

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究  
分担課題 地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離される  
サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査

研究分担者

四宮博人 (愛媛県立衛生環境研究所)

研究協力者

調 恒明 (山口県環境保健センター)  
小川恵子、大野祐太、三津橋和也、 (北海道立衛生研究所)  
宮島祥太、池田徹也、森本 洋  
山上剛志、高橋洋平、武差愛美 (青森県環境保健センター)  
佐藤千鶴子、小林妙子 (宮城県保健環境センター)  
倉園貴至 (埼玉県衛生研究所)  
小西典子 (東京都健康安全研究センター)  
間 京子、榎本啓吾 (千葉県衛生研究所)  
古川一郎、政岡智佳 (神奈川県衛生研究所)  
松本裕子、小泉充正 (横浜市衛生研究所)  
柳本恵太 (山梨県衛生環境研究所)  
綿引正則、磯部順子 (富山県衛生研究所)  
東方美保、永田暁洋、横山孝治、児玉 佳 (福井県衛生環境研究センター)  
柴田伸一郎 (名古屋市衛生研究所)  
坂田淳子、梅川奈央、西嶋駿弥、下中晶子 (大阪健康安全基盤研究所)  
若林友騎、河原隆二  
福田弘美、東野和直 (堺市衛生研究所)  
吉田孝子 (奈良県保健研究センター)  
齋藤悦子、荻田堅一、坂野 桂 (兵庫県立健康科学研究所)  
川瀬 遵、小谷麻祐子 (島根県保健環境科学研究所)  
狩屋英明 (岡山県環境保健センター)  
清水裕美子、山本泰子、青田達明 (広島市衛生研究所)  
福田千恵美 (香川県環境保健研究センター)  
大羽広宣、藤崎道子、有川衣美 (北九州市保健環境研究所)  
鈴木仁人、松井真理、鈴木里和、甲斐明美 (国立感染症研究所)  
山下育孝、浅野由紀子、木村千鶴子 (愛媛県立衛生環境研究所)  
阿部祐樹

研究要旨

薬剤耐性菌を制御するためには、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチが重要である。昨年度に引き続き、地研ネットワークの協力により、ヒト及び食品由来サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて薬剤耐性状況を調査した。今期（2019年）分離株と合わせ、サルモネラに関しては、2015年～2019年に分離されたヒト由来1,755株中の699株(39.8%)、及び食品由来583株中の527株(90.4%)株が、17剤中の1剤以上に耐性を示した。年次毎の耐性率はほぼ同様であり、現在の日本の状況を反映していると考えられる。2015年～2019年分離のサルモネラについて血清型別の詳細な解析を行ったところ、食品由来株では血清型別

の耐性傾向に共通する部分が多いがそれぞれに特徴的な点も認められ、ヒト由来株においては血清型別に特徴的な耐性傾向が認められた。また、ヒト由来株のうち食品からも分離された血清型、*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。一方、大腸菌については、2015年～2019年分離のヒト由来1,488株中の535株(36.0%)、及び食品由来75株中の43株(57.3%)が1剤以上に耐性を示した。腸管出血性大腸菌(EHEC)以外の下痢原性大腸菌の耐性率がEHECよりも2倍以上高かったが、多剤耐性状況は両者で類似していた。その他の大腸菌(病原因子陰性株など)は6剤以上の多剤耐性株が多く、下痢原性大腸菌よりも高度の多剤耐性傾向を示した。カンピロバクターについては、昨年度の本研究班で作成した全国地研で共通のプロトコル及び判定表を基に、感受性検査と判定を行った。2018年～2019年分離の*C. jejuni*と*C. coli*はともにヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。以上の薬剤感受性検査に加えて、2015年～2018年分離のサルモネラと大腸菌を対象に、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)産生遺伝子、AmpC型β-ラクタマーゼ(AmpC)遺伝子、コリスチン耐性遺伝子(*mcr1-10*)の検出を行った。食品由来菌の薬剤耐性調査に関して、統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本研究班で実施されている。これらのデータは、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」及びWHOのGLASSに提供されている。また、JANISやJVARMなど既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、ワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

#### A. 研究目的

薬剤耐性(AMR)の問題は医療現場に限定されるものではなく、環境—動物—食品—ヒトなどを包括するワンヘルス・アプローチが重要であるという認識が共有され、WHOは「AMRに関するグローバルアクションプラン」を採択し、我が国においても「AMR対策アクションプラン」が策定された。このうち、動物については農林水産省で実施しているJVARM(Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)による耐性菌モニタリングシステムがあり、病院内の耐性菌については厚生労働省で行われているJANIS(Japan Nosocomial Infections Surveillance)によるサーベイランスがある。一方、食品由来耐性菌については、これらのシステムではモニタリングされていない。

地方衛生研究所(以下、地研)は、従来から食中毒原因菌等の食品由来細菌の検査を実施しており、当分担任は、全国の地研において収集されているヒト及び食品由来細菌の薬剤耐性の動向調査を担当している。

今年度は、昨年度に引き続き、ヒト及び食品から分離されたサルモネラ、大腸菌、カンピロバクターの薬剤耐性状況を、全国で統一された

プロトコルや判定表に基づいて実施し、食品由来耐性菌に関する情報収集体制をさらに強固にすることを旨とする。得られたデータは、WHOグローバルアクションプランの一環として展開されている、GLASS(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)に報告する日本のデータベース構築に提供されるとともに、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」に提供され、延いては、ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に繋げていく。

#### B. 研究方法

##### 1. 薬剤耐性調査対象菌株

薬剤感受性検査としては、2019年にヒト(患者)及び食品から分離され、サルモネラ属菌、大腸菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと判定された菌株を対象とした。ヒト由来株は、感染性胃腸炎や食中毒の患者検体から分離されたものを対象とし、検体情報として、性別、年齢、症状、検体の種類、分離年を可能な範囲で求めた。食品由来株は、分離した食品の種類、分離年月日を求め、食品が食肉の場合は、国産、輸入(国名)、不明の情報を記載した。薬剤耐性遺伝子の検出については、2015年～2018年

に薬剤感受性検査を実施した菌株を対象とした。

## 2. 薬剤感受性検査

協力 23 地研においてサルモネラ属菌、大腸菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと判定された菌株を用い、平成 29 年度（サルモネラ、大腸菌）、平成 30 年度（カンピロバクター）の研究報告書に記載した方法により感受性試験と判定を実施した。以上の菌株について、検査に用いる感受性ディスク等の試薬、ディスクディスペンサーやノギス等の器具は全ての地研で共通のものを用いた。寒天・血液寒天平板上の感受性ディスクの配置は、阻止円が融合しないように配置した。阻止円径を測定し、結果表に記入した。

## 3. 結果の報告・集計と解析

サルモネラ及び大腸菌については、検体情報と菌株情報（血清型）を記載した。大腸菌はさらに病原因子やマーカー遺伝子の有無から、下痢原性大腸菌（腸管出血性大腸菌 EHEC、腸管毒素原性大腸菌 ETEC、腸管侵入性大腸菌 EIEC、腸管病原性大腸菌 EPEC、腸管凝集付着性大腸菌 EAggEC、他の下痢原性大腸菌）とその他の大腸菌（病原因子陰性株及び病原因子未検査株）に分類した。カンピロバクターについては検体情報と菌株情報（*C. jejuni*, *C. coli*）を記載した。以上の菌株について、感受性ディスク阻止円径と SIR 判定結果を感受性検査結果表に記載し、研究分担者である愛媛県立衛生環境研究所に送付し、集計・解析を行った。なお、コリスチンについては、CLSI ディスク拡散法の SIR 判定表がないため、阻止円径のみを記載した。

## 4. サルモネラの血清型別薬剤耐性解析

2015 年～2019 年分離のサルモネラを対象に、血清型別に各種抗菌剤に対する耐性率を解析し、血清型間で比較した。

## 5. $\beta$ -ラクタマーゼ関連遺伝子の検出

基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ (Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, ESBL) 産生遺伝子及び AmpC 型  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC) 遺伝子について、2015 年～2018 年分離サルモネラ及び大腸菌のうち、CTX, CAZ, CFX の 1 剤以上に耐性を示す菌株を対象に、末尾に添付した「渡邊班地研グループ耐性遺伝子

検査プロトコル」にしたがって検出を実施した。

## 6. コリスチン耐性遺伝子の検出

上述のように、コリスチンについては感受性試験のみから SIR 判定ができないため、コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*10*)のマルチプレックス PCR 法を開発し、2015 年～2018 年分離のサルモネラ株及び大腸菌のうちコリスチン阻止円径が 12 mm 以下の菌株を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を行った（途中経過）。

## 倫理面への配慮

本研究課題は、分担者を研究代表者、協力地研担当者を研究協力者として、愛媛県立衛生環境研究所倫理審査委員会で審査され、承認された。本審査にしたがい、全ての分離株及び調査情報は個人を特定できる情報を含まない状態で収集し、本研究に用いた。

## C. 研究結果

### 1. ヒト及び食品から分離されたサルモネラの内訳と血清型

2019 年に収集されたサルモネラは、ヒト由来 268 株、食品由来 123 株、総計 391 株で、それぞれの内訳と耐性率を表 1 及び表 2 に示す（株数は 2020 年 2 月 27 日までに集計された暫定的なものである）。1 剤以上に耐性を示した菌株の割合（耐性率）は、ヒト由来株 33.6%、食品由来株 89.4%で、前回の本研究班で 2015 年～2018 年に収集された菌株の結果と同様であった。2019 年に収集されたサルモネラの H 抗原を含めた血清型別の割合とヒト由来株の上位 10 血清型及び食品由来株の上位 5 血清型を図 1 に示す。図中の「その他」についても大部分は型別されている。

### 2. ヒト及び食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性状況

2015 年～2019 年に収集されたヒト由来 1,755 株及び食品由来 583 株の 17 剤に対する耐性率を年次別に示す（表 3, 4）。ヒト由来株、食品由来株ともに、TC, SM に対する耐性率が最も高く、ABPC, KM, NA がそれらに続く耐性率であったが、KM, SM, TC, ST は食品由来株で耐性率が高い傾向が見られた。セフェム系薬 CTX, CAZ, CFX 耐性も数%認められ、食品由来株でやや高い傾向であった。一方、アミノグリコシド系薬 GM, AMK、キノロン系薬 CPF, NFLX、ホスホマイシン系薬 FOM に

