

図 1. ブロイラー由来大腸菌 46 株の遺伝的系統と保有プラスミド

7 つの housekeeping 遺伝子の配列を結合した仮想配列から作成した系統樹の右に株名、遺伝子型 (ST)、ESC 耐性プラスミドのレプリコン型と薬剤耐性遺伝子、分離された鶏群を示した。太字は本研究で登録した新しい ST を示す。

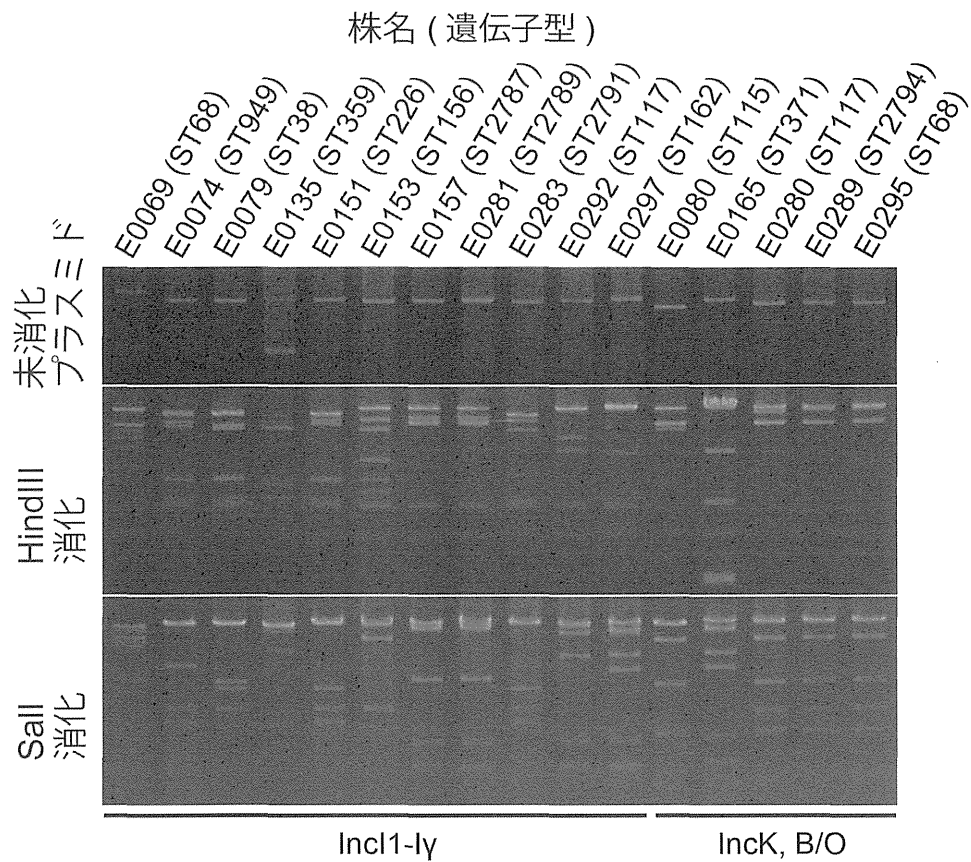


図2. プロイラー由来大腸菌プラスミドのRFLP解析結果

*bla<sub>CMY-2</sub>* 遺伝子を載せたプラスミドを保有する transconjugant または transformant からプラスミドを抽出し、HindIII または SalI で消化後、電気泳動像を比較した。

