

GPAT ORF finding: Sato... x

http://naruto/cgi-bin/gpat/showgeneFinding.cgi?ID=...

ORF finding result

Download predicted genes in [Nucleotide](#) / [Amino acid](#) sequence. Or as a [gene list](#).
 Picture Width: 1200 px. Bases for one line: 20000 bp [change](#)

scaffold1.1 length=37262 read depth: 74.07 to whole plasmid similarity

scaffold2.1 length=9124 read depth: 50.88 to whole plasmid similarity

scaffold3.1 length=8492 read depth: 79.50

gene=68. 2269-3048 length=780bp. aminoglycoside adenyltransferase

http://naruto/cgi-bin/gpat/showblasted.cgi?ID=201410201912401908&gene=68

GPAT result: ... x

naruto/cgi-bin/uhmin/showblasted.cgi?ID=...

BLAST result assembly v.s. ardb

Download BLAST result in [raw text](#) / [m8 table](#) / [modified m8 table](#)

gene 70|prodigal|516 aa|+2952|4499 length= 515 aa

CARD|putative recombinase. Encoded by gene sul1.p01. Orf513. ARO:1000001 process or component of antibiotic ...
 59% AF174129.3.gene8.p01 *Escherichia coli*

gene 71|prodigal|274 aa|+4593|5414 length= 273 aa

CARD|sul1** protein. Encoded by gene sul1**. ARO:1000001 process or component of antibiotic biology or ...
 88% AY458224.gene.p01 *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport*

ARDB|dihydropterolate synthase >g|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825_17 sul1 delta fusion protein fusion ...
 88% g|487652939|ref|WP_00174781.0.1| *Prateus mirabilis*

ARDB|dihydropterolate synthase >g|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825_17 sul1 delta fusion protein fusion ...
 88% g|487652939|ref|WP_00174781.0.1| *Prateus mirabilis*

ARDB|dihydropterolate synthase >g|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825_17 sul1 delta fusion protein

GPAT result: assembly v.s. plasmid (5)

Return to status
Inverse mode
Show All | Hide All

Download raw blast result or tabular format
go to plasmid view

scaffold1.1|size48513 length= 48513 bp. Average depth: 367.44 to ORF [Show this](#) [Hide this](#)

96.0%	JN883043	pSH11_166	165791	Salmonella enterica subsp. e
92.4%	AB277724	pP91-278	131520	Photobacterium damsela subsp.
92.4%	AB277723	pP99-018	150157	Photobacterium damsela sub
96.0%	F_621589	pe-HH	148106	Escherichia coli strain HH plasm
96.0%	F_621587	pAMD4528	158213	Salmonella enterica strain AM
96.0%	CP000604	pSN254	176473	Salmonella enterica subsp. enter
82.3%	JN687470	pMR0211	178277	Providencia stuartii plasmid pM
96.0%	HQ023862	pUMN-88	160573	Escherichia coli UMN-88 plas
92.7%	CP000603	pP1202	182913	Yersinia pestis biovar Orientalis
92.6%	JQ824049	pTC2	180184	Providencia stuartii plasmid pTC2
92.7%	CP006225	pKPH-53	105974	Klebsiella pneumoniae subsp. pn
96.0%	HQ023863	pAPEC1990_61	1161081	Escherichia coli strain Af
93.4%	JQ010984	pR55	170810	Klebsiella pneumoniae plasmid pR5
88.3%	JN157804	pNDM-KN	162746	Klebsiella pneumoniae strain K
95.5%	JK141473	pR148	165906	Aeromonas hydrophila plasmid pR1

GPAT result tabular for: x

Project:
Query: scaffold1.1|size48513, length = 48513
Subject: JN687470|pMR0211|178277|circular|, length = 178277
Annotation: Providencia stuartii plasmid pMR0211, complete sequence.

return to whole plasmid search

Identity	Hit Length	Mismatch	Gap	Query From	To	Subject From	To	E-value	Score
1.00	88	0	0	1	88	127317	127230	0.0	174.0
96	476	19	0	91	566	106535	108060	0.0	793.0
99	4891	2	0	7219	12109	158119	163009	0.0	9680.0
99	2811	2	0	12104	14914	162984	165794	0.0	5557.0
1.00	7563	0	0	16869	24431	165790	173352	0.0	14990.0
1.00	20	0	0	18116	18135	79462	79443	0.0	40.1
99	4931	1	0	24427	29357	173347	178277	0.0	9767.0
1.00	21	0	0	24843	24863	53920	53900	0.0	42.1
99	19156	2	0	29358	48513	1	19156	0.0	37960.0
1.00	19	0	0	35065	35063	86499	86481	0.0	38.2
1.00	19	0	0	45479	45497	83066	83068	0.0	38.2
1.00	64	0	0	48450	48513	21155	21092	0.0	127.0

