痢症の予防に飼料添加される(1000-2500 ppm)。今回の調べたMRSAとMSSAにおいて亜鉛、銅、コバルト、消毒剤に対する耐性も認められなかった。国内では、豚の発育ステージによって亜鉛と銅の添加濃度の基準値が示され、飼料中のこれらの濃度について定

期的な検査が実施されている。これらの規制が、MRSA の出現防止に関与しているかについて継続的なモニタリングが必要である。

E. 結論

家畜から分離されたセファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラは、近縁なプラスミドを保有することが示唆された。人の医療や海外の家畜で問題となる耐性菌は認められなかったが、継続的なモニタリングが必要である。さらに、海外の動向につい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. 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).

2. 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.
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 73, 279-282, 2011.

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。