

表7 Tn1546 の解析: *vanS*、*vanA*

vanS

TEIC	由来	原産国	株数	変異なし	3ヶ所変異 T148G、G160C、A207T	1ヶ所変異 G172A
耐性	ヒト		4	4	TEIC耐性	
	鶏肉	日本	2	2		
感受性 ・ 判定保留	鶏肉	ブラジル	8	2	6	
		タイ	8		8	
		インドネシア	3		3	
		フランス	2			2
		マレーシア	1		1	
		小計		22	2	18

TEIC感受性・判定保留

TEIC感受性・判定保留22株

3か所変異: 18株・・・アジアで報告されている。今回ブラジル産鶏肉でも確認。

1か所変異: 2株・・・関与は不明である。

変異なし: 2株・・・*vanS*以外の変異を確認中。

TEIC耐性株6株

変異なし

vanA

鶏肉24株すべての株で変異なし

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26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、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、研究を行った。

ESBL産生菌の食品、環境、並びにヒトから分離された報告について、和文誌及び英文誌について文献情報を収集し、どのような食品からESBLが分離されているか、どのような動物やヒトからESBLがどの程度検出されているかについてデータを整理し、ESBLの分布並びに食品を介したESBLのヒトへの伝播に関する危害分析について考察を試みた。

検証として、輸入鶏肉由来株とヒト由来株のESBL産生菌については、その相関について検証を試みた。健常人の約10%はESBL産生大腸菌を保有している。日本の市場に出回る輸入鶏肉の8~9割はブラジル産であるが、その鶏肉から高頻度に検出されるCTX-M-8を産生する大腸菌が健常人の便からも検出された。我々はそれらの菌株間の関連性を明らかにするべく、次世代DNAシーケンサー(NGS)を用いたゲノム解析を行なった。鶏肉およびヒト由来CTX-M-8産生大腸菌は互いに属するクローナルコンプレックス(CC)が異なり、共通した系統関係は確認されなかった。一方、CTX-M-8遺伝子を有するプラスミドは約90kbp、Inc11グループおよびpMLST ST113に属し、共通した特徴を有していた。したがって、鶏肉由来CTX-M-8産生大腸菌が有する当該プラスミドがヒト腸管内に元來定着している大腸菌に伝播した可能性が示唆された。

研究協力者

東邦大学医学部微生物・感染症学講座 石井良和、
青木弘太郎
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 朝
倉宏、山本詩織

A. 研究目的

①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、環境由来株、食品由来株、人から臨床的に分離された菌株を比較・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を推定できることを示してきた。昨年までの研究では、カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、鶏肉及び牛レバーを介してヒトへの伝播が確認された。一方、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耐性腸内細菌科細菌 (ESBL 産生菌) については、カンピロバクターのような食品を介したヒトへの伝播を確認することは容易でないことが示された。そこで、本年は、ESBL の環境、食品及びヒトからの分離に関する文献情報を調べ、ESBL の食品を介したヒトへの伝播に関する危害分析を行った。

②鶏肉から分離される大腸菌が産生する基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamase, ESBL) の多くの型は、ヒトから分離される大腸菌が産生するものと同一であることが知られている。日本の市場に出ている鶏肉の 8~9 割はブラジル産 (JACC ネットより) である。興味深いことに、ブラジル産の鶏肉からは CTX-M-8 産生大腸菌が高頻度に分離されるが、国産の鶏肉では別の CTX-M 型酵素産生の大腸菌が分離される。

健康人の約 10% は腸管内に ESBL 産生大腸菌を保菌しているといわれる。我々は東邦大学医学部医学科の学生実習における便中の ESBL 産生菌のスクリーニングにて CTX-M-8 型酵素を産生する大腸菌が 2 年間で 4 株収集された。また、同時期に都内のスーパーマーケットで購入したブラジル産鶏肉から分離された CTX-M-8 産生株が 7 株、2012 年のメロペネム市販後調査において尿から CTX-M-8 産生大腸菌が分離されたことから、菌株間の関連性を明らかにするべく、次世代 DNA シークエンサー (NGS) を用いたゲノム解析を行なった。

B. 研究方法

①データベースを活用して、ESBL に関連する論文検索を行った。用いたデータベースは、和文

誌については医中誌、英文誌は、PubMed を用いて、論文の絞り込みを行い、62 論文を採用し以後の検討に用いた。これらの論文に示されているデータを利用して、食品における ESBL 産生菌の陽性率、動物における ESBL 産生菌の陽性率、ヒトにおける ESBL 産生菌の陽性率をまとめた。

②鶏肉およびヒトから分離された CTX-M-8 産生大腸菌 10 株 (鶏肉由来: 4 株, 健康人由来: 5 株および臨床材料由来: 1 株) について、ゲノム DNA を抽出し、NGS MiSeq (イルミナ社) を用いてドラフトゲノム解読を実施した。ドラフトゲノム塩基配列より、Center for Genomic Epidemiology

(<http://www.genomicepidemiology.org/>) の Web ツール MLST1.7 を用いた Multilocus sequence typing (MLST)、ResFinder を用いた獲得性の薬剤耐性遺伝子網羅的検索、PlasmidFinder を用いた保有プラスミドのレプリコン遺伝子の検索、pMLST 1.3 を用いて Plasmid MLST を行なった。また、染色体とプラスミドを分離する目的で、菌体をアガロースゲルプラグに包埋、溶菌処理および S1-nuclease 処理をした後、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行ない (S1-PFGE)、そのバンドを全て切り出した。それらのバンドについてもゲノム DNA と同様に NGS で解読および解析を行なった。