>JN687470|pMR0211|178277|circular| Providencia stuartii plasmid pMR0211, complete sequence.
Length = 178277

naruto/cgi-bin/uhmin/showwholeblasted.cgi?ID=

GPAT result

http://naruto/cgi-bin/gpat/showincblast.cgi?ID=

BLAST result: assembly v.s. incdb

Return to status
Change database:
--- database ---

Download BLAST result in [raw text](#) / [m6 table](#) / [modified m6 table](#)

Detected Inc types: **N (scaffold2.1)**

scaffold2.1 length= 9124 nt

99% N_group,IncN

BLASTN 2.2.18 [Mar-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query= scaffold2.1 / [go to top](#)
(37,262 letters)

Database: PBRT-inc-seq_ver2.fa
25 sequences; 11,253 total letters

Searching.....done

**** No hits found ****

BLASTN 2.2.18 [Mar-02-2008]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Query= scaffold2.1 / [go to top](#)
(9124 letters)

Inc type	in silico PCR typing in GPAT	PBRT kit PCR-based replicon typing Carattoli A, Barbuti A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. <i>J Microbiol Methods</i> 2005;63:219-28.
A/C	0	0
B/O	0	0
FIA	0	0
FIB	0	0
FIB-M	0	0
FIC	0	0
FII	0	0
FIK	0	0
FIS	0	0
HI1	0	0
HI2	0	0
HIB-M	0	0
II	0	0
I2	X	0
K	0	0
L/M	0	0
N	0	0
P	0	0
R	0	0
T	0	0
U	0	0
W	0	0
X1	0	0
X2	0	0
Y	0	0

GPAT

http://naruto/cgi-bin/gpat/showincblast.cgi?ID=

List of

Accession	Source	Organism	Host	Date	Size (bp)	GC (%)	Gene	Gene length (bp)	Gene start	Gene end	Gene type	Gene name	Gene description	Gene function	Gene product	Gene status	Gene type	Gene name	Gene description	Gene function	Gene product	Gene status
...
...

図3 GPAT 実行結果画面。①パラメータ設定、進捗状況確認など。②de novo assembly 結果。③ORF 検索結果。④ORF の blast 検索結果。⑤、⑥既知の plasmid に対する同源性検索結果。⑦ Inc タイプの推定結果。⑧解析結果のリスト表示。

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」
平成 24-26 年度分担研究報告書

分担課題名：JANIS と JVARM の連携

分担研究者	柴山恵吾	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	鈴木里和	国立感染症研究所	細菌第二部
研究協力者	川西路子	動物医薬品検査所	検査第二部
研究協力者	比企基高	動物医薬品検査所	検査第二部
研究協力者	山根一和	川崎医科大学	公衆衛生学

研究要旨

この研究では厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS 事業)のデータベースを利用して、国内におけるリステリア感染症の罹患率の推定、及びサルモネラの薬剤耐性の実態について解析を行った。さらに、人と家畜由来の細菌の薬剤耐性を体系的に比較できるようにするため、農林水産省の食品媒介性病原体細菌の薬剤耐性モニタリング事業 (JVARM) において蓄積されたデータと JANIS 事業のデータとを比較可能な形式でデータベース化し集計を行った。日本におけるリステリアの罹患率は 1.06~1.57/100 万人で、4 年間の平均年間罹患率は 1.40/100 万人と算出された。罹患患者数の年齢分布は、65 歳以上の高齢者が 236 人 (77.6%) とその多くを占めていた。サルモネラに関しては、家畜や食肉から分離される株は第三世代セファロスポリン耐性が多いと報告されているが、人分離株で薬剤耐性で目立ったものとしてアンピシリンに対して耐性を示すものが約 7%程度あった。フォスホマイシンに対する耐性は約 1%から 2%程度だった。セフトキシム、セフトチジム等の第三世代セファロスポリンに対する耐性株は 1%未満と、家畜の分離菌の状況と乖離があることが分かった。人と家畜由来の薬剤耐性菌の状況をさらに JVARM と JANIS のデータから比較した。JVARM と JANIS では薬剤感受性を測定している抗菌薬の種類が異なるため、同系統の抗菌薬で代替した。JANIS データでは近年大腸菌のセファロスポリン、フルオロキノロンの耐性化が著しく増加しているが JVARM データではそのような傾向は認められなかった。テトラサイクリン系やクロラムフェニコールについては肉用鶏や豚で、過去 10 年間継続的に JANIS データよりも高い耐性率を示していたが、JANIS データ、JVARM データともに耐性率の明らかな上昇または低下の傾向は認められなかった。今後は JANIS と JVARM で、測定する薬剤を共通化して、より適切な比較データを出して行く予定である。

