

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」
分担研究報告書(平成24-26年度)

食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネジメント

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

薬剤耐性獲得株が、食品や環境を通じてどのように人に伝播されるかは、薬剤耐性獲得細菌のリスクマネジメントに重要である。これまでの検討から、PFGE、薬剤耐性パターン、遺伝子型などを利用し、ヒトから臨床的に分離された細菌を分析することによって、その株がどのような動物や環境を通じて伝播されたかある程度推定できることが分かっている。本研究では食中毒菌として *Campylobacter jejuni*、常在的に存在する細菌として第三世代および第四世代セファロスポリン系薬剤耐性腸内細菌科細菌 (ESBL 産生菌) に注目して、主に遺伝子型に注目してその伝播経路の推定を試みることにした。

C. jejuni については、研究班の分担研究者や協力研究者から提供を受けた市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の遺伝子型別 (MLST) により、人への伝播ルートの推定を行った。*C. jejuni* は、急性胃腸炎発症までの潜伏期が比較的長く、大気中で菌が死滅しやすいことから、食中毒事例での原因食品からの分離は一般的に試みられていない。通常、患者からの分離と喫食食品の推定から食中毒とされている。今回は動物由来株、食品由来株、ヒト臨床由来株の遺伝子型別を比較することにより、ヒト臨床分離株はその由来動物が推定可能で、耐性株の伝播のあることが示された。

ESBL 産生菌については、近年ヒトからの分離が急増しており、一方では鶏肉からの分離が高いことが報告されている。食品を介した ESBL のヒトへの伝播に関する危害分析を行うことにした。ESBL 産生菌の食品、環境、並びにヒトから分離された報告について、和文誌及び英文誌について文献情報を収集し、どのような食品から ESBL が分離されているか、どのような動物やヒトから ESBL がどの程度検出されているかについてデータを整理し、ESBL の分布並びに食品を介した ESBL のヒトへの伝播に関する危害分析について考察を試みた。検証として、輸入鶏肉由来株とヒト由来株の ESBL 産生菌については、その相関について検証を試みた。日本の市場に出回る輸入鶏肉の 8~9 割はブラジル産であるが、その鶏肉から高頻度に検出される CTX-M-8 を産生する大腸菌が健常人の便からも検出された。それらの菌株間の関連性を明らかにするべく、次世代 DNA シークエンサー (NGS) を用いたゲノム解析を行なった。鶏肉およびヒト由来 CTX-M-8 産生大腸菌は互いに属するクローナルコンプレックス (CC) が異なり、共通した系統関係は確認されなかった。一方、CTX-M-8 遺伝子を有するプラスミドは約 90kbp、IncI1 グループおよび pMLST ST113 に属し、共通した特徴を有していた。このことから、鶏肉由来 CTX-M-8 産生大腸菌が有する当該プラスミドがヒト腸管内に元来定着している大腸菌に伝播した可能性が示唆された。

研究協力者

東邦大学医学部微生物・感染症学講座 石井良和、
ト部尚久、青木弘太郎

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 朝
倉宏、山本詩織

A. 研究目的

薬剤耐性獲得株が、食品や環境を通じてどのように人に伝播されるかは、薬剤耐性獲得細菌のリスクマネージメントに重要である。これまでの検討から、PFGE、薬剤耐性パターン、遺伝子型などを利用し、環境由来株、食品由来株、人から臨床的に分離された菌株を比較・分析することによって、その株がどのような動物や環境を通じて伝播されたかを推定できることを示してきた。食品を介した耐性菌の人への危害分析を行った。*C. jejuni* については、研究班の分担研究者や協力研究者から提供を受けた市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の遺伝子型別により検討し、市販鶏肉等を汚染している *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性の、鶏肉及び牛レバーを介してヒトへの伝播について検証した。

常在的に存在する細菌として第三世代および第四世代セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科細菌 (ESBL 産生菌) については、これまでの検討から *C. jejuni* のような食品を介したヒトへの伝播を確認することは容易でないことが示された。そこで網羅的な考察を行う為、ESBL の環境、食品及びヒトからの分離に関する文献情報を調べ、ESBL の食品を介したヒトへの伝播に関する危害分析を行った。

検証としては第三世代および第四世代セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科細菌 (ESBL 産生菌) が市中に拡散している。国産鶏肉も同様の耐性菌による汚染を受けているが、ヒトから分離される耐性菌との菌株レベルでの関連性を認めることはできなかった。2012 年に実施したサーベイランスで収集された菌株の中に、

