

201327019A

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

(課題番号：H24-食品-一般-008)

平成25年度総括・分担研究報告書

(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26(2014)年3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 25 年度総括研究報告書

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 ..... 1

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 所長

#### 2. 平成 25 年度分担研究報告書

(I) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の遺伝学的研究 ..... 7

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 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) ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学的研究 .....14

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

松下 明子 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

門脇奈津子 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) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究 .....25

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 .....38

研究分担者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 石井 良和 東邦大学

卜部 尚久 東邦大学

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

(V) 家畜由来薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究 .....42

研究分担者	小島 明美	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
	比企 基高	農林水産省動物医薬品検査所
	浅井 鉄夫	岐阜大学大学院
	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

(VI) 家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析 .....48

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

(VII) 食品汚染及びヒト腸内細菌の薬剤耐性疫学 .....56

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
	原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所
	勢戸 和子	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) 伴侶動物病院から分離された薬剤耐性菌のヒトへの影響 .....63

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	臼井 優	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 .....72

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
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
	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
	山下 明史	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
	柴山 恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部
	鈴木 里和	国立感染症研究所 細菌第二部
	松井 真理	国立感染症研究所 細菌第二部

(X) JANIS と JVARM の連携.....78

研究分担者	柴山 恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部
研究協力者	鈴木 里和	国立感染症研究所 細菌第二部
	濱本 修一	動物医薬品検査所 検査第二部
	川西 路子	動物医薬品検査所 検査第二部
	比企 基高	動物医薬品検査所 検査第二部

(XI) 食肉の多剤耐性菌 (VRE, ESBL 生産菌など) の調査・研究 .....83

研究分担者	富田 治芳	群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野
研究協力者	谷本 弘一	群馬大学大学院医学系研究科薬剤耐性菌実験施設

3. 研究発表一覧.....102

平成 25 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業  
総括研究報告書  
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

代表研究者 渡邊治雄 国立感染症研究所所長

研究要旨：食品現場における耐性菌がヒトの現場に入り込んで、ヒトの健康に危害を及ぼすことが次第に明らかにされてきている。世界的には「farm to human」への耐性菌の流れの動向調査に関してWHOの抗菌薬耐性統合サーベイランスに関する専門家グループ（AGISAR：Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance）が活動しており、WHOは各国にサーベイランスのデータの報告を求めようとしている。我が国においても、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）との間で縦割り行政を越えての、横の連携をとり、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、病原性大腸菌、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と解析を行ってきた（JVARM）。一方、病院内における耐性菌の動向調査である院内感染菌耐性モニタリングシステム（JANIS：Japan Nosocomial Infections Surveillance）が別個に厚生労働省の事業として動いている。今回の研究班においては、この JVARM と JANIS のデータの統合を図るためのソフトの整備を行った。また、連携を強化し、動物等で選択されて耐性菌が実際の臨床の場に入り込んで、ヒトに健康危害を及ぼしているのかに関して、ゲノムレベルの高度な技術を用いて動物や臨床で分離される耐性菌およびその耐性遺伝子の比較解析を行い、その伝播ルートを明らかにするためのツールを開発してきている。この研究班での成果を AGISAR への報告に使えるようにし、国際貢献を図る予定である。

分担研究者：

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  
小島明美 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  
柴山恵吾 国立感染症研究所  
富田治芳 群馬大学大学院

は CTX 型 ESBL 産生株が問題となっているが、家畜から分離される大腸菌では CMY-2 型  $\beta$  ラクターマーゼ産生株が優勢である。国内で分離された臨床、食品および家畜由来耐性菌の比較解析を行い、その関連性を解明し、リスク評価等に供するデータの作成が必要とされている。また、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おり、ヨーロッパを中心に家畜関連 MRSA (MLST; CC398) が臨床に入り込んでいることが示されている。国内の家畜に由来する MRSA の報告は少ないが、同様のことがわが国でも発生しているのかに関する調査が必要である。本研究班では AGISAR への対応を見据え、家畜現場の耐性菌モニタリング JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) と院内感染菌耐性モニタリングシステム JANIS (Japan Nosocomial Infections Surveillance) のデータの統合を目指す、わが国の耐性菌のサーベイランス体制の強化を行う。また、動物等で選択された耐性菌が実際の臨床の場に入り込んで、ヒトに健康危害を及ぼしているのかに関しての解析を行うため、動物や臨床で分離される耐性菌およびその耐性遺伝子のゲノムレベルでの比較解析を行い、その伝播ルートの解明を目指す(図1)。

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ヒトに伝播し、ヒトの健康に危害を与える可能性について評価するため、モニタリング体制が構築されてきている。WHO は、世界における耐性菌の実態を明らかにするため Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) を設立し、食中毒菌などの薬剤耐性の国際的なサーベイランス体制の確立や検査法の統一を図ろうとしている。国内では食品安全委員会が家畜由来薬剤耐性菌のリスク評価を行っているが、医療上極めて重要な抗菌薬であるフルオロキノロンおよび第3世代セファロスポリン等が俎上に載っている。これまでの報告で、ヒト由来株で

B. 研究方法

- 1) AGISAR 会議に出席し、情報を集める
- 2) JVARM のデータを JANIS データフォーマット

トに準じたものに変換し、JANIS システムの集計プログラムを用いて、人由来株と家畜由来株のデータの比較が出来るようにする。

3) ヒトおよび食品由来株について、CP, TC, SM, KM, GM, ABPC, ST, NA, CTX, CPF, OFL, FOM, NFLX, Su, VCM などの各種薬剤に対する薬剤耐性菌出現動向を調べる。ヒト・食品・家畜由来食中毒菌(サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター、赤痢菌、MRSA 等)を対象に、生産現場の動物、市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株を収集し、その遺伝子型別(PFGE、MLST など)と耐性獲得状況から伝播経路について解析する。特に、セファロスポリン系薬剤に対する耐性(ESBL, CMY, カルバペネマーゼ等)の遺伝型を中心に解析する。