A. 研究目的

リステリア症は免疫力の低下している患者や高齢者、新生児で髄膜炎、敗血症などの重症感染症となることが多く、食品を介した *Listeria monocytogenes* 感染が原因となる。日本における近年の罹患率は明らかでない。また、サルモネラについては、家畜や食肉で分離される菌株で第三世代セファロスポリンを始めとして様々な薬剤に対して耐性を示す菌株が多く分離されている。人のサルモネラ感染症における薬剤耐性の実態については明らかでない

ので、これらについて、厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 検査部門のデータを用いて調査を行うこととした。また、我が国では、農林水産省が食品媒介性病原体細菌の薬剤耐性モニタリング事業 (JVARM) を 1999 年より開始している。一方、臨床分離株の薬剤耐性の調査として厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) 事業が 2000 年より開始されている。現在、これらの結果は独立した形で公表されているため、直接の比較を実施しにくい。そこで、JANIS 事業のシステムを

JVARMにも適用し、JANIS-JVARMのデータを経時的に比較可能とする体制を整備することとした。

B. 研究方法

リステリアの罹患率に関する解析には、2008~2011年にJANIS検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。本邦の全医療機関の病床数の算出には、厚生労働省医療施設調査の結果(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/79-1.html>)を用いた。罹患患者の定義は、血液または髄液から*L. monocytogenes*が分離された患者とし、各年で症例定義に合致する患者データを抽出し、分離された医療機関の病床規模別に、患者数を集計した。JANIS検査部門参加医療機関の病床規模群別罹患患者数を算出した割合で除した値を、国内の各病床規模群別推定罹患患者数とし、その合計を本邦における推定罹患患者数とした。

サルモネラに関しては、2001年から2011年にJANIS検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。菌種は、医療機関の自動検査機器で一般的に同定される*Salmonella arizonae*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella paratyphi* A、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*、に加え、*Salmonella* spp.として報告されるものを対象とした。抗菌薬は、OTC、NA、CEZ、KM、ABPC、STFX、CPFX、LVFX、MEPM、CTX、CTRX、CPDX-PR、AZT、CAZ、CMZ、ABPC+MCIPC、ABPC+MDIPC、PIPC、IPM/CS、AMK、FOMのデータを収集した。

JANISとJVARMとの連携については、肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌2003年~2013年分のJVARMデータをエクセル形式で受理し、JANIS-JVARM連携用データベースに格納して、JVARMとJANISにおける薬剤耐性率の年次推移を比較した。JANISとJVARMで共通した抗菌薬が無い場合は、同系統の抗菌薬を比較した。

倫理面への配慮

JANIS検査部門データは統計法32条に基づく申請を厚生労働省に行い、承認を受けた上で利用した。

C. 結果

リステリアに関しては、4年間の罹患患者合計は307例、病床規模に応じた補正を行

い算出された罹患率は1.06~1.57/100万人で、4年間の平均年間罹患率は1.40/100万人であった。2011年では、国内の患者数は200.9名と推定された。サルモネラでは、アンピシリンに対して耐性を示すものが約7%程度あった。 Fosfomicinに対する耐性は約1%から2%程度だった。セフトキシム、セフトチジム等の第三代セファロスポリンに対する耐性株は1%未満だった。これらは経年的に耐性率は変化していなかった。レボフロキサシンに耐性を示す株は、2010年までは1%未満だったが、2011年は2.0%だった。

JVARMから、肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌、計6798株のデータをJANIS-JVARM連携用データベースに格納した。菌株数は2008年以降増加していた。2003-2007年については毎年各畜種100株前後であったが、2008年以降は200株前後となっている。これらの株の薬剤感受性パターンをJANISと比較した。アンピシリンはペニシリン系抗菌薬であり、JANISでは2013年の耐性率が約50%であるが、2003年は約30%であり、過去10年間で明らかな増加傾向が認められている。一方、肉用鶏由来株は2013年の耐性率が約50%とJANIS同様高い耐性率を示しているが、10年前からすでに40%を超える耐性率を示しており、過去10年間にわたり高い耐性率を維持していたと思われる。セファゾリンとセフトチオフル/セフトキシムについては、JANISではいずれの抗菌薬も過去10年間に著明かつ継続的な耐性率の上昇を認めた。一方、肉用鶏由来株のセファゾリン耐性は、2011までは20%前後であったが、2012年に急落し、2013年は約5%まで低下している。同じく肉用鶏のセフトチオフル耐性とセフトキシム耐性も、同様の傾向を示しているが、2009年まではセフトチオフル、2010年以降はセフトキシムで測定されており、測定抗菌薬の切り替えと同じ2010年に耐性率が急落している。実際の耐性率の低下よりも抗菌薬の切り替えを反映していると考えられた。

