

日本の輸入鶏肉の 90%以上をブラジル産が占めることを加味して、ブラジル産鶏肉から ESBL 産生大腸菌の検出を試みた。その結果、ブラジル産鶏肉から分離された ESBL 産生大腸菌の約半数が *bla*<sub>CTX-M-8</sub> を保有していた。この結果は、ブラジル産鶏肉由来 *bla*<sub>CTX-M-8</sub> 保有大腸菌が学生の腸管に定着する大腸菌に何らかの影響を与えた可能性を示唆すると考えられる。

今後、全ゲノムシーケンスを含めたより詳細な解析が必要になると考えられた。

#### E. 結論

国産鶏肉を汚染する ESBL 産生大腸菌がヒトの腸管内に定着した可能性および国産鶏肉由来大腸菌が保有する ESBL をコードする遺伝子がヒトの糞便由来大腸菌に伝達された可能性は低いと考えられた。

一方で、アジア諸国で検出されることがない、*bla*<sub>CTX-M-8</sub> が学生糞便由来大腸菌から検出されたことから、ブラジル産鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌との関連性は否定できないと考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Asakura H, Brueggemann H, Sheppard S.K,

Ekawa T, Meye T. Fr, Yamamoto S, Igimi S. Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. *PLoS One* 7(11):e48394. (2012)

2. 五十君静信、朝倉宏、岡田由美子、百瀬愛佳。カンピロバクター食中毒制御を目指す基礎研究。日本臨床 70(8):1298-1303. (2012)

##### 2. 学会発表

1. Shizunobu Igimi, Akiko Ishiwa, Shuko Monden, Yumiko Okada, Hiroshi Asakura, Yoshika Momose, Tetsuo Asai, Akemi Kai, Keiko Yokoyama, Masumi Taguchi, Yoshikazu Ishii, Makoto Kuroda, Haruo Watanabe. Antimicrobial susceptibility profiles and PFGE typing of *Campylobacter jejuni* and their implications to public health in Japan. 11th International symposium on toxic microorganisms, "Risk Control and Food Safety", UJNR. 2012. Tokyo

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

平成24年度食品安全確保推進研究事業

「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：家畜由来薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

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：川西路子（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）等で収集した第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の耐性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。薬剤感受性は、MEPM を除く調査した人体用セファロスポリンに耐性を示し、家畜用第3世代セファロスポリンである CTF と CQN のうち CQN に感受性を示した。CQN の使用は、*bla*<sub>CMY-2</sub> 保有株の選択圧にならないと考えられた。また、CMY-2 保有プラスミドのレプリコン型は、IncI1 が優勢で、IncK も新たに認められた。

黄色ブドウ球菌 122 株（牛由来 109 株、豚由来 5 株及び鶏由来 8 株）のうち、牛由来 1 株が、MRSA であった。MRSA 株は、オキサシリンの MIC が 4μg/ml (Etest) で、SCCmecV 型、MLST 型は ST121 で、*spa*-type は t5110 であった。耐性型は、b-lactam 以外に GM 耐性であった。

## A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では家畜における薬剤耐性菌のモニタリング体制（JVARM）が構築されている。2004 年以降ブロイラー鶏において医療上極めて重要な成分（食品安全委員会の抗菌性物質リストランク I）の一つである第3世代セファロスポリンに対する耐性割合が増加した。これまで、人の臨床由来株では CTX 型 ESBL 産生株が問題となっているが、2004~2009 年に家畜由来第3世代セファロスポリン耐性大腸菌では CMY-2 型 β ラクタマーゼ産生株が優勢であることを報告してきた。国内で分離された家畜由来耐性菌及び耐性因子に関する情報蓄積を図るとともに、動物由来セファロスポリン耐性株の各種 β ラクタム剤に対する感受性を提供する。

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内

感染や市中感染の原因菌として問題であるが、家畜にも分布することが知られている。ヨーロッパを中心に家畜関連 MRSA(Livestock-associated MRSA: LA-MRSA)が注目されているが、国内の家畜に由来する MRSA の報告は少ない。国内で分離された家畜由来 MRSA について情報を蓄積するため、各種薬剤に対する感受性及び分子遺伝疫学解析を実施する。

## B. 研究方法

(1) 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の性状解析

2010~2011 年に家畜から分離された第3世代セファロスポリン耐性 (CTX :  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ ) 大腸菌 71 株（豚由来 4 株、ブロイラー鶏由来 65 株、採卵鶏由来 2 株）を対象に耐性遺伝子の同定及び各種セフェム系薬剤に対する感受性試験を微量液体希釈法で実施

した。

耐性遺伝子の検索は、ダブルディスク法を実施後、Dallenne らの報告した multiplex PCR でスクリーニングし、PCR により全長を増幅後、ダイレクトシーケンシングにより決定した。

薬剤感受性試験は、CLSI（臨床検査標準協会）の方法に準拠した微量液体希釈法により実施した。薬剤は、アンピシリン、セファゾリン（CEZ）、セフトキシム（CTX）、セフトリアキソン、セフトオフル（CTF）、セフキノム（CQN）、セフポドキシム、セフポドキシム・クラブラン酸、アズトレオナム、セフトジジム、セフメタゾール、メロペネム（MEPM）、ストレプトマイシン（SM）、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン（TC）、ナリジクス酸（NA）、シプロフロキサシン（CPF）、コリスチン（CL）、クロラムフェニコール及びトリメトプリムの 21 薬剤を供試した。

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 法で決定した。

#### (2)家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

(MRSA) の遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性：

2010 年に家畜から分離された黄色ブドウ球菌 122 株の薬剤感受性を調べた。

ABPC 耐性 9 株を対象にオキサシリン感受性と耐性遺伝子 (*mecA*) に基づき MRSA を検索した。牛から分離された MRSA 1 株の遺伝子型を調べた。遺伝子型は、multilocus sequence typing (MLST)型、SCC*mec* 型と *spa* type を決定した。

### C. 研究結果

#### 1. セファゾリン耐性大腸菌の性状解析(表 1～ 4)

JVARM で健康な家畜から分離された大腸菌において、CTX 耐性が 2010 年に 4.1% (34/816)、2011 年に 4.3% (32/751) で認められた。CTX 耐性株の  $\beta$  ラクターマーゼ型は、43 株（豚由来 1 株、ブロイラー鶏由来 42 株）が *bla*<sub>CMY-2</sub> であった。内、ブロイラー鶏由来 2 株が *bla*<sub>CTX-M-25</sub> を合わせて保有していた。その他、ESBL 産生株は、10 株（全てブ

