



表1. 鶏肉由来耐性菌が保有する耐性遺伝子とプラスミドの性状(2008年)

遺伝子型	菌株番号	菌種	伝達効率	不和合性
	TUM 4359	大腸菌	1.7×10^{-8}	ND
	TUM 4360	大腸菌	形質転換	ND
CTX-M-2	TUM 4381	<i>E.cloacae</i>	2.3×10^{-7}	ND
	TUM 5315	肺炎桿菌	3.0×10^{-6}	ND
	TUM 5473	大腸菌	7.4×10^{-7}	I1-I γ
CTX-M-8	TUM 4380	<i>E.cloacae</i>	9.4×10^{-5}	FIB,F
	TUM 5318	肺炎桿菌	6.3×10^{-4}	N
CTX-M-9	TUM 5472	肺炎桿菌	2.3×10^{-4}	N
CTX-M-14	TUM 4384	大腸菌	2.2×10^{-5}	FIB,F
CTX-M-15	TUM 4385	大腸菌	1.4×10^{-4}	I1-I γ

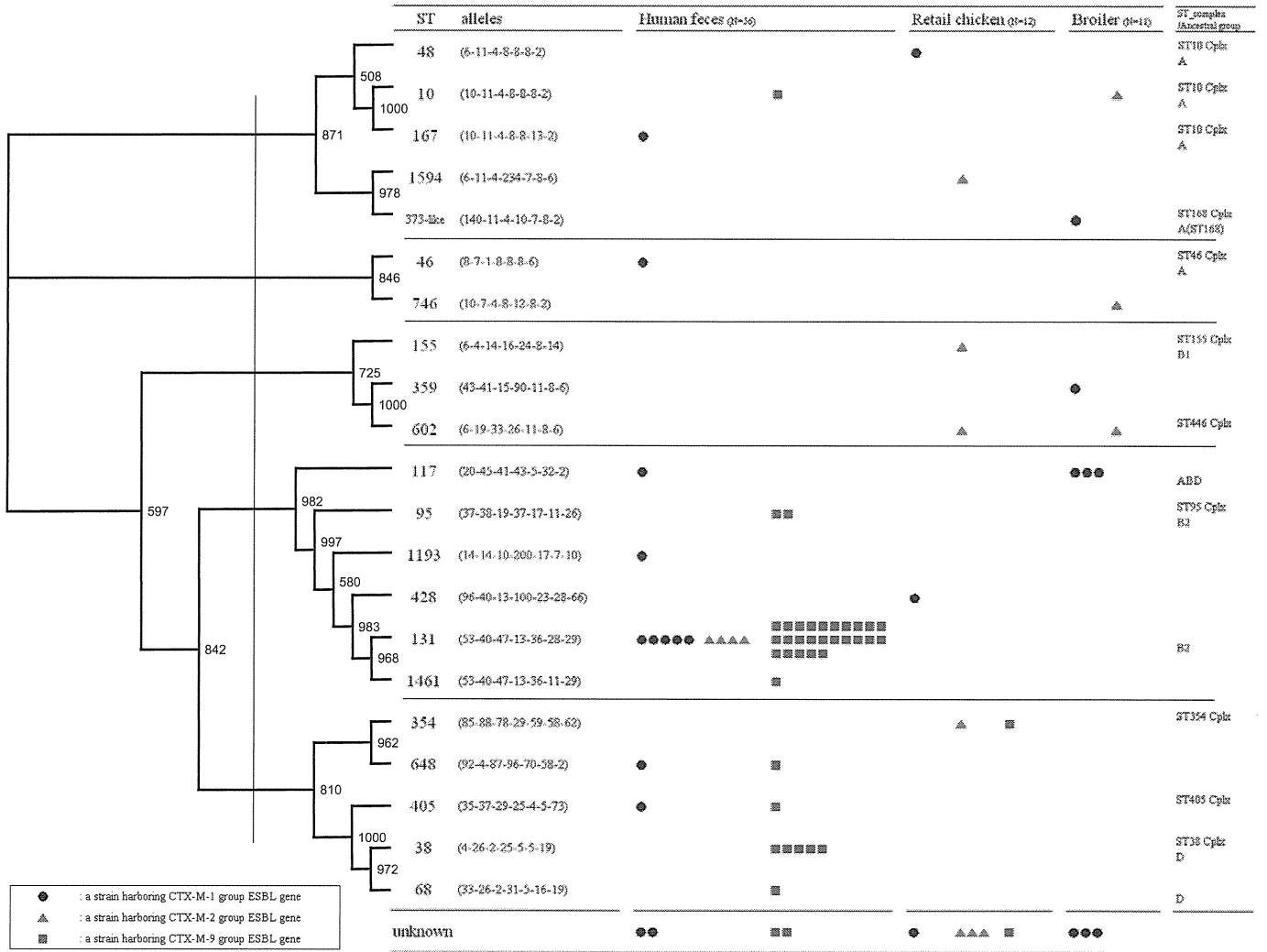


图 6.