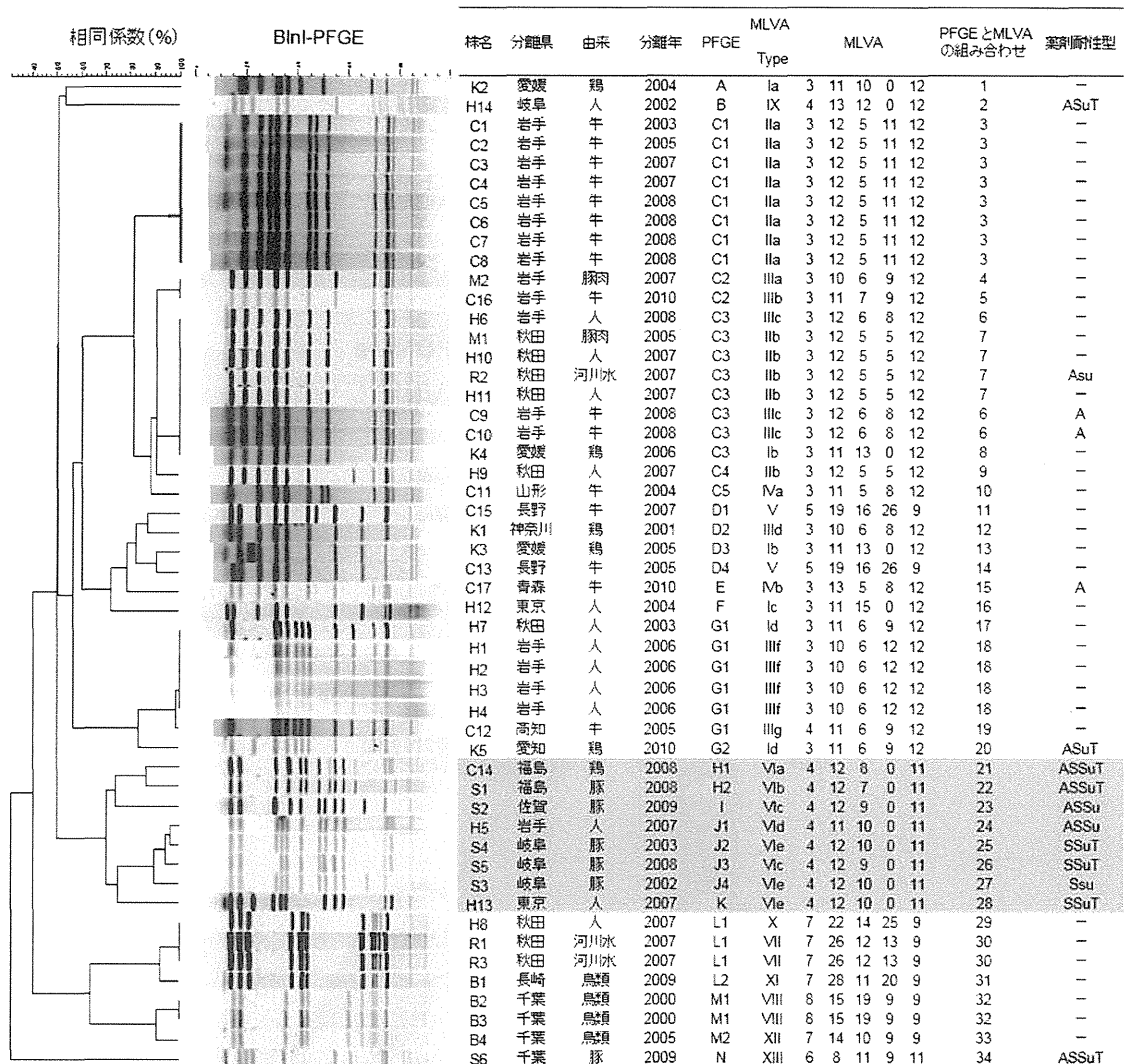


図3. 国内で分離された4:i:-株のPFGEとMLVAによる型別結果

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

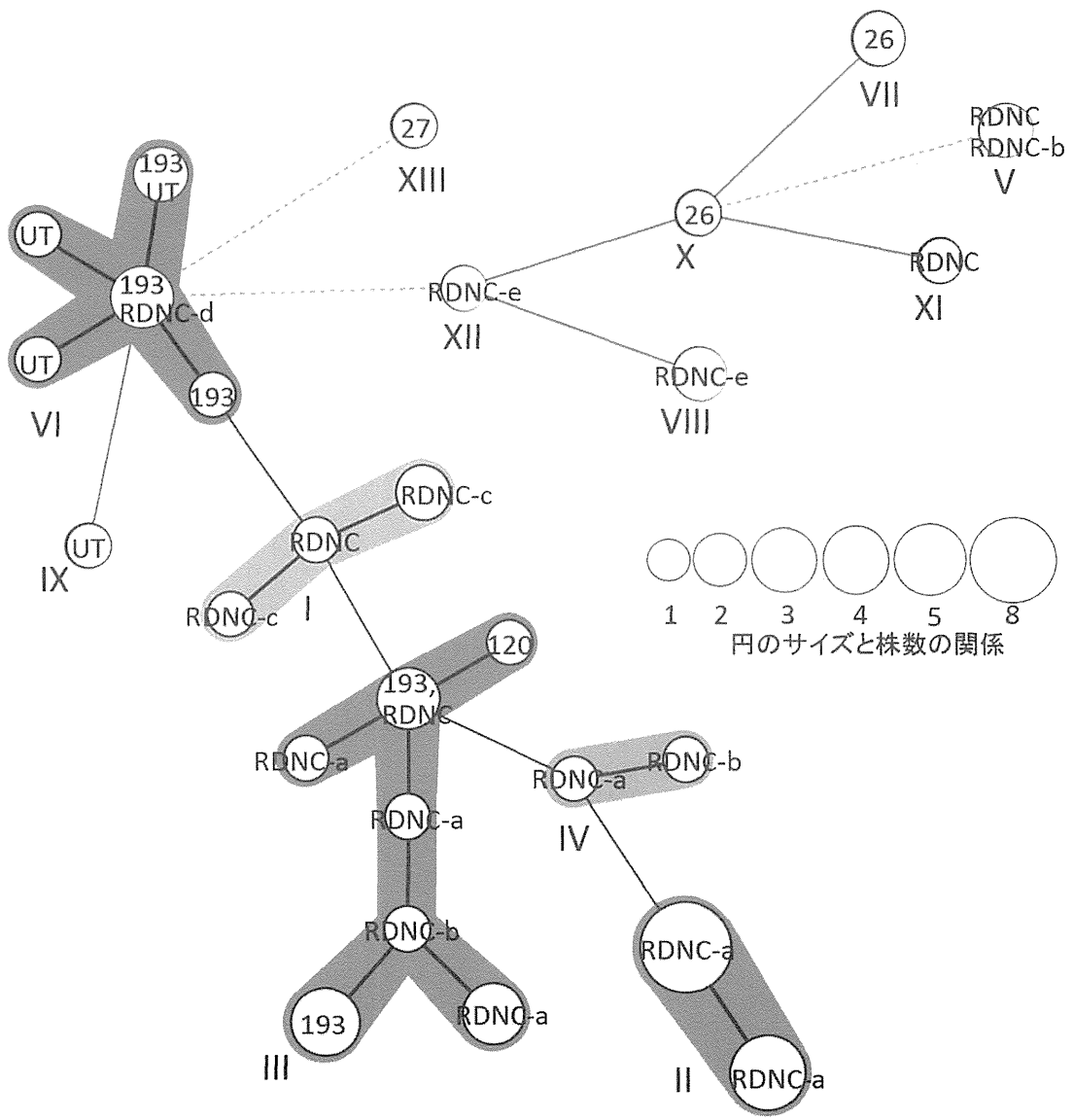


図 4. MLVA データから作成した Minimum-spanning tree

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」

平成 24-26 年度 総合分担研究報告書

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。

市販の鶏肉の大腸菌調査では、同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出された。そして ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。鶏肉から検出されるサルモネラの中で最も多い血清型 *Infantis* では、2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いている。しかし他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

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から第三世代セファロスポリン系抗菌剤に耐性の大腸菌やサルモネラ属菌の分離が報告されており公衆衛生上の問題となっている。特に家禽においては、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (ESBL)

またはプラスミド性 AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC) 産生株の増加が報告されており、ヒトの感染症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。

## B. 研究方法

### (1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌

2012年に国内産鶏肉55検体、2013年に国内産鶏肉 24 検体を検査した。大腸菌検出は、検体 25g を採取し Bufferd Peptone Water で増菌培養し、分離培養には 2012 年は市販培地の chromID ESBL のみを、2013 年は chromID ESBL およびセフォキシチン 20 $\mu$ g/mL 加 CHROMagar ECC の 2 種類の平板培地を使用した。

ESBL 産生は CLSI のディスク拡散法、AmpC 産生は 3-アミノフェニルボロン酸を用いたダブルディスクシナジー法で表現型を確認した (図 1)。その後 ESBL 産生菌は遺伝子のグループ型別 (CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、CTX-M-8/25、TEM、SHV) を行い、AmpC 産生菌はプラスミド性遺伝子 (ACC、CIT、DHA、EBC、FOX、MOX) の検出を行った。

### (2) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生サルモネラ

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、血清型の変化と、ESBL および AmpC の表現型について調べた。

