

図1. VREの分離方法

VRE:分離・同定による腸球菌の検出かつ分離菌に対するバンコマイシンのMIC値が $16 \mu\text{g/ml}$ 以上(厚労省 感染症法届出基準)

試料25g + BPW 225ml

| 37°C, 24h

エンテロココセル寒天培地(BD)
(VCM $6 \mu\text{g/ml}$ 及び $32 \mu\text{g/ml}$)

| 37°C, 48h

定型的集落

| 血液寒天

| 37°C, 24h

vanA, *vanB*遺伝子の確認(PCR)

(Dutka-Malen et al., *J.Clin.Microbiol.* 33:24-27,1995)

* *van*遺伝子を保有していた株については, Rapid ID 32 STREP(シスマックス・ビオリユール)により菌種の同定を行った。

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)
「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(平成25年度)

食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネジメント

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

薬剤耐性獲得株が、食品や環境を通じてどのように人に伝播されるかは、薬剤耐性獲得細菌のリスクマネジメントに重要である。これまでの検討から、PFGE、薬剤耐性パターン、遺伝子型などを利用し、人から臨床的に分離された細菌を分析することによって、その株がどのような動物や環境を通じて伝播されたかある程度推定できることが分かっている。本年度は、食中毒菌としてカンピロバクター、常在的に存在する細菌として第三世代および第四世代セファロスポリン系薬剤耐性腸内細菌科細菌(ESBL産生菌)に注目して、主に遺伝子型に注目してその伝播経路の推定を試みることにした。

カンピロバクターについては、研究班の分担研究者や協力研究者から提供を受けた市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の遺伝子型別(MLST)により、人への伝播ルート of 推定を行った。カンピロバクターは、急性胃腸炎発症までの潜伏期が比較的長く、大気中で菌が死滅しやすいことから、食中毒事例での原因食品からの分離は一般的に試みられていない。通常、患者からの分離と喫食食品の推定から食中毒とされている。今回の型別により、由来動物がある程度推定可能であることが示された。

ESBL産生菌については、ESBL型別により、食品や環境由来株と人由来株の相関について検討を行った。輸入鶏肉について検討を試みた。

①市販鶏肉等を汚染しているカンピロバクターの耐性に関して検討し、食品を介した耐性菌の人への健康影響に関する基礎的な知見を集積する。カンピロバクターについては、研究班

協力研究者

東邦大学医学部微生物・感染症学講座 石井良和、
ト部尚久

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 朝
倉宏

の分担研究者や協力研究者から提供を受けた市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の遺伝子型別により検討した。

A. 研究目的

②第三世代および第四世代セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科細菌 (ESBL 産生菌) が市中に拡散している。国産鶏肉も同様の耐性菌による汚染を受けているが、昨年度までの研究から、ヒトから分離される耐性菌との関連性を認めることはできなかった。2012 年に実施したサーベイランスで収集された菌株の中に、CTX-M-8 産生菌株が含まれていた。CTX-M-8 産生菌株はブラジルやアルゼンチンなどの南米にその起源があると考えられている。南米以外で CTX-M-8 産生菌が分離されることは稀で、これまで南米以外から報告された症例は何れも南米への渡航歴を有していた。本邦では CTX-M-8 産生菌による感染症は報告されていない。

日本国内で流通している輸入鶏肉の原産国の多くはブラジルであることから、ブラジル産の鶏肉が CTX-M-8 産生菌による汚染に関して調査することを目的に研究を実施した。

B. 研究方法

①カンピロバクターは、生産現場の動物、市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の遺伝子型別 (PFGE, MLST など) と耐性獲得状況から伝播経路について考察した。

②ブラジル産鶏肉を食肉販売店で購入し、その 25g を 25mL の LB 培地で一晚、35°C にて振盪培養した。培養液はクロモアガー-ESBL 培地を用いて、第三世代および第四世代セファロスポリン系薬耐性大腸菌を選択した。

クロモアガー-ESBL 培地上に発育したコローナは、Phoenix system (日本 BD) で菌種同定および薬剤感受性検査を行った。薬剤感受性検査成績から ESBL 産生が疑われた菌株は、PCR にて大まかに ESBL の遺伝子型別を行った。ESBL をコードする遺伝子が陽性となった菌株に対して、その構造遺伝子全長を PCR で増幅し、DNA 塩基配列を決定した。

C. 研究結果

①カンピロバクターの MRST 遺伝子型の検討では、

日本の分離株が由来動物により遺伝子型に特徴があることが確認された。遺伝子型によって人、鶏、牛のいずれからも分離されている cc (遺伝子型)、人と牛のみから分離されている cc、人と鶏のみから分離されている cc があることが明らかとなった (図 1)。ヒト臨床分離株の遺伝子情報から cc を決定すると、cc によっては分離される動物が特定することが可能で、由来動物の推定がある程度可能である。それらの情報を基に、フルオロキノロン耐性の伝播について推定することが可能であった。

遺伝子型 cc を決定し、データベースと照会するとその cc が主にどの動物から分離されているかの情報を知ることができる。これらの情報から人由来臨床株が主にどのような動物由来であるかについて推定したところ、国内の人臨床分離株では、鶏肉 50%、牛 (レバー生食等) 10%、その他 10%、不明 30%であることが推定された。

今回用いた菌株の鶏肉と牛レバーのフルオロキノロン耐性の割合はそれぞれ 44%、13%で、ヒト臨床分離株は 33%であった。

②ブラジル産鶏肉から同耐性大腸菌の分離を試みたところ、ESBL 産生株が高率に分離された。遺伝子型は、*bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{CTX-M-8} が検出され、検出率はそれぞれ 50%であった。*bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{CTX-M-8} 以外の ESBL 産生株は存在しなかった。

D. 考察

①カンピロバクターの MRST 遺伝子型の検討では、図 1 に示したように、由来動物により遺伝子型に特徴があることが確認された。遺伝子型によって人、鶏、牛のいずれからも分離されている cc (遺伝子型)、人と牛のみから分離されている cc、人と鶏のみから分離されている cc があることがあ