倫理面への配慮

本研究課題は、東邦大学医学部倫理委員会において承認を受けている (課題番: 25028, 課題名: メロペネム市販後調査で全国医療施設から収集された臨床分離株が保有する薬剤耐性の解析、課題番号: 25050, 課題名: 微生物学実習における医学部 2 年次学生が保菌する薬剤耐性菌の分離検出、課題番号: 26055, 健康人が保菌する薬剤耐性菌の動向調査、課題番号: 26056, 課題名: 健康人が保菌する ESBL 産生大腸菌の過去 21 年間の経年推移)。

C. 研究結果

①データベースを活用して、ESBLに関連する論文検索を行い、62論文を採用しそのデータを基に表を作成した。

表1：食品におけるESBL産生菌の陽性率では、鶏肉からのESBL陽性率は最も高く、腸内細菌科菌群で51%、*Escherichia coli*が、49%であった。以下牛肉では、腸内細菌科菌群で5.2%、*E. coli*が、5.2%、豚肉では、腸内細菌科菌群で4.7%、*E. coli*が、4.7%であった。その他の食品では、腸内細菌科菌群で1.2%、*E. coli*が、3.4%であった。

表2：動物におけるESBL産生菌の陽性率では、鶏からのESBL陽性率は最も高く、腸内細菌科菌群で56%、*E. coli*が、56%であった。以下牛からは、腸内細菌科菌群で25%、*E. coli*が、26%、豚からは、腸内細菌科菌群で7.3%、*E. coli*が、7.3%であった。その他では、腸内細菌科菌群で16%、*E. coli*が、15%であった。

表3：ヒトにおけるESBL産生菌の陽性率を示した。健常者では、腸内細菌科菌群で16%、*E. coli*が、14%、患者では、腸内細菌科菌群で5.8%、*E. coli*が、9.8%、食品従事者では、腸内細菌科菌群で8.4%、*E. coli*が、8.4%、農場従事者では、腸内細菌科菌群で8.0%、*E. coli*が、9.7%であった。*Klebsiella*や、*Proteus*からのESBL産生菌の割合は、表3に示した。

表4には、データベースとして用いた論文リストを示した。

②A. 鶏肉由来菌株

トリ由来の菌株が属するClonal Complex (CC, あるSTに属する菌株を共通の祖先とした時の集団)はCC10が2株、CC648が1株およびどのCCにも属さない(Singleton)が1株であった(図)。

薬剤耐性遺伝子はESBLをコードするCTX-M-8遺

伝子、アミノグリコシド系薬耐性遺伝子(aadA1, aadA2, aph(3')-Ic, strAおよびstrB,)、テトラサイクリン耐性遺伝子(tet)、スルホンアミド耐性遺伝子(sul)およびトリメトプリム耐性遺伝子(dfrA)を保有していた(図)。

また、プラスミドレプリコンのIncompatibility (Inc, 不和合性) グループInc I1, FIA, FIB, FIC, FII, XおよびQ1に属するプラスミドを有していた(図)。

S1-PFGEの切り出しバンドのシーケンスの結果、TUM12355および12368においてそれぞれ約100kbpおよび90kbpのプラスミドでCTX-M-8遺伝子が検出され、いずれもIncI1に属し、後者についてはpMLSTのST113に属するプラスミドであった(図)。

B. ヒト由来菌株

ヒト由来菌株が属するCCは、CC69が1株、CC88が1株、CC127が1株、CC131が1株およびSingletonが2株であった(図)。

薬剤耐性遺伝子はβ-ラクタマーゼをコードするペニシリナーゼをコードするTEM-1遺伝子、ESBLをコードするCTX-M-8遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、スルホンアミド耐性遺伝子、トリメトプリム耐性遺伝子およびフルオロキノロン系薬耐性遺伝子を保有していた(図)。

また、プラスミドレプリコンのIncompatibility (Inc, 不和合性) グループInc I1, FIA, FIB, FIC, FII, X, p0001およびColに属するプラスミドを有していた(図)。

S1-PFGEの切り出しバンドのシーケンスの結果、TUM11352, 11353, 13058および13937においてそれぞれ約90kbpのプラスミドでCTX-M-8遺伝子が検出され、いずれもIncI1に属し、pMLSTのST113に属するプラスミドであった(図)。

D. 考察

①食品を介してヒトに伝達される ESBL の可能性は、保有率の高い鶏で最も高く、鶏肉の約 50%から検出されており、菌種としては *E. coli* であった。次いで牛では、約 25%から ESBL 産生菌が分離されていたが、牛肉からは 5%と分離率はあまり高くなかった。その他の食用動物や食品からの ESBL 産生菌の分離率は低かった。ESBL 産生菌のヒトへの伝搬の可能性は、鶏肉が最も重要であることが示された。

②鶏肉およびヒト由来 CTX- M- 8 産生大腸菌は MLST の結果、互いに関連のない CC に属する菌株であったことが明らかとなった。

鶏肉由来株はヒト由来株と比較して、他系統の抗菌薬耐性遺伝子を有しており、ブラジル産肉鶏（ブロイラー）への抗菌薬投与の影響で選択された可能性が示唆された。

S1-PFGE で染色体とプラスミドを分離し、各プラスミドについてのみ深くシーケンスすることで、一部の菌株において、鶏肉およびヒト由来大腸菌が宿す、CTX-M-8 遺伝子を有するプラスミドは約 90kbp, IncI1 グループおよび pMLST ST113 に属するプラスミドであることが明らかとなった。プラスミドの宿主である大腸菌は属する CC が異なっていたが、CTX- M- 8 遺伝子を有するプラスミドは共通した特徴を有することから、食肉由来の大腸菌が直接ヒト腸管内に保菌されたのではなく、元来ヒトに定着していた大腸菌にプラスミドが受け渡された可能性が示唆された。

