

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

(課題番号：H24-食品-一般-008)

平成26年度総括・分担研究報告書  
(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)

研究代表者 渡邊 治雄

国立感染症研究所 所長

平成27(2015)年3月

## 目次

### 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

#### 1. 平成 26 年度総括研究報告書

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…………… 1

**研究代表者**      **渡邊 治雄**      **国立感染症研究所 所長**

#### 2. 平成 26 年度分担研究報告書

( ) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の遺伝学的研究……………

**研究分担者**      **泉谷 秀昌**      **国立感染症研究所 細菌第一部**

( ) ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学的研究……………

**研究分担者**      **倉園 貴至**      **埼玉県衛生研究所**

**研究協力者**      **青木 敦子**      **埼玉県衛生研究所**

**砂押 克彦**      **埼玉県衛生研究所**

**松下 明子**      **埼玉県衛生研究所**

**近 真理奈**      **埼玉県衛生研究所**

**大塚佳代子**      **埼玉県衛生研究所**

**門脇奈津子**      **埼玉県衛生研究所**

**上野 裕之**      **さいたま市健康科学研究センター**

**土井 りえ**      **埼玉県食肉衛生検査センター**

( ) 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**

(IV) 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメント……………

**研究分担者**      **五十君静信**      **国立医薬品食品衛生研究所**

**研究協力者**      **石井 良和**      **東邦大学医学部微生物・感染症学講座**

**青木弘太郎**      **東邦大学医学部微生物・感染症学講座**

**朝倉 宏**      **国立医薬品食品衛生研究所**

**山本 詩織**      **国立医薬品食品衛生研究所**

(V) 家畜由来薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

研究分担者	川西 路子	農林水産省動物医薬品検査所
研究協力者	小池 良治	農林水産省動物医薬品検査所
	比企 基高	農林水産省動物医薬品検査所
	佐々木貴正	農林水産省動物医薬品検査所
	浅井 鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学研究科
	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
	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

( ) 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
	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
	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
	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

( ) 食品汚染及びヒト腸内細菌の薬剤耐性疫学

研究分担者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河原 隆二	大阪府立公衆衛生研究所
	原田 哲也	大阪府立公衆衛生研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所

( ) 伴侶動物病院から分離された薬剤耐性菌のヒトへの影響

研究分担者	田村 豊	酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット
研究協力者	白井 優	酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット

( ) 薬剤耐性化食中毒菌のヒトおよび家畜由来株のゲノム比較解析

研究分担者	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
	竹内史比古	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
	山下 明史	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

( ) JANIS と JVARM の連携.....

<b>研究分担者</b>	<b>柴山 恵吾</b>	<b>国立感染症研究所 細菌第二部</b>
<b>研究協力者</b>	<b>鈴木 里和</b>	<b>国立感染症研究所 細菌第二部</b>
	<b>川西 路子</b>	<b>動物医薬品検査所 検査第二部</b>
	<b>比企 基高</b>	<b>動物医薬品検査所 検査第二部</b>

( I ) 食肉の多剤耐性菌 ( VRE, ESBL 生産菌など ) の調査・研究.....

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

3 . 平成 2 6 年度業績.....

**学会発表一覧表**.....

**研究成果の刊行に関する一覧表**.....

平成 26 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業  
総括研究報告書  
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

研究代表者 渡邊治雄 国立感染症研究所所長

研究要旨：家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介してヒトに伝播し、ヒトの健康に危害を与える可能性について評価するため、モニタリング体制が構築されてきている。WHO は、世界における耐性菌の実態を明らかにするため Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) を設立し、食中毒菌などの薬剤耐性の国際的なサーベイランス体制の確立や検査法の統一を図ろうとしている。国内では食品安全委員会が家畜由来薬剤耐性菌のリスク評価を行っているが、医療上極めて重要な抗菌薬であるフルオロキノロンおよび第 3 世代セファロスポリンが俎上に載っている。近年、ヒト及び家畜由来大腸菌、サルモネラ株で CTX 型 ESBL 産生株、および CMY-2 型ラクタマーゼ産生株の分離率が上昇してきている。国内で分離された臨床、食品および家畜由来耐性菌の比較解析を行い、その関連性を解明し、リスク評価等に供するデータの作成が必要とされている。動物等で出現する耐性遺伝子がプラスミドを介してヒトの腸内細菌に伝播され、それがヒトで選択されることが考えられているが、プラスミド遺伝子の多様性のため、科学的証拠が少ない。網羅的に考察するためには、動物由来細菌、及びヒト由来細菌から分離される多くのプラスミド遺伝子のデータバンクを作成し、統計学的に解析する必要がある。今年度は、データバンクの作成を重点的に行い、動物 ヒト間の移動に関する解析を行った。また、動物で行われている耐性菌モニタリングシステム JVARM とヒトにおける院内感染症耐性サーベイランス JANIS のデータを総合的に解析できるようにするための相互関連ソフトを完成させた。それにより WHO 等への国際的なネットワークへの対応が可能となる。

**分担研究者：**

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
小島明美	農林水産省動物医薬品検査所
五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所
泉谷秀昌	国立感染症研究所
黒田 誠	国立感染症研究所
甲斐明美	東京都健康安全研究センター
田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
田村 豊	酪農学園大学獣医学部獣医公衆 衛生学教室
倉園貴至	埼玉県衛生研究所
柴山恵吾	国立感染症研究所
富田治芳	群馬大学大学院

**A. 研究目的：**

前回の「薬剤耐性食中毒菌に係る解析技術の開発及びサーベイランスシステムの高度化に関する研究」において、家畜飼育現場（農林省関連機関：動物医薬品検査所および動物衛生研究所）、食品取り扱い現場（国立医薬品食品衛生研究所）、医療現場にかかわる機関（国立感染症研究所、地方衛生研究所）との間で縦割り行政を越えての、横の連携をとり、畜産、ペット類の愛玩動物、食品および食中毒患者から分離される主にサルモネラ、カンピロバクター、病原性大腸菌、MRSA を中心とした薬剤耐性菌の現状及び動向について全国レベルの調査と解析を行ってきた（JVARM への連携）。一方、病院内における耐性菌の動向調査である院内

感染菌耐性モニタリングシステム (JANIS: Japan Nosocomial Infections Surveillance) が別個に厚生労働省の事業として動いている。今回の研究班においては、この JVARM と JANIS の相互乗り入れを可能にすることにより、動物等で選択された耐性菌が実際の臨床の場に入り込んで、ヒトに健康危害を及ぼしているのかに関して推察できるデータが得られる。耐性遺伝子はプラスミドを介して細菌間を移動していると考えられるが、プラスミド遺伝子の多様性のため、直接的関連性を示すデータが得られていないのが現状である。網羅的に解析するために、動物およびヒトから分離される耐性プラスミドのデータベースを構築し、バイオインフォマティクスの技術を使い詳細に解析し、耐性遺伝子の移動を明らかにする。この研究班で得られた成果を WHO・AGISAR の場を通して世界に発信することにより国際的貢献を果たす。

**B. 研究方法**

- 1) AGISAR および WHO AMR-TAG 会議に出席し、情報を集める
- 2) JVARM のデータを JANIS データフォーマットに準じたものに変換し、JANIS システムの集計プログラムを用いて、人由来株と家畜由来株のデータの比較が出来るようにする。
- 3) ヒトおよび食品由来株について、CP, TC, SM, KM, GM, ABPC, ST, NA, CTX, CPF, OFLX, FOM, NFLX, Su, VCM などの各種薬剤に対する薬剤耐性菌出現動向を調べる。

4) 次世代シーケンサーを用いて菌の染色体および耐性プラスミドの全ゲノム配列の解析を実施する。特に、増加傾向にある第三世代セファロスポリン耐性大腸菌を中心に解析を行う。

5) 現在公開されているプラスミド 2981配列の特徴 (Incタイプ、薬剤耐性因子、Insertion sequence、Transposon等)を用いたPlasmidomeネットワーク解析と、プラスミド保有菌種の情報 (菌種、分離年・国・地域・宿主、各種タイプピング結果等)を網羅しデータ・ベース化を行う

6) サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて、動物由来株 (担当: 秋庭、浅井)、愛玩動物由来株 (田村)、食品由来株 (五十君、甲斐、田口、倉園)、人由来株 (甲斐、田口、倉園、泉谷)の菌株の収集、耐性型、耐性遺伝子を行う。JANIS 院内感染由来大腸菌、MRSAの収集、解析 (柴山)。各菌株の遺伝子型 (PFGE, MLVA, MLST 等の分子疫学的解析手法により解析)の解析結果に基づき (泉谷、浅井、五十君) 遺伝型の整理を行い、データベースの構築を行う (渡邊、泉谷)。それらの中から詳細な全ゲノム配列 (特にプラスミドを中心に)の決定およびインフォーマティクスによる解析を行い、菌株あるいは耐性遺伝子の動物からヒトへの移動に関する推定を行う (黒田)

### C. 研究結果概要

1) 今年度4月15 - 16日、10月16日、12月2 - 3日に開催されたWHO AMR-TAGに参加して、2015年5月にWHO総会に提出される今後5か年間のglobal action planについて討議した。WHOは、薬剤耐性菌が環境 動物 食品 ヒトの総合的問題として取り組まなければ最終的解決が図れない点を強調している (薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子がそれらの間を自由に動き回り、伝播し続けている; 解決には、厚労省、農林省等のintersection間の連携が不可欠)。政府 (政治家、政策決定者等)、医療関係者、一般人を含めすべての人へ、薬剤耐性の重要性を理解してもらうための適切な情報の提供、啓発の重要性も指摘。4月の会議で2015年WHO総会の議案の下準備が行われ、特に下記の課題に対する討議が行われた。

リスクコミュニケーション: 政府 (政治家、政策決定者等)、医療関係者、一般人を含めすべての人へ、薬剤耐性の重要性を理解してもらうための適切な情報の提供、啓発を行う; 薬剤の使用を含めた考え方、薬剤を受ける行動パターンの改善を図る 薬剤耐性の評価: 薬剤耐性のサーベイランス、薬剤の使用状況のモニタリング体制を確立し、それによって得られる科学的データに基づくヒトへの健康影響評価をおこなう。 対策とその継続: 多関連機関 (ヒ

ト、動物、環境等に係る機関)との連携による耐性問題への対応とそれを行った場合の経済的効果のレビューを行う。耐性問題はヒトの健康にかかわる国家的問題としてとらえることが重要。10月の会議では、2015年5月WHO総会に提出する「微生物 (細菌ばかりでなくウイルス、寄生虫、真菌を含む)の薬剤耐性に対処」するためのGlobal action planについての討議が行われた。WHOは6項目を対象にした行動計画を立て、それを履行することを各国に求めている。公共への啓発、教育や訓練を通して耐性菌の問題点を関係者 (国民、医療従事者、政治家等)に理解してもらう。研究 (調査) やサーベイランスを通して得られるヒト、動物、環境の耐性菌の実態の理解を深める。効果的な衛生状況の改善や感染症防止策を通し、感染症の罹患率を減少させる。ヒトや動物への抗菌薬の使用を適正化させる。新薬、診断薬、ワクチン等の開発を促進する。行動計画の実行と達成度の評価を行う; 2年ごとに各国は達成状況をWHOに報告する。最終目標をAMRの頻度の減少、AMRによる死亡率の減少、治療不可能な重症感染症の患者数を最終的にゼロにする、開発途上国において迅速診断できる病原体の数の増加を図る、第2相の臨床治験に入る新薬の使用の制限、ヒトに使用する抗菌薬の量を削減、動物等に使う抗菌薬の量の削減、ヒトや動物以外に使用する抗菌薬をゼロにする、ことを挙げている

2) JANIS データフォーマットに準じた新JVARM データフォーマット (Ver1.0) を作成した。そして、JVARM データを新JVARM フォーマットに変換するプログラムを作成し、家畜由来細菌のアンチバイオグラムを作成するシステムを構築した。平成26年度は、農水省の手続きが進み、JVARMの過去10年間分の実データを研究班用として受けとった。12月現在、JVARM実データによるアンチバイオグラムを作成し、JANISとの比較を行う予定である。

3) 腸内細菌科におけるESBL (CTX-M) およびカルバペネマーゼ (NDM-1, KPC) のプラスミドを介した伝達頻度をPlasmidomeネットワークとして図示化することに成功し、俯瞰的な解析法の基盤を作成した。このネットワーク・データベースを重厚なものとするため、プラスミド配列解析ソフトGPAT、そして得られたプラスミド配列の関係性を明確にするネットワーク解析ソフトiPATを開発した。

4) 2014年11月に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ111株について血清型別試験および薬剤感受性試験を実施した (集団事例由来株は代表1株を実施)。血清型は34血清型に分類された。多く分離された血清型は09群Enteritidis (17株)、07群Infantis (17株)、04群Typhimurium (10株) およびChester (10

株)であった。各血清型の耐性菌出現率を比較すると、Infantisが70.6%、Typhimuriumは70%と耐性率が高いのに対し、Enteritidisでは17.6%、Chesterは全て感受性菌であった。このように血清型によって耐性率に差が認められた。

5)2012年は46検体(83.6%)、2013年は24検体(100%)からESBL/AmpC産生大腸菌が検出された。2013年はAmpC産生大腸菌検出用の分離平板を追加した結果、AmpC産生大腸菌の検出数が増え、ESBL産生大腸菌とAmpC産生大腸菌が両方検出された検体が22検体(91.7%)となった。2012年に国内の養鶏団体がセフトチオフルの使用に関して自主的に注意喚起を行ったことから、農場の鶏糞からのESBL/AmpC産生大腸菌の検出は2012年から減少している。しかし市販鶏肉ではその後もまだ高率に存在していることが明らかになった。

6)牛由来 *Salmonella enterica* 04:i:- の  $bla_{CTX-M-55}$  遺伝子は、プラスミドではなく染色体上に存在した。 $bla_{CTX-M-55}$  遺伝子周辺塩基配列の解析から、本菌の多剤耐性は染色体に挿入されたプラスミド由来断片に規定されている可能性が示唆された。なお、 $bla_{CTX-M-55}$  は  $bla_{CTX-M-15}$  と1塩基1アミノ酸の相違しかなく、本菌株が保有する  $bla_{CTX-M-55}$  は複製の過程で  $bla_{CTX-M-15}$  に変異が入ったものと推察された。

7)2014年収集の189鶏肉検体(国内産100検体、海外産89検体)について調べた。その結果、国内産鶏肉39検体(39%)、海外産鶏肉79検体(89%)からそれぞれVREが検出された(VanA型1検体、VanC1型100検体、VanC2型15検体、VanN型2検体)。このうち臨床で問題となるVanA型VREはブラジル産鶏肉検体から検出された。今回分離したVanA型VRE株は過去にブラジル産鶏肉から分離されたVREと同一のPFGEパターン、ST型(MLST解析)を示したことから、同一起源の株であることが示唆された。一方、VanN型VREは国内産鶏肉2検体(宮崎県産鶏肉1検体2株、群馬県産鶏肉1検体2株)から検出された。これまでに我々は新規のVanN型VREを環境(国内産鶏肉)由来株として世界で初めて分離し、2012年に報告している。今回新たに分離されたVanN型VRE株の解析を行ったところ、全て同一のPFGEパターンを示し、さらに2009年収集の国内産鶏肉検体から分離したVanN型VRE株とも同一パターンであった。またMLST解析でST型が一致したことからこれらは同一由来株であることが示された。これらの結果は、新規のVanN型VREが国内の環境中(養鶏場)に既に拡がっていることを示している。しかし、これらの株は我々の収集し解析した臨床分離腸球菌株の遺伝子型とは異なるものであり、直接の関連性は認められなかった。

8)第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の性状

解析:2012年3月に国内の生産者団体からセフトチオフルの使用に関する注意喚起が自主的に行われ、2012年および2013年のプロイラーにおけるセファロスポリン耐性は、2011年に比べて有意に減少した。(2011年18.0%、2012年9.7%、2013年4.6%)2010~2013年におけるセファロスポリン耐性株のラクタマーゼ型別を行ったところ、2004~2009年の第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の解析と同様  $bla_{CMY-2}$  が優勢であった。トランスコンジュガントを用いたプラスミドの解析では  $bla_{CMY-2}$  を保有するプラスミドのレプリコン型は、2010年から2013年の分離株においていずれの年もIncKが主要な型として認められ、IncI1もIncKに次いで多く認められた。その一方で2010年度まで主要なInc型の一つとして認められた多剤耐性プラスミド(IncA/C)は2013年に1株認められたものの減少傾向であった。セフトチオフルの自主規制に伴う当該製剤の選択圧の減少によって、プラスミドの維持に関連する負荷(biological cost)の差異が関連したと推察された。

9)MSSA、MRSA、MRCNSの遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性:LA-MRSAについては、我が国の豚においてMRSA ST398の分布が確認され、ゲノム解析によりSCCmec型がヨーロッパ等で報告されているものとは異なる新規のものであることが明らかとなった。MSSAのMLST解析により、ST398はMSSAの主要なST型として高率(7/15株(46.7%))に認められた。その一方で今回調べたMSSAには国内で分離されたMRSA ST398と同spa型かつ同薬剤耐性型の株は認められなかった。またMRCNSにおいて国内で分離されたMRSA ST398と同じSCCmec型は認められなかった。以上より新規のSCCmec型を持つMRSA ST398が一部の豚農場に分布していることが確認されたが、本調査で確認されたMRSA ST398の起源となりうるMSSA及びMRCNSは認められなかった。

10)2012年から2014年にかけて埼玉県内で11から分離された $bla_{EHEC}$  366株、腸管出血性大腸菌(STEC)373株、赤痢菌13株、 $katG$   $bla_{CTX-M-59}$  株の薬剤感受性試験を実施した。その結果、 $bla_{EHEC}$ 耐性株が、 $bla_{EHEC}$ で1株、STECで1株、赤痢菌で5株、 $katG$   $bla_{CTX-M-59}$ で29株が、CTX耐性株は $bla_{EHEC}$ で4株、STECで1株、赤痢菌で4株検出されている。環境由来では、市場等で購入した食肉などの食品202検体、動物指導センターの協力で得られた $bla_{EHEC}$ の糞便443検体、およびアライグマの糞便533検体を材料として、食品は $bla_{EHEC}$ 、STEC、 $katG$   $bla_{CTX-M-59}$ 、 $bla_{EHEC}$ およびアライグマ糞便については $bla_{EHEC}$ を対象として検査を実施した。食品では鶏肉から $bla_{EHEC}$ 耐性 $katG$   $bla_{CTX-M-59}$ が分離された。 $bla_{EHEC}$ およびアライグマ糞便では、 $bla_{EHEC}$  5検体、 $katG$  1検体、アライグマ13検体から $bla_{EHEC}$ が分離されたが、 $bla_{EHEC}$ およびCTX耐性株は分離

されなかった。

11)南九州の肉用鶏とヒトから分離された ESC 耐性大腸菌の比較:肉用鶏由来株 46 株およびヒト由来 15 株の MLST 解析を行い、全株の ST を決定するとともに、ESC 耐性を規定する遺伝子の検出を終了した。鶏由来株に 32 の ST を、ヒト由来株に 11 の ST を認めた。全体として肉用鶏由来株とヒト由来株の ST に類似性は認められなかったが、検出される ESC 耐性遺伝子は類似していた。すなわち *bla*<sub>CTX-M-14</sub>、*bla*<sub>CTX-M-15</sub>、*bla*<sub>SHV-12</sub> は両者から検出された。以上の成績は、肉用鶏とヒトに定着する大腸菌の遺伝子型は異なるが、肉用鶏由来株とヒト由来株の間で薬剤耐性プラスミド等耐性因子の交換が起きている可能性を示唆している。

