

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））で収集した健康なプ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。プ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ロフルの使用に関する自主規制（2012年3月）により、セフトロ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ールゼ陰性ブドウ球菌（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年以降プ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。米国やカナダのプ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ロフル（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が

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、国内のプロイ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 SCC mec 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 SCC mec 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 で収集した健康なプロイラー由来の大腸菌の CTF 及びセフォタキシム (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 年にプロイラーから分離された第 3 世

代セファロスポリン耐性 (CTX: 4 μ 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、ダイレクトシークエ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 にてオキシシリン(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 SCC mec 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 ' 5'

-GGAATCAGTCTCAATCAGTGCT-3'

ccrB-398P1:5 ' 5'

-CATGAGTTCGTGTTTATTGTCTGGA-3 ' 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クエンスにより塩基配列を確認

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IncI1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:0.09-0.75µg/ml)及びCFX(MIC:2-3µg/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SCCmec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、 bla_{CMY-2} が優勢であり、この耐性遺伝子の分布にIncI1、IncIγ、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、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。

-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 JVARМ 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

プロイラーにおける 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

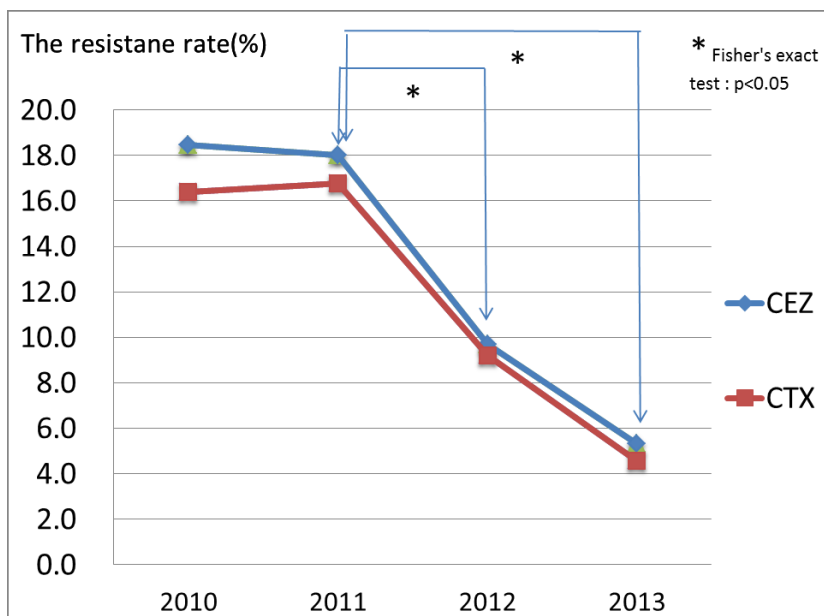
1. Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

