

201131013A・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 21～23 年度総合研究報告書

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……………101

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 所長

#### 2. 平成 21～23 年度分担総合研究報告書

(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……………108

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……………117

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……………132

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ジメントに関する研究……………143

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	東邦大学医学部微生物・感染症学講座
	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
	舘田 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

(V) 家畜由来腸内細菌の疫学的研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・159

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・・・・・・・・・・・・・・・・172

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・・・・・・・・・・・・・・・・184

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	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	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
	久米田裕子	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・・・・・・・・・・・・・・・・198

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・・・・・・・・212

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

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
田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
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
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.....231

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：

ヒト、家畜、食品から分離されるサルモネラ、カンピロバクテラ、大腸菌等の薬剤耐性菌について高度技術（ゲノム配列の決定、ゲノム情報に基づくタイピング）を用いての解析法の確立を行い、サーベイランスへの応用を試みた。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全ゲノム配列を解読した。血清型特有の 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を抽出しデータベース化した。*S. Typhimurium* 高度フルオロキノロン多剤耐性株 T000240 の全ゲノム解読を行い、特徴的な薬剤耐性アイランド (Class I integron) の 2 loci を見い出すとともに、耐性プロファイルに対応する耐性遺伝子マーカー全てを明らかにした。また、わが国で分離されたカルバペネム耐性を示す NDM-1 保有大腸菌株のゲノム解読を行い、NDM-1 遺伝子が腸内細菌科に幅広く同定される IncA/C プラスミドを介して水平伝播していることを明らかにした。いくつかの NDM-1 耐性株の比較から、NDM-1 遺伝子自体は同一配列であるが隣接配列の多様性が存在していた。NDM-1 遺伝子が水平伝播する過程に多様性が存在することになる。これら解析結果から、耐性遺伝子は IS 等の挿入配列を介して種々の遺伝体（プラスミドやファージ）に入り込み、それを介してさらに水平伝播していることが明らかになった。それら伝達様式の詳細を明らかにするためには各病原体株間に存在するプラスミドの系統的なゲノム解析が重要であることも示された。

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、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 *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、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

### 1) 薬剤耐性の疫学

(1) 家畜由来サルモネラの薬剤感受性

2008-2010年度に収集した家畜由来サルモネラ 507 株を対象に薬剤感受性を調べた。牛由来株では、ABPC (26.2-54.3%)、DSM (70-91.7%)、KM (18.0-23.4%) 及び OTC/TC (33.3-53.2%) に対する耐性が高率に認められた。豚、鶏由来株でも、耐性が高率に認められた。全畜種で、ERFX 耐性は認められなかったが、CEZ 耐性は、鶏由来 4 株 (Infantis 3 株と Agona 1 株)、牛由来 2 株 (Typhimurium) 及び

豚由来1株 (04:i:-)で認められた。

(2) 家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性

2008-2010 年度に分離された *C. jejuni* 419 株では ABPC (13.8-17.4%)、OTC/TC (29.0-46.7%)、NA (17.0-27.0%) 及び ERFX/CPFX (16.0-24.3%) に耐性が認められた。EM 耐性 *C. jejuni* は認められなかった。

(3) セファロsporin耐性大腸菌及びサルモネラ

健康な家畜から分離されたセファゾリン (CEZ) 耐性 (MIC 32 µg/ml) 大腸菌 78 株 (牛由来 2 株、豚由来 1 株、ブロイラー由来 65 株及び採卵鶏由来 10 株) の CMY-2 は 47 株 (60.2%) と最も多く、CTX-M 型や SHV 型の ESBL 産生株も認められた。PFGE 遺伝型は多様であった。

ブロイラー由来 CMY-2 産生大腸菌 41 株中 34 株から接合伝達株が得られた。主要な伝達性プラスミドのレプリコン型は、4 種類 (IncI $\gamma$ 、IncA/C、IncB/O 及び IncI1) であった。また、CEZ 耐性サルモネラの CMY-2 耐性プラスミドのレプリコン型も、IncA/C (5 株)、IncI1 (2 株)、IncI $\gamma$  (1 株) であり、それら遺伝子はプラスミドを介して大腸菌間あるいは大腸菌-サルモネラ間を移動している可能性が考えられた。

