

平成24-26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である Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM) 事業より、収集された健康なブロイラー由来の大腸菌において、人の医療で重要とされる第3世代セファロスポリンに対する耐性率は、2000~2003年では3.8%であったが、2010~2012年では約20%と増加が顕著であった。このことを受けた国内の養鶏団体がセフトオフルの使用に関する自主規制（2012年3月）を行った結果、ブロイラーにおけるセファロスポリン耐性の割合は2012年-2013年度には、2011年度と比べて有意に減少した。なお、自主規制前後で優勢なβ-ラクタマーゼ遺伝子 (*bla<sub>CMY2</sub>*)、レプリコン型(IncK)は変わらず、人の臨床分離株で主に報告される遺伝子 (*bla<sub>CTX-M</sub>*) とは異なった。

家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) について、2010年に牛由来 MRSA (sequence type (ST) 121) 1株が分離され、2012年に1農家の豚4頭より MRSA (ST398) 11株が分離された。本 MRSA ST398 の SCCmec 型は、classA-A1B3 で新規の型であった。当該 MRSA ST398 の起源を探るべく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。

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 :sequence type (ST)398)が注目されているが、国内の家畜に由来する MRSA の報告は少ない。国内で分離された家畜由来 MRSA について情報を蓄積するため、各種薬剤に対する感受性及び分子遺伝疫学解析を実施する。さらに、LA-MRSA の起源を確認するため、家畜由来メチシリン耐性コアグラエ陰性ブドウ球菌 (MRCNS)、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 及び MRSA について各種薬剤に対する感受性試験及び分子遺伝疫学解析を実施した。

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 *C. 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:  $\geq 4\mu\text{g/ml}$ ) 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シングにより決定した。

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) LA-MRSA の調査

#### 1) 各種家畜由来 MRSA の分布調査及び MRSA の遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性

2010年に家畜から分離された黄色ブドウ球菌122株の薬剤感受性を調べた。アンピシリン (ABPC) 耐性9株を対象にオキサシリン (OXA) 感受性と耐性遺伝子 (*mecA*) に基づきMRSAを検索した。牛から分離されたMRSA 1株の遺伝子型を調べた。遺伝子型は、multilocus sequence typing (MLST)、SCC*mec*型と *spa* type を決定した

#### 2) 豚農場由来 MRSA の分布調査及び性状解析

2012年に、東北、関東、中部及び九州地方の計50農場、500頭の豚を対象とした調査より関東の2農場5頭よりMRSA14株 (1検体最大3株) が分離された。本研究では、1頭当たり1株を代表株として、薬剤感受性、MLST、SCC*mec*型と *spa* type を検索し、その後、ST398を示した株については次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを解析した。

#### 3) 国内豚由来 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OXA及びセフトキシム(CFX)のMICを測定し、MSSAと決定した後にそれぞれの株について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 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'

-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 *Campylobacter coli*69 株について Qin 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  $\beta$ -ラクタマーゼ型は、いずれの年も *bla*<sub>CMY-2</sub> 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*<sub>CMY-2</sub> 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*<sub>CMY-2</sub> を保有するプラスミドは、2010年以降、 $\beta$ -ラクタム系以外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) LA-MRSA の調査

#### 1) 各種家畜由来 MRSA の分布調査及び MRSA の遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性

黄色ブドウ球菌122株(牛由来109株、豚由来5株及び鶏由来8株)の薬剤感受性試験には、7薬剤を供した。いずれの薬剤に対する耐性率も10%未満であった(表5)。

ABPC耐性は、牛由来6株と豚由来3株で認められ、起立不能牛の後肢関節膿瘍由来1株が、MRSAであった。MRSA1株では、OXAのMICが4 $\mu$ g/ml (Etest)で、SCC*mecV*型、MLST型はST121で、*spa-type*はt5110であった。耐性型は、 $\beta$ -ラクタム系以外にGM耐性であった。

#### 2) 豚農場由来 MRSA の性状解析

1農場4頭由来11株は、全てST398で、SCC*mec*型と *spa type* は欧米で報告されているものとは異なる新規のものであった。薬剤耐性型は、ABPC-TC-EM-SM-CP-GM耐性、または、ABPC-TC-EM-SM-CP耐性を示した。

全ゲノム解析では、ST3984株中1株(No. 274-1)で比較的良好に解読できた。コアゲノムはST398の08BA02176株と非常に近いが、SCC*mec*型は、新規の型であるclassA-A1B3と同定された。本株は、*mecA*の他、フルオロキノロン(*norA*)、マクロライド(*erm(B)*、*erm(T)*)、テトラサイクリン耐性(*tet(38)*、*tet(L)*、*tet(M)*、*tet(S)*)遺伝子を保有していた。本株は、 $\gamma$ ヘモリジン遺伝子は保有したが、PVLやエンテロ

