

201426008A

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26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27(2015)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 26 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 26 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…………… 8

研究分担者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

(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…………… 23

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

西野由香里 東京都健康安全研究センター・微生物部

井田 美樹 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

貞升 健志 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 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

青木弘太郎 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所

山本 詩織 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..... 49

研究分担者	川西 路子	農林水産省動物医薬品検査所
研究協力者	小池 良治	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
	佐々木貴正	農林水産省動物医薬品検査所
	浅井 鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学研究科
	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..... 58

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..... 65

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..... 72

研究分担者	田村 豊	酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット
研究協力者	臼井 優	酪農学園大学 獣医学部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..... 83

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

(X) JANIS と JVARМ の連携	92
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
	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	99
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. 平成26年度業績	111
学会発表一覧表	112
研究成果の刊行に関する一覧表	115

研究代表者 渡邊治雄 国立感染症研究所所長

研究要旨：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が組上に載っている。近年、ヒト及び家畜由来大腸菌、サルモネラ株で CTX 型 ESBL 産生株、および CMY-2 型  $\beta$  ラクターマーゼ産生株の分離率が上昇してきている。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。動物等で出現する耐性遺伝子がプラスミドを介してヒトの腸内細菌に伝播され、それがヒトで選択されることが考えられているが、プラスミド遺伝子の多様性のため、科学的証拠が少ない。網羅的に考察するためには、動物由来細菌、及びヒト由来細菌から分離される多くのプラスミド遺伝子のデータバンクを作成し、統計学的に解析する必要がある。今年度は、データバンクの作成を重点的にを行い、動物—ヒト間の移動に関する解析を行った。また、動物で行われている耐性菌モニタリングシステム JVARM とヒトにおける院内感染症耐性サーベイランス JANIS のデータを総合的に解析できるようにするための相互連関ソフトを完成させた。それにより WHO 等への国際的なネットワークへの対応が可能となる。

#### 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

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 の相互乗り入れを可能にすることにより、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推察できるデータが得られる。耐性遺伝子はプラスミドを介して細菌間を移動していると考えられるが、プラスミド遺伝子の多様性のため、直接的関連性を示すデータが得られていないのが現状である。網羅的に解析するために、動物およびヒトから分離される耐性プラスミドのデータベースを構築し、バイオインフォマティクスの技術を使い詳細に解析し、耐性遺伝子の移動を明らかにする。この研究班で得られた成果を WHO・AGISAR の場を通して世界に発信することにより国際的貢献を果たす。

#### A. 研究目的：

前回の「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」において、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 への連携)。一方、病院内における耐性菌の動向調査である院内

#### B. 研究方法

- 1) AGISAR および WHO AMR-TAG 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, NFL, 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。

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sporin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、各種タイピング結果等) 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) 今年度4月15-16日、10月16日、12月2-3日に開催されたWHO AMR-TAGに参加して、2015年5月にWHO総会に提出される今後5か年間の global action plan について討議した。WHO は、薬剤耐性菌が環境—動物—食品—ヒトの総合的問題として取り組まなければ最終的解決が図れない点を強調している (薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子がそれらの間を自由に動き回り、伝播し続けている；解決には、厚労省、農林省等の intersection 間の連携が不可欠)。政府 (政治家、政策決定者等)、医療関係者、一般人を含めすべての人へ、薬剤耐性の重要性を理解してもらうための適切な情報の提供、啓発の重要性も指摘。4月の会議で2015年WHO総会の議案の下準備が行われ、特に下記の課題に対する討議が行われた。①リスクコミュニケーション：政府 (政治家、政策決定者等)、医療関係者、一般人を含めすべての人へ、薬剤耐性の重要性を理解してもらうための適切な情報の提供、啓発を行う；薬剤の使用を含めた考え方、薬剤を受ける行動パターンの改善を図る②薬剤耐性の評価：薬剤耐性のサーベイランス、薬剤の使用状況のモニタリング体制を確立し、それによって得られる科学的データに基づくヒトへの健康影響評価をおこなう。③対策とその継続：多関連機関 (ヒ