(4) 豚におけるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分布

豚から採取した鼻腔スワブ 115 検体と糞便 115 検体の 1 検体から MRSA が分離された。分離 MRSA 株は、MLST:ST221/spa-type:t002/SCCmec:UT であった。分離された MSSA15 株の MLST 型は ST398、ST9、ST5、ST97 及び ST705 で、欧米 (ST398) やアジア (ST9) で問題となっている MRSA と同じ MLST 型の MSSA が国内の

豚にも広く分布していることが示唆された。現状では国内の豚における MRSA の分布は低度であるが、海外からの MRSA の侵入や国内での MRSA の出現には注意していく必要がある。

(5) 大腸菌及びサルモネラのカルバペネムに対する感受性

健康家畜から分離されたセファゾリン耐性大腸菌 119 株、病畜から分離されたセファゾリン耐性大腸菌 38 株及び家畜から分離されたセファゾリン耐性サルモネラ 16 株を用いてイミペネムの MIC を調べたが、耐性株 (NDM-1 様株) は認められなかった。

## 2) ゲノムの解析

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。入手可能な *S. enterica* のゲノム情報 (30 株) と、今年度解読した全ゲノム情報 20 株の計 50 株のゲノム情報を統合し、血清型特有の 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を抽出しデータベース化した。

Enteritidis の薬剤耐性株のゲノム解読により、耐性株の特徴的な PFGE プロファイルは IS10 挿入に起因することを明らかにした。

Typhimurium 薬剤耐性株 T000240 の全ゲノム解読を製品評価技術基盤機構との共同研究で行い、特徴的な薬剤耐性アイランド (Class I integron) を 2 loci 見だし、耐性プロファイルに対応する耐性遺伝子マーカー全てを明らかにした。

カルバペネム耐性を示す NDM-1 保有大腸菌株のゲノム解読を行い、NDM-1 遺伝子が腸内細菌科に幅広く



同定される IncA/C プラスミドを介して水平伝播していることを明らかにした。NDM-1 遺伝子の隣接配列の解析から、植物病原菌として知られる *Pseudoxanthomonas* 属等から NDM-1 遺伝子を獲得している可能性が示唆された。

家畜および食中毒由来 *Campylobacter jejuni* 16 株のゲノム配列を解読し、PFGE, MLST 型の遺伝型情報を含めた系統分類解析を行った。家畜と食中毒由来の間で類縁の系統を示す分離株を見出せたことから、ゲノム情報に基づく系統分類法は *Campylobacter* 食中毒の原因食材のトレースに有用だと示唆された。

#### 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。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た。しかし、幸いなことに 2008～2010 年の調査では、フルオロキノロン高度耐性株は検出されなかった。その理由は不明であるが、農場で家畜へのフルオロキノロン剤の不要な投与が控えられているのかもしれない。しかし、今後の継続的なモニタリングは不可欠である。

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た。2008 年からの調査においても CEZ 耐性は、鶏由来 4 株 (Infantis 3 株と Agona 1 株)、牛由来 2 株 (Typhimurium) 及び豚由来 1 株 (04:i:-) で認められた。健康な家畜から分離されたセファゾリン (CEZ) 耐性 (MIC 32  $\mu$ g/ml) 大腸菌 78 株 (牛由来 2 株、豚由来 1 株、ブロイラー由来 65 株及び採卵鶏由来 10 株) の CMY-2 は 47 株 (60.2%) と最も多く、CTX-M 型や SHV 型の ESBL 産生株も認められ、かなりの高頻度の耐性化が進んでいる現状が明らかにされた。菌の PFGE 遺伝型が多様であったことから、クロナールな菌株の広がりではなく、おそらくプラスミドを介して多種の菌株に伝播・拡大していることを示していると考えられた。

そのことは下記の事実からも示された：ブロイラー由来 CMY-2 産生大腸菌 41 株中 34 株から接合伝達株が得られた。主要な伝達性プラスミド

のレプリコン型ルモネラの CMY-2 耐性プラスミドのレプリコン型も、IncA/C (5 株)、IncI1 (2 株)、IncI $\gamma$  (1 株) であり、それら遺伝子はプラスミドを介して大腸菌間あるいは大腸菌—サルモネラ間を移動している可能性が考えられた。

臨床でいくつか分離されている NDM-1 耐性株は、調べた限りでは家畜由来、食品由来のサルモネラ、大腸菌株からは分離できなかった。海外におけるその伝播拡大からすれば、わが国にいつ入ってきてもおかしくはない。注意深く監視を続けていくことが重要である。