トキシンの遺伝子は保有していなかった。

他1農場で分離されたMRSAは、ST5で、SCCmec型とspa typeはt002であった。薬剤耐性型は、ABPC-EM-TC-CP耐性を示した。

### 3) 国内の豚由来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領域ではなく、Jostらが報告する*Arcanobacterium pyogenes*の染色体上のorf181からorfεの5'側の領域と相同な遺伝子配列が認められた。

## D. 考察

1999年のJVARMの開始時から、ブロイラー由来大腸菌で第3世代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*<sub>CMY-2</sub>が優勢であり、②この耐性遺伝子の分布に

IncI1、IncIy、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。2012年および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。

一方、セファロスポリン耐性率の減少とは対称的にKMおよびSMの耐性率の上昇がブロイラー由来大腸菌全体およ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*<sub>CMY-2</sub>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*<sub>CTX-M</sub>とは異なった。

トランスコンジュガントの解析では*bla*<sub>CMY-2</sub>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、IncI1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ST398が分離されている。

本調査では、2010年に牛由来のMRSA(ST121)が分離された。その遺伝子型は、国内(佐渡島)の小児の鼻粘膜及び皮膚病変から分離された株と同一であったが、薬剤耐性型はGMのみに耐性で小児分離株と異なっていた。また2012年、1農場の豚にお

いて MRSA ST398 の分布が確認されたが、ゲノム解析により SCC<sub>mec</sub> 型が欧米等で報告されているものとは異なる新規のものであった。この 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<sub>mec</sub> 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 型かつ薬剤耐性型、また MRCNS には同じ SCC<sub>mec</sub> 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の 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た。

#### E. 結論

ブロイラーにおけるセフトオフルの使用に関する自主規制(2012 年)後、セファロスポリン耐性大腸菌は有意に減少した。

国内の 1 農家の豚より MRSA ST398 が分離され、欧米の LA-MRSA とは異なる新規の SCC<sub>mec</sub> 型であった。本 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. Asai, T., Hiki, M., Baba, K., Usui, M., Ishihara, K., Tamura, Y. 2012. Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 551-552.

2. Kawanishi, M., Ozawa, M., Hiki, M., Abo, H., Kojima, A., Asai, T. 2013. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 19(5):823-5.

#### (2) 海外

1. Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. 2013. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*CMY-2 gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 10(3): 243-249.

2. Usui, M., Nagai, H., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T. 2013. Effect of antimicrobial exposure on *acrAB* expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis*. *Front Microbiol.* 4:53, 2013.

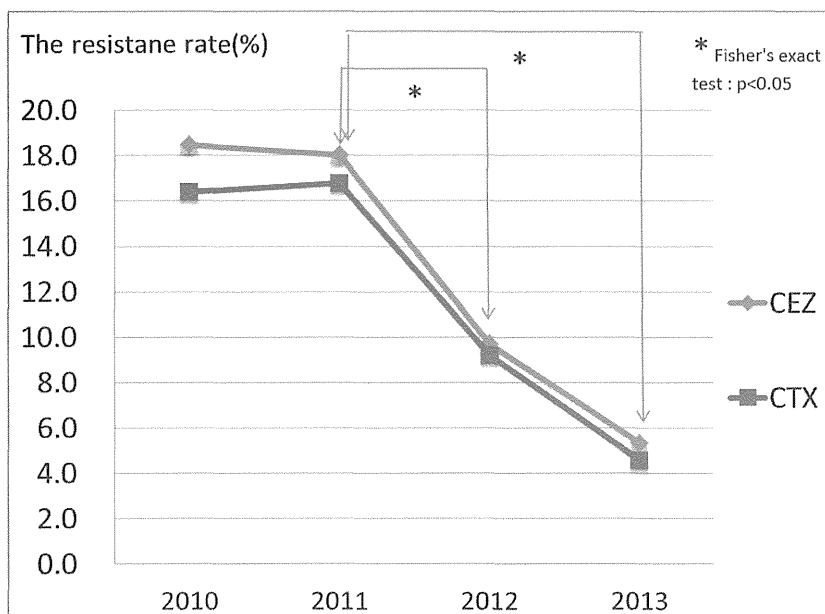
3 Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura I, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal.* 67:14  
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

