

表5 家畜由来 *C.coli* のエリスロマイシンに対する MIC 分布

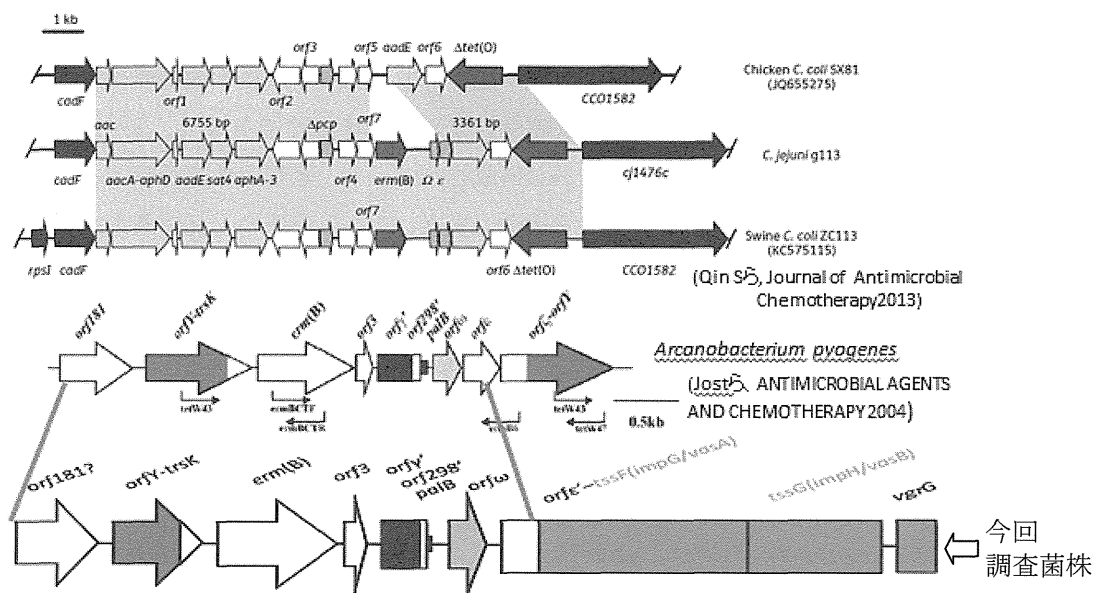
	MIC(mg/L)											菌株数	耐性株	耐性率(%)	
	≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128				256
平成25年	3	5	6	12	13	4						18	61	18	29.5
平成24年	1	7	9	15	11	8					3	23	77	26	33.8
平成23年	2	3	10	26	11	11				1	5	19	88	25	28.4

69株

表6 *erm(B)*保有株の各種薬剤に対する MIC

NA	CPFX	SM	EM	TC	ABPC	GM	CP
128	>64	8	>128	1	16	2	16
128	>64	8	>128	1	16	2	16

図4 *erm(B)*の周辺領域の遺伝子



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（平成 26 年度）

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

国内でヒト、家畜、環境から分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12:i:- 51 株を Pulsed-field gel electrophoresis と Multilocus variable-number tandem repeat analysis により型別したところ、両者の組み合わせにより識別力が向上することが示された。本法により家畜由来 3 株がヒト由来株と識別不能であり、何らかの疫学的関連の存在が示唆されたが、これら菌株は供試した全ての薬剤に感受性または単剤耐性であった。多剤耐性を示す一群の菌株はヒト由来株の他、主に豚由来株から構成されていた。薬剤耐性菌が豚肉を介してヒトに感染していることを示唆する成績と考えられた。また、これら菌株の一部は薬剤耐性型やフェージ型がヨーロッパで流行している菌株と一致しており、何らかの関連が示唆された。

### A. 研究目的

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12:i:- (4:i:-) は血清型 Typhimurium (4, [5], 12:i:1, 2) の単相変異株と考えられており、多くの先進国で最も高頻度にヒトから分離されるサルモネラ血清型の 1 つとなっている。わが国のヒト由来株の中では 2000 年代後半から目立ち始め、2014 年には Enteritidis に次いで最も分離頻度の高い血清型となった (図 1)。Typhimurium によるサルモネラ感染症は家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されているため、全国的な発生状況を把握できるが、4:i:- は届出の対象とならず、その発生状況は不明である。しかしながら、某県

における近年の集計 (図 2) では Typhimurium の分離頻度が減少し、4:i:- のそれが上昇している傾向が明らかである。すなわち、ヒトからの 4:i:- 分離頻度上昇は家畜における本菌の分離頻度上昇とリンクしており、畜産物を介したヒトへの感染ルートの存在が示唆される。そこで、今年度は 4:i:- のヒト由来株と家畜等由来株を Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) および Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) の手法を用いて詳細に分析し、家畜からヒトへの薬剤耐性菌の流れを指摘できるか否かを検討した。

## 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2000～2010年に分離同定された4:i:-, 51株を実験に供した。由来はヒト、牛、豚、鶏、ペンギン、カラス、オウインコ、豚肉、河川水である。

### 2. PFGEによる型別

制限酵素BlnI消化後のゲノムDNAを1%アガロースゲルに包埋し、TBE緩衝液中、6V/cm、14°Cで泳動した。装置はCHEF DRIII (Bio-Rad Laboratories社)を用い、スイッチ時間2.2～63.8秒で19時間泳動した。得られた泳動像はTIFFフォーマットで保存し、Fingerprinting II informatics software

(Bio-Rad Laboratories社)を用いてダイスの係数に基づくクラスター解析を行い、系統樹を作成した。

### 3. MLVAによる型別

既報 (Lindstedt et al., 2004, J Microbiol Methods 59:163-172) の手法に従い、ゲノム上の5つの部位 (STTR-9, STTR-5, STTR-6, STTR-10p1, STTR-3) をPCR増幅し、キャピラリーシーケンサーを用いてその塩基配列を決定した。タンデムリピートの数はGenetyx version 10.0 (Genetyx)を用いて目視で数え、得られたデータをBioNumerics version 6.5 (Applied Maths社)に取り込みminimum-spanning tree (MST)を作成した。各ローカスの多様性を評価するため、POPGENE version 1.32

([http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene\\_download.html](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html))を用いてNei's diversity indicesを算出した。

### 4. 型別法の識別力判定

Simpson's diversity index (DI) と95%信頼区間はEpicompare version 1.0 (<http://www3.ridom.de/epicompare/>)を用いて算出した。