鶏のみから分離されている cc に型別されれば、それぞれ牛、鶏を食べることによりカンピロバクターが伝播されることが推定できる。カンピロバクター食中毒は潜伏期間が比較的長く、菌も大気中で死にやすく、食材が残されていないことが多いことから、食中毒事例では、厳密に原因食品を決定することはまれである。MLST 型によれば、食品をある程度推定できる。このような手法で推定した人臨床株の推定食品は、鶏肉 50%、牛（レバー生食等）10%、その他 10%、不明 30%である。MLST 型では、複数の動物から分離されている遺伝子型もあるため、不明という結論が 30%程度である。

それぞれの分離株の由来別のフルオロキノロンに対する耐性率は、鶏分離株 44%、牛レバー分離株 13%、ヒト臨床分離株 33%であった。人臨床分離株のフルオロキノロン剤に対する耐性率が鶏分離株と牛レバー分離株の中間的な値であったことは、MLST 型別の結果を考慮すると矛盾の無い値であり、大変興味深い結果であると思われる。

②本邦において CTX-M-8 産生大腸菌が海外渡航歴のない患者および鶏肉から分離された。これまでの報告を鑑みるに、本邦の患者由来 CTX-M-8 産生大腸菌あるいはその遺伝子が鶏肉を汚染している CTX-M-8 産生大腸菌に由来することが示唆された。来年度以降、ヒトおよび鶏肉由来大腸菌および *bla*_{CTX-M-8} をコードする遺伝子の周辺領域を詳細に比較し、ヒト由来大腸菌から検出された *bla*_{CTX-M-8} の起源を明らかにすることを目的に研究を実施する。

E. 結論

①カンピロバクターの市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の MLST 遺伝子型別により検討した結果、人臨床株の推定食品は、鶏肉 50%、牛（レバー生食等）10%、その他 10%、不明 30%と推定する

ことができた。この結果を基に分離株のフルオロキノロンに対する耐性率を由来別に比較すると、人臨床分離株の耐性獲得率が、鶏分離株と牛分離株の耐性率の中間となることが理解できる。

②海外渡航歴のない患者およびブラジル産鶏肉から CTX-M-8 産生大腸菌が検出された。患者由来株とブラジル鶏肉由来株との関連性の解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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*. 2013 Aug 6;8(8):e70418.

2. 学会発表

ありません。

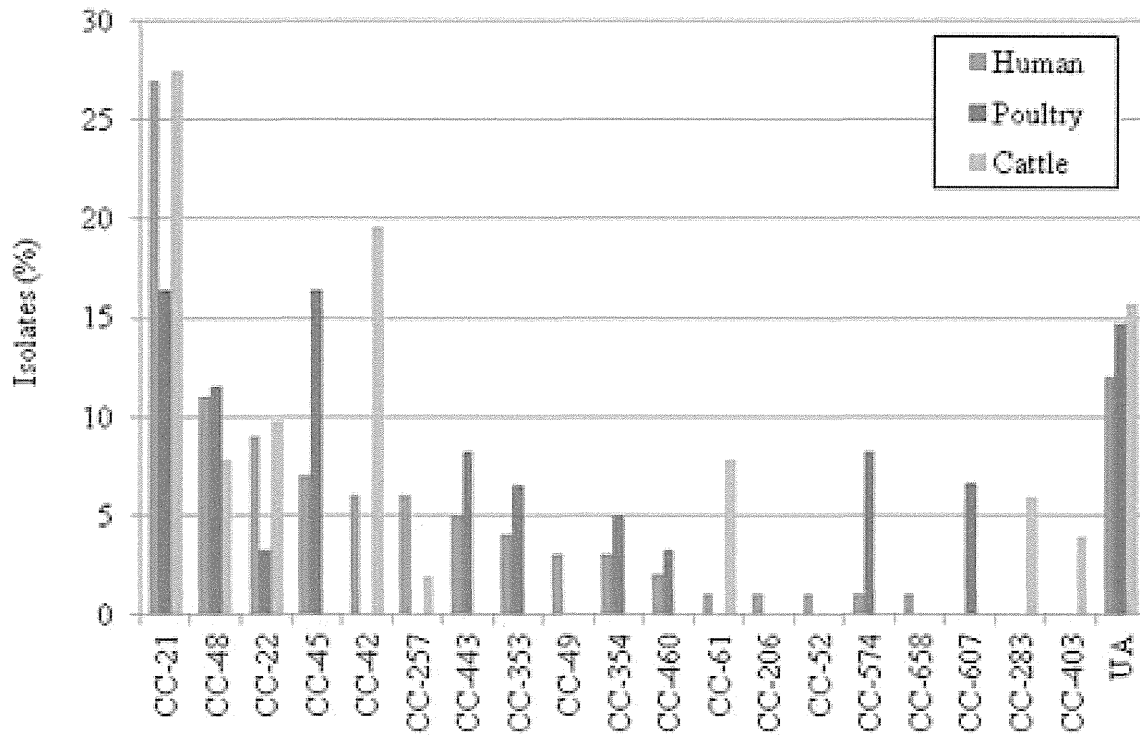


図1. 各種分離株のMLSTによるcc型別と由来動物の推定

平成25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：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）

研究協力者：比企基高（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：浅井鉄夫（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

研究協力者：黒田 誠（国立感染症研究所）

研究協力者：関塚剛司（国立感染症研究所）

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及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の耐性遺伝子型と耐性因子の性状を解析した。国内の養鶏団体によるセフトチオフルの使用に関する自主規制（2012年3月）により、ブロイラーにおけるセファロスポリン耐性の割合が前年度に比べて有意に減少した。なお、依然として β -ラクタマーゼ遺伝子保有プラスミドが分布することが示された。また、国内の豚でMRSA ST398の分布が認められ、新規のSCCmec型であることを明らかにした。

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、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チオフル（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報告されている。