に対する耐性率は低いか、0%であった。カルバペネム系薬 IPM、MEPM に対する耐性菌は認められなかった。全体として、年次別に顕著な違いは認められなかった。

2019 年分離のサルモネラ中の 6 剤以上に耐性を示した多剤耐性株（ヒト由来 6 株、食品由来 6 株）を図 2 に示す。また、ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌との関連が示唆される、CTX, CAZ, CFX の 1 剤以上に耐性である菌株（ヒト由来 5 株、食品由来 5 株）を図 3 に示す。食品では、国産鶏肉においても高度な耐性菌が認められた。

### 3. ヒト及び食品から分離されたサルモネラの血清型別の耐性率の比較

2015 年～2019 年に収集されたサルモネラについて血清型別の詳細な解析を行った。食品由来株（583 株）において、*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* は、これらで全体の約 8 割を占め、国産鶏肉から検出される主要な血清型と考えられる。*S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* の各種抗菌剤に対する耐性率を年次別に示す（表 5, 6）。また、2019 年に収集された *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* の計 103 株の耐性率を図 4 に示す。これらの菌株には共通する点が多いが、それぞれの血清型に特徴的な点も認められた。すなわち、*S. Schwarzengrund* では CTX, CAZ, CFX 耐性が低く、*S. Manhattan* では KM 耐性が認められず、ST 耐性も低かった。このような傾向は、昨年度の報告書で示した、2015 年～2018 年分離株での傾向と同様であった。

一方、ヒト由来株の上位 5 位を占める、*S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Thompson*, *S. 4:i:-*, *S. Saintpaul* の各種抗菌剤に対する耐性率を年次別に示す（表 7, 8, 9, 10, 11）。それぞれの血清型で多少の年次間の増減は認められるが、全体的傾向として血清型別の耐性率に興味深い特徴が認められた。上記 5 種の血清型に *S. Schwarzengrund* を加えた 6 種の血清型株（2019 年分離 124 株）について相互に比較した（図 5）。*S. 4:i:-* は国産鶏肉からの検出率は低いですがヒト由来株では主要な血清型の一つで、ABPC, SM, TC に対する耐性率が最も高かった。国産鶏肉由来株の主な血清型である *S. Infantis* と *S. Schwarzengrund* では ABPC 耐性率は低いですが SM, TC 耐性率は高かった。一方、鶏肉よりも鶏卵から分離される *S. Enteritidis*

では SM, TC 耐性率は低く、本調査において食品からは分離されなかった *S. Saintpaul* 及び *S. Thompson* においても SM, TC 耐性率は低かった。このような傾向は、昨年度の報告書で示した、2015 年～2018 年分離株での傾向と同様であった。

次に、2019 年分離株について、ヒト由来株と食品由来株の両方で認められ、かつ食品由来株の主要な血清型である *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* について、各種抗菌剤に対する耐性率を比較すると（表 12、図 6）、両血清型ともヒト由来株と耐性傾向が非常に類似していた。この点についても、昨年度の報告書で示した、2015 年～2018 年分離株での傾向と同様であった。

### 4. ヒト及び食品から分離された大腸菌の薬剤耐性状況

本研究における大腸菌の分類を表 13 に示す。2015 年～2019 年分離のヒト由来大腸菌 1,488 株のうち、17 剤中の 1 剤以上に耐性を示した株は 535 株で、耐性率は 36.0%であった（表 14）。大腸菌株の分類別耐性率は、EHEC 27.2%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 69.9%、その他 71.3%であり、EHEC 以外の下痢原性大腸菌株の耐性率が EHEC 株よりも 2 倍以上高かった。一方、食品（牛肉、鶏肉など）由来株 75 株のうち、43 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 57.3%であった。分類別耐性率は、EHEC 33.3%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 63.3%であった。

### 5. ヒト及び食品から分離された大腸菌の多剤耐性状況及び各種抗菌剤に対する耐性率について

ヒト由来株のうち、17 剤中の 1 剤以上に耐性を示した EHEC 以外の下痢原性大腸菌の頻度は EHEC より 2 倍以上高かったが（表 14）、多剤耐性傾向については両者間で大きな差がなく、一方、その他の大腸菌株では、下痢原性大腸菌株と比べて 7 剤～12 剤の多剤耐性株の頻度が高かった（図 7）。各種抗菌剤に対する耐性率では、ABPC, ST, CTX, NA 及びキノロン系薬 CFX, NFLX に対して、EHEC 以外の下痢原性大腸菌株が EHEC 株よりも耐性率が高く、その他の大腸菌株はセフェム系薬、キノロン系薬、カルバペネム系薬 MEPM 等に耐性を示し、高度の耐性傾向を示した（図 8）。

### 6. ヒト及び食品から分離されたカンピロバ

クター株の薬剤耐性状況

カンピロバクター株については、*C. jejuni*、*C. coli* 共にヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された（表 15、図 9）。*C. coli* は菌株数が多くないが、ヒト由来株、食品由来株とも、EM, CPF, NA に対する耐性率が *C. jejuni* よりも高い傾向を示した。

7. サルモネラ及び大腸菌における ESBL 産生遺伝子及び AmpC 遺伝子保有状況

2015 年～2018 年分離ヒト由来サルモネラ 26 株及び食品由来 31 株中の ESBL 産生遺伝子及び AmpC 遺伝子を図 10 に示す方法で検出すると、ヒト由来株では ESBL 産生遺伝子保有が多く、食品由来株では AmpC 遺伝子保有が多い傾向が認められた（図 11）。ESBL 産生遺伝子では、ヒト由来株、食品由来株とも、CTX-M-1 グループの保有が最も多く、TEM 型が次に多かった。

一方、大腸菌では、サルモネラと異なり、AmpC 遺伝子の保有がほとんど認められず、ESBL 産生遺伝子が主として検出された。さらに、種類毎に保有する ESBL 産生遺伝子が異なり、その他の大腸菌では CTX-M-9 グループ、CTX-M-2 グループ、TEM 型が多く検出され、他方、EHEC では CTX-M-1 グループ、TEM 型は検出されたが、CTX-M-9 グループ、CTX-M-2 グループは検出されなかった（図 12）。

8. サルモネラ及び大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子保有状況

コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1-10* を検出するための multiplex PCR 法を開発した（図 13）。この方法を用いて、2015 年～2018 年分離ヒト由来株及び食品由来株中でコリスチンに対する阻止円径が 12 mm 以下の菌株（表 16）を対象にコリスチン耐性遺伝子を検出する予定である。

#### D. 考察

昨年度の本研究班での調査に引き続き、全国 23 地研の協力を得て、ヒト（有症者、大部分は便検体）及び食品（大部分は国産鶏肉）から、2019 年に分離されたサルモネラの薬剤耐性状況を調査した。ヒト由来株（268 株）は 33.6%、食品由来株（123 株）は 89.4%が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。2015 年～2019 年の年次毎の耐性率はほぼ同様で、現在の日本におけ

る状況を反映していると考えられる。ヒト由来株の血清型は非常に多様で多くの型が含まれていたが、食品由来株は 5 種類の型が約 90%を占め、ある程度限定された血清型が養鶏場等で定着している可能性が示唆された。

多剤耐性状況については、6 剤以上に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 6 株、食品由来株中 6 株認められた。高度の多剤耐性株ではプラスミドのゲノム解析やその伝達リスクについて調査する必要がある。

2015 年～2019 年に分離されたサルモネラを対象に血清型別の耐性率パターンを解析すると、食品由来（主として国産鶏肉）株として主要な *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* では、各種抗菌剤に対する耐性率に共通する部分が多いが、血清型に特徴的な点も認められた。例えば、*S. Manhattan* では KM 耐性が全く認められなかった。このような違いは養鶏場等での使用抗菌剤の種類を反映しているのかもしれない。一方、ヒト由来株においては、血清型別の耐性率に特徴的な点が認められた。それぞれの血清型において、ヒトの感染に至るまでの生息環境における抗菌剤への暴露の違いを反映しているのかもしれない。鶏肉から分離される *S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* は耐性率が高い傾向であった。今回の調査で鶏肉から分離されないか、分離が少ない血清型、*S. Enteritidis*, *S. Thompson*, *S. 4:i:-*, *S. Saintpaul* では、*S. 4:i:-*を除いて各種抗菌剤に対する耐性率があまり高くない傾向であったが、*S. 4:i:-*は ABPC, SM, TC に対して耐性率が高く、抗菌剤を投与される食用鶏以外の保菌動物の存在が示唆される。

食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌の両方で認められる *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* では、ヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来株がヒトサルモネラ症の感染源になっていることが示唆される。*S. Schwarzengrund* と *S. Manhattan* では耐性率そのものも近似であり、より直接的に感染源になっている可能性が高い。*S. Infantis* ではヒト由来株の耐性率は食品由来株の 6 割程度で、鶏肉だけでなく、複数の感染経路があるのかもしれない。今回の結果は、いくつかの血清型について感染経路を具体的に推測させるもので、今後の研究と相まって、ワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋

ることが期待される。

ヒト及び食品由来大腸菌においても興味ある知見が得られた。EHEC, EHEC 以外の下痢原性大腸菌株、その他の大腸菌株の間で、抗菌剤に対する耐性率が相当に異なることが明らかにされた。生息環境の違いによって、抗菌剤に対する選択圧や薬剤耐性遺伝子の伝達頻度が異なることが可能性として示唆される。

カンピロバクターについても、昨年度に感受性検査プロトコルと判定基準を決定し、全ての協力地衛研が統一された方法で検査を実施した。*C. jejuni*, *C. coli* とも、ヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。また、*C. coli* は菌株数が多くないが、ヒト由来株、食品由来株とも、EM, CPM, NA に対する耐性率が *C. jejuni* よりも高い傾向が認められた。

以上の薬剤感受性検査に加えて、耐性遺伝子 (ESBL 産生遺伝子、AmpC 遺伝子、コリスチン耐性遺伝子) の保有状況を調べると、サルモネラでは、ヒト由来株と食品由来株に共通して、ESBL 産生遺伝子の CTX-M-1 グループと TEM 型、及び AmpC 遺伝子の CIT 型が多く検出され、食品株が感染源になっている可能性が示唆されるが、CTX-M-9 グループのようにヒト由来株のみで検出された遺伝子もあり、ヒトに於いて伝達される可能性も示唆された。一方、大腸菌株ではその種類毎に保有する ESBL 産生遺伝子が異なり、生息環境による耐性獲得の相違が示唆された。