ロイラー鶏由来株）が *bla*<sub>CTX-M-2</sub>、ブロイラー鶏由来 4 株が *bla*<sub>CTX-M-1</sub>、ブロイラー鶏由来 3 株が *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 及び豚由来 1 株が *bla*<sub>CTX-M-55</sub> を保有していた。ブロイラー鶏由来 1 株で耐性遺伝子を特定できなかった（表 1）。

供試した 62 株全てが、MEPM に感受性であった（MEPM MIC:  $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ ）。保有する  $\beta$  ラクターマーゼにより MIC 分布が異なった（表 1）。特に、動物専用成分である CTF と CQN では、CMY-2 $\beta$  ラクターマーゼに対する感受性が異なっていた。CTF の MIC は、CMY-2 や CTX-M 保有株では 8 $\sim$ >8 $\mu\text{g/ml}$  であった。CQN の MIC は、CTX-M 保有株で 16 $\sim$ >64 $\mu\text{g/ml}$ 、CMY-2 保有株では  $\leq 1\text{-}2\mu\text{g/ml}$  であった。

一方、 $\beta$  ラクターマーゼ以外の薬剤に対して、SM、TC 及び NA に対する耐性は、50%以上で認められたが、CPF 及び CL に対する耐性は 10%未満であった（表 2）。

ブロイラー由来 *bla*<sub>CMY-2</sub> 保有株から得られたトランスコンジュガント 20 株では、IncI1-Iy が 10 株、IncK が 5 株、IncA/C が 4 株で認められた（表 3）。

IncA/C プラスミド保有 4 株と IncI1-Iy 保有 2 株に由来するトランスコンジュガントは、b-lactam 以外の薬剤に耐性を示した(表 4)。

#### 2. 家畜由来黄色ブドウ球菌の薬剤感受性と MRSA の遺伝子型

黄色ブドウ球菌 122 株（牛由来 109 株、豚由来 5 株及び鶏由来 8 株）の薬剤感受性試験には、7 薬剤を供した。いずれの薬剤に対する耐性率も 10%未満であった（表 5）。

ABPC 耐性は、牛由来 6 株と豚由来 3 株で認められ、起立不能牛の後肢関節膿瘍由来 1 株が、MRSA であった。MRSA 1 株では、オキサシリンの MIC が 4 $\mu\text{g/ml}$  (E test) で、SCC*mecV* 型、MLST 型は ST121 で、*spa*-type は t5110 であった。耐性型は、b-lactam 以外に GM 耐性であった。

### D. 考察

1999年のJVARMの開始時から、ブロイラー由来大腸菌でセファロスポリン耐性株が継続的に分離され、2004年以降、増加傾向が認められた。セファロスポリン系薬剤は、鶏の治療薬として承認されていないことから、セファロスポリン耐性株の性状解析を行ったところ、①CMY-2 β-ラクタマーゼが優勢であり、②この耐性遺伝子の分布に4種類のプラスミド (IncA/C, IncB/O, IncI1 及び IncIy) が関与し、③4種類のプラスミドのうちIncA/Cが多剤耐性プラスミドであることを明らかにした。2010～2011年においても健康な家畜から分離された第3世代セファロスポリン耐性大腸菌では、ブロイラー由来が大部分を占め、CMY-2 β-ラクタマーゼが優勢であった。

今回、家畜由来CTX耐性株を用いて、人体用セファロスポリン7剤と家畜用セファロスポリン3剤 (CEZは共通) を対象に薬剤感受性を調べた。家畜由来CTX耐性株は、MEPMを除く調査した人体用セファロスポリンに耐性を示した。一方、現在、家畜用として承認されている第3世代セファロスポリンは、CTFとCQNである。家畜で優勢なCMY-2 β-ラクタマーゼがCQNに感受性を示したことから、CQNの使用は、*bla*<sub>CMY-2</sub> 保有株の選択圧にならないと考えられた。

ブロイラー由来CTX耐性大腸菌から作出したトランスコンジュガントの解析により、*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有するプラスミドのレプリコン型は、2004～2009年と同様、IncI1-Iyが多く認められた。また、新たにIncKが認められた。これら、IncI1-Iy及びIncKの大部分がb-lactam以外の薬剤に感受性を示したことから、動物用の抗菌剤以外に選択圧としての可能性を調べていく必要がある。また、米国やカナダのブロイラー鶏においてセファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラが増加した要因として、ヒナの大腸菌症の予防等のために、ワクチン接種時にセフトオフル（第3世代セファロスポリン）を混合して卵内接種されることに起因することが示された。そして、2012年3月に国内の養鶏団体からセフトオフルの使用に関する注意喚起が自主的に行われた。国内のブロイラーにおけるセファロスポリン耐性の動向について継続して調査する予定である。

ヨーロッパ諸国と北米で豚におけるMRSA ST398

の分布が問題となっている。一方、アジアでは異なるタイプ (ST9) のMRSAが豚から分離されている。これまで、EUやUSAのMRSAの汚染状況に比べると低いこと、MRSA CC398やCC9の浸潤は認められないことが示してきた。一方、国内の豚由来メチシリン感受性黄色ブドウ球菌でST398やST9に分類される株が分布しているため、継続的な調査が必要となっている。

今回、分離されたMRSA株の遺伝子型は、国内 (佐渡島) の小児の鼻粘膜及び皮膚病変から分離された株と同一であったが、薬剤耐性型はGMのみに耐性で異なっていた。人と家畜間でのMRSAの伝播について注意が必要である。

#### 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は、MEPMを除く調査した人体用セファロスポリンに耐性を示した。また、家畜由来大腸菌に*bla*<sub>CMY-2</sub> が優勢に分布する要因について継続的な疫学調査が必要と考えられた。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

- 1.
2. Baba, K., Ishihara, K., Ozawa, M., Usui, M., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T. 2012. Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan. *J Vet Med Sci* 74: 561-565.
3. Asai, T., Hiki, M., Baba, K., Usui, M., Ishihara, K., Tamura, Y. 2012. Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 551-552.
4. Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* (in press)