これを受けて、2012年3月に国内の養鶏団体からセフトチオフル使用の自主的な注意喚起が通知された。そこで、セフトチオフルの自主的な使用禁止の影響を評価するため、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とともに、耐性因子に関する情報蓄積を図る。

また、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、国内においてもCC398が豚に分布することを報告した。そこで、国内で

分離された MRSA ST398 の性状解析を行った。

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

2010～2012年にブロイラーから分離された第3世代セファロスポリン耐性 (CTX: $\geq 4\mu\text{g/ml}$) 大腸菌 78 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スにより決定した。

混合培養法でプラスミド伝達試験を行い、得られたトランスコンジュガントを用いて、Inc型をPCR法で決定した。

(2) 家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (LA-MRSA) の遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性:

2012年に、東北、関東、中部、九州地方の計50農場、500頭の豚鼻粘膜スワブからMRSAの分離を試みたところ、関東の2農場5頭から14株(1検体最大3株)のMRSAが分離された。1頭当たり1株を代表株として、薬剤感受性、multilocus sequence typing (MLST)型、SCCmec型とspa typeを検索し、その後、ST398を示した株については次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを解析した。

C. 研究結果

(1) 第三世代セファロスポリン耐性大腸菌

2010～2012年に収集した健康ブロイラー由来大腸菌における第三世代セファロスポリンに対する耐性割合は、2010年に19.1%(36/188)、2011年に18.0%(29/161)であったが、2012年に9.7%(20/206)と有意に減少した ($p<0.05$) (図1)。

耐性株が保有する β -ラクタマーゼ型は、*bla*_{CMY-2}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))(図

2)。このように、2012年におけるブロイラー由来大腸菌の第3世代セファロスポリン耐性の割合の低下は、2004年以来優勢な*bla*_{CMY-2}を維持したまま減少したことが示唆された。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(図3)。

次に、2011年と2012年度にブロイラーから分離された第三世代セファロスポリン耐性株における各種薬剤に対する耐性割合を比較すると、KM耐性の増加の傾向が認められた。また、ブロイラー由来大腸菌の全体集計においてKM耐性の増加は有意に認められた(表1)。

接合伝達試験により*bla*_{CMY-2}を保有するプラスミドは、2011年以降一部(I1、FIB、K)のレプリコン型でTC耐性と2剤耐性プラスミドであったが、多剤耐性を示すIncA/C型のプラスミドは認められなかった(表2)。

(2) 家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (LA-MRSA)

1農場4頭由来11株は、全てST398で、SCCmec型とspa typeは、決定できなかった。薬剤耐性型は、AMP-TC-EM-SM-CP-GM耐性、または、AMP-TC-EM-SM-CP耐性を示した。

全ゲノム解析では、ST398 4株中1株(No. 274-1)で比較的良好に解読できた。コアゲノムはST398の08BA02176株と非常に近いが、SCCmec型は、新規のタイプであるclassA-A1B3と同定された。本株は、*mecA*の他、フルオロキノロン(*norA*)、マクロライド(*ermB*、*ermT*)、テトラサイクリン耐性(*tet*(38)、*tet*(L)、*tet*(M)、*tet*(S))遺伝子を保有していた。本株は、 γ ヘモリジン遺伝子は保有したが、PVLやエンテロトキシンの遺伝子は保有していなかった。

他1農場で分離されたMRSAは、ST5で、SCCmec型とspa typeは、決定できなかった。薬剤耐性型は、AMP-EM-TC-CP耐性を示した。

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、2004～2009年に収集した第三世代セファロスポリン耐性大腸菌の解析では、①*bla*_{CMY-2}が優勢であり、②この耐性遺伝子の分布に *IncI1*、*IncIγ*、*IncA/C* 及び *IncB/O* の4種類のレプリコン型のプラスミドが関与し、③これら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てきた (Hiki et al. 2013)。

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。2012年度のブロイラーにおけるセファロスポリン耐性は、2011年度に比べて有意に減少した。

セファロスポリン耐性株に、NA耐性の減少が認められたが、セファロスポリン耐性を保有していない大腸菌においてはNA耐性の変動が認められなかったことから、NAの使用状況の変化が、セファロスポリン耐性の減少に影響していないと考えられた。

一方、セファロスポリン耐性株にKM耐性の増加が認められたが、カナマイシン耐性を保有するプラスミドの分布は、認められなかったことから、KMの使用が影響したとは考えられなかった。

以上から、2012年度に観察されたセファロスポリン耐性の減少は、NA及びKM等他の薬剤の使用状況の変化によるものではなく、セフトオフルの自主規制に伴う当該薬剤の選択圧の減少が影響したと考えられた。

さらに、トランスコンジュガントの解析により、*bla*_{CMY-2}を保有するプラスミドのレプリコン型は、2011年と同様、*IncI1* 及び *IncK* が継続的に認められたが、2010年度まで認められた多剤耐性プラスミド (*IncA/C*) が検出できなくなった。このことは、セフトオフルの自主規制に伴う当該薬剤の選択圧の減少によって、プラスミドの維持に関連する負荷 (biological cost) の差異が関連したと推察された。

LA-MRSAについては、我が国において、ヨ

ーロッパ諸国と北米で問題となっている豚におけるMRSA ST398の分布が確認された。ゲノム解析により、国内分離株が保有するSCCmec型が新規のものであることが明らかとなった。この株の由来については不明であるが、国内で出現したか、海外から侵入したかについて、次年度解析していく予定である。一方、国内の豚におけるST398の拡散状況について、継続的な調査が必要である。

E. 結論

家畜由来大腸菌に *bla*_{CMY-2} が優勢に分布する要因及びMRSA ST398の浸潤状況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