平成21~23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、人の細菌感染症の治療を困難にするという問題に対して、科学的なリスク分析が必要とされている。薬剤耐性菌のリスク管理は、生産から流通・消費にわたる幅広い視点で検討必要があるが、家畜に分布する薬剤耐性菌は、家畜に使用する抗菌性物質の影響の他、様々な要因が関与している。

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である JVARМ 事業より、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。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* で約 20%、*C. coli* で約 40%に認められた。また、エリスロマイシン耐性は、*C. coli* で約 40%に認められたが、*C. jejuni* では認められなかった。これらの薬剤に対する耐性割合は3年間で大きな変動は認められなかった。セファロスポリン耐性サルモネラは、低率ではあるが継続的に認められた。

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%の大腸菌でセフトフル耐性が認められている。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。家畜由来セファロスポリン耐性サルモネラの β -ラクタマーゼ型は、CMY-2優勢であった。セファロスポリン耐性サルモネラに由来する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。

豚におけるMRSAの分布を調査し、食肉由来MRSAと豚由来MSSAの遺伝子型を調べた。欧米で報告されている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

畜産現場において、抗菌性物質は、法的規制の下で使用され、細菌感染症による損耗の抑制や安全な畜産物の安定供給に貢献してきた。一方、医療や獣医療において使用された抗菌性物質によって薬剤耐性菌が出現・増加し、薬剤耐性菌による感染症は、治療効果の低下につながる深刻な問題となっている。家畜由来の食中毒菌の薬剤耐性が、食品を介してヒトの健康へ悪影響を及ぼ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。我々は、1)国内において分離される各種家畜由来の食品媒介性病原細菌等の抗菌剤感受性を調べ、2)その現状を把握することにより、抗菌剤の慎重使用を喚起してその有効性を確保すると共に、3)畜産界での抗菌剤使用の公衆衛生分野に及ぼすリスク分析の基礎資料に資する目的で、JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistant Monitoring System) を実施してきた。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が示唆されたが、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。そして、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耐性を示す大腸菌が家畜で増加しているこ

とから、大腸菌及びサルモネラの耐性性状を解析し、家畜内での両菌種間における薬剤耐性因子の伝播を検討した。さらに、欧米諸国で家畜関連MRSA (ST398) が問題となっているため、国内の豚におけるMRSAの分布状況、豚及び食肉由来ブドウ球菌の遺伝子型を解析し、国内の家畜におけるMRSAの分布及び危険性を検討した。

B. 研究方法

1. 畜産分野におけるサルモネラとカンピロバクターの薬剤感受性

(1)サルモネラ：

全国の家畜保健衛生所で病性鑑定材料から分離されたサルモネラを用いて、CLSI 法に準じて薬剤感受性を調べた。2009 及び 2010 年は、寒天平板希釈法により、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。2011 年度は、微量液体希釈法により、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン(CEZ)、セフォタキシム (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 のガイドライン及び既報 (J Antimicrob Chemother. 53: 266-270, 2004.) に基づき設定した。

(2)カンピロバクター：

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を用い、CLSI 法に準拠して薬剤感受性を実施した。2009～2010 年度は、寒天平板希釈法により、ABPC、DSM、OTC、CP、エリスロマイシン (EM)、NA、ERFX の 7 薬剤を供試した。2011 年度は、微量液体希釈法により ABPC、GM、TC、CP、エリスロマイシン (EM)、NA、CPFEX の 7 薬剤を供試した。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。

2. セファゾリン耐性菌の性状解析：

(1) 供試株

健康家畜由来 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)、病畜由来 CEZ 耐性大腸菌 38 株及び CEZ 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。

(2) 大腸菌の遺伝子型別

遺伝子型は、系統分析とパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いて分析した。系統分析は、Clermont らのマルチプレックス PCR により行った。PFGE 法は、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。

(3) β -ラクタマーゼ型

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。

(4) 伝達性プラスミドの比較

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。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 (CPFEX) 及び TMP を対象に調べた。

3. メチシリン耐性黄色ブドウ球菌：

(1) サンプル及び分離方法

2009 年に 23 農場 115 頭の豚から食肉処理場で採材した鼻腔スワブと糞使用して、メチシリン耐性ブドウ球菌 (MRSA) の分離を行った。分離は、7.5% 塩化ナトリウム (NaCl) 加 HIB (Heart Infusion Broth) を用いて 35 度で 18 時間増菌培養を行った。増菌培養後、クロモアガー MRSA スクリーン培地 (関東化学) と MRSA 選択培地 (ベクトンディッキンソン社) に増菌培養液一白金耳を塗布し、37 度で 24 時間培養した。ブドウ球菌を疑うコロニーは、オキシダーゼ、カタラーゼ試験及びグラム染色を行った。同定は、コアグラマーゼ反応と N-ID テスト SP-18 (ニッスイ) を用いて実施した。

(2) 供試株

2008～2009 年に食肉から分離された MRSA 5 株、2005 年に乳牛から分離された MRSA 1 株、2009 年に豚から分離された MRSA 1 株及び 2003～2009 年に豚から分離された MSSA15 株を用いて、遺伝子型及び各種抗菌性物質に対する感受性を調べた。

