

平成 26 年度 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」  
研究分担報告書

分担課題名 ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

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

研究要旨： 2011～2013年に市販流通鶏肉から分離されたカンピロバクターについて薬剤耐性率を調べた。*C. jejuni*では、NA耐性率は、国産40%、輸入60%、EM耐性は国産0%、輸入20%、*C. coli*では、NA耐性率は、国産64%、輸入62%、EM耐性は国産27%、輸入46%と、全体的に輸入鶏肉由来株で高い傾向であった。

ヒトおよび食品由来のサルモネラの内、検出率の高い血清型Typhimurium, O4群(i: -), Schwarzengrund, Infantis, Enteritidisについて、耐性菌出現状況を比較した結果、ヒト由来Enteritidis以外は、全て耐性率70%以上を示し、耐性率はいずれも食品由来株の方が高い傾向であった。

市販鶏肉から分離されたVREはヒト由来株ではとは異なり、TEICに対して感受性を示す株が多い。その違いを解明するために、TEIC感受性の鶏肉由来株について関連遺伝子の変異を調べた結果、その多くの株に*vanS*遺伝子の変異が認められた。この変異が、ヒト由来株との相違に関係していることが示唆された。

#### A. 研究目的

近年医療現場では、臨床分離株におけるフルオロキノロン系薬剤耐性菌やESBL産生菌の分離が増加傾向にあり、問題となっている。特にサルモネラやカンピロバクター等の腸管系病原菌は、ヒトや家畜、生肉等の食材から分離される例が多く、耐性菌の広がりが懸念されている。今後、更に耐性菌が増加し続ける

と、抗菌薬の選択肢が限られるなど、治療の問題が生じることになる。薬剤耐性菌拡大のメカニズムを解明し、これ以上の拡大を防ぐためには、ヒトおよび食品から分離される菌の薬剤耐性状況を的確に把握することが非常に重要である。そこで、食中毒起因菌であるカンピロバクターおよびサルモネラの薬剤耐性菌出現状況を調べた。

また、昨年度の研究結果において、ヒト由来バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) は、TEIC に対しても耐性を示す株が多いのに対して、市販鶏肉由来株は TEIC に対して感受性を示す株が多い成績であった。その違いを解明するために、鶏肉由来の VRE について関連遺伝子の変異について調べた。

## B. 研究方法

### 1. 鶏肉由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

#### 1) 供試菌株

2011 年～2013 年に東京都内で流通した国産鶏肉から検出した *C. jejuni* 236 株および *C. coli* 11 株と、輸入鶏肉から検出した *C. jejuni* 19 株および *C. coli* 13 株を供試した。

#### 2) ナリジクス酸およびエリスロマイシンに対する薬剤感受性試験

ナリジクス酸 (NA) およびエリスロマイシン (EM) に対する薬剤感受性試験は、KB ディスク法で調べた。

### 2. サルモネラ分離状況および耐性菌出現状況

#### 1) 供試菌株

2014 年に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ 114 株および食品から分離された 102 株を供試した。

#### 2) 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC), セフォタキシム (CTX), ゲンタマイシン (GM), カナマイシン (KM), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), ST 合剤 (ST), ナリジクス

酸 (NA), シプロフロキサシン (CPFX), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), スルfoisキサゾール (SIX), ホスホマイシン (FOM), アミカシン (AMK), イムペネム (IPM), メロペネム (MEPM) の 17 薬剤を供試し、米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) の方法に従い、センジディスク (BD) を用いた KB 法で薬剤感受性を調べた。

### 3. VRE 検出状況

#### 1) 供試菌株

1999 年から 2012 年に東京都内で流通した鶏肉から分離された VanA 型 VRE 24 株を供試した。分離された鶏肉の原産国は、日本 (2 株), ブラジル (8 株), タイ (8 株), インドネシア (3 株), フランス (2 株), マレーシア (1 株) であった。

#### 2) MIC の測定

バンコマイシン (VCM) およびテイコプラニン (TEIC) に対する最少発育阻止濃度の測定は、Etest を用いて行った。

#### 3) VanA 型耐性遺伝子の解析

VanA 型耐性遺伝子が存在する Tn1546 の塩基置換や挿入配列の有無について調べた。すなわち、*vanA* および *vanA* の調節遺伝子である *vanS* の 5' 端側の約 250bp について塩基配列を調べ、遺伝子変異の有無を確認した。