ト、動物、環境等に係る機関) との連携による耐性問題への対応とそれを行った場合の経済的効果のレビューを行う。耐性問題はヒトの健康にかかわる国家的問題としてとらえることが重要。10月の会議では、2015年5月WHO総会に提出する「微生物 (細菌ばかりでなくウイルス、寄生虫、真菌を含む) の薬剤耐性に対処」するための Global action plan についての討議が行われた。WHO は6項目を対象にした行動計画を立て、それを履行することを各国に求めている。①公共への啓発、教育や訓練を通して耐性菌の問題点を関係者 (国民、医療従事者、政治家等) に理解してもらう。②研究 (調査) やサーベイランスを通して得られるヒト、動物、環境の耐性菌の実態の理解を深める。効果的な衛生状況の改善や感染症防止策を通し、感染症の罹患率を減少させる。③ヒトや動物への抗菌薬の使用を適正化させる。④新薬、診断薬、ワクチン等の開発を促進する。⑤行動計画の実行と達成度の評価を行う；2年ごとに各国は達成状況をWHOに報告する。最終目標をAMRの頻度の減少、AMRによる死亡率の減少、治療不可能な重症感染症の患者数を最終的にゼロにする、開発途上国において迅速診断できる病原体の数の増加を図る、第2相の臨床治験に入る新薬の使用の制限、ヒトに使用する抗菌薬の量を削減、動物等に使う抗菌薬の量の削減、ヒトや動物以外に使用する抗菌薬をゼロにする、ことを挙げている

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。そして、JVARM データを新 JVARM フォーマットに変換するプログラムを作成し、家畜由来細菌のアンチバイオグラムを作成するシステムを構築した。平成26年度は、農水省の手続きが進み、JVARMの過去10年間分の実データを研究班用として受けとった。12月現在、JVARM実データによるアンチバイオグラムを作成し、JANISとの比較を行う予定である。

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。

4) 2014年1-11月に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ 111株について血清型別試験および薬剤感受性試験を実施した (集団事例由来株は代表1株を実施)。血清型は34血清型に分類された。多く分離された血清型は09群 Enteritidis (17株)、07群 Infantis (17株)、04群 Typhimurium (10株) および Chester (10

株)であった。各血清型の耐性菌出現率を比較すると、Infantisが70.6%、Typhimuriumは70%と耐性率が高いのに対し、Enteritidisでは17.6%、Chesterは全て感受性菌であった。このように血清型によって耐性率に差が認められた。

5)2012年は46検体(83.6%)、2013年は24検体(100%)からESBL/AmpC産生大腸菌が検出された。2013年はAmpC産生大腸菌検出用の分離平板を追加した結果、AmpC産生大腸菌の検出数が増え、ESBL産生大腸菌とAmpC産生大腸菌が両方検出された検体が22検体(91.7%)となった。2012年に国内の養鶏団体がセフトオフルの使用に関して自主的に注意喚起を行ったことから、農場の鶏糞からのESBL/AmpC産生大腸菌の検出は2012年から減少している。しかし市販鶏肉ではその後もまだ高率に存在していることが明らかになった。

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。

7)2014年収集の189鶏肉検体(国内産100検体、海外産89検体)について調べた。その結果、国内産鶏肉39検体(39%)、海外産鶏肉79検体(89%)からそれぞれVREが検出された(VanA型1検体、VanC1型100検体、VanC2型15検体、VanN型2検体)。このうち臨床で問題となるVanA型VREはブラジル産鶏肉検体から検出された。今回分離したVanA型VRE株は過去にブラジル産鶏肉から分離されたVREと同一のPFGEパターン、ST型(MLST解析)を示したことから、同一起源の株であることが示唆された。一方、VanN型VREは国内産鶏肉2検体(宮崎県産鶏肉1検体2株、群馬県産鶏肉1検体2株)から検出された。これまでに我々は新規のVanN型VREを環境(国内産鶏肉)由来株として世界で初めて分離し、2012年に報告している。今回新たに分離されたVanN型VRE株の解析を行ったところ、全て同一のPFGEパターンを示し、さらに2009年収集の国内産鶏肉検体から分離したVanN型VRE株とも同一パターンであった。またMLST解析でST型が一致したことからこれらは同一由来株であることが示された。これらの結果は、新規のVanN型VREが国内の環境中(養鶏場)に既に拡がっていることを示している。しかし、これらの株は我々の収集し解析した臨床分離腸球菌株の遺伝子型とは異なるものであり、直接の関連性は認められなかった。

8)第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の性状

解析:2012年3月に国内の生産者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、2012年および2013年のブロイラーにおけるセファロスポリン耐性は、2011年に比べて有意に減少した。(2011年18.0%→2012年9.7%、2013年4.6%)2010~2013年におけるセファロスポリン耐性株のβラクタマーゼ型別を行ったところ、2004~2009年の第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の解析と同様 *bla*<sub>CMY-2</sub> が優勢であった。トランスコンジュガントを用いたプラスミドの解析では *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有するプラスミドのレプリコン型は、2010年から2013年の分離株においていずれの年もIncKが主要な型として認められ、IncIIもIncKに次いで多く認められた。その一方で2010年度まで主要なInc型の一つとして認められた多剤耐性プラスミド(IncA/C)は2013年に1株認められたものの減少傾向であった。セフトオフルの自主規制に伴う当該製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。