12)国内で分離されたサルモネラ 4:i:- の性状解析:2000~2010 年に国内の様々な材料から分離された 4:i:- 51 株の性状を解析した。ST を検出するための m-PCR 及び PCR では全ての供試菌株で陽性の結果が得られたことから、4:i:- は Typhimurium の単相変異株と考えられた。また CGH 解析等の結果から、2 相 H 抗原を規定する染色体領域の大規模欠失または点変異が単相化の原因であることが示唆された。薬剤感受性を調べたところ、39 株 (76%) は全ての供試薬剤に感受性が単剤耐性を示した。残りの 12 株 (24%) は ASSuT または類似の薬剤耐性パターンを示した。一方、PFGE と MLVA による型別で極めて類似度の高いグループの中にヒト、豚肉、及び牛由来株が含まれていたことは、何らかの疫学的関連の存在を示唆するが、その多くは供試した全ての薬剤に感受性であった。2013 年に、それ以前の分離株には認められない多剤耐性菌が分離された。本菌は ESC にも耐性を示し、 $\beta$ -ラクタマーゼを規定する遺伝子は *bla*<sub>CTX-M-55</sub> で、染色体上に存在した。周辺塩基配列を解析したところ、他菌種が保有するプラスミドの塩基配列と相同であることが明らかとなり、プラスミドが染色体に挿入されたものと推察された。ESC 耐性サルモネラは公衆衛生上の脅威と考えられることから、わが国の牛群における当該クローンの動向には今後、特段の注意を払う必要がある。

#### D. 考察

家畜現場の耐性菌モニタリング JVARM ( Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)と院内感染菌耐性モニタリングシステム JANIS ( Japan Nosocomial Infections Surveillance)の連携を強化し、動物等で選択された耐性菌が実際の臨床の場に入り込んで、ヒトに健康危害を及ぼしているのに関しても明らかにしていくことは重要である。JVARM のデータを JANIS ファーマットに変換するためのソフトを作成し、お互

いのデータの比較解析をできるようにした。今後、試行を繰り返し、更なる改良をすることが必要である。予備的データとしては、動物の耐性菌率とヒトの耐性菌率の間にはかなりの差があるようである。動物の耐性菌がヒトに入り込んでいることは確かであろうが、その後ヒトに使用される抗菌薬の量や種類により、耐性菌の選択等が起こることがあるので単純な比較でものをいうことは難しいようである。今後の解析でお互いの影響要因等の解析も必要になり、かなり複雑な因子が絡むようである。

JVARM の報告からは、プロイラー由来大腸菌でセファロスポリン耐性株が 2004 年以降、セファロスポリン系薬剤は鶏の治療薬として承認されていないにもかかわらず、増加傾向が認められた。耐性株では CMY-2  $\beta$ -ラクタマーゼが優勢であり、セファロスポリン耐性遺伝子の分布に 4 種類のプラスミド ( IncA/C, IncB/O, IncI1 及び IncI ) が関与し、4 種類のプラスミドのうち IncA/C が多剤耐性プラスミドであること、*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有するプラスミドのレプリコン型は、IncI1-I が多く認められたことが明らかになった。また、ヒトから分離されるセファロスポリン耐性大腸菌との MLST 解析の比較では、プロイラー由来大腸菌とヒト由来大腸菌では、その遺伝型に共通する部分が少ないことが判明した。しかし、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子型や Inc 型では共通するものが見られることから、鶏の大腸菌が人の腸管に入ってもそのまま定着するのではなく、プラスミドがヒトの大腸菌に伝達して安定化している可能性、又はヒトの大腸菌にあるプラスミドと組み換えを起こし安定化する、あるいは薬剤耐性遺伝子をコードしている動く遺伝子だけがヒトの大腸菌のプラスミド、あるいは染色体に入り込んでいる可能性が考えられた。このような変遷をゲノムレベルで証明するためには、痕跡として残されているゲノムの情報を解析する必要がある。まずは、世界中で解析されてきている耐性プラスミドの情報の整理を行うため、プラスミド配列解析ソフト GPAT、そして得られたプラスミド配列の関係性を明確にするネットワーク解析ソフト iPAT を開発した。腸内細菌間のプラスミドの伝達はかなり高い頻度で起こっている可能性があること、且つ容易に組み換えを起こし遺伝学的に多様性が生じていると考えられるので、マスとして解析する必要がある。今回開発したソフトは、プラスミドの大規模なデータ・ベースからの解析を促進すると思われる。

今後も輸入食肉 (鶏肉) と国内食肉 (鶏肉) の多剤耐性菌、特にヒト臨床上問題となる  $\beta$ -ラクタム耐性腸内細菌科菌 (ESBL 産生菌、AmpC 産生菌等) 及びバンコマイシン耐性腸球菌 VRE (多剤耐性腸球菌を含む) の分離状況を継続的



に把握することが必要である。食肉から分離された耐性菌株について分子疫学的解析（PFGE、MLST、耐性型の同定）を行い食肉由来株とヒト臨床由来株との関連性を調べる。また耐性菌が保持する各種耐性遺伝子の同定と局在、及びその伝達性を調べることにより、環境（家畜）からヒトへの耐性菌の伝播、拡散機構について明らかにすることも重要である。

特に日本の家畜環境から分離されている新型 VanN 型 VRE のヒト環境内での拡散状況、関連性を明らかにするために詳細な遺伝子解析（全体のオペロン構造とその局在、伝達性）及びヒト臨床分離腸球菌株、特にバンコマイシン低度耐性株、Van 型別不明株を含めた詳細な検索が必要である。また他の家畜環境（他の農場、屠場等）を含めた全国的な調査が重要と考える。

継続的な家畜由来株の薬剤感受性のモニタリング、特に人医療上極めて重要な成分の一つであるセファロスポリン及びフルオロキノロンについて遺伝学的解析を含め継続的に実施する必要がある。また今回の結果より *C. jejuni* のマクロライド耐性の出現について注意が必要である。

JVARM 側において、測定する抗菌薬をヒトで用いるものに合わせ、また菌株数を代表性が確保できる程度に増やし、継続的にデータを収集する体制の構築が必要である。

## E. 結論

JVARM のデータを JANIS ファーマットに変換するためのソフトの開発を行った。近い将来、我が国に

において WHO-AGISAR が求めている integrated surveillance に到達できるであろう。耐性遺伝子が腸管内で、高頻度で移動している可能性があり、それらを明らかにするためのツールとして、プラスミド配列解析ソフト GPAT、そして得られたプラスミド配列の関係性を明確にするネットワーク解析ソフト iPAT を開発した。今回開発したソフトは、プラスミドの大規模なデータ・ベースからの解析を促進し、食品等を介して人の腸管に入り込んだ耐性遺伝子がヒトの腸内細菌に入り込んでいく証拠を提供するためのツールとして利用できるようになることが期待される。

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## G. 健康危険情報

WHO は 2015 年の総会に耐性菌のコントロールに向けた世界戦略として Global action plan を提出し、各国に耐性菌の減少に向けての 5 年間の行動計画を作成することを求める。

ブロイラー由来の大腸菌のセファロスポリン耐性菌が 2012 年には減少した。業者による自主的なセフチオフルの使用規制が関与している可能性が考えられる。

## H. 研究発表

### (1) 国内

臼井優、佐藤豊孝、大久保寅彦、田村豊、伴侶動物由来細菌へのフルオロキノロン剤曝露による耐性菌出現リスク、獣医畜産新報、66：279-282. 2012.

### (2) 海外

1) Ishihara K, Saito M, Shimokubo N, Muramatsu Y, Maetani S, Tamura Y. Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff of companion animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* in press. 2014.

2) Ishihara K, Saito M, Shimokubo N, Muramatsu Y, Maetani S, Tamura Y. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staff and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.* 58. 149-154. 2014.

3) Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y. Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.* 5. 513. 2014.

4) Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB-TolC efflux pump-associated intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.* 76. 937-945. 2014.

5) Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y. Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J. Infect. Chemother.* 20. 243-249. 2014.

6) Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y. Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-01-ST648 *Escherichia coli* carrying bla<sub>CMY</sub>-2 from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med.*

*Microbiol.* 63. 263-270. 2014.

7) 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)

8) 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)

9) 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)

10) Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M. Characterization of Antimicrobial Resistance Dissemination across Plasmid Communities Classified by Network Analysis. *Pathogens.* 3(2):356-376, 2014

11) Mather AE, Reid SW, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, Lemey P, Mellor DJ, Haydon DT, Thomson NR. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in different hosts. *Science.* 2013 Sep 27;341(6153):1514-7.

12) Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of blaTEM-52-Carrying Plasmids of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Isolates from Chicken Meat with a Common Supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7545-7. doi: 10.1128/AAC.02731-14. Epub 2014 Sep 22. PubMed PMID: 25246394.

13) Sekizuka T, Lee K, Kuroda M, Kusumoto M, Iwata T, Uchida I, Tanaka K, Tamamura Y, Akiba M. Whole-Genome Sequence of CMY-2-β-Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain L-3553. *Genome Announc.* 2014 Jul 24;2(4). pii: e00711-14. doi: 10.1128/genomeA.00711-14. PubMed PMID: 25059867; PubMed Central PMCID: PMC4110225.

14) Kudo M, Nomura T, Yomoda S, Tanimoto K,

Tomita H. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan. *Microbiol Immunol.* 58:607-614, 2014.

15) Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein BacL<sub>1</sub> of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala<sup>2</sup>-crossbridged peptidoglycan. *J Bacteriol.* (In Press)

16) Asai, T., Hiki, M., Baba, K., Usui, M., Ishihara, K., Tamura, Y. 2012. Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 551-552.

17) Kawanishi, M., Ozawa, M., Hiki, M., Abo, H., Kojima, A., Asai, T. 2013. Detection of *aac(6')-Ib-cr* in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 19(5):823-5.

18) Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. 2013. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 10(3): 243-249.

19) Usui, M., Nagai, H., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T. 2013. Effect of antimicrobial exposure on *acrAB* expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis*. *Front Microbiol.* 4:53, 2013.

20) Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal.* 67:14

21) Francis Shahada, Takehisa Chuma, Gakudoh Kosugi, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, and Masato Akiba • Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan • *Poultry Science* • 92(6)1641-1649 • 2013

22) Noriko Ido, Ken-ichi Lee, Kaori Iwabuchi, Hidemasa Izumiya, Ikuo Uchida, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, Makoto Ohnishi, and Masato Akiba • Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4, [5], 12: i: - as a monophasic variant of serovar Typhimurium • *PLoS ONE* • 9(8):e104380 • 2014

23) Noriko Ido, Kaori Iwabuchi, Yusuke Sato,

Yasuo Sato, Masaru Sugawara, Gakuji Yaegashi, Masaru Konno, Masato Akiba, Kiyoshi Tanaka, Katsuhiko Omoe, and Ikuo Uchida • Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- isolated from

humans, animals, and river water in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis • Journal of Veterinary Medical Science • *in revision*

平成 26 年度 厚生労働省 食品の安心確保推進研究事業  
「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」

「ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の遺伝学的研究」

分担研究報告書

研究分担者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨：本研究班では、ヒトの健康への脅威となる食品由来細菌感染症に関して、主として薬剤耐性菌に着目し、薬剤耐性食中毒菌による健康被害の発生動向を把握するための監視体制に関して、ヒト、食品、環境および家畜といった多方面からの情報整備をすることを目的とする。そのための基礎研究として上記耐性菌を含め、さまざまな菌の解析手法を開発しサーベイランスシステムに組み込むことで上記情報整備の拡充、高度化を図る。本分担研究においては、特に、サルモネラ等の腸管系細菌をはじめ、食品汚染を介した細菌感染症に着目して上記目的のための新規要素の検討を行う。

A. 研究目的

薬剤耐性の問題がグローバル化する中で、サーベイランスにおけるギャップを把握し、埋めていくことは、よりよいサーベイランス体制構築に欠かせない。本研究ではシガ毒素産生性大腸菌（STEC）の薬剤耐性について、経年変化を追った。また、WHO - GFN が実施している外部精度管理試験において使用されているブレイクポイントの変遷と、結果に与える影響を調べた。

（倫理面への配慮）

食中毒事例に関し、ヒトの臨床情報等を扱う場合には、事前に研究倫理委員会の承認を得た上で、個人情報の取り扱いに注意し、研究を遂行する。分離した菌株に関しては、匿名化を図り、特定の個人に不利益が生じないように配慮する。

B. 研究方法

1. 薬剤感受性試験：BD 社のセンシディスクを用いて、CLSI に準拠した方法により試験し判定を行った。使用した薬剤はアンピシリン（A）、ストレプトマイシン（S）、テトラサイクリン（T）、シプロフロキサシン（Cip）、カナマイシン（K）、セフォタキシム（Ct）、クロラムフェニコール（C）、ST 合剤（Sx）、スルフィソキサゾール（Su）、ゲンタマイシン（G）、ナリジクス酸（N）、セファロチン（Cf）、ホスホマイシン（F）、セフォキシチン（CFX）、セフォタン（CTT）、アミカシン（AMK）、イミペネム（IPM）およびメロペネム（MEPM）の 18 剤であった。

2. 一濃度スクリーニング：アジスロマイシン、シプロフロキサシン、セフォタキシム、およびホスホマイシンを、それぞれ 50、0.1、1 および 50 mg/L 含む LB 寒天培地を調製した。上記 4 種の培地に試験菌株を植菌し、明らかに生息してきたものを R、わずかに生えてき

たものを r とした。

## C. 研究結果および考察

### 1. シガ毒素産生性大腸菌 (STEC) 薬剤耐性の傾向

1998 年から 2013 年までの分離株から各年 150-500 株程度選択し、ディスク法による感受性試験を行った。

結果を表 1 に示す。各カラムには約 30% を最大の網掛けとした帯グラフを賦してある。

耐性が多くみられる薬剤は、スルフィソキサゾール、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリンであり、15 年間の平均はそれぞれ、20.5、20.1、14.6、13.6% であった。

これらに次いで、セファロチン、ST 合剤、カナマイシン、クロラムフェニコールに対して 2-5% 程度の耐性を示した。

年ごとに若干の変動はあるものの、その耐性率に顕著な減少もしくは増加を示す薬剤は見られなかった。

STEC および他の腸管系細菌において特に注視すべき薬剤ホスホマイシン、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 3 剤については 1% 以下であり、これらについても大きな変動は見られなかった。また、セフォテタン、アミカシン、イミペネム、メロペネムについては中間および耐性は見られなかった。

### 2. STEC2013 年株のスクリーニング

上で述べたように、ホスホマイシン、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 3 剤の耐性率は非常に低かった。本 3 剤と昨年度赤痢菌について試験したアジスロマイシンは今後、その耐性出現が懸念される。そこで、この 4

剤について STEC2013 年株について一濃度スクリーニング法を試行した。

結果を表 2 に示す。最も R が多かったのがアジスロマイシンで 1.9%、ついでセフォタキシムが 1.5%、ホスホマイシンが 1.1% であった。シプロフロキサシンが 0.5% と最も低かった。

これら R 株について 0 血清群の分布を見たところ、シプロフロキサシンを除いた 3 剤については 026 の割合が最も大きかった(図 1)。これは、耐性獲得要因の主たる経路がシプロフロキサシンに関しては染色体性なのに対し、他がプラスミド性であることが関連していると推測される。

### 3. WHO - GFN における外部精度管理について

WHO - Global Foodborne Infections Network (GFN) では、毎年サルモネラ、赤痢菌等について薬剤感受性試験の外部精度管理試験 (EQA) を実施している。

GFN-EQA において挙げられている薬剤は、アンピシリン、テトラサイクリン、シプロフロキサシン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、ST 合剤、サルファ剤、ゲンタマイシン、ナリジクス酸、セフォタジジム、セフトリアキゾン、トリメトプリムの 12 薬剤である。後者 3 薬剤が本研究では含まれていない。

また、セフェム系およびニューキノロン系薬剤については GFN-EQA において独自のブレイクポイントを設定している。これは EUCAST の epidemiological cut-off value (ECOFF) に関連していると考えられる。例えば、シプロフロキサシンに関して、CLSI のディスク法の間接判定は 16-20mm (15mm 以下で耐性、21mm 以上で感受性) であるが、GFN-EQA では

21-30mm となっている。これはチフス菌などの腸管外感染サルモネラに適用される基準である。

セフォタキシムに関しては、同じく CLSI における中間判定域が 23-25mm なのに対し、GFN-EQA では 27mm 以下で耐性、27mm より大で感受性（ここでは便宜的に中間 27.5mm とする）。結果 1 の 2012-13 年株について、それぞれの基準で耐性・中間・感受性をまとめたものを表 3 に示す。CLSI 基準（CTX23-25）による R は 0.7%、GFN-EQA（CTX27.5）による基準では R が 2.6%となる。参考までにセファロチンの阻止円がない（CF6）ものは 1.0%であり、CTX27.5 における耐性率よりも低くなる。セファロチンとセフォタキシムの阻止円径の分布を見ると、CTX23-25 における中間もしくは感受性領域（23mm 以上）と、CTX27.5 における耐性領域の重なり部分、すなわち 23-27mm 部分に該当する株は CF6 に該当していないことがわかる（表 4）。これらの株が野生株（感受性株）と異なる表現型を示すのは、ESBL に関連する遺伝子以外の遺伝子もしくは遺伝子変異に起因することが考えられる。今後こうした表現型の遺伝的背景を明らかにし、精度管理における補助的なマーカーを開発していく必要があると思われる。

耐性出現を極力広く探知するため、耐性の基準が年々変化してきている。セフォタキシムは 2010 年以前は中間領域が 15-22mm であったが、現在は 23-25mm である。上記のように GFN ではさらに広げられており、薬剤耐性サーベイランスにおいて精度管理の担保はますます重要性を帯びていると考えられる。

#### D. 結論

STEC 薬剤耐性の傾向は過去 15 年において目立った変化は起きていないと思われる。一方でアジスロマイシン、セフォタキシム、ホスホマイシン、シプロフロキサシン耐性が一定頻度で見られ、今後も注視していく必要がある。

薬剤耐性サーベイランスにおいて判定基準は重要であり、基準の変化に柔軟に対応していかななくてはならない。そのために精度管理を充実させる必要がある。また、精度管理を安定させる一つの因子として、遺伝学的背景などの情報収集も重要であると考えられる。

#### E. 研究発表等

Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*<sub>TEM-52</sub>-carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7545-7.