検査方法は、検体 25g を採取し一次増菌培養には Bufferd 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。薬剤を添加した増菌培地および分離培地は使用しなかった。

確認培地でサルモネラの性状を示した株について血清型別と薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性試験は 1 検体につき 1 株、複数の血清型が同一検体から分離された場合は複数株を 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)、セフポドキシム (CPDX)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEM)、アミカシン (AMK)、スルフィソキサゾール (Su) の 16 剤を供試した。

ESBL および AmpC 産生サルモネラのスクリーニングにはセフポドキシムを用い、セフポドキシム耐性株について ESBL および AmpC 産生性を大腸菌と同じ方法で調べた。

### (3) 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。

### (4) 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。薬剤感受性試験は鶏肉由来サルモネラと同じ方法で行った。

### C. 研究結果と考察

#### (1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌

2012 年は 44 検体 (80.0%) から ESBL 産生大腸菌、2 検体 (3.6%) から AmpC 産生大腸菌が検出された。2013 年は ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が両方検出された検体が 22 検体 (91.7%) あり、ESBL のみ検出は 1 検体、AmpC のみ検出は 1 検体であった。また、ESBL 産生大腸菌はすべて chromID ESBL で検出され、AmpC 産生大腸菌はすべてセフォキシチン 20µg/mL 加 CHROMagar ECC で検出され、分離平板による差が明らかになった (表 1)。

2012 年の遺伝子のグループ型別は 46 株で行い、CTX-M-1 グループ 8 株、CTX-M-2 グループ 23 株、CTX-M-8/25 グループ 3 株、CTX-M-9 グループ 5 株、SHV 型 7 株であった。AmpC 産生大腸菌はいずれも CMY-2 であった (表 2)。

2013 年の遺伝子のグループ型別は、ESBL 産生大腸菌では CTX-M-1 グループ 7 株、CTX-M-2 グループ 30 株、CTX-M-8/25 グループ 14 株、CTX-M-9 グループ 25 株、SHV 型 22 株、TEM 型 5 株であった。同一検体由来株でも異なる型が検出され、12 検体で複数の型を検出した。一方、AmpC 産生大腸菌はいずれもプラスミド性の CIT 遺伝子保有であった (表 3)。

2012 年に国内の養鶏団体がセフォチオフルの使用に関して自主的に注意喚起を行ったことから、農場の鶏糞からの ESBL/AmpC 産生大腸菌の検出は 2012 年から減少している。しかし市販鶏肉ではその後もまだ高率に存在していること