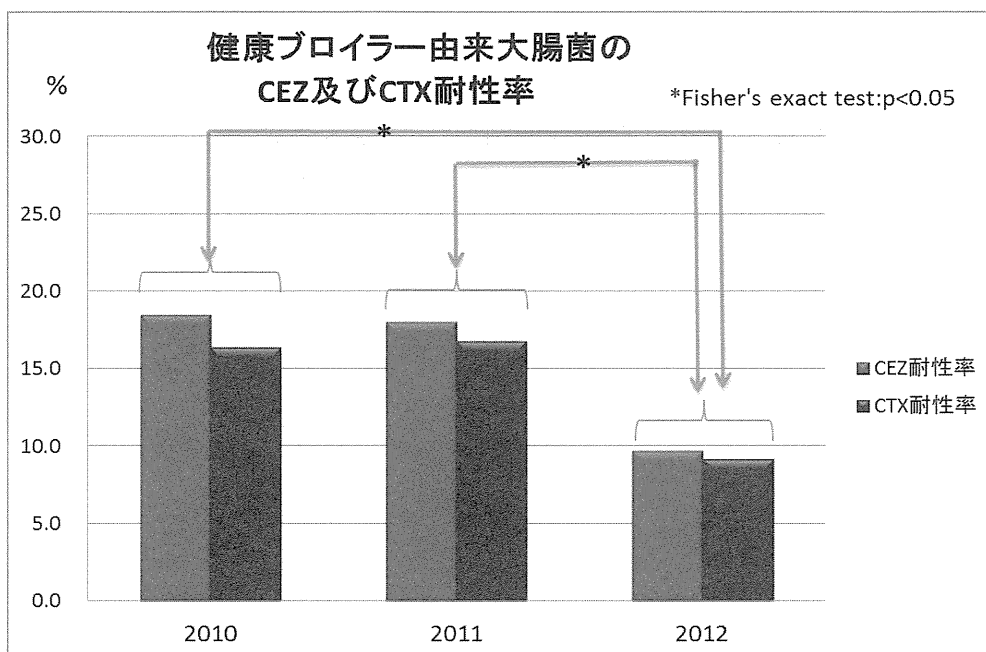
1. Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*_{CMY-2} gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 10(3):243-9, 2013.
2. Kawanishi M, Ozawa M, Hiki M, Abo H, Kojima A, Asai T. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 19(5):823-5, 2013.
3. 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.

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 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の推移



セファゾリン (CEZ) 、セフォタキシム (CTX)