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

解析に使用した菌株を提供していただいた地方衛生研究所、動物医薬品検査所、動物衛生研究所等の諸先生方に深謝いたします。

年	ABPC	SM	TC	KM	CP	ST合剤	Su	GM	NA	CPFX	FOM	CTX	CF	CFX	株数
1998	14.03%	15.83%	13.43%	2.61%	1.80%			0.20%	0.20%	0.00%	2.20%	1.60%			499
1999	8.12%	19.80%	16.24%	1.02%	0.51%			0.00%	0.51%	0.00%	0.00%	2.03%			197
2000	8.00%	14.33%	8.33%	1.33%	0.33%			0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%			300
2001	10.67%	14.00%	13.33%	6.00%	1.33%		14.67%	0.67%	0.00%	0.00%	0.67%	0.00%			150
2002	14.00%	20.00%	10.50%	2.00%	0.00%		17.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.50%	1.50%			200
2003	13.50%	22.50%	16.50%	4.00%	1.00%		21.50%	0.50%	0.50%	0.00%	0.50%	1.00%			200
2004	13.50%	19.50%	16.00%	4.50%	3.00%	3.50%	20.50%	1.50%	0.00%	0.00%	1.00%	3.00%			200
2005	23.53%	25.34%	14.93%	1.81%	1.36%	1.36%	22.62%	0.00%	0.90%	0.00%	0.90%	1.81%			221
2006	12.06%	18.59%	16.08%	3.02%	1.01%	3.02%	20.10%	0.50%	1.01%	0.00%	2.01%	0.00%			199
2007	11.50%	22.00%	17.00%	4.00%	2.50%	1.50%	23.50%	0.50%	0.50%	0.00%	1.50%	0.00%	6.50%		200
2008	15.69%	21.57%	15.20%	3.43%	0.49%	2.94%	20.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.98%	0.00%	4.90%	0.00%	204
2009	15.03%	26.80%	20.92%	3.92%	2.61%	3.27%	26.80%	0.65%	1.31%	0.00%	1.96%	1.96%	5.23%	0.65%	153
2010	19.63%	27.57%	20.09%	2.34%	1.87%	2.80%	26.64%	0.00%	0.93%	0.00%	0.47%	2.34%	28.50%	0.00%	214
2011	14.43%	19.07%	10.82%	0.52%	5.15%	4.64%	19.59%	0.00%	0.00%	0.00%	0.52%	1.03%	13.92%	0.52%	194
2012	14.62%	19.81%	15.09%	1.89%	1.89%	2.83%	19.34%	0.00%	1.89%	0.47%	0.00%	0.94%	8.96%	0.00%	212
2013	9.31%	14.22%	8.33%	2.45%	2.94%	3.92%	14.22%	0.98%	0.98%	0.00%	0.49%	0.49%	10.29%	0.00%	204
平均	13.60%	20.06%	14.55%	2.80%	1.74%	2.98%	20.54%	0.34%	0.55%	0.03%	0.86%	1.11%	4.48%	0.19%	3547

表 1、STEC 薬剤耐性分布（1998-2013、ディスク法）

	AZM50	CPFX0.1	CTX1	FOM50
R	1.88%	0.53%	1.47%	1.06%
r	0.38%	0.06%	0.06%	
S	97.75%	99.41%	98.47%	98.94%
計	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

表 2、STEC 薬剤耐性分布（1濃度スクリーニング、2013、N=3200）

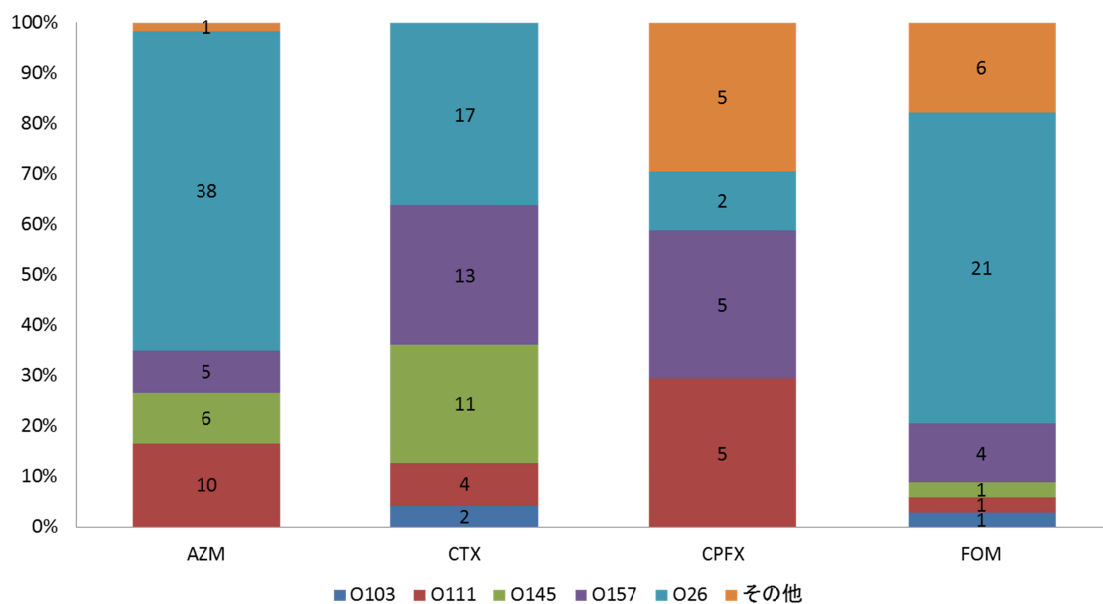


図 1、各耐性における血清群分布。AZM、アジスロマイシン；CTX、セフトキシム；CPF、シプロフロキサシン；FOM、ホスホマイシン。

	R	I	S	計
CTX23-25	0.72%	0.96%	98.32%	100.00%
CTX27.5	2.64%		97.36%	100.00%
CF6	0.96%		99.04%	100.00%

表 3、CLSI (CTX23-25)、GFN-EQA (CTX27.5) 基準による耐性、中間、感受性の分布 (STEC2012-13)、CF6、セファロチン阻止円なしの分布。



	CF														
CTX	6	7	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	総計
6	2														2
12	1														1
25						3		1							4
26							1								1
27								3							3
28	1			1	1	3	4	36	32	24	19		1		122
29						5	1	1	8	6	3				24
30		1	1		4	2	6	46	59	50	30	1	5	1	206
31						2		3	1	8	4				18
32							1	3	7	6	7		1		25
33								2		2	3	1	1		9
34											1				1
<b>総計</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>95</b>	<b>107</b>	<b>96</b>	<b>67</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>416</b>

表 4、セファロチン (CF) とセフトキシム (CTX) 阻止円分布 (mm) (STEC2012-13)

平成 26 年度厚生労働省 食品・安全確保研究事業 分担研究報告書

課題名：「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

分担課題名：ヒト及び食品由来食中毒菌の薬剤耐性の疫学的研究

研究分担者	倉園貴至	埼玉県衛生研究所
研究協力者	青木敦子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	砂押克彦	埼玉県衛生研究所
研究協力者	松下明子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	近真理奈	埼玉県衛生研究所
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	門脇奈津子	埼玉県衛生研究所
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター
研究協力者	土井りえ	埼玉県食肉衛生検査センター

研究要旨

薬剤耐性菌が健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的としてヒト等から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行うとともに、ヒト及びイヌ・ネコ糞便を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

埼玉県内で 2014 年に分離され、供試したヒト（散発下痢症例及び健康保菌者）由来サルモネラは 140 株で 37 血清型に型別された。薬剤耐性では 61 株（43.0%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示し、CTX 耐性株とフルオロキノロン耐性株がそれぞれ 1 株ずつ分離された。また、動物由来株として、伴侶動物のイヌ 102 頭、ネコ 29 頭および野生アライグマ 127 頭の検査を行い、ネコ 1 頭およびアライグマ 3 頭からサルモネラが分離された。イヌとネコの ESBL 産生菌の検索では 9 株分離された。

赤痢菌では、供試した *S. sonnei* 2 株中 1 株がフルオロキノロン耐性で、インドへの渡航歴のある患者からの分離であった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 220 株が分離され、薬剤感受性試験では、220 株中 17 株（7.7%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。CTX 耐性株やフルオロキノロン耐性株の分離はなかった。ヒト糞便からの ESBL 産生菌の検索では 37 検体中 6 検体から分離された。

食品の汚染実態調査では、県内の市場で購入した鶏肉、野菜等 105 検体を供試し、サルモネラは鶏肉 12 検体中 3 検体から、カンピロバクターは鶏肉 12 検体中 4 検体、ESBL は鶏肉 12 検体中 4 検体並びに生力キ 7 検体中 1 検体から検出された。サルモネラおよびカンピロバクター分離株は供試薬剤のいずれかに耐性を示した。

食鳥肉のフキトリ調査では、出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査を実施し、カ

ンピロバクターが 44 検体中 10 検体から、サルモネラは 1 検体から分離された。

## A. 研究目的

近年、ヒトや食品等の周辺環境から分離されるサルモネラや大腸菌などの食中毒起因菌で、治療薬剤であるフルオロキノロン剤や第三世代セファロスポリンに対して抵抗を示す耐性菌の出現や増加が問題となっている。このような耐性菌がどのような経路でヒトに感染するのか、健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的としてヒト、食品および伴侶動物等から分離される食中毒菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。また、ヒト及びイヌやネコの糞便を対象に ESBL 産生菌の検索を行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

#### 1. ヒト由来

埼玉県内で分離された散発下痢症例、集団食中毒事例及び健康保菌者由来のサルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクター・赤痢菌を医療機関等の協力を得て広く収集した。また、埼玉県衛生研究所に搬入された糞便を chromID™ ESBL Agar (ピオメリユー社製) に塗抹し、ESBL 産生菌の検索を行った。

#### 2. 食品由来

買い取りによる検体収集を行い、サルモネラ・腸管出血性大腸菌・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。また、食肉からの ESBL 産生菌の検索も行った。

#### 3) 食鳥処理場由来

食鳥処理場でのと体フキトリからのサルモネラ・カンピロバクターの分離を検討し、調査に供した。

#### 4) 動物由来

伴侶動物のイヌやネコに加え、「埼玉県アライグマ防除実施計画」に基づき捕獲された野性化アライグマのサルモネラ分離を検討し、調査に供した。イヌ・ネコについてはヒト同様 ESBL 産生菌の検索を行った。

##### ・ 薬剤感受性試験

収集した菌株は米国臨床検査標準化協会 (CLSI) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク: BBL) を用いて行った。サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌はクロラムフェニコール (CP; 30 µg)、ストレプトマイシン (SM; 10 µg)、テトラサイクリン (TC; 30 µg)、カナマイシン (KM; 30 µg)、アミノベンジルペニシリン (ABPC; 10 µg)、ナリジクス酸 (NA; 30 µg)、セフォタキシム (CTX; 30 µg)、シプロフロキサシン (CPFX; 5 µg)、ゲンタマイシン (GM; 10 µg)、ホスホマイシン (FOM; 50 µg)、ノルフロキサシン (NFLX; 5 µg)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST; 25 µg) の 12 薬剤で、ヒト由来株についてはイミペネム (IMP; 10 µg)、アミカシン (AMK; 30 µg)、メロペネム (MEPM; 10 µg)、スルフィソキサゾール (Su; 250 µg) の 4 薬剤を加えた 16 薬剤を供試した。カンピロ

バクターはテトラサイクリン(TC;30 µg)、ナリジクス酸(NA;30 µg)、シプロフロキサシン(CPFX;5 µg)、ノルフロキサシン(NFLX;5 µg)、オフロキサシン(OFLX;5 µg)、エリスロマイシン(EM;15 µg)の6薬剤を供試した。

## C. 研究結果

### (1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で2014年に、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表1に示した。分離された142株は型別不能を除き37血清型に型別され、*S. Enteritidis*が18株と最も多く分離された。次いで *S. Thompson*と *S. Infantis*が12株であった。

この142株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した142株のうち61株(43.0%)が16薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された *S. Enteritidis*は18株中6株(33.3%)が耐性を示した。*S. Schwarzengrund*は供試10株全てが耐性を示した。

分離株の区分別耐性パターンを表2に示す。NA耐性が11株と最も多く、次いでSM・TC・KM・Su耐性が10株、SM・TC・ABPC・Su耐性が8株であった。また、4剤以上の薬剤に耐性を示す株が27株分離され、そのうち第3世代セフェム系薬剤であるCTXに対する耐性菌が1株、フルオロキノロン剤耐性株が1株分離された(表3)。CTX耐性菌はCP・SM・TC・KM・ABPC・CTXの6薬剤に耐性を示す血清型 *S. Blockley* であり、その保有耐性

遺伝子はCTX-M-15であった。フルオロキノロン耐性株は、CP・SM・TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX・SXT・Suの9薬剤に耐性を示す血清型 *S. Kentucky* であり、そのMLST型はST198であった。

### (2) 動物由来サルモネラ

イヌ、ネコおよび野生化アライグマのサルモネラ保菌状況調査の結果を表4に示す。イヌは102頭のいずれからも分離されなかったが、ネコは29頭中1頭(3.4%)から分離され、血清型は *S. Nagoya* であった。薬剤感受性は、供試した16薬剤に対して感受性を示した。野生化アライグマは127頭中3頭(2.4%)の便からサルモネラが分離された。その血清型はそれぞれ異なっていた。薬剤感受性は、血清型O4:i:-がSM・TC・ABPCの3剤に耐性であった。

### (3) 動物由来ESBL産生菌

ESBL産生菌の検索ではイヌ100頭中8頭(8.0%)から8株、ネコ26頭中1頭(3.8%)から1株分離され、菌種は全て *E. coli* であった(表5)。イヌ由来株はCTX-M-1groupあるいはCTX-M-9groupのいずれかを、ネコ由来株はCTX-M-1groupの耐性遺伝子を保有していた。ディスク法による感受性試験では、フルオロキノロン剤にも耐性を示す株がイヌ由来で4株、ネコ由来で1株確認された。

### (4) 赤痢菌

赤痢菌では、供試した *S. sonnei* 2株中1株がフルオロキノロン耐性で、インドへの渡航歴のある患者からの分離であった(表6)。

### (5) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で2014年に、ヒトから分離された腸管出血性大腸菌の血清型別分離状況を表7に示した。分離された220株で最も多く分離された血清型は、O157:H7 (VT1&2 産生)が158株、次いで、O157:H7 (VT2 産生)が24株、O26:H11 (VT1 産生)が12株の順であった。分離220株の薬剤感受性試験の結果、供試した16薬剤のいずれかに耐性であったのは17株(7.7%)であった(表8)。耐性株の耐性パターンは13パターンに分かれた。最も多かったのはSM・TC・Su耐性で3株が該当した。

#### (7) ヒト由来 ESBL 産生菌

ESBL 産生菌の検索では37検体中6検体から6株が分離された(表9)。その菌種は全て *E. coli* で、そのうちCTX-M-9group 保有株が4株、CTX-M-1group 保有株が2株であった。ディスク法による感受性試験では、CTX-M-9group 保有株の2株がCTXのみならずフルオロキノロン剤に耐性を示し、その血清型はO86aとOUTであった。

#### (8) カンピロバクター

2014年に食中毒疑いで搬入された17事例の臨床材料から分離したカンピロバクターは39株で、すべて *C. jejuni* であった(表10)。薬剤感受性試験では39株中30株(76.9%)が供試した6薬剤のいずれかに耐性を示し、そのうち23株がフルオロキノロン剤耐性であった。

#### (9) 食品からの分離

2013年6月から2014年1月にかけて、埼玉県内の市場等で食肉、食鳥肉、内臓肉及び漬物、計105検体を購入し、腸管

出血性大腸菌、サルモネラ、カンピロバクターの検査を行った。その結果、サルモネラは鶏肉12検体中5検体から、カンピロバクターは鶏肉12検体中4検体から検出された。腸管出血性大腸菌はいずれの検体からも検出されなかった(表11)。検出されたサルモネラの血清型は *S. Schwarzengrund* と *S. Manhattan* であり、薬剤感受性では供試した16薬剤のいずれかに耐性であった。また、カンピロバクターは *C. jejuni* が3株、*C. coli* が1株であり、フルオロキノロン剤に対して耐性を示した。

食肉からのESBL産生菌の検索では、ESBLは鶏肉12検体中4検体並びに生力キ7検体中1検体から検出された。(表12)。ESBL産生菌が分離された鶏肉4検体派の産地は国産3検体、ブラジル産1検体であった。

#### (10) 食鳥処理場由来

食鳥処理場での出荷前最終洗浄後のと体等の拭き取り検査で、カンピロバクターが44検体中10検体から、サルモネラは1検体から分離された。薬剤感受性ではカンピロバクターでは供試16薬剤のいずれにも感受性であった。サルモネラではKM・GMに耐性を示した(表13)。

### D. 考察

2014年に県内で分離されたヒト由来サルモネラ142株で供試した16薬剤のいずれかに対して耐性を示したのは61株(43.0%)であり、2012年(35.7%)2013年(35.1%)と比較して耐性率の上昇が見られた。CTX耐性株とフルオロキ

ノロン剤耐性株が 1 株ずつ分離された。*S. Blockley* は、以前は、埼玉県内において検出数も多く耐性率の高い血清型であったが、2009 年から 2014 年にかけてわずか 2 株しか分離されておらず、1 株は供試薬剤に感受性であった。フルオロキノロン剤耐性の *S. Kentucky* は、県内での検出は 2009 年から 2014 年にかけてわずか 1 株であったが、アフリカ東部からヨーロッパやアメリカ等に拡がりをみせている多剤耐性の *S. Kentucky* と同じ MLST 型 ST198 であった。今後とも病原体サーベイランスを通じてその動向を注視する必要がある。

動物由来では、ネコや野生化アライグマから 4 株のサルモネラが分離されたが、1 株を除き供試薬剤すべてに感受性であり、フルオロキノロン剤や CTX に対して耐性を示す株は分離されていない。しかし、伴侶動物のイヌやネコ、ヒトの生活圏を浸食する野生化アライグマについて今後も監視していく必要がある。

赤痢菌で 2013 年に引き続きフルオロキノロン剤耐性株が分離され、インドへの渡航歴があった。このような海外からの持ち込みに関して、更なる情報収集の強化を図る必要がある。

腸管出血性大腸菌は、供試 16 薬剤に対する耐性率は 7.7%と 2013 年の 19.8%や 2012 年の 19.4%と比べて低下した。これは保育園集団事例での分離株が感受性であった影響があった。

ヒトやイヌおよびネコの糞便を材料とした ESBL 産生菌の検索でヒトで 16.2%、

イヌでは 8.0%、ネコでは 3.8%の検体から分離された。昨年に引き続きディスク法による感受性試験で、CTX のみならずフルオロキノロン剤に耐性を示す株が、複数株検出されていたことから引き続き監視する必要があると考えられた。

#### E. 結論

ヨーロッパやアメリカでその拡がりが危惧される MLST 型 ST198 の *S. Kentucky* が初めて県内で確認され、フルオロキノロン系薬剤やセフェム系薬剤の耐性株の検出も続いていることから、健康被害に及ぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、今後とも耐性菌の動向調査を継続していくことが重要である。

#### F. 健康危機情報

サルモネラ感染事例において、CTX 耐性菌やフルオロキノロン剤耐性株が分離された。これらの発生動向等に注意を払う必要がある。

#### G. 研究発表

準備中

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 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： 2011～2013年に市販流通鶏肉から分離されたカンピロバクターについて薬剤耐性率を調べた。*C. jejuni*では、NA耐性率は、国産40%、輸入60%、EM耐性は国産0%、輸入20%、*C. coli*では、NA耐性率は、国産64%、輸入62%、EM耐性は国産27%、輸入46%と、全体的に輸入鶏肉由来株で高い傾向であった。

ヒトおよび食品由来のサルモネラの内、検出率の高い血清型Typhimurium, O4群(i:-), Schwarzengrund, Infantis, Enteritidisについて、耐性菌出現状況を比較した結果、ヒト由来Enteritidis以外は、全て耐性率70%以上を示し、耐性率はいずれも食品由来株の方が高い傾向であった。

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、食中毒起因菌であるカンピロバクターおよびサルモネラの薬剤耐性菌出現状況を調べた。

