

平成 24～26 年度 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」
研究分担報告書

分担課題名 ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター	微生物部
研究協力者	小西 典子	東京都健康安全研究センター	微生物部
	下島優香子	東京都健康安全研究センター	微生物部
	西野由香里	東京都健康安全研究センター	微生物部
	井田 美樹	東京都健康安全研究センター	微生物部
	横山 敬子	東京都健康安全研究センター	微生物部
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター	微生物部

研究要旨： *C. jejuni* および *C. coli* のキノロン系薬剤に対する耐性率は、ヒト由来 *C. jejuni* で 2011 年には、53.7%、*C. coli* で 87.5%と年々上昇している。食中毒の原因食品として最も重視されている鶏肉から分離された株では、*C. jejuni* 42.4%、*C. coli* 62.5%、また牛肉臓肉由来 *C. jejuni* 54.0%で、ヒト由来株と同様に高い耐性率であった。さらに、ヒトおよび鶏肉のいずれの由来株も *C. coli* の方が高い耐性率であった。

サルモネラの耐性率は血清型ごとに異なっていた。すなわち血清型 *Infantis* や *Typhimurium* では耐性率が高い上に、多剤耐性菌も多い。一方、血清型 *Entititidis* の耐性率は比較して低く、単剤耐性株が多かった。サルモネラやカンピロバクター等の腸管系病原菌に薬剤耐性菌が増加しており、今後も十分な監視が必要である。

市販鶏肉から分離された VRE はヒト由来株ではとは異なり、TEIC に対して感受性を示す株が多い。その違いを解明するために、TEIC 感受性の鶏肉由来株について関連遺伝子の変異を調べた結果、その多くの株に *vanS* 遺伝子の変異が認められた。この変異が、ヒト由来株との相違に関係していることが示唆された。

A. 研究目的

近年医療現場では、臨床分離株におけるフルオロキノロン系薬剤耐性菌や ESBL 産生菌の分離が増加傾向にあり、問題となっている。特にサルモネラやカンピロバクター等の腸管系病原菌は、ヒトや家畜、生肉等の食材から分離される例が多く、耐性菌の広がりが懸念されて

いる。今後、更に耐性菌が増加し続けると、抗菌薬の選択肢が限られるなど、治療の問題が生じることになる。薬剤耐性菌拡大のメカニズムを解明し、これ以上の拡大を防ぐためには、ヒトおよび食品から分離される菌の薬剤耐性状況を的確に把握することが非常に重要である。そこで、食中毒起因菌として重要なカンピ

ロバクターおよびサルモネラについて、ヒトおよび食品由来株を対象に、薬剤耐性菌出現状況を比較検討した。

また、鶏肉から検出されたバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)とヒト由来VREを比較検討した。

B. 研究方法

1. カンピロバクターの耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2009年～2011年にヒト散発事例から分離された *C. jejuni* (2009年153株, 2010年141株, 2011年108株) および *C. coli* (2009年9株, 2010年8株, 2011年8株) を供試した。また、食品由来株として、牛内臓肉由来株 (*C. jejuni* 50株, *C. coli* 16株), 国産鶏肉由来株 (*C. jejuni* 236株, *C. coli* 11株), 輸入鶏肉由来株 (*C. jejuni* 19株, *C. coli* 13株) を供試した。

2) 薬剤感受性試験

シプロフロキサシン(CPFX), またはナリジクス酸(NA)についてKB法で実施した。

2. サルモネラ分離状況および薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2012年～2014年に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ305株および食品から分離された305を供試した。また2009年～2012年に分離されたESBL産生菌疑い株49株を供試した。

2) 薬剤感受性試験

アンピシリン(ABPC), セフトキシム(CTX), ゲンタマイシン(GM), カナマ

イシン(KM), ストレプトマイシン(SM), テトラサイクリン(TC), クロラムフェニコール(CP), ST合剤(ST), ナリジクス酸(NA), シプロフロキサシン(CPFX), ノルフロキサシン(NFLX), オフロキサシン(OFLX), スルフィソキサゾール(SIX), ホスホマイシン(FOM), アミカシン(AMK), イムペネム(IPM), メロペネム(MEPM)の17薬剤を供試し、米国臨床検査標準化委員会(CLSI)の方法に従い、センジディスク(BD)を用いたKB法で薬剤感受性を調べた。