## C. 研究結果

### 1. PFGEによる型別

BlnI-PFGEにより28のプロファイルが観察された (DI, 0.94; 95%CI, 0.91-0.98) (図3)。クラスター解析の結果、7つのプロファイル群 (クラスターC, D, G, H, J, L, M) と7つのプロファイル (A, B, E, F, I, K, N) が認められた。最優勢のクラスターC (20株) には5つのプロファイル (C1-C5) が含まれていた。他の6つのクラスターには2～4のプロファイルが含まれ、それらは2～7株から構成されていた。

### 2. MLVAによる型別

MLVAでは27のプロファイルが観察された (DI, 0.96; 95%CI, 0.93-0.98)。5つのローカスの多様性の程度は異なっており、Nei's diversity indices はSTTR-3, 0.52; STTR-5, 0.74; STTR-6, 0.83; STTR-9, 0.58; STTR-10p1, 0.85と算出された。作成したMSTから8つのクラスター (I～VIII) と5つのプロファイル (IX～XIII) が認められた (図4)。最優勢なクラスターIIは2つのMLVAプロファイルを含み、13株から構成されていた。クラスターIIIは7つのMLVAプロファイルを含み、11株から構成されていた。他のクラスターは1～5つのプロファイルを含み、2～8株から構成されていた。

### 3. PFGEとMLVAの組み合わせによる型別

PFGEとMLVAの型別の組み合わせにより34のCombination type (CT) (DI, 0.97; 95% CI, 0.94-0.99) が観察された (図3)。最優勢のCT3 (PFGE, C1; MLVA, IIa) は同じ町内の異なる農家で分離された8株から構成されていた。CT6 (PFGE, C3; MLVA, IIIc) は異なる町の牛に由来する2株とヒト由来1株から構成されていた。CT7 (PFGE, C3; MLVA, IIb) は異なる散発事例のヒト由来2株、豚由来1株、下水由来1株から構成さ

れていた。CT18 (PFGE, G1; MLVA, III f) は同じ町内の異なる散発事例から分離されたヒト由来 4 株から構成されていた。CT30 (PFGE, L1; MLVA, VII) と 32 (PFGE, M1; MLVA, VIII) は、それぞれ同じ町内の異なるサンプルから分離された 2 株から構成されていた。

#### 4. ヒト由来株とそれ以外の株の関連

本研究では PFGE と MLVA の組み合わせによる型別で牛由来 2 株 (6 型の C9 および C10 株) と豚肉由来 1 株 (7 型の M1 株) が、それぞれヒト由来株 (H6 および H10 株) と識別不能であった (図 3)。6 型の牛由来株はアンピシリン耐性、ヒト由来株は供試した全ての薬剤に感受性を示す点で異なっていたが、これらの株は全て 2008 年に岩手県内で分離された株であった。7 型の豚肉およびヒト由来株は供試した全ての薬剤に感受性であった。これら 2 株は共に秋田県内の分離株であるが、分離年は 2 年異なっていた。

類似度の高い菌株をグループとして見たとき、PFGE C3 型の中にはヒト由来株の他、牛、鶏、豚肉、河川水由来株が含まれていたが分離県や分離年は一定でなかった (図 3)。PFGE 型別の相同係数 70% をカットオフ値としたとき、H~K 型を 1 つのクラスターと見ることができる。これら菌株は多剤耐性を示し、ヒト由来 2 株の他は主に豚由来株で占められていたが、分離地や分離年は一定でなかった。このうちヒト由来 2 株と豚由来 1 株のファージ型は 193 であった (昨年度成績)。

#### D. 考察

型別法の識別力を比較するための指数として DI が用いられる。これは型別した集団の中から 2 株を無作為に選んだとき、それらが異なる型に型別される確率を示す。本研究において PFGE と MLVA の DI は、それぞれ 0.94 および 0.96 と算出され、MLVA の識別力の方が若干高かった。これら 2 つを

組み合わせることにより、DI は 0.97 と算出され、単独で用いるより識別力が高くなることが示された。

一部のヒトおよび家畜由来株で PFGE と MLVA の組み合わせ型別で識別できない株が認められた。すなわち、組み合わせ型別 6 型の C9 および C10 株は 2008 年に岩手県の牛から分離されている。これらと識別不能なヒト由来 H6 株も 2008 年の岩手県分離株であり、薬剤感受性に若干の相違が認められたものの、何らかの疫学的関連が疑われる。また、2005 年に秋田県の豚肉から分離された組み合わせ型別 7 型の M1 株は 2007 年に秋田県のヒトから分離された H10 株と識別不能であった。これらは供試薬剤の全てに感受性を示す点でも一致しており、特定の菌株が地域で維持されていた可能性が示唆される。

一方、複製の回数に応じて菌株には変異が蓄積され、徐々に遺伝子型が変化することが知られている。したがって、遺伝子型が完全に一致する場合だけでなく、類似度の高い菌株をグループとして捉える視点も必要である。PFGE 型別の相同係数 70% をカットオフ値としたとき、H~K 型を 1 つのクラスターと見ることができる。分離地や分離年は一定でないが、これら菌株は 2~4 剤に耐性を示すという共通の特徴が認められた。本クラスターのヒト由来株の他は主に豚由来株で占められていたことは興味深い。ヨーロッパでは 4:i:- の感染源は豚であるとされており、それらの多くが国内株で認められる ASSuT に耐性を示すファージ型 193 であることが報告されている (Hauser et al., 2010, *Appl Environ Microbiol* 76:4601-4610)。本クラスターに含まれる菌株のうち、ヒト由来 2 株と豚由来 1 株はファージ型 193 であることから、少なくともこれら 3 株はヨーロッパと何らかの関連を有するのかもしれない。また、これらの成績は豚肉を介して薬剤耐性菌がヒトに感染する可能

性を示唆する成績と考えられる。

#### E. 結論

4:i:-の型別法としてはPFGEとMLVAが優れており、これらの組み合わせにより、さらに詳細な型別が可能となる。国内のヒト、動物、環境に由来する51株を解析したところ、ヒトおよび家畜由来株で識別不能となる株が一部、認められた。また、多剤耐性を示す一群の菌株がヒトと豚から分離されており、豚肉を介したヒトへの薬剤耐性菌伝播の可能性が示唆された。

