

## 新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明

食品における基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ産生菌の汚染状況に関する研究

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学 / 耐性菌制御学・教授）  
研究協力者 川村 久美子（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・准教授）  
後藤 謙介（名古屋大学大学院医学系研究科・医療技術学専攻・大学院生）  
中根 邦彦（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学・院生 / 耐性菌制御学，  
岡崎市保健所）

研究要旨：我が国では徹底した抗菌薬の適正使用が指導されてきたが、近年では抗菌薬曝露が比較的少ない健常人の市中感染症の起原菌からも耐性菌が分離されるようになり、公衆衛生の見地からも重要な問題となりつつある。これら耐性菌出現の重要な場として近年注目されているのが、動物を含めた様々な環境での菌の耐性化であり、特に、食用動物に対する抗生物質投与による耐性菌の選択とヒトへ感染の可能性が危惧されている。そこで本研究では、ESBL 産生菌による食品汚染に焦点を当て、調査・解析を実施した。153 サンプル中 35 サンプル (22.9%) から 85 株の基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌を検出し、そのすべてはトリ肉からの分離であった。ESBL の遺伝子型は輸入トリ肉、国産トリ肉とも CTX-M-2 型が最も多く、また輸入トリ肉由来株では CTX-M-8 型が優位であった。現在、日本の臨床分離株では CTX-M-9 group が主流を占めており、さらに接合伝達性が確認されたトリ肉株のプラスミドのレプリコンタイプも各々異なることから、今回の我々の結果は、食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定するものであると考える。しかしながら、現時点では、食品汚染菌が可動性の薬剤耐性遺伝子の供給源となる可能性は否定できず、今後も周辺遺伝子の解析を含めた調査・解析が必要と考える。

### A. 研究目的

基質特異性拡張型 -ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌の分離報告は年々増加傾向にある。特に CTX-M タイプの ESBL 産生大腸菌による市中感染症の増加は 2000 年以降顕著であり、公衆衛生の見地からも重要な問題となりつつある。近年、耐性菌出現の重要な場として注目されているのが、動物を含めた様々な環境での菌の耐性化であり、特に、食用動物に対する抗生物質投与による耐性菌の選択とヒトへ感染の可能性が指摘されている。そこで本研究では、ESBL 産生菌による食品汚染に焦点を当て、調査・解析を実施した。

### B. 研究方法

2010 年 1 月から同年 8 月までに 29 の異なるスーパーで購入した食品 153 サンプルを対象とした。サンプル約 10g を brilliant green lactose bile broth にて 24 時間増菌培養したのち、100  $\mu$ l を cefotaxime 1  $\mu$ g/ml 添加マッコッキー寒天培地に塗布し、一夜培養した。平板上に発育したコロニーについて、菌名同定を

行なうとともに、double disk synergy test による ESBL 産生性のスクリーニング試験、血清型別、ESBL 関連遺伝子の検索、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 解析および Inc type の同定を行なった。

倫理面への配慮 本研究は、名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得て実施された。

### C. 研究結果

153 サンプル中 35 サンプル (22.9%) から 85 株の ESBL 産生菌を検出した。ESBL 産生菌はトリ肉からのみ検出され、その分離率は輸入トリ肉の方が国産トリ肉よりやや高い傾向にあった (輸入 57.7% vs 国産 45.2%)。PFGE 解析によりクローナルな関連性がないことが判明した 53 株のうち、52 株が大腸菌、1 株が肺炎桿菌と同定された (Figure 1)。

ESBL 産生大腸菌 52 株のうち、43 株が CTX-M 型、残り 9 株が TEM-もしくは SHV-型の ESBL を産生しており、CTX-M 型では CTX-M-2 型 (22 株) が最も多く検出された。こ

の CTX-M-2 型の割合は輸入トリ肉と国産トリ肉との間で有意差は認められなかったが、CTX-M-8 型は輸入トリ肉株で有意に高い傾向(9株中8株)にあった (Table 1)。薬剤感受性試験では cefmetazole、flomoxef、imipenem、amikacin、fosfomycin に高い感受性傾向を示したが、ceftazidime、aztreonam、minocycline に対しては耐性傾向を示していた。

今回、世界的流行株である CTX-M-15 型の O25b:H4-ST131 株は認められなかったものの CTX-M-15 型が 5 株、O25b:H4-ST131 が 4 株あり、そのうち CTX-M-15 株で 4 株、O25b 株では 2 株に接合伝達性が認められた。解析の結果、各々のプラスミドのレプリコンタイプは Inc 11- が 4 株、Inc F、Inc P が 1 株であった (Table 2)。

#### D. 考察

今回の調査により、トリ肉からのみ ESBL 産生菌が検出された。このトリ肉における ESBL 産生菌の汚染率は、国内の過去の報告 (Asai et al., 2011. Acta Vet Scand; Hiroi et al., 2012. J Vet Med Sci) とほぼ一致しているが、欧州の報告 (Dhanji et al., 2010. J Antimicrob Chemother ; Jouini et al., 2007. J Antimicrob Chemother) よりもやや高い傾向にあった。ESBL 型は CTX-M-2 型が輸入トリ肉、国産トリ肉とも最も多く、輸入トリ肉由来株では CTX-M-8 型が優位であった。この結果はトリ肉の輸入元を同じくするイギリスの報告 (Dhanji et al., 2010. J Antimicrob Chemother) と類似していたが、オランダの調査 (Overvest et al., 2011. Emerg Infect Dis) とは異なるものであった。現在、日本の臨床分離株では CTX-M-9 group が主流を占めており、今回の結果は食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定するものであると考える。一方、オランダなど一部の国では、食品由来株と臨床分離株の ESBL 型が一致しており (Lverstein-van et al., 2011. Clin Microbiol Infect)、食品由来株のヒトへの感染を肯定している。この違いはトリ肉の産地や流通機構の差が影響しているかもしれない。今回、接合伝達

性が確認されたプラスミドのレプリコンタイプが、臨床分離株のそれとは異なったことも、食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定する結果であるが、本研究では可動性の遺伝子の伝播については解析しておらず、結論を出すには時期尚早といえる。今後は周辺遺伝子の解析を含めた調査が必要と考える。

#### E. 結論

今回の研究により、トリ肉の ESBL 産生菌汚染が明らかになった。遺伝子型やレプリコンタイプは食品由来株のヒトへの感染の可能性を否定するものであるが、食品汚染菌が可動性の薬剤耐性遺伝子の供給源となる可能性は否定できず、今後も周辺遺伝子の解析を含めた調査が必要と考える。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kawamura K., K. Goto, K. Nakane, and Y. Arakawa. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan.

Foodborne Pathog. Dis. 2013. 11(2):104-10.

##### 2. 学会発表

1) 後藤謙介, 川村久美子, 中根邦彦, 荒川宜親. 健康人糞便由来基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の細菌学的特徴と食品由来株との比較. 第87回日本感染症学会学術講演会. 感染症学雑誌. 2013. 第87巻, 238頁

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他