9)MSSA、MRSA、MRCNSの遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性:LA-MRSAについては、我が国の豚においてMRSA ST398の分布が確認され、ゲノム解析によりSCCmec型がヨーロッパ等で報告されているものとは異なる新規のものであることが明らかとなった。MSSAのMLST解析により、ST398はMSSAの主要なST型として高率(7/15株(46.7%))に認められた。その一方で今回調べたMSSAには国内で分離されたMRSA ST398と同spa型かつ同薬剤耐性型の株は認められなかった。またMRCNSにおいて国内で分離されたMRSA ST398と同じSCCmec型は認められなかった。以上より新規のSCCmec型を持つMRSA ST398が一部の豚農場に分布していることが確認されたが、本調査で確認されたMRSA ST398の起源となりうるMSSA及びMRCNSは認められなかった。

10)2012年から2014年にかけて埼玉県内でヒトから分離されたサルモネラ366株、腸管出血性大腸菌(STEC)373株、赤痢菌13株、カンピロバクター59株の薬剤感受性試験を実施した。その結果、フルオキノロン耐性株が、サルモネラで1株、STECで1株、赤痢菌で5株、カンピロバクターで29株が、CTX耐性株はサルモネラで4株、STECで1株、赤痢菌で4株検出されている。環境由来では、市場等で購入した食肉などの食品202検体、動物指導センターの協力で得られたイ・ネの糞便443検体、およびアライグマの糞便533検体を材料として、食品はサルモネラ、STEC、カンピロバクター、イ・ネおよびアライグマ糞便についてはサルモネラを対象として検査を実施した。食品では鶏肉からフルオキノロン耐性カンピロバクターが分離された。イ・ネおよびアライグマ糞便では、イ5検体、ネ1検体、アライグマ13検体からサルモネラが分離されたが、フルオキノロンおよびCTX耐性株は分離

されなかった。

11) 南九州の肉用鶏とヒトから分離された ESC 耐性大腸菌の比較: 肉用鶏由来株 46 株およびヒト由来 15 株の MLST 解析を行い、全株の ST を決定するとともに、ESC 耐性を規定する遺伝子の検出を終了した。鶏由来株に 32 の ST を、ヒト由来株に 11 の ST を認めた。全体として肉用鶏由来株とヒト由来株の ST に類似性は認められなかったが、検出される ESC 耐性遺伝子は類似していた。すなわち *bla*<sub>CTX-M-14</sub>、*bla*<sub>CTX-M-15</sub>、*bla*<sub>SHV-12</sub> は両者から検出された。以上の成績は、肉用鶏とヒトに定着する大腸菌の遺伝子型は異なるが、肉用鶏由来株とヒト由来株の間で薬剤耐性プラスミド等耐性因子の交換が起こっている可能性を示唆している。

12) 国内で分離されたサルモネラ 4:i:- の性状解析: 2000~2010 年に国内の様々な材料から分離された 4:i:- 51 株の性状を解析した。ST 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、4:i:- は Typhimurium の単相変異株と考えられた。また CGH 解析等の結果から、2 相 H 抗原を規定する染色体領域の大規模欠失または点変異が単相化の原因であることが示唆された。薬剤感受性を調べたところ、39 株 (76%) は全ての供試薬剤に感受性か単剤耐性を示した。残りの 12 株 (24%) は ASSuT または類似の薬剤耐性パターンを示した。一方、PFGE と MLVA による型別で極めて類似度の高いグループの中にヒト、豚肉、及び牛由来株が含まれていたことは、何らかの疫学的関連の存在を示唆するが、その多くは供試した全ての薬剤に感受性であった。2013 年に、それ以前の分離株には認められない多剤耐性菌が分離された。本菌は ESC にも耐性を示し、 $\beta$ -ラクタマーゼを規定する遺伝子は *bla*<sub>CTX-M-55</sub> で、染色体上に存在した。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。

#### 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 ファーマットに変換するためのソフトを作成し、お互

いのデータの比較解析をできるようにした。今後、試行を繰り返し、更なる改良をすることが必要である。予備的データとしては、動物の耐性菌率とヒトの耐性菌率の間にかかなりの差があるようである。動物の耐性菌がヒトに入り込んでいることは確かであろうが、その後ヒトに使用される抗菌薬の量や種類により、耐性菌の選択等が起こることがあるので単純な比較でものをいうことは難しいようである。今後の解析でお互いの影響要因等の解析も必要になり、かなり複雑な因子が絡むようである。

JVARM の報告からは、プ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にもかかわらず、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, IncI1 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、IncI1-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、プ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。