が明らかになった。

#### (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、変化が認められている (図 2)。

薬剤感受性試験を実施した 700 株のうちセフポドキシム耐性は 127 株 (18.1%) あり、ESBL 産生菌が 34 株、AmpC 産生菌が 93 株であった。ESBL 産生 34 株の血清型は *S. Infantis* 24 株、*S. Manhattan* 7 株、そして *S. Schwarzengrund*、*S. Hadar*、*S. Typhimurium* が各 1 株であった。AmpC 産生菌ではさらに *S. Infantis* の占める割合が高く、93 株中 90 株が *S. Infantis* であった。他の血清型では *S. Manhattan* のセフポドキシム耐性 7 株が全て ESBL 産生であるなど、血清型による差が認められた (表 4)。

*S. Infantis* の ESBL および AmpC 産生菌の年次変化をみると、2009 年から AmpC 産生菌の急増が認められ、2013 年も 13 株中 6 株 (46.2%) が AmpC 産生であった (図 3)。

#### (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 7)。

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 4)。

#### (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 8)。

#### D. 結論

市販の鶏肉には ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。そして同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出される事も判明した。2012 年に国内の養鶏団体がセフトオフルの使用に関して自主的に注意喚起を行ったことから、農場の鶏糞からの ESBL/AmpC 産生大腸菌の検出は 2012 年から減少している。しかし市販鶏肉では 2013 年になっても高率に存在していることが明らかになった。

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の傾向が認められた。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。*S. Infantis* では 2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いているが、他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

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)

- 1) Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended - Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase - Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2012, 65: 555-557.
- 2) Harada T, Hirai Y, Itou T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an IS1203 variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 77: 176-178.
- 3) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66: 530-533.
- 4) 田口真澄：食品由来細菌の薬剤耐性の疫学化学療法の領域、29：48-54,2013.



- 5) 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)

(口頭発表)

- 1) 田口真澄、勢戸和子、河原隆二、原田哲也、久米田裕子：鶏肉の ESBL、衛生微生物技術協議会第 33 回研究会、2012 年 6 月、神奈川
- 2) 田口真澄：大阪府におけるカンピロバクター食中毒の動向および鶏肉からのカンピロバクター検出状況、第 5 回日本カンピロバクター研究会、2012 年 11 月、大阪
- 3) 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄：大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌出血性大腸菌感染症研究会、2013 年 7 月、つくば
- 4) 田口真澄、河原隆二、勢戸和子：市販鶏肉には AmpC 型  $\beta$ -lactamase 産生大腸菌と ESBL 産生大腸菌が同率に存在する、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月、東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

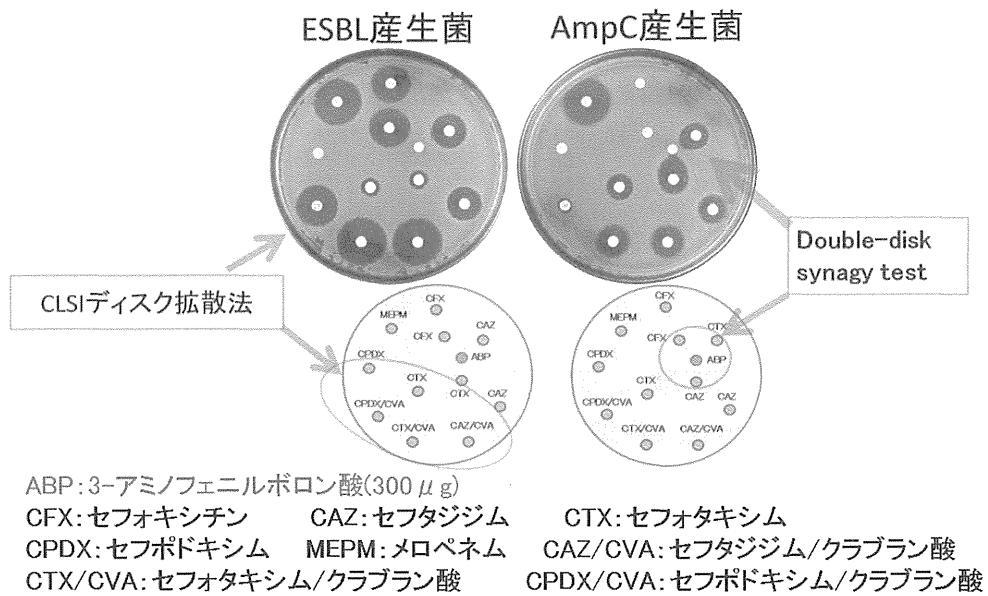


図1 ESBLおよびAmpC産生菌の検出方法

表1 国産鶏肉からのESBL/AmpC産生大腸菌検出

年	検体数	ESBL/AmpC 陽性検体	ESBL産生大腸菌検出		AmpC産生大腸菌検出	
			chromID ESBL agar	セフトキシチン加 CHROMagar ECC	chromID ESBL agar	セフトキシチン加 CHROMagar ECC
2012年	55	46 (83.6%)	44 (80.0%)		2 (3.6%)	
2013年	24	24 (100%)	23 (95.8%)	0	0	23 (95.8%)