JVARМ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 耐性株のラクタマーゼ型別

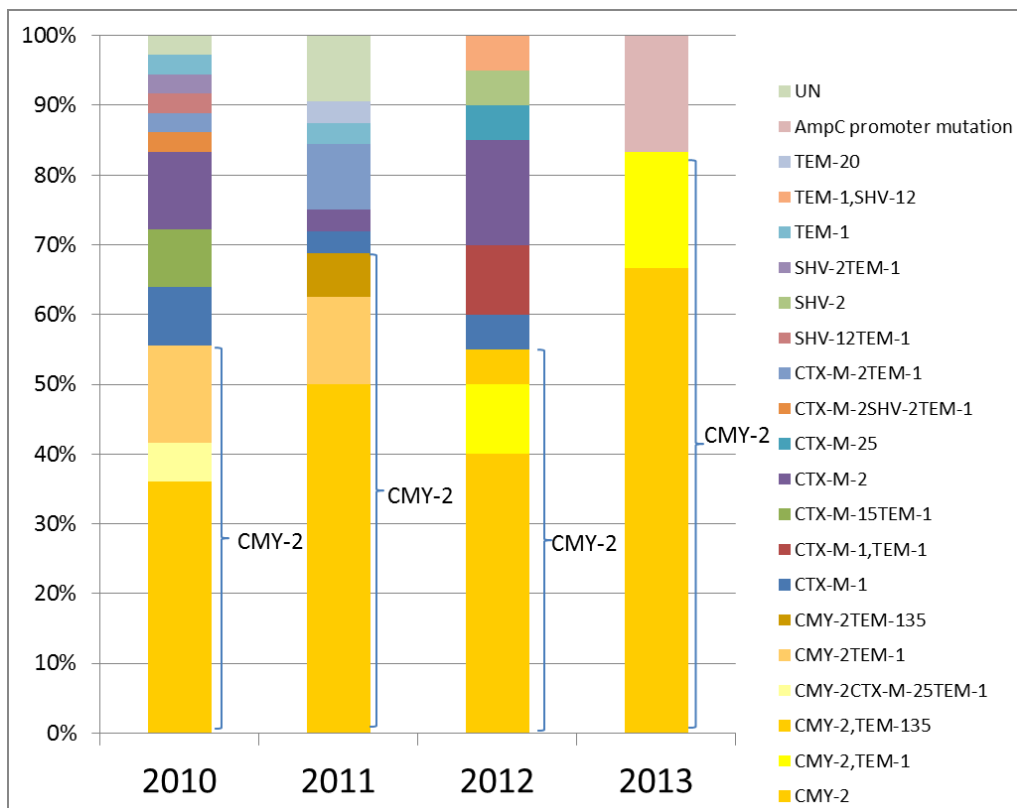


図3 伝達株のレプリコン型別

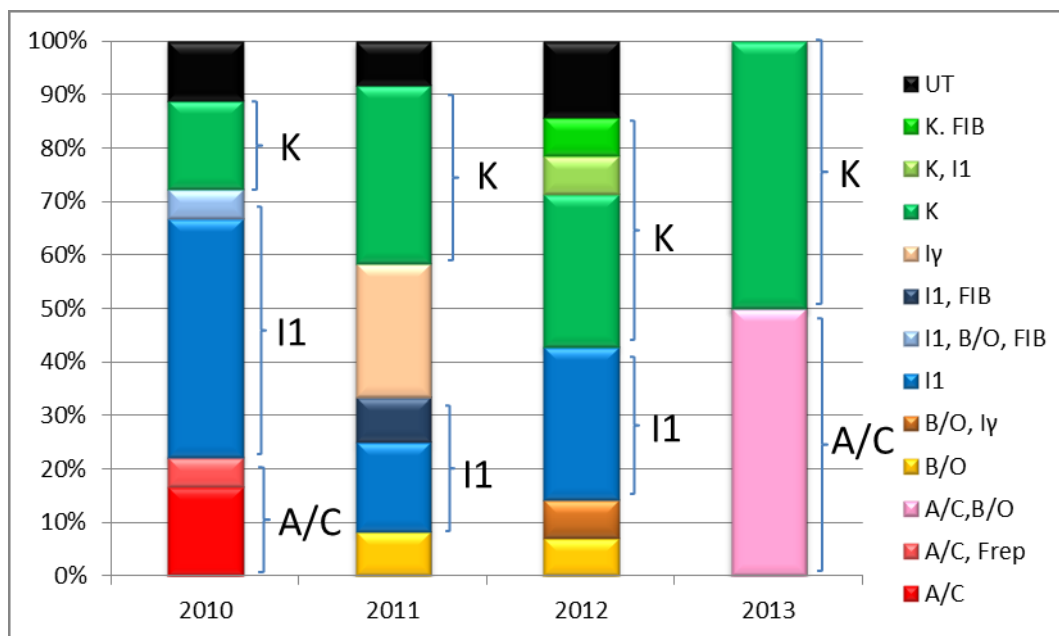


表1 プロイラー由来大腸菌及び第3世代セファロスポリン耐性 (CTX 4 μg/mL) 大腸菌における各種薬剤に対する耐性

	<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
kanamycine	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 プロイラー由来 CMY2 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
	I	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, I	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
	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>	+	-	-

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	CPF	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