今後も輸入食肉 (鶏肉) と国内食肉 (鶏肉) の多剤耐性菌、特にヒト臨床上前問題となる  $\beta$ -ラクタム耐性腸内細菌科菌 (ESBL 産生菌、AmpC 産生菌等) 及びバンコマイシン耐性腸球菌 VRE (多剤耐性腸球菌を含む) の分離状況を継続的



に把握することが必要である。食肉から分離された耐性菌株について分子疫学的解析 (PFGE、MLST、耐性型の同定) を行い食肉由来株とヒト臨床由来株との関連性を調べる。また耐性菌が保持する各種耐性遺伝子の同定と局在、及びその伝達性を調べることにより、環境 (家畜) からヒトへの耐性菌の伝播、拡散機構について明らかにすることも重要である。

特に日本の家畜環境から分離されている新型 VanN 型 VRE のヒト環境内での拡散状況、関連性を明らかにするために詳細な遺伝子解析 (全体のオペロン構造とその局在、伝達性)、及びヒト臨床分離腸球菌株、特にバンコマイシン低度耐性株、Van 型別不明株を含めた詳細な検索が必要である。また他の家畜環境 (他の農場、屠場等) を含めた全国的な調査が重要と考える。

継続的な家畜由来株の薬剤感受性のモニタリング、特に人医療上極めて重要な成分の一つであるセファロスポリン及びフルオロキノロンについて遺伝学的解析を含め継続的に実施する必要がある。また今回の結果より *C. jejuni* のマクロライド耐性の出現について注意が必要である。

JVARM 側において、測定する抗菌薬をヒトで用いるものに合わせ、また菌株数を代表性が確保できる程度に増やし、継続的にデータを収集する体制の構築が必要である。

## E. 結論

JVARM のデータを JANIS ファーマットに変換するためのソフトの開発を行った。近い将来、我が国において 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

WHO は 2015 年の総会に耐性菌のコントロールに向けた世界戦略として Global action plan を提出し、各国に耐性菌の減少に向けての 5 年間の行動計画を作成することを求める。

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トオフルの使用規制が関与している可能性が考えられる。

## H. 研究発表

### (1) 国内

臼井優、佐藤豊孝、大久保寅彦、田村豊、伴侶動物由来細菌へのフルオロキノロン剤曝露による耐性菌出現リスク、獣医畜産新報、66 : 279-282. 2012.

### (2) 海外

1) Ishihara K, Saito M, Shimokubo N, Muramatsu Y, Maetani S, Tamura Y. Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff of companion animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* in press. 2014.

2) Ishihara K, Saito M, Shimokubo N, Muramatsu Y, Maetani S, Tamura Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 58. 149-154. 2014.

3) Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y. Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.* 5. 513. 2014.

4) Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB-TolC efflux pump-associated intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.* 76. 937-945. 2014.

5) Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J. Infect. Chemother.* 20. 243-249. 2014.

6) Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying bla<sub>CMY</sub>-2 from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med.*

- Microbiol.* 63. 263-270. 2014.
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis. *Pathogens.* 3(2):356-376, 2014
- 11) 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.* 2013 Sep 27;341(6153):1514-7.
- 12) Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of blaTEM-52-Carrying Plasmids of Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Isolates from Chicken Meat with a Common Supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7545-7. doi: 10.1128/AAC.02731-14. Epub 2014 Sep 22. PubMed PMID: 25246394.
- 13) Sekizuka T, Lee K, Kuroda M, Kusumoto M, Iwata T, Uchida I, Tanaka K, Tamamura Y, Akiba M. Whole-Genome Sequence of CMY-2  $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain L-3553. *Genome Announc.* 2014 Jul 24;2(4). pii: e00711-14. doi: 10.1128/genomeA.00711-14. PubMed PMID: 25059867; PubMed Central PMCID: PMC4110225.
- 14) Kudo M, Nomura T, Yomoda S, Tanimoto K, Tomita H. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan. *Microbiol Immunol.* 58:607-614, 2014.
- 15) Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein BacL<sub>1</sub> of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala<sup>2</sup>-crossbridged peptidoglycan. *J Bacteriol.* (In Press)
- 16) 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.
- 17) Kawanishi, M., Ozawa, M., Hiki, M., Abo, H., Kojima, A., Asai, T. 2013. Detection of aac(6')-Ib-cr in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 19(5):823-5.
- 18) Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. 2013. 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(3): 243-249.
- 19) Usui, M., Nagai, H., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T. 2013. Effect of antimicrobial exposure on acrAB expression in *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Choleraesuis. *Front Microbiol.* 4:53, 2013.
- 20) Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal.* 67:14
- 21) 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
- 22) Noriko Ido, Ken-ichi Lee, Kaori Iwabuchi, Hidemasa Izumiya, Ikuo Uchida, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, Makoto Ohnishi, and Masato Akiba • Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium • *PLoS ONE* • 9(8):e104380 • 2014
- 23) Noriko Ido, Kaori Iwabuchi, Yusuke Sato,