(3) 遺伝子型別

mecA遺伝子は、既報（Kawanoら、J. Clin. Microbiol. 34: 2072-2077, 1996）のPCR法により検索した。SCCmec型は、既報のマルチプレックスPCR法（Oliveiraら2002とMilheiriçoら2007）を用いての決定した。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。

(4) 抗菌性物質感受性試験

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）を用いて実施した。

C. 研究結果

1. 畜産分野におけるサルモネラとカンピロバクターの薬剤耐性菌の全国動向

(1) 家畜由来サルモネラの血清型と薬剤感受性（表1、2）：収集した家畜由来サルモネラは、合計509株で、Typhimuriumが最も多く（187株）、次いでCholeraesuis（69株）、Infantis（36株）の順であった。Typhimuriumは、主に牛及び豚に由来し、Choleraesuisは豚のみ、Infantisは主に鶏に由来した。

DSMに対する耐性割合は全ての畜種で60%以上を示し、最も高率であった。各種薬剤に対する耐性割合は、牛由来株及び豚由来株では大きな変動は認められなかった。鶏由来株におけるOTC/TC、KM、NA及びTMP/STに対する耐性割合は、2009年度以降減少傾向が認められた。全ての畜種で、フルオロキノロン（ERFX及びCPFX）に対する耐性は認

められなかったが、セファロスポリン耐性は低率ではあるが継続的に認められた。

(2) 家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性（表3、図1）

2008~2010年に収集された*C. jejuni* 419株及び*C. coli* 225株の薬剤感受性試験では、これまでと同様に、OTC/TCに対する耐性割合が最も高く、また、ほとんどの薬剤で*C. coli*の耐性率が*C. jejuni*より高かった。EM耐性は*C. jejuni*においてEM耐性は認められなかった。キノロン剤（NA及びERFX）に対する耐性割合は、*C. jejuni*で16~24%、*C. coli*で35~41%で、期間中に大きな変動は認められなかった。

2. セファゾリン耐性大腸菌及びサルモネラ（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。

健康由来CEZ耐性大腸菌の系統型は、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%に認められた。病畜由来CEZ耐性大腸菌の系統型は、鶏由来株でA型が、72%に認められた。CEZ耐性大腸菌株ではB2型は認められなかった。

健康由来CEZ耐性大腸菌の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-1（1株）及びCTX-M-25（2株）などのESBL産生株も認められた。

健康由来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-I_γ (19株、41%)、A/C (13株、28%)、B/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対しても耐性を示したが、B/O型とI1-I_γ型プラスミド伝達株では1株を除いてβ-ラクタムのみ耐性を示した

CEZ耐性サルモネラの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EcoR1とCla1により制限酵素処理して電気泳動像を比較した。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、一方のものでは一部の株で一致するものもあった。

3. 家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、115頭中1頭から分離された。分離されたMRSA株のSCCmec型は型別できなかったが、MLST型はST221 (CC5) でspa-type型はt002であった。分離株の薬剤感受性は、アンピシリンとストレプトマイシンに耐性を示し、テトラサイクリンやエリスロマイシンには感受性を示した。

メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌は、*S. warneri* (4検体)、*S. haemolytica* (3検体)、*S. epidermidis*、*S. lentus*、*S. spp* (各1検体)で認められた。*S. epidermidis*のSCCmec型はIV、*S.*

warneri 2株と*S. haemolyticus* 2株のSCCmec型はVであった。その他のSCCmec型は、決定できなかった

乳牛及び食肉由来MRSAは、全てSCCmecIV型だった。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株のMLST型は、ST398が6株、ST9が6株、ST5、ST97及びST705であった。MSSA ST398ではspa type t034が4株で認められた。

D. 考察

家畜に分布するセファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラは、食品を介して人に伝播するリスクがある。現在、食品安全委員会による鶏用フルオロキノロン剤のリスク評価において、日和見感染症に関連しうる大腸菌が新たにハザードとして加えられた。人の臨床分離大腸菌株では、系統型B2が多く認められるが、国内の健康家畜由来及び病畜由来大腸菌ではB2は非常に少ないことが示された。このことは、人と動物の疾病が、異なるタイプの大腸菌によって引き起こされていること、さらに、人の疾病が動物由来株によって直接的に引き起こされる可能性が低いことを示唆している。しかし、MLST型の解析では、健康なブロイラーにおいて、多様なMLST型の大腸菌が存在し、人の臨床分離株で認められるMLST型の大腸菌も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、家畜と人に由来する大腸菌の関連について明らかにしていく必要がある。

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が、原因について

は不明な点が多い。我々の調査で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型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で、CMY-2保有株が多く認められた。本研究班で、大腸菌とサルモネラ間でのセファロスポリン耐性プラスミド水平伝播を検討したが、同一のプラスミドではないが、近縁な関係が示唆された。耐性因子の伝播を明らかにしていく上で、より詳細な解析方法が必要である。

