

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、IncI1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来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

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。

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 - ラクタマーゼ (Extended-spectrum -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じ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

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。

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 (課題番号 : 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

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。

### A. 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  $\beta$ -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

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。

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（プロイラー）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

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。

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