表2 2012年のESBL/AmpC産生大腸菌型別成績

	型	菌株数	血清型(菌株数)
ESBL	CTX-M-1	3	O111:H4(2),O8:H19(1)
	CTX-M-14	5	O166:HUT(2),OUT(3)
	CTX-M-15	2	OUT(2)
	CTX-M-2	23	O166:H45(1),O15:H10(3),O111:HNM(4), O166:HUT(1),O157:HNM(1),OUT(13)
	CTX-M-25	3	O166:HUT(1),OT(2)
	CTX-M-55	3	OUT(3)
	SHV-12	7	O114:HNM(2),O18:H7(1),OUT(3)
AmpC	CMY-2	2	OUT(2)

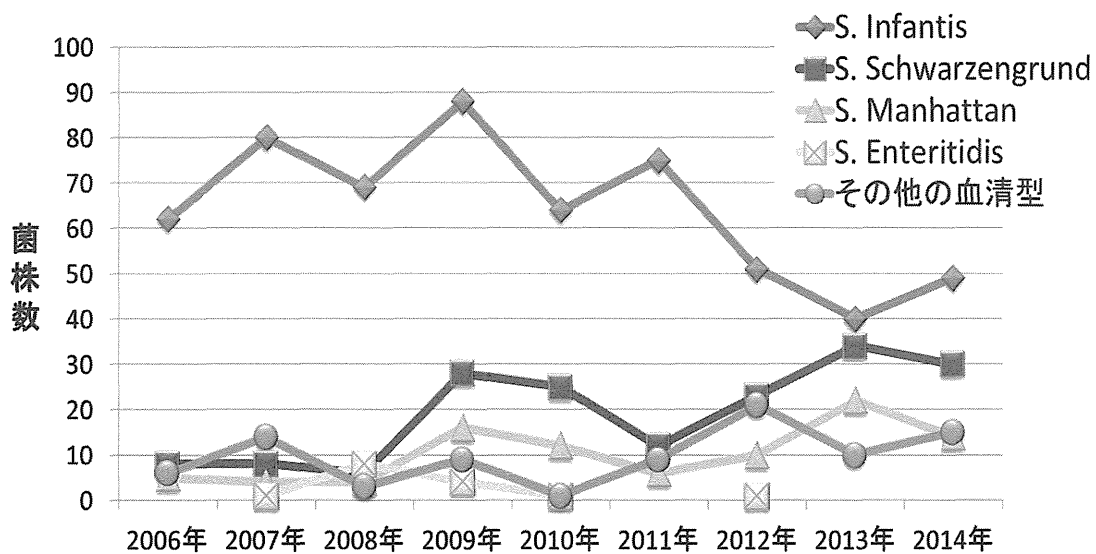


図2 大阪府内で入手した国産鶏肉由来サルモネラの血清型別検出数

表3 2013年のESBL/AmpC産生大腸菌遺伝子型別成績

検体 番号	販売 店	供試 株数	ESBL							AmpC		
			菌株数	CTX-M (グループ)				SHV	TEM	菌株数	CMY-2	CIT まで
				-1	-2	-9	-8/25					
1	Q	9	4		1			3		5	5	
2	Q	10	5	1				4		5	5	
3	R	10	5		2	3				5	5	
4	R	7	4	1	3					3	3	
5	R	4	2		2					2	2	
6	G	10	5		1		3	1		5	5	
7	G	10	5		4	1				5	5	
8	G	10	5	1		2	2			5	5	
9	S	1	0							1	1	
10	T	10	5		4	1				5	2	3
11	T	5	3		3					2	2	
12	U	7	5				5			2	2	
13	U	10	5		1		4			5	5	
14	U	9	5						5	4	4	
15	U	10	5		5					5	5	
16	V	6	1		1					5	5	
17	V	5	5			5				0		
18	V	10	5	2		3				5	5	
19	V	10	5	2		2		1		5	5	
20	W	10	5		3			2		5	5	
21	W	10	5					5		5	5	
22	X	9	5					5		4		4
23	Y	10	5			5				5	5	
24	Y	9	4			3		1		5	5	
合計		201	103	7	30	25	14	22	5	98	91	7

表4 サルモネラのセフトロキシン耐性株数

血清型	菌株数	セフトロキシン 耐性株		
		合計	ESBL	AmpC
<i>S. Infantis</i>	472	114	24	90
<i>S. Schwarzengrund</i>	109	1	1	
<i>S. Manhattan</i>	59	7	7	
<i>S. Hadar</i>	10	1	1	
<i>S. Typhimurium</i>	7	1	1	
<i>S. Heidelberg</i>	1	1		1
<i>S. (1) O7:HNM</i>	1	1		1
<i>S. Enteritidis</i>	15			
その他	26	1		1
合計	700	127	34	93