また、昨年度の研究結果において、ヒト由来バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)は、TEICに対しても耐性を示す株が多いのに対して、市販鶏肉由来株はTEICに対して感受性を示す株が多い成績であった。その違いを解明するために、鶏肉由来のVREについて関連遺伝子の変異について調べた。

## B. 研究方法

### 1. 鶏肉由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

#### 1) 供試菌株

2011年～2013年に東京都内で流通した国産鶏肉から検出した *C. jejuni* 236株および *C. coli* 11株と、輸入鶏肉から検出した *C. jejuni* 19株および *C. coli* 13株を供試した。

#### 2) ナリジクス酸およびエリスロマイシンに対する薬剤感受性試験

ナリジクス酸(NA)およびエリスロマイリン(EM)に対する薬剤感受性試験は、KBディスク法で調べた。

### 2. サルモネラ分離状況および耐性菌出現状況

#### 1) 供試菌株

2014年に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ114株および食品から分離された102株を供試した。

#### 2) 薬剤感受性試験

アンピシリン(ABPC)、セフォタキシム(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fois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。

### 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)であった。

#### 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. 鶏肉由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

#### 1) *C. jejuni* の薬剤耐性菌出現状況

国産由来株のNA耐性率は2011年が



44.7% ,2012 年 37.4% ,2013 年 43.9% と横ばい傾向であった。輸入鶏肉由来株は、分離株数が非常に少ないことから、年次推移の比較はできないが、3 年間の耐性率は 63.2% で、国産由来株に比べて耐性率が高い傾向であった。一方、EM に対する耐性株出現状況は、国産由来株では 0%、輸入鶏肉では 19 株中 4 株 (21.1%) であった (図 1)。

## 2) *C. coli* の薬剤耐性菌出現状況

2011 年~2013 年に分離された国産鶏肉由来株の NA に対する薬剤耐性株は 11 株中 7 株 (63.6%)、輸入由来株では 13 株中 8 株 (61.5%) であった。EM 耐性株は国内由来株で 11 株中 3 株 (27.3%)、輸入由来株で 13 株中 8 株 (46.2%) であった (図 2)。

## 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

2014 年に東京都内でヒトから分離されたサルモネラ 114 株は 35 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 18 株 (15.8%)、次いで O7 群 Infantis が 17 株 (14.9%)、O4 群 Chester 11 株 (9.6%)、O4 群 Typhimurium 10 株 (8.8%) であった。

一方、食品から分離された 102 株は 18 血清型に分類され、O7 群 Infantis が 41 株 (40.2%) と最も多かった (表 2)。次いで O4 群 Agona 17 株 (16.7%)、O4 群 Schwarzengrund が 12 株 (11.8%)、OUT:r:1,5 が 8 株 (7.8%) であった。

### 2) サルモネラの薬剤耐性菌出現状況

2014 年にヒト、食品の両方から多く分離された血清型 Typhimurium、O4 群 (i:-)、Schwarzengrund、Infantis、Enteritidis について、耐性菌出現状況を比較した (図 3)。耐性率は、いずれの血清型菌においても食品由来株の方がヒト由来株より高く、ヒト由来 Enteritidis 以外の株の耐性率は 70% 以上であった。

### 3) 耐性パターンの比較

血清型 Infantis、Typhimurium および Enteritidis について、ヒト由来株と食品由来株の薬剤耐性パターンを比較した。血清型 Infantis のヒト由来株は 7 種類、食品由来株は 15 種類の耐性パターンに分類された。耐性パターンはヒト由来、食品由来株とも同様のパターンであったが、食品由来株では 5 薬剤耐性が 24.4% を占めていたのに対し、ヒト由来株では 5.9% であった (表 3)。

血清型 Typhimurium では、ヒト由来株で 4 パターン、食品由来株では 5 パターンに分類された (表 4)。5 薬剤耐性株が、食品由来株で 40%、ヒト由来株で 20% に認められた。

血清型 Enteritidis では、ヒト由来株で SM 耐性が 3 株、NA 耐性が 1 株、食品由来株では NA 耐性が 1 株であった。Infantis や Typhimurium と比較して、Enteritidis の耐性率は低く、単剤耐性菌のみであった (表 5)。

### 3. VRE 検出状況

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  $\mu$ g/ml 以上であったものが 2 株 (8.3%)、16  $\mu$ g/ml が 1 株 (4.2%)、4

~ 12 µg/ml が 9 株 ( 37.5% ), < 4 µg/ml が 12 株 ( 50% ) であった ( 表 6 ) 。

#### 2) Tn1546 中の遺伝子変異

*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 7 ) 。

#### D. 考察

カンピロバクターによる食中毒は依然として多く、東京都では 2014 年に発生した食中毒 99 事例中 35 事例 ( 35.4% ) がカンピロバクターによるものである。その原因の多くは、生あるいは半生の鶏肉料理を喫食することで発生している。そこで 2011 ~ 2013 年に市販流通鶏肉から分離されたカンピロバクターについて、フルオロキノロン耐性に变化するリスクの高い NA 耐性菌、またカンピロバクター腸炎の治療に推奨される第一選択薬である EM に対する耐性菌の出現状況を調べた。

都内に流通する国産鶏肉由来 *C. jejuni* 236 株および輸入鶏肉由来 19 株の NA および EM 耐性率を比較した結果、いずれも輸入鶏肉由来株が高かった。*C. coli* についても同様の傾向であった。薬剤耐性率は、これまでの調査成績と同様に *C. coli* の方が *C. jejuni* より高い成績であった。しかし、輸入鶏肉は冷凍で輸入されるため、カンピロバクター分離率が非常に低い。そのため供試菌株数に差が認められることから、今後、さらに輸入

鶏肉由来株を増やして調査する必要があると考えられた。

2014 年に分離されたサルモネラは、ヒト由来 114 株、食品由来 116 株であった。ヒトおよび食品由来の耐性菌出現状況を比較する目的で、検出頻度の高い 5 血清型菌、すなわち Typhimurium、O4 群 ( i: - ), Schwarzengrund, Infantis, Enteritidis について血清型ごとに調べた結果、ヒト由来 Enteritidis 以外は、全て耐性率 70% 以上を示した。また、耐性率はいずれも食品由来株の方が高い傾向であった。Infantis や Typhimurium は、2 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性株が多いのに対し、Enteritidis は単剤耐性であった。この様に血清型によって耐性パターンが異なる傾向であった。

通常、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 ( 16 µg/ml 以下 ) であった。そこで Tn1546 に存在する VanA 型耐性遺伝子である *vanA* および *vanA* の調整遺伝子である *vanS* の塩基配列を調べ、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。3 か所変異株がアジアだけではなく、ブラジルまで広がっていることが確認された。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

2011～2013年に市販流通鶏肉（国産、及び輸入品）から分離されたカンピロバクターについて薬剤耐性を調べた。*C. jejuni*では、NA耐性率は、国産の約40%、輸入の約60%、EM耐性は国産0%、輸入約20%、*C. coli*では、NA耐性率は、国産64%、輸入62%、EM耐性は国産27%、輸入46%と、全体的に輸入鶏肉由来株で高い傾向であった。

ヒトおよび食品由来のサルモネラの内、検出率の高い5血清型菌、すなわちTyphimurium、O4群（i:-）、Schwarzengrund、Infantis、Enteritidisについて、耐性菌出現状況を比較した結果、ヒト由来Enteritidis以外は、全て耐性率は70%以上を示した。また、耐性率はいずれも食品由来株の方が高い傾向であった。

ヒト由来VREは、TEICに対しても耐性を示す株が多い。しかし、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（判定保留）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与していることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

薬剤耐性菌の出現状況に注意する必要がある。

#### 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

#### I. 特許取得

無し

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)  
「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、人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。本年度は、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、研究を行った。

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。健常人の約10%はESBL産生大腸菌を保有している。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。我々はそれらの菌株間の関連性を明らかにするべく、次世代DNAシーケンサー(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、Incl1グループおよびpMLST ST113に属し、共通した特徴を有していた。したがって、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、  
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。昨年までの研究では、カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、鶏肉及び牛レバーを介してヒトへの伝播が確認された。一方、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、カンピロバクター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、本年は、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。

鶏肉から分離される大腸菌が産生する基質特異性拡張型 - ラクタマーゼ (Extended-spectrum -lactamase, ESBL) の多くの型は、ヒトから分離される大腸菌が産生するものと同じであることが知られている。日本の市場に出ている鶏肉の 8~9 割はブラジル産 (JACC ネットより) である。興味深いことに、ブラジル産の鶏肉からは CTX-M-8 産生大腸菌が高頻度に分離されるが、国産の鶏肉では別の CTX-M 型酵素産生の大腸菌が分離される。

健康人の約 10% は腸管内に ESBL 産生大腸菌を保菌しているといわれる。我々は東邦大学医学部医学科の学生実習における便中の ESBL 産生菌のスクリーニングにて CTX-M-8 型酵素を産生する大腸菌が 2 年間で 4 株収集された。また、同時期に都内のスーパーマーケットで購入したブラジル産鶏肉から分離された CTX-M-8 産生株が 7 株、2012 年のメロペネム市販後調査において尿から CTX-M-8 産生大腸菌が分離されたことから、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。

## B . 研究方法

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。

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

(<http://www.genomicepidemiology.org/>) の Web ツール MLST1.7 を用いた Multilocus sequence 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 : メロペネ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

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。

### A. 鶏肉由来菌株

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

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  $\beta$ -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

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。

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（プロイラー）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

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。

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

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

なし

## 平成26年度食品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」

分担課題名：家畜由来薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究者：川西路子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：小池良治（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：比企基高（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：佐々木貴正（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：浅井鉄夫（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

研究協力者：黒田 誠（国立感染症研究所）

研究協力者：関塚剛司（国立感染症研究所）

### 研究要旨

家畜衛生分野における薬剤耐性菌実態調査システム（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System（JVARM））で収集した健康なプロイラー由来の大腸菌の第3世代セファロスポリン耐性率及び薬剤耐性遺伝子を解析した。プロイラーにおける第3世代セファロスポリン耐性の割合は、2011年に比べて2012年及び2013年で有意に減少した。これは、国内の生産者団体によるセフトロフルの使用に関する自主規制（2012年3月）により、セフトロフルの使用が減少したことによると考えられた。なお、 $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子保有プラスミドが分布するが、人の臨床現場で主に分離されるものとは異なっていた。

昨年度本事業で、国内の1農家の豚でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）sequence type (ST) 398 が分離され、新規の SCCmec 型であることを報告した。MRSA ST398 の起源を探るため豚由来のメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）の遺伝子型及び薬剤耐性型並びにメチシリン耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌（MRCNS）の SCCmec 型を調べたが、起源と考えられる MSSA 及び遺伝子は認められなかった。

また、JVARM で収集した健康家畜由来カンピロバクターにおいて2013年中国の豚由来 *Campylobacter coli* で初めて報告されたマクロライド耐性因子 *erm(B)* の保有状況を調査したところ、1農場から分離された *C. coli* において可動性遺伝因子 *erm(B)* を保有が確認された。

#### A. 研究目的

家畜に由来する薬剤耐性菌が畜産食品を介して人に伝播し、人の健康に危害を与える可能性について評価するため、国内では家畜における薬剤耐性菌のモニタリング体制（JVARM）が構築されている。

JVARM の調査において2004年以降プロイラーにおいて医療上極めて重要な成分（食品安全委員会の抗菌性物質リストランクI）の一つである第3世代

セファロスポリンに対する耐性割合が増加した。米国やカナダのプロイラーにおいてセファロスポリン耐性の大腸菌やサルモネラが増加した要因として、ヒナの大腸菌症の予防等のために、第3世代セファロスポリンの一つであるセフトロフル（CTF）がワクチンと混合して卵内接種されることに起因することが報告されている。

これを受けて、2012年3月に国内の生産者団体が



ら CTF 使用の自主的な注意喚起が通知された。そこで、この措置の効果を評価するため、国内のプロイラーにおけるセファロスポリン耐性の動向について継続して調査するとともに、耐性因子に関する情報収集を行った。

また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内感染や市中感染の原因菌として問題であるが、家畜にも分布することが知られている。ヨーロッパを中心に家畜関連 MRSA(Livestock-associated MRSA: LA-MRSA)が注目されている。昨年度本事業で国内においても ST398 が 1 農場の豚に分布し、ゲノム解析により、国内分離株が保有する SCC<sub>mec</sub> 型が classA-A1B3 であり、海外の報告されているものとは異なる新規のものであることを報告した。そこで、今年度は MRSA ST398 の起源を探るため豚由来メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) の遺伝子型及び薬剤耐性型並びにメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRCNS) の SCC<sub>mec</sub> 型を調べた。

人のカンピロバクター腸炎は、主にマクロライド系抗菌性物質製剤で治療される。カンピロバクターにおいてマクロライド耐性は主に染色体上の遺伝子の突然変異の結果として発現するが、2013 年に中国の豚から分離された *Campylobacter coli* が可動性遺伝因子 *erm*(B) を獲得していることが初めて報告された (Qin ら 2013)。*erm*(B) は染色体上の多剤耐性遺伝子が集積した領域 (multidrug-resistant genomic island:MDRGI) に存在し、*erm*(B) 保有株は多剤耐性株であった。そこで、国内における家畜由来マクロライド耐性カンピロバクターにおける *erm*(B) の保有状況を調査した。

## B. 研究方法

### (1) 第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌の性状解析

2010 ~ 2013 年に JVARM で収集した健康なプロイラー由来の大腸菌の CTF 及びセフォタキシム (CTX) の薬剤感受性を Clinical and Laboratory Standards (CLSI) に準拠した微量液体希釈法で測定し、各年毎の耐性率について Fisher 直接確立検定を実施した ( $p < 0.05$ )。

2010 ~ 2013 年にプロイラーから分離された第 3 世

代セファロスポリン耐性 (CTX: 4 $\mu$ g/ml) 大腸菌 84 株を対象に耐性遺伝子の同定及び各種セフェム系薬剤に対する感受性試験を微量液体希釈法で実施した。

耐性遺伝子の検索は、ダブルディスク法を実施後、Dallenne らの報告した multiplex PCR でスクリーニングし、PCR により全長を増幅後、ダイレクトシークエンスにより決定した。

混合培養法でプラスミド伝達試験を行い、得られたトランスコンジュガントを用いて、レプリコン型を PCR 法で決定した。

### (2) 国内の家畜における MRSA ST398 の起源に関する調査

2010 ~ 2013 年に豚から分離された黄色ブドウ球菌 15 株について CLSI に準拠した E-test にてオキシシリン(OXA)及びセフォキシチン(CFX)の MIC を測定し、MSSA と決定した株について Enright らの方法による multilocus sequence typing (MLST) 及び Ridom SpaServer の方法による spa type を決定した。各種薬剤の MIC は CLSI に準拠した微量液体希釈法にてアンピシリン(ABPC)、シプロフロキサシン(CPFX)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)、ゲンタマイシン(GM)及びクロラムフェニコール(CP)を対象に測定した。

さらに、と畜場由来 MRCNS10 株の SCC<sub>mec</sub> 型を確認するため、Kondo らの方法により *mec* gene complex を確認し、*ccr* gene complex を MRSA ST398 の *ccr* gene complex-A1B3 を検出するプライマーを以下のとおり作成し、PCR により検出した。

ccrA-398P1:5'

-GGAATCAGTCTCAATCAGTGCT-3

ccrB-398P1:5'

-CATGAGTTCGTGTTTATTGTCTGGA-3'

### (3) 家畜由来カンピロバクターにおける *erm*(B) 保有状況の確認

2011 ~ 2013 年に JVARM で健康家畜より分離された EM 耐性 *C. coli*69 株について Qin らが報告した PCR により *erm*(B) の有無を確認した。PCR 陽性株についてダイレクトシークエンスにより塩基配列を確認

認した。

### C. 研究結果

#### (1) 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌

2010～2013年に収集した健康ブロイラー由来大腸菌における第3世代セファロスポリンに対する耐性率は、2010年に19.1%(36/188)、2011年に18.0%(29/161)であったのに対し、2011年と比べて2012年は9.7%(20/206)、2013年は4.6%(6/131)と有意に減少した( $p<0.05$ )

(図1)。

耐性株が保有するβ-ラクタマーゼ型は、いずれの年も $bla_{CMY-2}$ が優勢であった(2010年55.6%(20/36)、2011年75.9%(22/29)、2012年55.0%(11/20)、2013年83.3%(5/6))(図2)。このように、2012年、2013年におけるブロイラー由来大腸菌の第3世代セファロスポリン耐性の割合の低下は、2004年以来優勢な $bla_{CMY-2}$ を維持したまま減少したことが示唆された。伝達株のプラスミドのレプリコン型別では、各年度ともIncKが優勢であった(図3)。

次に、2010年と2013年に分離された株の耐性率の比較では、ブロイラー由来大腸菌の全体集計においてカナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)及びCPの耐性率の有意な上昇が認められた。また第3世代セファロスポリン耐性株ではSM及びKMの耐性率の有意な上昇が認められた( $p<0.05$ )(表1)。

接合伝達試験により $bla_{CMY-2}$ を保有するプラスミドは、2010年以降、β-ラクタム系以外では、TC単剤のみ耐性もしくは感受性型のIncK及びIncI1が主要なレプリコン型として認められ、多剤耐性を示すIncA/C型のプラスミドは2013年で1株認められたものの減少傾向であった(表2)。

#### (2) 国内の家畜におけるMRSA ST398の起源に関する調査

豚由来黄色ブドウ球菌15株は全てOXA(MIC:0.09-0.75μg/ml)及びCFX(MIC:2-3μg/ml)に対して感受性であった。MLST型はST398が7株(46.7%)、ST433が5株(33.3%)、ST9が2株(13.3%)及びST2113が1株(6.7%)で、spa typeは15株で13種類の型が認められた。(表3)各種薬剤に対する感受性は、ST398

の7株及びST9の2株は全てABPC及びTCに対して耐性を示した(表3)。

と畜場由来のMRCNSにおいて $mec$  gene complexは、A型が1株のみであり、 $ccr$  gene complex-A1B3を検出するPCRで陽性の株は認められなかった。つまり、国内で分離されたMRSA ST398と同じSCC $mec$ 型は認められなかった(表4)。

#### (3) 家畜由来カンピロバクターにおける $erm(B)$ 保有状況の確認

PCRにより豚由来エリスロマイシン耐性*C. coli*の2株(同一農場)が、 $erm(B)$ 遺伝子を保有していることが確認された。2株はEMの他ナリジク酸(NA)、CPFX、CPに耐性を示した(表6)。ダイレクトシークエンスにより $erm(B)$ 遺伝子は、Qinらの報告したMDRGI領域とは異なり、Jostらが報告する*Arcanobacterium pyogenes*の染色体上のorf181からorfの5'側の領域と相同な遺伝子配列中に認められた(図4)。

### D. 考察

1999年のJVARMの開始時から、健康ブロイラー由来大腸菌でセファロスポリン耐性株が継続的に分離され、2004年以降、増加傾向が認められていた。セファロスポリンは、鶏の治療薬として承認されていないことから、セファロスポリン耐性株の性状解析を行ったところ、2004～2009年に収集した第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の解析では、 $bla_{CMY-2}$ が優勢であり、この耐性遺伝子の分布にIncI1、IncIγ、IncA/C及びIncB/Oの4種類のレプリコン型のプラスミドが関与し、これらのプラスミドのうちIncA/Cが多剤耐性プラスミドであることを明らかにしてきた(Hiki et al. 2013)。