4) 次世代シーケンサーを用いて菌の染色体および耐性プラスミドの全ゲノム配列の解析を実施する。特に、増加傾向にある第三世代セファロスポリン耐性大腸菌を中心に解析を行う。

5) 現在公開されているプラスミド 2981配列の特徴(Incタイプ、薬剤耐性因子、Insertion sequence、Transposon等)を用いたPlasmidome ネットワーク解析と、プラスミド保有菌種の情報(菌種、分離年・国・地域・宿主、各種タイプング結果等)を網羅しデータベース化を行う

6) 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、甲斐、田口、倉園)、人由来株(甲斐、田口、倉園、泉谷)の菌株の収集、耐性型、耐性遺伝子を行う。JANIS 院内感染由来大腸菌、MRSA の収集、解析(柴山)。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)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、データベースの構築を行う(渡邊、泉谷)。それらの中から詳細な全ゲノム配列(特にプラスミドを中心に)の決定およびインフォーマティクスによる解析を行い、菌株あるいは耐性遺伝子の動物からヒトへの移動に関する推定を行う(黒田)

### C. 研究結果概要

1) 2103年9月2日~7日までコロンビアで開催された第5回 AGISAR 会議に渡邊が出席した。ヒトへの抗菌薬の CIA (critically important agents) リストを作成した。WHOは2013-2017年に向けての耐性菌対策の action plan を作成し、2014年初めを目処に WHO Global AMR report を出すことを計画している。Global Microbial Identifier (GMI: 細菌の全ゲノム配列をきめ、その情報を公衆衛生学的調査等に利用することを目的とした科学者のグループ)グループの進捗状況: 次世シーケンサーを用いて、分離された細菌の全ゲノム配列を決めて、その配列

から菌の種の決定、遺伝子型(MLST)、薬剤耐性型を数時間で判定しようとするプロジェクトが進行している。

2) JANIS データフォーマットに準じた新 JVARM データフォーマット (Ver1.0) を作成した。JVARM データを JVARM フォーマットに変換するプログラムを作成し、まずダミーデータを用いてアンチバイオグラム作成を試行している。農水省から JVARM の実データ利用が許可された後、過去の全データを JVARM フォーマットに変換し、JANIS と同じ形式の集計を行う事で、人と家畜との薬剤耐性菌分離状況が比較可能となる(図2)。

3) 腸内細菌科における ESBL (CTX-M) およびカルバペネマーゼ (NDM-1, KPC) のプラスミドを介した伝達頻度を Plasmidome ネットワークとして図示化することに成功し、俯瞰的な解析法の基盤を作成した。このネットワーク・データベースを重厚なものとするため、プラスミド配列解析ソフト GPAT、そして得られたプラスミド配列の関係性を明確にするネットワーク解析ソフト iPAT を開発した。腸内細菌間のプラスミドの伝達はかなり頻繁で、且つ容易に組み換えを起こし遺伝学的に多様性が生じるので、マスとして解析しないと、耐性遺伝子がどのように(動物由来細菌からヒト由来細菌への伝播)移動しているのかを解析するのは難しい。プラスミドの大規模なデータ・ベース化からの解析が重要である。

4) 食肉由来腸内細菌の中でのベータラクタム剤への耐性: 腸内細菌科耐性菌に関しては国内産食肉 121 検体 (121/135:89.6%)、および輸入食肉 115 検体 (115/150:76.7%) からペニシリン(アンピシリン)耐性菌を検出した。これらの耐性株のうち、ESBL 生産菌の分離頻度は、国内産食肉:分離頻度 25/135:18.5%、輸入食肉分離頻度 11/150:7.3%であった。AmpC 生産菌は国内産食肉:分離頻度 14/135:10.4%、輸入食肉:分離頻度 3/150:2%であった。

5) ブロイラー由来大腸菌の耐性: 2010~2012年に収集した健康ブロイラー由来大腸菌におけるセファロスポリン耐性の割合は、2010年に19.1% (36/188)、2011年に18.0% (29/161)、2012年に9.7% (20/206) と、2012年に有意に減少した ( $p < 0.05$ )。bla<sub>CMY-2</sub>耐性が優勢であった(2010年55.6% (20/36)、2011年75.9% (22/29)、2012年55.0% (11/20))。伝達株のプラスミドのレプリコン型別では、各年度とも IncI1 および IncK が優勢であった。耐性率の減少が一時的なものか、国内の養鶏団体によるセフチオフルの自主的な使用禁止の影響によるものかを、今後も耐性動向を継続的に解析する。

6) 牛由来 *Salmonella enterica* 04:i:- の bla<sub>CTX-M-55</sub> 遺伝子は、プラスミドではなく染色体上に存在した。bla<sub>CTX-M-55</sub> 遺伝子周辺塩基配列の

解析から、本菌の多剤耐性は染色体に挿入されたプラスミド由来断片に規定されている可能性が示唆された。なお、*bla*<sub>CTX-M-55</sub> は *bla*<sub>CTX-M-15</sub> と 1 塩基 1 アミノ酸の相違しかなく、本菌株が保有する *bla*<sub>CTX-M-55</sub> は複製の過程で *bla*<sub>CTX-M-15</sub> に変異が入ったものと推察された。

#### D. 考察

家畜現場の耐性菌モニタリング JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) と院内感染菌耐性モニタリングシステム JANIS (Japan Nosocomial Infections Surveillance) の連携を強化し、動物等で選択された耐性菌が実際の臨床の場に入り込んで、ヒトに健康危害を及ぼしているのかに関して明らかにしていくことは重要である。JVARM のデータを JANIS フォーマットに変換するためのソフトの解析がほぼ完了しつつある。今後、試行を繰り返し、更なる改良をすることにより、相互対応できるようになるであろう。動物で分離される耐性菌情報とヒトの世界で問題となっている耐性菌の情報が同じ土俵で解析することができる意義は大きい。WHO-AGISAR が求めている integrated surveillance に到達できるであろう。