E. 結論

①論文検索により、ESBL 産生菌に関する 62 論文を特定し、データを集計した結果、鶏の ESBL 産生大腸菌が、鶏肉を通じヒトへの伝播に最も重要

な食品であることが判明した。

②鶏肉およびヒト由来 CTX- M- 8 産生大腸菌において、大腸菌の系統は異なっていたが、CTX-M-8 遺伝子を有するプラスミドは共通した特徴を有しており、当該遺伝子は特定のプラスミドによって媒介されていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

2. 学会発表

なし

表1. 食品における ESBL 産生菌の陽性率

区分	腸内細菌科菌群						<i>Escherichia coli</i>					
	陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献 ^{※1}		陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献			
				文献数	文献番号				文献数	文献番号		
鶏肉	710 /	1397	50.8%	16	(2, 4, 7, 10, 12, 20, 24, 26, 29, 32, 41, 43, 50, 51, 53, 62)	490 /	1009	48.6%	14	(2, 4, 7, 10, 12, 24, 29, 32, 41, 43, 50, 51, 53, 62)		
牛肉	12 /	232	5.2%	4	(4, 12, 31, 51)	12 /	232	5.2%	4	(4, 12, 31, 51)		
豚肉	7 /	149	4.7%	2	(12, 31)	7 /	149	4.7%	2	(12, 31)		
その他	22 /	1345	1.2%	7	(4, 11, 38, 46, 47, 52)	12 /	351	3.4%	5	(4, 11, 46, 47, 52)		
他の食肉	3 /	58	1.6%	2	(4, 46)	3 /	58	5.2%	2	(4, 46)		
[羊]	3 /	58	5.2%	2	(4, 46)	3 /	58	5.2%	2	(4, 46)		
[馬]	0 /	1	0.0%	1	(4)	0 /	1	0.0%	1	(4)		
卵	1 /	102	1.0%	2	(11, 46)	1 /	102	1.0%	2	(11, 46)		
魚	5 /	128	3.9%	2	(4, 52)	5 /	128	3.9%	2	(4, 52)		
生野菜	10 /	181	5.5%	3	(11, 46, 47)	10 /	181	4.8%	3	(11, 46, 47)		
その他 ^{※2}	3 /	875	0.3%	3	(13, 38, 46)	—	—	—	—	—		

※1 別表（参考文献リスト）を参照。

※2 未殺菌乳および調理済み食品等を含む。

表2. 動物におけるESBL産生菌の陽性率

区分	腸内細菌科菌群						<i>Escherichia coli</i>				
	陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献 ^{※1}		陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献		
				文献数	文献番号				文献数	文献番号	
鶏	104 /	187	55.6%	4	(3, 4, 16, 41)	104 /	187	55.6%	4	(3, 4, 16, 41)	
牛	142 /	574	24.7%	6	(2, 3, 5, 14, 16, 48)	130 /	510	25.5%	5	(2, 3, 5, 16, 48)	
豚	14 /	192	7.3%	3	(2, 14, 16)	14 /	192	7.3%	3	(2, 14, 16)	
その他	31 /	189	16.4%	4	(3, 4, 5, 17)	26 /	169	15.4%	4	(3, 4, 5, 17)	
他の食用動物	2 /	63	3.2%	2	(3, 4)	2 /	63	3.2%	2	(3, 4)	
[ウサギ]	0 /	5	0.0%	1	(3)	0 /	5	0.0%	1	(3)	
[羊]	2 /	51	3.9%	2	(3, 4)	2 /	51	3.9%	2	(3, 4)	
[馬]	0 /	7	0.0%	2	(3, 4)	0 /	7	0.0%	2	(3, 4)	
愛玩動物	25 /	60	41.7%	1	(17)	20 /	40	50.0%	1	(17)	
魚	0 /	10	0.0%	1	(4)	0 /	10	0.0%	1	(4)	
その他	4 /	56	7.1%	2	(3, 5)	4 /	56	7.1%	2	(3, 5)	

※1 別表の参考文献を参照。

表3. ヒトにおける ESBL 産生菌の陽性率

区分	腸内細菌科菌群					Escherichia coli				
	陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献 ^{※1}		陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献	
				文献数	文献番号				文献数	文献番号
健常者	1691 /	10347	16.3%	20	(1-3, 9, 22, 23, 33-39, 42, 44, 45, 57-60, 61)	832 /	6039	13.8%	15	(1-3, 9, 33-37, 39, 44, 45, 57, 50, 60)
患者	869 /	14907	5.8%	21	(6, 8, 18-23, 25, 27, 28, 30, 34, 38, 40, 42, 49, 54, 55, 58, 61)	128 /	1301	9.8%	5	(19, 20, 49, 54, 55)
[年齢別区分]										
成人患者	730 /	14177	5.1%		(6, 18-20, 22, 23, 25, 27, 28, 30, 34, 38, 42, 49, 54, 55, 58, 61)	—		—	—	—
小児患者	139 /	730	19.0%	3	(8, 21, 40)	—		—	—	—
[受診別区分]										
市中・外来患者	130 /	1572	8.3%	5	(22, 23, 34, 54, 58, 61)	5 /	196	2.6%	1	(54)
入院患者	556 /	10938	5.1%	13	(6, 19, 23, 25, 27, 28, 30, 38, 42, 49, 54, 55, 58, 61)	110 /	909	12.1%	4	(19-23, 25, 27, 28, 30, 31, 33-40, 42, 44, 45, 49, 54, 55)
[疾患別区分]										
下痢症患者	44 /	1667	2.6%	2	(18, 20)	13 /	196	2.6%	1	(20)
その他の患者	825 /	13240	6.2%	19	(6, 8, 19, 21-23, 25, 27, 28, 30, 34, 38, 40, 42, 49, 54, 55, 58, 61)	115 /	1105	10.4%	4	(19, 49, 54, 55)
食品従事者	39 /	465	8.4%	2	(31, 53)	39 /	465	8.4%	2	(31, 53)
農場従事者	19 /	238	8.0%	2	(15, 56)	19 /	195	9.7%	1	(15)