フルオロキノロン耐性率については、JANISではセファロスポリン系同様、過去10年間に於いて耐性率が顕著に上昇しており、2003年には約10%であった耐性率が

2013年には30%を超えている。一方、JVARMデータではいずれの畜種においても過去10年間においてこのような耐性率の増加傾向は認めていない。

クロラムフェニコールは、ヒト臨床では使用は限定的であり、薬剤感受性試験実施数は少なく、2007年以降は公開情報での集計はしていない。JANISデータベース上の2013年の耐性率は約5%であり、10年間ほぼ変化ないと思われる。JVARMでは、豚由来株での耐性率が15-25%と高く、過去10年間同様の耐性率で推移していた。

テトラサイクリン/ミノサイクリンについては、ヒトでのミノサイクリン耐性率は10%以下であるのに対し、豚、肉用鶏由来株のテトラサイクリン耐性率は50%を超えていた。牛、採卵鶏由来株も20-30%のテトラサイクリン耐性率であった。

D. 考察

日本におけるリステリア症は、その症例の3/4以上が高齢者であり、かつその罹患率は年間1.00~1.60/100万人程度であると推定された。

サルモネラは、家畜や食肉から分離される株は第三世代セファロスポリン耐性が多いと報告されているが、患者からの分離株では1%未満と、状況が大きく異なった。少なくとも家畜で分離される耐性菌の状況は、そのまま人で分離される耐性菌の状況と相関するものではないことが明らかになった。

さらにJANISとJVARMの連携で詳細に解析した結果、人と家畜由来の菌株の耐性率は乖離があることが明らかになった。近年問題となっている大腸菌のセファロスポリン、フルオロキノロン系抗菌薬に対する継続的かつ著明な耐性化は、JANISヒト臨床分離株では明確に認められたが、JVARMのいずれの畜種由来株においても認められなかった。肉用鶏において2000年代後半にセファロスポリン系抗菌薬耐性が進行していたが、その後2010年代に入り、著明に低下していた。また、 β -ラクタム剤やフルオロキノロン系抗菌薬など、現在ヒトの臨床分野での使用頻度が高い抗菌薬については、JANISヒト臨床分離株の耐性率がJVARMの動物由来株よりも高かった。一方、クロラムフェニコールやテトラサイ

クリン系など、以前はヒト臨床においても使用されていたが、現在は使用頻度が低いと思われる抗菌薬については、JVARMの動物由来株の耐性率が高い傾向が見られた。

家畜の薬剤耐性菌が食品を介してヒトに広まっていったと仮定した場合、家畜由来株での耐性率が先行し、そのあとをヒト臨床分離株の耐性率が追う形での相関がみられることが想定される。しかし、今回の研究において、そのような相関を認めた抗菌薬耐性は無かった。もう一つの可能性は、家畜由来株の薬剤耐性菌がなんらかの契機にヒト臨床株に入り込み、ヒトでのみ急速に広まった可能性である。これについては、耐性遺伝子の種類など、分子疫学的アプローチが必要になる。

ヒト臨床株におけるセファロスポリン系抗菌薬の耐性は、これまでの研究によりCTX-M型基質拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生菌の蔓延によるものであると考えられている。さらに、フルオロキノロンに耐性を示すCTX-M型ESBL産生大腸菌O25-ST131という特定のクローンが世界的に流行し、大腸菌の多剤耐性化に寄与していることも知られている。一方、JVARMの肉用鶏における耐性率の増加と減少については、鶏ブロイラーにおけるセフトオフルの適用外使用と2012年以降のその自主的規制の影響が考えられた。さらに、家畜由来株ではヒト臨床株に比較し、CTX-M型ESBL産生菌の割合が低く、AmpC β -ラクタマーゼ産生菌の割合が多いことが知られている。さらに、フルオロキノロン耐性がJVARMデータでは増加していないことは、大腸菌O25-ST131が家畜由来大腸菌においてはヒト臨床株に比べ少ないことを示唆する。ヒト臨床株と家畜由来株では耐性機序が異なる可能性があり、これはJANISやJVARMで現在集計している耐性率のみでは把握できない。今後は、家畜由来株とヒト臨床株の耐性菌の相関関係を検討するうえでは、同時期に分離された大腸菌の耐性遺伝子や分離株のタイプング解析を行うことが必要と思われる。

本研究において、薬剤耐性率の比較を行う上で最も問題となったのは、JANISとJVARMにおける測定抗菌薬の違いであった。JANISデータは医療機関で測定されて

いる薬剤感受性データを収集している。医療機関において感受性試験が実施される抗菌薬は、臨床的な必要性により決まるため、研究目的での追加が不可能である。特に動物用抗菌薬の薬剤感受性試験については今後も比較不可能である。一方、JVARMでは実際に菌株を収集し、研究目的で薬剤感受性試験を実施しているため、追加等が可能である。今後は、比較対象とする抗菌薬を事前に調整する事により、より有用性の高い比較結果が得られると思われる。