深謝いたします。

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

表1 2010～2011年に家畜から分離された第3世代セファロスポリン耐性（CTX： $\geq 4\mu\text{g/ml}$ ）大腸菌の各種セファロスポリンに対する感受性

| $\beta$ -ラクタマーゼ型     | ブロイラー | 豚 | 計  | 抗菌性物質*   |          |          |      |            |          |        |            |            |             |
|----------------------|-------|---|----|----------|----------|----------|------|------------|----------|--------|------------|------------|-------------|
|                      |       |   |    | CEZ      | CTX      | CTR      | CTF  | CQN        | CPDX     | AZT    | CAZ        | CMZ        | MEPM        |
| CMY-2                | 29    | 1 | 30 | 512->512 | 8-64     | 8-64     | 8->8 | $\leq 1-2$ | 128->128 | 4-32   | 16-64      | 16-128     | $\leq 0.25$ |
| CMY-2/CTX-M-25/TEM-1 | 2     |   | 2  | >512     | >128     | 256-512  | >8   | >64        | >128     | 32     | 32-64      | 64         | $\leq 0.25$ |
| CMY-2/TEM-1          | 9     |   | 9  | 256->512 | 4-16     | 16-32    | 8->8 | $\leq 1$   | 128->128 | 4->128 | 8-128      | 16-32      | $\leq 0.25$ |
| CMY-2/TEM-135        | 2     |   | 2  | 512      | 16       | 32       | >8   | $\leq 1$   | >128     | 8      | 16         | 32         | $\leq 0.25$ |
| CTX-M-1              | 4     |   | 4  | 512->512 | 128->128 | 256->512 | >8   | 64         | >128     | 8-16   | 2-4        | $\leq 1$   | $\leq 0.25$ |
| CTX-M-15/TEM-1       | 3     |   | 3  | 512->512 | >128     | >512     | >8   | >64        | >128     | 64-128 | 16-32      | $\leq 1$   | $\leq 0.25$ |
| CTX-M-55             |       | 1 | 1  | >512     | >128     | 256      | >8   | 64         | >128     | 64     | 32         | $\leq 1$   | $\leq 0.25$ |
| CTX-M-2              | 5     |   | 5  | 512->512 | >128     | 256->512 | >8   | >64        | >128     | 4-8    | $\leq 1-2$ | $\leq 1-2$ | $\leq 0.25$ |
| CTX-M-2/SHV-2/TEM-1  | 1     |   | 1  | 512      | 32       | 64       | >8   | 16         | 128      | 8      | 2          | $\leq 1$   | $\leq 0.25$ |
| CTX-M-2/TEM-1        | 4     |   | 4  | 512->512 | 128->128 | 256-512  | >8   | 16->64     | 128->128 | 4-8    | $\leq 1-4$ | $\leq 1-2$ | $\leq 0.25$ |
| ND                   |       | 1 | 1  | 32       | 4        | $\leq 4$ | 8    | 4          | 4        | 128    | 16         | 2          | $\leq 0.25$ |
| 合計                   | 59    | 3 | 62 |          |          |          |      |            |          |        |            |            |             |

\*セファゾリン（CEZ）、セフトキシム（CTX）、セフトリアキソン（CTR）、セフトチフル（CTF）、セフキノム（CQN）、セフポドキシム（CPDX）、アズトレオナム（AZT）、セフトジジム（CAZ）、セフメタゾール（CMZ）、メロペネム（MEPM）

表2 2010～2011年に家畜から分離された第3世代セファロスポリン耐性（CTX： $\geq 4\mu\text{g/ml}$ ）大腸菌における各種薬剤に対する耐性の分布

| β-ラクタマーゼ型            | 株数 | 薬剤名*   |        |        |        |        |       |       |        |        |
|----------------------|----|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
|                      |    | SM     | GM     | KM     | TC     | NA     | CPFX  | CL    | CP     | TMP    |
| CMY-2                | 30 | 19     | 5      | 4      | 16     | 17     | 4     | 0     | 6      | 6      |
| CMY-2/CTX-M-25/TEM-1 | 2  | 2      | 0      | 0      | 2      | 2      | 0     | 0     | 0      | 2      |
| CMY-2/TEM-1          | 9  | 6      | 0      | 2      | 6      | 6      | 1     | 0     | 0      | 6      |
| CMY-2TEM-135         | 2  | 2      | 2      | 0      | 2      | 0      | 0     | 0     | 2      | 0      |
| CTX-M-1              | 4  | 2      | 0      | 1      | 4      | 1      | 0     | 0     | 1      | 1      |
| CTX-M-15/TEM-1       | 3  | 3      | 0      | 2      | 3      | 3      | 0     | 0     | 0      | 1      |
| CTX-M-55             | 1  | 0      | 0      | 0      | 1      | 0      | 0     | 0     | 0      | 0      |
| CTX-M-2              | 5  | 1      | 0      | 0      | 2      | 2      | 0     | 0     | 1      | 0      |
| CTX-M-2/SHV-2/TEM-1  | 1  | 1      | 0      | 1      | 1      | 1      | 0     | 0     | 1      | 1      |
| CTX-M-2/TEM-1        | 4  | 4      | 0      | 4      | 4      | 3      | 0     | 0     | 1      | 3      |
| ND                   | 1  | 1      | 0      | 1      | 1      | 0      | 0     | 1     | 0      | 1      |
| 合計                   | 62 | 41     | 7      | 15     | 42     | 35     | 5     | 1     | 12     | 21     |
| (%)                  |    | (66.1) | (11.2) | (24.2) | (67.7) | (56.5) | (8.1) | (1.6) | (19.4) | (33.9) |

\*ストレプトマイシン(SM)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、テトラサイクリン(TC)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、コリスチン(CL)、クロラムフェニコール(CP)及びトリメトプリム(TMP)

表3 作出した接合伝達株(TC)のReplicon型

| 動物種 | Replicon type   | 22    |         |          |         |          | 計 | 23    |         | 計  | 合計 |
|-----|-----------------|-------|---------|----------|---------|----------|---|-------|---------|----|----|
|     |                 | CMY-2 | CTX-M-1 | CTX-M-15 | CTX-M-2 | CTX-M-55 |   | CMY-2 | CTX-M-2 |    |    |
| C   | A/C             | 3     |         |          |         |          | 3 |       |         | 3  |    |
|     | A/C, Frep       | 1     |         |          |         |          | 1 |       |         | 1  |    |
|     | B/O             |       |         |          |         |          | 0 | 1     |         | 1  |    |
|     | II-Iy           | 4     | 1       | 3        |         |          | 8 | 5     | 5       | 13 |    |
|     | II-Iy, B/O, FIB |       | 1       |          |         |          | 1 |       |         | 1  |    |
|     | II-Iy, FIB      |       |         |          |         |          | 0 | 1     |         | 1  |    |
|     | K               | 3     |         |          |         |          | 3 | 2     | 2       | 5  |    |
|     | UT              |       |         |          | 2       |          | 2 |       | 1       | 3  |    |
| 小計  | 11              | 2     | 3       | 2        | 0       | 18       | 9 | 1     | 10      | 28 |    |
| P   | II-Iy           |       |         |          |         | 1        | 1 |       |         | 1  |    |
|     | 小計              |       |         |          |         | 1        | 1 |       |         | 1  |    |
| 総計  | 11              | 2     | 3       | 2        | 1       | 19       | 9 | 1     | 10      | 29 |    |