#### 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. Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M. Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4, [5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium. PLoS ONE 9(8): e104380.
2. Ido N, Iwabuchi K, Sato'o Y, Sato Y, Sugawara M, Yaegashi G, Konno M, Akiba M, Tanaka K, Omoe K, Uchida I. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar 4, [5],12:i:- isolates from humans, animals, and river water in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis. J Vet Med Sci. (in press)

\*各都道府県市の地方衛生研究所からの分離報告を図に示した

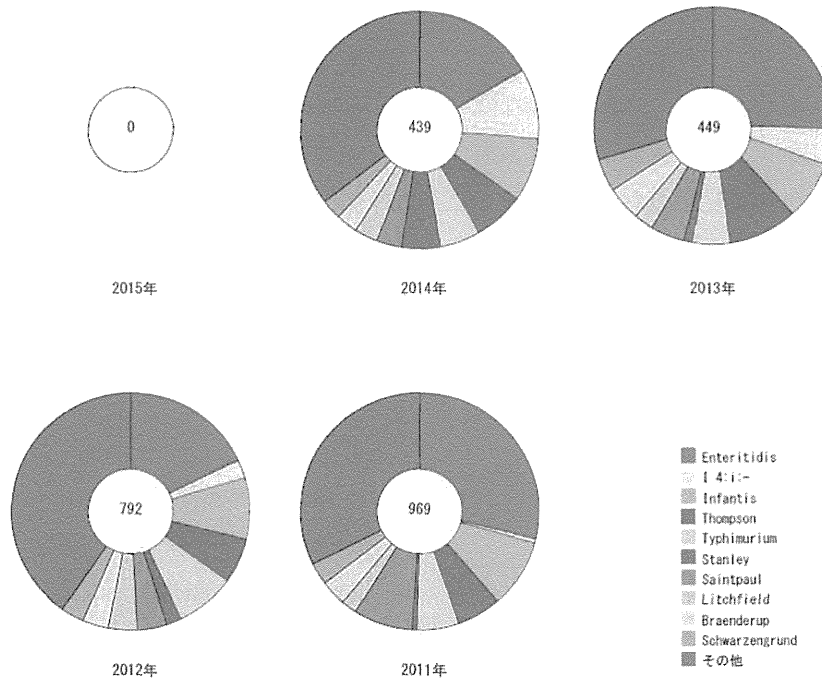
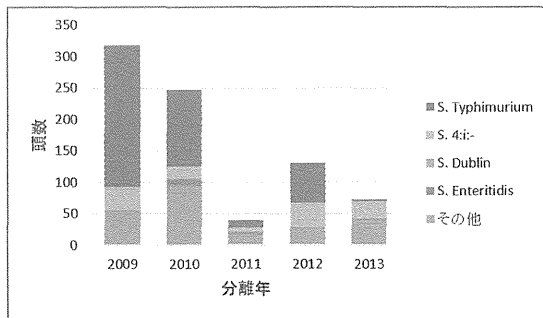
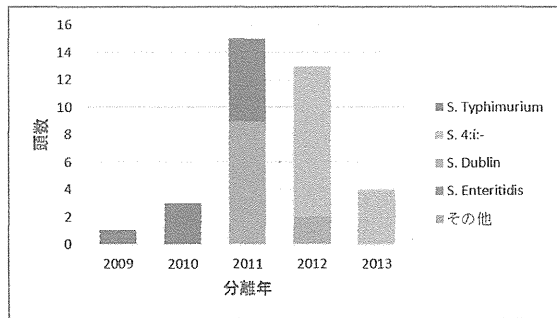


図1. ヒトから分離されたサルモネラの血清型割合 (2011~2015年)

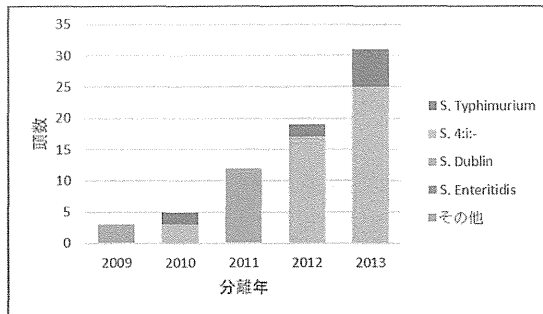
乳牛



肉牛



豚



鶏

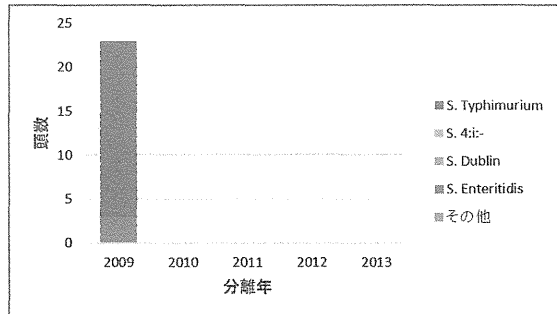


図2. 某県における家畜由来サルモネラ分離状況 (2009~2013年)