2012年及び2013年のブロイラーにおけるセファロスポリン耐性は、2011年に比べて有意に減少した。2012年3月に国内の生産者団体からCTFの使用に関する注意喚起が自主的に行われた効果と考えられた。

一方、セファロスポリン耐性率の減少とは対称的にKM及びSMの耐性率の上昇がブロイラー由来大腸菌全体及びセファロスポリン耐性株に認められ

た。KM や SM と同系統薬剤である GM はアメリカやカナダで CTF の代替薬として卵内接種されており、今後の KM や SM の耐性率の動向に注視する必要があると考えられた。

-ラクタマーゼ遺伝子の解析では、2010 年から 2013 年の分離株においても *bla*<sub>CMY-2</sub> が優勢であり人由来のセファロスポリン耐性株で主に報告される β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla*<sub>CTX-M</sub> とは異なった。

トランスコンジュガントの解析では *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有するプラスミドのレプリコン型は、2010 年から 2013 年の分離株においていずれの年も IncK が継続的に認められ、IncII も IncK に次いで主要なレプリコン型として認められた。その一方で多剤耐性プラスミドである IncA/C は 2013 年に 1 株認められたものの減少傾向にあり、このことは CTF の自主規制に伴う当該薬剤の選択圧の減少によって、プラスミドの維持に関連する負荷 (biological cost) の差異が関連したと推察された。

欧米では家畜関連 MRSA ST398 が大きな話題となっている。2005 年にオランダで家畜、特に豚における MRSA ST398 の保菌が問題となり、欧米で大規模な豚農場における MRSA の浸潤調査が行われている。また、米国の豚からも分離され、ST398 の汚染拡大が懸念されている。アジアでは、シンガポール、タイ、中国で MRSA ST398 が分離されており、我が国においても昨年 MRSA ST398 が分離されたことを報告した。昨年認められた MRSA ST398 の SCC*mec* 型及び *spa* type は欧米で流行している型とは異なる型であったため、今回国内で認められた MRSA の起源を探るため国内の豚から分離された MSSA の遺伝子型及び薬剤耐性型、MRCNS の SCC*mec* 型を調べた。その結果、今回調べた MSSA には ST398 が高率に認められたが、昨年分離された MRSA ST398 と同じ *spa* type かつ薬剤耐性型、また MRCNS では同じ SCC*mec* 型の株は認められなかった。以上より MRSA ST398 の起源は特定できなかったが、国内ではこれ以外に MRSA ST398 が分離されたとの報告はないことから、今後 MRSA ST398 の浸潤状況に注意を払う必要があると考えられた。

また、本研究により、家畜由来 *C. coli* において可動性遺伝因子 *erm*(B) を保有する株が我が国に分布す

ることが確認された。人におけるカンピロバクターによる食中毒の報告はその多くが *C. jejuni* であり、治療にはマクロライド系薬剤が使用される。1999 年から 2015 年までの JVARМ の調査では家畜由来 *C. jejuni* においてマクロライド系薬剤である EM の耐性は確認されていない。今回確認された *erm*(B) は Qin らの報告した多剤耐性遺伝子が集積した領域にはなく、*erm*(B) 保有菌株も EM 以外 CP とキノロン剤にのみ耐性であった。*erm*(B) を含む可動性遺伝因子が伝達された菌株が、EM 以外の多剤耐性となる可能性は低いと考えられた。しかし、*erm*(B) は *C. coli* から *C. jejuni* に伝達されることが報告されていることから、今後 *C. jejuni* におけるマクロライド耐性をモニタリングし、その出現により一層の注意を払う必要があると考えられる。

#### E. 結論

プロイラーにおける CTF の使用に関する自主規制(2010 年)による第 3 世代セファロスポリン耐性大腸菌の減少は 2013 年においても継続していた。国内で分離された MRSA ST398 の起源と考えられる MSSA 及び遺伝子は認められなかった。家畜由来 *C. coli* において可動性遺伝因子 *erm*(B) を保有する株が認められた。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

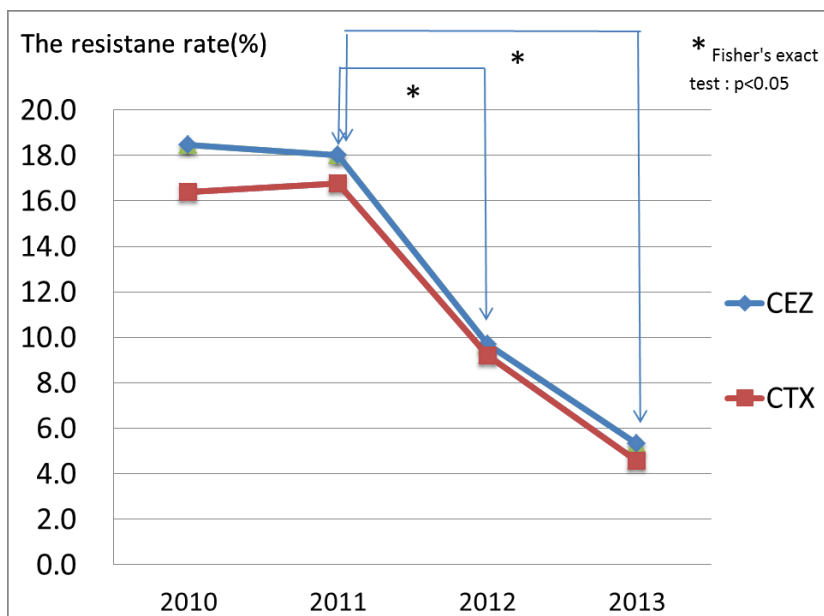
1. Hiki, M., Usui, M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T. 2014. Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from healthy broilers in Japan. *Irish Veterinary Journal*.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

JVARМ事業を通して菌株の提供等ご協力いただきました全国の家畜保健衛生所の諸先生方に深謝いたします。

図1 第3世代セファロスポリン耐性大腸菌の推移



セファゾリン (CEZ)、セフトキシム (CTX)

図2 CEZ 耐性株のラクタマーゼ型別

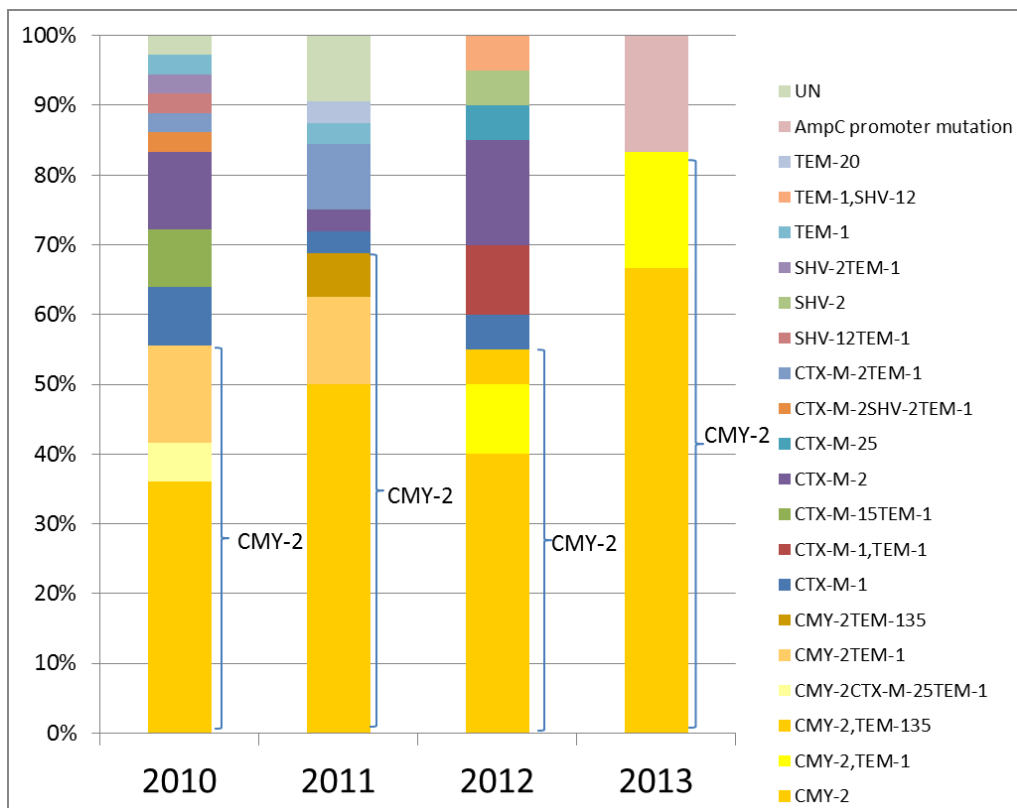


図3 伝達株のレプリコン型別

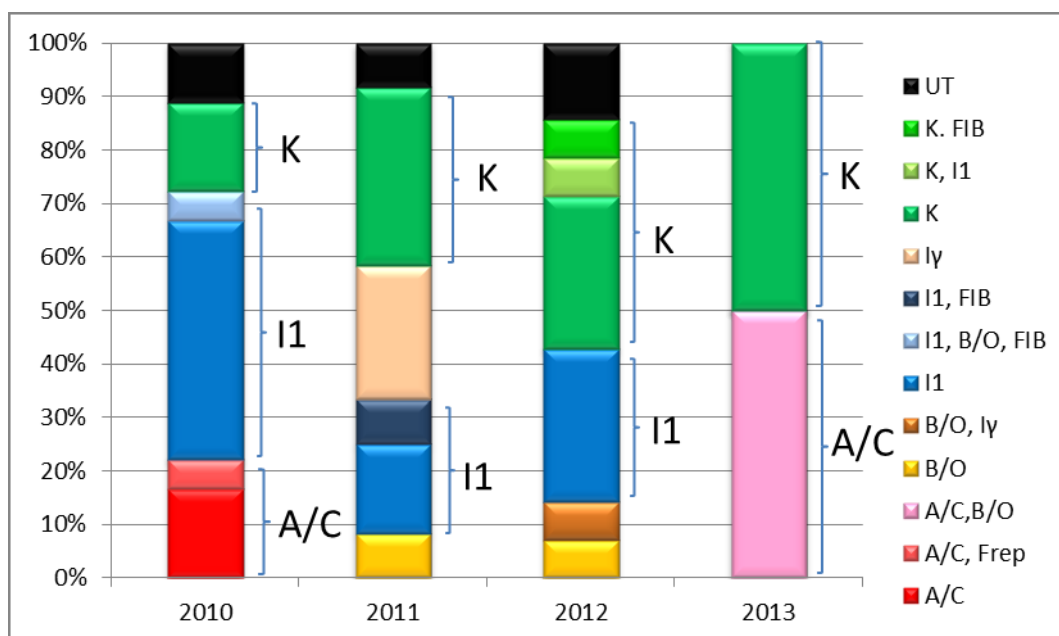


表1 プロイラー由来大腸菌及び第3世代セファロスポリン耐性 (CTX 4 μg/mL) 大腸菌における各種薬剤に対する耐性

	<i>E. coli</i> isolates from broilers(%)				Broad-spectrum cephalosporin resistant <i>E. coli</i> isolates from broilers(%)			
	2010	2011	2012	2013	2010	2011	2012	2013
ampicillin	42.1	42.9	55.8	47.3	100.0	100.0	100.0	100.0
streptomycin	NT	a 24.8	37.9	b 38.2	b 37.5	a 51.9	52.6	100.0
gentamicin	3.6	3.7	3.4	0.8	9.4	14.8	5.3	0.0
kanamycine	13.3	a 14.3	a 27.7	b 24.4	b 25.0	a 22.2	a 42.1	83.3
tetracycline	56.4	47.2	58.3	61.8	68.8	66.7	78.9	100.0
nalidixic acid	33.3	31.7	30.1	35.1	59.4	a 59.3	a 26.3	b 50.0
ciprofloxacin	3.6	3.7	7.8	7.6	15.6	11.1	0.0	33.3
colistin	0.5	0.6	0.5	0	3.1	0.0	0.0	0.0
chloramphenicol	10.8	a 9.3	a 16.5	b 22.1	b 18.8	22.2	21.1	50.0
trimetoprim	NT	23.6	33.0	40.5	NT	25.9	15.8	16.7

A significant difference ( $P < 0.05$ ) in prevalence was observed between a and b.

**表2** プロイラー由来 CMY2 ラクタマーゼ産生株をドナーとして作出した  
トランスコンジュガントの性状

year	Inc	Resistance pattern	total
2010	I1	None	4
	K	None	3
	A/C, Frep	SM-KM-TC-TMP	1
	A/C	SM-GM-TC-CP	1
		SM-TC-CP	1
		SM-TC	1
2011	I1, FIB	TC	1
	I1	TC	1
		None	1
	I	None	3
	K	None	3
	B/O	None	1
2012	I1	TC	1
	K	None	4
	K, I1	TC	1
	K, FIB	None	1
	B/O, I	None	1
	UT	None	1
2013	K	None	1
	A/C, B/O	SM-TC-CP	1

表3 豚由来メチシリン感受性黄色ブドウ球菌の遺伝子型と薬剤耐性型

ST (n)	spa type	Resistance pattern (n)
398 (7)	t034	ABPC-TC-CP (1)
	t1255	ABPC-TC (1)
	t1456	ABPC-TC-CPFX-CP (2)
	t1606	ABPC-TC-EM-CP (1)
	t5883	ABPC-TC-GM-CP (1)
	t8620	ABPC-TC-EM (1)
	433 (5)	t318
	t1130	None (1)
	t3427	None (1)
9 (2)	t337	ABPC-TC-EM (1)
	t899	ABPC-TC (1)
2113 (1)	New	None (1)
参考 昨年分離されたMRSA		
398	New	ABPC-TC-EM-CP-GM or ABPC-TC-EM-CP

表4 と畜場由来のメチシリン耐性ブドウ球菌の性状

検体番号	菌種名	mecA	mec complex	ccr A1B3PrimerPCR
NS11	<i>S.lentus</i>	+	A	-
NS24	<i>S.warneri</i>	+	B	-
RC29	<i>S.haemolyticus</i>	+	C	-
RC30	<i>S.haemolyticus</i>	+	C	-
RC68	<i>S.warneri</i>	+	C	-
NS66	<i>S.warneri</i>	+	C	-
NS67	<i>S.haemolyticus</i>	+	C	-
NS68	<i>S.warneri</i>	+	C	-
RC67	<i>S.warneri</i>	+	-	-
NS105	<i>S.spp</i>	+	-	-

表5 家畜由来 *C.coli* のエリスロマイシンに対する MIC 分布

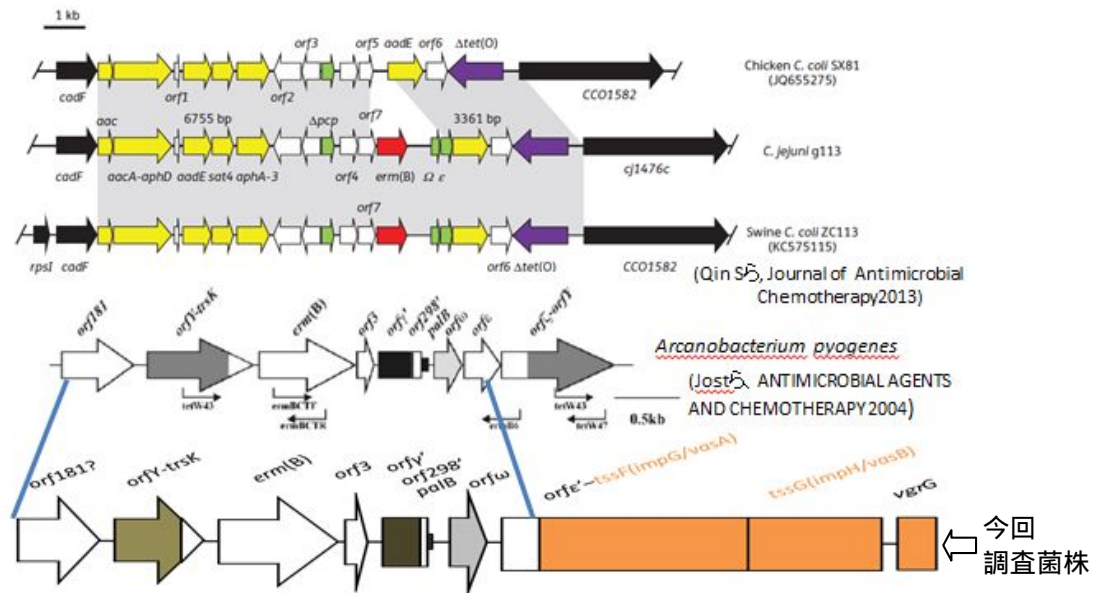
	MIC(mg/L)											菌株数	耐性株	耐性率(%)	
	≤0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128				256
平成25年	3	5	6	12	13	4						18	61	18	29.5
平成24年	1	7	9	15	11	8					3	23	77	26	33.8
平成23年	2	3	10	26	11	11				1	5	19	88	25	28.4

69株

表6 *erm(B)*保有株の各種薬剤に対する MIC

NA	CPF	SM	EM	TC	ABPC	GM	CP
128	>64	8	>128	1	16	2	16
128	>64	8	>128	1	16	2	16

図4 *erm(B)*の周辺領域の遺伝子





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」

分担研究報告書（平成 26 年度）

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

国内でヒト、家畜、環境から分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12: i: - 51 株を Pulsed-field gel electrophoresis と Multilocus variable-number tandem repeat analysis により型別したところ、両者の組み合わせにより識別力が向上することが示された。本法により家畜由来 3 株がヒト由来株と識別不能であり、何らかの疫学的関連の存在が示唆されたが、これら菌株は供試した全ての薬剤に感受性または単剤耐性であった。多剤耐性を示す一群の菌株はヒト由来株の他、主に豚由来株から構成されていた。薬剤耐性菌が豚肉を介してヒトに感染していることを示唆する成績と考えられた。また、これら菌株の一部は薬剤耐性型やファージ型がヨーロッパで流行している菌株と一致しており、何らかの関連が示唆された。

#### A . 研究目的

*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( 図 1 )。Typhimurium によるサルモネラ感染症は家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されているため、全国的な発生状況を把握できるが、4: i: - は届出の対象とならず、その発生状況は不明である。しかしながら、某県

における近年の集計( 図 2 ) では Typhimurium の分離頻度が減少し、4: i: - のそれが上昇している傾向が明らかである。すなわち、ヒトからの 4: i: - 分離頻度上昇は家畜における本菌の分離頻度上昇とリンクしており、畜産物を介したヒトへの感染ルートが存在が示唆される。そこで、今年度は 4: i: - のヒト由来株と家畜等由来株を Pulsed-field gel electrophoresis ( PFGE ) および Multilocus variable-number tandem repeat analysis ( MLVA ) の手法を用いて詳細に分析し、家畜からヒトへの薬剤耐性菌の流れを指摘できるか否かを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 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。

### 2. 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フォーマットで保存し、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。

### 3. 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](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html))を用いてNei's diversity indicesを算出した。

### 4. 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. PFGEによる型別

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)(図3)。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。

### 2. MLVAによる型別

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(図4)。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。

### 3. 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(図3)。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)は異なる散発事例のヒト由来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発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。

#### 4. 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 (図 3)。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。

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年は一定でなかった (図 3)。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 (昨年度成績)。