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。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 2006～2007 年において ERFX 耐性が、*C. jejuni* と *C. coli* とともに増加傾向にあったが、2008～2011 年の調査では現状維持が続いていた。また、*C. jejuni* の EM 耐性の増加も見られていない。今後増加しないことを望みつつ、動向の継続調査が必要である。

近年食肉等に含まれる MRSA の人への感染が注目された。前回の研究班で我が国の市販食肉および食中毒関連食品中の MRSA 汚染を調べた結果、市販食肉（豚肉および牛肉）および食中毒関連食品（鶏もも肉、豚バラ肉、焼き鮭）から 0.8～1.0% と僅かではあるが MRSA が検出された。今期では、豚から採取した鼻腔スワブ 115 検体と糞便 115 検体の 1 検体から MRSA が分離された。分離 MRSA 株は、MLST:ST221/spa-type:t002/SCCmec:UT であった。分離された MSSA15 株の MLST 型は ST398、ST9、ST5、

ST97 及び ST705 で、欧米 (ST398) やアジア (ST9) で問題となっている MRSA と同じ MLST 型の MSSA が国内の豚にも広く分布していることが示唆された。現状では、家畜由来で臨床問題となっている ST398 型 MRSA は国内の豚から分離されていなかったが、MSSA には存在するので、海外からの MRSA の侵入や国内での MRSA の出現には注意していく必要がある。

サルモネラのゲノム解析から、多剤耐性化に IS 挿入配列やインテグロン、トランスポゾンなどの動く遺伝子が関与していることを分子レベルで示した。それらが耐性遺伝子の菌株間の伝播に、又はゲノムの多様性に深く関わっていることも明らかにされた。ゲノム解析結果から SNP を菌株、あるいは血清型間の差違の検出に利用可能であることも明らかになった。耐性菌株の動物—食品—ヒトへの移動解析のツールとしても有用でもある。今後、全ゲノム解析がより安価で、より容易になる時代が間近である。今回の研究班でその解析手法が、耐性菌の分子疫学解析のひとつの有用な手段となることが示せた。

また、今回の研究班の成果として強調すべきことは、今後、家畜由来株の性状解析を進めるとともに、家畜・食品・人症例由来株の関連を検討するためには、有用な疫学マーカーとして各菌株の保持するプラスミドのゲノム情報のデータベースの構築とその比較解析が不可欠なことである。

## E. 結論

家畜に分布するサルモネラ、大腸菌の薬剤感受性状況を調査した結果、医療上重要なセファロスポリンに対

する耐性が増加していることである。特にブロイラー由来 CMY-2 産生大腸菌やサルモネラの増加である。それらの耐性遺伝子が“動く遺伝子”を介してプラスミドに移動し、そのプラスミドが異なる菌株あるいは菌種間に伝播している可能性が強く示唆された。今後の耐性菌対策、リスク評価を考えていく上で重要である。

**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大腸菌において医療上重要な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**  
別紙に記載

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. 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。

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。

7. 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. 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、現行の型別法を、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 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 (*Xba*I 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 *Bln*I を使用した場合には、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考えられる。

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望まれる。そこで遺伝子型別の候補の一つとして CRISPR の解析を行った。

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 (図 3)。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リピートは 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ことが明らかとなった。

4. *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 4)。供試菌株は散發事例由来 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。

5. 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 5）。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。得られたアレ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 6）。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、より精度の高い疫学解析手法が求められるようになってきている。本研究ではサルモネラ食中毒の代表的な血清型である SE を中心に、耐性率の変化をモニターしてきている。また、SE を含めたサルモネラの伝播状況を明らかにすべく、疫学解析手法の高度化を図ってきた。ファージ型別、PFGE・MLVA・CRISPR 等の分子疫学手法の評価を行った。さらに、ゲノム配列情報をベースに SNP 抽出を行い、約 80 箇所のゲノム上の違いを見

る新規手法を設計した。本法により、47 株から 35 の型を得ることができた。本法をファージ型別、薬剤感受性試験、PFGE 等の既存の方法と併用することで、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. 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.
2. 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。
3. 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.
4. 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.