欧米では家畜関連MRSA ST398が市中感染の原因となったことから、公衆衛生上の重要な問題として取り上げられている。MRSA ST398は、2005年にオランダで家畜、特に豚における保菌が問題となり、ヨーロッパで大規模な調査が行われ、EU各国で、汚染状況が異なることが明らかとなった。MRSA ST398の汚染は、北米、アジア（シンガポール、タイ、中国）に拡大しているが、中国やマレーシアの調査ではST398とは異なるMRSA（ST9）も豚に浸潤していることが報告されている。2009年度に我々が実施した調査で、国内の豚のMRSA汚染は低度であること示された。しかし、これまでに豚から分離されたMSSAにST398が含まれていたこと、さらに、アジアで分離されるMRSAと同じMLST型（ST9）のMSSAも存在していることが示された。したがって、国内へのMRSAの侵入防止措置と国内の養豚を含む畜産でのMRSAの実態把握を積極的に行っていく必要がある。

ヨーロッパでは、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ている（1000–2500 ppm）。今回調べた

MRSAとMSSAにおいて亜鉛を含む金属や消毒剤に対する耐性は認められなかった。国内では、飼料中の亜鉛と銅の添加濃度の基準値が豚の発育ステージごとに設定されており、これらの規制がMRSAの出現防止に役立っている可能性が考えられる。今後、ヨーロッパにおける規制の動向を継続的に把握していく必要がある。

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. Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, M., Asai, T., Tamura, Y. 2009. National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 51:35.
2. Asai, T., Murakami, K., Ozawa, M., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Relationships between multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund and both broiler chickens and retail chicken meats in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 198-200.
3. Harada, K., Ozawa, M., Ishihara, K., Asai, T., Koike, R., Ishikawa, H. 2009. Prevalence of antimicrobial resistance

- among serotypes of *Campylobacter jejuni* isolates from cattle and poultry in Japan. Microbiol. Immunol. 53:107-11.
4. 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.
 5. 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
 6. Usui, M., Uchiyama, M., Baba, K., Nagai, H., Yamamoto, Y., Asai, T. 2011. Contribution of enhanced efflux to reduced Susceptibilities of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis to fluoroquinolone and other Antimicrobials. J Vet Med Sci 73, 279-282.
 7. Asai, T., Masani, K., Sato, C., Hiki, M., Usui, M., Baba, K., Ozawa, M., Harada, K., Aoki, H., Sawada, T. 2011. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. Acta Vet Scand. 53:52.
 8. 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).
- 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。