JVARM の報告からは、ブロイラー由来大腸菌でセファロスポリン耐性株が 2004 年以降、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のかかわらず、増加傾向が認められた。①耐性株では CMY-2  $\beta$ -ラクタマーゼが優勢であり、②セファロスポリン耐性遺伝子の分布に 4 種類のプラスミド (IncA/C, IncB/0, IncII 及び IncI $\gamma$ ) 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、④*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有するプラスミドのレプリコン型は、IncII-I $\gamma$  が多く認められたことが明らかになった。また、ヒトから分離されるセファロスポリン耐性大腸菌との MLST 解析の比較では、ブロイラー由来大腸菌とヒト由来大腸菌では、その遺伝型に共通する部分が少ないことが判明した。しかし、 $\beta$ ラクタマーゼ遺伝子型や Inc 型では共通するものが見られることから、鶏の大腸菌が人の腸管に入ってもそのまま定着するのではなく、プラスミドがヒトの大腸菌に伝達して安定化している可能性、又はヒトの大腸菌にあるプラスミドと組み換えを起こし安定化する、あるいは薬剤耐性遺伝子をコードしている動く遺伝子だけがヒトの大腸菌のプラスミド、あるいは染色体に入り込んでいる可能性が考えられた。このような変遷をゲノムレベルで証明するためには、痕跡として残されているゲノムの情報を解析する必要がある。まずは、世界中で解析されてきている耐性プラスミドの情報の整理を行うため、プラスミド配列解析ソフト GPAT、そして得ら

れたプラスミド配列の関係性を明確にするネットワーク解析ソフト iPAT を開発した。腸内細菌間のプラスミドの伝達はかなり高い頻度で起こっている可能性があること、且つ容易に組み換えを起こし遺伝学的に多様性が生じていると考えられるので、マスとして解析する必要がある。今回開発したソフトは、プラスミドの大規模なデータ・ベースからの解析を促進すると思われる。

健康ブロイラー由来大腸菌におけるセファロスポリン耐性の割合は、2010 年に 19.1%、2011 年に 18.0%、2012 年に 9.7%と、2012 年に有意に減少した ( $p < 0.05$ )。これは興味ある傾向であった。耐性率の減少が一時的なものか、国内の養鶏団体によるセフチオフルの自主的な使用禁止の影響によるものかを、今後も耐性動向を継続的に解析する必要があるが、同じような現象が過去にもカナダで報告されている。カナダにおいては、鶏に使用されるセフチオフルを 2005 年に自主的に使用を禁止すると鶏から分離されるセファロスポリン耐性大腸菌の割合が 60% から翌年には 20% ぐらいまでに減少したと報告されている。抗菌薬の使用を避けることにより耐性菌への選択圧が下がり、耐性菌の分離頻度が下がることの報告はいくつか見られるが、今回のケースもそれによるものなのかは今後の継続的調査が必要である。

#### E. 結論

JVARM のデータを JANIS フォーマットに変換するためのソフトの開発がほぼ完了しつつある。近い将来、WHO-AGISAR が求めている integrated surveillance に到達できるであろう。耐性遺伝子が腸管内で、高頻度で移動している可能性があり、それらを明らかにするためのツールとして、プラスミド配列解析ソフト GPAT、そして得られたプラスミド配列の関係性を明確にするネットワーク解析ソフト iPAT を開発した。今回開発したソフトは、プラスミドの大規模なデータ・ベースからの解析を促進し、食品等を介して人の腸管に入り込んだ耐性遺伝子がヒトの腸内細菌に入り込んでいく証拠を提供するためのツールとして利用できるようになることが期待される。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

#### G. 健康危険情報

ブロイラー由来の大腸菌のセファロスポリン耐性菌が 2012 年には減少した。業者による自主的なセフチオフルの使用規制が関与しているのか、今後の継続的調査が必要である。

## H. 研究発表

### (1) 国内 3 件

- 1) Kawanishi M, Ozawa M, Hiki M, Abo H, Kojima A, Asai T. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. J Vet Med Sci. (in press)
- 2) 秋庭正人・地球規模で広がる耐性菌－抗菌薬の多角的使用とその功罪－6. 薬剤耐性遺伝子の伝播機構・化学療法の領域・29(6)1282-1291・2013
- 3) 渡邊 治雄 WHO 等による広範囲な耐性菌サーベイランスの取り組み:化学療法の領域. 29(6): 26-31. 2013

### (2) 海外 15 件

- 1) Nomura T. et al. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 56:6389-6392 (2012).
- 2) Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: collaborative study. J AOAC Int. 96(5):991-997. (2013)
- 3) Asakura H, Hashii N, Uema M, Kawasaki N, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yamamoto S. *Campylobacter jejuni* pdxA Affects Flagellum-Mediated Motility to Alter Host Colonization. PLoS One. 8(8):e70418. (2013)
- 4) Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S. Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. J Appl Microbiol. 114(5):1529-1538. (2013)
- 5) Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations. Front Microbiol, 24 May doi: 10.3389/fmicb. (2013).
- 6) Sato T, Yokota S, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance 2 of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying blaCMY-2 from fecal samples of 3 dogs in Japan J Med Microbiol., in press
- 7) 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. 10:243-249, 2013.
- 8) Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T. Effect of antimicrobial exposure on *acrAB* expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis. Front Microbiol. 4:53, 2013.
- 9) Francis Shahada, Takehisa Chuma, Gakudoh Kosugi, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, and Masato Akiba・Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan・Poultry Science・92(6)1641-1649・2013
- 10) Mather AE, Reid SW, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, Lemey P, Mellor DJ, Haydon DT, Thomson NR. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. Science. Sep 27;341(6153):1514-7 (2013).
- 11) Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group (Izumiya H), Møller Nielsen E. Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results. Euro Surveill. Aug 29;18(35):20566 (2013).
- 12) Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P; MLVA Harmonization Working Group (Izumiya H). Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. Euro Surveill. Aug 29;18(35):20565. Review(2013).
- 13) Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. Emerg Infect



Dis. May;19(5):823-5(2013).

14) Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains containing New Delhi metallo-beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam. J Clin Microbiol. Jan;51(1):373-4 (2013).

15) Chowdhury G, Pazhani GP, Dutta D, Guin S, Dutta S, Ghosh S, Izumiya H, Asakura M, Yamasaki S, Takeda Y, Arakawa E, Watanabe H, Mukhopadhyay AK, Bhattacharya MK, Rajendran K, Nair GB, Ramamurthy T. *Vibrio fluvialis* in patients with diarrhea, Kolkata, India. Emerg Infect Dis. Nov;18(11):1868-71(2012).

図1. 耐性菌のヒト、動物、環境間での伝播の解析と国際対応

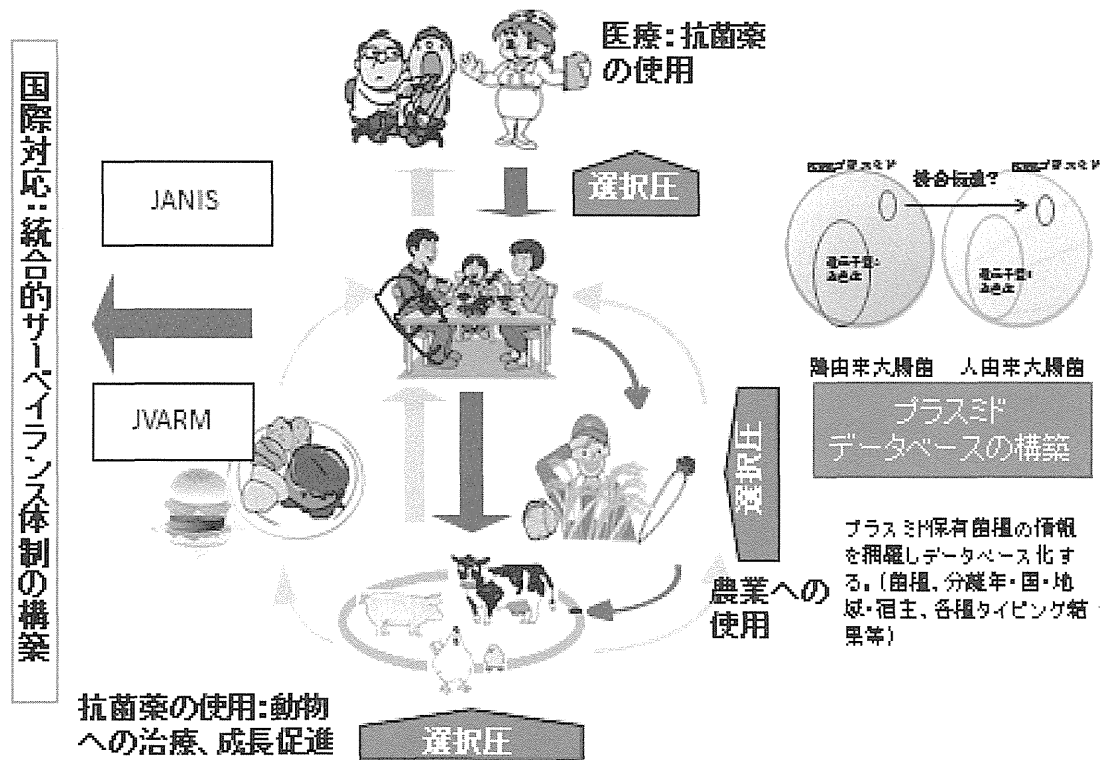
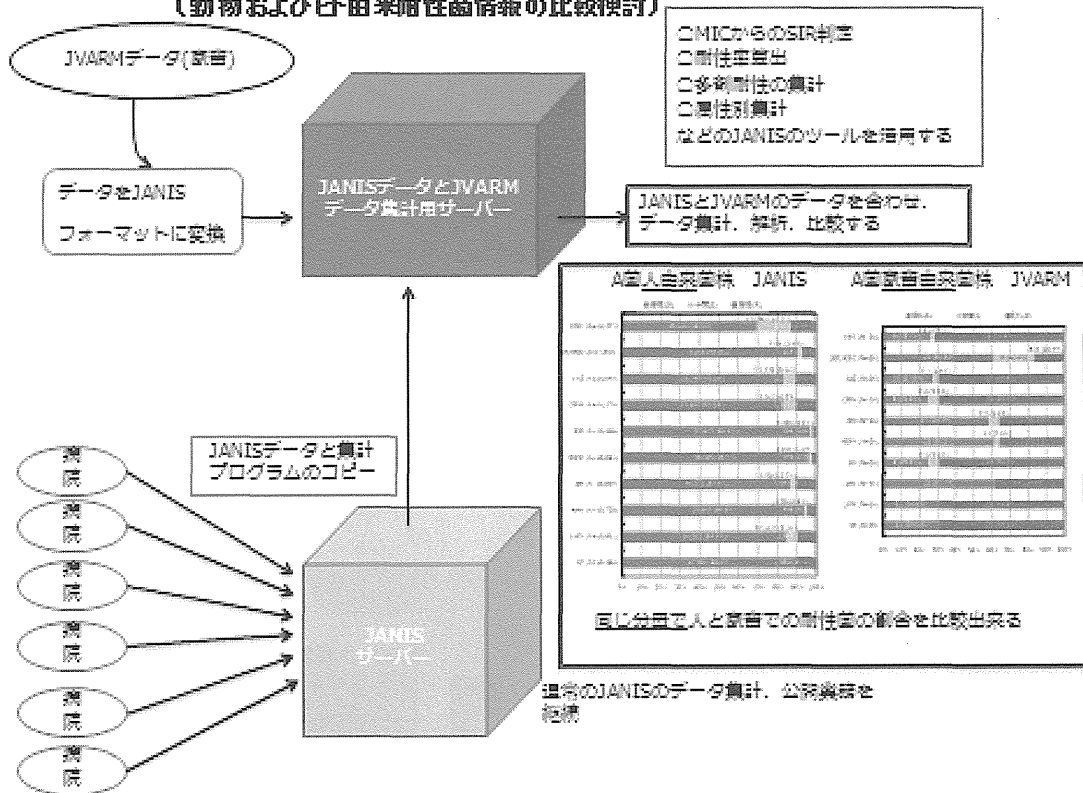