表4 ブロイラー由来CMY-2 βラクタマーゼ産生株から作出したトランスコンジュガントの耐性型

| Replicon type | Resistance pattern | 2004-2009 | 2010-2011 |
|---------------|--------------------|-----------|-----------|
| A/C           | TC                 |           | 1         |
|               | TC-CP-             | 7         | 1         |
|               | TC-ST-             | 3         |           |
|               | TC-CP-ST-          | 2         |           |
|               | TC-GM-CP-          |           | 1         |
|               | TC-KM-TMP          |           | 1         |
|               | TC-GM-KM-CP-       | 1         |           |
| B/O           | None               | 9         | 1         |
|               | TC-ST-             | 1         |           |
|               | TC-CP-             |           |           |
| I             | None               | 19        | 8         |
|               | TC-                |           | 2         |
| N             | TC-                | 1         |           |
| K             | None               |           | 5         |
| Others        | None               | 3         |           |
| Total         |                    | 46        | 20        |

表5 2011年に病性鑑定材料から分離された黄色ブドウ球菌における薬剤耐性菌の分布

| 薬剤(Break point)      | 牛 (n=109) | 豚 (n=5) | 鶏 (n=8) |
|----------------------|-----------|---------|---------|
| Ampicillin (0.5)     | 6         | 3       | 0       |
| Streptomycin (64)    | 7         | 0       | 0       |
| Gentamicin (16)      | 1         | 0       | 0       |
| Tetracycline (16)    | 0         | 3       | 3       |
| Erythromycin (8)     | 2         | 1       | 4       |
| Chloramphenicol (32) | 0         | 1       | 0       |
| Ciprofloxacin (4)    | 0         | 0       | 2       |



平成 24 年度厚生労働省食品の安全確保推進研究事業  
「食品由来細菌のサーベイランスシステムの強化と国際対応に関する研究」

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

研究要旨

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に感染する可能性を検証するため、同じ地域でブロイラーとヒトから分離された広域スペクトラムセファロsporin (ESC) 耐性大腸菌に共通性が認められるか否かを検討した。ブロイラー由来株の解析では、鶏群間に共通する ESC 耐性大腸菌汚染源が存在する可能性が示唆された。また、ESC 耐性の伝播にプラスミドが重要な役割を果たすことが示唆された。ブロイラー由来株とヒト由来株の遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子には共通性が認められた。ブロイラー由来 ESC 耐性大腸菌がヒトに定着する可能性は低いものの、耐性遺伝子の交換は起こっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

本研究班におけるこれまでの調査研究から、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、それが畜産物を汚染する可能性が指摘されている。しかしながら、それら耐性菌が摂取されたとしてもヒトに定着したとの明確な証拠はこれまで得られていない。おそらく、そのようなルートがあったとしても、家畜由来細菌がヒトに定着する確率は低いと想像される。

本分担課題では家畜からヒトへ耐性菌が伝播した証拠を得るために、限られた地域で収集されたブロイラー及びヒト由来耐性大腸菌の諸性状を比

較することを試みた。ブロイラー生産現場においては近年、広域スペクトラムセファロsporin (ESC) 耐性菌の分離頻度が上昇しており、市販鶏肉の ESC 耐性菌汚染率も高いことから、これを研究の対象とした。菌種は菌株の遺伝子型別システムの整った大腸菌を選択した。南九州地域の食鳥処理場で採材したブロイラー盲腸便から ESC 耐性大腸菌を分離し、同じ地域でヒトから分離された ESC 耐性大腸菌と性状を比較することで、ブロイラー生産現場で選択された薬剤耐性菌がヒトに伝播した証拠が得られるか否かを検討した。

B. 研究方法

## 1. 菌分離、同定、遺伝子型別、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、個体ごとに大腸菌の分離を試みた。糞便希釈液を 0.5mg/L セフトキシム加マッコンキー寒天培地に塗布し、得られた赤色コロニーの生化学的性状を API 20E (BioMerieux) で確認し、大腸菌と同定した。ヒト由来株については鹿児島大学より分与を受けた小児下痢症由来 ESC 耐性大腸菌 15 株を供試した。

MLST website  
(<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) のプロトコールに従い、大腸菌の housekeeping 遺伝子 (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) の塩基配列を解析し、遺伝子型 (sequence type: ST) を決定した。ST131 と型別された大腸菌については市販の抗血清を用いて O 抗原と H 抗原の型別を行った。

## 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の ESC に対する感受性を調べた。セフトジジム, CAZ ; セフトキシム, CTX ; セフォキシチン, FOX

## 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 $\alpha$  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 (restriction-fragment-length polymorphism: RFLP 解析)。制限酵素として HindIII と SalI を用いた。

また、一部大腸菌プラスミドの宿主域を明らかにする目的で、それらプラスミドの *Salmonella* Typhimurium LT2 株、*Salmonella* Infantis L-3701 株、*Citrobacter freundii* ATCC8090 株、*Klebsiella pneumonia* ATCC9997 株、*Enterobacter cloacae*

ATCC13047 株、*Escherichia coli* ATCC14763 株に対する伝達性を調べた。

## 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。

## 5. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及びサザンブロット解析

ホームイングエンドヌクレアーゼ I-CeuI または S1 ヌクレアーゼを用いて供試菌株のゲノム DNA を消化後、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プローブを用いてサザンブ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。ESC 耐性遺伝子として *bla<sub>CM-2</sub>*、*bla<sub>CTX-M-15</sub>*、*bla<sub>CTX-M-2</sub>* を標的とした。

## C. 研究結果

### 1. 菌分離成績

2010 年 5 月～2011 年 5 月に採材した 14 農場由来、45 サンプルの全てから CTX に耐性を示す大腸菌が分離された。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. ブロイラー由来大腸菌性状解析結果

ブロイラー由来大腸菌 46 株に 32 の ST を認め、うち 8 つ (ST2787-ST2794) は本研究で新たに登録されたものである。ESC 耐性を規定するプラスミド (ESCP) のレプリコン型は 6 種 (I1-I $\gamma$ 、FIB、K、B/O、FIC、Y) で、単一のプラスミドから 2 つまでのレプリコン型が検出できた。 $\beta$ ラクタマー

ゼ遺伝子として SHV-2、SHV-12、CTX-M-2、CTX-M-14、CTX-M-15、CMY-2 が検出された (図 1)。

46 株中 6 株では ESC 耐性遺伝子が染色体上にのみ存在し、1 株では染色体とプラスミドの両方に存在していた (図 2)。

異なる鶏群由来株で同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合は認められた。具体的には *bla<sub>CMY-2</sub>* を載せた IncI1-I $\gamma$  プラスミドを保有する ST68 が鶏群 B と L で、*bla<sub>CMY-2</sub>* を載せた IncK、B/O プラスミドを保有する ST68 が鶏群 L と M で分離された (図 1)。