JANIS 及び JVARM には食品由来耐性菌の情報は含まれないことから、環境-動物-食品-ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて、地研における食品由来菌の耐性データは重要である。また、ヒト便検体由来サルモネラ株の耐性データについても地研での集積が大きいと言われている。JANIS 及び JVARM は、それぞれ病院及び動物由来耐性菌データベースであるが、本研究班で開発された相互変換ソフトウェアによって、地研での薬剤耐性菌のデータをこれらと合わせ一元化することが可能となった。今後、三者のデータをナショナルサーベイランスとして充実させ、ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に繋げていくためには、地研による食品由来耐性菌のモニターを継続して実施していくネットワーク整備が必要である。

## E. 結論

全国 23 地研の協力を得て、2019 年に分離されたヒト及び食品由来のサルモネラ株、大腸菌株、カンピロバクター株について薬剤耐性状況を調査し、2015 年～2018 年分離株とあわせ耐性データを解析した。食品由来菌の薬剤耐性調査に関して、統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本研究班で実施されている。地研における薬剤耐性データを JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、環境-動物-食品-ヒトを包括するワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

## F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記載)

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

- 1) Keiko Semba, Yuki Abe, Sachiyo Sonobe, Manabu Aono, Komei Shirabe, Akei Kai, Keigo Shibayama, Makoto Onishi, Haruo Watanabe and Hiroto Shinomiya: Monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. of food origin from 2015–2017 in Japan. 第 92 回日本細菌学会総会、2019.4.23-25、札幌
- 2) 四宮博人、浅野由紀子、木村千鶴子、阿部祐樹、森本 洋、高橋洋平、小林妙子、倉園貴至、小西典子、榎本啓吾、政岡智佳、吉野友章、柳本恵太、加藤智子、東方美保、一瀬佳美、柴田伸一郎、高橋佑介、福田弘美、吉田孝子、秋山由美、川瀬 遵、狩屋英明、清水裕美子、福田千恵美、中山志幸、大羽広宣、調 恒明、甲斐明美：2015 年～2018 年に全国で分離されたヒト及び食品由来各種大腸菌株の薬剤耐性状況、第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2019.11.14-15、松山
- 3) 阿部祐樹、木村千鶴子、浅野由紀子、山下育孝、四宮博人：地方衛生研究所におけるヒト及び食品由来薬剤耐性菌のモニタリング、シンポジウム「地方衛生研究所との連携強化」第 94 回日本感染症学会総会、

2020.4.16-18、東京（予定）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 渡邊班地研グループ ESBL 遺伝子検査プロトコル

### 1 検査概要

#### (1) 検査項目

ESBL 遺伝子検査 (TEM 型, SHV 型, 及び CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8/25 各グループ)

#### (2) 方法

マルチプレックス PCR 法

#### (3) 検体の種類・適用範囲

2015～2018 年分離サルモネラ属菌株及び大腸菌株のうち、CTX, CAZ, CFX の 1 剤以上に耐性を示す菌株

### 2 試薬等 (全てヌクレアーゼフリーの遺伝子検査用を使用)

- ・ dH<sub>2</sub>O
- ・ Qiagen Multiplex PCR kit Cat No./ID : 206151/206152 キアゲン(株)
- ・ Mix 2μM プライマー (表 1)
- ・ Chelex 100 Resin #142-1253 Bio-Rad(株)
- ・ TE バッファー
- ・ Mix 陽性コントロール (表 2)
- ・ 陰性コントロール (dH<sub>2</sub>O)
- ・ アガロースゲル (100~1kbp 程度の分子量用)  
アガロース(低電気浸透、高ゲル強度),(微粉末) 商品コード : 02468-66 カライテック(株) 同等品
- ・ 電気泳動用 Buffer
- ・ EtBr 溶液

表 1 ESBL 遺伝子検査用プライマー一覧

遺伝子型	Primer	size(bp)
TEM型	TEM-410F GGTCGCCGCATACACTATTCTC	372bp
	TEM-781R TTTATCCGCCTCCATCCAGTC	
SHV型	SHV-287F CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC	231bp
	SHV-517R CCGGGAAGCGCCTCAT	
CTX-M-1型	ctxm1-115F GAATTAGAGCGGCAGTCGGG	588bp
	ctxm1-702R CACAACCCAGGAAGCAGGC	
CTX-M-2型	ctxm2-39F GATGGCGACGCTACCCC	107bp
	ctxm2-145R CAAGCCGACCTCCCGAAC	
CTX-M-8/25型	ctxm8g25g-533F GCGACCCGCGGATAC	186bp
	ctxm8g25g-718R TGCCGGTTTTATCCCCG	
CTX-M-9型	ctxm9-16F GTGCAACGGATGATGTTCCG	475bp
	ctxm9-490R GAAACGTCTCATCGCCGATC	



表 2 ESBL 遺伝子検査用陽性コントロール一覧

分類	遺伝子型	濃度	調整方法
ESBL	TEM型	40ng/μL	6種のDNAを等量混合
	SHV型	40ng/μL	
	CTX-M-1 group	40ng/μL	
	CTX-M-2 group	40ng/μL	
	CTX-M-8 group	40ng/μL	
	CTX-M-9 group	40ng/μL	

### 3 検査手順

#### (1) 鋳型 DNA の調整

- ア 1.5mL チューブに 5% Chelex TE を 100μL ずつ分注する。
- イ ディスポニードルを用いて、平板上の単コロニーを釣菌し、アのチューブに懸濁する。
- ウ 100°C 10 分加熱し、10,000rpm 10 分遠心、上清を鋳型 DNA とする。  
(Chelex 粒子は PCR を阻害するため、沈査を吸い上げないように注意！)  
鋳型 DNA は 4°C で保存する (長期保存は -20°C)。

\* 通常の TE/水懸濁後、熱処理 (遠心不要) でも可。ただし、菌摂取量は少量にすること。

#### (2) PCR 反応液の調整

##### ア PCR マスターミックスの調整

- (ア) Qiagen Multiplex PCR Plus kit を用いる。
- (イ) 以下の分量で PCR マスターミックスを調整する。
- (ウ) 調整した PCR マスターミックスを PCR 用チューブに 24μL ずつ分注する。

	最終濃度	1 反応液
2×Multiplex PCR Master mix (μL)	× 1	12.5
プライマーミックス (μL)	0.2μM	2.5
Q-Solution		2.5
Coral Load Dye, ×10		2.5
dH <sub>2</sub> O		4
合計液量 (μL)		24

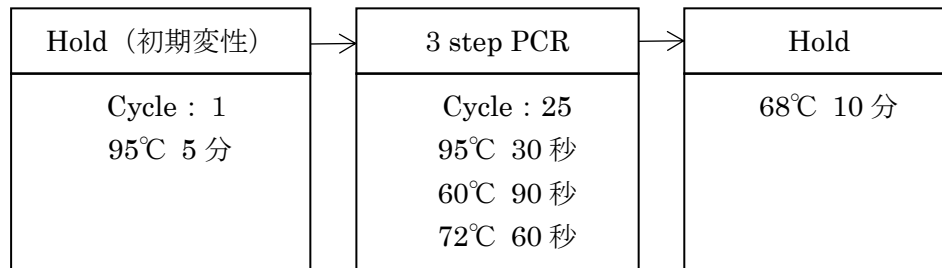
##### イ 鋳型 DNA 等の添加

- (ア) PCR マスターミックスを分注した PCR 用チューブに陰性コントロール (dH<sub>2</sub>O)、鋳型 DNA、陽性コントロールを各 1μL 添加する。  
\* 送付した陽性コントロールをそのまま使用されますと、バンドがシャープにならず、エキストラバンドかなり濃くでます。適宜 TE 等で希釈して使用してください。
- (イ) PCR を行う。

### (3) PCR

以下の条件で PCR を開始する。

(PCR 時間：1 時間 51 分程度 Bio-Rad T100 使用)



### (4) 増幅産物の電気泳動

2%アガロースゲルで電気泳動 (100V 30~40 分程度) を実施し、EtBr 染色を行う。

### 4 検査結果報告方法

結果報告は別添ファイル (ESBL+AmpC 遺伝子検査報告用) に入力して報告する。

### 5 参考文献

Quoc Phong Le, Shuhei Ueda, Thi Ngoc Hue Nguyen, Thi Van Khanh Dao, Thi Ai Van Hoang, Thi Thuy Nga Tran, Itaru Hirai, Tatsuya Nakayama, Ryuji Kawahara, Thai Hung Do, Quang Mai Vien, Yoshimasa Yamamoto. Characteristics of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam. *Foodborne Pathog Dis* 2015; 12(8):719-725.

### 6 備考

サブタイプの決定には別途 PCR とシーケンスなどの追加試験が必要となります。また、ESBL 以外の  $\beta$ -ラクタマーゼ (TEM-1、SHV-1、LEN 等) も陽性になりますので、ESBL かどうかの確認には、別の PCR とシーケンスが必要となります。

CTX-M についても、各遺伝子グループの検出であることにご注意ください。例としては、本キットで CTX-M-1 グループ陽性となった場合、CTX-M-1、CTX-M-3、CTX-M-15、CTX-M-55 などの遺伝子型である可能性があります。それらを特定するためには別に PCR とシーケンスが必要です。

## 渡邊班地研グループ AmpC 遺伝子検査プロトコル

### 1 検査概要

#### (1) 検査項目

AmpC 遺伝子検査 (FOX、CIT、DHA、ACC、EBC、MOX 各型)

#### (2) 方法

マルチプレックス PCR 法

#### (3) 検体の種類・適用範囲

2015～2018 年分離サルモネラ属菌株及び大腸菌株のうち、CTX, CAZ, CFX の 1 剤以上に耐性を示す菌株

### 2 試薬等 (全てヌクレアーゼフリーの遺伝子検査用を使用)

- ・ dH<sub>2</sub>O
- ・ Qiagen Multiplex PCR kit Cat No./ID : 206151/206152 キアゲン(株)
- ・ Mix 2μM プライマー (表 1)
- ・ Chelex 100 Resin #142-1253 Bio-Rad(株)
- ・ TE バッファー
- ・ Mix 陽性コントロール (表 2)
- ・ 陰性コントロール (dH<sub>2</sub>O)
- ・ アガロースゲル (100~1kbp 程度の分子量用)  
アガロース(低電気浸透、高ゲル強度),(微粉末) 商品コード : 02468-66 カライテック(株) 同等品
- ・ 電気泳動用 Buffer
- ・ EtBr 溶液