図2 CEZ 耐性株のβラクタマーゼ型別

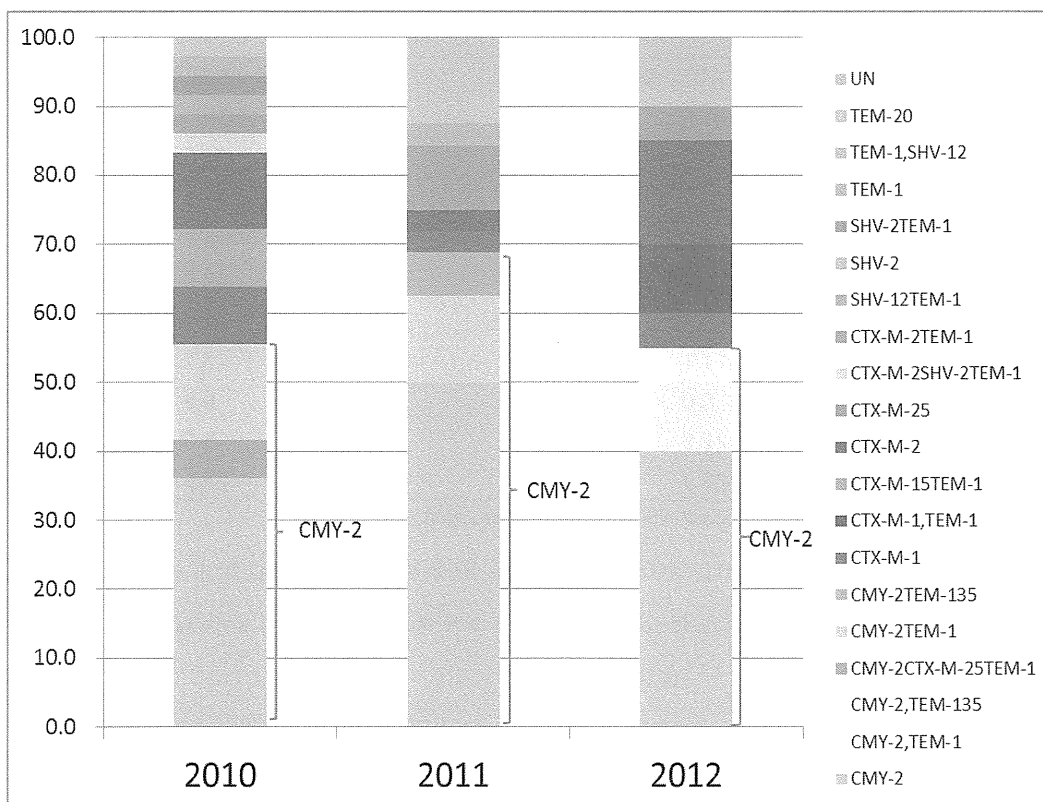


図3 伝達株のレプリコン型別

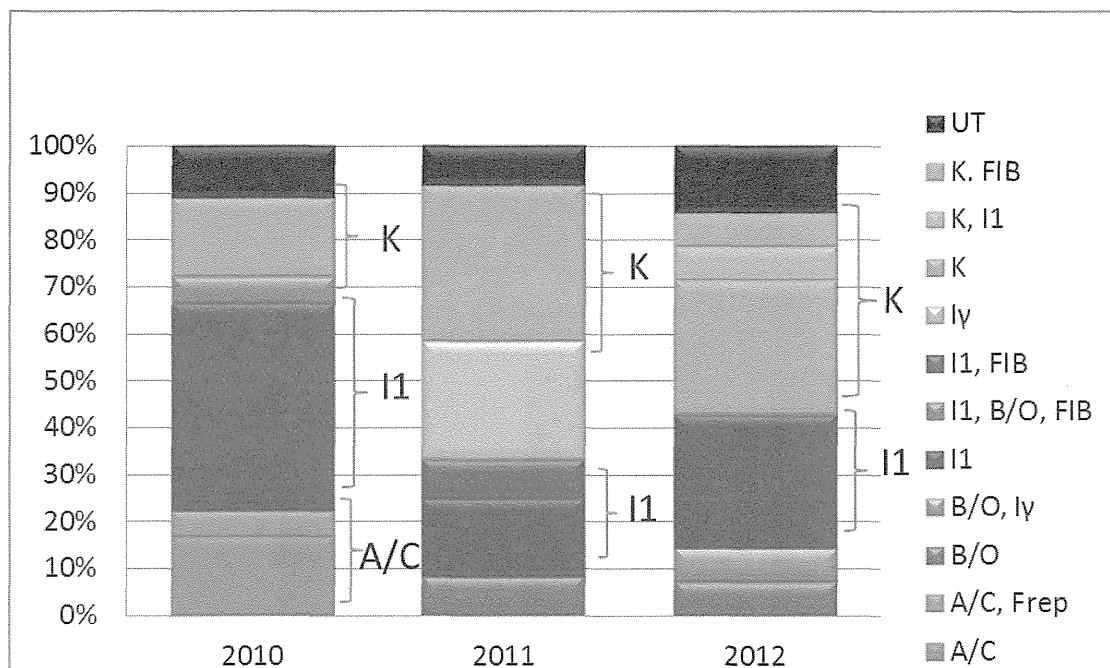


表1 ブロイラー由来大腸菌及び第3世代セファロスポリン耐性 (CTX \geq 4 μ g/mL) 大腸菌における各種薬剤に対する耐性

薬剤名*	第3世代セファロスポリン耐性大腸菌(%)			ブロイラー由来大腸菌(%)		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012
SM	NT	51.9	52.6	NT	24.8	37.9
GM	9.4	14.8	5.3	3.6	3.7	3.4
KM	25.0	22.2	42.1	13.3 a	14.3 a	27.7 b
TC	68.8	66.7	78.9	56.4	47.2	58.3
NA	59.4 a	59.3 a	26.3 b	33.3	31.7	30.1
CPFEX	15.6	11.1	0.0	3.6	3.7	7.8
CL	3.1	0.0	0.0	0.5	0.6	0.5
CP	18.8	22.2	21.1	10.8	9.3 a	16.5 b
TMP	NT	25.9	15.8	NT	23.6	33.0

A significant difference ($P<0.05$) in prevalence was observed between a and b.

*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(CPFEX)、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 2 ブロイラー由来 CMY2 β ラクタマーゼ産生株をドナーとして作出した
トランスコンジュガントの性状

year	Inc	Resistance pattern	total
2010	I1	None	4
	K	None	3
	A/C, Frep	SM-KM-TC-TMP	1
	A/C	SM-GM-TC-CP	1
		SM-TC-CP	1
	SM-TC	1	
2011	I1, FIB	TC	1
	I1	TC	1
		None	1
	I γ	None	3
	K	None	3
	B/O	None	1
2012	I1	TC	1
	K	None	4
	K, I1	TC	1
	K, FIB	None	1
	B/O, I γ	None	1
	UT	None	1

平成 25 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

国内で様々な材料から分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 04, [5], 12:i:- (04:i:-) 53 株の性状を解析した。血清型 Typhimurium (04, [5], 12:i:1, 2) を検出するための m-PCR 及び PCR では全ての供試菌株で陽性の結果が得られたことから、04:i:-は Typhimurium の単相変異株と考えられた。薬剤感受性を調べたところ、39 株 (74%) は全ての供試薬剤に感受性か単剤耐性を示した。残りの 14 株 (26%) は ASSuT または類似の薬剤耐性パターンを示した。2013 年に、それ以前の分離株には認められない広域セファロsporin (ESC) 耐性菌が分離された。β-ラクタマーゼを規定する遺伝子は *bla*_{CTX-M-55} で、染色体に存在した。周辺塩基配列を解析したところ、他菌種が保有するプラスミドの塩基配列と相同であることが明らかとなり、プラスミドが染色体に挿入されたものと推察された。ESC 耐性サルモネラは公衆衛生上の脅威と考えられることから、わが国の牛群における当該クローンの動向には今後、特段の注意を払う必要がある。

A. 研究目的

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar 04, [5], 12:i:- (04:i:-) は多くの国で最も高頻度に分離されるサルモネラ血清型の 1 つとなっている。わが国も例外ではない。本菌は血清型 Typhimurium (04, [5], 12:i:1, 2) の単相変異株と考えられているが、その他の血清型に由来する可能性は否定できない。また薬剤耐性を含め、その性状の詳細は不明である。そこで本研究では国内で人、動物、環境から分離された 04:i:-が血清型

Typhimurium に由来する可能性を検証し、それらの薬剤感受性を明らかにすることを目的とした。また、調査の過程で牛から分離された 04:i:-に広域スペクトラムセファロsporin (ESC) 耐性菌を見いだした。ESC 耐性サルモネラは公衆衛生上の脅威と考えられており、その分離状況には特段の注意を払う必要があることから、本菌株の性状を詳細に解析し、耐性遺伝子の由来を考察した。

B. 研究方法

1. 供試菌

県の衛生研究所または家畜保健衛生所で2001～2013年に分離同定された O4:i:-、53株(表1)を実験に供した。由来は人、牛、豚、鶏、ペンギン、カラス、オウインコ、豚肉、河川水である。

2. PCR

O4:i:-と Typhimurium との関連を明らかにする目的で、Typhimurium を同定するための m-PCR (Akiba et al., 2011, J Microbiol Methods 85:9-15) 及び IS200-PCR (Echeita et al., 2001, J Clin Microbiol 39:2981-2983) を実施した。また、Typhimurium を含む限られた血清型が保有する病原性プラスミドのマーカである *spvB* 遺伝子を検出する PCR を実施した。