また、異なる ST で同じ RFLP パターンを示す ESCP を保有する株が認められた。具体的には HindIII と SalI 消化後に同じ泳動像を示す IncK、B/O プラスミドが ST117、ST2794、ST68 に属する大腸菌から分離された (図 3)。

IncI1-I $\gamma$  プラスミド及び IncK、B/O プラスミドの宿主域を明らかにする目的で伝達試験を行ったところ、両プラスミドが異種細菌に接合伝達されることが示された (表 1)

### 3. ヒト由来大腸菌の解析結果

ヒト由来大腸菌 15 株に 11 の ST を認め、うち 2 つ (ST3026、ST3475) は本研究で新たに登録されたものである。 $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型として SHV-12、CTX-M-2、CTX-M-14、CTX-M-15 が検出された (表 2)。ST131、O25:H4、CTX-M-15 保有菌の分離頻度は世界的に高いとされる。我々のヒト由来株の中に ST131 が 3 株、ST131 とは 1 アレル (*adh*) のみ異なる ST3475 が含まれていたため諸性状を比較したところ、性状が完全に一致する株は含まれなかった (表 2)。

### 4. ブロイラー由来株とヒト由来株の比較

ブロイラー由来株とヒト由来株で認められた合計 39 の ST のうち、ST38、ST68、ST162 は共通していた (表 3)。これら菌株の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型は鶏由来株でいずれも CMY-2、ヒト由来株は

CTX-M-14 または SHV-12 であった (表 4)。また、ブロイラー由来株とヒト由来株で認められる合計 6 つの  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型のうち CTX-M-14、CTX-M-15、SHV-12 は共通して認められた (表 5)。

### D. 考察

ブロイラー生産現場における ESC 耐性菌の蔓延は日本のみならず世界的に問題となっているが、その背景として ESC の適用外使用が疑われている (Dutil et al., *Emerg. Infect. Dis.*, 16:48-54, 2010)。本研究において異なる鶏群由来株で同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合は認められた。これは鶏群間に共通する汚染源が存在することを示唆しており、ブロイラー農場の上流に位置する孵化場などで ESC の適用外使用が行われていることを示唆する成績かも知れない。

異なる ST 間で同じ RFLP パターンを示す株が認められたことは、ST 間でプラスミドの伝達が起こっていることを示唆する成績と考えられた。また、ブロイラー由来大腸菌が保有する ESCP が異種細菌に接合伝達し得ることが示されたことは、ESC 耐性の伝播にプラスミドが重要な役割を果たすことを示唆している。

ブロイラー由来株とヒト由来株の比較では合計 39 の ST のうち、共通する ST が 3 つのみで、それらの菌株が保有する  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子は異なっていた。ブロイラーとヒトで定着できる大腸菌の遺伝子型は異なることを示唆する成績かも知れない。一方、合計 6 つの  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型のうち、3 つはブロイラー由来株とヒト由来株で共通していた。ヒト由来株に CMY-2  $\beta$  ラクタマーゼ保有菌が含まれないのは、分離法が異なるためと考えられるので、保有する  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型は類似性が高いと考えて良い。つまり、鶏とヒトで定着する大腸菌の遺伝子型は異なるが、何らかの形で耐性遺伝子の交換は起こっている可能

性が考えられた。そこで次年度は、ブロイラー由来株とヒト由来株が保有する ESCP に共通性が認められるか否かを検証する。

#### E. 結論

ESC に耐性を示し、同じ地域で分離されたブロイラー由来大腸菌とヒト由来大腸菌を比較したところ、遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子型には共通性が認められた。ブロイラー由来耐性菌がヒトに定着する可能性は低いものの、耐性遺伝子の交換は起こっている可能性が考えられた。

#### 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

(口頭発表)

1. Francis Shahada, Gakudoh Kosugi, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, Takehisa Chuma, and Masato Akiba. Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. 3<sup>rd</sup> ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment. June 26, 2012. Aix-en-Provence, France.
2. Francis Shahada、中馬猛久、小杉岳童、楠本正博、岩田剛敏、秋庭正人. ブロイラーから分離されたサルモネラと大腸菌における広域セファロsporin耐性因子の分布. 第154回日本獣医学会学術集会(2012年9月、岩手大)