表 1 AmpC 遺伝子検査用プライマー一覧

遺伝子型	Primer	size(bp)
FOX型	FOXMF AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp
	FOXMR CAAAGCGCGTAACCGGATTG	
EBC型	EBCMF TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302bp
	EBCMR CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
ACC型	ACCMF AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp
	ACCMR TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
DHA型	DHAMF AACTTTACAGGTGTGCTGGGT	405bp
	DHAMR CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
CIT型	CITMF TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp
	CITMR TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
MOX型	MOXMF GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520bp
	MOXMR CACATTGAATAGGTGTGGTGC	

表 2 AmpC 遺伝子検査用陽性コントロール一覧

分類	遺伝子型	濃度	調整方法
AmpC	FOX型	40ng/μL	6種のDNAを等量混合
	CIT型	40ng/μL	
	DHA型	40ng/μL	
	ACC型	40ng/μL	
	EBC型	40ng/μL	
	MOX型	40ng/μL	

### 3 検査手順

#### (1) 鋳型 DNA の調整

- ア 1.5mL チューブに 5% Chelex TE を 100μL ずつ分注する。
- イ ディスポニードルを用いて、平板上の単コロニーを釣菌し、アのチューブに懸濁する。
- ウ 100°C 10 分加熱し、10,000rpm 10 分遠心、上清を鋳型 DNA とする。  
(Chelex 粒子は PCR を阻害するため、沈査を吸い上げないように注意！)  
鋳型 DNA は 4°C で保存する (長期保存は -20°C)。

#### (2) PCR 反応液の調整

- ア PCR マスターミックスの調整
  - (ア) Qiagen Multiplex PCR Plus kit を用いる。
  - (イ) 以下の分量で PCR マスターミックスを調整する。
  - (ウ) 調整した PCR マスターミックスを PCR 用チューブに 24μL ずつ分注する。

	最終濃度	1 反応液
2×Multiplex PCR Master mix (μL)	× 1	12.5
プライマーミックス (μL)	0.2μM	2.5
Q-Solution		2.5
Coral Load Dye, ×10		2.5
dH <sub>2</sub> O		4
合計液量 (μL)		24

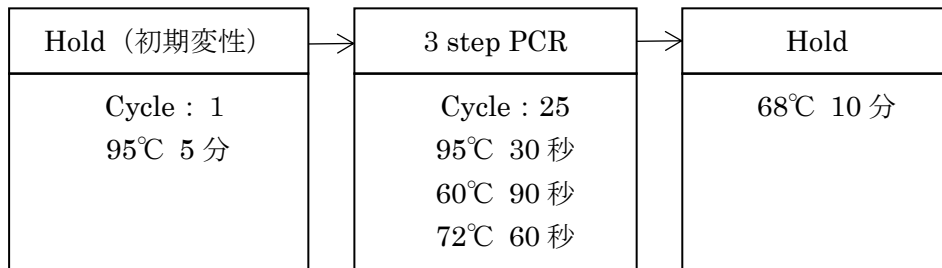
#### イ 鋳型 DNA 等の添加

- (ア) PCR マスターミックスを分注した PCR 用チューブに陰性コントロール (dH<sub>2</sub>O)、鋳型 DNA、陽性コントロールを各 1μL 添加する。
- (イ) PCR を行う。

### (3) PCR

以下の条件で PCR を開始する。

(PCR 時間 : 1 時間 51 分程度 Bio-Rad T100 使用)



### (4) 増幅産物の電気泳動

2%アガロースゲルで電気泳動 (100V 30~40 分程度) を実施し、EtBr 染色を行う。

#### 4 検査結果報告方法

結果報告は別添ファイル (ESBL+AmpC 遺伝子検査報告用) に入力して報告する。

#### 5 参考文献

Pérez-Pérez FJ, Hanson ND.2002. Detection of plasmid mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J Clin Microbiol 40:2153-2162.

#### 6 備考

サブタイプの決定には別途 PCR とシーケンスなどの追加試験が必要となります。また、染色体上に元来保有している菌種もあることに留意してください。

表 1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の薬剤耐性状況  
(2019 年分離株\* n=391)

(2020/2/27 時点)

由来		菌株数	耐性菌株数#	耐性率
ヒト由来		268	90	33.6%
食品由来	国産鶏肉	106	96	90.6%
	外国産鶏肉	6	5	83.3%
	その他・不明	11	9	81.8%
	合計	123	110	89.4%

\*2019 年 1 月～12 月に分離された菌株  
#17 抗菌剤中 1 剤以上に耐性(R)を示した菌株

表 2. ヒト由来サルモネラ株の検体別内訳と耐性率  
(2019 年分離株 n=268)

(2020/2/27 時点)

検体名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
糞便・便	214	77	36.0%
血液・静脈血	11	3	27.3%
尿・中間尿	2	0	0.0%
菌株	2	0	0.0%
膿	1	1	100.0%
喀痰	1	0	0.0%
胆汁	1	1	100.0%
不明・空白	36	8	22.2%
合計	268	90	33.6%

図 1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型(2019 年分離株)

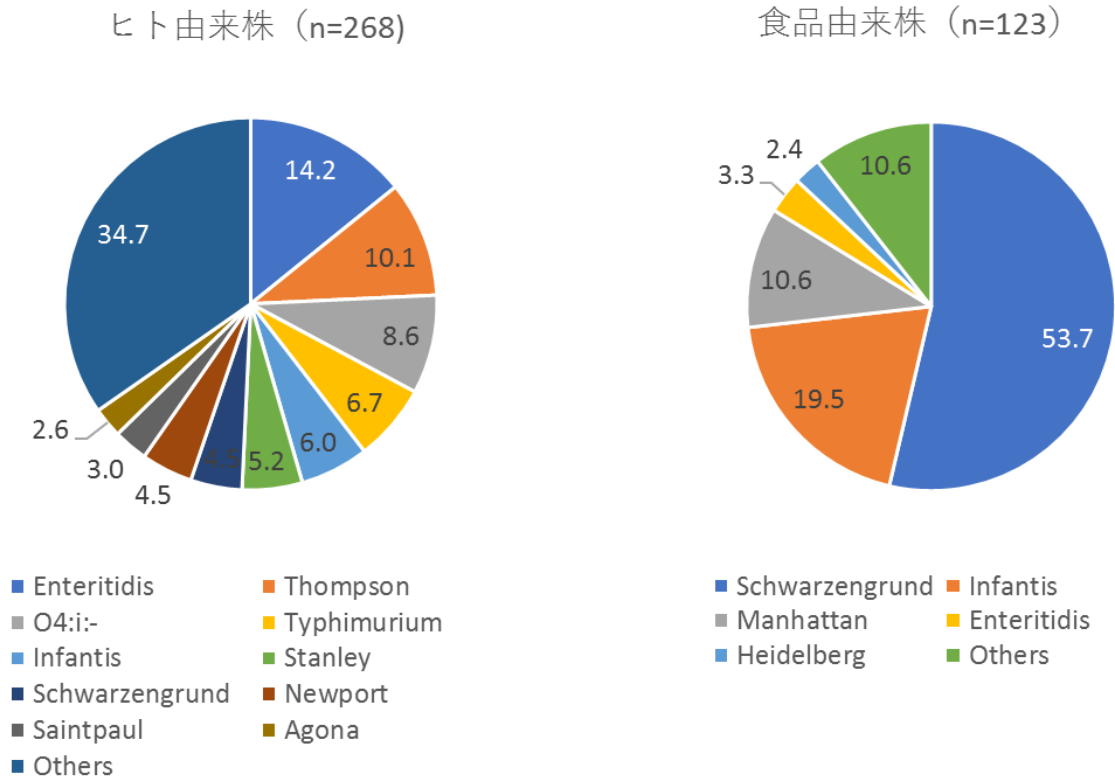


表 3. ヒト由来 non-typhoidal *Salmonella* spp の耐性率(2015-2019 年)

	2015 (n=388)	2016 (n=362)	2017 (n=420)	2018 (n=317)	2019 (n=268)	2015-2019 (n=1755)
ABPC	17.3	18.0	15.5	19.2	14.9	17.0
GM	0.3	0.6	0.7	0.6	1.5	0.7
KM	5.9	11.6	7.1	8.2	5.6	7.7
SM	27.1	29.8	26.0	29.0	23.1	27.1
TC	32.5	28.7	26.4	25.2	21.6	27.3
ST	4.4	6.6	7.9	6.3	3.7	5.9
CP	2.3	6.4	5.2	6.0	5.6	5.0
CTX	0.3	2.8	3.1	3.2	1.9	2.2
CAZ	0.3	2.2	1.7	1.9	1.1	1.4
CFX	0.0	1.4	0.5	0.6	0.0	0.5
FOM	0.0	0.3	0.5	0.3	0.4	0.3
NA	7.0	8.0	10.0	6.0	5.2	7.5
CPFX	0.3	0.8	1.4	0.3	1.5	0.9
NFLX	0.3	0.8	0.5	0.0	0.7	0.5
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1 剤以上耐性数	163	162	158	126	90	699
1 剤以上耐性率	42.0	44.8	37.6	39.7	33.6	39.8

各年 1 月～12 月に分離された菌株

表 4. 食品由来 non-typhoidal *Salmonella* spp の耐性率(2015-2019 年)

	2015 (n=156)	2016 (n=110)	2017 (n=86)	2018 (n=108)	2019 (n=123)	2015-2019 (n=583)
ABPC	17.9	13.6	11.6	14.8	8.9	13.7
GM	0.0	0.9	1.2	0.0	0.0	0.3
KM	47.4	47.3	45.3	50.0	58.5	49.9
SM	82.7	70.9	69.8	77.8	65.9	74.1
TC	85.9	76.4	73.3	81.5	69.9	78.0
ST	19.9	16.4	12.8	38.0	26.0	22.8
CP	7.1	10.0	2.3	8.3	4.1	6.5
CTX	5.1	5.5	8.1	9.3	4.1	6.2
CAZ	4.5	6.4	8.1	9.3	2.4	5.8
CFX	2.6	3.6	8.1	7.4	3.3	4.6
FOM	0.0	0.9	1.2	0.0	0.0	0.3
NA	18.6	18.2	14.0	19.4	25.2	19.4
CPFX	0.0	0.9	1.2	0.0	0.0	0.3
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1 剤以上耐性数	143	96	77	98	113	527
1 剤以上耐性率	91.7	87.3	89.5	90.7	91.9	90.4