家畜の薬剤耐性菌とヒト臨床株の薬剤耐性菌の相関を検討するうえでは、クロラムフェニコールやテトラサイクリンなど、過去 10 年にわたって、その耐性率が両者で大きな変化が見られない場合は、評価が難しい。その点では、大腸菌のセファロスポリン耐性やフルオロキノロン耐性は過去 10 年間でヒト臨床株の耐性率の上昇が顕著であり、解析対象としては得られる知見が多いと思われる。さらに、カルバペネム耐性大腸菌については、現在家畜由来株、ヒト臨床分離株ともに耐性率が極めて低いものの、ヒト臨床株において増加している可能性があり、その臨床的な重要性からも今後両者で注視していく必要がある。

E. 結論

JANIS と JVARM の連携用データベースを構築し、人と家畜由来の細菌の薬剤耐性を比較するシステムを構築した。過去 10 年間のみの比較では、動物由来株とヒト臨床分離株との耐性率推移に明らかな相関は認めなかったが、今後もシステムの改良を続けながら薬剤耐性の状況について監視を続ける必要がある。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた本邦におけるリストeria 症罹患率の推定. 山根 一和、鈴木里和 柴山恵吾 病原体微生物検出情報 (IASR) 33(9):247-8, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

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）
平成 24-26 年度 分担研究報告書

・ 食肉の多剤耐性菌（VRE, ESBL 生産菌など）の調査・研究

研究分担者 富田 治芳 （群馬大学大学院医学系研究科細菌学分野）
研究協力者 谷本 弘一 （群馬大学大学院医学系研究科薬剤耐性菌実験施設）

研究要旨.

環境（家畜、食肉）からヒトへの伝播・拡散が危惧される多剤耐性腸内細菌科菌（ESBL 生産菌、AmpC 生産菌）およびバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）について国内に流通する食肉検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。2011 年度と 2012 年度に収集した国内産食肉 271 検体（鶏肉 180、豚肉 91）、輸入食肉 358 検体（鶏肉 157、豚肉 201）の合計 629 検体を調査した結果、ESBL 生産菌は 57 検体陽性（9.1%）、AmpC 生産菌は 39 検体陽性（6.2%）であった。ESBL 生産菌は鶏肉から高頻度で検出され（国内産 20.0%、ブラジル産 21.5%）、AmpC 生産菌の検出率は国内産（9.2%）、輸入食肉（3.9%）であった。2013 年度に収集した国内産食肉（鶏肉）100 検体、輸入食肉（鶏肉）89 検体の合計 189 検体を調査した結果では、ESBL 生産菌は 102 検体陽性（54.0%）、AmpC 生産菌は 39 検体陽性（20.6%）であった。ESBL 生産菌は国内産鶏肉から高頻度で検出され（国内産 64.0%、輸入肉 42.7%）、AmpC 生産菌の検出率は国内産で 14.0%、輸入食肉で 28.1%と輸入肉の方が高かった。各耐性株の遺伝子型の解析から ESBL 生産菌は CTX-M 型が多く、国内産は CTX-M-1、輸入食肉は CTX-M-2, CTX-M-8/25 が主に分離された。食肉由来株の各遺伝子型の分離頻度は臨床分離 ESBL 生産株とは異なっていた。また AmpC 生産菌は CIT 型が主であった。これら食肉由来の多剤耐腸内細菌科菌種としては大腸菌が最も多く検出された。一方、VRE については、2012 年度収集検体のうち、ブラジル産鶏肉 2 検体とデンマーク産鶏肉 2 検体から VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出され、分離頻度はそれぞれ 2.6%、67%であった。また 2013 年度収集検体では、ブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE (*E. faecium*) を検出した（分離頻度 1.3%）。さらに新規 VanN 型 VRE を産地が異なる国内産（宮崎、群馬）鶏肉 2 検体から検出した。PFGE 解析と MLST 解析の結果、これら VanN 型 VRE 株は宿主遺伝子型が互いに同一であった。また 2008 年度と 2010 年度の調査において国内産（宮崎）鶏肉から分離された VanN 型 VRE 株とも宿主遺伝子型が類似することから、これらは全て同一の起源を持つと考えられた。

A. 研究目的（ポンチ絵）

1) 臨床では多剤耐性の腸内細菌科菌（大腸菌、肺炎桿菌など）が急激に増加している。特に抗菌薬として最も多く使用されている β -ラクタム剤に対して高度耐性を示す ESBL 生産菌、および AmpC 生産菌の増加が深刻な問題となっている。これら多剤耐性腸内細菌科菌は環境（家畜）から畜産物、特に食肉を介してヒトへ伝播、拡散する危険性が指摘されている。本研究では食肉のこれら多剤耐性腸内細菌科菌の調査・解析を行い、その関連性を科学的に明確にすることを目的とした。