図2. JANISとJVARMのデータの統合的利用  
 (動物およびヒト由来耐性菌情報の比較検討)



平成 25 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」

「ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の遺伝学的研究」

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	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、サルモネラ等の腸管系細菌をはじめ、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要素の検討を行う。

A. 研究目的

食品を介した薬剤耐性の伝播という問題は、広範かつ多様な要素を含んでいる。その一つには海外渡航も検討すべき事項であると考えられる。Thamらは海外渡航歴のある下痢症患者を対象に薬剤耐性大腸菌のスクリーニングを実施した (Scand. J. Infect. Dis, 2010; 42:275-280)。その結果 24%から基質拡張型β-ラクタマーゼ産生性大腸菌が検出され、うち 90%が *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子陽性であった。

今年度の本研究では、海外渡航者由来の下痢原性大腸菌コレクションを対象に、今後その耐性が懸念されるアジスロマイシン (AZM) に着目し耐性株のスクリーニングを行った。

(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：渡航者下痢症由来大腸菌 63 株を供試した。

2. 薬剤感受性試験：Etest による感受性試験を実施した。必要に応じて 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)。

3. AZM 耐性遺伝子のスクリーニング：既報に従い、*mphA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* 遺伝子の有無をPCRによって試験した。

4. プラスミドの解析：供試菌株からプラスミドを抽出し、大腸菌 K-12 株 (DH5 $\alpha$  等) に形質転換を行った。当該耐性に基づく培地を使い形質転換体を選択した。形質転換体からパルスフィールドゲル電気泳動法用のプラグを調製した。当該プラグを S1 ヌクレアーゼ処理し PFGE にかき、プラスミドと推定されるバンドを切り出し、DNA を精製した。精製 DNA を Illumina NEXTERA XT kit にてライブラリーを作製した。Miseq シークエンサーにて解読後、情報解析を行った。

## C. 研究結果および考察

### 1. AZM 耐性株のスクリーニング

供試菌株の AZM に対する MIC の分布は 0.125 ~ >256 であった。便宜的に break point を 32 とし、3 株が耐性と考えられた。

### 2. 耐性遺伝子の検索

上記耐性株 3 株 (#42, 81, 99) に対し、AZM 耐性に関係している報告のある *mphA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* 遺伝子の有無を PCR により検索した。その結果、3 株とも *mphA* が陽性であることが判明した。*mphA* 遺伝子は macrolide 2' - phosphotransferase をコードしており、これは AZM を修飾して不活化すると考えられている。

### 3. プラスミドの解析

上記 3 株より市販キットにてプラスミド DNA を抽出し、DH5a 等の大腸菌 K-12 株に形質転換を行った。#81 及び #99 については AZM 耐性形質転換体を得ることができた。#42 についてはアンピシリン耐性の形質転換体を、#99 についてはさらにテトラサイクリン耐性の形質転換体を得た。

これらの形質転換体から PFGE 用のプラグを調製し、S1 ヌクレアーゼ消化後に PFGE でプラスミド DNA を分離した (図 1)。分離されたプラスミドと推定されるバンドを切り出し、Miseq により解析を行った。その結果、表 1 に示すように、28~68kb の大きさのプラスミドの配列が得られた。inc タイプは FII、FII-FIC もしくは K であった。形質転換体を選択した際に使用した薬剤に対応した耐性遺伝子が確認された。AZM 耐性を示したプラスミドには *mphA* 遺伝子が確認され、その周囲のコアな遺伝子構造は #81、#99 とも同様であったが、さらに周辺の遺伝子構造は異なっていた。両者は大きさも 68kb、28kb と大きく異なっており、#99 プラスミドには *bla* に加え、*aad* および *sullI* 遺伝子も見出された。

#81 および #99 の保有する病原性遺伝子は *aggR* であり、所謂 EAEC (Enteroaggregative *E. coli*) に分類される。EAEC に関しては、2011 年にドイツで発生した STEC 0104 集団事例の株も、EAEC から派生してきているものと考えられており、当該菌も AZM ではないが、CTX に耐性を持っていた。今回、EAEC13 株中 2 株で AZM 耐性株が確認され、一方 ETEC46 株からは AZM 耐性株を確認できなかった。このことから EAEC が耐性を獲得しやすいことが窺える。また、AZM は腸チフス・パラチフ

スでの治療にも使われることから、本耐性の動向には注意を払う必要があると考えられた。

#### D. 結論

AZM は腸チフスの治療薬としても重要な位置を占めている。これまで注視してきたセフェム系およびキノロン系抗菌薬に加え、AZM 耐性の動向も今後検討すべきかもしれない。また、渡航者下痢症において耐性菌が見出されることは、現地での食事を通じて感染していることが十分に考えられる。