※1 別表の参考文献を参照。

表3. ヒトにおける ESBL 産生菌の陽性率 (続き)

区分	<i>Klebsiella pneumoniae</i>					<i>Proteus spp.</i>				
	陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献 ^{※1}		陽性数	供試 検体数	陽性率	参考文献	
				文献数	文献番号				文献数	文献番号
健常者	97	／ 782	12.4%	2	(1, 34)	—	—	—	—	—
患者	—	—	—	—	—	13	／ 64	20.3%	1	(28)
[年齢別区分]										
成人患者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
小児患者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
[受診別区分]										
市中・外来患者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
入院患者	—	—	—	—	—	13	／ 64	20.3%	1	(28)
[疾患別区分]										
下痢症患者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
その他の患者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
食品従事者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
農場従事者	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

※1 別表の参考文献を参照。

表4. 参考文献リスト

文献 番号	参考文献
1	Abdul Rahman et al., <i>J Investig Med.</i> , 59, 1284–1286, 2011
2	麻生嶋ら、 <i>日本食品微生物学会雑誌</i> 、29、215–220、2012
3	Ben Sallem et al. <i>Foodborne Pathog Dis.</i> , 9, 1137–1142, 2012
4	Ben Slama et al. <i>Int J Food Microbiol.</i> , 137, 281–286, 2010
5	Carneiro et al. <i>Foodborne Pathog Dis.</i> , 7, 991–994, 2010
6	Daoud et al., <i>The Journal of General and Applied Microbiology</i> , 52, 169–178, 2006
7	Dhanji et al. <i>J Antimicrob Chemother.</i> , 65, 2534–2537, 2010
8	Duman et al., <i>Pediatrics International</i> , 47, 267–273, 2005
9	Dureja et al. <i>PLoS One</i> . 9, e112551, 2014
10	Egea et al. <i>Int J Food Microbiol.</i> , 159, 69–73, 2012
11	Egea et al. <i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis.</i> , 30, 1045–1047, 2011
12	Egervärn et al. <i>Int J Food Microbiol</i> , 171, 8–14, 2014
13	Gallati et al. <i>Foodborne Pathog Dis</i> , 10, 549–54, 2013
14	Geser et al. <i>J Food Prot.</i> , 74, 446–449, 2011
15	Hammerum et al. <i>J Antimicrob Chemother</i> , 69, 2650–2657, 2014
16	Hiroi et al. <i>J Vet Med Sci.</i> , 74, 189–195, 2012
17	Hordijk et al. <i>Front Microbiol</i> , 16, 242, 2013
18	畠山ら、 <i>東京都健康安全研究センター研究年報</i> 、57、69–72、2007
19	林ら、 <i>津山中央病院医学雑誌</i> 、27、59–64、2013
20	石原ら、 <i>日本食品微生物学会雑誌</i> 、28、123–127、2011
21	Kaarme et al., <i>Acta Paediatr.</i> , 102, 655–660, 2013
22	Kader et al., <i>East Mediterr Health J.</i> , 15, 1365–1370, 2009
23	Kader et al., <i>Infect Control Hosp Epidemiol.</i> , 28, 1114–1116, 2007
24	Kawamura et al. <i>Foodborne Pathog Dis.</i> , 11, 104–10, 2014
25	Kizilca et al. <i>Pediatrics International</i> , 54, 858–862, 2012
26	Kola et al. <i>J Antimicrob Chemother.</i> , 67, 2631–2634, 2012
27	Korona-Glowniak et al., <i>ScientificWorldJournal.</i> , 2012:617218, 2012
28	Kurihara et al., <i>Journal of Infection and Chemotherapy</i> , 19, 799–805, 2013
29	黒崎ら、 <i>島根県保健環境科学研究所報</i> 、51、45–47、2010
30	川田ら、 <i>日本老年医学会雑誌</i> 、50、555–556、2013
31	Lavilla et al. <i>J Antimicrob Chemother.</i> , 61, 1244–1251, 2008
32	Leverstein-van et al. <i>Clin Microbiol Infect.</i> , 17, 873–880, 2011
33	Li et al., <i>Scand J Infect Dis.</i> , 43, 170–174, 2011
34	Lonchel et al., <i>BMC Infect Dis.</i> , 12:53, 2012
35	Luvsansharav et al. <i>J Med Microbiol.</i> , 60, 619–624, 2011
36	Machado et al. <i>Front Microbiol</i> , 8, 80, 2013
37	Mathai et al., <i>Microb Drug Resist.</i> 2014 [Epub ahead of print]
38	Mesa et al. <i>J Antimicrob Chemother.</i> , 58, 211–5, 2006
39	Meyer et al., <i>Infection.</i> , 685–687, 2012