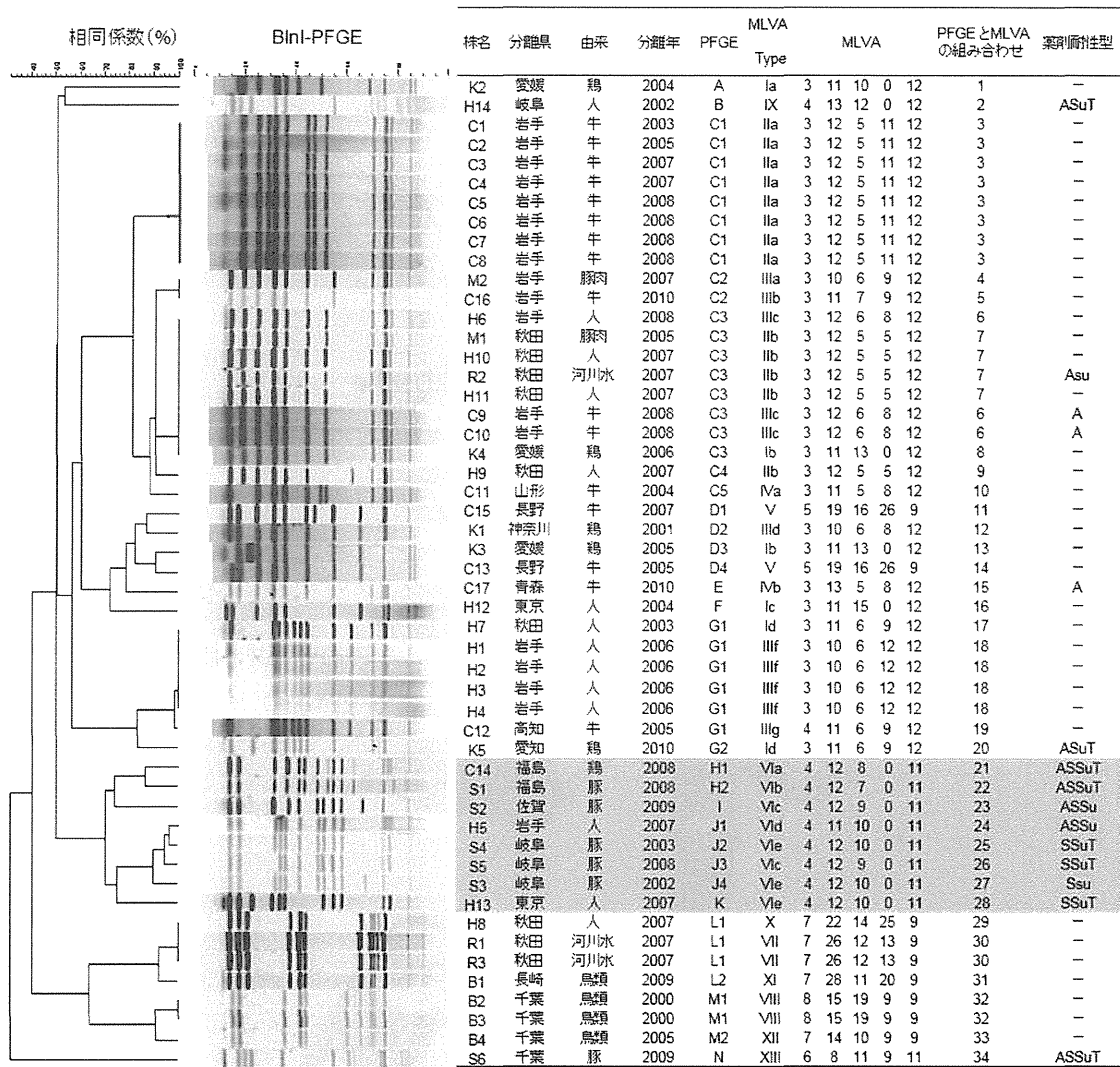


図3. 国内で分離された4:i:-株のPFGEとMLVAによる型別結果

薬剤耐性型 A, アンピシリン; 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

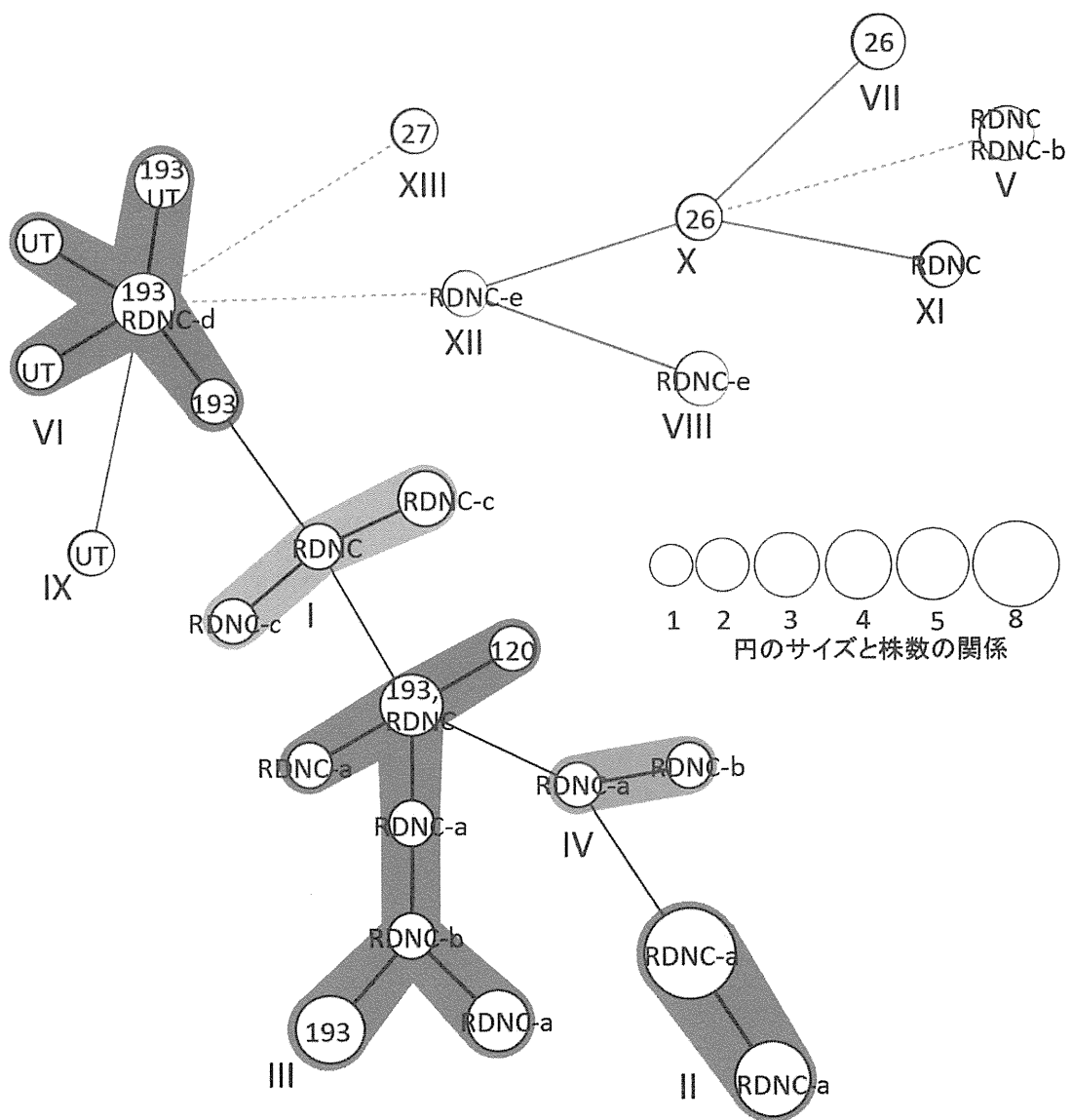


図 4. MLVA データから作成した Minimum-spanning tree



平成 26 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：**

薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性とヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べた。