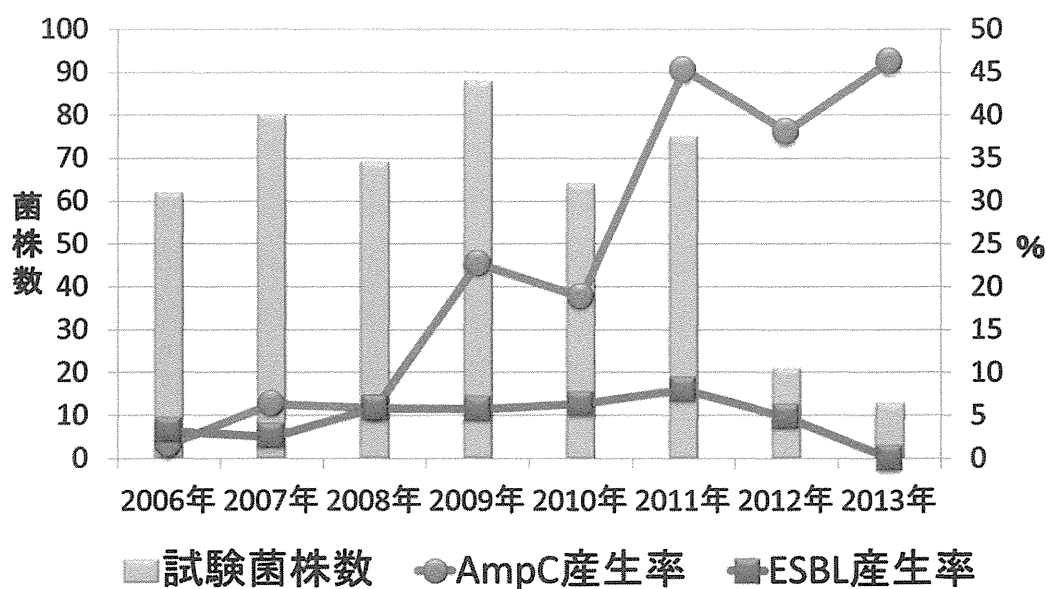


図3 *S. Infantis*のESBLおよびAmpC産生率の年次変化

表5 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
<i>C. jejuni</i>	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
	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
<i>C. coli</i>	NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	1		1	1	3	3
	NFLX,OFLX,CPFX,NA				1	1	3
	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6 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
<i>C. jejuni</i>	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
	<i>C. coli</i>	NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	3			3	6
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7 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</i> / <i>coli</i> 合計	56	218

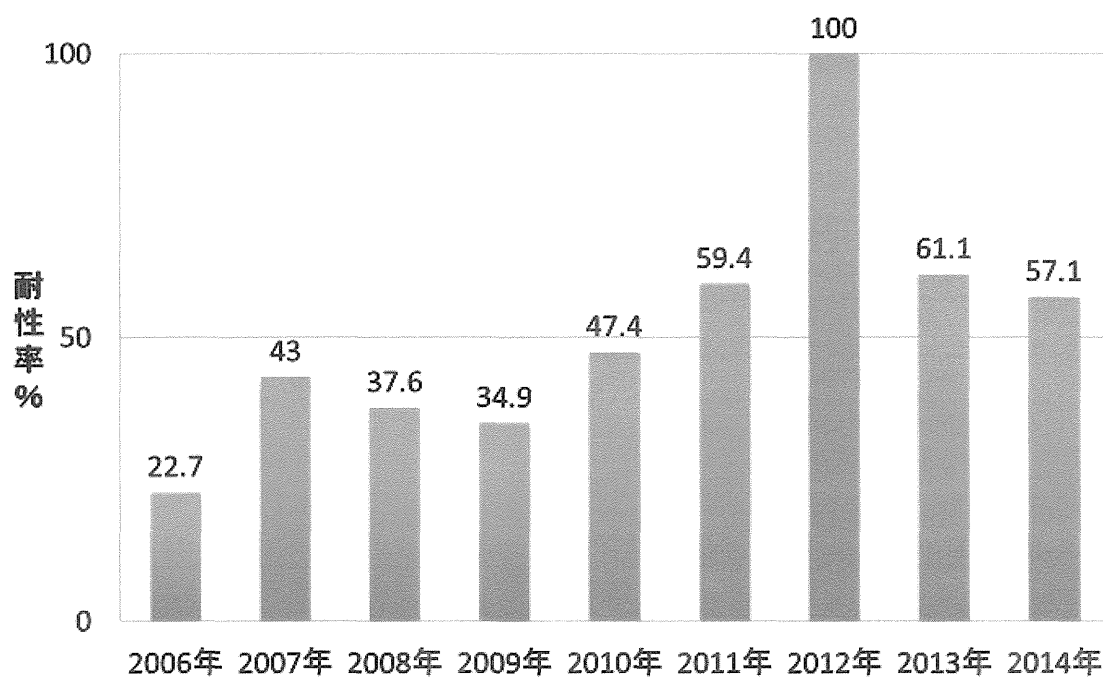


図4 散発下痢症由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率

表8 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	

## 分担研究報告書

分担課題名：伴侶動物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群獣医学類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群獣医学類食品衛生学ユニット