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。

4. ファージ型別

Typhimurium 型別用ファージによるファージ型別を国立感染症研究所細菌第一部に依頼した。

5. 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薬剤に対する感受性を調べた。アンピシリン、セファゾリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ホスホマイシン、コリスチン、スルファメトキサゾール、ナリジクス酸。セファゾリンに耐性を示した2株については、さらにセフォキシチン、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフトジジム、セフェピム、セフピロム、イミペネム、メロペネム、ゲンタマイシン、ST合剤、オフロキサシン、エンロフロキサシン、シプロフロキサシンに対する感受性を調べた。加えて上記薬剤の一部について寒天平板希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) 測定を

実施した。

6. β -ラクタマーゼ産生性の確認

P/C アーゼテスト-N (日水製薬) を用いて基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) とセファロスポリナーゼ産生性を確認した。

7. ESC 耐性遺伝子の同定

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二部の方法に従って PCR 及び増幅産物の塩基配列解析を行った。

8. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及びサザンハイブリダイゼーション解析

ホーミ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ハイブリダイゼーション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プローブを用いた。

9. ESC 耐性遺伝子周辺塩基配列の解析

プライマーウォーキング法により ESC 耐性遺伝子周辺塩基配列の解析を行った。

C. 研究結果

1. PCR 及びプラスミド解析 (表1)

未実施の2株を除き、全ての供試菌株は m-PCR により Typhimurium と判定された。また、Typhimurium 特異的 IS200 も同様に検出できた。53株中39株が94 kb プラスミドを保有しており、保有の有無と *spvB* 遺伝子検出の有無が一致したことから、本プラスミドは Typhimurium 特異的病原性プラスミドであることが示唆された (表1)。

2. ファージ型

未実施の2株を除き、供試菌51株中13株は既知ファージ型に型別された。内訳はDT193が8株、DT26が3株、DT120とDT27がそれぞれ1株認めら

れた。34 株は既知溶菌パターンに当てはまらなかったが、複数の菌株で同じ溶菌パターンを示す場合が認められ、RDNC-a~e と命名した。4 株は型別不能であった (表 1)。

3. 薬剤感受性

53 株中 14 株は 2~5 薬剤に耐性を示した (表 1)。セファゾリンに耐性を示す株が 2 株 (C18、C19) 認められたので、さらに薬剤感受性を確認したところ、セファマイシンの一種であるセフォキシチンには感受性であったが、セフォタキシム、セフトリアキソン、セフトジジムといった第 3 世代のみならず、セフェピム、セフピロムといった第 4 世代セファロスポリンにも耐性を示した。カルバペネム系であるイミペネムには感受性、メロペネムには中間であった。その他、アミノグリコシド系であるゲンタマイシンにも耐性を示した (表 2)。

4. β ラクタマーゼ産生性

P/C アーゼテスト-N により C18、C19 株は ESBL 単独産生菌であることを確認した。

5. ESC 耐性遺伝子とその局在

PCR 産物の塩基配列解析により、C18、C19 株が $bla_{CTX-M-55}$ 遺伝子を保有することを明らかにした。両菌株からは Kado-Liu の方法でプラスミドが検出できなかった。I-CeuI または S1 スクレアーゼ消化後の DNA を PFGE で展開し、メンブレンに転写後、 $bla_{CTX-M-55}$ プローブを用いてハイブリダイゼーションを行ったところ、シグナルは染色体由来フラグメント上にも認められた (図 1)。なお、 $bla_{CTX-M-55}$ 遺伝子は世界的に高頻度に分離されている $bla_{CTX-M-15}$ と 1 塩基 1 アミノ酸の違いを有する。

6. $bla_{CTX-M-55}$ 遺伝子周辺塩基配列

$bla_{CTX-M-55}$ 遺伝子を含む 4.2 kb の領域の塩基配列をプライマーウォーキング法により決定した。この領域は *Klebsiella pneumoniae* のプラスミド pKPX-2 及び *Shigella sonnei* のプラスミド pKHSB1 の一部配列と相同であった。これらプラスミド上

で ESC 耐性を規定する遺伝子は $bla_{CTX-M-15}$ であった (図 2)。

D. 考察

未実施の 2 株を除き、供試した 04:i:- 51 株は m-PCR 及び IS200-PCR で全て Typhimurium と判定されたことから、これら菌株は Typhimurium の単相変異株と考えられた。一部の株で Typhimurium 特異的病原性プラスミドの保有が確認されたことや Typhimurium 型別用ファージで型別可能であったことは、これを裏付けている。病原性プラスミドが検出されないことやファージ型別できないことは Typhimurium である可能性を否定するものではない。Namimatsu ら (2006, J Vet Med Sci 68:187-188) は全身症状を示した豚から分離された Typhimurium の 92% が病原性プラスミドを保有していたのに対し、下痢及び無症状豚から分離された Typhimurium における病原性プラスミド保有率は 20% 以下であったことを報告している。

ファージ型別では 4 つのファージ型、9 つの RDNC パターンが認められ、4 株が型別不能であった。過去 10 年以上にわたって国内で分離された 04:i:- が多様な遺伝的背景を有する集団である可能性が示唆された。すなわち特定の Typhimurium から派生したのではなく、複数の Typhimurium 株から何らかの原因で単相化したものと推察される。

04:i:- は世界中で分離されているが、大まかな傾向としてはヨーロッパで分離される株は多剤耐性で、北米と南米で分離される株は感受性または単一薬剤に耐性を示すとされている (Switt et al., 2009, Foodborne Pathog Dis 6:407-415)。国内分離株は感受性菌と単剤耐性菌が 74% を占め、北米や南米の傾向に近いことが示された。残りの株は ASSuT または類似の薬剤耐性パターンを示した。ASSuT を示す株はヨーロッパのいくつかの国で分離されていることから、これら国々との疫学的関連の存在を示唆する成績とも考えられる。