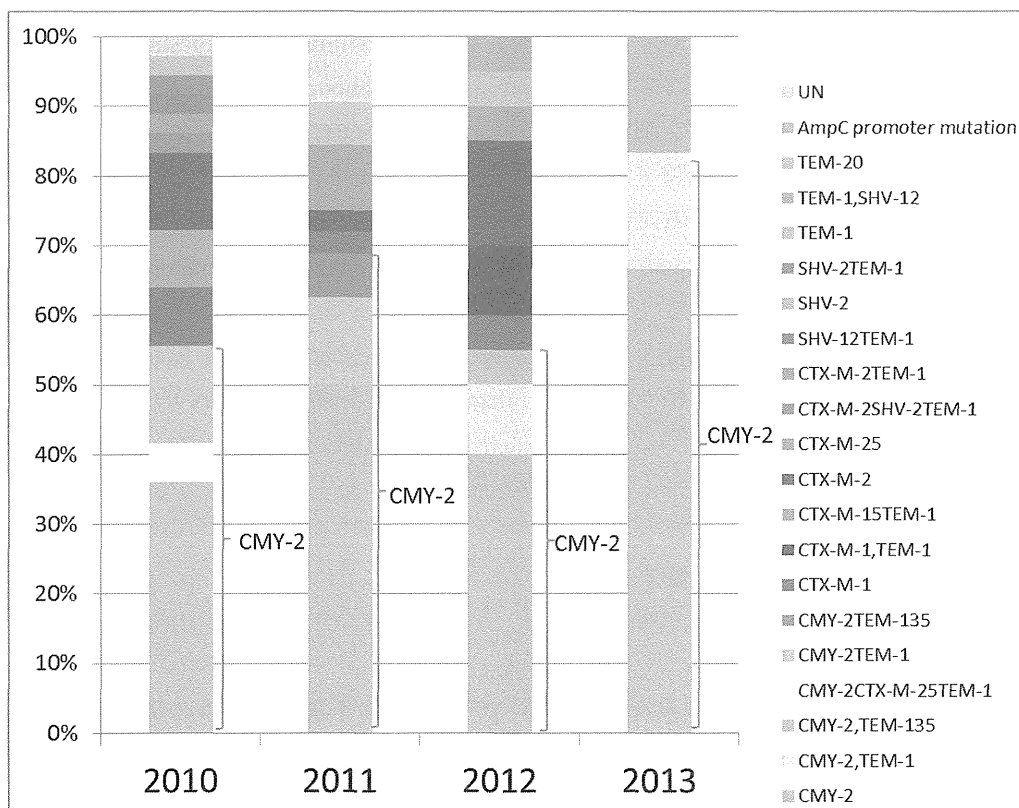


図3 伝達株のレプリコン型別

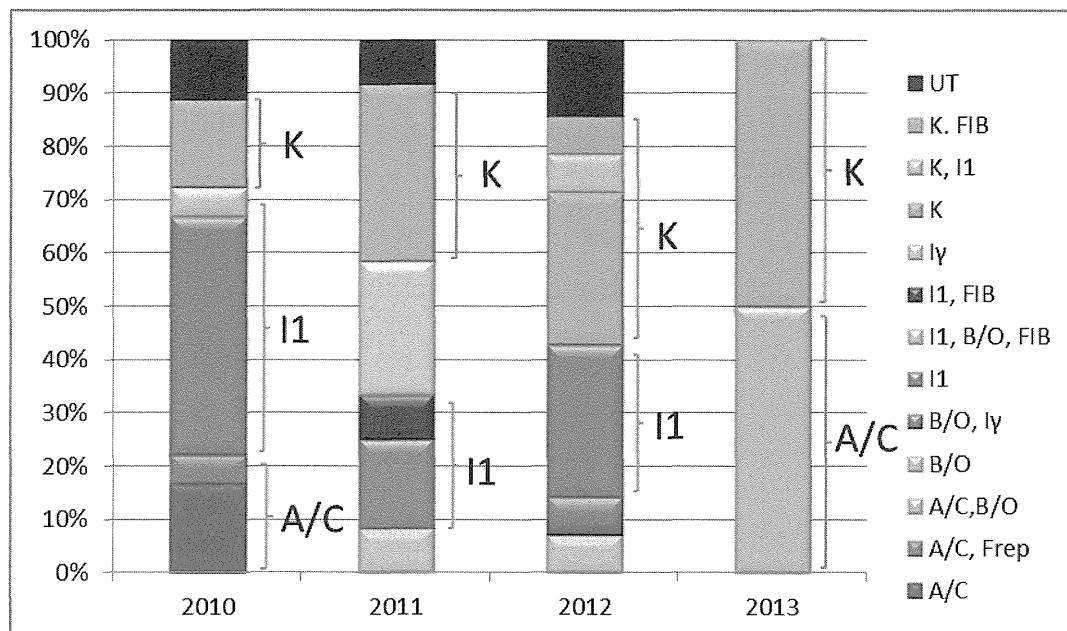


表1 ブロイラー由来大腸菌及び第3世代セファロスポリン耐性 (CTX $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ )  
大腸菌における各種薬剤に対する耐性