図2. 6剤以上に耐性を示したサルモネラ株  
(2019年分離株)

ヒト由来株

分離年	薬剤耐性数	ABPC	GM	KM	SM	TC	ST	CP	CTX	CAZ	CFX	FOM	NA	CPFX	NFLX	AMK	IPM	MEPM
2019	7	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S
2019	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2019	8	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	I	S	S	S
2019	8	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	I	S	S	S	S
2019	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2019	9	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S

食品由来株

分離年	薬剤耐性数	ABPC	GM	KM	SM	TC	ST	CP	CTX	CAZ	CFX	FOM	NA	CPFX	NFLX	AMK	IPM	MEPM
2019	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	I	R	S	S	R	R	R	I	R	I	S	S	S	S
2019	6	I	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	I	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S

国産  
不明  
国産  
国産  
国産  
国産

図3. セフェム系薬剤に耐性を示したサルモネラ株  
(2019年分離株)

ヒト由来株

分離年	耐性薬剤数	CTX	CAZ	CFX
2019	7	R	R	S
2019	7	R	R	S
2019	8	R	R	S
2019	8	R	S	S
2019	9	R	S	S

食品由来株

分離年	薬剤耐性数	CTX	CAZ	CFX
2019	6	R	R	R
2019	3	R	I	R
2019	5	R	R	S
2019	5	R	I	R
2019	6	R	R	R

不明  
国産  
国産  
国産  
国産

表 5. 食品由来 *S. Infantis* の耐性率 (2015–2019 年)

	2015 (n=65)	2016 (n=33)	2017 (n=19)	2018 (n=27)	2019 (n=24)	2015–2019 (n=168)
ABPC	10.8	12.1	5.3	14.8	8.3	10.7
GM	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.6
KM	44.6	42.4	15.8	33.3	37.5	38.1
SM	81.5	72.7	63.2	85.2	58.3	75.0
TC	89.2	81.8	68.4	85.2	58.3	80.4
ST	18.5	30.3	0.0	44.4	12.5	22.0
CP	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	1.8
CTX	4.6	6.1	5.3	11.1	8.3	6.5
CAZ	3.1	9.1	5.3	11.1	0.0	5.4
CFX	4.6	9.1	5.3	14.8	8.3	7.7
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	3.1	9.1	0.0	3.7	16.7	6.0
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 6. 食品由来 *S. Schwarzengrund* の耐性率 (2015–2019 年)

	2015 (n=47)	2016 (n=36)	2017 (n=45)	2018 (n=51)	2019 (n=66)	2015–2019 (n=245)
ABPC	17.0	5.6	0.0	7.8	3.0	6.5
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	85.1	88.9	77.8	80.4	92.4	85.3
SM	93.6	80.6	82.2	76.5	74.2	80.8
TC	95.7	86.1	80.0	86.3	80.3	85.3
ST	36.2	16.7	24.4	56.9	43.9	37.6
CP	19.1	11.1	4.4	9.8	6.1	9.8
CTX	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.4
CAZ	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.4
CFX	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.4
FOM	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.4
NA	25.5	19.4	6.7	23.5	27.3	21.2
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図 4. 主要な食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率  
(2019 年分離株 n=103)

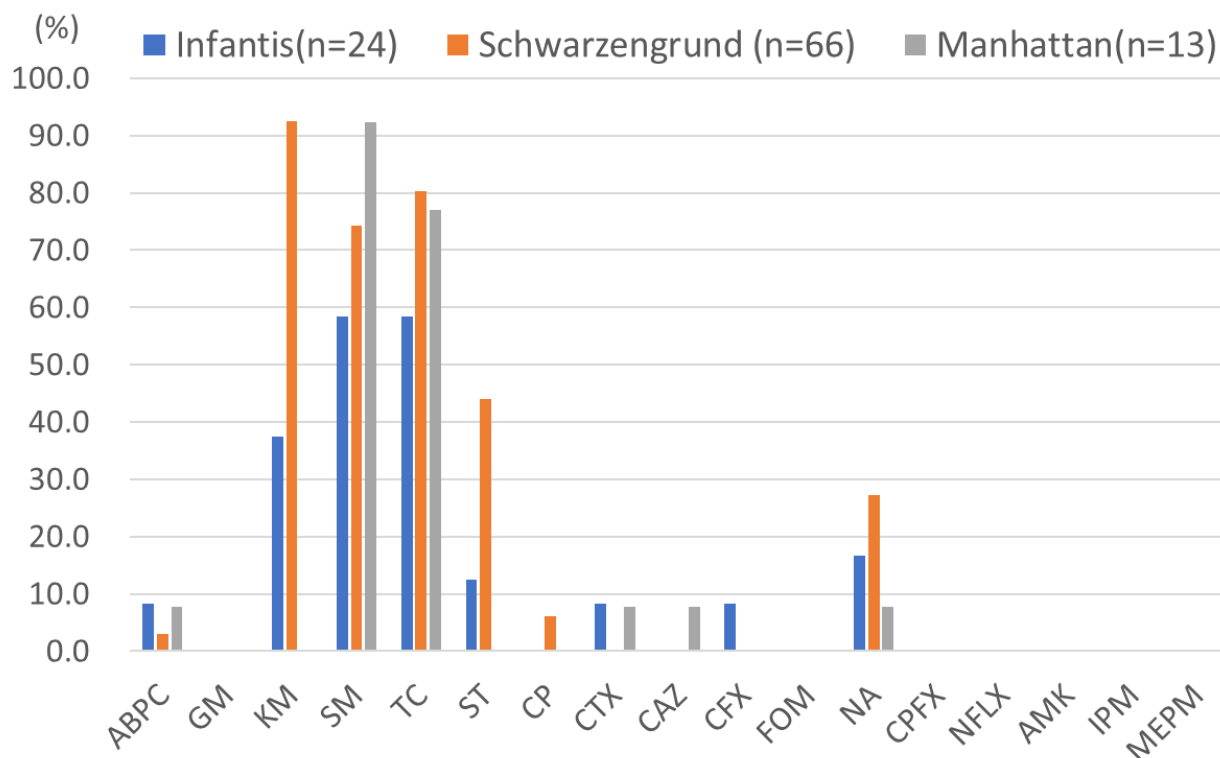


表 7. ヒト由来 *S. Infantis* の耐性率 (2015–2019 年)

	2015 (n=34)	2016 (n=48)	2017 (n=48)	2018 (n=22)	2019 (n=16)	2015–2019 (n=168)
ABPC	0.0	2.1	0.0	9.1	6.3	2.4
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	20.6	14.6	6.3	22.7	12.5	14.3
SM	29.4	33.3	20.8	50.0	31.3	31.0
TC	47.1	33.3	22.9	54.5	37.5	36.3
ST	14.7	14.6	2.1	18.2	0.0	10.1
CP	0.0	0.0	0.0	9.1	6.3	1.8
CTX	0.0	2.1	0.0	4.5	6.3	1.8
CAZ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CFX	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	0.6
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	0.6
NA	8.8	4.2	8.3	0.0	12.5	6.5
CPMX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 8. ヒト由来 *S. Enteritidis* の耐性率 (2015-2019 年)

	2015 (n=39)	2016 (n=41)	2017 (n=50)	2018 (n=43)	2019 (n=38)	2015-2019 (n=211)
ABPC	5.1	19.5	6.0	7.0	5.3	8.5
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	2.6	2.4	0.0	0.0	0.0	0.9
SM	12.8	12.2	14.0	14.0	5.3	11.8
TC	10.3	2.4	6.0	9.3	5.3	6.6
ST	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
CP	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
CTX	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.5
CAZ	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.5
CFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FOM	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.5
NA	10.3	26.8	14.0	25.6	10.5	17.5
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 9. ヒト由来 *S. Thompson* の耐性率 (2015-2019 年)

	2015 (n=28)	2016 (n=28)	2017 (n=30)	2018 (n=29)	2019 (n=27)	2015-2019 (n=142)
ABPC	0.0	10.7	0.0	0.0	7.4	3.5
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4
SM	7.1	7.1	3.3	6.9	0.0	4.9
TC	3.6	7.1	6.7	0.0	0.0	3.5
ST	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.4
CP	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.4
CTX	0.0	10.7	0.0	0.0	0.0	2.1
CAZ	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.4
CFX	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.4
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.7
CPFX	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.4
NFLX	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	1.4
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 10. ヒト由来 S. 4:i:- の耐性率(2015-2019 年)

	2015 (n=60)	2016 (n=37)	2017 (n=36)	2018 (n=36)	2019 (n=23)	2015-2019 (n=192)
ABPC	71.7	64.9	77.8	86.1	82.6	75.5
GM	1.7	0.0	2.8	0.0	0.0	1.0
KM	3.3	5.4	2.8	8.3	4.3	4.7
SM	73.3	70.3	80.6	91.7	82.6	78.6
TC	85.0	62.2	77.8	80.6	65.2	76.0
ST	5.0	10.8	5.6	8.3	8.7	7.3
CP	3.3	10.8	8.3	13.9	8.7	8.3
CTX	0.0	2.7	2.8	2.8	0.0	1.6
CAZ	0.0	2.7	2.8	0.0	0.0	1.0
CFX	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.5
FOM	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.5
NA	1.7	2.7	5.6	0.0	0.0	2.1
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 11. ヒト由来 S. Saintpaul の耐性率(2015-2019 年)

	2015 (n=27)	2016 (n=26)	2017 (n=42)	2018 (n=10)	2019 (n=8)	2015-2019 (n=113)
ABPC	7.4	7.7	14.3	10.0	0.0	9.7
GM	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.9
KM	0.0	3.8	4.8	0.0	0.0	2.7
SM	3.7	3.8	11.9	0.0	0.0	6.2
TC	40.7	15.4	21.4	10.0	12.5	23.0
ST	0.0	11.5	16.7	10.0	12.5	10.6
CP	3.7	0.0	14.3	0.0	12.5	7.1
CTX	0.0	0.0	11.9	0.0	0.0	4.4
CAZ	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.9
CFX	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.9
FOM	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.9
NA	7.4	3.8	19.0	0.0	0.0	9.7
CPFX	3.7	0.0	9.5	0.0	0.0	4.4
NFLX	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図 5. 主要なヒト由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率  
(2019 年分離株 n=124)