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型に変化が認められた。2011 年までは *S. Infantis* が圧倒的に多く検出される血清型であったが、2012 年以降は、*S. Schwarzengrund* や *S. Manhattan* など、他の血清型の分離頻度が高くなり、今後の動向が注目される。

カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、ヒト由来株、鶏肉由来株のいずれも 2010 年以前の成績と比較して耐性率の上昇が認められた。

**A. 研究目的**

近年世界各国で食品および食用動物にヒトの治療に用いられる薬剤に耐性を示す細菌が分離されており、ヒト由来株との関連性の監視が求められている。

日本国内では食品からの薬剤耐性株検出の年次推移の詳細な報告はなく、薬剤耐性菌がヒトに影響を及ぼしているかどうかの現状は明らか

ではない。本研究では薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性と、ヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べる。平成 26 年度は鶏肉のサルモネラおよびカンピロバクターと、ヒト由来の腸管出血性大腸菌およびカンピロバクターについて調査した。

## B. 研究方法

### (1) 国内産鶏肉のサルモネラ

2006年～2014年の9年間に国内産鶏肉から分離した948株を用いて、血清型の変化について調べた。

検査方法は、検体25gを採取し一次増菌培養にはBuffered Peptone Water、二次増菌培養にはRappaport-Vassiliadis Enrichment brothを用い、XLD寒天培地ならびにBGS培地(ブリリアントグリーン寒天培地+スルファピリジン)で分離培養を行った。

### (2) カンピロバクター

ヒト由来株は2011年～2014年に分離した散発下痢症患者由来147株および食中毒患者由来(有症苦情事例を含む)148株の合計295株を供試した。鶏肉由来株は2014年に国内産鶏肉から分離した56株を供試した。薬剤感受性試験はノルフロキサシン(NFLX)、OFLX、CPFX、NA、TC、エリスロマイシン(EM)の6剤で、センシディスクを用いて行った。

### (3) ヒト由来腸管出血性大腸菌

2012年～2013年に患者および健康者から分離された121株を供試した。薬剤感受性試験はCLSIのディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク(BD)を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスフォマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフトキシム(CTX)、セフトキシム(CPDX)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEM)、アミカシン(AMK)、スルフイソキサゾール(Su)の16

剤を供試した。

## C. 研究結果と考察

### (2) 国内産鶏肉のサルモネラ

大阪府の鶏肉から分離したサルモネラの血清型は、2011年までは*Salmonella Infantis*が圧倒的に多かったが、2012年からは、*S. Schwarzengrund*や*S. Manhattan*など、他の血清型の分離頻度が高くなり、変化が認められた(図1)。

### (3) カンピロバクター

ヒト由来菌株: *C. jejuni*では散発下痢症患者で89株(63.6%)、食中毒患者で94株(74.6%)がフルオロキノロン耐性であった。どちらも2009～2010年の耐性率よりも高率であった(表1,2)。  
*C. coli*では散発下痢症患者で4株(57.1%)、食中毒患者で6株(27.3%)がフルオロキノロン耐性であった。

鶏肉由来菌株: *C. jejuni/coli* (*C. jejuni*と*C. coli*の同定は未実施)のフルオロキノロン耐性率は62.5%であり、2009～2010年の40.8%よりも高率であった(表3)。

フルオロキノロン耐性率の年次変化: 散発下痢症患者由来*C. jejuni*のフルオロキノロン耐性をみると、2011年以降は2010年以前の耐性率よりも高率になった(図2)。

### (4) 腸管出血性大腸菌 :

血清群O157では1剤以上に耐性を示す株は95株中9株(9.5%)であった。CTX耐性株が1株あり、その株はO157:H7でプラスミド性AmpC産生株であった。血清群O26では1剤以上に耐性を示す株は11株中5株(45.5%)であった。NA耐性は血清群O111の1株に認められ

た(表4)。2012年、2013年は腸管出血性大腸菌の感染者数が少なく、また、薬剤耐性菌の検出率も少ない傾向が認められた(図3)。

#### D. 結論

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型に変化が認められた。2011年までは *S. Infantis* が圧倒的に多く検出される血清型であったが、2012年以降は、*S. Schwarzengrund* や *S. Manhattan* など、他の血清型の分離頻度が高くなり、今後の動向が注目される。

カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、ヒト由来株、鶏肉由来株のいずれも2010年以前の成績と比較して耐性率の上昇が認められた。

#### E. 研究発表

(論文発表)

Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, kumeda Y, Suzuki Y : Characterization of third-generation cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. (投稿中)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

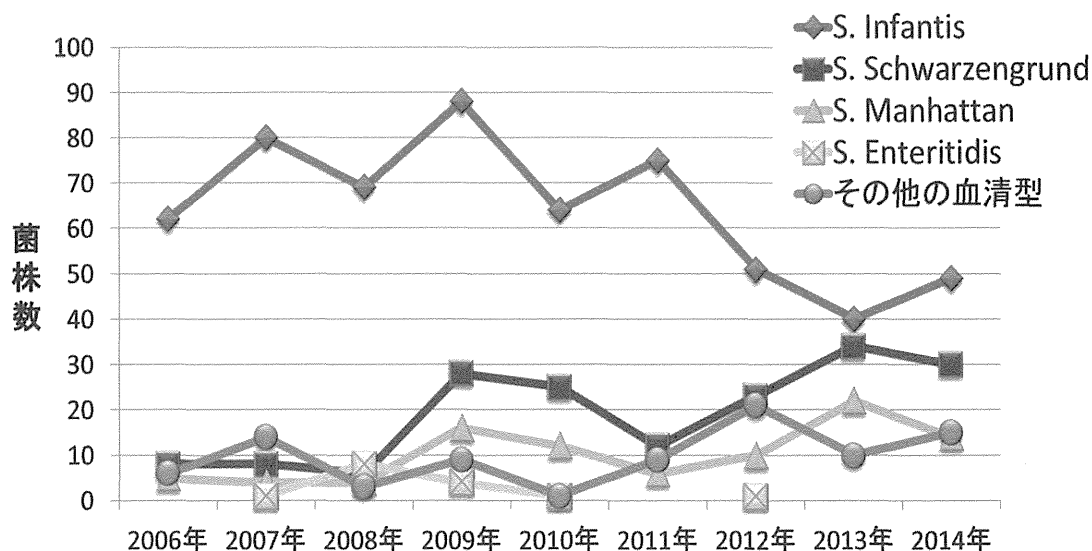


図1 大阪府内で入手した国産鶏肉由来サルモネラの血清型別検出数

表1 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績  
散発下痢症由来株 (2011-2014年)