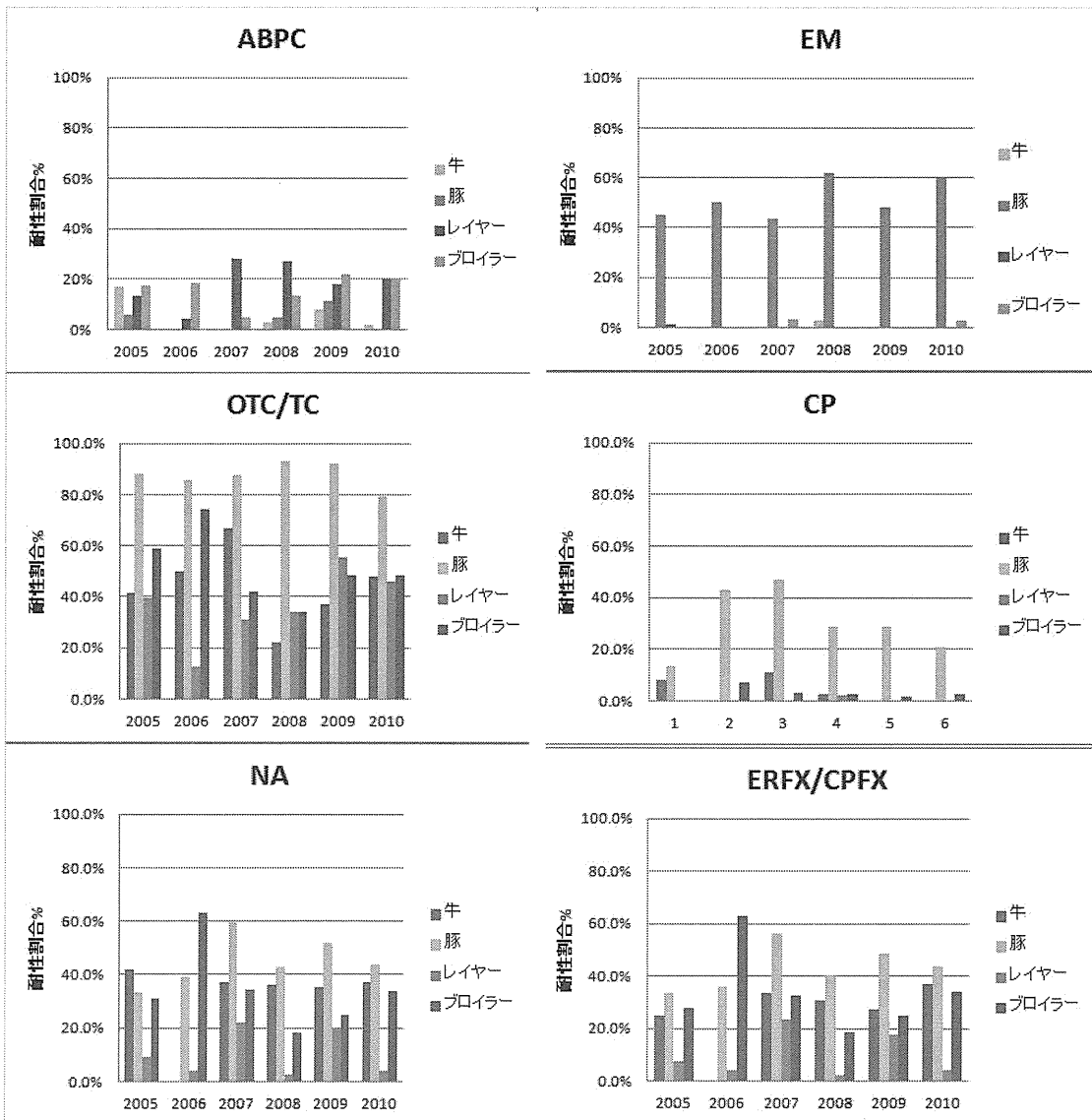


図1 動物別カンピロバクターの耐性率の推移

表1 2008～2010年度に分離されたサルモネラの血清型

血清型	2008				2009				2010				2009-2010			
	牛	豚	鶏	計	牛	豚	鶏	計	牛	豚	鶏	計	牛	豚	鶏	総計
Typhimurium	32	38	1	71	35	7		42	54	19	1	74	121	64	2	187
Choleraesuis		36		36		5		5		28		28	0	69	0	69
Infantis	1		11	12	1	1	9	11	3	2	8	13	5	3	28	36
Enteritidis					2		3	5	9		6	15	11	0	9	20
O4:d:-	7			7	8			8	1			1	16	0	0	16
Thompson	2	1	1	4	5		2	7	3		1	4	10	1	4	15
O4:i:-	4			4					7	3		10	11	3	0	14
Braenderup	3			3	2		5	7	1		1	2	6	0	6	12
Derby		3		3	1	4		5		4		4	1	11	0	12
Agona					5	1	2	8	2			2	7	1	2	10
Schwarzengrund			3	3			4	4			1	1	0	0	8	8
London		3		3	1	1		2		1		1	1	5	0	6
その他血清型	24	4	5	33	24	3	11	38	14	2	15	32	62	9	31	103
計	73	85	21	179	84	22	36	142	94	59	33	187	251	166	90	509

表2 2008～2010年度に分離されたサルモネラの動物別の薬剤感受性

ntimicrobia	Breakpoint ts	2008			2009			2010		
		牛 (n=73)	豚 (n=85)	鶏 (n=21)	牛 (n=84)	豚 (n=22)	鶏 (n=36)	牛 (n=94)	豚 (n=59)	鶏 (n=33)
ABPC	32	44.0	51.0	14.0	26.2	40.9	5.6	54.3	37.3	3.0
CEZ	32	1.4	0.0	4.8	0.0	0.0	2.8	1.1	1.7	3.0
DSM	32	70.0	94.0	62.0	91.7	100.0	77.8	NT	NT	NT
GM	16	0.0	16.0	0.0	0.0	18.2	0.0	0	20.3	0
KM	64	18.0	22.0	48.0	21.4	27.3	27.8	23.4	22.0	6.1
OTC	16	42.0	82.0	62.0	33.3	72.7	25.0	NT	NT	NT
TC	16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	53.2	71.2	12.1
CP	32	22.0	27.0	0.0	2.4	27.3	0.0	25.5	6.8	0
CL	16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0	0	0
NA	32	0.0	22.0	19.0	1.2	13.6	2.8	7.4	3.4	6.1
ERFX	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	NT	NT	NT
CPFx	4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	0	0
TMP	16	4.1	35.0	38.0	0.0	27.3	19.4	NT	NT	NT
ST	>152/8	NT	NT	NT	NT	NT	NT	4.3	33.9	3.0