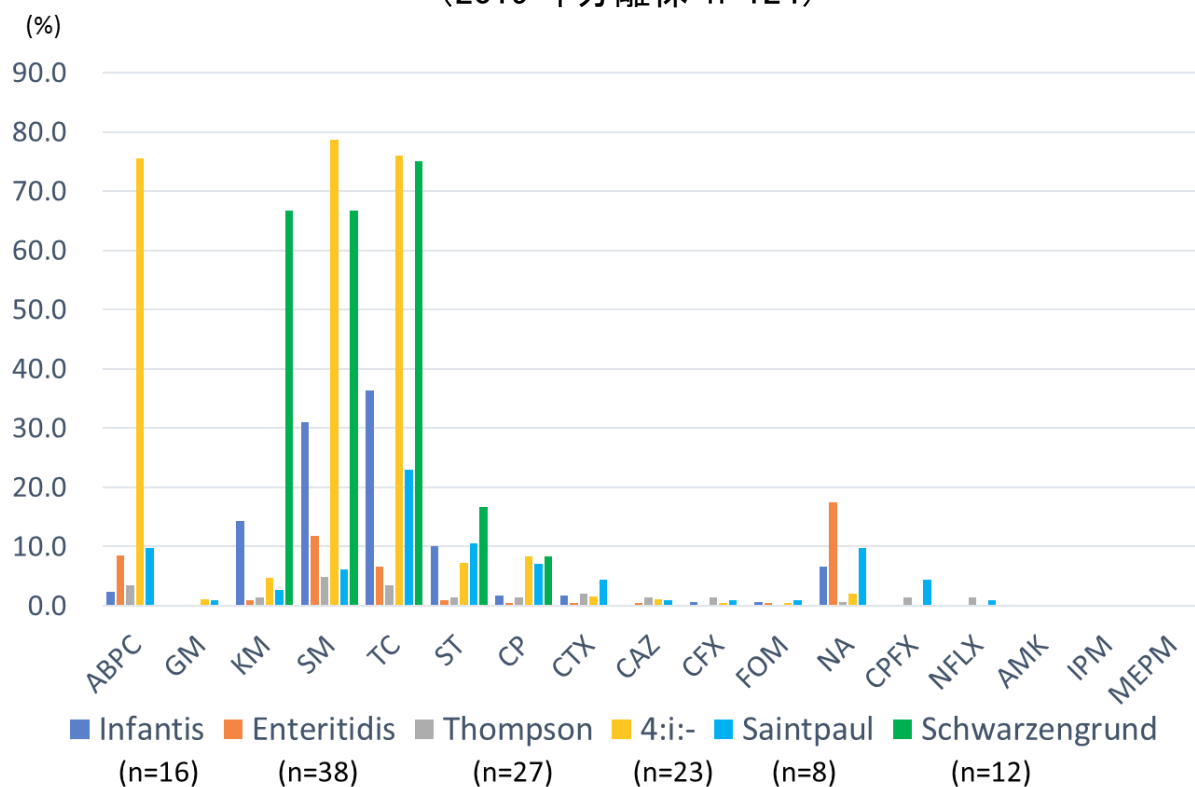


表12. ヒト及び食品から検出される *S. Infantis*、*S. Schwarzengrund*、*S. Manhattan* の耐性率 (2019年)

	Infantis		Schwarzengrund		Manhattan	
	ヒト(n=16)	食品(n=24)	ヒト(n=12)	食品(n=66)	ヒト(n=4)	食品(n=13)
ABPC	6.3	8.3	0.0	3.0	0.0	7.7
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	12.5	37.5	66.7	92.4	0.0	0.0
SM	31.3	58.3	66.7	74.2	75.0	92.3
TC	37.5	58.3	75.0	80.3	50.0	76.9
ST	0.0	12.5	16.7	43.9	0.0	0.0
CP	6.3	0.0	8.3	6.1	0.0	0.0
CTX	6.3	8.3	0.0	0.0	0.0	7.7
CAZ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7
CFX	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0
FOM	6.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	12.5	16.7	0.0	27.3	0.0	7.7
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図 6. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率  
(2019 年分離株) (表 12 のグラフ)

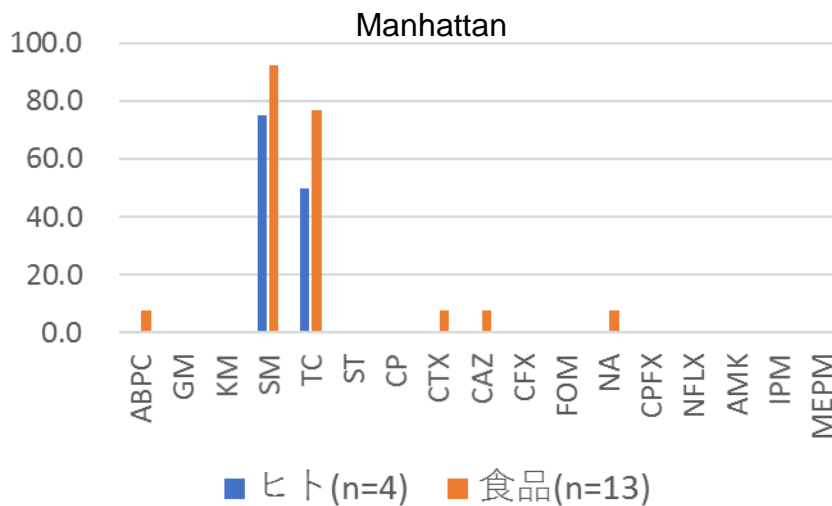
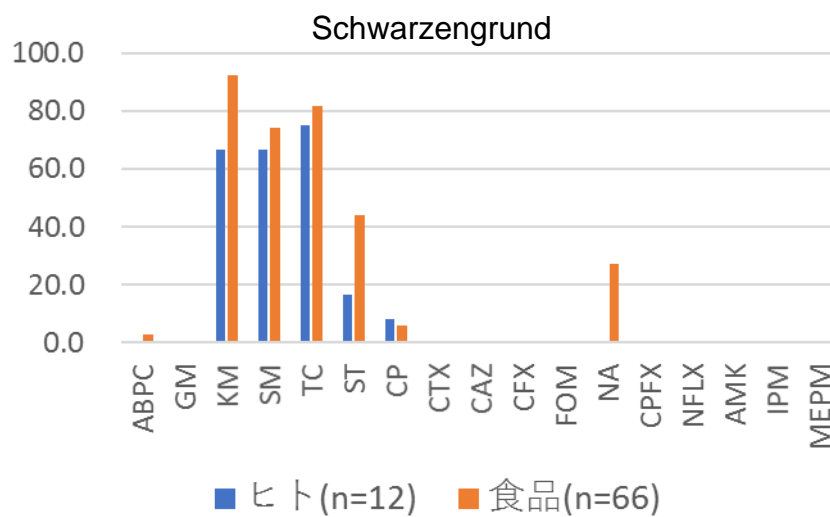
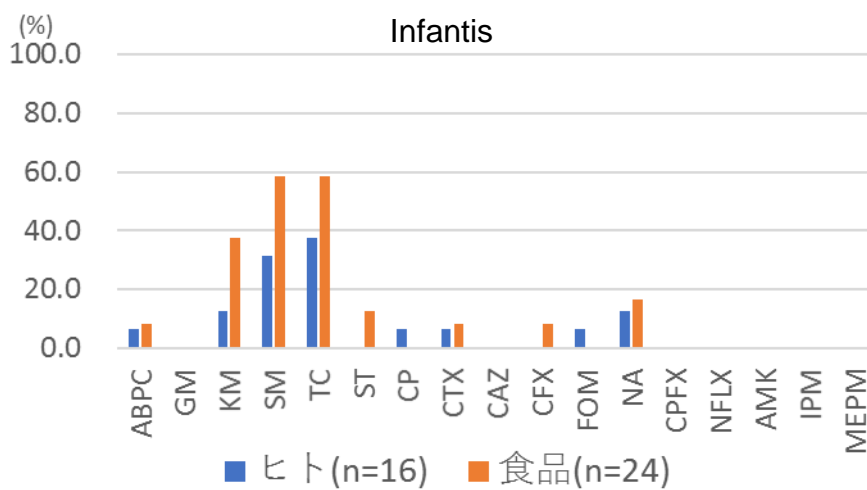


表13. 本研究で用いた大腸菌株の分類

分類	病原因子またはマーカー	定義
腸管出血性/Vero毒素産生性 (EHEC/VTEC)	VT1, VT2	VT産生性あるいはVT遺伝子が確認されたもの
腸管毒素原性 (ETEC)	LT, ST	LT,ST,あるいはその両者の産生性あるいは毒素遺伝子が確認されたもの
腸管侵入性 (EIEC)	<i>invE, ipaH</i>	組織侵入性プラスミドを保有していること、あるいは組織侵入性遺伝子が確認されたもの
腸管病原性 (EPEC)	<i>eae, bfpA, EAF</i>	培養細胞への局在付着性、または、それに関連する遺伝子が確認されたもの (VT, LT, ST, 侵入性が確認されたものを除く)
腸管凝集付着性 (EAggEC)	<i>aggR, CVD432</i>	培養細胞への凝集付着性、または、それに関連する遺伝子が確認されたもの (VT, LT, ST, 侵入性が確認されたものを除く)
他の下痢原性	<i>astA</i>	上記5つに該当しないが胃腸炎の原因と考えられるもの. 生化学的性状が同じものが多数の患者より検出された場合
その他	—	上記病原因子陰性 (病原因子未検査株を含む)

(病原微生物検出情報Vol.33 No.1表1を改変)

表14. ヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性状況  
(2015～2019年分離株 n = 1,563)

ヒト由来株 (n = 1,488)

食品由来株 (n = 75)