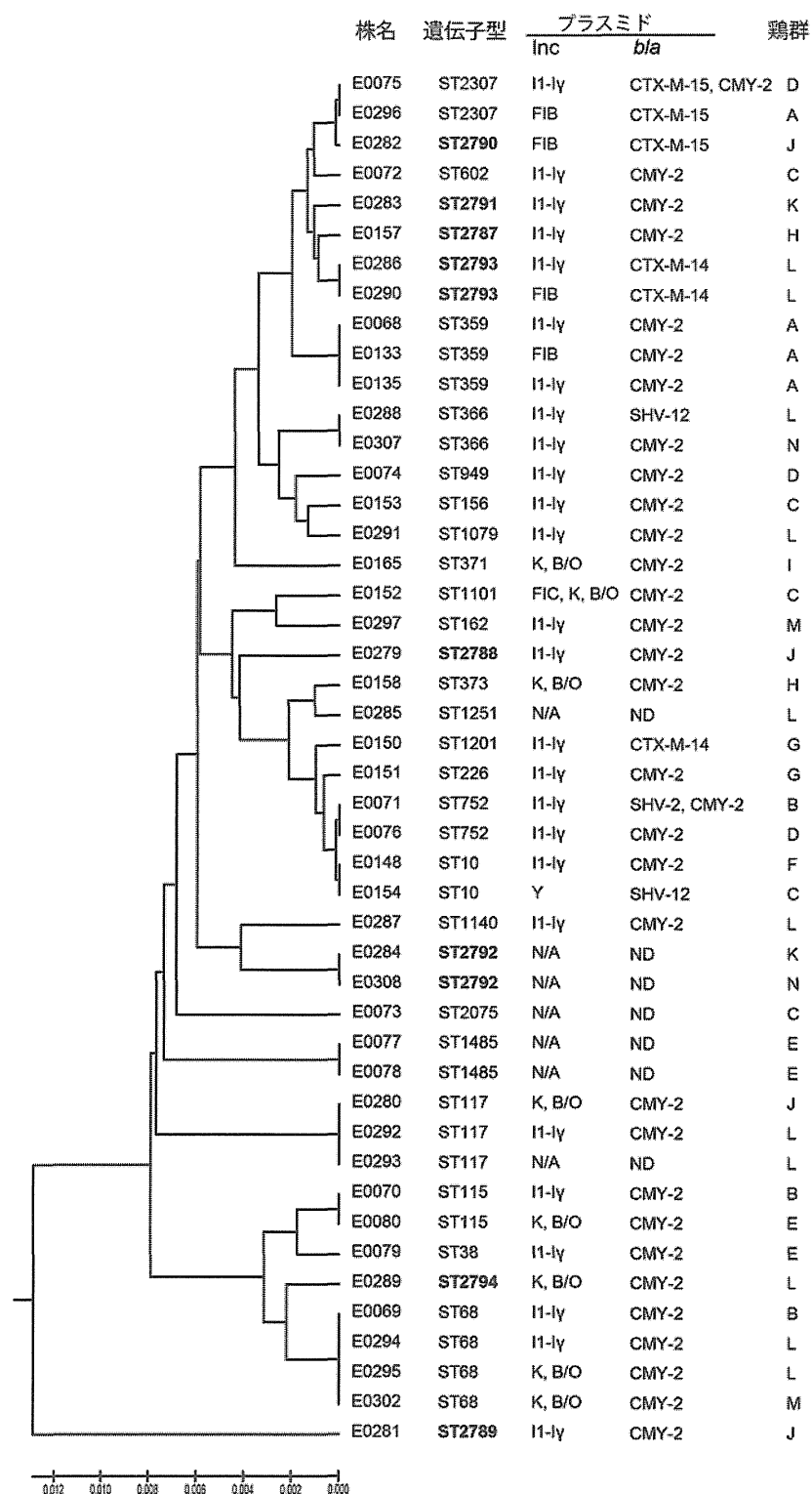


図1. ブロイラー由来大腸菌 46 株の遺伝的系統と保有プラスミド

7つの housekeeping 遺伝子の配列を結合した仮想配列から作成した系統樹の右に株名、遺伝子型 (ST)、ESC 耐性プラスミドのレプリコン型と薬剤耐性遺伝子、分離された鶏群を示した。

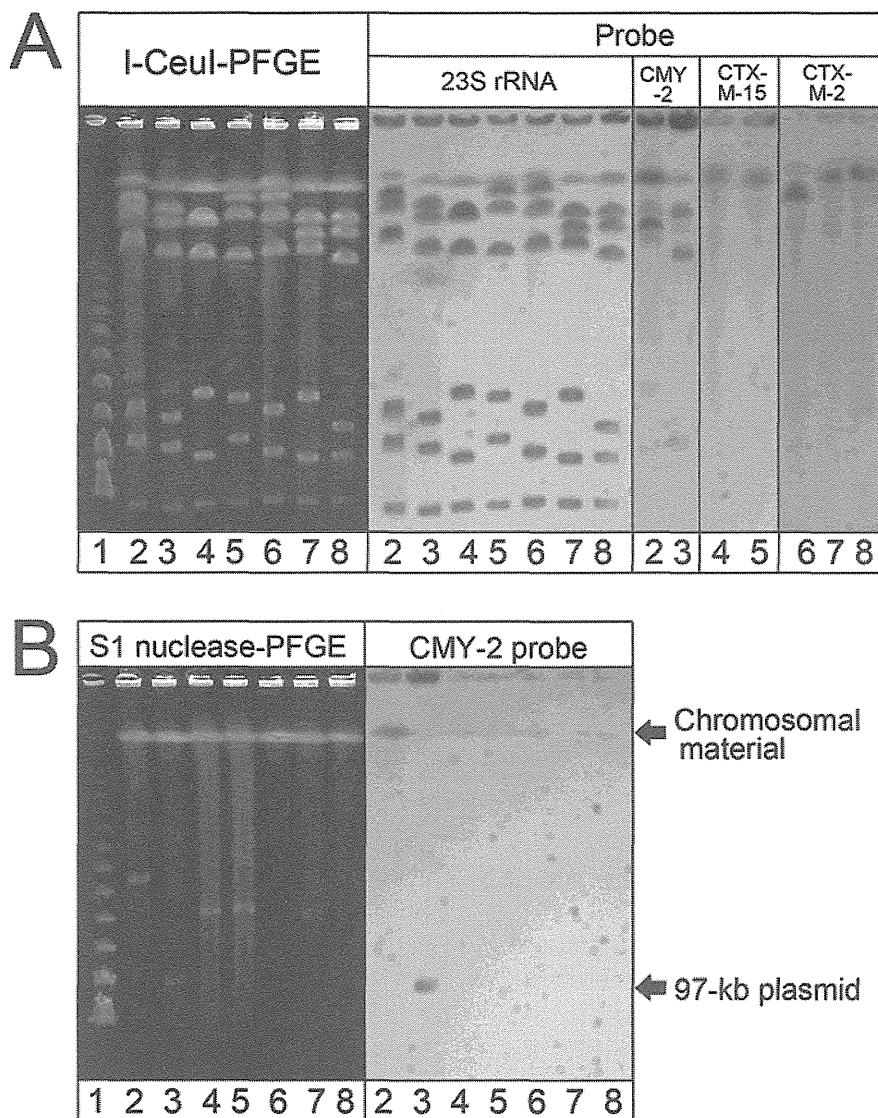


図2. プロイラー由来大腸菌の染色体上に存在する ESC 耐性遺伝子の検出

- レーン1,  $\lambda$ ラダー; 2, E0073; 3, E0285; 4, E0077; 5, E0078; 6, E0284; 7, E0293; 8, E0308
- A. I-CeuI 消化後のゲノム DNA を PFGE で展開後、23S rRNA プローブを用いてサザンブロット解析を行い、得られたバンドが染色体由来であることを確認した。 $bla_{CMY-2}$ 、 $bla_{CTX-M-15}$ 、 $bla_{CTX-M-2}$  プローブは染色体由来フラグメントとハイブリダイズすることが示され、これらの遺伝子が染色体上に存在することが裏付けられた。
- B. S1 ヌクレアーゼ消化後のゲノム DNA を PFGE で展開後、 $bla_{CMY-2}$  プローブを用いてサザンブロット解析を行った。PFGE 像にはプラスミドのバンドが観察されるが、E0285 株を除いてプラスミド上にシグナルは認められなかった。E0285 株では染色体とプラスミドの両方に  $bla_{CMY-2}$  遺伝子が存在することが示された。