- 40 Minami et al., Japanese Journal of Infectious Diseases, 65, 548–550, 2012
41 森田ら、医学検査、63、294–299、2014
42 Moubareck et al., J Clin Microbiol., 43, 3309–3313, 2005
43 永井ら、三重県保健環境研究所年報、15、37–42、2013
44 Nicolas-Chanoine et al., J Antimicrob Chemother., 68, 562–568, 2013
45 仁木ら、日本環境感染学会誌、26、154–156、2011
46 Rasheed et al. Rev Inst Med Trop Sao Paulo., 56, 341–346, 2014
47 Reuland et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 33, 1843–1846, 2014
48 Schmid et al. Appl Environ Microbiol, 79, 3027–32, 2013
49 Shigehara et al., International Journal of Urology, 16, 808–812, 2009
50 清水ら、富山県衛生研究所年報、36、118–121、2013
51 下島ら、東京都健康安全研究センター研究年報、62、145–150、2011
52 Sousa et al. Foodborne Pathog Dis., 8, 1139–1141, 2011
53 Stewardson et al. Infect Control Hosp Epidemiol, 35, 375–83, 2014
54 Strömdahl et al., Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 30, 1159–1162, 2011
55 菅原ら、日本病院薬剤師会雑誌、49、153–156、2013
56 Tamang et al. Appl Environ Microbiol, 79, 3898–3905, 2013
57 Valenza et al. Antimicrob Agents Chemother, 58, 1228–30, 2014
58 Valverde et al., J Clin Microbiol., 42, 4769–4775, 2004
59 Vinué et al., Clin Microbiol Infect., 15, 954–957, 2009
60 Woerther et al., J Infect Dis., 202, 515–523, 2010
61 吉川ら、日本臨床微生物学会誌、24、9–16、2014
62 Zarfel et al. Int J Environ Res Public Health., 11, 12582–12593, 2014
-

平成26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：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）

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：佐々木貴正（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

家畜衛生分野における薬剤耐性菌実態調査システム（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System（JVARM））で収集した健康なブロイラー由来の大腸菌の第3世代セファロスポリン耐性率及び薬剤耐性遺伝子を解析した。ブロイラーにおける第3世代セファロスポリン耐性の割合は、2011年に比べて2012年及び2013年で有意に減少した。これは、国内の生産者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、セフトチオフルの使用が減少したことによると考えられた。なお、 β -ラクタマーゼ遺伝子保有プラスミドが分布するが、人の臨床現場で主に分離されるものとは異なっていた。

昨年度本事業で、国内の1農家の豚でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）sequence type（ST）398が分離され、新規のSCCmec型であることを報告した。MRSA ST398の起源を探るため豚由来のメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）の遺伝子型及び薬剤耐性型並びにメチシリン耐性コアグラマーゼ陰性ブドウ球菌（MRCNS）のSCCmec型を調べたが、起源と考えられるMSSA及び遺伝子は認められなかった。

また、JVARMで収集した健康家畜由来カンピロバクターにおいて2013年中国の豚由来*Campylobacter coli*で初めて報告されたマクロライド耐性因子*erm(B)*の保有状況を調査したところ、1農場から分離された*C. coli*において可動性遺伝因子*erm(B)*を保有が確認された。

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。

JVARMの調査において2004年以降ブロイラー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。米国やカナダのブロイラーにおいてセファロスポリン耐性の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、第3世代セファロスポリンの一つであるセフトチオフル（CTF）がワクチンと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月に国内の生産者団体か

ら CTF 使用の自主的な注意喚起が通知された。そこで、この措置の効果を評価するため、国内のブロー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収集を行った。

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。昨年度本事業で国内においても ST398 が 1 農場の豚に分布し、ゲノム解析により、国内分離株が保有する SCCmec 型が classA-A1B3 であり、海外の報告されているものとは異なる新規のものであることを報告した。そこで、今年度は MRSA ST398 の起源を探るため豚由来メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) の遺伝子型及び薬剤耐性型並びにメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRCNS) の SCCmec 型を調べた。

人のカンピロバクター腸炎は、主にマクロライド系抗菌性物質製剤で治療される。カンピロバクターにおいてマクロライド耐性は主に染色体上の遺伝子の突然変異の結果として発現するが、2013 年に中国の豚から分離された *Campylobacter coli* が可動性遺伝因子 *erm* (B) を獲得していることが初めて報告された (Qin ら 2013)。*erm* (B) は染色体上の多剤耐性遺伝子が集積した領域 (multidrug-resistant genomic island:MDRGI) に存在し、*erm* (B) 保有株は多剤耐性株であった。そこで、国内における家畜由来マクロライド耐性カンピロバクターにおける *erm*(B)の保有状況を調査した。

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

2010～2013 年に JVARM で収集した健康なブローラー由来の大腸菌の CTF 及びセフトキシム (CTX) の薬剤感受性を Clinical and Laboratory Standards (CLSI)に準拠した微量液体希釈法で測定し、各年毎の耐性率について Fisher 直接確立検定を実施した ($p < 0.05$)。

2010～2013 年にブロー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 84 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、レプリコン型を PCR 法で決定した。

(2) 国内の家畜における MRSA ST398 の起源に関する調査

2010～2013 年に豚から分離された黄色ブドウ球菌 15 株について CLSI に準拠した E-test にてオキサシリン(OXA)及びセフォキシチン(CFX)の MIC を測定し、MSSA と決定した株について Enright らの方法による multilocus sequence typing (MLST)及び Ridom SpaServer の方法による *spa* type を決定した。各種薬剤の MIC は CLSI に準拠した微量液体希釈法にてアンピシリン(ABPC)、シプロフロキサシン(CPFX)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)、ゲンタマイシン(GM)及びクロラムフェニコール(CP)を対象に測定した。