	<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
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 ブロイラー由来 CMY2  $\beta$  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 2011年病勢鑑定材料から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤耐性菌の分布

薬剤(Break point)	牛(n=109)	豚(n=5)	鶏(n=8)
Ampicillin (0.5)	6	3	0
Streptomycin (64)	7	0	0
Gentamicin (16)	1	0	0
Tetracycline (16)	0	3	3
Erythromycin (8)	2	1	4
Chloramphenicol (32)	0	1	0
Ciprofloxacin (4)	0	0	2

表4 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5 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6 家畜由来 *C.coli* のエリスロマイシンに対する MIC 分布

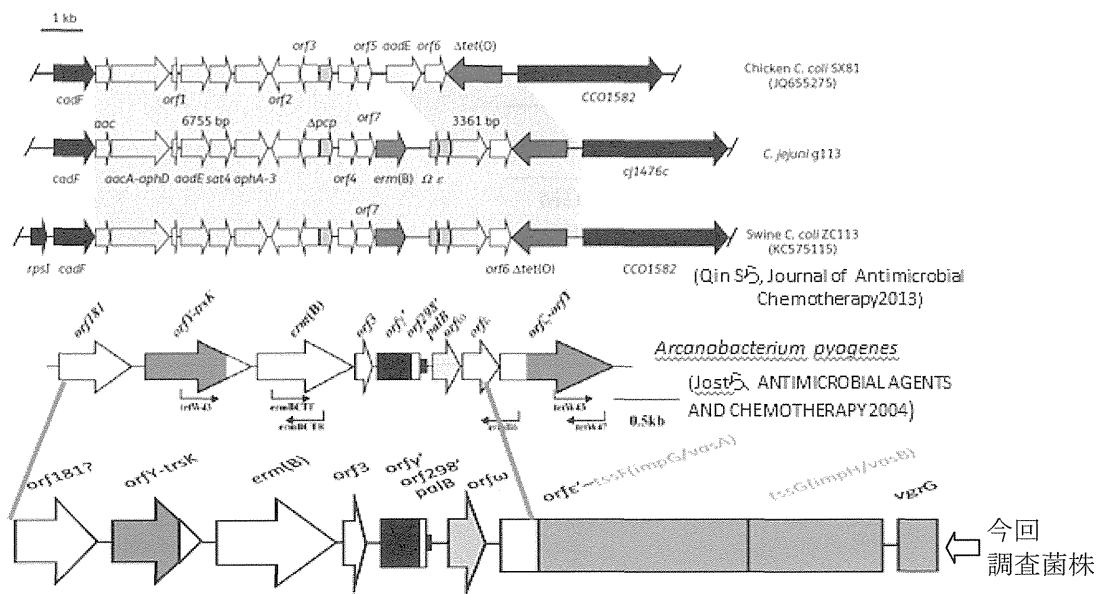
	MIC(mg/L)										菌株数	耐性株	耐性率(%)		
	≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64				128	256
平成25年	3	5	6	12	13	4						18	61	18	29.5
平成24年	1	7	9	15	11	8					3	23	77	26	33.8
平成23年	2	3	10	26	11	11				1	5	19	88	25	28.4

69株

表7 *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



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」

総合分担研究報告書

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

家畜、家禽の生産現場における抗菌剤の使用が薬剤耐性菌の選択につながり、畜産物を介してその耐性菌に感染することでヒトに健康被害をおよぼす可能性を検証する目的で 2 つの研究を実施した。南九州で分離されたブロイラーおよびヒト由来広域スペクトラムセファロスポリン耐性大腸菌を比較したところ、大腸菌遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子型には共通性が認められた。ブロイラーとヒトで定着できる大腸菌は異なるが、プラスミド等を介した耐性遺伝子の伝播は起こっている可能性が考えられた。また、近年ヒトと家畜で *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12:i:- (4:i:-) の分離頻度が上昇している。国内のヒト、動物、環境に由来する 4:i:-51 株を解析したところ、本菌の遺伝子型別法としては 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ことが示された。ヒトおよび家畜由来株で識別不能となる株が一部、認められたほか、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。

A. 研究目的

家畜、家禽の生産現場における抗菌剤の使用が薬剤耐性菌の選択につながり、畜産物を介してその耐性菌に感染することでヒトに健康被害をおよぼす可能性が古くから指摘されている。本課題では家畜とヒトから大腸菌やサルモネラを分離し、その薬剤感受性を調査するとともに、両者の類似性を様々な角度から検証することで、この仮説を検証することを目的とした。このため、以下に示