Yasuo Sato, Masaru Sugawara, Gakuji  
Yaegashi, Masaru Konno, Masato Akiba,  
Kiyoshi Tanaka, Katsuhiko Omoe, and Ikuo  
Uchida • Molecular typing of *Salmonella*  
*enterica* serovar 4, [5], 12:i:- isolated from

humans, animals, and river water in Japan by  
multilocus variable-number tandem repeat  
analysis and pulsed-field gel  
electrophoresis • Journal of Veterinary  
Medical Science • *in revision*

平成 26 年度 厚生労働省 食品の安心確保推進研究事業  
「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

薬剤耐性の問題がグローバル化する中で、サーベイランスにおけるギャップを把握し、埋めていくことは、よりよいサーベイランス体制構築に欠かせない。本研究ではシガ毒素産生性大腸菌 (STEC) の薬剤耐性について、経年変化を追った。また、WHO-GFN が実施している外部精度管理試験において使用されているブレイクポイントの変遷と、結果に与える影響を調べた。

(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、個人情報の取り扱いに注意し、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. 薬剤感受性試験：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判定を行った。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)、スルフィソキサゾール (Su)、ゲンタマイシン (G)、ナリジクス酸 (N)、セファロチン (Cf)、ホスホマイシン (F)、セフォキシチン (CFX)、セフォタン (CTT)、アミカシン (AMK)、イミペネム (IPM) およびメロペネム (MEPM) の 18 剤であった。

2. 一濃度スクリーニング：アジスロマイシン、シプロフロキサシン、セフォタキシム、およびホスホマイシンを、それぞれ 50、0.1、1 および 50 mg/L 含む LB 寒天培地を調製した。上記 4 種の培地に試験菌株を植菌し、明らかに生息してきたものを R、わずかに生えてき

たものを r とした。

### C. 研究結果および考察

#### 1. シガ毒素産生性大腸菌 (STEC) 薬剤耐性の傾向

1998 年から 2013 年までの分離株から各年 150-500 株程度選択し、ディスク法による感受性試験を行った。

結果を表 1 に示す。各カラムには約 30% を最大の網掛けとした帯グラフを賦してある。耐性が多くみられる薬剤は、スルフィソキサゾール、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリンであり、15 年間の平均はそれぞれ、20.5、20.1、14.6、13.6% であった。これらに次いで、セファロチン、ST 合剤、カナマイシン、クロラムフェニコールに対して 2-5% 程度の耐性率を示した。

年ごとに若干の変動はあるものの、その耐性率に顕著な減少もしくは増加を示す薬剤は見られなかった。

STEC および他の腸管系細菌において特に注視すべき薬剤ホスホマイシン、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 3 剤については 1% 以下であり、これらについても大きな変動は見られなかった。また、セフォテタン、アミカシン、イミペネム、メロペネムについては中間および耐性は見られなかった。

#### 2. STEC2013 年株のスクリーニング

上で述べたように、ホスホマイシン、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 3 剤の耐性率は非常に低かった。本 3 剤と昨年度赤痢菌について試験したアジスロマイシンは今後、その耐性出現が懸念される。そこで、この 4

剤について STEC2013 年株について一濃度スクリーニング法を試行した。

結果を表 2 に示す。最も R が多かったのがアジスロマイシンで 1.9%、ついでセフォタキシムが 1.5%、ホスホマイシンが 1.1% であった。シプロフロキサシンが 0.5% と最も低かった。

これら R 株について 0 血清群の分布を見たところ、シプロフロキサシンを除いた 3 剤については 026 の割合が最も大きかった (図 1)。これは、耐性獲得要因の主たる経路がシプロフロキサシンに関しては染色体性なのに対し、他がプラスミド性であることが関連していると推測される。

#### 3. WHO-GFN における外部精度管理について

WHO - Global Foodborne Infections Network (GFN) では、毎年サルモネラ、赤痢菌等について薬剤感受性試験の外部精度管理試験 (EQA) を実施している。

GFN-EQA において挙げられている薬剤は、アンピシリン、テトラサイクリン、シプロフロキサシン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、ST 合剤、サルファ剤、ゲンタマイシン、ナリジクス酸、セフォタジジム、セフトリアキゾン、トリメトプリムの 12 薬剤である。後者 3 薬剤が本研究では含まれていない。