さらに、と畜場由来 MRCNS10 株の SCCmec 型を確認するため、Kondo らの方法により *mec* gene complex を確認し、*ccr* gene complex を MRSA ST398 の *ccr* gene complex-A1B3 を検出するプライマーを以下のとおり作成し、PCR により検出した。

```
ccrA-398P1:5'  
-GGAATCAGTCTCAATCAGTGCT-3  
ccrB-398P1:5'  
-CATGAGTTCGTGTTTATTGTCTGGA-3'
```

(3)家畜由来カンピロバクターにおける *erm*(B)保有状況の確認

2011～2013 年に JVARM で健康家畜より分離された EM 耐性 *C. coli*69 株について Qin らが報告した PCR により *erm*(B)の有無を確認した。PCR 陽性株についてダイレクトシーケンスにより塩基配列を確

認した。

C. 研究結果

(1) 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌

2010～2013年に収集した健康ブロイラー由来大腸菌における第3世代セファロスポリンに対する耐性率は、2010年に19.1% (36/188)、2011年に18.0% (29/161)であったのに対し、2011年と比べて2012年は9.7% (20/206)、2013年は4.6% (6/131)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、いずれの年も *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)、2013年 83.3% (5/6)) (図2)。このように、2012年、2013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 IncK が優勢であった(図3)。

次に、2010年と2013年に分離された株の耐性率の比較では、ブロイラー由来大腸菌の全体集計においてカナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM) 及び CP の耐性率の有意な上昇が認められた。また第3世代セファロスポリン耐性株では SM 及び KM の耐性率の有意な上昇が認められた ($p<0.05$) (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、2010年以降、 β -ラクタム系以外では、TC 単剤のみ耐性もしくは感受性型の IncK 及び IncII が主要なレプリコン型として認められ、多剤耐性を示す IncA/C 型のプラスミドは2013年で1株認められたものの減少傾向であった(表2)。

(2) 国内の家畜における MRSA ST398 の起源に関する調査

豚由来黄色ブドウ球菌 15株は全て OXA (MIC:0.09-0.75 μ g/ml)及び CFX (MIC:2-3 μ g/ml)に対して感受性であった。MLST型は ST398が7株(46.7%)、ST433が5株(33.3%)、ST9が2株(13.3%)及び ST2113が1株(6.7%)で、spa type は15株で13種類の型が認められた。(表3) 各種薬剤に対する感受性は、ST398

の7株及び ST9 の2株は全て ABPC 及び TC に対して耐性を示した(表3)。

と畜場由来の MRCNS において *mec* gene complex は、A型が1株のみであり、*ccr* gene complex-A1B3を検出する PCR で陽性の株は認められなかった。つまり、国内で分離された MRSA ST398 と同じ SCC*mec* 型は認められなかった(表4)。

(3) 家畜由来カンピロバクターにおける *erm(B)* 保有状況の確認

PCRにより豚由来エリスロマイシン耐性 *C. coli* の2株(同一農場)が、*erm(B)* 遺伝子を保有していることが確認された。2株は EM の他ナリジク酸 (NA)、CPFX、CP に耐性を示した(表6)。ダイレクトシークエンスにより *erm(B)* 遺伝子は、Qin らの報告した MDRGI 領域とは異なり、Jost らが報告する *Arcanobacterium pyogenes* の染色体上の *orf181* から *orf ϵ* の5'側の領域と相同な遺伝子配列中に認められた(図4)。

D. 考察

1999年のJVARMの開始時から、健康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ていた。セファロスポリンは、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3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 IncII、IncI γ 、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年及び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。2012年3月に国内の生産者団体から CTF の使用に関する注意喚起が自主的に行われた効果と考えられた。

一方、セファロスポリン耐性率の減少とは対称的に KM 及び SM の耐性率の上昇がブロイラー由来大腸菌全体及びセファロスポリン耐性株に認められ

た。KM や SM と同系統薬剤である GM はアメリカやカナダで CTF の代替薬として卵内接種されており、今後の KM や SM の耐性率の動向に注視する必要があると考えられた。

β -ラクタマーゼ遺伝子の解析では、2010 年から 2013 年の分離株においても *bla*_{CMY-2} が優勢であり人由来のセファロスポリン耐性株で主に報告される β -ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{CTX-M} とは異なった。

トランスコンジュガントの解析では *bla*_{CMY-2} 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 が継続的に認められ、IncII も IncK に次いで主要なレプリコン型として認められた。その一方で多剤耐性プラスミドである IncA/C は 2013 年に 1 株認められたものの減少傾向にあり、このことは CTF 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。

欧米では家畜関連 MRSA ST398 が大きな話題となっている。2005 年にオランダで家畜、特に豚における MRSA ST398 の保菌が問題となり、欧米で大規模な豚農場における MRSA の浸潤調査が行われている。また、米国の豚からも分離され、ST398 の汚染拡大が懸念されている。アジアでは、シンガポール、タイ、中国で MRSA ST398 が分離されており、我が国においても昨年 MRSA ST398 が分離されたことを報告した。昨年認められた MRSA ST398 の SCC*mec* 型及び *spa* type は欧米で流行している型とは異なる型であったため、今回国内で認められた MRSA の起源を探るため国内の豚から分離された MSSA の遺伝子型及び薬剤耐性型、MRCNS の SCC*mec* 型を調べた。その結果、今回調べた MSSA には ST398 が高率に認められたが、昨年分離された MRSA ST398 と同じ *spa* type かつ薬剤耐性型、また MRCNS では同じ SCC*mec* 型の株は認められなかった。以上より MRSA ST398 の起源は特定できなかったが、国内ではこれ以外に MRSA ST398 が分離されたとの報告はないことから、今後 MRSA ST398 の浸潤状況に注意を払う必要があると考えられた。