す 2 つの研究を実施した。

まず、家畜からヒトへの伝播が確認できる可能性の高い家畜および薬剤耐性菌として、ブロイラーと広域スペクトラムセファロスポリン (ESC) 耐性大腸菌を調査対象とした。加えて調査地域を限定することにより、家畜からヒトへの耐性菌伝播が確認できるか否かを調査した。また、ヒトと家畜で同時に分離頻度の上昇している病原菌は両者の間に何らかの関連が存在する可能性が考えられ

る。*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。本菌の家畜からの分離頻度も近年、上昇していることから、本血清型のヒト由来株と家畜由来株を比較することで、家畜からヒトへの薬剤耐性菌伝播が確認できるか否かを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 南九州でヒトおよびプロイラーから分離された大腸菌の比較

#### ①菌分離、同定、遺伝子型別、および血清型別

鹿児島県の食鳥処理場においてプロイラー盲腸便を採取し、個体ごとに大腸菌の分離を試みた。糞便希釈液を0.5mg/Lセフトキシム加マッコンキー寒天培地に塗布し、得られた赤色コロニーの生化学的性状をAPI 20E (BioMerieux) で確認し、大腸菌と同定した。ヒト由来株については鹿児島大学より分与を受けた小児下痢症由来ESC耐性大腸菌15株を供試した。

大腸菌の7つのhousekeeping遺伝子(*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*)をPCRで増幅後、その塩基配列を決定し、MLST website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>)のプロトコールに従い遺伝子型(sequence type: ST)を決定した。ST131と型別された大腸菌については市販の抗血清を用いてO抗原とH抗原の型別を行った。

#### ②薬剤感受性試験

市販の薬剤感受性ディスクを用いて下記のESCに対する感受性を調べた;セフトジジム, CAZ;セ

フトキシム, CTX;セフトキシチン, FOX。

#### ③プラスミド解析

野外分離株の保有するプラスミドはKado-Liuの方法で分離し、アガロースゲル電気泳動により確認した。また、大腸菌MC1061を受容菌とした接合伝達法、または大腸菌DH5 $\alpha$ を受容菌とした形質転換法により薬剤耐性(R)プラスミドの単離を試みた。単一のRプラスミドを保有する受容菌からプラスミドを分離し、制限酵素消化後の泳動像を比較した(Restriction-fragment-length polymorphism: RFLP解析)。制限酵素としてHind IIIとSalIを用いた。

また、一部大腸菌プラスミドの宿主域を明らかにする目的で、それらプラスミドの*Salmonella* Typhimurium LT2株、*Salmonella* Infantis L-3701株、*Citrobacter freundii* ATCC8090株、*Klebsiella pneumoniae* ATCC9997株、*Enterobacter cloacae* ATCC13047株、*Escherichia coli* ATCC14763株、*Escherichia coli* MC1061株に対する伝達性を調べた。

#### ④薬剤耐性遺伝子およびレプリコン型の解析

ESC耐性を規定する遺伝子を特定するため、国立感染症研究所細菌第2部の方法に従ってPCRおよび増幅産物の塩基配列解析を行った。また、ESC耐性遺伝子が存在するRプラスミドのレプリコン型を決定するため、PCR-based replicon typing (Carattoli et al., 2005, J Microbiol Methods 63:219-228)を実施した。

### 2. 国内で分離された*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4:i:-の解析

#### 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。

#### ②PCR

4:i:-と Typhimurium との関連を明らかにする  
目的で、Typhimurium を同定するための m-PCR  
(Akiba et al., 2011, J Microbiol Methods  
85:9-15) および IS200-PCR (Echeita et al., 2001,  
J Clin Microbiol 39:2981-2983) を実施した。また、  
Typhimurium を含む限られた血清型が保有する  
病原性プラスミドのマーカである *spvB* 遺伝  
子を検出する PCR を実施した。

### ③プラスミド解析

野外分離株の保有するプラスミドは Kado-Liu  
の方法で分離し、アガロースゲル電気泳動により  
確認した。

### ④ファージ型別

Typhimurium 型別用ファージによるファージ型  
別は国立感染症研究所細菌第一部で実施した。

### ⑤薬剤感受性試験

市販の薬剤感受性ディスクを用いて下記 10 薬  
剤に対する感受性を調べた；アンピシリン、セフ  
ァゾリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、  
テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ホス  
ホマイシン、コリスチン、スルファメトキサゾー  
ル、ナリジクス酸。

### ⑥Pulsed-field gel electrophoresis (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 ファーマットで  
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。

### ⑦Multilocus variable-number tandem repeat analysis (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-10pl、  
STTR-3) を PCR 増幅し、キャピラリーシークエン  
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\\_downl  
oad.html](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html)) を用いて Nei' s diversity indices を  
算出した。