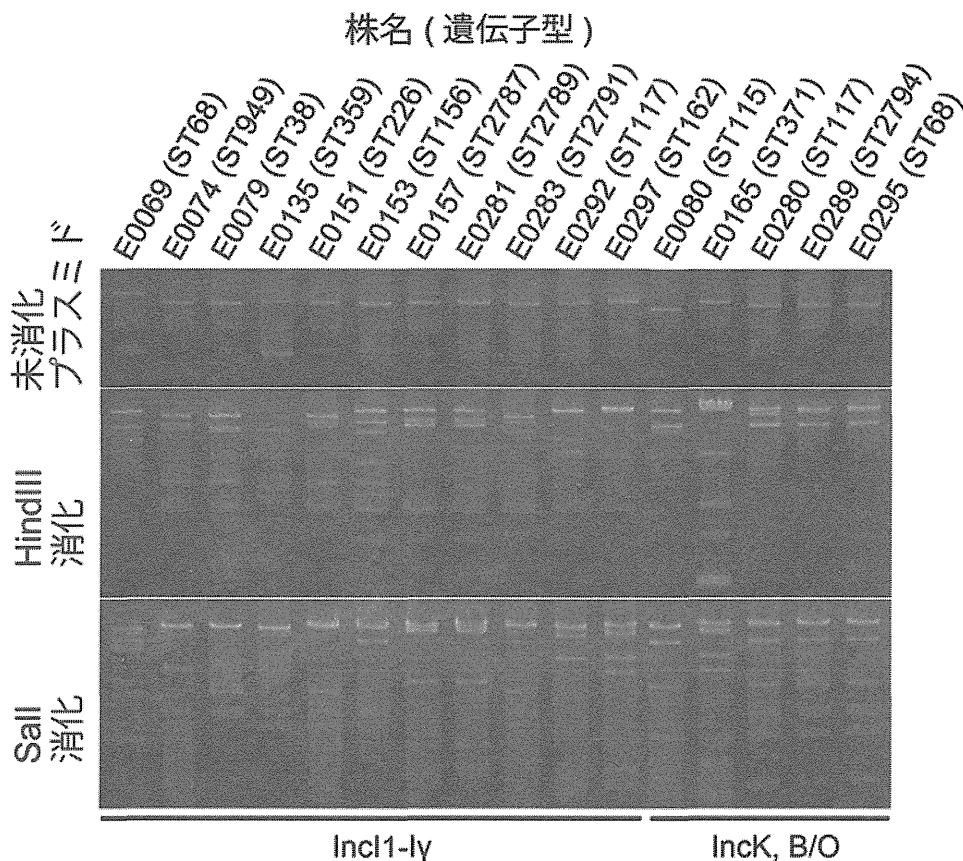


図 3. プロイラー由来大腸菌プラスミドの RFLP 解析結果

*bla<sub>CMY-2</sub>* 遺伝子を載せたプラスミドを保有する transconjugant または transformant からプラスミドを抽出し、HindIII または SalI で消化後、電気泳動像を比較した。

表 1. 大腸菌由来薬剤耐性プラスミドの伝達頻度

| 受容菌                                   | 供与プラスミド   |   |
|---------------------------------------|---|---|
|                                       | pE0074<br>Incl1-ly<br>95 kb<br><i>bla<sub>CMY-2</sub></i> | pE0080<br>InclK, B/O<br>80 kb<br><i>bla<sub>CMY-2</sub></i> |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2     | $3.2 \times 10^{-5}$                                      | $1.12 \times 10^{-8}$                                       |
| <i>Salmonella</i> Infantis L-3701     | $3.8 \times 10^{-8}$                                      | $5.0 \times 10^{-7}$  |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC8090  | $1.3 \times 10^{-3}$                                      | $8.0 \times 10^{-8}$  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC9997 | $7.5 \times 10^{-6}$                                      | $1.6 \times 10^{-8}$  |
| <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047 | $4.6 \times 10^{-2}$                                      | $1.0 \times 10^{-5}$  |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC14763     | $5.0 \times 10^{-9}$                                      | $4.3 \times 10^{-10}$                                       |
| <i>Escherichia coli</i> MC1061        | $1.9 \times 10^{-3}$                                      | $6.0 \times 10^{-7}$  |

表 2. 鹿児島大学より分与を受けた小児下痢便由来大腸菌 15 株の解析結果

| 番号   | 採材   | MLST   | O 抗原 | H 抗原 | ESBL     | AggR |
|------|------|--------|------|------|----------|------|
| E570 | 2005 | ST457  | UT   | NT   | CTX-M-2  | -    |
| E571 | 2005 | ST405  | UT   | NT   | CTX-M-15 | -    |
| E572 | 2007 | ST70   | 167  | NT   | CTX-M-2  | -    |
| E573 | 2007 | ST457  | UT   | NT   | CTX-M-2  | -    |
| E574 | 2008 | ST3475 | 25   | 4    | CTX-M-2  | -    |
| E575 | 2008 | ST1148 | 168  | NT   | CTX-M-15 | -    |
| E576 | 2009 | ST3026 | 169  | NT   | SHV-12   | -    |
| E577 | 2009 | ST131  | 153  | 4    | CTX-M-15 | -    |
| E578 | 2009 | ST68   | UT   | NT   | SHV-12   | -    |
| E579 | 2010 | ST162  | 145  | NT   | SHV-12   | -    |
| E580 | 2010 | ST131  | 63   | UT   | CTX-M-14 | +    |
| E581 | 2010 | ST131  | 25   | 4    | CTX-M-14 | -    |
| E582 | 2010 | ST38   | 142  | NT   | CYX-M-14 | -    |
| E583 | 2010 | ST297  | 86a  | NT   | CTX-M-14 | -    |
| E584 | 2010 | ST38   | 127  | NT   | CTX-M-14 | -    |

表 3. ブロイラー及び人由来株における遺伝子型の分布

| MLST  | ブロイラー<br>由来 | ヒト由来 | MLST   | ブロイラー<br>由来 | ヒト由来 |
|-------|-------------|------|--------|-------------|------|
| ST10  | 2           |      | ST1079 | 1           |      |
| ST38  | 1           | 2    | ST1101 | 1           |      |
| ST68  | 4           | 1    | ST1140 | 1           |      |
| ST70  |             | 1    | ST1148 |             | 1    |
| ST115 | 2           |      | ST1201 | 1           |      |
| ST117 | 3           |      | ST1251 | 1           |      |
| ST131 |             | 3    | ST1485 | 2           |      |
| ST156 | 1           |      | ST2075 | 1           |      |
| ST162 | 1           | 1    | ST2307 | 2           |      |
| ST226 | 1           |      | ST2787 | 1           |      |
| ST297 |             | 1    | ST2788 | 1           |      |
| ST359 | 3           |      | ST2789 | 1           |      |
| ST366 | 2           |      | ST2790 | 1           |      |
| ST371 | 1           |      | ST2791 | 1           |      |
| ST373 | 1           |      | ST2792 | 2           |      |
| ST405 |             | 1    | ST2793 | 2           |      |
| ST457 |             | 2    | ST2794 | 1           |      |
| ST602 | 1           |      | ST3026 |             | 1    |
| ST752 | 2           |      | ST3475 |             | 1    |
| ST949 | 1           |      |        |             |      |