	ヒト由来株 (n = 1,488)				食品由来株 (n = 75)				
	分類	株数	耐性数	耐性率	分類	株数	耐性数	耐性率	
2015	EHEC	130	39	30.0	2015	EHEC	4	1	25.0
	下痢原性	23	20	87.0		下痢原性	2	2	100.0
	その他	12	6	50.0		その他	0	0	—
	計	165	65	39.4		計	6	3	50.0
2016	EHEC	115	34	29.6	2016	EHEC	5	2	40.0
	下痢原性	32	24	75.0		下痢原性	2	2	100.0
	その他	24	15	62.5		その他	0	0	—
	計	171	73	42.7		計	7	4	57.1
2017	EHEC	191	68	35.6	2017	EHEC	0	0	—
	下痢原性	26	18	69.2		下痢原性	9	5	55.6
	その他	28	23	82.1		その他	19	12	63.2
	計	245	109	44.5		計	28	17	60.7
2018	EHEC	471	110	23.4	2018	EHEC	1	0	0.0
	下痢原性	50	31	62.0		下痢原性	15	9	60.0
	その他	42	30	71.4		その他	13	8	61.5
	計	563	171	30.4		計	29	17	58.6
2019	EHEC	282	73	25.9	2019	EHEC	2	1	50.0
	下痢原性	32	21	65.6		下痢原性	2	1	50.0
	その他	30	23	76.7		その他	1	0	0.0
	計	344	117	34.0		計	5	2	40.0
合計	EHEC	1189	324	27.2	合計	EHEC	12	4	33.3
	下痢原性	163	114	69.9		下痢原性	30	19	63.3
	その他	136	97	71.3		その他	33	20	60.6
	計	1488	535	36.0		計	75	43	57.3

#下痢原性EC：ETEC, EIEC, EPEC, EAggEC, 他の下痢原性EC (上記5つに該当せず*astA*保有)

\*その他：病原因子陰性株及び病原因子未検査株



図7. ヒト由来大腸菌株の多剤耐性状況  
(2015～2019年分離株)

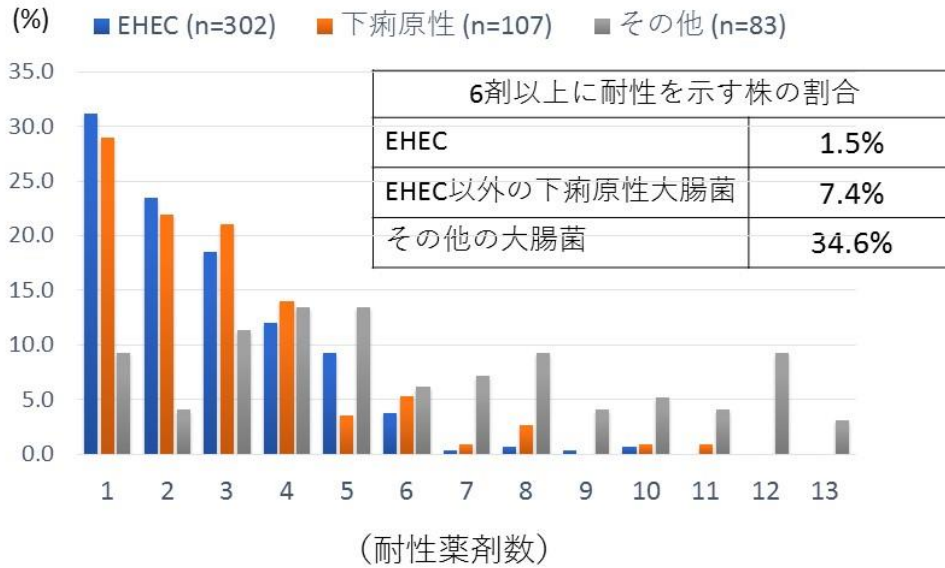


図8. ヒト由来大腸菌株の各種薬剤耐性率  
(2015～2019年分離株)

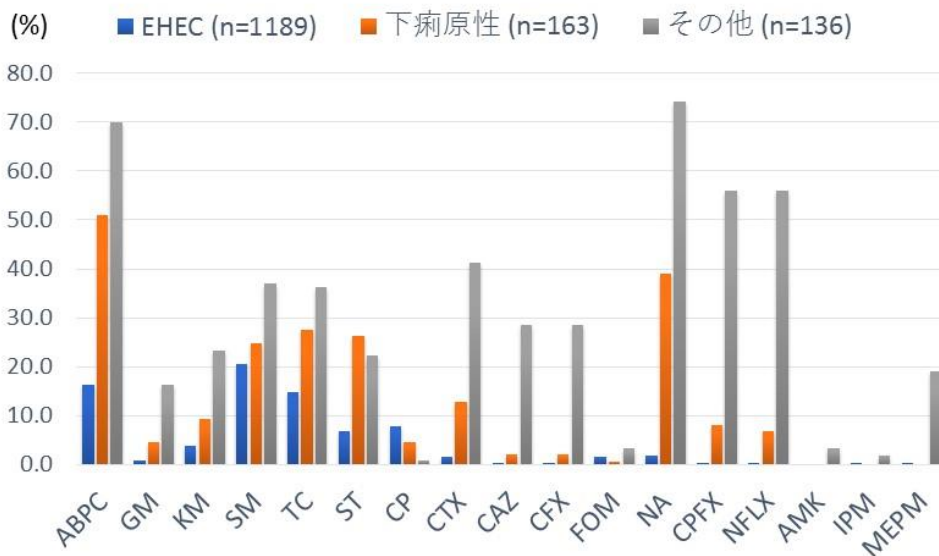


表15. ヒト及び食品由来*C.jejuni/coli*の耐性率  
(2018～2019年分離株)

ヒト由来株

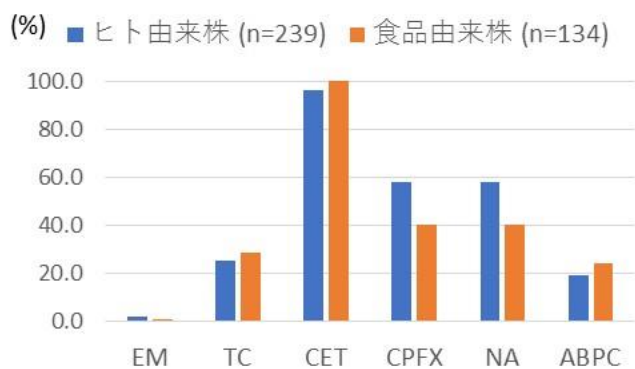
	2018			2019			2018-2019		
	jejuni (n=94)	coli (n=6)	合計 (n=100)	jejuni (n=145)	coli (n=10)	合計 (n=155)	jejuni (n=239)	coli (n=16)	合計 (n=255)
EM	2.1	16.7	3.0	1.4	10.0	1.9	1.7	12.5	2.4
TC	16.0	33.3	17.0	31.0	30.0	31.0	25.1	31.3	25.5
CET	92.6	100.0	93.0	98.6	100.0	98.7	96.2	100.0	96.5
CPFX	44.7	83.3	47.0	66.9	80.0	67.7	58.2	81.3	59.6
NA	45.7	83.3	48.0	66.2	80.0	67.1	58.2	81.3	59.6
ABPC	11.7	33.3	13.0	23.4	40.0	24.5	18.8	37.5	20.0
1剤以上耐性数	89	6	95	145	10	155	234	16	250
1剤以上耐性率	94.7	100.0	95.0	100.0	100.0	100.0	97.9	100.0	98.0

食品由来株

	2018			2019			2018-2019		
	jejuni (n=60)	coli (n=12)	合計 (n=72)	jejuni (n=74)	coli (n=12)	合計 (n=87)	jejuni (n=134)	coli (n=24)	合計 (n=158)
EM	0.0	25.0	4.2	1.4	25.0	4.7	0.7	25.0	4.4
TC	25.0	58.3	30.6	31.1	66.7	36.0	28.4	62.5	33.5
CET	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
CPFX	35.0	58.3	38.9	44.6	58.3	46.5	40.3	58.3	43.0
NA	35.0	58.3	38.9	44.6	58.3	46.5	40.3	58.3	43.0
ABPC	30.0	16.7	27.8	18.9	50.0	23.3	23.9	33.3	25.3
1剤以上耐性数	60	12	72	74	12	86	134	24	158
1剤以上耐性率	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

図9. ヒト及び食品由来  
*C.jejuni/coli*株の  
薬剤耐性率  
(上表のグラフ)  
(2018～2019年分離株)

*C.jejuni*



*C.coli*

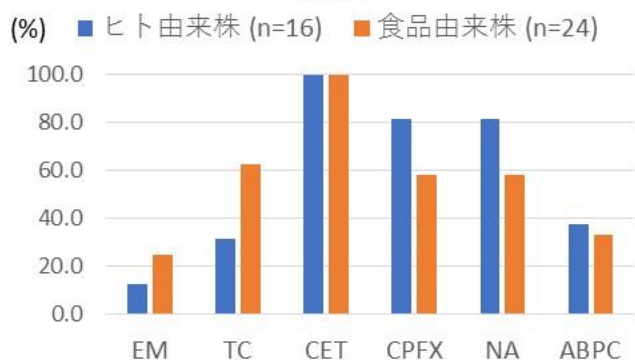


図10. サルモネラ株及び大腸菌株におけるESBL産生遺伝子及びAmpC遺伝子の検出

**対象菌株：**2015～2018年分離サルモネラ属菌株及び大腸菌株のうち、CTX, CAZ, CFXの1剤以上に耐性を示す菌株

**方法：**菌株から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、PCR法で検出

ESBL 遺伝子検査用プライマー一覧				AmpC 遺伝子検査用プライマー一覧			
遺伝子型		Primer	size(bp)	遺伝子型		Primer	size(bp)
TEM型	TEM-410F	GGTCGCCGCATACACTATTCTC	372bp	FOX型	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp
	TEM-781R	TTTATCCGCCTCCATCCAGTC			FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTG	
SHV型	SHV-287F	CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC	231bp	EBC型	EBCMF	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302bp
	SHV-517R	CCGGGAAGCGCCTCAT			EBCMR	CTTCCA CTGCGGCTGCCAGTT	
CTX-M-1型	ctxm1-115F	GAATTAGAGCGGCAGTCGGG	588bp	ACC型	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp
	ctxm1-702R	CACAACCCAGGAAGCAGGC			ACCMR	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
CTX-M-2型	ctxm2-39F	GATGGCGACGCTACCCC	107bp	DHA型	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405bp
	ctxm2-145R	CAAGCCGACCTCCCGAAC			DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
CTX-M-8/25型	ctxm8g25g-533F	GCGACCCGCGGATAC	186bp	CIT型	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAA	462bp
	ctxm8g25g-718R	TGCCGGTTTTATCCCCG			CITMR	TTTTCTCTGAACGTGGCTGGC	
CTX-M-9型	ctxm9-16F	GTGCAACGGATGATGTTCCG	475bp	MOX型	MOXMF	GCTGCTCAAGGACACAGGAT	520bp
	ctxm9-490R	GAAACGTCTCATCGCCGATC			MOXMR	CACATTGAATAGGTGTGGTGC	