### 研究要旨

伴侶動物では人体用医薬品が汎用され、伴侶動物において出現した薬剤耐性菌がヒトへ伝播し、ヒトの健康へ影響することが懸念されている。しかし、日本における伴侶動物由来菌のヒトの健康への影響についての実態は明らかとなっていない。そこで今回、ネコ由来大腸菌の感受性調査、イヌ由来 *Clostridium difficile* の保有調査、イヌ由来大腸菌のプラスミド性高度アミノグリコシド耐性遺伝子保有調査、動物病院スタッフの MRSA 保有調査を行った。その結果、ネコはセファロスポリン耐性菌やフルオロキノロン耐性菌などを保有していること、イヌはヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となり得る *C. difficile* を保有しておりヒト由来株と相同性を示したこと、イヌ由来大腸菌の一部にはプラスミド性高度アミノグリコシド耐性を示す *rmtB* 遺伝子保有株が存在したこと、動物病院勤務の獣医師の 12% が MRSA を保菌していたことが明らかとなった。伴侶動物および伴侶動物に関わる獣医師が、ヒトの医療において重視される薬剤耐性菌を保有しており、伴侶動物とヒト間で伝播している危険性が示唆された。

#### A. 研究目的

近年、イヌやネコ等の伴侶動物はヒトと共通の場で生活し、ヒトとの接触頻度は極めて高い状況にある。一方、獣医学技術の進展や動物福祉への関心の高まりを背景として、伴侶動物に対してヒトと遜色のない獣医療が求められるよ

うになった。その結果、伴侶動物医療では人体用医薬品の使用が一般化しており、その使用に伴う薬剤耐性菌の出現が問題となっている。

しかし、伴侶動物及び伴侶動物に関わるヒトにおける薬剤耐性菌保有の実態については明らかになっていないことが多く、そのリスクを明



らかにするための研究が必要とされている。

そこで本研究では、イヌと比較して調査成績が少ないネコが保有する大腸菌の薬剤感受性調査、ヒト医療において抗菌薬関連下痢症の原因として問題となっている *Clostridium difficile* のイヌにおける保有状況及びヒト臨床由来株との比較、イヌ由来大腸菌のプラスミド性高度アミノグリコシド耐性株の実態調査、動物病院スタッフの MRSA 保菌調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

#### (1) 供試菌株

酪農学園大学附属動物病院および江別市内の8ヶ所の動物病院に来院したネコから直腸スワブを採取し、菌分離に供した。スワブは DHL 寒天培地に直接塗布し、37°C24 時間好気下で培養した。発育した赤色集落を純培養して菌株を得た後、生化学性状試験に基づいて大腸菌 (*Escherichia coli*) と同定し、以降の実験に供した。

#### (2) 薬剤感受性試験

アモキシシリン (ABPC)、セファレキシン (CEX)、セフトロキシム (CPDX)、カナマイシン (KM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、エンロフロキサシン (ERFX) の7薬剤について CLSI の方法に準拠した寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した

### (3) CPDX 耐性株の性状解析

CPDX 耐性であった株を対象に DNA を抽出し、PCR 法による  $\beta$  ラクタム耐性遺伝子の検索に供した。検出された遺伝子は塩基配列を解析することでその亜型を決定した。また、これらの株については染色体性 AmpC 過剰産生による  $\beta$  ラクタム耐性化の有無を調べるため、ampC プロモーター領域の塩基配列を解析し、点突然変異の有無を確認した

### (4) 病原性解析

CPDX 耐性株について、O 抗原血清型を血清凝集反応 (病原大腸菌免疫血清「生研」、デンカ生検株式会社) により決定した。また、PCR により系統発生分類を決定するとともに病原性遺伝子を検出した。

### 2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査及びヒト感染症由来株との比較

#### (1) 供試菌株

動物病院来院犬及びセラピー犬合計 204 頭の糞便からクロストリジウム選択培地 (CCMA-Ex 培地) により *C. difficile* を分離した。一方、ヒト由来 *C. difficile* は、東京都の2病院の患者から分離された73株を供試した。

#### (2) 薬剤感受性試験

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 (CLDM)、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(CPFX)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。

### (3) トキシン産生性

PCR 法によりトキシン A(*tcdA*), B(*tcdB*), 及びバイナリートキシン(*cdtA/B*)産生性について決定した。

### (5) 疫学解析

リボタイピングを実施し、イヌ由来株とヒト由来株でリボタイプが一致した株についてさらに PFGE 解析を行った。

## 3. 16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

### (1) 供試菌株

動物病院来院犬から分離されたイヌ由来大腸菌 212 株を供試した。

### (2) 薬剤感受性試験

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。また、16S-RMTase 陽性株については、微量液体希釈法により他の複数の種類の薬剤に対する感受性も決定した。

### (3) 16S-RMTase 遺伝子の検出

*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA* 遺

伝子の保有について PCR により検索した。

### (4) 接合伝達試験

16S-RMTase 陽性株について Broth-mating 法による接合伝達試験を行った。

## 4. 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

### (1) 供試菌株

3カ所の大学附属動物病院(酪農学園大学、岐阜大学、東京農工大学)の獣医師 50 名、動物看護師 15 名、事務職員 3 名の鼻腔スワブより MRSA を分離した。