5. 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。

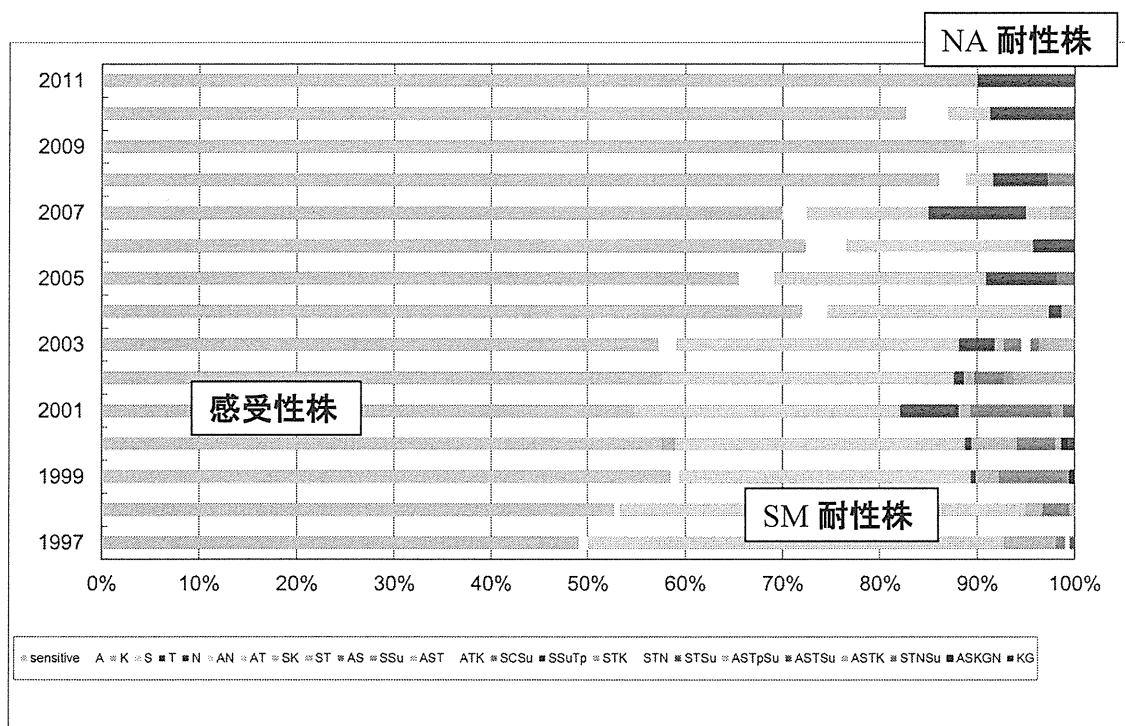


図 1. SE 集団事例関連株薬剤耐性パターンの推移 (1997-2011 : 2012 年 1 月現在)。

	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)。

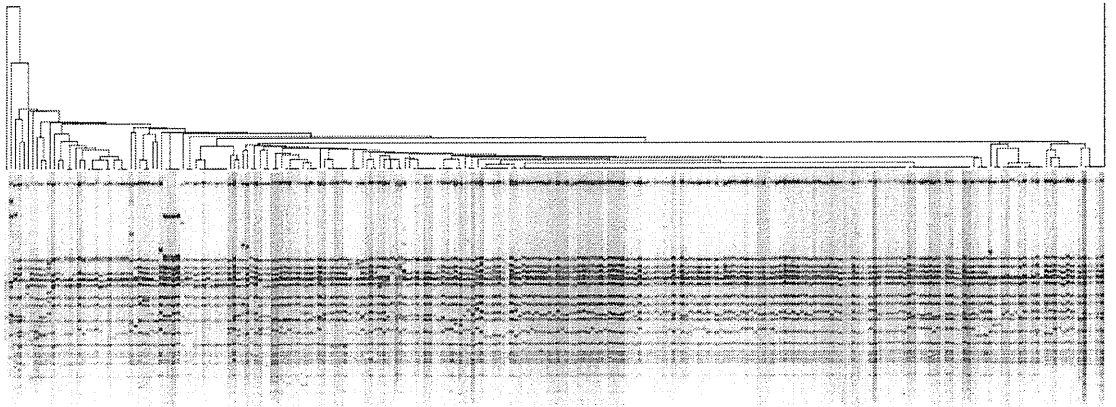
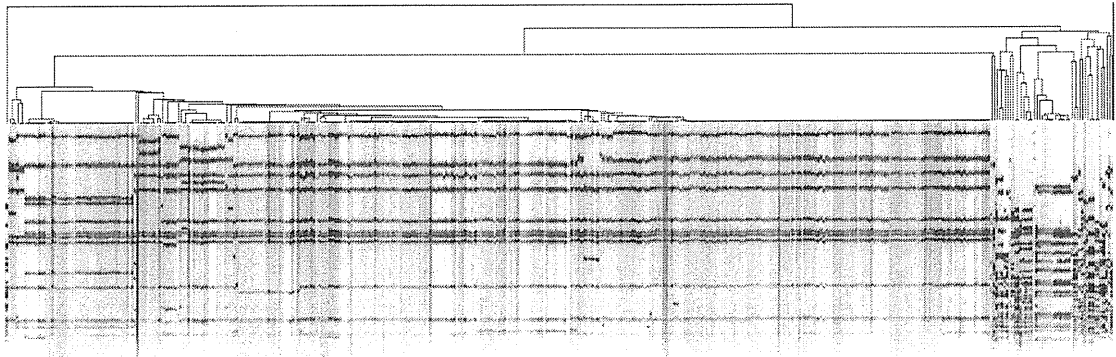