### ⑧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. 南九州でヒトおよびブロイラーから分離され た大腸菌の比較

#### ①菌分離成績

2010年5月~2011年5月に採材した14農場由  
来、45サンプルの全てからCTXに耐性を示す大腸  
菌が分離された。原則的に1サンプルから1株を  
解析に供したが、45サンプル中1サンプルのみ、  
大腸菌2株を解析に供した。

#### ②ブロイラー由来大腸菌性状解析結果

ブロイラー由来大腸菌46株に32のSTを認め、  
うち8つ (ST2787-ST2794) は本研究で新たに登録  
されたものである。ESC耐性を規定するプラスミ  
ド (ESCP) のレプリコン型は6種 (I1-I $\gamma$ 、FIB、  
K、B/O、FIC、Y) で、単一のプラスミドから2つ  
までのレプリコン型が検出できた。 $\beta$ ラクタマー  
ゼ遺伝子としてSHV-2、SHV-12、CTX-M-14、CTX-M-15、

CMY-2 が検出された (図 1)。

異なる鶏群由来株で同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合が認められた。具体的には *bla<sub>CM-2</sub>* を載せた IncII-I $\gamma$  プラスミドを保有する ST68 が鶏群 B とし、*bla<sub>CM-2</sub>* を載せた IncK、B/O プラスミドを保有する ST68 が鶏群 L と M で分離された (図 1)。

また、異なる ST で同じ RFLP パターンを示す ESCP を保有する場合が認められた。具体的には HindIII と SalI 消化後に同じ泳動像を示す IncII-I $\gamma$  プラスミドが ST2787 と 2789 に属する大腸菌から、IncK、B/O プラスミドが ST117、ST2794、ST68 に属する大腸菌から分離された (図 2)。

IncII-I $\gamma$  プラスミドおよび IncK、B/O プラスミドの宿主域を明らかにする目的で伝達試験を行ったところ、両プラスミドが同種および異種細菌に接合伝達されることが示された (表 1)

### ③ヒト由来大腸菌の解析結果

ヒト由来大腸菌 15 株に 11 の ST を認め、うち 2 つ (ST3026、ST3475) は本研究で新たに登録されたものである。 $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型として SHV-12、CTX-M-2、CTX-M-14、CTX-M-15 が検出された。ST131、O25:H4、CTX-M-15 保有菌の分離頻度は世界的に高いとされる。我々のヒト由来株の中に ST131 が 3 株、ST131 とは 1 つのアレル (*adk*) が異なる ST3475 が含まれていたため諸性状を確認したところ、上記の株と性状の全く一致する株は含まれなかった (表 2)。

### ④ブロイラー由来株とヒト由来株の比較

ブロイラー由来株とヒト由来株で認められた合計 39 の ST のうち、ST38、ST68、ST162 は共通して認められた (表 3)。これら菌株の  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型はブロイラー由来株でいずれも CMY-2、ヒト由来株は CTX-M-14 または SHV-12 であった (表 4)。また、ブロイラー由来株とヒト由来株で認められる合計 6 つの  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子型のうち

CTX-M-14、CTX-M-15、SHV-12 は共通して認められた (表 5)。

## 2. 国内で分離された 4:i:- の解析

### ①PCR およびプラスミド解析

未実施の 2 株を除き、全ての供試菌株は m-PCR により Typhimurium と判定された。また、Typhimurium 特異的 IS200 も同様に検出できた。53 株中 39 株が 94 kb プラスミドを保有しており、保有の有無と *spvB* 遺伝子検出の有無が一致したことから、本プラスミドは Typhimurium 特異的病原性プラスミドであることが示唆された (表 6)。

### ②薬剤感受性

51 株中 12 株は 2~4 薬剤に耐性を示した (表 6)。

### ③ファージ型

供試菌 51 株中 13 株は既知ファージ型に型別された。内訳は DT193 が 8 株、DT26 が 3 株、DT120 と DT27 がそれぞれ 1 株認められた。34 株は既知溶菌パターンに当てはまらなかったが、複数の菌株で同じ溶菌パターンを示す場合が認められ、RDNC-a~e と命名した。4 株は型別不能であった (表 6)。

### ④PFGE 型

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)。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 (図 3)。

### ⑤MLVA 型

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。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 (図 4)。

#### ⑥ 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。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, IIIf) 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 (図 3)。

#### ⑦ 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。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 (図 3)。

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。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 (図 3)。