2010年までの分離株にセファロスポリン耐性菌は認められなかったが、2013年に第4世代セファロスポリンにまで耐性を示すESBL産生菌が牛から分離された。セファロスポリン耐性を規定する遺伝子は $bla_{CTX-M-55}$ であった。本遺伝子の検出頻度は高くないが、世界的に高頻度に検出される $bla_{CTX-M-15}$ 遺伝子と1塩基1アミノ酸の違いを有するのみである。また、その周辺塩基配列と相同性を有する*Klebsiella*及び*Shigella*のプラスミド配列では β -ラクタマーゼ遺伝子型が $bla_{CTX-M-15}$ であることから、おそらくそれらと近縁なプラスミドがO4:i:-の染色体に挿入されたもので、その後 β -ラクタマーゼ遺伝子に点変異が入ったものと推察された。サルモネラ症の治療に汎用されるフルオロキノロン系(FQ)とESCのうち、FQは小児の治療に用いにくいいため、ESC耐性サルモネラの存在は公衆衛生上、看過できない。また、現行の法律(家畜伝染病予防法、食品衛生法)ではO4:i:-は届出伝染病に該当しないため(Typhimuriumであれば該当)、O4:i:-によるサルモネラ症で生乳出荷停止等の措置が取れないという問題もある。わが国の牛群における本菌株の動向には今後、特段の注意を払う必要がある。

E. 結論

わが国で分離されるO4:i:-はTyphimuriumの単相変異株である可能性が高い。2010年までの分離株では多剤耐性菌より感受性菌の分離頻度が高かった。2013年の牛由来株に認められたO4:i:-は

ESC耐性を示し、 β -ラクタマーゼを規定する遺伝子は $bla_{CTX-M-55}$ であった。他菌種に由来するプラスミドが染色体に挿入されたものと推察された。わが国の牛群における本菌株の動向には今後、特段の注意を払う必要がある。

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

(紙上発表)

1. Shahada F, Chuma T, Kosugi G, Kusumoto M, Iwata T, Akiba M. Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. *Poult Sci.* 92(6):1641-9, 2013.
2. Chuma T, Miyasako D, Dahshan H, Takayama T, Nakamoto Y, Shahada F, Akiba M, Okamoto K. Chronological Change of Resistance to β -Lactams in *Salmonella enterica* serovar Infantis Isolated from Broilers in Japan. *Front Microbiol.* 4:113, 2013.
3. 秋庭正人. 薬剤耐性遺伝子の伝播機構. *化学療法の領域.* 29:1282-1291, 2013

表 1. サルモネラ 04:i:-の性状解析結果

株	由来	分離年	PCR 結果 ^a			94 kb P ^b	ファージ型 ^c	薬剤耐性 パターン ^d
			m-PCR	IS200	spvB			
H1-4	人	2006	+	+	+	+	193	-
H5	人	2007	+	+	-	-	193	ASSu
H6	人	2008	+	+	+	+	RDNC-a	-
H7	人	2003	+	+	+	+	193	-
H8	人	2007	+	+	+	+	26	-
H9-11	人	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
H12	人	2004	+	+	-	-	RDNC-c	-
H13	人	2007	+	+	-	-	193	SSuT
H14	人	2002	+	+	+	+	UT	ASuT
C1	牛	2003	+	+	+	+	RDNC-a	-
C2	牛	2005	+	+	+	+	RDNC-a	-
C3-4	牛	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
C5-8	牛	2008	+	+	+	+	RDNC-a	-
C9-10	牛	2008	+	+	+	+	RDNC-a	A
C11	牛	2004	+	+	+	+	RDNC-a	-
C12	牛	2005	+	+	+	+	120	-
C13	牛	2005	+	+	+	+	RDNC-b	-
C14	牛	2008	+	+	-	-	UT	ASSuT
C15	牛	2007	+	+	+	+	RDNC	-
C16	牛	2010	+	+	+	+	RDNC-a	-
C17	牛	2010	+	+	+	+	RDNC-b	A
C18-19	牛	2013	ND	ND	-	-	ND	ACzSTC
S1	豚	2008	+	+	-	-	UT	ASSuT
S2	豚	2009	+	+	-	-	UT	ASSu
S3	豚	2002	+	+	-	-	RDNC-d	SSu
S4	豚	2003	+	+	-	-	RDNC-d	SSuT
S5	豚	2008	+	+	-	-	193	SSuT
S6	豚	2009	+	+	+	+	27	ASSuT
K1	鶏	2001	+	+	+	+	RDNC-b	-
K2	鶏	2004	+	+	-	-	RDNC	-
K3	鶏	2005	+	+	-	-	RDNC-c	-
K4	鶏	2006	+	+	-	-	RDNC-c	-
K5	鶏	2010	+	+	+	+	RDNC	ASuT
B1	ペンギン	2009	+	+	+	+	RDNC	-
B2-3	カラス	2000	+	+	+	+	RDNC-e	-
B4	オウインコ	2005	+	+	+	+	RDNC-e	-
M1	豚肉	2005	+	+	+	+	RDNC-a	-
M2	豚肉	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
R1	河川水	2007	+	+	+	+	26	-
R2	河川水	2007	+	+	+	+	RDNC-a	ASu
R3	河川水	2007	+	+	+	+	26	-

^a+, 増幅陽性; -, 増幅陰性; ND, 未実施

^bP, プラスミド; +, 保有; -, 非保有

^cRDNC, reacted but did not conform (既知の溶菌パターンに該当せず); RDNC-a~e, 同じアルファベットの RDNC 株の中で同じ溶菌パターンであることを示す; UT, 型別不能; ND, 未実施

^dA, アンピシリン; Cz, セファゾリン; S, ストレプトマイシン; Su, スルファメトキサゾール;
T, テトラサイクリン; -, 全ての薬剤に感受性

表 2. 牛由来 ESC 耐性サルモネラ 04:i:-株の薬剤感受性

試験法	菌株	ABPC	CEZ	CFX	CTX	CTRX	CAZ	CFPM	CPR	IPM	MEPM
ディスク法	C18	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I
	C19	R	R	S	R	R	R	R	R	S	I
寒天平板希釈法 (mg/L)	C18	>128	>128	4	128	NT	128	NT	128	NT	NT
	C19	>128	>128	4	128	NT	128	NT	128	NT	NT

