

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プ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。プ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、プ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

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(*adh*, *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。

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; セフォキシチン, FOX。

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。

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

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。

PCR

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。

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。

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。

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。

Pulsed-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 で泳動した。装置は CHEF DR (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 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。

Multilocus 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、キャピラリーシーケ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_download.html) を用いて Nei 's diversity indices を算出した。

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

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。

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、FIB、K、B/Q、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。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は認められた。具体的には *bla_{CMY-2}* を載せた Inc11-I プラスミドを保有する ST68 が鶏群 B と L で、*bla_{CMY-2}* 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 を保有する場合は認められた。具体的には HindIII と SalI 消化後に同じ泳動像を示す Inc11-I 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)。

Inc11-I 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)。

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。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)。

プロイラー由来株とヒト由来株の比較

プ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)。これら菌株のラクタマーゼ遺伝子型はプ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、プロイラー由来株とヒト由来株で認められる合計 6 つの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

PCR 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)。

薬剤感受性

51 株中 12 株は 2~4 薬剤に耐性を示した (表 6)。

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)。

PFGE 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)。

MLVA 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-10pl, 0.85 と算出された。作成した MST から 8 つのクラスター(1~)と 5 つのプロファイル(~) が認められた。最優勢なクラスター 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 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)。

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, a) 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, c) 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, b) は異なる散发事例のヒト由来 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, f) は同じ町内の異なる散发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,) と 32 (PFGE, M1; MLVA,) 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)。

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年や分離地は一定でなかった。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と同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合が認められた。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、これらの菌株が保有する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つのラクタマーゼ遺伝子型のうち、3つはプ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、プ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プ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。プ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 β -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	IncK, B/O
	95 kb	80 kb
	bla _{CMY-2}	bla _{CMY-2}
Salmonella Typhimurium LT2	3.2 x 10 ⁻⁵	1.1 x 10 ⁻⁸
Salmonella Infantis L-3701	3.8 x 10 ⁻⁸	5.0 x 10 ⁻⁷
Citrobacter freundii ATCC8090	1.3 x 10 ⁻³	8.0 x 10 ⁻⁸
Klebsiella pneumoniae ATCC9997	7.5 x 10 ⁻⁶	1.6 x 10 ⁻⁸
Enterobacter cloacae ATCC13047	4.6 x 10 ⁻²	1.0 x 10 ⁻⁵
Escherichia coli ATCC14763	5.0 x 10 ⁻⁹	4.3 x 10 ⁻¹⁰
Escherichia coli MC1061	1.9 x 10 ⁻³	6.0 x 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. プロイラーおよびヒト由来株における遺伝子型の分布

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

表5. プ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	プロイラー 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 ^a			94 kb P ^b	ファージ型 ^c	薬剤耐性 パターン ^d
			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	-