#### D. 考察

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

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. 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.
2. Ido N, Iwabuchi K, Sato'o 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)

\* 各都道府県市の地方衛生研究所からの分離報告を図に示した

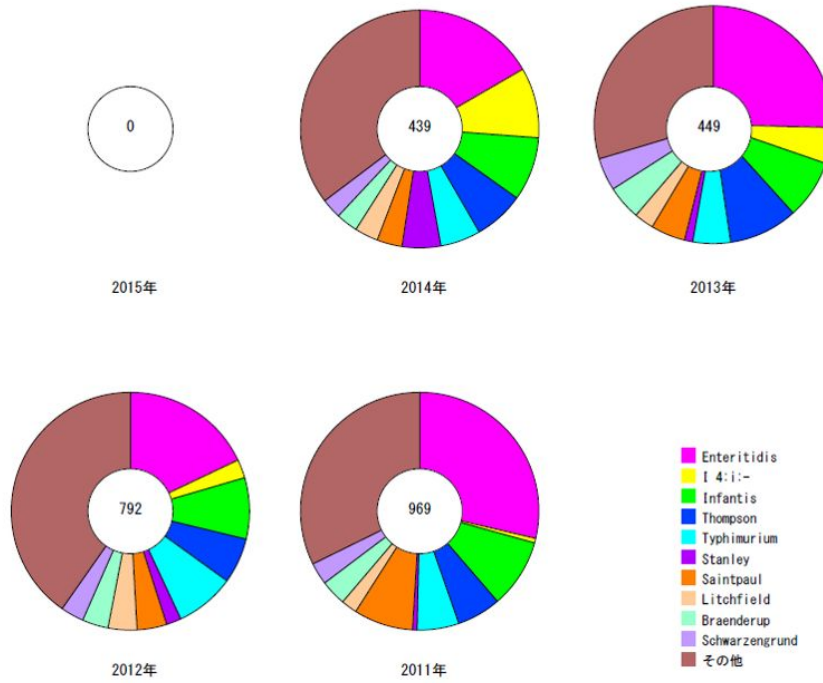
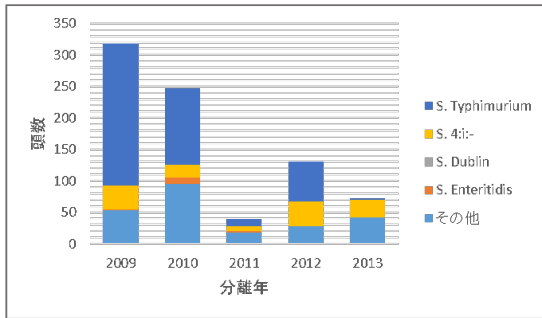
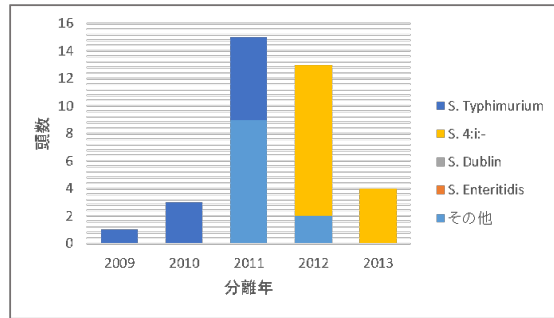


図1. ヒトから分離されたサルモネラの血清型割合 (2011～2015年)

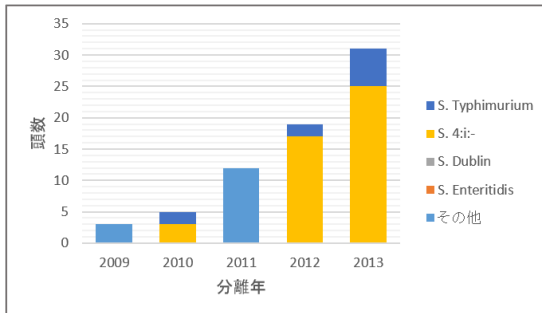
乳牛



肉牛



豚



鶏

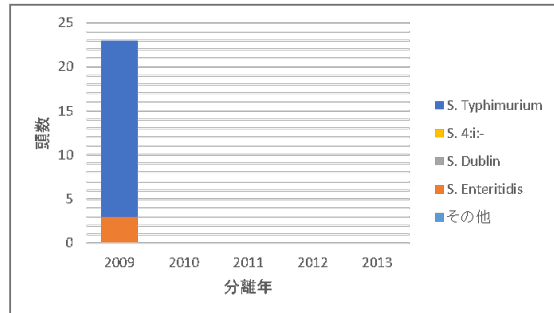


図2. 某県における家畜由来サルモネラ分離状況 (2009～2013年)

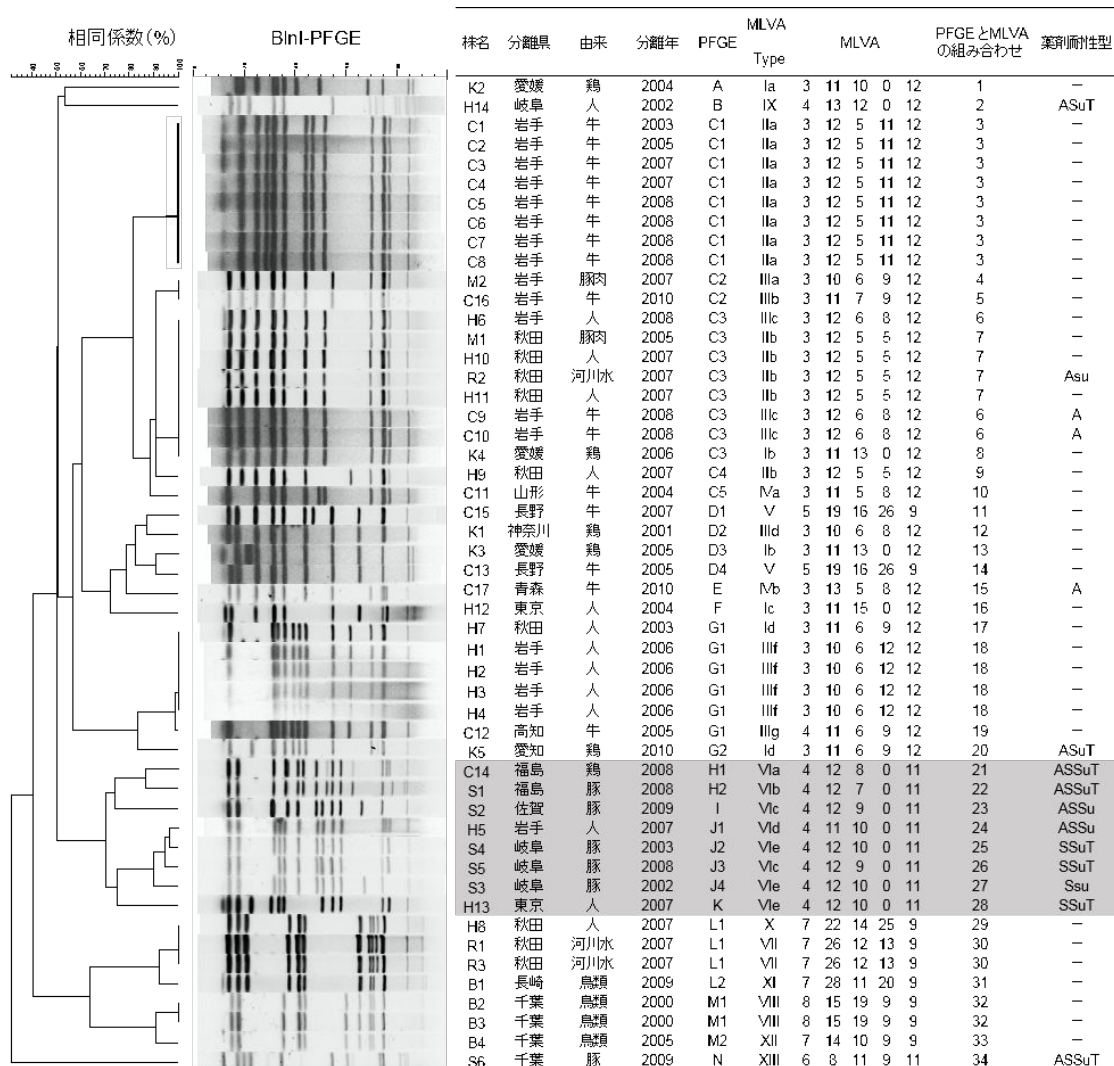


図3. 国内で分離された4:i-株のPFGEとMLVAによる型別結果

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

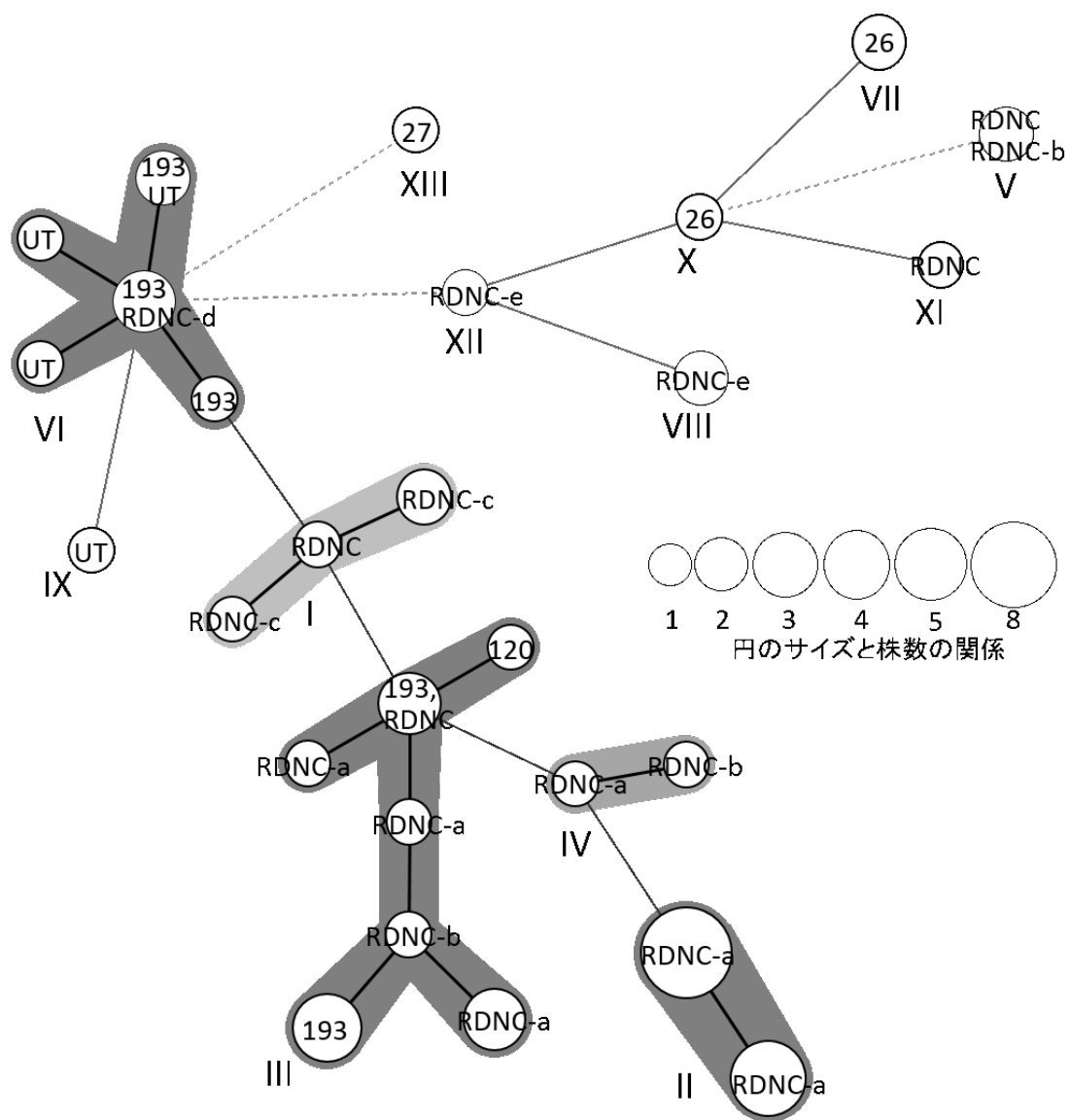


図4. MLVA データから作成した Minimum-spanning tree

平成 26 年度 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

分担課題名：食品汚染及びヒト腸内細菌の薬剤耐性疫学

研究分担者	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
	原田哲也	大阪府立公衆衛生研究所
	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨：

薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性とヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べた。

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型に変化が認められた。2011 年までは *S. Infantis* が圧倒的に多く検出される血清型であったが、2012 年以降は、*S. Schwarzengrund* や *S. Manhattan* など、他の血清型の分離頻度が高くなり、今後の動向が注目される。

カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、ヒト由来株、鶏肉由来株のいずれも 2010 年以前の成績と比較して耐性率の上昇が認められた。

A. 研究目的

近年世界各国で食品および食用動物にヒトの治療に用いられる薬剤に耐性を示す細菌が分離されており、ヒト由来株との関連性の監視が求められている。

日本国内では食品からの薬剤耐性株検出の年次推移の詳細な報告はなく、薬剤耐性菌がヒトに影響を及ぼしているかどうかの現状は明らか

ではない。本研究では薬剤耐性菌が食品を介してヒトに健康被害をおよぼす危険性を評価する科学的根拠の提供を目的として、食品を汚染している病原細菌の薬剤耐性と、ヒト由来病原細菌の薬剤耐性の関連を調べる。平成 26 年度は鶏肉のサルモネラおよびカンピロバクターと、ヒト由来の腸管出血性大腸菌およびカンピロバクターについて調査した。



## B. 研究方法

### (1) 国内産鶏肉のサルモネラ

2006年～2014年の9年間に国内産鶏肉から分離した948株を用いて、血清型の変化について調べた。

検査方法は、検体25gを採取し一次増菌培養にはBuffered Peptone Water、二次増菌培養にはRappaport-Vassiliadis Enrichment brothを用い、XLD寒天培地ならびにBGS培地(ブリリアントグリーン寒天培地+スルファピリジン)で分離培養を行った。

### (2) カンピロバクター

ヒト由来株は2011年～2014年に分離した散発下痢症患者由来147株および食中毒患者由来(有症苦情事例を含む)148株の合計295株を供試した。鶏肉由来株は2014年に国内産鶏肉から分離した56株を供試した。薬剤感受性試験はノルフロキサシン(NFLX)、OFLX、CPFX、NA、TC、エリスロマイシン(EM)の6剤で、センシディスクを用いて行った。

### (3) ヒト由来腸管出血性大腸菌

2012年～2013年に患者および健康者から分離された121株を供試した。薬剤感受性試験はCLSIのディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク(BD)を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ST合剤(ST)、ホスフォマイシン(FOM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、セフォタキシム(CTX)、セフポドキシム(CPDX)、イミペネム(IPM)、メロペネム(MEM)、アミカシン(AMK)、スルフイソキサゾール(Su)の16

剤を供試した。

## C. 研究結果と考察

### (2) 国内産鶏肉のサルモネラ

大阪府の鶏肉から分離したサルモネラの血清型は、2011年までは*Salmonella* *Infantis*が圧倒的に多かったが、2012年からは、*S. Schwarzengrund*や*S. Manhattan*など、他の血清型の分離頻度が高くなり、変化が認められた(図1)。

### (3) カンピロバクター

ヒト由来菌株: *C. jejuni*では散発下痢症患者で89株(63.6%)、食中毒患者で94株(74.6%)がフルオロキノロン耐性であった。どちらも2009～2010年の耐性率よりも高率であった(表1,2)。*C. coli*では散発下痢症患者で4株(57.1%)、食中毒患者で6株(27.3%)がフルオロキノロン耐性であった。

鶏肉由来菌株: *C. jejuni/coli* (*C. jejuni*と*C. coli*の同定は未実施)のフルオロキノロン耐性率は62.5%であり、2009～2010年の40.8%よりも高率であった(表3)。

フルオロキノロン耐性率の年次変化: 散発下痢症患者由来*C. jejuni*のフルオロキノロン耐性をみると、2011年以降は2010年以前の耐性率よりも高率になった(図2)。

### (4) 腸管出血性大腸菌 :

血清群O157では1剤以上に耐性を示す株は95株中9株(9.5%)であった。CTX耐性株が1株あり、その株はO157:H7でプラスミド性AmpC産生株であった。血清群O26では1剤以上に耐性を示す株は11株中5株(45.5%)であった。NA耐性は血清群O111の1株に認められ

た(表4)。2012年、2013年は腸管出血性大腸菌の感染者数が少なく、また、薬剤耐性菌の検出率も少ない傾向が認められた(図3)。

#### D. 結論

サルモネラでは、市販の鶏肉から検出される血清型に変化が認められた。2011年までは *S. Infantis* が圧倒的に多く検出される血清型であったが、2012年以降は、*S. Schwarzengrund* や *S. Manhattan* など、他の血清型の分離頻度が高くなり、今後の動向が注目される。

カンピロバクターのフルオロキノロン耐性は、ヒト由来株、鶏肉由来株のいずれも2010年以前の成績と比較して耐性率の上昇が認められた。

#### E. 研究発表

(論文発表)

Kawahara R, Seto K, Taguchi M, Nakajima C, kumeda Y, Suzuki Y : Characterization of third-generation cephalosporin-resistant Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. (投稿中)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

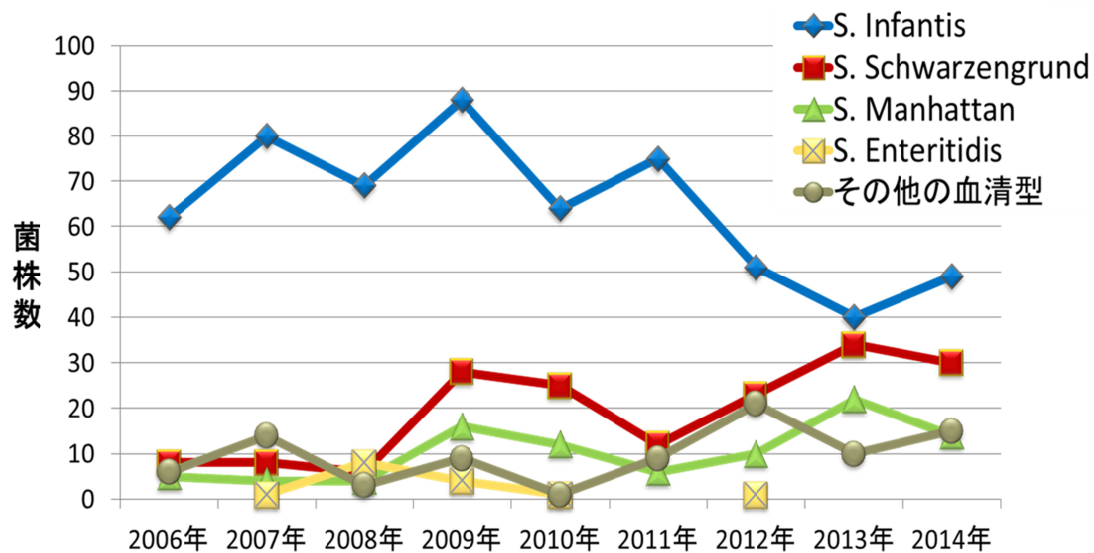


図1 大阪府内で入手した国産鶏肉由来サルモネラの血清型別検出数

表1 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績  
散発下痢症由来株 (2011-2014年)