#### D. 考察

##### 1. 南九州でヒトおよびブロイラーから分離された大腸菌の比較

ブロイラー生産現場における ESC 耐性菌の蔓延は日本のみならず世界的に問題となっているが、その背景として ESC の適用外使用が疑われている (Dutil et al., *Emerg Infect Dis*, 16:48-54, 2010)。我々の解析でも異なる鶏群由来株で同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合は認められた。これは鶏群間に共通する汚染源が存在することを示唆しており、ブロイラー農場の上流に位置する孵化場などで ESC の適用外使用が行われていることを示唆する成績かも知れない。

異なる ST 間で同じ RFLP パターンを示す株が認められたことは、ST 間でプラスミドの伝達が起こっていることを示唆する成績と考えられた。また、ブロイラー由来大腸菌が保有する ESCP が異種細菌に接合伝達し得ることが示されたことは、ESC 耐性の伝播にプラスミドが重要な役割を果たすことを示唆している。

ブロイラー由来株とヒト由来株の比較では合計 39 の ST のうち、共通する ST が 3 つのみで、それらの菌株が保有する  $\beta$  ラクタマーゼ遺伝子は異なっていた。ブロイラーとヒトで定着できる大腸菌の遺伝子型は異なることを示唆する成績かも知れ

ない。一方、合計6つのβラクタマーゼ遺伝子型のうち、3つはブロイラー由来株とヒト由来株で共通していた。ヒト由来株にCMY-2 βラクタマーゼ保有菌が含まれないのは、分離法が異なるためと考えられるので、保有するβラクタマーゼ遺伝子型は類似性が高いと考えて良い。つまり、ブロイラーとヒトで定着する大腸菌の遺伝子型は異なるが、何らかの形で耐性遺伝子の交換は起こっている可能性が考えられた。

## 2. 国内で分離された4:i:-の解析

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

ESCに耐性を示し、同じ地域で分離されたブロイラー由来大腸菌とヒト由来大腸菌を比較したところ、大腸菌遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子型には共通性が認められた。ブロイラーとヒトで定着できる大腸菌は異なるが、プラスミド等を介した耐性遺伝子の伝播は起こっている可能性が考えられた。

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. Shahada F, Chuma T, Kosugi G, Kusumoto M, Iwata T, Akiba M. Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. *Poult Sci.* 92(6):1641-9, 2013.
2. Chuma T, Miyasako D, Dahshan H, Takayama T, Nakamoto Y, Shahada F, Akiba M, Okamoto K. Chronological Change of Resistance to  $\beta$ -Lactams in *Salmonella enterica* serovar Infantis Isolated from Broilers in Japan. *Front Microbiol.* 4:113, 2013.
3. 秋庭正人. 薬剤耐性遺伝子の伝播機構. 化学療法の領域. 29:1282-1291, 2013
4. 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.
5. Ido N, Iwabuchi K, Sato 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)

表 1. 大腸菌由来薬剤耐性プラスミドの伝達頻度

受容菌	供与プラスミド	
	pE0074	pE0080
	Incl1-ly 95 kb	InclK, B/O 80 kb
	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
<i>Salmonella</i> Typhimurium LT2	$3.2 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-8}$
<i>Salmonella</i> Infantis L-3701	$3.8 \times 10^{-8}$	$5.0 \times 10^{-7}$
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC8090	$1.3 \times 10^{-3}$	$8.0 \times 10^{-8}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC9997	$7.5 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-8}$
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	$4.6 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-5}$
<i>Escherichia coli</i> ATCC14763	$5.0 \times 10^{-9}$	$4.3 \times 10^{-10}$
<i>Escherichia coli</i> MC1061	$1.9 \times 10^{-3}$	$6.0 \times 10^{-7}$

表 2. 鹿児島大学より分与を受けた小児下痢便由来大腸菌 15 株の解析結果

番号	採材	MLST	O 抗原	H 抗原	ESBL	AggR
E570	2005	ST457	UT	NT	CTX-M-2	-
E571	2005	ST405	UT	NT	CTX-M-15	-
E572	2007	ST70	167	NT	CTX-M-2	-
E573	2007	ST457	UT	NT	CTX-M-2	-
E574	2008	ST3475	25	4	CTX-M-2	-
E575	2008	ST1148	168	NT	CTX-M-15	-
E576	2009	ST3026	169	NT	SHV-12	-
E577	2009	ST131	153	4	CTX-M-15	-
E578	2009	ST68	UT	NT	SHV-12	-
E579	2010	ST162	145	NT	SHV-12	-
E580	2010	ST131	63	UT	CTX-M-14	+
E581	2010	ST131	25	4	CTX-M-14	-
E582	2010	ST38	142	NT	CYX-M-14	-
E583	2010	ST297	86a	NT	CTX-M-14	-
E584	2010	ST38	127	NT	CTX-M-14	-