2) 多剤耐性のバンコマイシン耐性腸球菌 VRE は欧米で院内感染症の主な起因菌として深刻な問題となっている。ヨーロッパにおいては過去の家畜への肥育目的の抗菌薬（アボパルシン）使用による環境中での VRE の増加とそのヒトへの伝播、拡散が指摘されている。幸い日本国内では VRE の分離頻度は欧米に比較的低いが、近年、増加中であり複数件のアウトブレイクが臨床報告されている。しかし国内ではこれまで VRE に関する耐性機構の解析、伝播・拡散機構の解明、分子疫学研究は十分に行われていない。本研究では環境（家畜、食肉）由来 VRE と臨床分離 VRE との関係性を明らかにする目的で、国内食

肉における VRE の調査と解析を行った。

B. 研究方法

食肉検体：国内産食肉は群馬県、宮崎県、鹿児島県の 3ヶ所で採取、収集した。国外産輸入食肉は各年度に国内検疫所で取り扱う輸入食肉（鶏肉および豚肉）を収集した。各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。2011 年度、2012 年度は鶏肉及び豚肉検体を収集し解析を行ったが、2013 年度は鶏肉検体のみを収集し解析に用いた（表 1、表 2）。尚、検体収集を依頼した協力施設の都合により検体の収集（採取）が各年度の終わり（毎年 2 月）であった。そのため送付された検体の処理、解析が次年度にまたがることとなり、本調査での最終的な結果報告は前年度検体収集分となっている。今回の平成 24-26 年度の報告では、平成 23~25 年度（2011~2013 年度）調査として、実際には 2012 年~2014 年の各 2 月に採取、収集された検体の解析結果を示す。そのため本文と図表中の各年は記載のない限り、各年度を表す。

検出方法：

1) ESBL 生産菌および AmpC 生産菌（腸内細菌科

菌)の検出 (図1)

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。食肉検体からの耐性菌の検出率の改善を目指し、2011年度、2012年度と2013年度とでは検出方法の最初のステップ(検体の前培養と選択培地の種類)を改変(改良)した。2011年度、および2012年度では、それぞれの検体をLB液体培地3mlで一夜培養し(前培養)、0.1mlをDHL寒天培地(ABPC 20 mg/L)に塗布した。一方、2013年度では検体をABPC添加(80mg/L)LB液体培地3mlで一夜培養し(前培養)、二種類の異なった抗菌薬(CAZ 1mg/LまたはCTX 1mg/L)を添加したDHL寒天培地にそれぞれ培養液を0.1ml塗布した。各選択平板上の発育コロニーを2個ずつ釣菌し、純培養後トクロム・オキシダーゼ試験陰性菌のみを選択した。CTX、CAZに対するMIC値2mg/L以上の株についてさらに二薬剤阻害実験を行った。ESBL生産確認のためにCTX、CAV、CAZディスク、AmpC生産確認のためにCTX、ボロン酸、CAZディスクをそれぞれ用いたディスク拡散法を行った。各々の耐性遺伝子型(ESBL; TEM, SHV, CTX-M, およびAmpC; MOX, CIT, DHA, ACC, EBM, FOX)の確認には各種特異的プライマーを用いたPCR法を用いた。本研究での検出方法のサマリーを図1に示す。

2) VREの検出 (図8)

培地; 腸球菌分離にはEnterococcosel Broth (BBL)、Bile esculin azide agar (Difco) およびBrain Heart Infusion agar (Difco) を使用。用いた薬剤; バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC)

腸球菌の分離; VRE検出のための選択的方法を用いた。検体のガーゼのふき取りサンプル、ミンチ肉片を、VCM6.0 mg/L加Enterococcosel Brothで48時間選択的増菌後、VCM12.5 mg/L加Bile esculin azide agar選択培地に塗布し、得られたコロニーをVCM6.0 mg/L加Brain Heart Infusion agar上で単集落分離を行うことにより選択した。ミンチ肉浸潤液0.1mlをVRE選択寒天培地に塗布した。選択用寒天平板の培養時間はすべて37°C、48時間培養。薬剤耐性検査は薬剤平板希釈法を用い、接種菌液は1夜液体培地培養後の菌を100倍希釈することにより用いた。VREの検出には*vanA*, *vanB*, *vanCI*, *vanC2/3*, *vanN*, 各種*ddl*の特異的プライマーを用いたマルチプレックスPCR法を用いた。必要に応じてDNAシーケンス解析(Big Dye primer法)、PFGE解析、MLST解析を行った。本研究での検出方法のサマリーを図8に示す。

倫理面への配慮 全ての臨床分離株は患者個人を同定できる情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