図11. ヒト及び食品由来サルモネラ株のESBL産生遺伝子及びAmpC遺伝子保有

ヒト由来株						食品由来株					
分	離	耐	CTX	GAZ	CFX	分	離	耐	CTX	GAZ	CFX
年	年	性				年	年	性			
数		数				数		数			
1	2016	10	R	R	R	1	2015	7	R	I	R
2	2016	2	R	S	S	2	2015	5	R	R	S
3	2016	8	R	R	S	3	2015	8	R	R	R
4	2016	3	S	S	R	4	2015	6	R	R	S
5	2016	7	R	R	S	5	2015	5	R	R	S
6	2016	7	R	R	S	6	2015	9	R	R	R
7	2016	10	R	R	R	7	2015	6	R	R	R
8	2016	6	R	R	R	8	2015	5	R	R	S
9	2017	5	R	R	S	9	2016	7	I	R	R
10	2017	5	R	R	S	10	2016	7	R	R	S
11	2017	7	R	R	S	11	2016	8	R	R	R
12	2017	4	R	S	S	12	2016	8	R	R	R
13	2017	8	R	I	S	13	2016	5	R	R	S
14	2017	8	R	I	S	14	2016	7	R	R	S
15	2017	8	R	S	S	15	2016	6	R	R	R
16	2017	7	R	R	S	16	2017	7	R	R	R
17	2017	9	R	R	R	17	2017	6	R	S	S
18	2017	8	R	R	R	18	2017	7	R	R	R
19	2018	2	R	I	S	19	2017	7	R	R	R
20	2018	7	R	R	S	20	2017	6	R	R	R
21	2018	4	R	I	I	21	2017	6	R	R	R
22	2018	3	R	R	S	22	2017	6	I	R	R
23	2018	6	R	I	S	23	2017	6	R	R	R
24	2018	11	R	R	S	24	2018	7	R	R	R
25	2018	7	R	R	S	25	2018	7	R	R	S
26	2018	8	R	R	R	26	2018	8	R	R	R
						27	2018	7	R	R	R
						28	2018	8	R	R	R
						29	2018	7	R	R	S
						30	2018	6	I	I	R
						31	2018	5	R	R	S

耐性遺伝子	ヒト由来株	食品由来株
<b>ESBL (gr: group)</b>		
CTX-M-1 gr.	10	6
CTX-M-2 gr.	1	1
CTX-M-8/25 gr.	0	0
CTX-M-9 gr.	4	0
SHV型	1	0
TEM型	6	5
<b>AmpC</b>		
ACC型	0	0
CIT型	5	18
DHA型	1	0
EBC型	0	0
FOX型	0	0
MOX型	0	0

(2015～2018年分離株)

図12. ヒト由来大腸菌株のESBL産生遺伝子及びAmpC遺伝子保有

ヒト由来大腸菌株						
分	類	分	耐	CTX	GAZ	CFX
年		年	性			
数		数	数			
1	EHEC	2016	3	R	I	S
2	EHEC	2017	3	R	S	S
3	EHEC	2018	2	R	I	S
4	EHEC	2018	2	R	I	I
5	EHEC	2018	2	R	I	S
6	EHEC	2018	3	R	R	S
7	EHEC	2018	2	R	S	S
8	下痢原性	2015	3	R	S	S
9	下痢原性	2015	2	R	S	S
10	下痢原性	2015	4	R	S	S
11	下痢原性	2016	3	R	S	S
12	下痢原性	2016	2	R	S	S
13	下痢原性	2016	6	R	S	S
14	下痢原性	2016	2	R	I	S
15	下痢原性	2016	4	R	R	S
16	下痢原性	2016	3	R	S	S
17	下痢原性	2017	4	R	S	S
18	下痢原性	2018	3	R	I	S
19	下痢原性	2018	5	R	S	S
20	下痢原性	2018	2	I	I	R
21	下痢原性	2018	5	R	S	S
22	下痢原性	2018	2	I	I	R
23	その他	2015	8	R	R	R
24	その他	2015	10	R	R	R
25	その他	2016	2	R	S	S
26	その他	2016	6	R	R	S
27	その他	2017	5	R	S	S
28	その他	2017	8	R	R	R
29	その他	2017	11	R	R	R
30	その他	2017	11	R	R	R
31	その他	2017	10	R	R	R
32	その他	2017	12	R	R	R
33	その他	2017	9	R	I	R
34	その他	2017	12	R	R	R
35	その他	2017	7	R	R	R
36	その他	2017	8	R	R	R
37	その他	2017	5	R	S	I
38	その他	2017	6	R	R	S
39	その他	2017	5	R	S	S
40	その他	2017	9	R	R	S
41	その他	2017	3	I	I	R
42	その他	2017	12	R	R	I
43	その他	2018	12	R	S	R
44	その他	2018	8	R	R	R
45	その他	2018	5	R	S	S
46	その他	2018	7	R	S	S
47	その他	2018	5	R	S	S
48	その他	2018	6	R	S	R
49	その他	2018	8	R	I	S
50	その他	2018	7	R	S	I
51	その他	2018	13	R	R	R
52	その他	2018	13	R	R	R
53	その他	2018	11	R	R	R
54	その他	2018	9	R	R	R
55	その他	2018	12	R	R	R
56	その他	2018	13	R	R	R
57	その他	2018	12	R	R	R
58	その他	2018	12	R	R	R
59	その他	2018	12	R	R	R
60	その他	2018	10	R	R	R

耐性遺伝子	EHEC	下痢原性	その他
<b>ESBL (gr: group)</b>			
CTX-M-1 gr.	5	7	9
CTX-M-2 gr.	0	0	13
CTX-M-8/25 gr.	0	0	0
CTX-M-9 gr.	0	6	16
SHV型	0	0	0
TEM型	5	6	13
<b>AmpC</b>			
ACC型	0	0	0
CIT型	0	0	1
DHA型	0	0	0
EBC型	0	0	0
FOX型	0	0	0
MOX型	0	0	0

(2015～2018年分離株)



図13. サルモネラ株及び大腸菌株におけるコリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1-10*) の検出

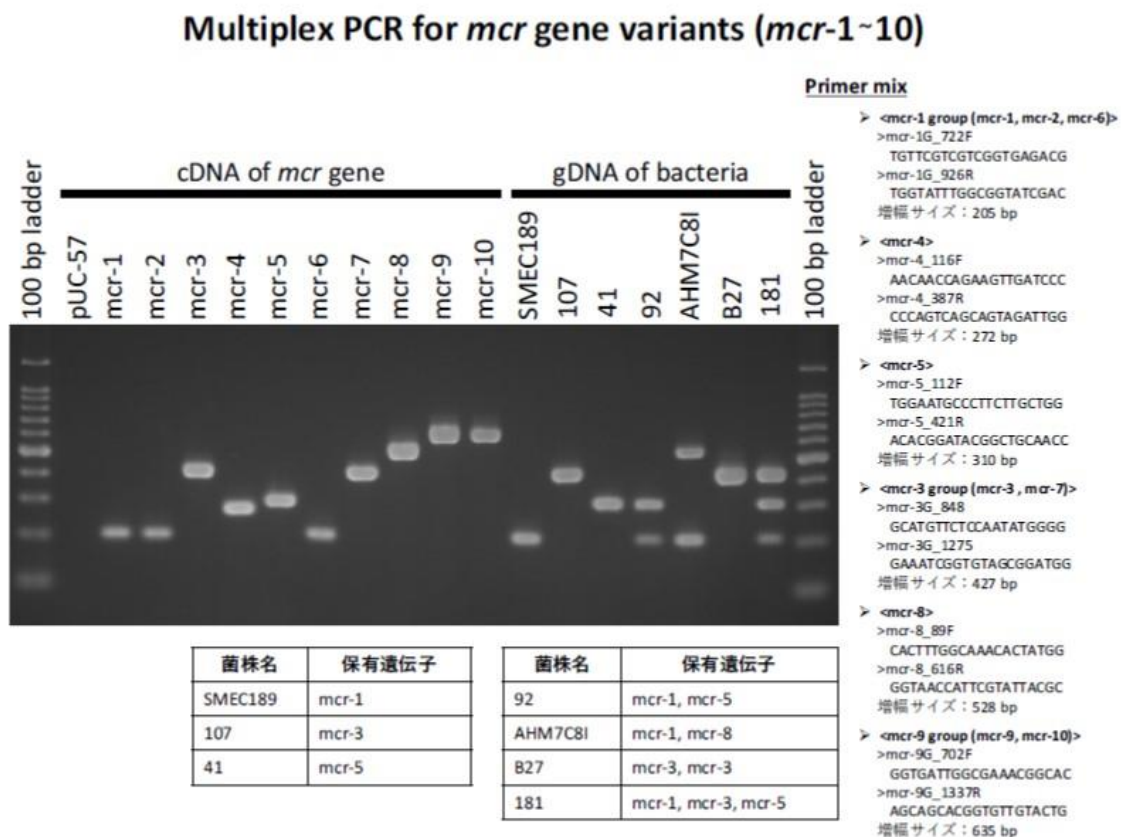


表16. 2015～2018年分離サルモネラ株及び大腸菌株におけるコリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1-10*) の検出  
(阻止円径 12 mm 以下の株について遺伝子検出の予定)

2015-2018サルモネラ株 コリスチン感受性ディスク阻止円						
		11mm以下	12mm	13mm	14mm以上	合計
ヒト由来	2015	4	69	105	210	388
	2016	9	33	149	170	361
	2017	3	64	128	215	410
	2018	1	23	82	211	317
	小計	17	189	464	806	1476
食品由来	2015	3	25	20	108	156
	2016	2	10	24	74	110
	2017	1	0	9	75	85
	2018	2	2	24	81	109
	小計	8	37	77	338	460
合計		25	226	541	1144	1936

2015-2018大腸菌株 コリスチン感受性ディスク阻止円							
	分類	11mm以下	12mm	13mm	14mm以上	合計	
ヒト由来	2015	EHEC	2	11	33	84	130
		下痢	0	0	1	22	23
		その他	0	0	0	12	12
	2016	EHEC	0	8	28	79	115
		下痢	0	1	4	27	32
		その他	0	0	0	24	24
	2017	EHEC	6	25	27	133	191
		下痢	0	1	3	22	26
		その他	1	3	5	19	28
	2018	EHEC	5	33	156	277	471
		下痢	0	1	12	37	50
		その他	7	6	11	18	42
	小計		21	89	280	754	1144