また、本研究により、家畜由来 *C. coli* において可動性遺伝因子 *erm*(B) を保有する株が我が国に分布す

ることが確認された。人におけるカンピロバクターによる食中毒の報告はその多くが *C. jejuni* であり、治療にはマクロライド系薬剤が使用される。1999 年から 2015 年までの JVARM の調査では家畜由来 *C. jejuni* においてマクロライド系薬剤である EM の耐性は確認されていない。今回確認された *erm*(B) は Qin らの報告した多剤耐性遺伝子が集積した領域にはなく、*erm*(B) 保有菌株も EM 以外 CP とキノロン剤にのみ耐性であった。*erm*(B) を含む可動性遺伝因子が伝達された菌株が、EM 以外の多剤耐性となる可能性は低いと考えられた。しかし、*erm*(B) は *C. coli* から *C. jejuni* に伝達されることが報告されていることから、今後 *C. jejuni* におけるマクロライド耐性をモニタリングし、その出現により一層の注意を払う必要があると考えられる。

E. 結論

ブロイラーにおける CTF の使用に関する自主規制(2010 年)による第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌の減少は 2013 年においても継続していた。国内で分離された MRSA ST398 の起源と考えられる MSSA 及び遺伝子は認められなかった。家畜由来 *C. coli* において可動性遺伝因子 *erm*(B) を保有する株が認められた。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

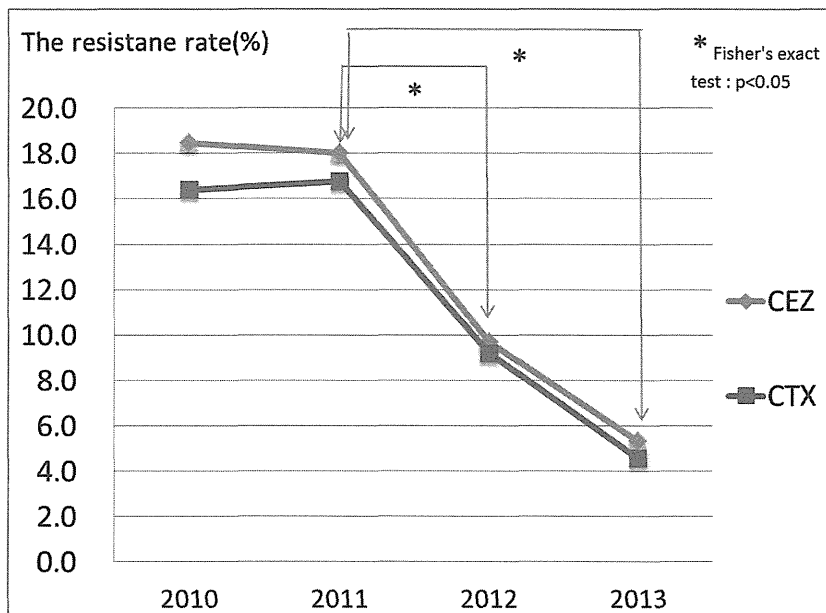
1. Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal*.

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) 、セフトキシム (CTX)