また、セフェム系およびニューキノロン系薬剤については GFN-EQA において独自のブレイクポイントを設定している。これは EUCAST の epidemiological cut-off value (ECOFF) に関連していると考えられる。例えば、シプロフロキサシンに関して、CLSI のディスク法の中間判定は 16-20mm (15mm 以下で耐性、21mm 以上で感受性) であるが、GFN-EQA では

21-30mm となっている。これはチフス菌などの腸管外感染サルモネラに適用される基準である。

セフトキシムに関しては、同じく CLSI における中間判定域が 23-25mm なのに対し、GFN-EQA では 27mm 以下で耐性、27mm より大で感受性（ここでは便宜的に中間 27.5mm とする）。結果 1 の 2012-13 年株について、それぞれの基準で耐性・中間・感受性をまとめたものを表 3 に示す。CLSI 基準 (CTX23-25) による R は 0.7%、GFN-EQA (CTX27.5) による基準では R が 2.6%となる。参考までにセファロチンの阻止円がない (CF6) ものは 1.0%であり、CTX27.5 における耐性率よりも低くなる。セファロチンとセフトキシムの阻止円径の分布を見ると、CTX23-25 における中間もしくは感受性領域 (23mm 以上) と、CTX27.5 における耐性領域の重なり部分、すなわち 23-27mm 部分に該当する株は CF6 に該当していないことがわかる (表 4)。これらの株が野生株 (感受性株) と異なる表現型を示すのは、ESBL に関連する遺伝子以外の遺伝子もしくは遺伝子変異に起因することが考えられる。今後こうした表現型の遺伝的背景を明らかにし、精度管理における補助的なマーカーを開発していく必要があると思われる。

耐性出現を極力広く探知するため、耐性の基準が年々変化してきている。セフトキシムは 2010 年以前は中間領域が 15-22mm であったが、現在は 23-25mm である。上記のように GFN ではさらに広げられており、薬剤耐性サーベイランスにおいて精度管理の担保はますます重要性を帯びていると考えられる。

#### D. 結論

STEC 薬剤耐性の傾向は過去 15 年において目立った変化は起きていないと思われる。一方でアジスロマイシン、セフトキシム、ホスホマイシン、シプロフロキサシン耐性が一定頻度で見られ、今後も注視していく必要がある。

薬剤耐性サーベイランスにおいて判定基準は重要であり、基準の変化に柔軟に対応していかなくてはならない。そのために精度管理を充実させる必要がある。また、精度管理を安定させる一つの因子として、遺伝学的背景などの情報収集も重要であると考えられる。

#### E. 研究発表等

Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*<sub>TEM-52</sub>-carrying plasmids of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Dec;58(12):7545-7.

#### 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。

年	ABPC	SM	TC	KM	CP	ST合剤	Su	GM	NA	CPFX	FOM	CTX	CF	CFX	株数
1998	14.03%	15.83%	13.43%	2.61%	1.80%			0.20%	0.20%	0.00%	2.20%	1.60%			499
1999	8.12%	19.80%	16.24%	1.02%	0.51%			0.00%	0.51%	0.00%	0.00%	2.03%			197
2000	8.00%	14.33%	8.33%	1.33%	0.33%			0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%			300
2001	10.67%	14.00%	13.33%	6.00%	1.33%		14.67%	0.67%	0.00%	0.00%	0.67%	0.00%			150
2002	14.00%	20.00%	10.50%	2.00%	0.00%		17.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.50%	1.50%			200
2003	13.50%	22.50%	16.50%	4.00%	1.00%		21.50%	0.50%	0.50%	0.00%	0.50%	1.00%			200
2004	13.50%	19.50%	16.00%	4.50%	3.00%	3.50%	20.50%	1.50%	0.00%	0.00%	1.00%	3.00%			200
2005	23.53%	25.34%	14.93%	1.81%	1.36%	1.36%	22.62%	0.00%	0.90%	0.00%	0.90%	1.81%			221
2006	12.06%	18.59%	16.08%	3.02%	1.01%	3.02%	20.10%	0.50%	1.01%	0.00%	2.01%	0.00%			199
2007	11.50%	22.00%	17.00%	4.00%	2.50%	1.50%	23.50%	0.50%	0.50%	0.00%	1.50%	0.00%	6.50%		200
2008	15.69%	21.57%	15.20%	3.43%	0.49%	2.94%	20.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.98%	0.00%	4.90%	0.00%	204
2009	15.03%	26.80%	20.92%	3.92%	2.61%	3.27%	26.80%	0.65%	1.31%	0.00%	1.96%	1.96%	5.23%	0.65%	153
2010	19.63%	27.57%	20.09%	2.34%	1.87%	2.80%	26.64%	0.00%	0.93%	0.00%	0.47%	2.34%	28.50%	0.00%	214
2011	14.43%	19.07%	10.82%	0.52%	5.15%	4.64%	19.59%	0.00%	0.00%	0.00%	0.52%	1.03%	13.92%	0.52%	194
2012	14.62%	19.81%	15.09%	1.89%	1.89%	2.83%	19.34%	0.00%	1.89%	0.47%	0.00%	0.94%	8.96%	0.00%	212
2013	9.31%	14.22%	8.33%	2.45%	2.94%	3.92%	14.22%	0.98%	0.98%	0.00%	0.49%	0.49%	10.29%	0.00%	204
平均	13.60%	20.06%	14.55%	2.80%	1.74%	2.98%	20.54%	0.34%	0.55%	0.03%	0.86%	1.11%	4.48%	0.19%	3547