#### E. 研究発表等

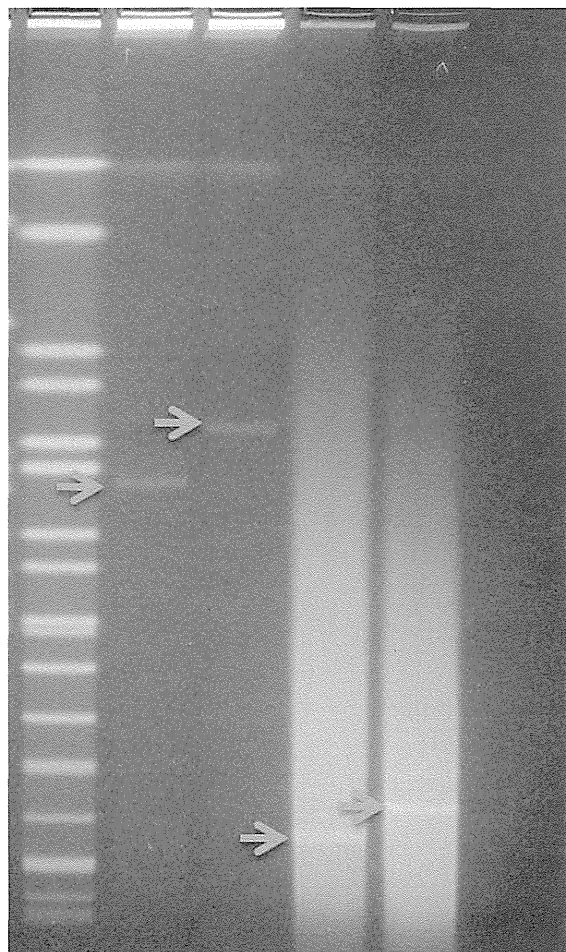
Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emerg Infect Dis.* 2013 May;19(5):823-5.

#### 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。

#42 #81 #42 #81



+S1 digestion

图 1. S1 -PFGE 解析例

	(vir)	size	contig	inc	R gene
#42	( <i>daa</i> )	50581	1	FII	<i>bla</i>
#81	( <i>aggR</i> )*	68194	1	FII	<i>bla</i> , <i>mphA</i>
#99azm	( <i>aggR</i> )	28377	2	FII-FIC	<i>bla</i> , <i>mphA</i> , <i>aad</i> , <i>sul1</i>
#99tc	( <i>aggR</i> )	54143	6	K	<i>tet</i> (classA)

表 1. プラスミドの配列解析結果

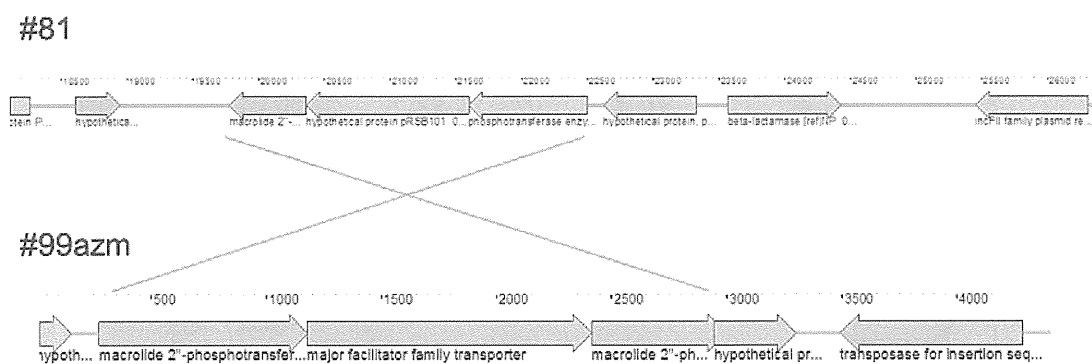
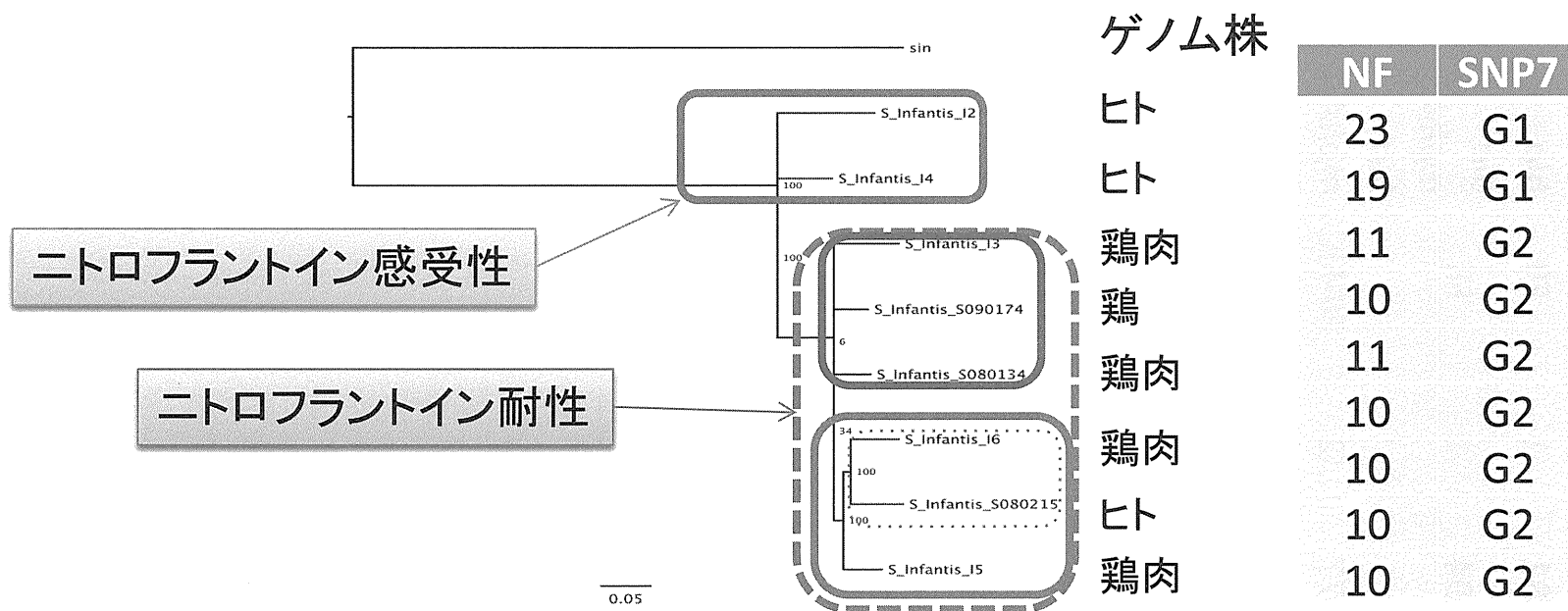