試験法	菌株	CP	TC	SM	KM	GM	ST	NA	OFLX	EFLX	CPFEX
ディスク法	C18	R	R	R	I	R	S	S	S	S	I
	C19	R	R	R	I	R	S	S	S	S	I
寒天平板希釈法 (mg/L)	C18	32	512	128	2	32	NT	8	NT	NT	0.25
	C19	64	512	256	4	32	NT	8	NT	NT	0.25

ABPC, アンピシリン; CEZ, セファゾリン; CFX, セフォキシチン; CTX, セフォタキシム; CTRX, セフトリアキソン; CAZ, セフトアジジム; CFPM, セフェピム; CPR, セフピロム; IPM, イミペネム; MEPM, メロペネム; CP, クロラムフェニコール; TC, テトラサイクリン; SM, ストレプトマイシン; KM, カナマイシン; GM, ゲンタマイシン; ST, ST 合剤; NA, ナリジクス酸; OFLX, オフロキサシン; EFLX, エンロフロキサシン; CPFEX, シプロフロキサシン

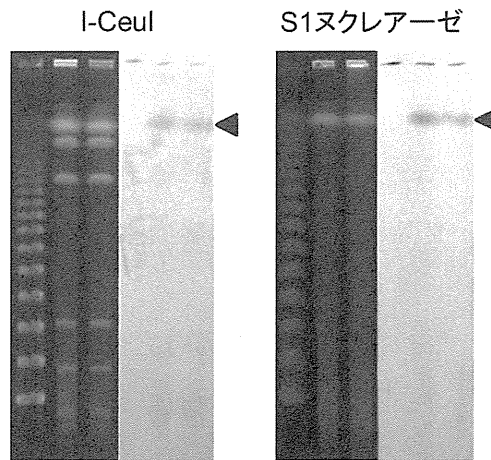


図 1. *bla*_{CTX-M55} 遺伝子は染色体上に存在する

I-CeuI または S1 ヌクレアーゼで消化した被検菌ゲノム DNA を PFGE で展開後、*bla*_{CTX-M55} プロンプを用いてサザン解析を行った。I-CeuI 消化後に観察されるフラグメントは染色体由来であり、サザン解析で一番上のフラグメント（矢頭）にシグナルが認められた（左パネル）。S1 ヌクレアーゼ消化後の PFGE ではプラスミドは観察されず、サザン解析で染色体由来断片（矢頭）上にシグナルが認められた（右パネル）。各写真レーン左から λ ラダーマーカー、C18、C19。

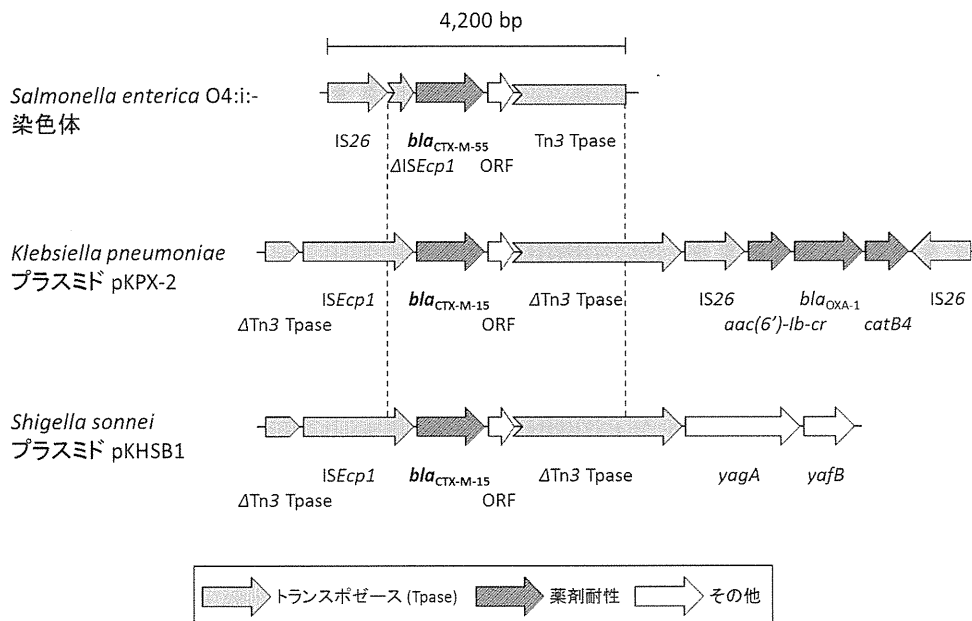


図 2. *bla*_{CTX-M55} 前後の塩基配列解析結果

C18、C19 株の染色体上に存在する *bla*_{CTX-M55} 遺伝子の近傍塩基配列を解析したところ、*Klebsiella pneumoniae* または *Shigella sonnei* 由来プラスミド配列の一部と相同であった。

平成 25 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
	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

研究要旨：

市販の国産鶏肉 24 検体から基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) およびプラスミド性 AmpC 型 β -ラクタマーゼ (AmpC) 産生大腸菌の検出を試みた。その結果、24 検体全てから ESBL または AmpC 産生大腸菌が検出され、市販の国産鶏肉にセファロsporin系抗菌剤に耐性の大腸菌が高率に存在することが明らかになった。そして同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出される事も判明した。また、AmpC 産生大腸菌検出には、セフォキシチン加平板培地などを使用する事が必要であると考えられた。

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型が変化していることが認められた。これまでは *S. Infantis* が最も多い血清型であったが、2013 年は *S. Schwarzengrund* が第 1 位であり、今後の動向が注目される。*S. Infantis* では 2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いているが、他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

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sporin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 β -ラクタマーゼ (ESBL) またはプラスミド性 AmpC 型 β -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
---	--