本研究では、2011年度と2012年度収集の検体と2013年度収集の検体では、食肉の種類および検出方

法(上記の初期ステップ)が異なっているために、調査(検出)結果を以下別々に示す(各図表)。

1) 今回のESBL生産菌およびAmpC生産菌の調査・検出のために収集し、解析に用いた検体の内訳を表1(国内産食肉)および表2(輸入食肉)に示す。2011年、2012年度の二年間に収集(それぞれ2012年2月、2013年2月に採取)した国内産食肉は271検体(鶏肉180、豚肉91)、輸入食肉は358検体(鶏肉157、豚肉201)で合計629検体であった。また2013年度に収集(2014年2月に採取)した国内産鶏肉は100検体、輸入鶏肉は89検体で合計189検体であった。輸入量の関係から、主な国外産鶏肉はブラジル産であり(8~9割)、国外産豚肉検体は米国内産、デンマーク産、カナダ産が多くこれら3カ国で約8割を占めた。

2011年度、2012年度の食肉検体全体での検出頻度はESBL生産菌57検体陽性(9.1%)、AmpC生産菌39検体陽性(6.2%)であった。国内産食肉と輸入食肉との比較ではどちらの耐性菌も国内産食肉からの検出率の方が高かった(図2)。ESBL生産菌は鶏肉から高頻度で検出され(国内産20.0%、ブラジル産21.5%)、AmpC生産菌の検出率は国内産で9.2%、輸入食肉で3.9%だった。一方、2013年度収集の検体全体での検出頻度はESBL生産菌102検体陽性(54.0%)、AmpC生産菌39検体陽性(20.6%)であった。国内産食肉と輸入食肉との比較ではESBL生産菌は国内産鶏肉からの検出率の方が高く(64.0%)、一方AmpC生産菌は海外産鶏肉の方が高かった(28.1%)(図2)。

耐性遺伝子型の解析から2011年、2012年はESBL生産菌としてCTX-M型が多く(図3)、国内産はCTX-M-1、輸入食肉はCTX-M-2、CTX-M-8/25が主に分離された(図4)。2013年のESBL生産菌の由来検体種類の割合、検出方法は異なっていたが、各耐性遺伝子型の頻度の傾向は同様であった(図4)。これら食肉由来株の各耐性遺伝子型の分離割合は同時期(2012年)の国内での臨床分離ESBL生産株の遺伝子型とは異なっていた(図5)。

AmpC生産菌は国内外の食肉から2011年、2012年は5%、2013年は25%の頻度で検出され(図2)、鶏肉由来株は主にCIT型耐性遺伝子であった(図6)。一方、国外産食肉(鶏、豚)検体からは他にACC型、DHA型、EBC型など多様な型が検出された(図6)。

本調査で検出された多剤耐性腸内細菌科菌種としては2011年、2012年は*Escherichia. coli*が最多であり、次いで*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*が多く分離された(図7)。2013年は*Escherichia. coli*が最多(93%)であり、次いで*Ptoteus mirabilis*(2%)、*Enterobacter cloacae*(2%)が多く分離された(図7)。

2) 2012年度及び2013年度収集した食肉検体のVREの検出結果をそれぞれ、表3、表4に示す。

2012年はブラジル産鶏肉2検体、デンマーク産鶏肉2検体からそれぞれVanA型VRE株を検出した。それぞれの検出率は3%、67%であった。またこれらVanA型VREの菌種は全て*E. faecium*であった。国

内産食肉からは高度耐性を示す VRE 株は検出されなかった。

2013 年はブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE 株が分離され (検出率 1.3%)、菌種は *E. faecium* であった。一方、国内産鶏肉 2 検体から VanN 型 VRE 株が検出され (検出率 2.0%)、それらは全て *E. faecium* 株であった (表 4)。これらの 2 検体はそれぞれ国内の異なる検査所 (産地) から得られた鶏肉検体であった。

VanN 型 VRE は我々が 2011 年 3 月に収集した国内産鶏肉から分離し、世界で 2 例目として (環境中からは初めて) 報告した新型 VRE (*E. faecium* GU121-1 株) である (図 9)。我々は過去の VRE 調査において、2009 年 3 月に収集解析した食肉 8 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 合計 19 株を分離した (型別不明 VRE として以前保存していた株のレトロスペクティブな解析により新たに判明した)。それら 8 検体は全て国内産鶏肉 (宮崎県産) であった。19 株の VanN 型 VRE を PFGE 解析した結果、これらは 6 検体 14 株と 2 検体 5 株の全く異なる 2 つのパターンに分かれた (図 10)。6 検体 14 株の VRE は 2011 年に分離し報告した VanN 型 VRE 株 (*E. faecium* GU121-1) と同一の PFGE パターンを示したことから由来が同じクローンと考えられた。他の異なるパターンを示す 2 検体 5 株のうち代表株 (*E. faecium* AA-22) を 1 つ選び、宿主染色体遺伝子の MLST 解析を行った。その結果、この株は 2011 年分離の GU121-1 株の ST669 とは全く異なる新規の ST 型 (ST862) であった。この新規 ST862 は ST240 と *atpA* 遺伝子配列が 1 塩基異なるのみの *E. faecium* 株でこれらは極めて近縁の遺伝子型を持つことが明らかとなった (表 5)。この ST240 は世界で初めて分離された VanN 型 VRE (*E. faecium* UCN71) 株である (図 9、表 5)。ST240 と ST862 は ST669 同様、ヒトや家畜において拡がっている主なクローン株とは異なる別の遺伝子型 *E. faecium* 株であった (図 12)。