薬剤耐性パターン	2011年	2012年	2013年	2014年	散発合計	2009-2010年
NFLX,OFLX,CPFX,NA,EM				1	1	
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	25	8	13	4	50	31
NFLX,OFLX,CPFX,NA	16	6	9	7	38	35
<i>C. jejuni</i> フルオロキノロン耐性 小計	41(59.4%)	14(100%)	22(61.1%)	12(57.1%)	89(63.6%)	66(41%)
TC	9		3		12	25
感受性	19		11	9	39	70
<i>C. jejuni</i> 合計	69	14	36	21	140	161
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	1		1	1	3	3
NFLX,OFLX,CPFX,NA				1	1	3
<i>C. coli</i> フルオロキノロン耐性 小計	1(25%)		1(100%)	2(100%)	4(57.1%)	6(75%)
TC,EM						1
TC	1				1	
感受性	2				2	1
<i>C. coli</i> 合計	4		1	2	7	8

供試薬剤: ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、テトラサイクリン(TC)、エリスロマイシン(EM)

表2 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績  
食中毒事例由来株 (2011-2014年)

薬剤耐性パターン	2011年 22事例	2012年 9事例	2013年 19事例	2014年 26事例	合計 76事例	2009- 2010年 41事例
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	6	6	12	19	43	25
NFLX,OFLX,CPFX,NA	9	8	18	16	51	23
フルオロキノロン耐性 小計	15(71.4%)	14(70%)	30(83.3%)	35(71.4%)	94(74.6%)	48(55.2%)
TC	2		1	2	5	7
感受性	4	6	5	12	27	32
<i>C. jejuni</i> 合計	21	20	36	49	126	87
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	3			3	6	4
NFLX,OFLX,CPFX,NA						1
フルオロキノロン耐性 小計	3(60%)			3(33.3%)	6(27.3%)	5(71.4%)
TC,EM						1
TC	1			1	2	1
感受性	1	1	7	5	14	
<i>C. coli</i> 合計	5	1	7	9	22	7

表3 鶏肉由来カンピロバクター *jejuni/coli* の薬剤感受性試験成績

薬剤耐性パターン	2014年	2009-2010年
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC,EM	1	1
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	17	45
NFLX,OFLX,CPFX,NA	17	42
NFLX,NA		1
フルオロキノロン耐性 小計	35(62.5%)	89(40.8%)
TC	4	42
感受性	17	87
<i>C. Jejuni/coli</i> 合計	56	218

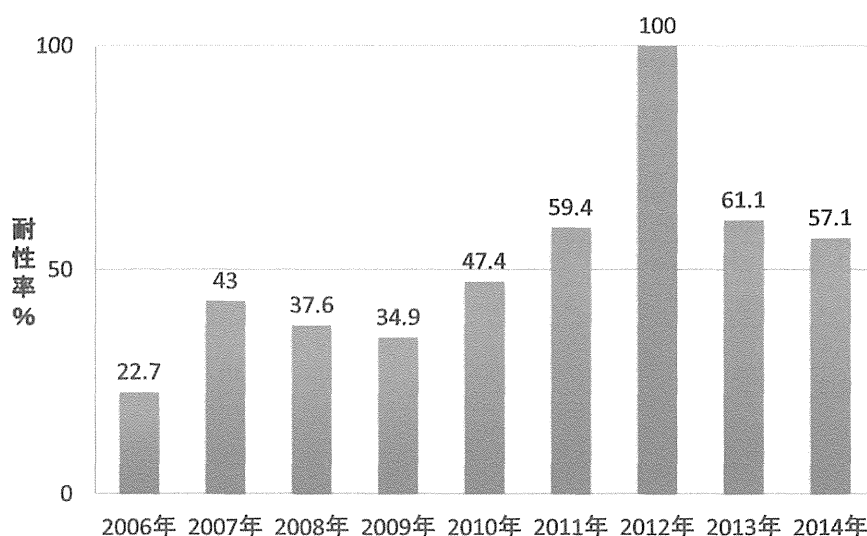


図2 散発下痢症由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率

表4 腸管出血性大腸菌の薬剤感受性試験成績 (2012-2013年)

血清群	耐性パターン	2012年	2013年	合計	備考
O157 (95株)	ABPC, SM, TC, CP, CPDX, CTX, Su	1		1	AmpC
	ABPC, SM, TC, KM, CP, Su		1	1	
	ABPC, SM, TC, ST, Su		1	1	
	ABPC, SM, TC, Su	2		2	
	ABPC, SM, Su	1		1	
	SM, TC, CP, Su		1	1	
	SM, Su	1		1	
	TC	1		1	
	感受性	47	39	86	
O26 (11株)	ABPC, SM, TC, ST, Su		2	2	家族
	SM, Su	1		1	
	ABPC		1	1	
	FOM		1	1	
感受性	2	4	6		
O103	SM, Su		2	2	家族
	感受性		1	1	
O111	ABPC, SM, TC, KM, Su	1		1	
	ABPC, SM, TC, NA, Su		1	1	
O121	感受性	1	3	4	
O91	SM, TC, Su	1		1	
O88	感受性	1		1	
O113	感受性	1		1	
O148	感受性	1		1	
O4	感受性		1	1	
OUT	感受性		1	1	
計		62	59	121	