^a+, 増幅陽性; -, 増幅陰性; ND, 未実施

^bP, プラスミド; +, 保有; -, 非保有

^cRDNC, 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

^dA, 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

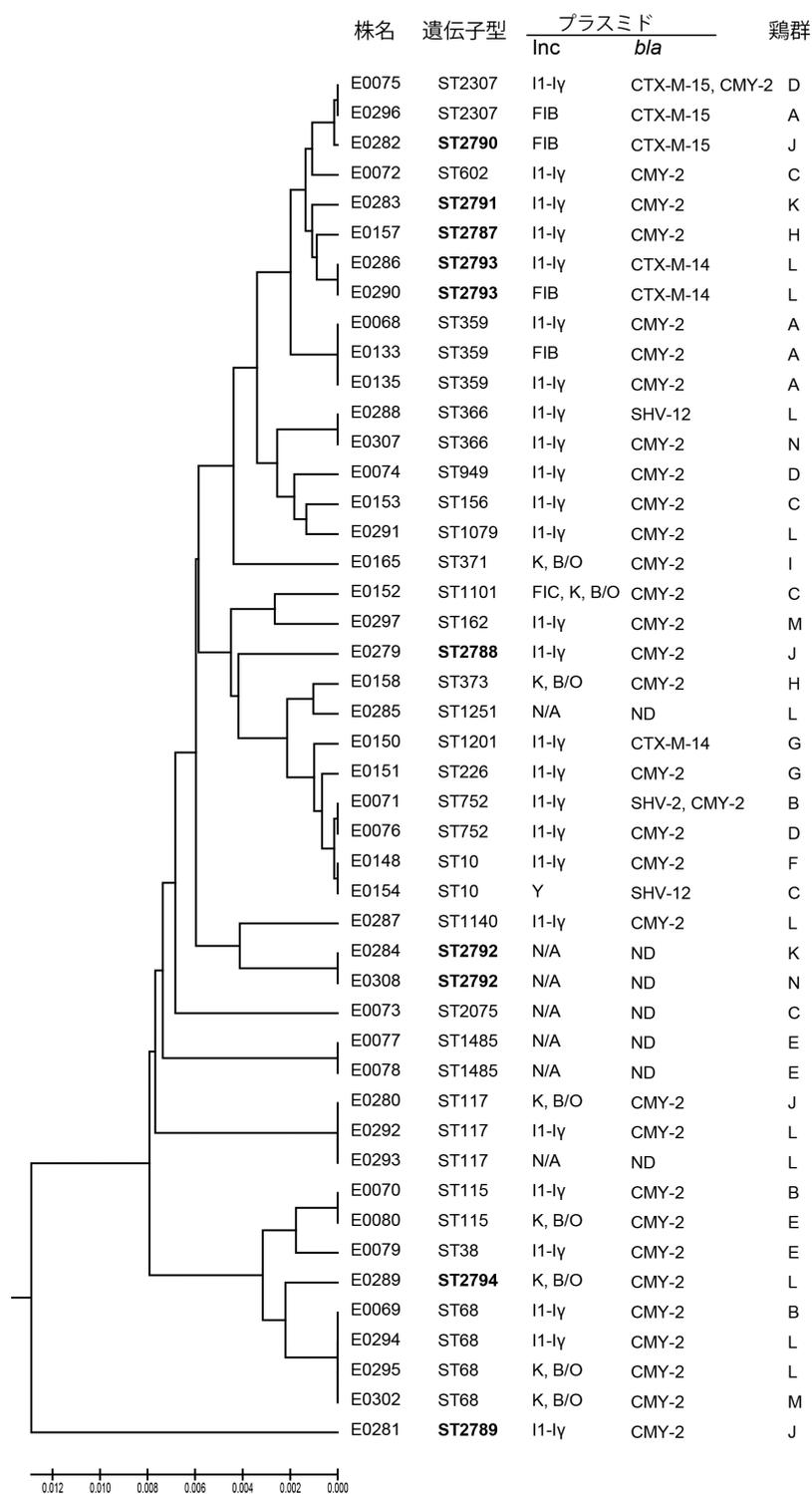


図1. プロイラー由来大腸菌 46 株の遺伝的系統と保有プラスミド

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。

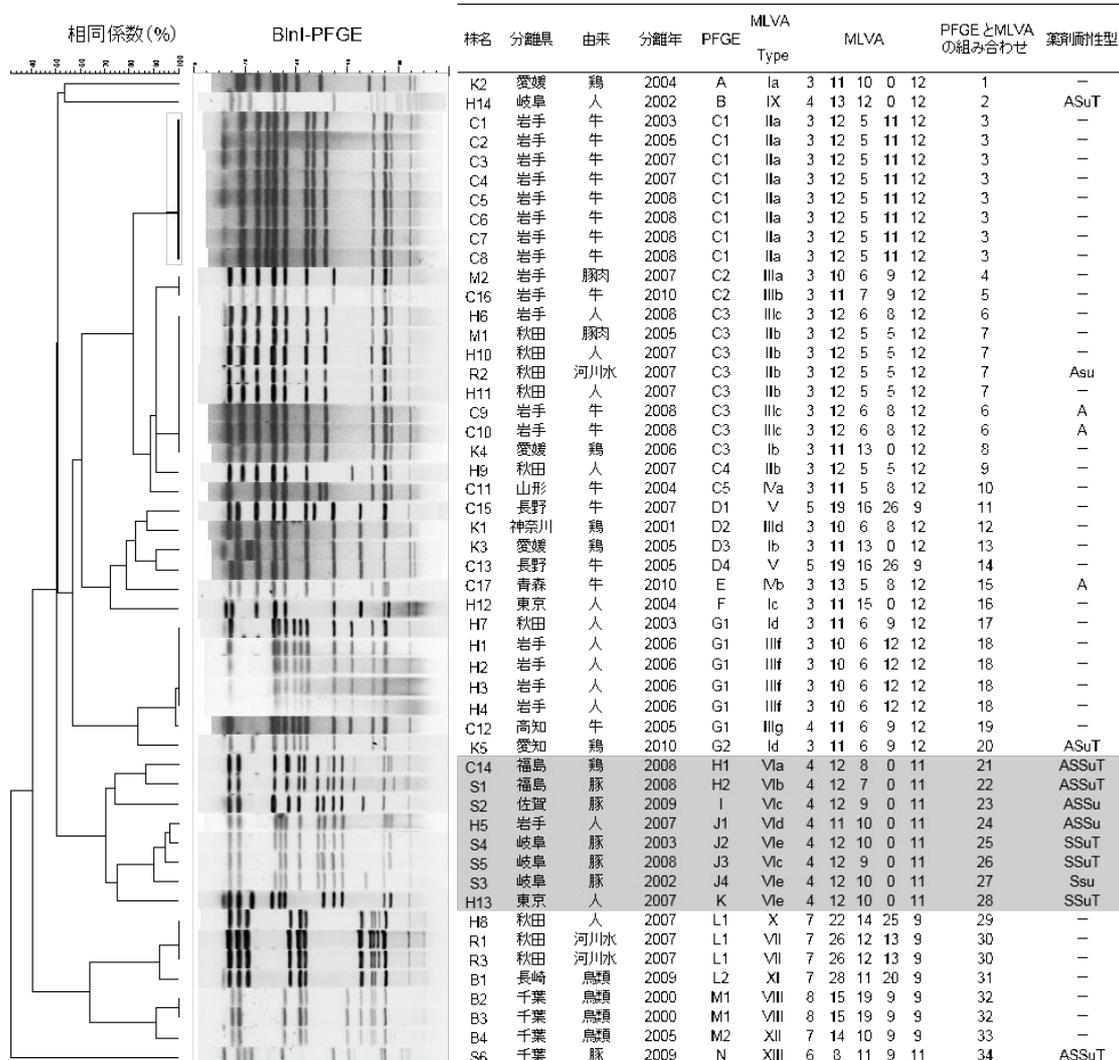


図3. 国内で分離された4:i:-株のPFGEとMLVAによる型別結果

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