今回の調査で 2013 年度に国産鶏肉 2 検体から分離された VanN 型 VRE 株について PFGE 解析を行ったところ、先に報告した VanN 型 VRE 株 *E. faecium* GU121-1 と極めて類似の PFGE パターンを示した (図 11)。また MLST 解析を行ったところ、これらは全て ST669 に分類された (表 5)。

D. 考察

2011 年、2012 年の調査では食肉検体から ESBL 生産、および AmpC 生産各種腸内細菌科菌を検出した。しかし、検出頻度は他の報告とは異なり (時には 80% 以上の検出率)、それぞれ全体で 10% 程度と高くなかった。その原因としていくつかの理由が考えられた。他の報告の多くは食肉小売店から購入し収集した検体を用いた調査であった。そのため小売店での食肉加工中に環境菌や他の汚染された食肉の耐性菌が処理器具 (まな板や包丁) を介し、本来は汚染されていない食肉に付着したために、著しく高い陽性率となった可能性は否定できない。今回私達が

収集した検体は小売店に流通する以前の段階の食肉であった。それらの違いによって見かけ上、検出頻度に大きな差を認めた可能性が考えられた。一方で食肉検体からの検出方法の感度が低かった可能性も考えられた。食肉検体に目的以外の他の菌の付着が多い場合、あるいは検出菌の付着が極めて少ない場合、増菌処理後であっても目的とする菌が検出限界以下になることが考えられる。また食肉収集の過程で凍結溶解が繰り返されるため、また検体収集から検査までの時間経過中に付着菌の大部分が死滅減少してしまっただけでも予想される。2013 年度には検出率の改善を目指し、検出方法を改変した。最初に検体を ABPC 添加液体培地によって前培養を行い、その培養液を低濃度の CAZ あるいは CTX 添加寒天平板培地へ塗布する操作とした。この改良によって大幅に検出限界値が高められ、耐性菌の検出率が高くなったものと考えられる。本調査研究では、一部の検査所から得られた検体からの耐性菌の検出率が他地域と比べ、著しく低いことが認められた。検出方法を変更した 2013 年度の某国内施設からの検体では ESBL 生産菌の検出率は 100% (30 検体中 30 検体陽性) であったのに対し、別の施設からは 0% (30 検体全てが陰性) であった。その施設から送付された検体試料のほとんどが乾燥に近い状態であることなど検体の採取方法や送付方法などに手技的な問題もあることが示された。今後、より正確な調査のために各施設での検体採取方法の改善指導が必要であろう。

食肉由来株とヒト由来株 (臨床分離株) とでは ESBL 生産株の CTX 型遺伝子の種類とその頻度が異なっていた。これらの結果は一見、家畜環境の耐性菌と臨床の耐性菌とは直接的な関連性が低いことを示している。一方、検出された ESBL 遺伝子型、AmpC 遺伝子型の多くがプラスミド性であるとされることから、伝達性プラスミドを介した腸内細菌科細菌間での耐性遺伝子の伝達による耐性菌の伝播、拡散が生じていることを否定はできない。特に CTX-M1 型耐性遺伝子は食肉由来株でも臨床分離株においても 20%~30% の頻度で分離されている。今後は、これらの共通する特定の耐性遺伝子に着目した、宿主遺伝子型の比較解析、さらには耐性プラスミドの詳細な解析を進める必要がある。

食肉由来の VRE の調査では、2012 年、2013 年と輸入食肉 (鶏肉) から VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出された。特にブラジル産鶏肉から頻度は低いものの継続的に VanA 型 VRE が検出されている。また 2012 年には検体数が少ないものの、デンマーク産鶏肉から高頻度 (3 検体中 2 検体) で VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出された。グリコペプチド系抗菌薬であるアボパルシンの家畜への投与は 2000 年頃に世界的に禁止されてから、すでに 10 年以上が経過している。ヨーロッパ、特にデンマークでは家畜へのグリコペプチド系抗菌薬使用による環境中での VRE の増加とその人への伝播・拡散の危険性が論議され、早くから使用禁止となり、その後も厳格に規制が行われてい