表3 2008～2010年度に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(<i>C.jejuni</i> 100株、 <i>C.coli</i> 57株)				2009年度(<i>C.jejuni</i> 152株、 <i>C.coli</i> 81株)				2010年度(<i>C.jejuni</i> 167株、 <i>C.coli</i> 87株)			
		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 (%)	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	4	32	21	13.8	4	32	29	17.4
	<i>C.coli</i> (32)	4	16	5	8.8	8	8	14	17.3	2	8	0	0.0
DSM	<i>C.jejuni</i> (32)	1	2	0	0	1	2	4	2.6	NT	NT		
	<i>C.coli</i> (32)	4	>512	27	47.4	64	>512	27	50.6	NT	NT		
GM	<i>C.jejuni</i>	0.25	0.5			0.5	1			0.5	1		
	<i>C.coli</i>	0.5	2			1	2			1	2		
OTC	<i>C.jejuni</i> (16)	1	128	29	29	2	128	57	37.5	NT	NT		
	<i>C.coli</i> (16)	128	512	45	78.9	128	512	64	79	NT	NT		
TC	<i>C.jejuni</i> (16)	NT	NT			NT	NT			0.5	128	78	46.7
	<i>C.coli</i> (16)	NT	NT			NT	NT			64	128	62	71.3
CP	<i>C.jejuni</i> (16)	2	4	1	1	2	4	0	0	1	2	0	0.0
	<i>C.coli</i> (16)	4	32	14	24.6	4	32	19	23.5	2	32	15	17.2
EM	<i>C.jejuni</i> (32)	1	2	0	0	2	2	0	0	0.5	2	0	0.0
	<i>C.coli</i> (32)	8	>512	27	47.4	8	>512	30	37	2	>128	39	44.8
NA	<i>C.jejuni</i> (32)	4	256	17	17	4	256	41	27	4	128	40	24.0
	<i>C.coli</i> (32)	8	256	22	38.6	16	128	36	44.4	8	128	33	37.9
ERFX	<i>C.jejuni</i> (2)	≦0.125	4	16	16	≦0.125	4	37	24.3	NT	NT		
	<i>C.coli</i> (2)	≦0.125	8	20	35.1	≦0.125	8	33	40.7	NT	NT		
CPFEX	<i>C.jejuni</i> (4)	NT	NT			NT	NT			0.25	16	40	24.0
	<i>C.coli</i> (4)	NT	NT			NT	NT			0.5	16	33	37.9

表4 健康家畜及び病畜から分離されたセファロスポリン耐性大腸菌の系統分類

系統	健康				病畜				
	肉用牛	豚	ノロイ マ	レイヤー	Total	牛	豚	鶏	Total
A	0	2	36	4	42	3	2	21	26
B1	2	0	32	4	38	2	0	2	3
B2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	1	0	29	8	38	1	1	7	9
Total	3	2	97	16	118	6	3	29	38

表5 健康家畜及び病畜から分離されたセファロスポリン耐性大腸菌のβラクタマーゼ型

βラクタマーゼ型	健康				病畜				
	牛	豚	ブロイ ラー レイヤー	計	牛	豚	鶏	計	
CMY-2		2	59	7	68	2	1	11	14
CTX-M-14			5	2	7				0
CTX-M-2			5		5	2		1	3
CTX-M-25			3		3			4	4
CTX -M-15				1	1			1	1
SHV-12	1		7	1	9				0
SHV-2			3		3			3	3
SHV-2a			1		1				0
SHV-5				1	1				0
不明	2		15	4	21	2	2	9	13
合計	3	2	98	16	119	6	3	29	38

平成 21-23 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」

総合研究報告書

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

本研究では家畜から分離される広域スペクトラムセファロスポリン (ESC) 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た。北海道の牛から分離され、特定の遺伝子型を有するサルモネラ血清型 Typhimurium (ST) の ESC 耐性は CMY-2 β ラクタマーゼに担われていた。その遺伝子は染色体上の 125 kb 多剤耐性ゲノミックアイランド GI-VII-6 の一部として存在していた。構造解析の結果、GI-VII-6 は IncA/C プラスミドが IS26 転移酵素を介して染色体に挿入されたものと推察された。また、系統解析の結果は北海道に侵入、あるいは北海道で出現した特殊な ST クローンがこの地域の牛群に拡散したことを示唆している。一方、南九州地域の 28 農場由来、608 のブロイラー糞便サンプル中 14 農場 (50%) 由来、45 サンプル (7.4%) から ESC に耐性を示す大腸菌とサルモネラが共に分離された。サルモネラでは血清型 Infantis (SI) と Manhattan (SM) が認められ、両者の間で同一のプラスミドプロファイルを示す株が存在した。SI と SM が保有する 40 kb 薬剤耐性プラスミドはいずれも TEM-52 β ラクタマーゼ遺伝子をコードしており、その制限酵素 EcoRV 切断パターンは株間で識別不能であった。これは両血清型間でプラスミドが伝達されたことを示す成績と考えられた。大腸菌には様々な ESC 耐性遺伝子が分布しており、大腸菌間でそれら耐性因子の伝達が起きている可能性が示唆された。サルモネラと大腸菌の間に共通する伝達性薬剤耐性因子は認められなかった。

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。本研究では広域スペクトラムセファロスポリン

(ESC) 耐性菌に焦点を絞って、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た。具体的には北海道の牛から分離された牛由来サルモネラ血清型 Typhimurium (ST) における ESC 耐性遺伝子の存在様式を解析した。また、ブロイラー生産現場において ESC 耐性を含む薬剤耐性因子の伝達が異種腸内細菌間で起こっている可能性を検証した。

B. 研究方法

1. 牛由来 ESC 耐性 ST の解析

①供試菌株

北海道の疫学的関連のない牛から分離され、特定のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 型 Cluster VII-6 を示す ESC 耐性 ST 22 株を解析に供した。

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 ; エンフロキシサン, EFX ; スルファメチゾール, SUL ; ST 合剤, SXT。

③塩基配列解析

PFGE 型 Cluster VII-6 に属する 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。

④L-3553 株の系統解析

③で得られた全ゲノム塩基配列解析データとデータベース上に公開された他の ST 株の全ゲノム塩基配列を用いて系統解析を実施した。

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

③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 スキャンニング系を構築し、野外分離株におけるこれら遺伝子領域の分布を確認した。