図2 CEZ 耐性株のβラクタマーゼ型別

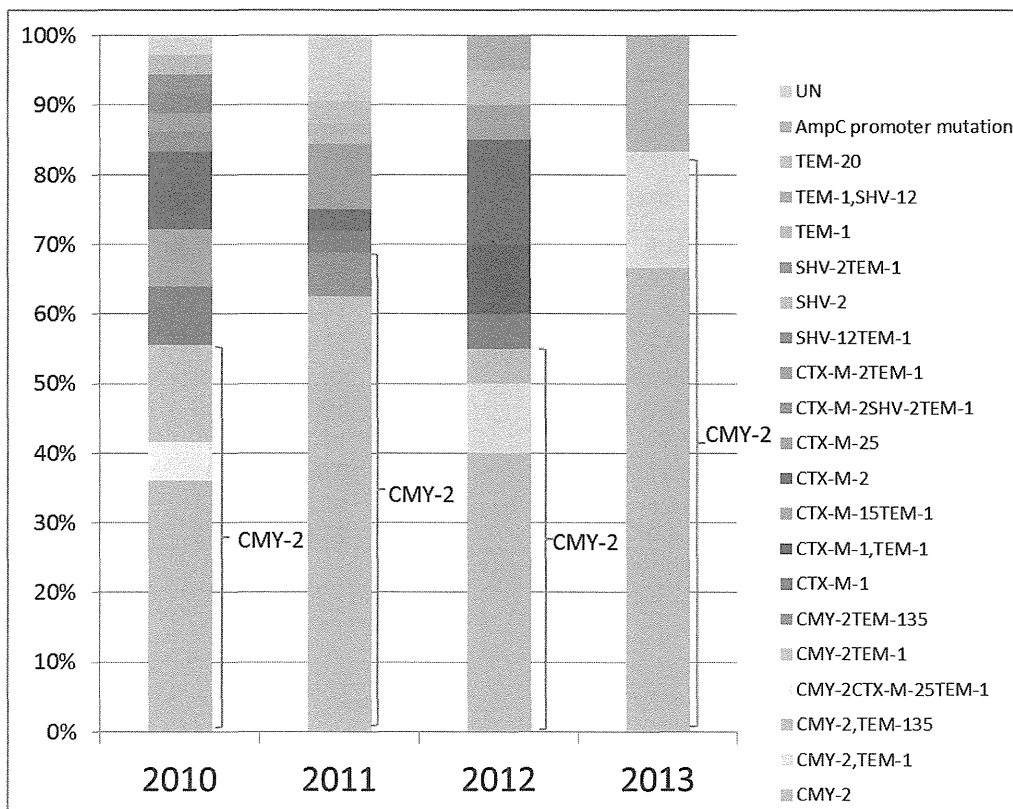


図3 伝達株のレプリコン型別

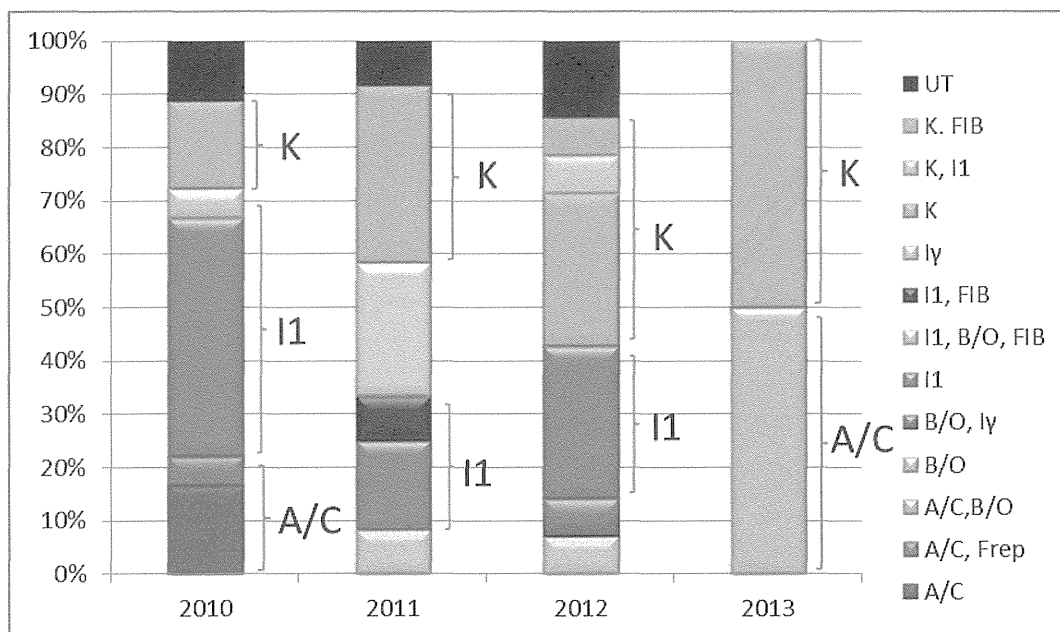


表1 ブロイラー由来大腸菌及び第3世代セファロスポリン耐性 (CTX \geq 4 μ g/mL) 大腸菌における各種薬剤に対する耐性

	<i>E. coli</i> isolates from broilers(%)				Broad-spectrum cephalosporin resistant <i>E. coli</i> isolates from broilers(%)			
	2010	2011	2012	2013	2010	2011	2012	2013
ampicillin	42.1	42.9	55.8	47.3	100.0	100.0	100.0	100.0
streptomycin	NT	a 24.8	37.9	b 38.2	b 37.5	a 51.9	52.6	100.0
gentamicin	3.6	3.7	3.4	0.8	9.4	14.8	5.3	0.0
kanamycin	13.3	a 14.3	a 27.7	b 24.4	b 25.0	a 22.2	a 42.1	83.3
tetracycline	56.4	47.2	58.3	61.8	68.8	66.7	78.9	100.0
nalidixic acid	33.3	31.7	30.1	35.1	59.4	a 59.3	a 26.3	b 50.0
ciprofloxacin	3.6	3.7	7.8	7.6	15.6	11.1	0.0	33.3
colistin	0.5	0.6	0.5	0	3.1	0.0	0.0	0.0
chloramphenicol	10.8	a 9.3	a 16.5	b 22.1	b 18.8	22.2	21.1	50.0
trimetoprim	NT	23.6	33.0	40.5	NT	25.9	15.8	16.7

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

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
	Iy	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, Iy	None	1
	UT	None	1
2013	K	None	1
	A/C, B/O	SM-TC-CP	1

表 3 豚由来メチシリン感受性黄色ブドウ球菌の遺伝子型と薬剤耐性型

ST (n)	spa type	Resistance pattern (n)
398 (7)	t034	ABPC-TC-CP (1)
	t1255	ABPC-TC (1)
	t1456	ABPC-TC-CPFX-CP (2)
	t1606	ABPC-TC-EM-CP (1)
	t5883	ABPC-TC-GM-CP (1)
	t8620	ABPC-TC-EM (1)
433 (5)	t318	EM-CP (2), EM (1)
	t1130	None (1)
	t3427	None (1)
9 (2)	t337	ABPC-TC-EM (1)
	t899	ABPC-TC (1)
2113 (1)	New	None (1)
参考 昨年分離されたMRSA		
398	New	ABPC-TC-EM-CP-GM or ABPC-TC-EM-CP

表 4 と畜場由来のメチシリン耐性ブドウ球菌の性状

検体番号	菌種名	mecA	mec complex	ccr A1B3PrimerPCR
NS11	<i>S.lentus</i>	+	A	-
NS24	<i>S.warneri</i>	+	B	-
RC29	<i>S.haemolyticus</i>	+	C	-
RC30	<i>S.haemolyticus</i>	+	C	-
RC68	<i>S.warneri</i>	+	C	-
NS66	<i>S.warneri</i>	+	C	-
NS67	<i>S.haemolyticus</i>	+	C	-
NS68	<i>S.warneri</i>	+	C	-
RC67	<i>S.warneri</i>	+	-	-
NS105	<i>S.spp</i>	+	-	-