CTX-M-8 産生菌株が含まれていた。CTX-M-8 産生菌株はブラジルやアルゼンチンなどの南米にその起源があると考えられている。南米以外で CTX-M-8 産生菌が分離されることは稀で、これまで南米以外から報告された症例は何れも南米への渡航歴を有していた。本邦では CTX-M-8 産生菌による感染症は報告されていない。日本国内で流通している輸入鶏肉の原産国の多くはブラジルであることから、ブラジル産の鶏肉が CTX-M-8 産生菌による汚染に関して調査・研究を実施した。

B. 研究方法

カンピロバクターは、生産現場の動物、市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の遺伝子型別 (PFGE、MLST など) と耐性獲得状況から伝播経路について考察した。

データベースを活用して、ESBL に関連する論文検索を行った。用いたデータベースは、和文誌については医中誌、英文誌は、PubMed を用いて、論文の絞り込みを行い、62 論文を採用し以後の検討に用いた。これらの論文に示されているデータを利用して、食品における ESBL 産生菌の陽性率、動物における ESBL 産生菌の陽性率、ヒトにおける ESBL 産生菌の陽性率をまとめた。

ブラジル産鶏肉を食肉販売店で購入し、その 25g を 25mL の LB 培地で一晩、35℃ にて振盪培養した。培養液はクロモアガー-ESBL 培地を用いて、第三世代および第四世代セファロスポリン系薬耐性大腸菌を選択した。

クロモアガー-ESBL 培地上に発育したコロニーは、Phoenix system (日本 BD) で菌種同定および薬剤感受性検査を行った。薬剤感受性検査成績から ESBL 産生が疑われた菌株は、PCR にて大まかに ESBL の遺伝子型別を行った。ESBL をコードする遺伝子が陽性となった菌株に対して、その構造遺伝子全長を PCR で増幅し、DNA 塩基配列を決定した。

鶏肉およびヒトから分離された CTX-M-8 産

生大腸菌 10 株（鶏肉由来：4 株，健康人由来：5 株および臨床材料由来：1 株）について、ゲノム DNA を抽出し、NGS MiSeq（イルミナ社）を用いてドラフトゲノム解読を実施した。ドラフトゲノム塩基配列より、Center for Genomic Epidemiology の Web ツール MLST1.7 を用いた（<http://www.genomicepidemiology.org/>）Multilocus se-quence typing（MLST）、ResFinder を用いた獲得性の薬剤耐性遺伝子網羅的検索、PlasmidFinder を用いた保有プラスミドのレプリコン遺伝子の検索、pMLST 1.3 を用いて Plasmid MLST を行なった。また、染色体とプラスミドを分離する目的で、菌体をアガロースゲルプラグに包埋、溶菌処理および S1-nuclease 処理をした後、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行ない（S1-PFGE）、そのバンドを全て切り出した。それらのバンドについてもゲノム DNA と同様に NGS で解読および解析を行なった。

倫理面への配慮

本研究課題は、東邦大学医学部倫理委員会において承認を受けている（課題番号：25028，課題名：メロペナム市販後調査で全国医療施設から収集された臨床分離株が保有する薬剤耐性の解析、課題番号：25050，課題名：微生物学実習における医学部 2 年次学生が保菌する薬剤耐性菌の分離検出、課題番号：26055，健康人が保菌する薬剤耐性菌の動向調査、課題番号：26056，課題名：健康人が保菌する ESBL 産生大腸菌の過去 21 年間の経年推移）。

C. 研究結果

C. jejuni の MRST 遺伝子型の検討では、日本の分離株が由来動物により遺伝子型に特徴があることが確認された。遺伝子型によって人、鶏、牛

のいずれからも分離されている cc（遺伝子型）、人と牛のみから分離されている cc、人と鶏のみから分離されている cc があることが明らかとなった。ヒト臨床分離株の遺伝子情報から cc を決定すると、cc によっては分離される動物が特定することが可能で、由来動物の推定がある程度可能である。それらの情報を基に、フルオロキノロン耐性の伝播について推定することが可能であった。

遺伝子型 cc を決定し、データベースと照会するとその cc が主にどの動物から分離されているかの情報を知ることができる。これらの情報から人由来臨床株が主にどのような動物由来であるかについて推定したところ、国内の人臨床分離株では、鶏肉 50%、牛（レバー生食等）10%、その他 10%、不明 30%であることが推定された。

今回用いた菌株の鶏肉と牛レバーの *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性の割合はそれぞれ 44%、13%で、ヒト臨床分離株は 33%であった。

データベースを活用して、ESBL に関連する論文検索を行い、62 論文を採用しそのデータを基に表を作成した。

表 1：食品における ESBL 産生菌の陽性率では、鶏肉からの ESBL 陽性率は最も高く、腸内細菌科菌群で 51%、*Escherichia coli* が、49%であった。以下牛肉では、腸内細菌科菌群で 5.2%、*E. coli* が、5.2%、豚肉では、腸内細菌科菌群で 4.7%、*E. coli* が、4.7%であった。その他の食品では、腸内細菌科菌群で 1.2%、*E. coli* が、3.4%であった。