CTXに対する阻止円が27mm以下の菌株はESBL産生菌を疑い、CTXおよびセフトジジム(CAZ)と各薬剤のクラブラン酸合剤に対する薬剤感受性試験をKB法で実施した。クラブラン酸合剤で5mm以上阻止円が拡大したものをESBL産生菌と判定した。

3) ESBL産生菌の遺伝子型

ESBL産生菌については、八木ら(FEMS Microbiol.Lett., 18,53,2000)およびShibataら(J.Clin.Microbiol., 50,791,2006)のプライマーを用いたPCR法で遺伝子型を調べた。

3. VRE検出状況

1) 供試菌株

1999年から2012年に東京都内で流通した鶏肉から分離されたVanA型VRE24株を供試した。分離された鶏肉の原産国は、日本(2株), ブラジル(8株), タイ(8株), インドネシア(3株), フランス(2株), マレーシア(1株)である。

2) MICの測定

バンコマイシン (VCM) およびテイコプラニン (TEIC) に対する最少発育阻止濃度の測定は, Etest を用いて行った。

3) VanA 型耐性遺伝子の解析

VanA 型耐性遺伝子が存在するプラスミド上のトランスポゾン Tn1546 の塩基置換や挿入配列の有無について調べた。すなわち, *vanA* および *vanA* の調節遺伝子である *vanS* の 5' 端側の約 250bp について塩基配列を調べ, 遺伝子変異の有無を確認した。

C. 研究結果

1. カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

各分離株の CPFIX 耐性菌出現状況を図 1 に示した。ヒト由来 *C. jejuni* の耐性率は, 2009 年が 33.3%, 2010 年 46.1%, 2011 年 53.7% と年々上昇傾向であった。牛肉臓肉由来株の耐性率は 54%, 鶏肉由来では 42.4% と, ヒト由来株とほぼ同程度であった。一方, ヒト由来 *C. coli* 株の耐性率は, いずれの年も *C. jejuni* よりも高く 2009 年が 77.8%, 2010 年 62.5%, 2011 年 87.5% であった。牛肉臓肉由来 *C. coli* の耐性率は *C. jejuni* よりも低く 12.5% であったが, 鶏肉由来株では 62.5% と高い値であった。

2. サルモネラ分離状況および耐性菌出現状況

1) サルモネラの検出状況

2012 年~2014 年に東京都内でヒトから分離されたサルモネラは 305 株で, 51 血清型に分類された (表 1)。最も多く分離された血清型は O9 群 Enteritidis で

59 株 (19.3%), 次いで O7 群 Infantis が 40 株 (13.1%), O4 群 Typhimurium 32 株 (10.5%) であった。

一方, 食品から分離された 305 株は 26 血清型に分類され, O7 群 Infantis が 141 株 (46.2%) と最も多かった (表 2)。次いで O4 群 Schwarzengrund が 40 株 (13.1%), O4 群 Agona および OUT r:1,5 が各 24 株 (7.9%) であった。

2) サルモネラの薬剤耐性菌出現状況

ヒトおよび食品から多く検出された血清型 Infantis, Typhimurium および Enteritidis について, 由来ごとに比較した。

血清型 Infantis のヒト由来株の耐性率は 65.6% で, 2~6 薬剤耐性が認められた (表 3)。最も多かったのは 3 薬剤耐性 (9 株), 次いで 4 薬剤 (6 株), 5 薬剤 (4 株) であった。食品由来株の耐性率は 89.2% で, 1~8 薬剤耐性が認められた。多いのは, 4 薬剤 (27 株), 3 薬剤 (19 株), 5 薬剤 (18 株) 耐性株であった。8 薬剤耐性株は 2012 年に分離された鶏肉由来株で, ABPC, KM, SM, TC, NA, ST, CP, Su 耐性であった。

血清型 Typhimurium の内, ヒト由来株の耐性率は 66.7%, 1~10 薬剤耐性であった (表 4)。一方, 食品由来株の耐性率は 75% で, 1~3 薬剤および 5 薬剤耐性であった。2012 年にはヒト由来株の方が食品由来株より多く多剤耐性化が認められた。ヒト由来の 10 薬剤耐性株は, ABPC, SM, TC, NA, ST, CP, Su, CPFIX, OFLX, NFLX に耐性であった。