## C. 研究結果

### 1. 鶏肉由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

#### 1) *C. jejuni* の薬剤耐性菌出現状況

国産由来株の NA 耐性率は 2011 年が

44.7% ,2012 年 37.4% ,2013 年 43.9% と横ばい傾向であった。輸入鶏肉由来株は、分離株数が非常に少ないことから、年次推移の比較はできないが、3 年間の耐性率は 63.2% で、国産由来株に比べて耐性率が高い傾向であった。一方、EM に対する耐性株出現状況は、国産由来株では 0%、輸入鶏肉では 19 株中 4 株 (21.1%) であった (図 1)。

## 2) *C. coli* の薬剤耐性菌出現状況

2011 年~2013 年に分離された国産鶏肉由来株の NA に対する薬剤耐性株は 11 株中 7 株 (63.6%)、輸入由来株では 13 株中 8 株 (61.5%) であった。EM 耐性株は国内由来株で 11 株中 3 株 (27.3%)、輸入由来株で 13 株中 8 株 (46.2%) であった (図 2)。

## 2. サルモネラ分離状況および耐性菌出現状況

### 1) サルモネラの検出状況

2014 年に東京都内でヒトから分離されたサルモネラ 114 株は 35 血清型に分類された (表 1)。最も多く分離された血清型は O9 群 Enteritidis で 18 株 (15.8%)、次いで O7 群 Infantis が 17 株 (14.9%)、O4 群 Chester 11 株 (9.6%)、O4 群 Typhimurium 10 株 (8.8%) であった。

一方、食品から分離された 102 株は 18 血清型に分類され、O7 群 Infantis が 41 株 (40.2%) と最も多かった (表 2)。次いで O4 群 Agona 17 株 (16.7%)、O4 群 Schwarzengrund が 12 株 (11.8%)、OUT:r:1,5 が 8 株 (7.8%) であった。

### 2) サルモネラの薬剤耐性菌出現状況

2014 年にヒト、食品の両方から多く分離された血清型 Typhimurium、O4 群 (i:-)、Schwarzengrund、Infantis、Enteritidis について、耐性菌出現状況を比較した (図 3)。耐性率は、いずれの血清型菌においても食品由来株の方がヒト由来株より高く、ヒト由来 Enteritidis 以外の株の耐性率は 70% 以上であった。

### 3) 耐性パターンの比較

血清型 Infantis、Typhimurium および Enteritidis について、ヒト由来株と食品由来株の薬剤耐性パターンを比較した。血清型 Infantis のヒト由来株は 7 種類、食品由来株は 15 種類の耐性パターンに分類された。耐性パターンはヒト由来、食品由来株とも同様のパターンであったが、食品由来株では 5 薬剤耐性が 24.4% を占めていたのに対し、ヒト由来株では 5.9% であった (表 3)。

血清型 Typhimurium では、ヒト由来株で 4 パターン、食品由来株では 5 パターンに分類された (表 4)。5 薬剤耐性株が、食品由来株で 40%、ヒト由来株で 20% に認められた。

血清型 Enteritidis では、ヒト由来株で SM 耐性が 3 株、NA 耐性が 1 株、食品由来株では NA 耐性が 1 株であった。Infantis や Typhimurium と比較して、Enteritidis の耐性率は低く、単剤耐性菌のみであった (表 5)。

## 3. VRE 検出状況

1) 鶏肉由来 VRE の TEIC に対する MIC 供試した 24 株中 TEIC に対する MIC が 32  $\mu$ g/ml 以上であったものが 2 株 (8.3%)、16  $\mu$ g/ml が 1 株 (4.2%)、4

~ 12 µg/ml が 9 株 ( 37.5% ), < 4 µg/ml が 12 株 ( 50% ) であった ( 表 6 )。

## 2) Tn1546 中の遺伝子変異

*vanA* の調整遺伝子である *vanS* について塩基配列を決定し、遺伝子変異の有無を調べた結果、3 か所 ( T148G, G160C, A207T ) に変異を持つ株が 18 株、1 か所 ( G172A ) 変異が 2 株、変異なしが 2 株であった。*vanA* 遺伝子には全て変異は認められなかった ( 表 7 )。

## D. 考察

カンピロバクターによる食中毒は依然として多く、東京都では 2014 年に発生した食中毒 99 事例中 35 事例 ( 35.4% ) がカンピロバクターによるものである。その原因の多くは、生あるいは半生の鶏肉料理を喫食することで発生している。そこで 2011 ~ 2013 年に市販流通鶏肉から分離されたカンピロバクターについて、フルオロキノロン耐性に变化するリスクの高い NA 耐性菌、またカンピロバクター腸炎の治療に推奨される第一選択薬である EM に対する耐性菌の出現状況を調べた。