表 2：動物における ESBL 産生菌の陽性率では、鶏からの ESBL 陽性率は最も高く、腸内細菌科菌群で 56%、*E. coli* が、56%であった。以下牛からは、腸内細菌科菌群で 25%、*E. coli* が、26%、豚からは、腸内細菌科菌群で 7.3%、*E. coli* が、7.3%であった。その他では、腸内細菌科菌群で 16%、*E. coli* が、15%であった。

表3：ヒトにおける ESBL 産生菌の陽性率を示した。健常者では、腸内細菌科菌群で 16%、*E. coli* が、14%、患者では、腸内細菌科菌群で 5.8%、*E. coli* が、9.8%、食品従事者では、腸内細菌科菌群で 8.4%、*E. coli* が、8.4%、農場従事者では、腸内細菌科菌群で 8.0%、*E. coli* が、9.7%であった。*Klebsiella* や、*Proteus* からの ESBL 産生菌の割合は、表3に示した。表4には、データベースとして用いた論文リストを示した。

ブラジル産鶏肉から同耐性大腸菌の分離を試みたところ、ESBL 産生株が高率に分離された。遺伝子型は、*bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{CTX-M-8} が検出され、検出率はそれぞれ 50%であった。*bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{CTX-M-8} 以外の ESBL 産生株は存在しなかった。

A. 鶏肉由来菌株の遺伝子型

トリ由来の菌株が属する Clonal Complex (CC, ある ST に属する菌株を共通の祖先とした時の集団) は CC10 が 2 株、CC648 が 1 株およびどの CC にも属さない(Singleton)が 1 株であった(図)。

薬剤耐性遺伝子は ESBL をコードする CTX-M-8 遺伝子、アミノグリコシド系薬耐性遺伝子 (*aadA1*, *aadA2*, *aph(3')*-Ic, *strA* および *strB*,)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet*)、スルホンアミド耐性遺伝子(*sul*)およびトリメトプリム耐性遺伝子 (*dfrA*) を保有していた(図)。

また、プラスミドレプリコンの Incompatibility (Inc, 不和合性) グループ Inc I1, FIA, FIB, FIC, FII, X および Q1 に属するプラスミドを有していた(図)。

S1-PFGE の切り出しバンドのシーケンスの結果、TUM12355 および 12368 においてそれぞれ約 100kbp および 90kbp のプラスミドで CTX-M-8 遺伝子が検出され、いずれも IncI1 に属し、後者については pMLST の ST113 に属するプラスミドであった(図)。

B. ヒト由来菌株の遺伝子型

ヒト由来菌株が属する CC は、CC69 が 1 株、CC88 が 1 株、CC127 が 1 株、CC131 が 1 株および Singleton が 2 株であった(図)。

薬剤耐性遺伝子は -ラクタマーゼをコードするペニシリナーゼをコードする TEM-1 遺伝子、ESBL をコードする CTX-M-8 遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、スルホンアミド耐性遺伝子、トリメトプリム耐性遺伝子およびフルオロキノロン系薬耐性遺伝子を保有していた(図)。

また、プラスミドレプリコンの Incompatibility (Inc, 不和合性) グループ Inc I1, FIA, FIB, FIC, FII, X, p0001 および Col に属するプラスミドを有していた(図)。

S1-PFGE の切り出しバンドのシーケンスの結果、TUM11352, 11353, 13058 および 13937 においてそれぞれ約 90kbp のプラスミドで CTX-M-8 遺伝子が検出され、いずれも IncI1 に属し、pMLST の ST113 に属するプラスミドであった(図)。

D. 考察

カンピロバクターの MRST 遺伝子型の検討では、由来動物により遺伝子型に特徴があることが確認された。遺伝子型によって人、鶏、牛のいずれからも分離されている cc (遺伝子型)、人と牛のみから分離されている cc、人と鶏のみから分離されている cc があることがある。人と牛のみから分離されている cc や、人と鶏のみから分離されている cc に型別されれば、それぞれ牛、鶏を食べることによりカンピロバクターが伝播されることが推定できる。カンピロバクター食中毒は潜伏期間が比較的長く、菌も大気中で死にやすく、食材が残されていないことが多いことから、食中毒事例では、厳密に原因食品を決定することはま

れである。MLST 型によれば、食品をある程度推定できる。このような手法で推定した人臨床株の推定食品は、鶏肉 50%、牛（レバー生食等）10%、その他 10%、不明 30%である。MLST 型では、複数の動物から分離されている遺伝子型もあるため、不明という結論が 30%程度である。