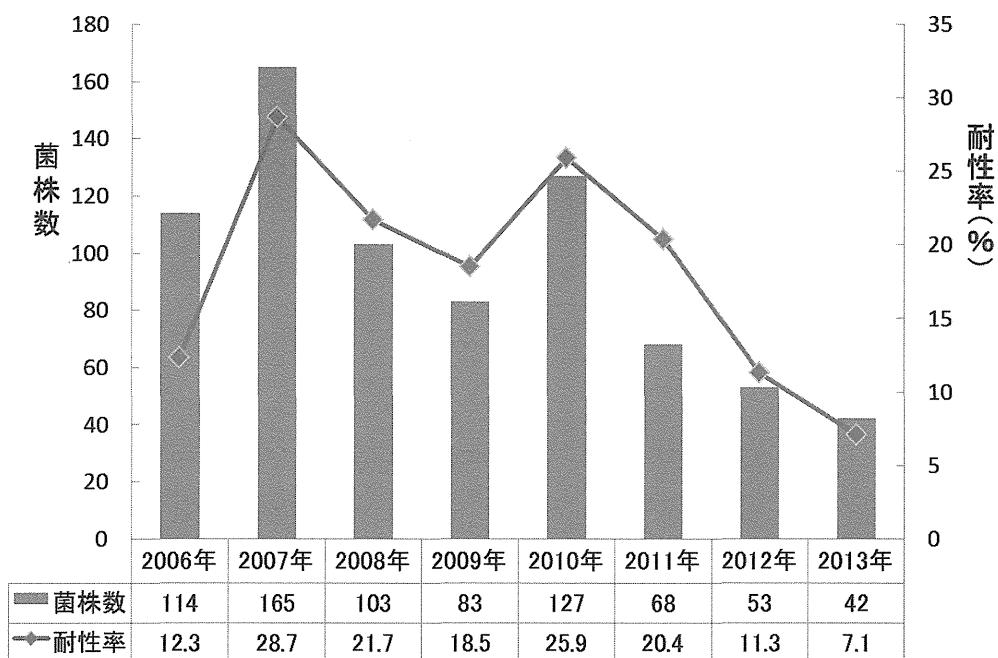


図3 腸管出血性大腸菌 0157 の菌株数と薬剤耐性率

分担研究報告書

分担課題名：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

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）

研究要旨

伴侶動物はヒトと密接な関係にある。伴侶動物に使用される抗菌性物質の多くは人体用であり、伴侶動物由来薬剤耐性菌がヒトへ伝播することによる影響が懸念される。今回、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因菌である *Clostridium difficile* の伴侶動物における現状及びヒトの感染症との関連を明らかにすることを目的として、イヌ由来 *C. difficile* の薬剤感受性及びその性状を決定し、ヒト臨床由来株との比較を行った。また、近年、ヒト医療において注目される 16S rRNA methylase (16S-RMTase) による高度アミノグリコシド耐性について、イヌ由来大腸菌での現状を調べた。イヌから分離された *C. difficile* の中にはヒト臨床由来株と同一のリボタイプ及び PFGE 型を示す株があった。イヌ由来大腸菌のうち 2/212 (9.4%) がヒト医療で最も多く報告される 16S-RMTase の一つである *rmtB* 遺伝子を保有していた。以上の結果より、イヌ由来 *C. difficile* はヒトに伝播する可能性があること、伴侶動物においても 16S-RMTase が伝播していることが示された。

A. 研究目的

1. *Clostridium difficile* はヒトの抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎の原因となり世界的な問題となっている。海外では、介護施設の入所者を訪問するイヌから過去にヒトでアウトブレイクを起こしたことがあるリボタイプ 027 型菌が分離された。イヌを含む伴侶動物はヒトの生活と密接な関係があることから、伴侶動物が保有する *C. difficile* は、ヒトが保有する *C. difficile* のレゼルボアとなっている可能性がある。

そこで今回、ヒトとイヌの間での *C. difficile* 伝播の可能性について明らかに

することを目的として、昨年度の本研究において分離したイヌ糞便由来 *C. difficile* とヒト臨床由来 *C. difficile* について、薬剤感受性、リボタイプ、PFGE 型について比較を行った。

2. 近年、ヒトの医療現場においてプラスミド性 16S rRNA methylase (16S-RMTase) の獲得によるグラム陰性腸内細菌の高度アミノグリコシド耐性が広がっている。疫学的に 16S-RMTase 保有株はメタロβラクタマーゼ、ESBL、*qnr* 遺伝子と共存することが多いことから、感染症を発症した場合は使用抗菌剤が限られることとなり大きな問題となっている。海外では、動物からも 16S-RMTase



保有株の存在が報告され始めた。

そこで今回、日本の伴侶動物における 16S-RMTase 保有状況の実態を明らかにすることを目的として、当研究室が保有するイヌ由来大腸菌株の 16S-RMTase 保有状況を調べた。

## B. 研究方法

### 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株との性状比較

昨年度の本研究にて 204 検体のイヌのうち 62 検体 (30%) から 68 株の *C. difficile* が分離された。これら 68 株と東京都内の 2 病院において *C. difficile* 感染症患者から分離された 73 株について薬剤感受性、リボタイプ、PFGE 型を決定し比較を行った。

感受性試験は、CLSI の方法に従い、ヒトの抗菌薬関連下痢症に対して使用されるバンコマイシン (VCM) 及びメトロニダゾール (MNZ)、抗菌薬関連下痢症の原因となるクリンダマイシン (GM)、セフトリアキソン (CTRX)、エリスロマイシン (EM)、シプロフロキサシン (CPF) に対する感受性を寒天平板希釈法により調べた。加えて、テトラサイクリン (TET) に対する薬剤感受性も寒天平板希釈法で調べた。

### 2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

動物病院来院犬から分離されたイヌ由来大腸菌 212 株について、高度アミノグリコシド耐性株をスクリーニングするため、アミノグリコシド系 4 薬剤 (ゲンタマイシン (GM)、アミカシン (AMK)、ネオマイシン (NEO)、アプラマイシン (APR)) に対する薬剤感受性を CLSI の方法に従い寒天平板希釈法により測定した。

16S-RMTase の保有が疑われる株について、

*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA* 遺伝子の保有について PCR により検索した。

16S-RMTase 陽性株について、複数薬剤の感受性について微量液体希釈法で決定した。また、その他の耐性遺伝子も PCR により決定した。

16S-RMTase 陽性株について、プラスミド伝達性を明らかにするため接合伝達試験を行った。

## C. 研究結果

### 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株の性状比較

薬剤感受性について、イヌ由来 *C. difficile* 及びヒト由来 *C. difficile* のいずれにおいても、VCM、MNZ 耐性は認められなかった (表 1)。抗菌薬関連下痢症の原因となる薬剤に対する耐性割合はヒト由来株が犬由来株に比べて高い傾向を示した。TET に対する耐性割合はいずれの由来も低かった。

リボタイプリングの結果、イヌ由来株は 29 の型に分類された (図 1)。最も主要なリボタイプ (16 株) はトキシシン A および B 陽性であった。4 番目に主要なリボタイプ (4 株) はヒト臨床由来株 (3 株) と同一のリボタイプを示した。これら同一のリボタイプの株について PFGE 解析を行ったところ、イヌ由来株のうち 1 株はヒト臨床由来株 3 株と同一の PFGE 型を示した (図 2)。