図 2. (上) SE の BlnI-PFGE によるクラスター解析。(下) SI の XbaI-PFGE によるクラスター解析。

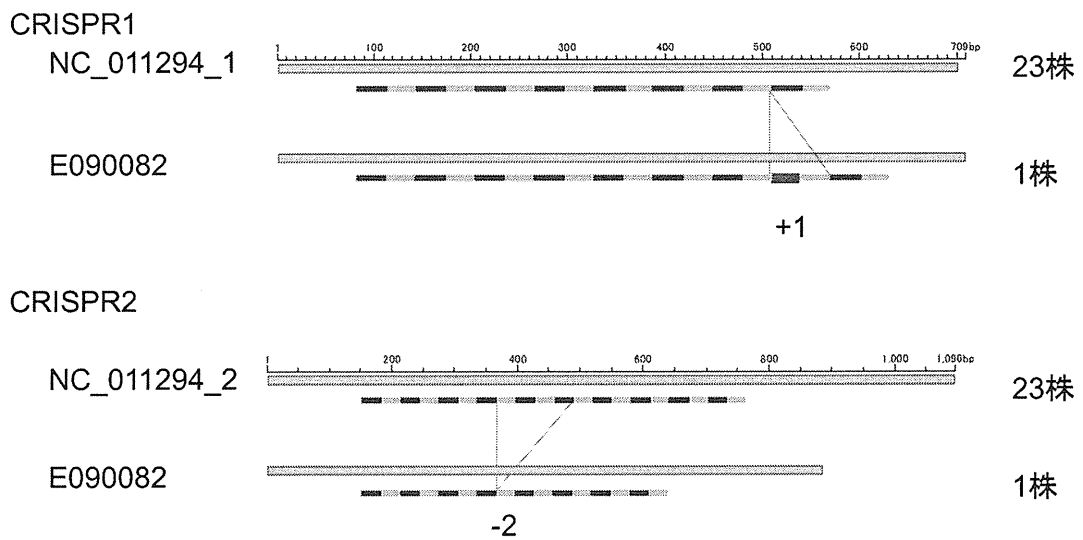


図 3. CRISPR 配列の多様性に関する検討



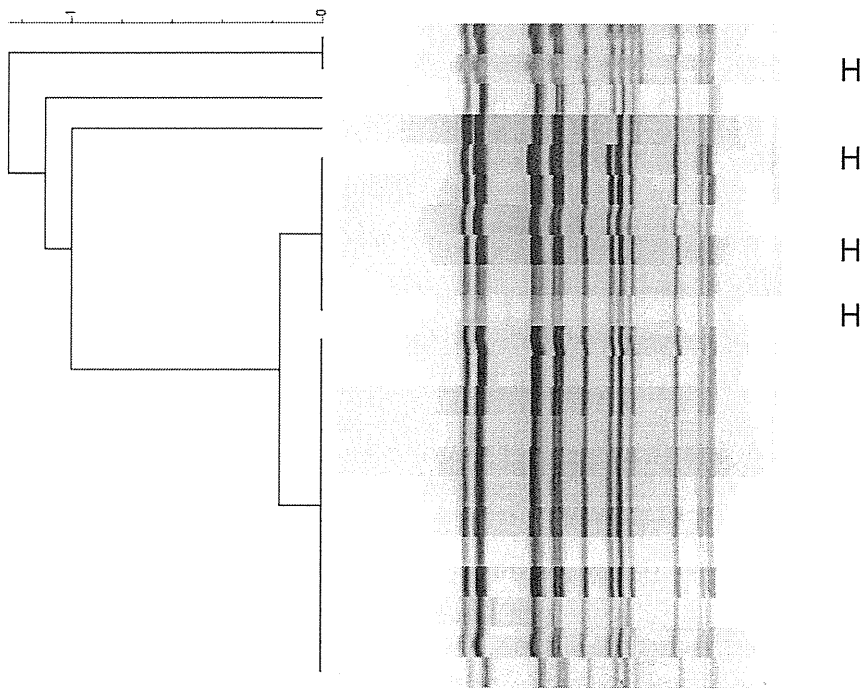


図 4. *S. Manhattan* の PFGE 解析。使用制限酵素は *Xba*I。解析条件：UPGMA、トレランス 1.2%。上の数字は異なるバンドの本数を表す（計算上のもの）。右にある H は散発事例由来であることを示す。