図 2. #81 および #99 プラスミドの *mphA* 遺伝子周辺領域。

(#81 と #99 とでは逆向きになっている。)

# Salmonella Infantisゲノム解析と耐性



由来	G1	G2	総計
Human*	29	22	51
Non-human	3	41	44
総計	32	63	95

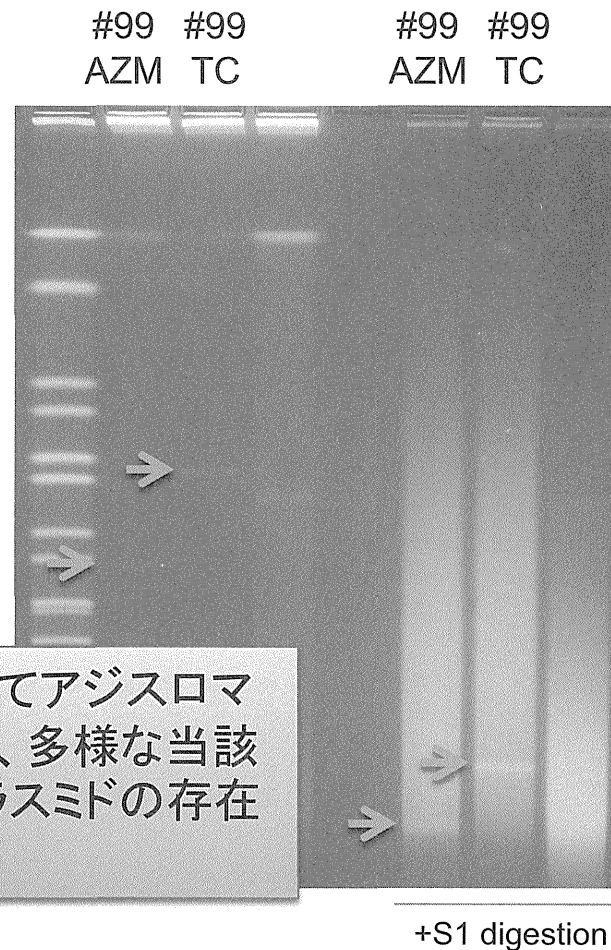
ゲノム解析およびSNP抽出により、SIにニトロフラントイン耐性を示すG2グループの存在と、それが非ヒト由来株に多く分布していることが示唆された。

\*患者、保菌者を含む

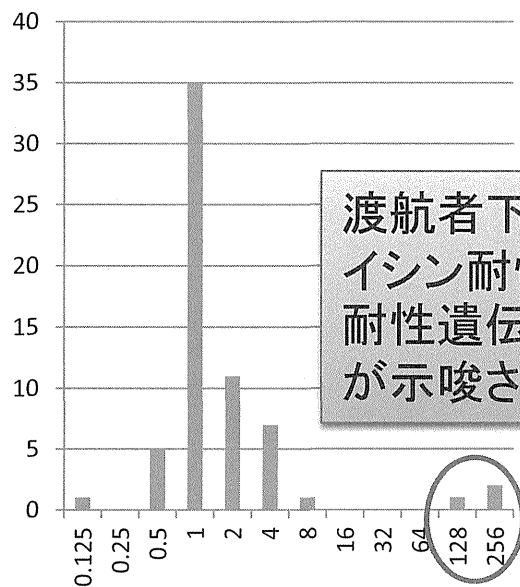


# 渡航者下痢症における耐性

	(vir)	size	contig	inc	R gene
#42	( <i>daa</i> )	50581	1	FII	<i>bla</i>
#81	( <i>aggR</i> )*	68194	1	FII	<i>bla</i> , <i>mphA</i>
#99azm	( <i>aggR</i> )	28377	2	FII-FIC	<i>bla</i> , <i>mphA</i> , <i>aad</i> , <i>sul1</i>
#99tc	( <i>aggR</i> )	54143	6	K	<i>tet</i> ( <i>classA</i> )



\* *bla*CTX-M-15陽性



渡航者下痢症由来の大腸菌においてアジスロマイシン耐性保有株が見つかり、また、多様な当該耐性遺伝子を保有する多様なR-プラスミドの存在が示唆された。

課題名：「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：ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学的研究

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
研究協力者	砂押克彦	埼玉県衛生研究所
研究協力者	松下明子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近真理奈	埼玉県衛生研究所
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター
研究協力者	土井りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

研究要旨

薬剤耐性菌が健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的としてヒト等から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行うとともに、ヒト及びイヌ・ネコ糞便を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

埼玉県内で 2013 年に分離され、供試したヒト（散发下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 168 株で 34 血清型に型別された。薬剤耐性では 59 株（35.1%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示した。CTX 耐性株が 2 株、フルオロキノロン耐性株が 1 株分離された。また、動物由来株として、伴侶動物のイヌ 131 頭、ネコ 31 頭および野生アライグマ 180 頭の検査を行い、イヌ 5 頭およびアライグマ 5 頭からサルモネラが分離されたが、分離株はすべて感受性であった。イヌとネコの ESBL 産生菌の検索では 25 株分離された。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 144 株が分離され、薬剤感受性試験では、144 株中 28 株（19.4%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示し、CTX 耐性株が 1 株分離された。ヒト糞便 227 検体からの ESBL 産生菌の検索では 29 株が分離された。

赤痢菌では、供試した 3 株中 2 株がフルオロキノロン耐性で、その血清型は *S. sonnei* であった。いずれも海外渡航歴のある患者からの分離であり、それぞれインド、あるいはカンボジアへの渡航歴があった。

食品の汚染実態調査では、県内の市場で購入した鶏肉、野菜等 140 検体を供試し、サルモネラは鶏肉 6 検体中 1 検体から、カンピロバクターは鶏肉 6 検体中 3 検体、ESBL は鶏肉 6 検体中 4 検体並びに生カキ 1 検体から検出された。サルモネラおよびカンピロバクター分離株は供試薬剤のいずれかに耐性を示した。