血清型 Enteritidis の薬剤耐性株は, ヒト由来株 41 株中 20 株 (48.8%) で,

Infantis や Typhimurium に比べて低かった (表 5)。耐性株も全て 1 薬剤耐性で, NA 耐性 (11 株), SM 耐性 (8 株), TC 耐性 (1 株) であった。食品由来株も数は少ないが NA 耐性 (1 株) のみで耐性率 20% であった。

都内で分離されたサルモネラのうち ESBL 産生菌が疑われる株 49 株を対象にスクリーニング試験を行った結果, 9 株が ESBL 産生菌であることが判明した。ESBL 産生菌の遺伝子型を表 6 に示した。血清型 Manhattan は 5 株中 4 株が TEM 型, 1 株は CTX-M-2 group, 血清型 Infantis の 2 株および O4:i:- の 1 株は CTX-M-2 group, 血清型 Cerro の 1 株は CTX-M-1 group であった。

3. 鶏肉由来 VRE の特徴

1) 鶏肉由来 VRE の TEIC に対する MIC

供試した 24 株中 TEIC に対する MIC が $32 \mu\text{g/ml}$ 以上で, 耐性と判定した株は 2 株 (8.3%) のみであり, 残りの 22 株は, TEIC 感受性または判定保留であった。それらの株の TEIC に対する MIC は, $12 \sim 16 \mu\text{g/ml}$ が 2 株 (8.3%), $4 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ が 8 株 (33.3%), $< 4 \mu\text{g/ml}$ が 12 株 (50%) であった (表 7)。

2) トランスポゾン Tn1546 中の遺伝子変異

TEIC 感受性または判定保留であった 22 株について, *vanA* の調整遺伝子である *vanS* について塩基配列を決定し, 遺伝子変異の有無を調べた。その結果, 3 か所 (T148G, G160C, A207T) に変異を持つ株が 18 株, 1 か所 (G172A) 変異が 2 株, 変異なしが 2 株であった。*vanA*

遺伝子には全て変異は認められなかった (表 8)。一方, TEIC 耐性の VRE であるヒト由来の 4 株および鶏肉由来の 2 株に同様の変異は認められなかった。

D. 考察

C. jejuni および *C. coli* のキノロン系薬剤に対する耐性率は, ヒト由来 *C. jejuni* で 2011 年には, 53.7%, *C. coli* で 87.5% と年々上昇している。食中毒の原因食品として最も重視されている鶏肉から分離された株では, *C. jejuni* 42.4%, *C. coli* 62.5% であり, ヒト由来株と同様に高い耐性率であった。さらに, ヒトおよび鶏肉のいずれの由来株も *C. coli* の方が高い耐性率であった。牛内臓肉由来の耐性率は, *C. jejuni* (54.0%) であった。

2012~2014 年の 3 年間にヒトおよび食品から分離されたサルモネラは, 共に 305 株であった。サルモネラによる食中毒は 1989 年頃から血清型 Enteritidis による鶏卵を原因とする食中毒の多発により激増したが, 2000 年頃から減少している。しかし, 2012~2014 年の 3 年間ににおいても変わらず血清型 Enteritidis が多く分離されている。一方, 食品からは血清型 Infantis が多く分離され, 本血清型が全体の 46.2% を占めた。Infantis が検出された食品は, 全て生の鶏肉 (内臓肉を含む) であった。

多く検出された血清型 Infantis, Typhimurium および Enteritidis について耐性率を比較した。血清型 Infantis では, ヒト由来株 65.6%, 食品由来株 89.2% で, 3 薬剤, 4 薬剤, 5 薬剤耐性が多い傾

向であった。Typhimurium では、ヒト由来株 66.7%、食品由来株 75.0%であった。5 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌の割合は、ヒト由来株の方が高く、2012 年にはヒト由来株で 10 薬剤、8 薬剤耐性株が分離されている。血清型 Entiridis では、耐性率が他の 2 血清型株に比べて低く、ヒト由来株 48.8%、食品由来株 20.0%であった。また、単剤耐性菌のみであった。この様に血清型によって薬剤耐性は異なることが明らかとなった。その理由について明らかにすることは出来なかった。このように、腸管系病原菌に薬剤耐性菌が増加しており、今後も継続した十分な監視が必要である。