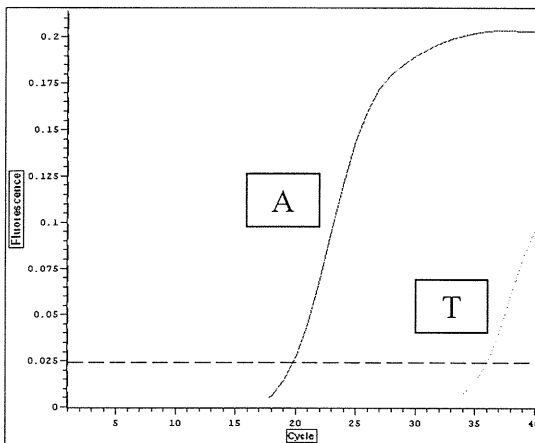
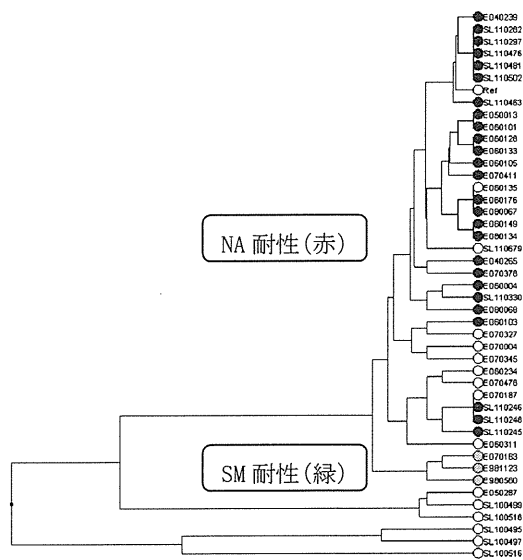


図 5. リアルタイム MAMA-PCR によるアリル検出例。図の場合、当該アリルは A となる。

A)



B)

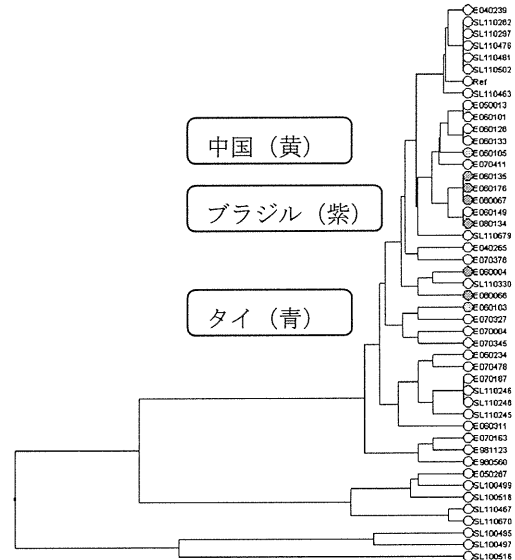


図6. MAMA-PCRの結果に基づく79箇所のアリルによる系統樹。(A)耐性パターンによる比較。(B)鶏肉由来株の産地による比較。