### 2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

イヌ由来大腸菌 202 株の 4 種類のアミノグリコシド系薬剤に対する感受性試験を行ったところ、GM 及び AMK に耐性を示す株が 29 株、4 薬剤の全てに耐性

を示す株が 6 株であった。

以上の 35 株のうち、2 株から *rmtB* 遺伝子が PCR により同定された (表 2)。*rmtB* の内部配列についてシーケンス解析を行ったところ、ヒトから分離されている *rmtB* 遺伝子と同一の遺伝子配列であった。この 2 株は、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し (表 2)、*bla*<sub>TEM-1</sub> も保有していた。

*rmtB* 陽性株について、伝達試験を行ったところ、プラスミドの伝達が認められた (伝達頻度は  $1.7 \times 10^{-5}$  及び  $2.4 \times 10^{-3}$ )。トランスコンジュガントには GM、AMK 耐性が伝達した。

#### D. 考察

##### 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床分離株の性状比較

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシシン A 及び B を産生する *C. difficile* を保有していた。分離された菌株について、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる抗菌薬に耐性割合はヒト臨床由来株に比べて低い傾向であるものの、CLDM、CTRX、CPFY に対して 50% 以上の株が耐性を示した。ブタ由来 *C. difficile* は TET に対して高い耐性割合を示すが、ブタでの TET の高い耐性割合は抗菌薬の使用実態を反映していると考えられている。以上のことから、イヌにおける 3 薬剤の高い耐性割合は、イヌへの抗菌薬の使用が一因と考えられる。

最も主要なリボタイプに分類された 16 株は全てトキシシン A および B を保有していた。イヌにおいて広く拡散している株が、ヒトに伝播した場合にヒトに対して毒性を示すことから、イヌからヒトに伝播した際

のリスクは高い。

また今回、イヌとヒトでリボタイプおよび PFGE 型が同一の株が同定された。今回のイヌ由来株とヒト由来株の疫学的な関連は不明であるものの、イヌとヒトが近縁な *C. difficile* を保有し、イヌとヒトの間で伝播し得ることが明らかとなった。今後、疫学的な調査を含めたイヌ由来 *C. difficile* の調査が必要であることが示唆された。

##### 2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

日本のイヌから分離された大腸菌において低率ではあるが、プラスミド性 16S-RMTase が同定された。16S-RMTase 保有株は他の耐性因子と共存することが多く、問題となりやすい。今回分離された 2 株についても、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し、少なくとも *bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子を保有していた。また、これら耐性遺伝子は接合伝達した。以上のことから、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及び耐性遺伝子の拡散には注意が必要であることが示唆された。

RGU-60 株について、NEO 及び APR に対する薬剤感受性は、トランスコンジュガントに伝達しなかった。RGU-60 株の NEO、APR 耐性は *rmtB* 遺伝子以外の因子が関係している可能性がある。また、高度アミノグリコシド耐性を示し、アミノ配糖体修飾酵素の作用による耐性では説明がつかない株も存在した。これらの株については新たな 16S-RMTase の存在の可能性も含めてさらなる研究が必要である。

#### E. 結論

伴侶動物として飼育されているイヌからヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる可能性のある *C. difficile* が分離され、イヌとヒトの間での伝播の可能性が示された。イヌにおける *C. difficile* のヒトへの伝播リスク、制御法についてのさらなる研究が必要であることが示唆された。

イヌ由来大腸菌から低率ではあるが、プラスミド性 *rmtB* 遺伝子保有株が分離された。今後、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及び耐性遺伝子の拡散について注意が必要であることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

<口頭発表>

1. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊：薬剤耐性遺伝子はイエバエ腸管内で接合伝達する、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
2. 大久保寅彦、臼井優、田村豊：ドブネズミ由来 *Enterococcus faecalis* の遺伝子的特徴について-市街地と無人島の比較-、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
3. 臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* リボタイプ 078 と欧州で分離されたリボタイプ 078 の比較、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
4. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊：薬剤耐性大腸菌はイエバエの発

育環で維持される、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌

5. 大久保寅彦、福田昭、田中和之、臼井優、田村豊：腸球菌の薬剤耐性性状と人為的影響の関係、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
6. 臼井優、酒見蓉子、内田郁夫、田村豊：豚へのフルオロキノロン剤投与及び群飼育がフルオロキノロン耐性カンピロバクターの選択・拡散に与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
7. 白川崇大、福田昭、大久保寅彦、臼井優、田村豊：農場由来耐性菌ベクターとしてのハエの役割、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
8. 工藤逸美、臼井優、田村豊：畜舎で使用される消毒薬が *Escherichia coli* の薬剤排泄ポンプに与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
9. 川崎ななみ、臼井優、田村豊：遺伝子導入による多剤耐性大腸菌の感受性回復の可能性、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
10. 鈴木要人、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
11. 長藤亘、臼井優、岡健太郎、高橋志達、山口博之、田村豊：

- Flavophospholipol による薬剤耐性遺伝子の接合伝達阻害作用、第157回日本獣医学会、2014年9月9日、札幌
12. 臼井優、大久保寅彦、福田昭、高田秀重、鈴木聡、田村豊：水圏環境からの薬剤耐性遺伝子伝播におけるハエの役割、環境微生物系合同大会2014、2014年10月23日、浜松
13. 大久保寅彦、臼井優、鈴木聡、高田秀重、田村豊：バンコク周辺の水圏環境における薬剤耐性菌とその耐性遺伝子の解析、環境微生物系合同大会2014、2014年10月23日、浜松
14. 臼井優、中島千絵、舘野翔、田勢準也、小野崎正修、大曾根司郎、鈴木定彦、田村豊：CAMERA 法による野外サンプル（鶏肉及び鶏糞便）からの薬剤耐性カンピロバクターの迅速検出法、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日
15. 中島千絵、臼井優、鈴木晴香、小野崎正修、大曾根司郎、田村豊、鈴木定彦：DNA アレイ技術を応用した新たなカンピロバクター同定・薬剤耐性検出法の開発、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日
- <紙上発表>
1. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y.: Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 685-692. 2014
  2. Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y. Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.*, 170: 438-441, 2014.
  3. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
  4. 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.
  5. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying *bla<sub>CMY-2</sub>* from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
  6. 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.
  7. 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