都内に流通する国産鶏肉由来 *C. jejuni* 236 株および輸入鶏肉由来 19 株の NA および EM 耐性率を比較した結果、いずれも輸入鶏肉由来株が高かった。*C. coli* についても同様の傾向であった。薬剤耐性率は、これまでの調査成績と同様に *C. coli* の方が *C. jejuni* より高い成績であった。しかし、輸入鶏肉は冷凍で輸入されるため、カンピロバクター分離率が非常に低い。そのため供試菌株数に差が認められることから、今後、さらに輸入

鶏肉由来株を増やして調査する必要があると考えられた。

2014 年に分離されたサルモネラは、ヒト由来 114 株、食品由来 116 株であった。ヒトおよび食品由来の耐性菌出現状況を比較する目的で、検出頻度の高い 5 血清型菌、すなわち Typhimurium、O4 群 ( i: - ), Schwarzengrund、Infantis、Enteritidis について血清型ごとに調べた結果、ヒト由来 Enteritidis 以外は、全て耐性率 70% 以上を示した。また、耐性率はいずれも食品由来株の方が高い傾向であった。Infantis や Typhimurium は、2 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性株が多いのに対し、Enteritidis は単剤耐性であった。この様に血清型によって耐性パターンが異なる傾向であった。

通常、ヒト由来 VRE は作用機序が同じである TEIC に対しても耐性を示す。しかし、鶏肉由来株の VRE 24 株中 22 株が TEIC 感受性あるいは判定保留 ( 16 µg/ml 以下 ) であった。そこで Tn1546 に存在する VanA 型耐性遺伝子である *vanA* および *vanA* の調整遺伝子である *vanS* の塩基配列を調べ、遺伝子変異の有無を確認した。その結果、TEIC 感受性 ( あるいは判定保留 ) の 22 株中 18 株において *vanS* に 3 か所変異が認められた。このタイプは、依然からアジアで報告されている型であるが、今回はブラジル産鶏肉でも確認された。3 か所変異株がアジアだけではなく、ブラジルまで広がっていることが確認された。また、これまで報告されていた 3 か所変異以外とは異なる G172A に 1 か所変異を持つ株が 2 株認められた。この変異が TEIC の

感受性に関与しているかは、今後の検討が必要と考えられた。更に今回調べた場所には変異が認められないが、TEICに感受性の株が2株あった。これらの株についても、*vanS*以外の変異を調べる予定である。

#### E. 結論

2011～2013年に市販流通鶏肉（国産、及び輸入品）から分離されたカンピロバクターについて薬剤耐性を調べた。*C. jejuni*では、NA耐性率は、国産の約40%、輸入の約60%、EM耐性は国産0%、輸入約20%、*C. coli*では、NA耐性率は、国産64%、輸入62%、EM耐性は国産27%、輸入46%と、全体的に輸入鶏肉由来株で高い傾向であった。

ヒトおよび食品由来のサルモネラの内、検出率の高い5血清型菌、すなわち Typhimurium, O4群(i:-), Schwarzengrund, Infantis, Enteritidisについて、耐性菌出現状況を比較した結果、ヒト由来 Enteritidis 以外は、全て耐性率は70%以上を示した。また、耐性率はいずれも食品由来株の方が高い傾向であった。

ヒト由来 VRE は、TEIC に対しても耐性を示す株が多い。しかし、市販鶏肉から分離された VRE はヒト由来株ではとは異なり、TEIC に対して感受性（判定保留）を示す株が多い。その違いを解明するために、TEIC 感受性の鶏肉由来株について関連遺伝子の変異を調べた結果、その多くの株に *vanS* 遺伝子の変異が認められた。この変異が、ヒト由来株との相違に関与していることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

薬剤耐性菌の出現状況に注意する必要がある。

#### G. 研究発表

1. 西野由香里,井田美樹,下島優香子,猪股光司,石塚理恵,宮尾陽子,黒田寿美代,奥野ルミ,石崎直人,貞升健志,甲斐明美:鶏肉由来バンコマイシン耐性腸球菌(VanA型)における Tn1546 の遺伝子解析,第35回日本食品微生物学会学術総会,2014年9月,大阪.
2. 横山敬子:ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性状況の変遷,第7回日本カンピロバクター研究会,2014年12月,東京.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

#### I. 特許取得

無し