### (2) 疫学解析

アンケート調査(性別、職業、診療時の衛生管理等 37 項目)を行い、MRSA 分離結果をもとにした統計解析を行った。

## C. 研究結果

### D. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

#### (1) 菌分離及び薬剤感受性試験

9ヶ所の動物病院(A~J)から 92 検体のネコ直腸スワブを採集し、うち 70 検体(76.1%)から大腸菌を分離した。分離菌株のうち 19 株(27.1%)が 1 剤以上の抗菌薬耐性を示し、測定した 7 剤すべてに耐性をもつ株も 1 株存在していた。ABPC および OTC に対する耐性株はそれぞれ全体の 21.4%, 15.7%とやや高い傾向を示したが、他の薬剤に対する耐性率はいずれも全体の 5~8%程度であった(表 1)。CPDX 耐

性株(6株、8.6%)やERFX耐性株(3株、4.3%)も確認された。また、施設ごとに耐性菌分離状況を比較した場合、検体数の多かった病院(A, B, H)で多種の耐性菌が検出される傾向にあるものの、その分離率には施設ごとの有意差は認められなかった。

## (2) CPDX耐性株の性状解析(表2)

第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるCPDXに耐性を示した6株について、保有するβラクタマーゼの検索を行なった(表2)。被検株のうち、セファロスポリン耐性に関わる因子としてESBLのCTX-M-14およびampC型βラクタマーゼのCMY-2保有株がそれぞれ1株ずつ(CFE5およびCFE3)確認された。また、うち2株(CFE7およびCFE9)については、ESBLやampC型βラクタマーゼは保有していなかったものの、染色体上のampCプロモーター領域の-32部分に変異(T to A)が生じていたことから、染色体性ampC過剰産生株であると考えられた。残り2株(CFE1およびCFE11)については、セファロスポリン耐性に関わる因子を特定することができなかった。

## (3) 菌株の病原性試験(表2)

0抗原型別の結果、上記6株はいずれも使用した抗血清と凝集反応を示さなかった。病原性遺伝子に基づく系統発生分類では、系統Aが1株、系統B1が1株、系統B2が3株、系統Dが1株であった(表2)。病原性遺伝子として、全株がアドヘジンをコードする*fimA*、*fimH*遺伝子を保有していたのに加え、系統B2

の3株(CFE7、CFE9、CFE11)は毒素をコードする*hly*、*cnf*遺伝子を保有していた。

## 2. イヌ由来*Clostridium difficile*保有調査及びヒト感染症由来株との比較

### (1) 菌分離とトキシン産生性

イヌ糞便204検体中62検体(30%)から68株が分離された。その内32株(47%)が*tcdA/tcdB*陽性で、36株が*tcdA/tcdB*陰性だった。CDT(*cdtA/cdtB*)を保有している株はなかった。

### (2) 薬剤感受性

イヌ由来株とヒト臨床由来株の薬剤感受性試験の結果を表3に示す。全てのイヌ由来株とヒト臨床由来株はVCM、MNZに感受性であった。TETに対しては、イヌ由来株及びヒト臨床由来株の両方で耐性割合が低かった。イヌ由来株の薬剤耐性割合はCTR及びEMで、ヒト臨床由来株の薬剤耐性割合よりも低い傾向を示した。

### (3) 疫学解析

リボタイピングの結果、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*tcdA/tcdB*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)。

### 3. 16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

#### (1) 薬剤感受性試験

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。

#### (2) 16S-RMTase 遺伝子保有状況

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 4)。*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 4)、*bla<sub>TEM-1</sub>* も保有していた。

#### (3) 16S-RMTase 保有株の性状

*rmtB* 遺伝子陽性株について、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。

### 4. 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

#### (1) MRSA の分離

MRSA は獣医師 50 名中 6 名 (12.0%) から分離された。内訳は、酪農学園大学附属動物

病院 5.6% (1/18)、東京農工大学附属動物病院 17.6% (3/17)、岐阜大学附属動物病院 13.3% (2/15) だった。動物看護師及び事務職員からは分離されなかった

#### (2) 疫学解析

MRSA は獣医師からのみ分離されたため、獣医師 50 名の MRSA 保菌のリスク因子の解析を行った。MRSA 保菌者の 2 週間の診療頭数 (平均 83.3 頭) は、陰性者 (平均 40.3 頭) よりも有意に多かった ( $p=0.049$ )。

### E. 考察

#### 1. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

CPDX 耐性や ERFX 耐性といった、抗菌活性の強い薬剤に対する耐性をもった大腸菌株が低率ながらも分離されたことから、ネコがこうした耐性菌を腸管細菌叢の一部として保菌していたことが確認された。

また、ABPC や OTC など古典的な抗菌薬に対する耐性株が比較的多かったことから、こうした抗菌薬に対する耐性菌がネコにおいても広く拡散していることが示された。一方で、全ての抗菌薬の耐性割合がイヌ分離菌株の約半分であった。このことは、イヌとネコにおける薬剤の使用状況または、ネコ分離菌株の特徴であることが考えられた。

さらに、それぞれの動物病院の間では耐性菌分離率に有意差が認められなかったことから、本研究におけるネコの耐性菌保菌率は特定の動