表 3. ブロイラーおよびヒト由来株における遺伝子型の分布

MLST	ブロイラー 由来	ヒト由来	MLST	ブロイラー 由来	ヒト由来
ST10	2		ST1079	1	
ST38	1	2	ST1101	1	
ST68	4	1	ST1140	1	
ST70		1	ST1148		1
ST115	2		ST1201	1	
ST117	3		ST1251	1	
ST131		3	ST1485	2	
ST156	1		ST2075	1	
ST162	1	1	ST2307	2	
ST226	1		ST2787	1	
ST297		1	ST2788	1	
ST359	3		ST2789	1	
ST366	2		ST2790	1	
ST371	1		ST2791	1	
ST373	1		ST2792	2	
ST405		1	ST2793	2	
ST457		2	ST2794	1	
ST602	1		ST3026		1
ST752	2		ST3475		1
ST949	1				

表 4. 遺伝子型が同じ株の耐性遺伝子

MLST	ブロイラー 由来	ヒト由来
ST38	CMY-2	CTX-M-14
ST68	CMY-2	SHV-12
ST162	CMY-2	SHV-12

表 5. ブロイラーおよびヒト由来株における  
ESC 耐性遺伝子の分布

耐性遺伝子	ブロイラー 由来	ヒト由来
CTX-M-2		4
CTX-M-14	3	5
CTX-M-15	3	3
SHV-2	1	
SHV-12	2	3
CMY-2	32	

表 6. サルモネラ 04:i:-の性状解析結果

株	由来	分離年	PCR 結果 <sup>a</sup>			94 kb P <sup>b</sup>	ファージ型 <sup>c</sup>	薬剤耐性 パターン <sup>d</sup>
			m-PCR	IS200	spvB			
H1-4	ヒト	2006	+	+	+	+	193	-
H5	ヒト	2007	+	+	-	-	193	ASSu
H6	ヒト	2008	+	+	+	+	RDNC-a	-
H7	ヒト	2003	+	+	+	+	193	-
H8	ヒト	2007	+	+	+	+	26	-
H9-11	ヒト	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
H12	ヒト	2004	+	+	-	-	RDNC-c	-
H13	ヒト	2007	+	+	-	-	193	SSuT
H14	ヒト	2002	+	+	+	+	UT	ASuT
C1	牛	2003	+	+	+	+	RDNC-a	-
C2	牛	2005	+	+	+	+	RDNC-a	-
C3-4	牛	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
C5-8	牛	2008	+	+	+	+	RDNC-a	-
C9-10	牛	2008	+	+	+	+	RDNC-a	A
C11	牛	2004	+	+	+	+	RDNC-a	-
C12	牛	2005	+	+	+	+	120	-
C13	牛	2005	+	+	+	+	RDNC-b	-
C14	牛	2008	+	+	-	-	UT	ASSuT
C15	牛	2007	+	+	+	+	RDNC	-
C16	牛	2010	+	+	+	+	RDNC-a	-
C17	牛	2010	+	+	+	+	RDNC-b	A
S1	豚	2008	+	+	-	-	UT	ASSuT
S2	豚	2009	+	+	-	-	UT	ASSu
S3	豚	2002	+	+	-	-	RDNC-d	SSu
S4	豚	2003	+	+	-	-	RDNC-d	SSuT
S5	豚	2008	+	+	-	-	193	SSuT
S6	豚	2009	+	+	+	+	27	ASSuT
K1	鶏	2001	+	+	+	+	RDNC-b	-
K2	鶏	2004	+	+	-	-	RDNC	-
K3	鶏	2005	+	+	-	-	RDNC-c	-
K4	鶏	2006	+	+	-	-	RDNC-c	-
K5	鶏	2010	+	+	+	+	RDNC	ASuT
B1	ペンギン	2009	+	+	+	+	RDNC	-
B2-3	カラス	2000	+	+	+	+	RDNC-e	-
B4	オウインコ	2005	+	+	+	+	RDNC-e	-
M1	豚肉	2005	+	+	+	+	RDNC-a	-
M2	豚肉	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
R1	河川水	2007	+	+	+	+	26	-
R2	河川水	2007	+	+	+	+	RDNC-a	ASu
R3	河川水	2007	+	+	+	+	26	-

<sup>a</sup>+, 増幅陽性; -, 増幅陰性; ND, 未実施

<sup>b</sup>P, プラスミド; +, 保有; -, 非保有

<sup>c</sup>RDNC, Reacted but did not conform (既知の溶菌パターンに該当せず); RDNC-a~e, 同じアルファベットの RDNC 株の中で同じ溶菌パターンであることを示す; UT, 型別不能; ND, 未実施

<sup>d</sup>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