表 1、STEC 薬剤耐性分布（1998-2013、ディスク法）

	AZM50	CPFX0.1	CTX1	FOM50
R	1.88%	0.53%	1.47%	1.06%
r	0.38%	0.06%	0.06%	
S	97.75%	99.41%	98.47%	98.94%
計	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

表 2、STEC 薬剤耐性分布（1 濃度スクリーニング、2013、N=3200）

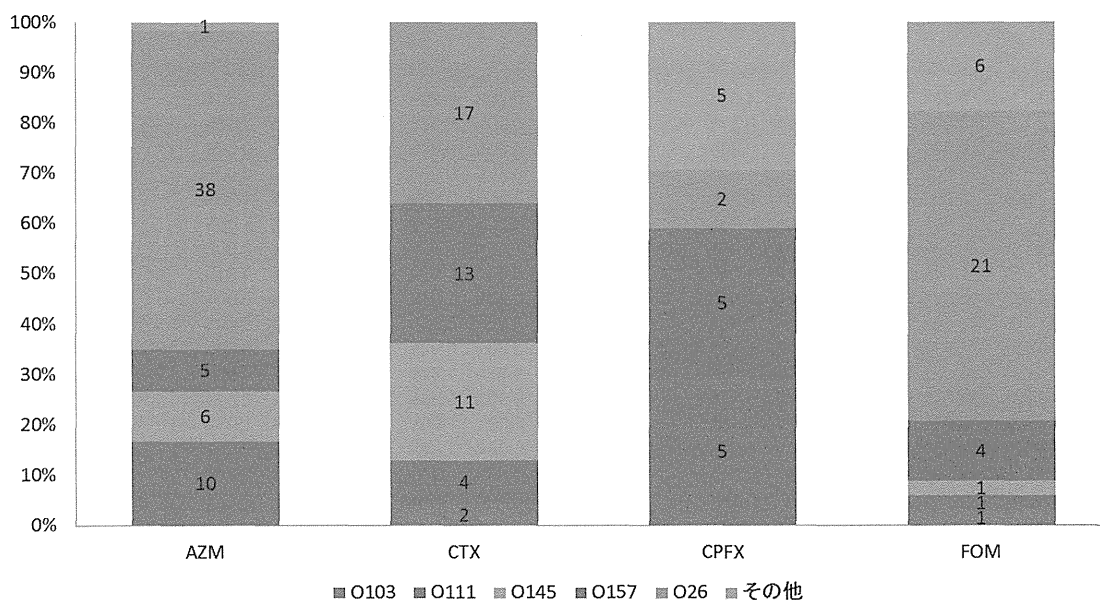


図 1、各耐性における血清群分布。AZM、アジスロマイシン；CTX、セフトキシム；CPFX、シプロフロキサシン；FOM、ホスホマイシン。

	R	I	S	計
CTX23-25	0.72%	0.96%	98.32%	100.00%
CTX27.5	2.64%		97.36%	100.00%
CF6	0.96%		99.04%	100.00%

表 3、CLSI (CTX23-25)、GFN-EQA (CTX27.5) 基準による耐性、中間、感受性の分布 (STEC2012-13)。CF6、セファロチン阻止円なしの分布。



	CF														
CTX	6	7	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	総計
6	2														2
12	1														1
25						3		1							4
26							1								1
27								3							3
28	1			1	1	3	4	36	32	24	19		1		122
29						5	1	1	8	6	3				24
30		1	1		4	2	6	46	59	50	30	1	5	1	206
31						2		3	1	8	4				18
32							1	3	7	6	7		1		25
33								2		2	3	1	1		9
34											1				1
<b>総計</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>95</b>	<b>107</b>	<b>96</b>	<b>67</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>416</b>