2. ブロイラー由来サルモネラ及び大腸菌の解析

①菌分離、同定、及び血清型別

鹿児島県の食鳥処理場においてブロイラー盲腸便を採取し、個体ごとに菌分離を試みた。サルモネラはハーナテトラチオン酸塩培地で増菌培養後、ランバック寒天培地上で分離した。市販抗血清を用いたスライド及び試験管凝集反応により血清型別を行った。大腸菌は糞便希釈液を用いて 0.5 μg/ml セフトキシム加マッコンキー寒天培地で直接、分離培養を行った。API 20E (BioMerieux) で生化学的性状を確認し、大腸菌と同定した。

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 16 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 ; セフォキシチン, FOX ; 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 ; オフロキシサン, OFL ; ノルフロキシサン, NOR ; スルファメチゾール, SUL ; ST 合剤, SXT。

③プラスミド解析

野外分離株の保有するプラスミドは Kado-Liu の方法で分離し、アガロースゲル電気泳動により

確認した。また、大腸菌 MC1061 を受容菌とした接合伝達法、または大腸菌 DH5 α を受容菌とした形質転換法により薬剤耐性 (R) プラスミドの単離を試みた。単一の R プラスミドを保有する受容菌からプラスミドを分離し、制限酵素消化後の泳動像を比較した (制限断片長多型解析)。

④薬剤耐性遺伝子及びレプリコン型の解析

ESC 耐性を規定する遺伝子を特定するため、国立感染症研究所細菌第 2 部の方法に従って PCR 及び増幅産物の塩基配列解析を行った。また、ESC 耐性遺伝子が存在する R プラスミドのレプリコン型を決定するため、Carattoli らの方法により PCR を実施した。

⑤PFGE 及びサザンプロット解析

制限酵素 XbaI、S1 ヌクレアーゼ、及びホーミングエンドヌクレアーゼ I-CeuI を用いて供試菌株のゲノム DNA を消化後、PFGE を行った。巨大プラスミドのサイズは S1 ヌクレアーゼ消化後の PFGE により決定した。必要に応じて 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プローブを用いてサザンプロット解析による目的遺伝子の検出を試みた。I-CeuI 消化後に観察されるフラグメントが染色体に由来することを示すために、23S rRNA 遺伝子を標的とする 23S-2 プローブを用いた。

C. 研究結果

1. 牛由来 ESC 耐性 ST の解析

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。一株のみ上記 10 薬剤のうち、CHL に感受性を示した。

②ESC 耐性遺伝子周辺領域の構造

供試 22 株の ESC 耐性は *bla*_{CMY-2} 遺伝子がコードする CMY-2 β ラクターマーゼに担われていた。*bla*_{CMY-2} 遺伝子の周辺は全長 125 kb の多剤耐性ゲノ

ミックアイランドを構成していることが明らかとなり、これを GI-VII-6 と命名した (DDBJ 受入番号: AB571791)。GI-VII-6 は *bla*_{CMY-2} の他に 10 の薬剤耐性遺伝子を含んでいた (図 1)。GI-VII-6 配列の 99%は大腸菌由来 IncA/C プラスミド pAR060302 と相同であった (図 2)。GI-VII-6 の両端には IS26 が同じ向きで存在し、その外側には 8 bp のダイレクトリピート (CTCCACAA) が存在した (図 1)。

③L-3553 株の系統解析結果

これまでにゲノムが解読された LT2、T000240、DT104、14028s、及び SL1344 株と L-3553 株の全ゲノム塩基配列データから 1920 カ所の一塩基多型を抽出、結合することで疑似塩基配列を作成し、最尤法で解析したところ、L-3553 株は他の株とは異なる系統に属する株であることが示された (図 3)。

④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

PCR スキャンニングの結果、22 株中 3 株でそれぞれ 1 箇所の非増幅部位を認めたものの、その他の領域では全て予想サイズの増幅が認められた (図 4)。

2. プロイラー由来サルモネラ及び大腸菌の解析

①菌分離成績

2010 年 5 月～2011 年 5 月に採材した 28 農場由来、608 の糞便サンプル中 14 農場 (50%) 由来、45 サンプル (7.4%) から CTX に耐性を示す大腸菌とサルモネラが共に分離された。原則的に 1 サンプルから 1 株を解析に供したが、45 サンプル中 1 サンプルのみ、大腸菌 2 株を解析に供した。

②サルモネラ性状解析結果

サルモネラ 45 株中、18 株が血清型 Infantis (SI)、27 株が血清型 Manhattan (SM) であった (表 1)。SI は 4～8 薬剤に耐性を示し、275 kb、50 kb、40 kb に加えて 10 kb 以下のプラスミドを保有する株が認められた。SM の薬剤耐性型は単一で 7 薬剤に