ヒト由来 VRE は作用機序が同じである TEIC に対しても耐性を示す。しかし、鶏肉由来株の VRE 24 株中 22 株が TEIC 感受性（あるいは判定保留）であり、多くのヒト由来 VRE とは異なっていた。VRE の耐性遺伝子は、プラスミッド上のトランスポゾン Tn1546 に存在するため、その遺伝子変異の有無を確認した。その結果、TEIC 感受性（あるいは判定保留）の 22 株中 18 株において *vanS* に 3 か所変異が認められた。このタイプは、依然からアジアで報告されている型であるが、今回はブラジル産鶏肉でも確認された。また、これまで報告されていた 3 か所変異以外とは異なる G172A に 1 か所変異を持つ株が 2 株認められた。この変異が TEIC の感受性に関与しているかは、今後の検討が必要と考えられた。更に今回調べた場所には変異が認められないが、TEIC に感受性の株が 2 株あった。これらの株についても、*vanS* 以外

の変異を調べる予定である。

E. 結論

C. jejuni および *C. coli* のキノロン系薬剤に対する耐性率は、ヒト由来 *C. jejuni* で 2011 年には、53.7%、*C. coli* で 87.5%と年々上昇している。食中毒の原因食品として最も重視されている鶏肉から分離された株では、*C. jejuni* 42.4%、*C. coli* 62.5%であり、ヒト由来株と同様に高い耐性率であった。さらに、ヒトおよび鶏肉のいずれの由来株も *C. coli* の方が高い耐性率であった。牛肉臓肉由来の耐性率は、*C. jejuni* (54.0%)であった。

サルモネラの耐性率は血清型ごとに異なっていた。すなわち血清型 Infantis や Typhimurium では耐性率が高い上に多剤耐性菌も多く、ヒト由来 Typhimurium で 10 薬剤耐性株も認められた。しかし、血清型 Entiridis では耐性率は比較して低く、単剤耐性株が多かった。

市販鶏肉から分離された VRE はヒト由来株とは異なり、TEIC に対して感受性を示す株が多い。その違いを解明するために、TEIC 感受性の鶏肉由来株について関連遺伝子の変異を調べた結果、その多くの株に *vanS* 遺伝子の変異が認められた。この変異が、ヒト由来株との相違に関係していることが示唆された。

F. 健康危機情報

サルモネラやカンピロバクター等の腸管系病原菌に薬剤耐性菌が増加しており、今後も十分な監視が必要である。

G. 研究発表

1. 西野由香里 ,井田美樹 ,下島優香子 ,猪股光司 ,石塚理恵 ,宮尾陽子 ,黒田寿美代 ,奥野ルミ ,石崎直人 ,貞升健志 ,甲斐明美 : 鶏肉由来バンコマイシン耐性腸球菌 (VanA 型) における Tn1546 の遺伝子解析 , 第 35 回日本食品微生物学会学術総会 , 2014 年 9 月 , 大阪 .
2. 横山敬子 : ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性状況の変遷 , 第 7 回日本カンピロバクター研究会 , 2014 年 12 月 , 東京 .
3. 西野由香里 ,井田美樹 ,下島優香子 ,猪股光司 ,高野智香 ,黒田寿美代 ,奥野ルミ ,仲真晶子 ,甲斐明美 : 東京都内で流通する食肉におけるバンコマイシン耐性腸球菌の検出状況 , 第 34 回日本食品微生物学会学術総会 , 2013 年 10 月 , 東京 .
4. 下島優香子 ,高野智香 ,猪股光司 ,井田美樹 ,西野由香里 ,黒田寿美代 ,石塚理恵 ,横山敬子 ,高橋正樹 ,仲真晶子 ,甲斐明美 : 牛レバー等内臓肉からのカンピロバクターおよび腸管出血性大腸菌検出状況 , 第 5 回日本カンピロバクター研究会 , 2012 年 11 月 , 大阪 .

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

I. 特許取得

無し