表 4. 遺伝子型が同じ株の耐性遺伝子

| MLST  | ブロイラー<br>由来 | ヒト由来     |
|-------|-------------|----------|
| ST38  | CMY-2       | CTX-M-14 |
| ST68  | CMY-2       | SHV-12   |
| ST162 | CMY-2       | SHV-12   |

表 5. ブロイラー及び人由来株における  
ESC 耐性遺伝子の分布

| 耐性遺伝子    | ブロイラー<br>由来 | ヒト由来 |
|----------|-------------|------|
| CTX-M-2  |             | 4    |
| CTX-M-14 | 3           | 5    |
| CTX-M-15 | 3           | 3    |
| SHV-2    | 1           |      |
| SHV-12   | 2           | 3    |
| CMY-2    | 32          |      |

平成 24 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業  
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」

分担研究報告書

分担課題名：食品汚染及びヒト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 |
| 研究協力者 | 久米田裕子 | 大阪府立公衆衛生研究所 |

研究要旨：

鶏肉を 55 検体検査し、44 検体 (80.0%) から ESBL 産生大腸菌、2 検体 (3.6%) から AmpC 産生大腸菌が検出された。サルモネラでは ESBL 産生が 2 検体 (3.6%)、AmpC 産生が 8 検体 (14.5%) であった。大腸菌では、ESBL 産生菌が大多数を占めていた。これは、大腸菌とサルモネラの検出方法の違いによるものと考えられ、大腸菌では ESBL 検出用の選択分離培地を使用したことから、AmpC 産生大腸菌の検出が出来なかったものと考えられる。

A.研究目的

近年世界各国で、食品および食用動物から第三世代セファロスポリン系抗菌剤に耐性の大腸菌やサルモネラ属菌の分離が報告されており公衆衛生上の問題となっている。特に家禽においては、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL) またはプラスミド性 AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC) 産生株の増加が報告されており、ヒトの感染症との関連性の監視が求められている。日本国内では食品からの薬剤耐性株検出の年次推移の詳細な

報告はなく、薬剤耐性菌がヒトに影響を及ぼしているかどうかの現状は明らかではない。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、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性と、ヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べる。本年度は国産鶏肉由来の大腸菌とサルモネラの ESBL および AmpC 産生について報告する。

## B.研究方法

### (1) 食肉の調査

2012年4月に大阪府内で流通している鶏肉 55 検体を検査した。

### (2) ESBL および AmpC 産生大腸菌検出方法

検体 25g を採取し Bufferd Pepton Water で増菌培養し、chromID ESBL agar (シスメックス・ビオメリユー) を用いて大腸菌の分離培養を行った。分離した大腸菌の ESBL 産生は CLSI のディスク拡散法、AmpC 産生は 3-アミノフェニルボロン酸を用いたダブルディスクシナジー法で表現型を確認した。その後 PCR 法で ESBL 産生菌は遺伝子のグループ型別を行い、AmpC 産生菌はプラスミド性遺伝子の検出を行った。

### (3) ESBL および AmpC 産生サルモネラ検出方法

検体 25g を採取し一次増菌培養には Bufferd Pepton Water、二次増菌培養には Rappaport-Vassiliadis Enrichment broth を用い、XLD 寒天培地ならびに BGS 培地 (ブリリアントグリーン寒天培地+スルファピリジン) で分離培養を行った。そして確認培地でサルモネラの性状を示した株について血清型別と薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性試験は 1 検体につき 1 株、複数の血清型が同一検体から分離された場合は複数株実施した。薬剤

を添加した増菌培地および分離培地は使用しなかった。ESBL および AmpC 産生サルモネラのクリーニングにはセフポドキシムを用いた。そして ESBL および AmpC 産生の確認は大腸菌と同様の方法で行った。

## C.研究結果

### (1) 大腸菌

ESBL 産生大腸菌は 44 検体 (80.0%) から検出された。遺伝子のグループ型別は 46 株で行い、CTX-M-1 グループ 8 株、CTX-M-2 グループ 23 株、CTX-M-8/25 グループ 3 株、CTX-M-9 グループ 5 株、SHV 型 7 株であった (図 1)。一方、AmpC 産生大腸菌は 2 検体 (3.6%) から 2 株の分離 (いずれも CMY-2 保有) のみであった。

血清型は型別不能が多く、特定の血清型に型別される傾向は認められなかった (表 1)。

### (2) サルモネラ

55 検体中、36 検体 (65.5%) からサルモネラが検出され、血清型は *S. infantis* が 21 株、*S. Schwarzengrund* 7 株、*S. Manhattan* 6 株、その他 4 血清型が 4 株であった。セフポドキシム耐性のサルモネラは 10 検体 (18.2%) から検出され、ESBL 産生が 2 検体 (3.6%) 3 株、AmpC

産生が 8 検体 (14.5%) 8 株であった。  
AmpC 産生はすべて *S. Infantis* であり、21 株中 8 株、38.1%であった (表 2)。

#### D.結論

昨年度までに実施した鶏肉由来サルモネラの調査において、AmpC 産生菌が急増していることを報告した (論文発表 1)。本年度の大腸菌では、ESBL 産生菌が大多数を占めていた。これは、大腸菌とサルモネラの検出方法の違いによるものと考えられた。大腸菌では ESBL 検出用の選択分離培地を使用したことから、AmpC 産生大腸菌の検出が出来なかったものと推察される。

今後の検査では、AmpC 産生大腸菌の分離培養方法の検討を行う事が重要である。AmpC 産生大腸菌についての実態調査が正しく行われたならば、鶏肉での第三世代セファロスポリン系抗菌剤耐性大腸菌の分布状況が正しく把握できると考えられる。

#### E.研究発表

(論文発表)

- 1) Masumi Taguchi, Ryuji Kawahara, Kazuko Seto, Tetsuya Harada, Yuko Kumeda : Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. Japanese Journal of Infectious Diseases, 65, 555-557, 2012

(口頭発表)

- 1) 田口真澄、勢戸和子、河原隆二、原田哲也、久米田裕子：鶏肉の ESBL、衛生微生物技術協議会第 33 回研究会、2012 年 6 月、神奈川
- 2) 田口真澄：大阪府におけるカンピロバクター食中毒の動向および鶏肉からのカンピロバクター検出状況、第 5 回日本カンピロバクター研究会、2012 年 11 月、大阪

#### G.知的財産権の出願・登録状況

なし