耐性を示し、275 kb、40 kb に加えて 10 kb 以下にもプラスミドを保有していた。βラクタマーゼ遺伝子はSI でTEM-52、CMY-2、CTX-M-14 のいずれかを保有しており、それぞれ40 kb、275 kb、50 kb プラスミド上に存在していた。これらプラスミドのレプリコン型は、それぞれ型別不能 (UT)、P、UT であった。SM ではレプリコン型 UT の 40 kb プラスミド上に存在する TEM-52 遺伝子のみ認められた。40 kb のレプリコン型 UT プラスミドを保有する SI と SM で同一のプラスミドプロファイルを示す株が認められ、40 kb プラスミドの EcoRV 切断パターンは株間で識別不能であった (図 5)。

③大腸菌性状解析結果

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 (表 2、図 6)。検出できたレプリコン型は 6 種 (I1-I γ 、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。β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βラクタマーゼ遺伝子の組み合わせが認められる場合があった (図 7)。

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 βラクタマーゼ遺伝子 ($bla_{CTX-M-2}$) が検出され、ESC に耐性を示す株が 2 株認められた (表 2 No. 30 及び 46)。これらの株では S1 ヌクレアーゼ消化後の PFGE で巨大プラスミドの保有が認められず、染色体由来断片上に $bla_{CTX-M-2}$ シグナルが認められた (図 8 左)。さらに、I-CeuI 消化後の PFGE-サザンプロット解析では 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 $bla_{CTX-M-2}$ シグナルが認められた (図 8 右)。これら 2 株のレプリコン型解析では IncFIB が検出された (表 2)。

④サルモネラと大腸菌の比較

両者の間に共通する伝達性薬剤耐性因子は認められなかった。

D. 考察

1. 牛由来 ESC 耐性 ST の解析

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 (ST-VII-6)。これらの ST ではセフェム系抗菌剤耐性を規定する bla_{CMY-2} 遺伝子が染色体上に存在する可能性が指摘された。 bla_{CMY-2} 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 ST-VII-6 における bla_{CMY-2} の存在様式を明らかにすることを目的として解析を行った。

本研究において GI-VII-6 は bla_{CMY-2} 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確認された。本アイランド配列の 99% は大腸菌由来 IncA/C プラスミドと高い相同性を示すこと、IS26 を介して染色体に連結していること、両端 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から、IncA/C プラスミドが IS26 転移酵素を介して染色体に挿入されたものと推察された。IncA/C プラスミドと染色体の共挿入体が形成された後、IS26 配列を介した相同組換えによる解離が起こり、複製起点 (*ori*) や *repA* 遺伝子を含む領域が脱落した可能性が考えられた。

系統解析の結果、L-3553 株はこれまでにゲノム

が解読された株とは異なる系統に属することが明らかとなった。また、PCR スキャンニングの結果、ST-VII-6 22 株において GI-VII-6 が保存されている可能性が示唆された。北海道に侵入、あるいは北海道で出現した特殊な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。

2. ブロイラー由来サルモネラ及び大腸菌の解析

サルモネラの性状解析では TEM-52 β ラクタマーゼ遺伝子をコードする 40 kb のレプリコン型 UT プラスミドを保有する SI と SM で全く同一のプラスミドプロファイルを示す株が認められた。さらに 40 kb プラスミドの EcoRV 切断パターンも株間で識別不能であり、これら血清型間でプラスミドが伝達されたことを示す成績と考えられた。また、大腸菌の性状解析では XbaI 消化後の PFGE 像で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 β ラクタマーゼ遺伝子の組み合わせが認められる場合があり、大腸菌間で薬剤耐性因子の伝達が起こった可能性が示唆されるが、この点については大腸菌遺伝子型のより詳細な解析と単離された R プラスミドの制限断片長多型解析により、さらに検討を加える必要がある。

*bla*_{CTX-H2} シグナルが染色体上に検出された 2 株ではレプリコン型解析で IncFIB が検出された。R プラスミドが挿入配列の転移酵素等を介して染色体に挿入された可能性を示唆する成績と考えられた。

本研究においてサルモネラと大腸菌の間に共通する伝達性薬剤耐性因子は認められず、両者の間で薬剤耐性因子の伝達が起こった可能性は指摘できない。

E. 結論

ST-VII-6 の染色体上に存在する多剤耐性アイランド、GI-VII-6 は IncA/C プラスミドが IS26 転移酵素を介して染色体に挿入されたものと推察され

た。ST-VII-6 保有菌は北海道に侵入、あるいは北海道で出現した特殊な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。

また、ブロイラー生産現場においてサルモネラの異なる血清型間で ESC 耐性を含む薬剤耐性因子の伝達が起こっていることが示された。大腸菌には様々な ESC 耐性遺伝子が分布しており、大腸菌間でそれら耐性因子の伝達が起こっている可能性が示唆された。サルモネラと大腸菌の間に共通する伝達性薬剤耐性因子は認められず、両者の間で薬剤耐性因子の伝達が起こった可能性は指摘できない。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 健康危害情報

なし

H. 研究発表

(論文発表)

1. M. Sugawara, J. Komori, M. Kawakami, H. Izumiya, H. Watanabe, M. Akiba: Molecular and phenotypic characteristics of CMY-2 β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 345-349, 2011.
2. 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 β -lactamase gene located on a multidrug