それぞれの分離株の由来別のフルオロキノロンに対する耐性率は、鶏分離株 44%、牛レバー分離株 13%、ヒト臨床分離株 33%であった。人臨床分離株のフルオロキノロン剤に対する耐性率が鶏分離株と牛レバー分離株の中間的な値であったことは、MLST 型別の結果を考慮すると矛盾の無い値であり、大変興味深い結果であると思われる。

食品を介してヒトに伝達される ESBL の可能性は、保有率の高い鶏で最も高く、鶏肉の約 50%から検出されており、菌種としては *E. coli* であった。次いで牛では、約 25%から ESBL 産生菌が分離されていたが、牛肉からは 5%と分離率はあまり高くなかった。その他の食用動物や食品からの ESBL 産生菌の分離率は低かった。ESBL 産生菌のヒトへの伝搬の可能性は、鶏肉が最も重要であることが示された。

本邦において CTX-M-8 産生大腸菌が海外渡航歴のない患者および鶏肉から分離された。これまでの報告を鑑みるに、本邦の患者由来 CTX-M-8 産生大腸菌あるいはその遺伝子が鶏肉を汚染している CTX-M-8 産生大腸菌に由来することが示唆された。来年度以降、ヒトおよび鶏肉由来大腸菌および *bla*_{CTX-M-8} をコードする遺伝子の周辺領域を詳細に比較し、ヒト由来大腸菌から検出された *bla*_{CTX-M-8} の起源を明らかにすることを目的に研究を実施した。

鶏肉およびヒト由来 CTX-M-8 産生大腸菌は MLST の結果、互いに関連のない CC に属する菌株であったことが明らかとなった。

鶏肉由来株はヒト由来株と比較して、他系統の抗菌薬耐性遺伝子を有しており、ブラジル産肉鶏（ブロイラー）への抗菌薬投与の影響で選択された可能性が示唆された。

S1-PFGE で染色体とプラスミドを分離し、各プラスミドについてのみ深くシーケンスすることで、一部の菌株において、鶏肉およびヒト由来大腸菌が宿す、CTX-M-8 遺伝子を有するプラスミドは約 90kbp、IncI1 グループおよび pMLST ST113 に属するプラスミドであることが明らかとなった。プラスミドの宿主である大腸菌は属する CC が異なっていたが、CTX-M-8 遺伝子を有するプラスミドは共通した特徴を有することから、食肉由来の大腸菌が直接ヒト腸管内に保菌されたのではなく、元来ヒトに定着していた大腸菌にプラスミドが受け渡された可能性が示唆された。

E. 結論

カンピロバクターの市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の MLST 遺伝子型別により検討した結果、人臨床株の推定食品は、鶏肉 50%、牛（レバー生食等）10%、その他 10%、不明 30%と推定することができた。この結果を基に分離株のフルオロキノロンに対する耐性率を由来別に比較すると、人臨床分離株の耐性獲得率が、鶏分離株と牛分離株の耐性率の中間となることが理解できる。

論文検索により、ESBL 産生菌に関する 62 論文を特定し、データを集計した結果、鶏の ESBL 産生大腸菌が、鶏肉を通じヒトへの伝播に最も重要な食品であることが判明した。海外渡航歴のない患者およびブラジル産鶏肉から CTX-M-8 産生大腸菌が検出された。患者由来株とブラジル鶏肉由来株との関連性の解析により、鶏肉およびヒト由来 CTX-M-8 産生大腸菌において、大腸菌の系統は異なっていたが、CTX-M-8 遺伝子を有するプラス

ミドは共通した特徴を有しており、当該遺伝子は特定のプラスミドによって媒介されていた。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

五十君静信、朝倉宏、岡田由美子、百瀬愛佳。カンピロバクター食中毒制御を目指す基礎研究。日本臨床 70(8):1298-1303. (2012)

Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S. Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: collaborative study. J AOAC Int. 96(5):991-997. (2013)

Asakura H, Hashii N, Uema M, Kawasaki N,

Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yamamoto S. *Campylobacter jejuni* pdxA Affects Flagellum-Mediated Motility to Alter Host Colonization. PLoS One. 8(8):e70418. (2013)

Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S. Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. J Appl Microbiol. 114(5):1529-1538. (2013)

2 . 学会発表

Igimi S, Ishiwa A, Monden S, Okada Y, Asakura H, Momose Y, Asai T, Kai A, Yokoyama K, Taguchi M, Ishii Y, Kuroda M, Watanabe H. Antimicrobial susceptibility profiles and PFGE typing of *Campylobacter jejuni* and their implications to public health in Japan. 11th International symposium on toxic microorganisms, "Risk Control and Food Safety", UJNR. 2012. Tokyo