食鳥肉のフキトリ調査では、出荷前最終洗浄後のと体 37 検体の拭き取り検査を実施し、カンピロバクターが 9 検体から 18 株分離された。分離された 18 株中 9 株がフルオロキノロン耐性であった。

## A. 研究目的

近年、ヒトや食品等の周辺環境から分離されるサルモネラや大腸菌などの食中毒起因菌で、治療薬剤であるフルオロキノロン剤や第三世代セファロスポリンに対して抵抗を示す耐性菌の出現や増加が問題となっている。このような耐性菌がどのような経路でヒトに感染するのか、健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的としてヒト、食品および伴侶動物等から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。また、ヒト及びイヌやネコの糞便を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

## B. 研究方法

### I. 供試菌株

#### 1. ヒト由来

埼玉県内で分離された散発下痢症例、集団食中毒事例及び健康保菌者由来のサルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクター・赤痢菌を医療機関等の協力を得て広く収集した。また、埼玉県衛生研究所に搬入された糞便を chromID™ ESBL Agar (ビオメリユー社製) に塗抹し、ESBL 産生菌の検索を行った。

#### 2. 食品由来

買い取りによる検体収集を行い、サルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供し

た。また、食肉からの ESBL 産生菌の検索も行った。

#### 3) 食鳥処理場由来

食鳥処理場でのと体フキトリからのサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。

#### 4) 動物由来

伴侶動物のイヌやネコに加え、「埼玉県アライグマ防除実施計画」に基づき捕獲された野性化アライグマのサルモネラ分離を検討し、調査に供した。イヌ・ネコについてはヒト同様 ESBL 産生菌の検索を行った。

## II. 薬剤感受性試験

収集した菌株は米国臨床検査標準化協会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク:BBL) を用いて行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌はクロラムフェニコール (CP; 30  $\mu$ g)、ストレプトマイシン (SM; 10  $\mu$ g)、テトラサイクリン (TC; 30  $\mu$ g)、カナマイシン (KM; 30  $\mu$ g)、アミノベンジルペニシリン (ABPC; 10  $\mu$ g)、ナリジクス酸 (NA; 30  $\mu$ g)、セフトキシム (CTX; 30  $\mu$ g)、シプロフロキサシン (CPFX; 5  $\mu$ g)、ゲンタマイシン (GM; 10  $\mu$ g)、ホスホマイシン (FOM; 50  $\mu$ g)、ノルフロキサシン (NFLX; 5  $\mu$ g)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST; 25  $\mu$ g) の 12 薬剤で、ヒト由来株についてはイミペネム

(IMP:10  $\mu$ g)、アミカシン (AMK:30  $\mu$ g)、メロペネム (MEPM:10  $\mu$ g)、スルフィソキサゾール (Su:250  $\mu$ g) の 4 薬剤を加えた 16 薬剤を供試した。カンピロバクターはテトラサイクリン (TC;30  $\mu$ g)、ナリジクス酸 (NA;30  $\mu$ g)、シプロフロキサシン (CPFX;5  $\mu$ g)、ノルフロキサシン (NFLX:5  $\mu$ g)、オフロキサシン (OFLX:5  $\mu$ g)、エリスロマイシン (EM:15  $\mu$ g) の 6 薬剤を供試した。

## C. 研究結果

### (1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で 2013 年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表 1 に示した。分離された 168 株は型別不能を除き 34 血清型に型別され、*S. Saintpaul* が 19 株と最も多く分離された。次いで *S. Enteritidis* が 11 株であった。

この 168 株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した 168 株のうち 59 株 (35.1%) が 16 薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された *S. Saintpaul* は 19 株のうち 8 株 (42.1%) が耐性を示し、*S. Enteritidis* では 11 株のうち 8 株 (72.7%) が耐性を示した。

分離株の区分別耐性パターンを表 2 に示す。SM・TC・Su 耐性が 10 株と最も多く、次いで NA 耐性が 8 株、TC 耐性が 7 株であった。また、4 剤以上の薬剤に耐性を示す株が 18 株分離され、そのうち第 3 世代セフェム系薬剤である CTX に対する耐性菌が 2 株、フルオロキノロン剤耐性株は 1 株分離された (表 3)。CTX

耐性菌は同じ 08 群のサルモネラであるが、06 因子の有無により血清型名が異なる 2 株から分離された。この 2 株が保有する耐性遺伝子は同じ CTX-M-2 であった。フルオロキノロン耐性株は、インドへの渡航歴がある患者から分離された *S. Typhi* であった。

### (2) 動物由来サルモネラ

動物由来は、伴侶動物のイヌおよびネコに加えて、野生アライグマのサルモネラ保菌状況調査を行った (表 4)。イヌおよびネコは動物指導センターの協力を得て実施したが、イヌでは 131 頭中 5 頭 (3.8%) から分離されたが、ネコでは 31 頭のいずれからも分離されなかった。イヌ 5 頭から分離された血清型は、いずれも *S. Stanley* であった。薬剤感受性は、いずれも供試した 16 薬剤に対して感受性を示した。

捕獲された野生アライグマは 180 頭中 5 頭 (2.8%) の便からサルモネラが分離された。その血清型は全て *S. Nagoya* であり、薬剤感受性では 5 株とも供試薬剤全てに対して感受性であった。

### (4) 動物由来 ESBL 産生菌

ESBL 産生菌の検索ではイヌ 131 頭中 25 頭 (19.1%) から 25 株分離され、ネコからは分離されなかった (表 5)。イヌから分離された 25 株はすべて *E. coli* で、TEM、CTX-M-1group、CTX-M-8group、CTX-M-9group の耐性遺伝子を保有していた。一部の株について実施したディスク法による感受性試験では、フルオロキノロン剤にも耐性を示す株が複数株確認された。

### (5) 赤痢菌