表4、セファロチン (CF) とセフトキシム (CTX) 阻止円分布 (mm) (STEC2012-13)

平成 26 年度厚生労働省 食品・安全確保研究事業 分担研究報告書

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 2014 年に分離され、供試したヒト（散発下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 140 株で 37 血清型に型別された。薬剤耐性では 61 株（43.0%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示し、CTX 耐性株とフルオロキノロン耐性株がそれぞれ 1 株ずつ分離された。また、動物由来株として、伴侶動物のイヌ 102 頭、ネコ 29 頭および野生アライグマ 127 頭の検査を行い、ネコ 1 頭およびアライグマ 3 頭からサルモネラが分離された。イヌとネコの ESBL 産生菌の検索では 9 株分離された。

赤痢菌では、供試した *S. sonnei* 2 株中 1 株がフルオロキノロン耐性で、インドへの渡航歴のある患者からの分離であった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 220 株が分離され、薬剤感受性試験では、220 株中 17 株（7.7%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。CTX 耐性株やフルオロキノロン耐性株の分離はなかった。ヒト糞便からの ESBL 産生菌の検索では 37 検体中 6 検体から分離された。

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 105 検体を供試し、サルモネラは鶏肉 12 検体中 3 検体から、カンピロバクターは鶏肉 12 検体中 4 検体、ESBL は鶏肉 12 検体中 4 検体並びに生カキ 7 検体中 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等の拭き取り検査を実施し、カ

ンピロバクターが 44 検体中 10 検体から、サルモネラは 1 検体から分離された。

## 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 μg)、ストレプトマイシン(SM;10 μg)、テトラサイクリン(TC;30 μg)、カナマイシン(KM;30 μg)、アミノベンジルペニシリン(ABPC;10 μg)、ナリジクス酸(NA;30 μg)、セフトキシム(CTX;30 μg)、シプロフロキサシン(CPFX;5 μg)、ゲンタマイシン(GM;10 μg)、ホスホマイシン(FOM;50 μg)、ノルフロキサシン(NFLX;5 μg)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST;25 μg)の12薬剤で、ヒト由来株についてはイミペネム(IMP;10 μg)、アミカシン(AMK;30 μg)、メロペネム(MEPM;10 μg)、スルフイソキサゾール(Su;250 μg)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2014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142株は型別不能を除き37血清型に型別され、*S. Enteritidis*が18株と最も多く分離された。次いで*S. Thompson*と*S. Infantis*が12株であった。

この142株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した142株のうち61株(43.0%)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. Enteritidis*は18株中6株(33.3%)が耐性を示した。*S. Schwarzengrund*は供試10株全てが耐性を示した。

分離株の区別耐性パターンを表2に示す。NA耐性が11株と最も多く、次いでSM・TC・KM・Su耐性が10株、SM・TC・ABPC・Su耐性が8株であった。また、4剤以上の薬剤に耐性を示す株が27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1株、フルオロキノロン剤耐性株が1株分離された(表3)。CTX耐性菌はCP・SM・TC・KM・ABPC・CTXの6薬剤に耐性を示す血清型*S. Blockley*であり、その保有耐性

遺伝子はCTX-M-15であった。フルオロキノロン耐性株は、CP・SM・TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX・SXT・Suの9薬剤に耐性を示す血清型*S. Kentucky*であり、そのMLST型はST198であった。

### (2) 動物由来サルモネラ

イヌ、ネコおよび野生化アライグマのサルモネラ保菌状況調査の結果を表4に示す。イヌは102頭のいずれからも分離されなかったが、ネコは29頭中1頭(3.4%)から分離され、血清型は*S. Nagoya*であった。薬剤感受性は、供試した16薬剤に対して感受性を示した。野生化アライグマは127頭中3頭(2.4%)の便からサルモネラが分離された。その血清型はそれぞれ異なっていた。薬剤感受性は、血清型O4:i:-がSM・TC・ABPCの3剤に耐性であった。

### (3) 動物由来ESBL産生菌

ESBL産生菌の検索ではイヌ100頭中8頭(8.0%)から8株、ネコ26頭中1頭(3.8%)から1株分離され、菌種は全て*E. coli*であった(表5)。イヌ由来株はCTX-M-1groupあるいはCTX-M-9groupのいずれかを、ネコ由来株はCTX-M-1groupの耐性遺伝子を保有していた。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イヌ由来で4株、ネコ由来で1株確認された。

### (4) 赤痢菌

赤痢菌では、供試した*S. sonnei*2株中1株がフルオロキノロン耐性で、インドへの渡航歴のある患者からの分離であった(表6)。

### (5) 腸管出血性大腸菌