薬剤耐性パターン	2011年	2012年	2013年	2014年	散発合計	2009-2010年
NFLX,OFLX,CPFEX,NA,EM				1	1	
NFLX,OFLX,CPFEX,NA,TC	25	8	13	4	50	31
NFLX,OFLX,CPFEX,NA	16	6	9	7	38	35
<i>C. jejuni</i> フルオロキノロン耐性 小計	41(59.4%)	14(100%)	22(61.1%)	12(57.1%)	89(63.6%)	66(41.%)
TC	9		3		12	25
感受性	19		11	9	39	70
<i>C. jejuni</i> 合計	69	14	36	21	140	161
NFLX,OFLX,CPFEX,NA,TC	1		1	1	3	3
NFLX,OFLX,CPFEX,NA				1	1	3
<i>C. coli</i> フルオロキノロン耐性 小計	1(25%)		1(100%)	2(100%)	4(57.1%)	6(75.%)
TC,EM						1
TC	1				1	
感受性	2				2	1
<i>C. coli</i> 合計	4		1	2	7	8

供試薬剤: ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFEX)、ナリジクス酸(NA)、テトラサイクリン(TC)、エリスロマイシン(EM)

表2 カンピロバクターの薬剤感受性試験成績  
食中毒事例由来株 (2011-2014年)

薬剤耐性パターン	2011年 22事例	2012年 9事例	2013年 19事例	2014年 26事例	合計 76事例	2009- 2010年 41事例
<i>C. jejuni</i>						
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	6	6	12	19	43	25
NFLX,OFLX,CPFX,NA	9	8	18	16	51	23
フルオロキノロン耐性 小計	15(71.4%)	14(70%)	30(83.3%)	35(71.4%)	94(74.6%)	48(55.2%)
TC	2		1	2	5	7
感受性	4	6	5	12	27	32
<i>C. jejuni</i> 合計	21	20	36	49	126	87
<i>C. coli</i>						
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	3			3	6	4
NFLX,OFLX,CPFX,NA						1
フルオロキノロン耐性 小計	3(60%)			3(33.3%)	6(27.3%)	5(71.4%)
TC,EM						1
TC	1			1	2	1
感受性	1	1	7	5	14	
<i>C. coli</i> 合計	5	1	7	9	22	7

表3 鶏肉由来カンピロバクター *jejuni/coli* の薬剤感受性試験成績

薬剤耐性パターン	2014年	2009-2010年
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC,EM	1	1
NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	17	45
NFLX,OFLX,CPFX,NA	17	42
NFLX,NA		1
フルオロキノロン耐性 小計	35(62.5%)	89(40.8%)
TC	4	42
感受性	17	87
<i>C. Jejuni/coli</i> 合計	56	218

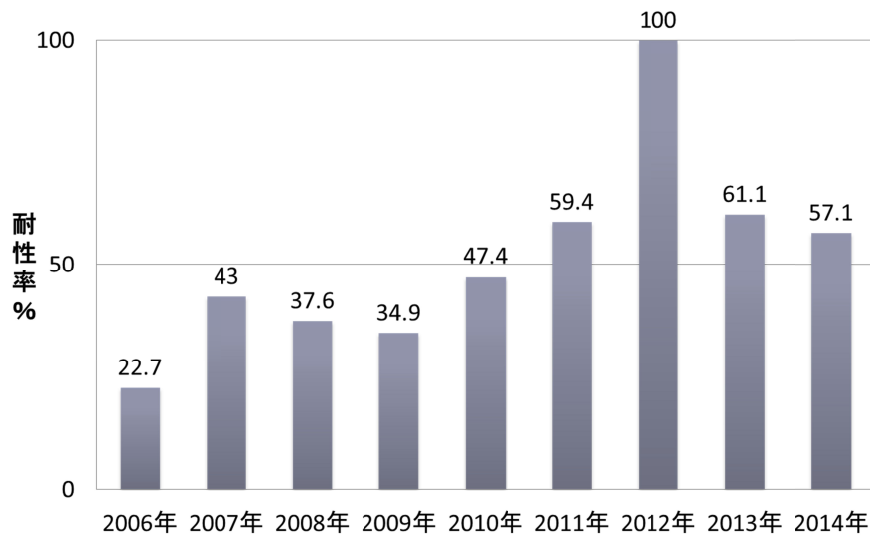


図2 散発下痢症由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率

表4 腸管出血性大腸菌の薬剤感受性試験成績 (2012-2013年)

血清群	耐性パターン	2012年	2013年	合計	備考
O157 (95株)	ABPC, SM, TC, CP, CPDX, CTX, Su	1		1	AmpC
	ABPC, SM, TC, KM, CP, Su		1	1	
	ABPC, SM, TC, ST, Su		1	1	
	ABPC, SM, TC, Su	2		2	
	ABPC, SM, Su	1		1	
	SM, TC, CP, Su		1	1	
	SM, Su	1		1	
	TC	1		1	
	感受性	47	39	86	
O26 (11株)	ABPC, SM, TC, ST, Su		2	2	家族
	SM, Su	1		1	
	ABPC		1	1	
	FOM		1	1	
	感受性	2	4	6	
O103	SM, Su		2	2	家族
	感受性		1	1	
O111	ABPC, SM, TC, KM, Su	1		1	
	ABPC, SM, TC, NA, Su		1	1	
O121	感受性	1	3	4	
O91	SM, TC, Su	1		1	
O88	感受性	1		1	
O113	感受性	1		1	
O148	感受性	1		1	
O4	感受性		1	1	
OUT	感受性		1	1	
計		62	59	121	

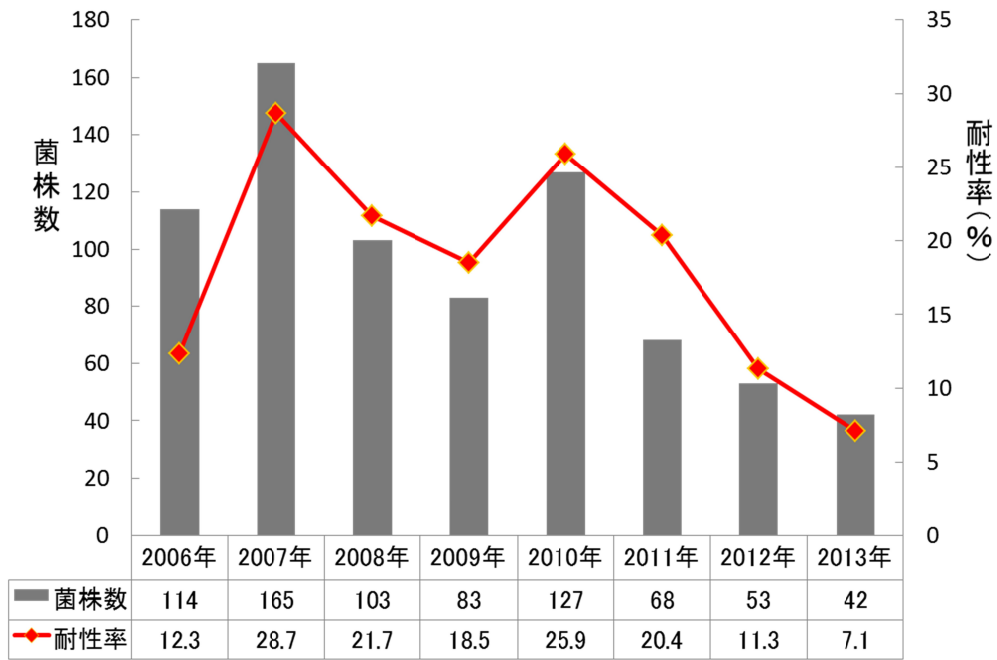


図3 腸管出血性大腸菌 O157 の菌株数と薬剤耐性率

分担研究報告書

分担課題名：伴侶動物病院から分離された薬剤耐性菌のヒトへの影響

研究分担者 田村 豊（酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット）

研究協力者 白井 優（酪農学園大学 獣医学部食品衛生学ユニット）

研究要旨

伴侶動物はヒトと密接な関係にある。伴侶動物に使用される抗菌性物質の多くは人体用であり、伴侶動物由来薬剤耐性菌がヒトへ伝播することによる影響が懸念される。今回、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因菌である *Clostridium difficile* の伴侶動物における現状及びヒトの感染症との関連を明らかにすることを目的として、イヌ由来 *C. difficile* の薬剤感受性及びその性状を決定し、ヒト臨床由来株との比較を行った。また、近年、ヒト医療において注目される 16S rRNA methylase(16S-RMTase)による高度アミノグリコシド耐性について、イヌ由来大腸菌での現状を調べた。イヌから分離された *C. difficile* の中にはヒト臨床由来株と同一のリボタイプ及び PFGE 型を示す株があった。イヌ由来大腸菌のうち 2/212(9.4%)がヒト医療で最も多く報告される 16S-RMTase の一つである *rmtB* 遺伝子を保有していた。以上の結果より、イヌ由来 *C. difficile* はヒトに伝播する可能性があること、伴侶動物においても 16S-RMTase が伝播していることが示された。

A. 研究目的

1. *Clostridium difficile* はヒトの抗菌薬関連下痢症・偽膜性大腸炎の原因となり世界的な問題となっている。海外では、介護施設の入所者を訪問するイヌから過去にヒトでアウトブレイクを起こしたことがあるリボタイプ 027 型菌が分離された。イヌを含む伴侶動物はヒトの生活と密接な関係があることから、伴侶動物が保有する *C. difficile* は、ヒトが保有する *C. difficile* のレゼルポアとなっている可能性がある。

そこで今回、ヒトとイヌの間での *C. difficile* 伝播の可能性について明らかに

することを目的として、昨年度の本研究において分離したイヌ糞便由来 *C. difficile* とヒト臨床由来 *C. difficile* について、薬剤感受性、リボタイプ、PFGE 型について比較を行った。

2. 近年、ヒトの医療現場においてプラスミド性 16S rRNA methylase(16S-RMTase)の獲得によるグラム陰性腸内細菌の高度アミノグリコシド耐性が広がっている。疫学的に 16S-RMTase 保有株はメタロ ラクタマーゼ、ESBL、*qnr* 遺伝子と共存することが多いことから、感染症を発症した場合は使用抗菌剤が限られることとなり大きな問題となっている。海外では、動物からも 16S-RMTase

保有株の存在が報告され始めた。

そこで今回、日本の伴侶動物における 16S-RMTase 保有状況の実態を明らかにすることを目的として、当研究室が保有するイヌ由来大腸菌株の 16S-RMTase 保有状況を調べた。

## B. 研究方法

### 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株との性状比較

昨年度の本研究にて 204 検体のイヌのうち 62 検体(30%)から 68 株の *C. difficile* が分離された。これら 68 株と東京都内の 2 病院において *C. difficile* 感染症患者から分離された 73 株について薬剤感受性、リボタイプ、PFGE 型を決定し比較を行った。

感受性試験は、CLSI の方法に従い、ヒトの抗菌薬関連下痢症に対して使用されるバンコマイシン(VCM)及びメトロニダゾール(MNZ)、抗菌薬関連下痢症の原因となるクリンダマイシン(GM)、セフトリアキソン(CTRX)、エリスロマイシン(EM)、シプロフロキサシン(CPFX)に対する感受性を寒天平板希釈法により調べた。加えて、テトラサイクリン(TET)に対する薬剤感受性も寒天平板希釈法で調べた。

### 2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

動物病院来院犬から分離されたイヌ由来大腸菌 212 株について、高度アミノグリコシド耐性株をスクリーニングするため、アミノグリコシド系 4 薬剤(ゲンタマイシン(GM)、アミカシン(AMK)、ネオマイシン(NEO)、アプラマイシン(APR))に対する薬剤感受性を CLSI の方法に従い寒天平板希釈法により測定した。

16S-RMTase の保有が疑われる株について、

*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA* 遺伝子の保有について PCR により検索した。

16S-RMTase 陽性株について、複数薬剤の感受性について微量液体希釈法で決定した。また、その他の耐性遺伝子も PCR により決定した。

16S-RMTase 陽性株について、プラスミド伝達性を明らかにするため接合伝達試験を行った。

## C. 研究結果

### 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床由来株の性状比較

薬剤感受性について、イヌ由来 *C. difficile* 及びヒト由来 *C. difficile* のいずれにおいても、VCM、MNZ 耐性は認められなかった(表 1)。抗菌薬関連下痢症の原因となる薬剤に対する耐性割合はヒト由来株が犬由来株に比べて高い傾向を示した。TET に対する耐性割合はいずれの由来も低かった。

リボタイプニングの結果、イヌ由来株は 29 の型に分類された(図 1)。最も主要なリボタイプ(16 株)はトキシン A および B 陽性であった。4 番目に主要なリボタイプ(4 株)はヒト臨床由来株(3 株)と同一のリボタイプを示した。これら同一のリボタイプの株について PFGE 解析を行ったところ、イヌ由来株のうち 1 株はヒト臨床由来株 3 株と同一の PFGE 型を示した(図 2)。

### 2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

イヌ由来大腸菌 202 株の 4 種類のアミノグリコシド系薬剤に対する感受性試験を行ったところ、GM 及び AMK に耐性を示す株が 29 株、4 薬剤の全てに耐性



を示す株が6株であった。

以上の35株のうち、2株から *rmtB* 遺伝子が PCR により同定された (表2)。*rmtB* の内部配列についてシーケンス解析を行ったところ、ヒトから分離されている *rmtB* 遺伝子と同一の遺伝子配列であった。この2株は、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し (表2)、*bla*<sub>TEM-1</sub> も保有していた。

*rmtB* 陽性株について、伝達試験を行ったところ、プラスミドの伝達が認められた (伝達頻度は  $1.7 \times 10^{-5}$  及び  $2.4 \times 10^{-3}$ )。トランスコンジュガントには GM、AMK 耐性が伝達した。

#### D. 考察

##### 1. イヌ由来 *C. difficile* とヒト臨床分離株の性状比較

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシシン A 及び B を産生する *C. difficile* を保有していた。分離された菌株について、ヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる抗菌薬に耐性割合はヒト臨床由来株に比べて低い傾向であるものの、CLDM、CTRX、CPFX に対して50%以上の株が耐性を示した。ブタ由来 *C. difficile* は TET に対して高い耐性割合を示すが、ブタでの TET の高い耐性割合は抗菌薬の使用実態を反映していると考えられている。以上のことから、イヌにおける3薬剤の高い耐性割合は、イヌへの抗菌薬の使用が一因と考えられる。

最も主要なリボタイプに分類された16株は全てトキシシン A および B を保有していた。イヌにおいて広く拡散している株が、ヒトに伝播した場合にヒトに対して毒性を示すことから、イヌからヒトに伝播した際

のリスクは高い。

また今回、イヌとヒトでリボタイプおよび PFGE 型が同一の株が同定された。今回のイヌ由来株とヒト由来株の疫学的な関連は不明であるものの、イヌとヒトが近縁な *C. difficile* を保有し、イヌとヒトの間で伝播し得ることが明らかとなった。今後、疫学的な調査を含めたイヌ由来 *C. difficile* の調査が必要であることが示唆された。

##### 2. イヌ由来大腸菌における 16S-RMTase 保有解析

日本のイヌから分離された大腸菌において低率ではあるが、プラスミド性 16S-RMTase が同定された。16S-RMTase 保有株は他の耐性因子と共存することが多く、問題となりやすい。今回分離された2株についても、アミノグリコシド系薬剤以外にも耐性を示し、少なくとも *bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子を保有していた。また、これら耐性遺伝子は接合伝達した。以上のことから、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及び耐性遺伝子の拡散には注意が必要であることが示唆された。

RGU-60 株について、NEO 及び APR に対する薬剤感受性は、トランスコンジュガントに伝達しなかった。RGU-60 株の NEO、APR 耐性は *rmtB* 遺伝子以外の因子が関係している可能性がある。また、高度アミノグリコシド耐性を示し、アミノ配糖体修飾酵素の作用による耐性では説明がつかない株も存在した。これらの株については新たな 16S-RMTase の存在の可能性も含めてさらなる研究が必要である。

#### E. 結論

伴侶動物として飼育されているイヌからヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となる可能性のある *C. difficile* が分離され、イヌとヒトの間での伝播の可能性が示された。イヌにおける *C. difficile* のヒトへの伝播リスク、制御法についてのさらなる研究が必要であることが示唆された。

イヌ由来大腸菌から低率ではあるが、プラスミド性 *rmtB* 遺伝子保有株が分離された。今後、イヌを含む伴侶動物における 16S-RMTase 保有株及び耐性遺伝子の拡散について注意が必要であることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### <口頭発表>

1. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊：薬剤耐性遺伝子はイェバエ腸管内で接合伝達する、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
2. 大久保寅彦、臼井優、田村豊：ドブネズミ由来 *Enterococcus faecalis* の遺伝子的特徴について-市街地と無人島の比較-、第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 28 日、東京
3. 臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：子豚糞便から分離された *Clostridium difficile* リボタイプ 078 と欧州で分離されたリボタイプ 078 の比較、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
4. 福田昭、臼井優、大久保寅彦、田村豊：薬剤耐性大腸菌はイェバエの発

育環で維持される、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌

5. 大久保寅彦、福田昭、田中和之、臼井優、田村豊：腸球菌の薬剤耐性性状と人為的影響の関係、第 81 回日本細菌学会北海道支部会、2014 年 8 月 29 日、札幌
6. 臼井優、酒見蓉子、内田郁夫、田村豊：豚へのフルオロキノロン剤投与及び群飼育がフルオロキノロン耐性カンピロバクターの選択・拡散に与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
7. 白川崇大、福田昭、大久保寅彦、臼井優、田村豊：農場由来耐性菌ベクターとしてのハエの役割、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
8. 工藤逸美、臼井優、田村豊：畜舎で使用される消毒薬が *Escherichia coli* の薬剤排泄ポンプに与える影響、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
9. 川崎ななみ、臼井優、田村豊：遺伝子導入による多剤耐性大腸菌の感受性回復の可能性、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
10. 鈴木要人、臼井優、岡健太郎、高橋志達、稲松孝思、神谷茂、田村豊：イヌ糞便由来 *Clostridium difficile* とヒト臨床由来株の比較、第 157 回日本獣医学会、2014 年 9 月 9 日、札幌
11. 長藤亘、臼井優、岡健太郎、高橋志達、山口博之、田村豊：

- Flavophospholipol による薬剤耐性遺伝子の接合伝達阻害作用、第157回日本獣医学会、2014年9月9日、札幌
12. 臼井優、大久保寅彦、福田昭、高田秀重、鈴木聡、田村豊：水圏環境からの薬剤耐性遺伝子伝播における八工の役割、環境微生物系合同大会2014、2014年10月23日、浜松
  13. 大久保寅彦、臼井優、鈴木聡、高田秀重、田村豊：バンコク周辺の水圏環境における薬剤耐性菌とその耐性遺伝子の解析、環境微生物系合同大会2014、2014年10月23日、浜松
  14. 臼井優、中島千絵、舘野翔、田勢準也、小野崎正修、大曾根司郎、鈴木定彦、田村豊：CAMERA法による野外サンプル(鶏肉及び鶏糞便)からの薬剤耐性カンピロバクターの迅速検出法、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日
  15. 中島千絵、臼井優、鈴木晴香、小野崎正修、大曾根司郎、田村豊、鈴木定彦：DNAアレイ技術を応用した新たなカンピロバクター同定・薬剤耐性検出法の開発、第7回日本カンピロバクター研究会、2014年12月11日
- <紙上発表>
1. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y.: Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand). *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 685-692. 2014
  2. Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y. Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*. *Vet. Microbiol.*, 170: 438-441, 2014.
  3. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
  4. Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y.: Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.*, 5: 513, 2014.
  5. Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 *Escherichia coli* carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
  6. Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y.: Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan. *J. Infect. Chemother.*, 20: 243-249. 2014.
  7. Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyauchi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.: Isolation of *Escherichia coli* strains with AcrAB-TolC efflux pump-associated

- intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 937-945., 2014
8. Sato T, Okubo T, Usui M, Yokota SI, Izumiyama S, Tamura Y.: Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. *PLOS One.*, 9: e96101, 2014.
  9. Okubo T, Tosaka Y, Sato T, Usui M, Nakajima C, Suzuki Y, Imura S, Tamura Y.: Bacterial diversity in sea ice from Southern ocean and the Sea of Okhotsk. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 2: 266-272, 2014.
  10. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Epidemiological analysis of Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs for companion animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1627-1629, 2014.
  11. Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.: Mechicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among veterinary staffs and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 58: 149-154, 2014.
  12. Makita K, Inoshita K, Kayano T, Uenoyama K, Hagiwara K, Asakawa M, Ogawa K, Kawamura S, Noda J, Sera K, Sasaki H, Nakatani N, Higuchi H, Ishikawa N, Iwano H, Tamura Y.: Temporal changes in environmental health risks and socio-psychological status in areas affected by the 2011 tsunami in Ishinomaki, Japan. *Environment and Pollution*, 3:1-20, 2014.
  13. Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, Sato T, Kuwahara O, Fujii N, Tamura Y, Yokota S.: High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *Chemotherapy* 59:379-384, 2014.
  14. Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh Tran Thi, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y.: Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1001-1008, 2014.
  15. Muramatsu Y, Usaki N, Thongchai C, Kramontong I, Kriegsak P, Tamura Y. Seroepidemiological survey in Thailand of *Coxiella burnetii* infection in cattle and chicken and presence in ticks attached to dairy cattle. *SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.*, 45: 1167-1172, 2014
  16. Harada K, Usui M, Asai T.: Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary respiratory pathogens. *J. Vet. Med. Sci.*, 76: 1427-1430., 2014.
  17. Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H,

Kojima A, Asai T.: Phylogenetic Grouping, Epidemiological Typing, Analysis of Virulence Genes, and Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* Isolated from Healthy Broilers in Japan. *Ir. Vet. J.*, 64: 14., 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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）  
「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 26 年度分担研究報告書

分担課題名：薬剤耐性化食中毒菌のヒトおよび家畜由来株のゲノム比較解析

分担研究者	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	第三室
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	第三室
研究協力者	竹内史比古	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	第三室
研究協力者	山下明史	国立感染症研究所	病原体ゲノム解析研究センター	第三室

#### 研究要旨

薬剤耐性食中毒菌の多くが多様なプラスミド伝達により薬剤耐性を獲得していることが明らかとなっている。食品と患者分離株との因果関係について、分離株のゲノム情報を活用した研究が行われるようになってきたが、耐性伝播の根本はプラスミド伝達が主体であり、異なる宿主菌でも同様の薬剤耐性プラスミドを有していることが報告されている。つまり、受け渡しを行う宿主菌のゲノム情報よりも、プラスミド単位での分子疫学のほうが頻繁な耐性授受の過程を追跡するのに好都合と考えられる。本分担研究では、家畜・食肉・ヒト臨床から分離された薬剤耐性菌プラスミドの包括的なデータベースを構築し、菌種間を伝播する薬剤耐性因子の追跡を可能にする解析パイプラインの構築を目的とする。本年度は、昨年度に開発したプラスミド総合解析ツール(GPAT)を改良した。具体的には、quality trimming や配列アセンブリでより多くの解析アルゴリズムを使えるようにし、更に、使い勝手の向上にも取り組んだ。これらの改良により GPAT による解析件数が飛躍的に増加したため、過去の解析結果に容易にアクセスできるデータ管理機能を追加する事が必要となった。データ管理機能はある程度までは実装できたもののさらなる改良が必要である。現在 GPAT は、計算能力の都合上、感染症研究所イントラネット内でのみ公開している。今後は増え続ける解析データをより容易に管理できる仕組みを実装し、Plasmid 配列全体の遺伝子水平伝達を過去・現在・地域に渡り俯瞰的に眺めることができるシステムへと発展させる必要がある。

## A．研究目的

ヒト、家畜、食品から分離される薬剤耐性食中毒菌のサーベイランス結果を基盤にし、ゲノム配列レベルおよびプラスミド・レベルでより具体的な耐性化機序と株伝播プロセスを解析する。この解析の基盤を作るために、現在登録されているプラスミド配列のうち、薬剤耐性因子の有無に関係なく全てのプラスミドを抽出し、各配列の特徴（Inc タイプ、薬剤耐性因子、Insertion sequence、Transposon 等）をリスト化する。プラスミド保有菌種の情報（菌種、分離年・国・地域・宿主、各種タイピング結果等）を網羅しデータベース化することで、より具体的な伝播過程が見えてくるものと期待している。

## B．研究方法

菌体からプラスミドに相当する DNA を抽出することが先決である。そのために、Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 用の菌体プラグからプラスミド DNA のみ泳動分離して回収・精製した。PFGE プラグの調整法は菌種に沿ったプロトコルを利用する。プラスミド・サイズに従った泳動距離を得るために、環状 DNA であるプラスミドを S1-nuclease でニックをいれ線状化の前処理を行った。S1-nuclease 処理菌体プラグによる PFGE を S1-PFGE と呼ぶ（図 1）。プラスミドに相当するアガロースバンドを切り出し、DNA を精製した。

精製 DNA を用いて Illumina NEXTERA XT kit にてライブラリー作成した。MiSeq シークエンサーにて解読後、プラスミド解析にかかる一連の情報解析を本年度開発を行った GPAT, iPAT を用いて行った（図 1）。詳細は C. 結果の項目に記述した。

## C．結果

### プラスミド配列の解読手法の構築

図 1 にプラスミド DNA の回収から情報解析までの一連の流れを示した。MiSeq シークエンサーにて解読後、新規に開発した GPAT を用いて解読リードの quality trimming, (genome subtract), de novo assembly, ORF 推定、推定した ORF の機能推定、および Inc タイプ推定を行う（図 2）。Quality trimming

ではユーザーの選択により skewer または fastq-mcf による処理の後 in house perl script で更に詳細なトリミングを行う。Genome subtract は bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを組み合わせた独自パイプラインを用いる。Assemble には A5\_miseq, A5 assembler, Spades, の他、p<sub>l</sub>atanus と p<sub>r</sub>ice を組み合わせた独自パイプライン (PIPr) を選択することが出来る。ORF 推定には prodigal, gmhmm\_heuristic, および gmhmm が選択可能である。ORF の機能推定および Inc タイプ推定には BLAST を用いる。データベースとして、既知の plasmid データベース、COG, ARDB + CARD、および NCBI NR を選択することができる。Inc タイプ推定には PBRT の replicon typing プライマーを用いた *in silico* PCR によって得られた配列データベースを用いる。

結果の概要 (quality trimming 後のリード数、アセンブル後のコンティグ長、コンティグ数、GC 含量、予測される遺伝子数、薬剤耐性遺伝子、Inc type など) は解析トップページの overview 欄で確認することが出来る。

Plasmid データベースは平成 24 年度の plast システム構築時に作成した plasmid データ抽出法を発展させ、NCBI から最新のデータをダウンロードできるシステムを構築した。ただし、解析する日によって結果が変わってしまう事態を防ぐため、GPAT では 2013 年 6 月 10 日時点のデータをもちいている。

GPAT は MiSeq のシーケンズ結果だけでなく、fasta format や GenBank format のデータも入力として受け付けることができる。GPAT 内部で使用しているソフトウェア、およびデータベースは全て無償で利用できるものを使用し、利用者および開発者の負担にならないよう配慮した。GPAT はバイオインフォマティクス解析に慣れていない研究者でも簡単に高度な解析ができるよ、操作性に配慮しながら開発を行い、直感的に操作できるユーザーインターフェースを構築した（図 3）。更に、実際に plasmid の解析を行っている研究者に試用してもらい、開発者側と利用者のあいだに認識のズレが生じないようにした。

これらの努力により、GPAT による解析の利便性は劇的に向上し、少数の試験的ユー

ザーのみにより今年度中に通算 1,700 以上の解析が GPAT を使って行われ、一人のユーザーが数百の解析結果を保つケースも現れた。このような多くのデータの扱いを容易にするために、本年度は GPAT に結果リスト表示機能等、データ取り扱い支援機能を追加したものの、利便性向上のためには更なる改良が必要である。

#### プラスミド間の関係性解析手法の構築

GPAT の開発により、大量の plasmid 配列を容易に解析することが可能になったが、薬剤耐性遺伝子や plasmid そのものの伝播課程を明らかにするためには plasmid 同士の関係性を大規模に解析する必要がある。そのため、plasmid が共通して持つ遺伝子のネットワークを解析するためのソフトウェア iPAT (inter Plasmid Analyzing Tool) を平成 25 年度に開発した。iPAT は GPAT が解析した plasmid の ORF 同士の相同性検索を行い、相同性のあった plasmid 同士をエッジで結合してゆくネットワーク解析を行う。

図には示していないが、臨床で採取され、GPAT で解析した plasmid を iPAT を用いて解析すると、同じ起源を持つと思われる plasmid はネットワーク上でも密接な関係性を示し、起源が違ふと思われる plasmid はネットワーク上も疎な関係性を示した。また、NDM-1 を持つ既知の plasmid のネットワーク解析を行ってみた結果を図 4 に示す。GPAT の持つ GenBank format 読み込み機能を用いて NCBI に登録されている NDM-1 を持つ plasmid 遺伝子を読み込み、iPAT を用いてネットワーク解析を行ったところ、NDM-1 保有 plasmid は 4 つのグループに分類できることが示唆された。iPAT は GPAT が解析したデータだけを扱うことができるため、既知の plasmid との関係性を解析するためには配列を手動で GPAT に入力してゆかなければならない。新たに解読した plasmid と既知の plasmid との関係性の解析を容易にするために、「既知のデータの入力」の過程を自動化できるようにする予定である。この手法は、既知の plasmid 全体の解析にも応用できる可能性がある。今後はこの手法を応用して plasmid による薬剤耐性伝播の網羅的な解析を行う予定である。

#### D . E . 考察・結論

薬剤耐性食中毒菌の多くは薬剤耐性プラスミドによる耐性獲得であり、プラスミド単位で菌種・株間の伝播を追跡できるので、より正確な耐性伝播の様式を明確にできるものと考えている。そのためには、プラスミド配列を利用した詳細な系統分類法の構築が必要である。配列解読から情報解析までの必要な手法がパイプライン化されておらず、配列解読後の解析に時間と負担を要していた。本分担研究において、“解読リードからシームレスにプラスミド解析”が可能な解析パイプラインを構築することを目標にし、誰もが使えて汎用性のある環境整備をはじめた。

本年度は、昨年度構築し、所内イントラネット限定公開した GPAT を改良し、通算 1,700 以上の解析を行った。GPAT は MiSeq による plasmid のシーケンシングからほとんどクリックだけでアセンブリや遺伝子予測・アノテーションまでを通常の web ブラウザのみで行うことを可能にし、1,700 以上の解析実績を積んだ。また、iPAT は GPAT で解析した plasmid 同士の関係性を図示することを可能にした。今後は GPAT/iPAT の利便性を更に充実させるとともに、これらの技術を用いて菌株・株間の plasmid そのものや plasmid 上の遺伝子の水平伝達を俯瞰的に解析できるシステムを構築してゆく予定である。

#### F . 健康危害情報

なし

#### G . 研究発表

(論文発表)

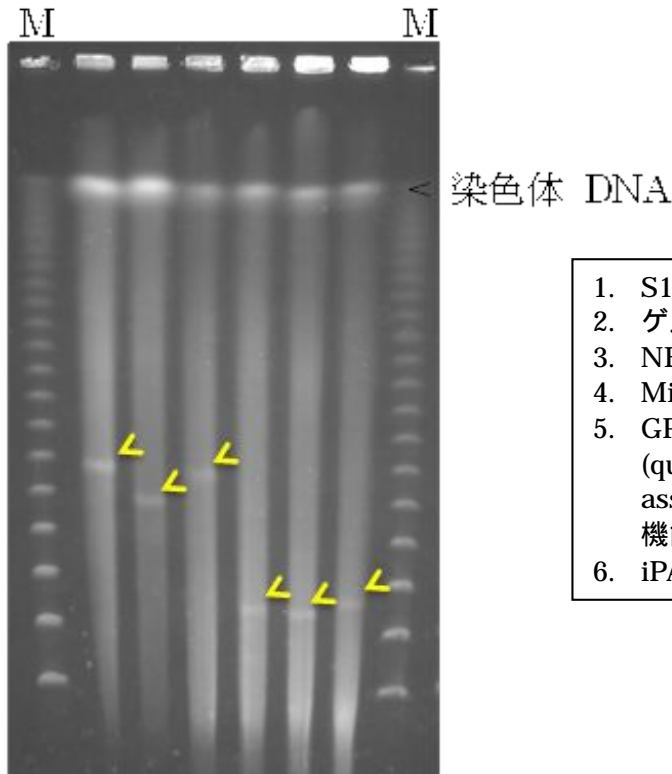
なし

(学会発表)

第 54 回 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) (ポスター発表 Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda) Plasmidome Community Network Analysis For Antimicrobial Resistance.

2014 年日本細菌学会総会 (ポスター発表 2P-089 山下明史、関塚剛史、黒田誠) Plasmidome network analysis.





1. S1-PFGE
2. ゲル回収
3. NEXTERA XT kit
4. MiSeq 解読
5. GPAT による解析  
(quality trimming, de novo assembly, ORF 抽出、遺伝子機能解析など)
6. iPAT による解析

図1 プラスミド DNA の PFGE 分離から配列解読そして情報解析までの流れ。S1-PFGE 泳動図に泳動分離されたプラスミド断片（黄色矢頭）を示す。

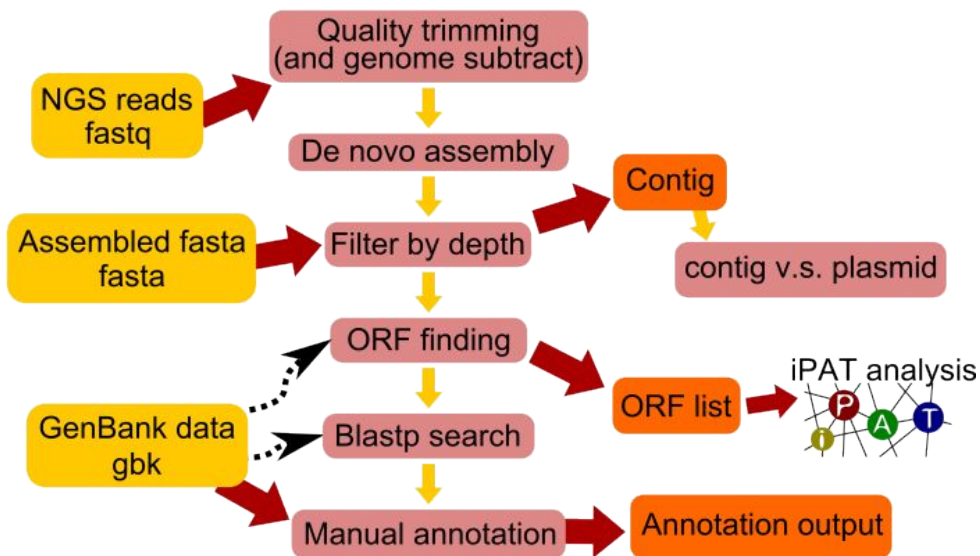


図2 GPAT (Global Plasmidome Analyzing Tool) による plasmid 解析のワークフロー。Quality trimming には skewer または fastq-mcf の後 in house perl スクリプトによる詳細なトリミングを行う。Genome subtract には bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを用いる。Assemble には A5\_miseq / A5 / spades / PIPr が選択可能である。ORF 推定には prodigal, gmhmm\_heuristic および gmhmm が選択可能である。

GPAT: V001-b

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

**project name:** ...

Collection: ...  
Organism: Escherichia coli, Host: ...  
plasmid size: 110kb, Drug resistance

Current group: ... [Show list](#) Go to another group

ID: ... (2015-01/19-12/23) ...

**Overview**

Total reads: 117,311  
Quality trimming: 91,001 (77.6%)

Assembly: 9 contigs  
Length: 1,049-41,350 bp  
GC: 50.9 %  
Total base: 111,136 bp  
N50: 26,645 bp

Number of genes: 137  
Detected Inc types: FII, FICF, FIBF

Detected AR genes

id	cov	Detected AR genes	Reference
100	100	AAC(3)-II	<a href="#">41056930</a>
100	100	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	<a href="#">17158058</a>
100	100	extended-spectrum beta-lactamase	<a href="#">DQ885477</a>
99	100	tetracycline efflux protein TetA tetracycline resistance protein, class A protein	<a href="#">31795168</a>

**Processing Status**

Process	Status	Exec
Trimming	Finished	<input type="checkbox"/>
Assemble	Finished	<input type="checkbox"/>
Filter by depth	Finished	<input type="checkbox"/>
Whole Plasmid similarity	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>
BLASTN search (inc type)	Finished	<input type="checkbox"/>
ORF finding	Finished	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (plasmid)	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (cog)	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (ardb)	Finished	<input type="checkbox"/>
Blastp Search (nr)	Not Analyzed	<input type="checkbox"/>

[Download](#)

[Run Process](#)

**Prefix Parameter Settings** -- Recommended settings --

--- Advanced settings ---

**Trimming params**

5' trim length: 5  
Trimming method: skewer  
Minimum average quality threshold: 15  
Trim lower than this q-value: 0 > 15  
Minimum remaining sequence length: 80  
Maximum length: 0  
Remove bacterial genomes: OFF

**Assembler settings**  
Select an assembler program: A5 miseq  
Cutoff depth: 0  
Cutoff depth=0 means automatic cutoff

**ORF finding settings**  
ORF finding mode: single  
Target sequence type: prokidal

**BLAST search settings**  
Gapped search: ON  
Filter: OFF  
E-value: 1e-10

[go to Annotation Editor](#)  
[go to inter Plasmid Analyzing Tool \(IPAT\)](#)  
[See your project list](#)

**About COG**

The cog database was downloaded from NCBI cog database (Mar. 2, 2003 version). We subsequently added class B metallo-beta-lactamase genes obtained from [The Metallo-Beta-Lactamase Engineering Database](#), because the cog does not contain the class B metallo-beta-lactamase genes.

**About ARDB (ARDB + CARD)**

The ARDB used in this service is made of [CARD database](#) plus [ARDB database](#). The original ARDB data is a list of accession number of antibiotic resistance genes, and the sequences were extracted from NCBI NR database by us on Jun. 4<sup>th</sup>, 2013. Note that we do not hold some of the genes in the original ARDB because of the update of NCBI database that make some accession numbers being expired. This database was updated on Sun Jan 18 23:55:10 JST 2015 according to the update of CARD database.

Collection: Year: Month: Date: Organism: Escherichia coli Host: ...

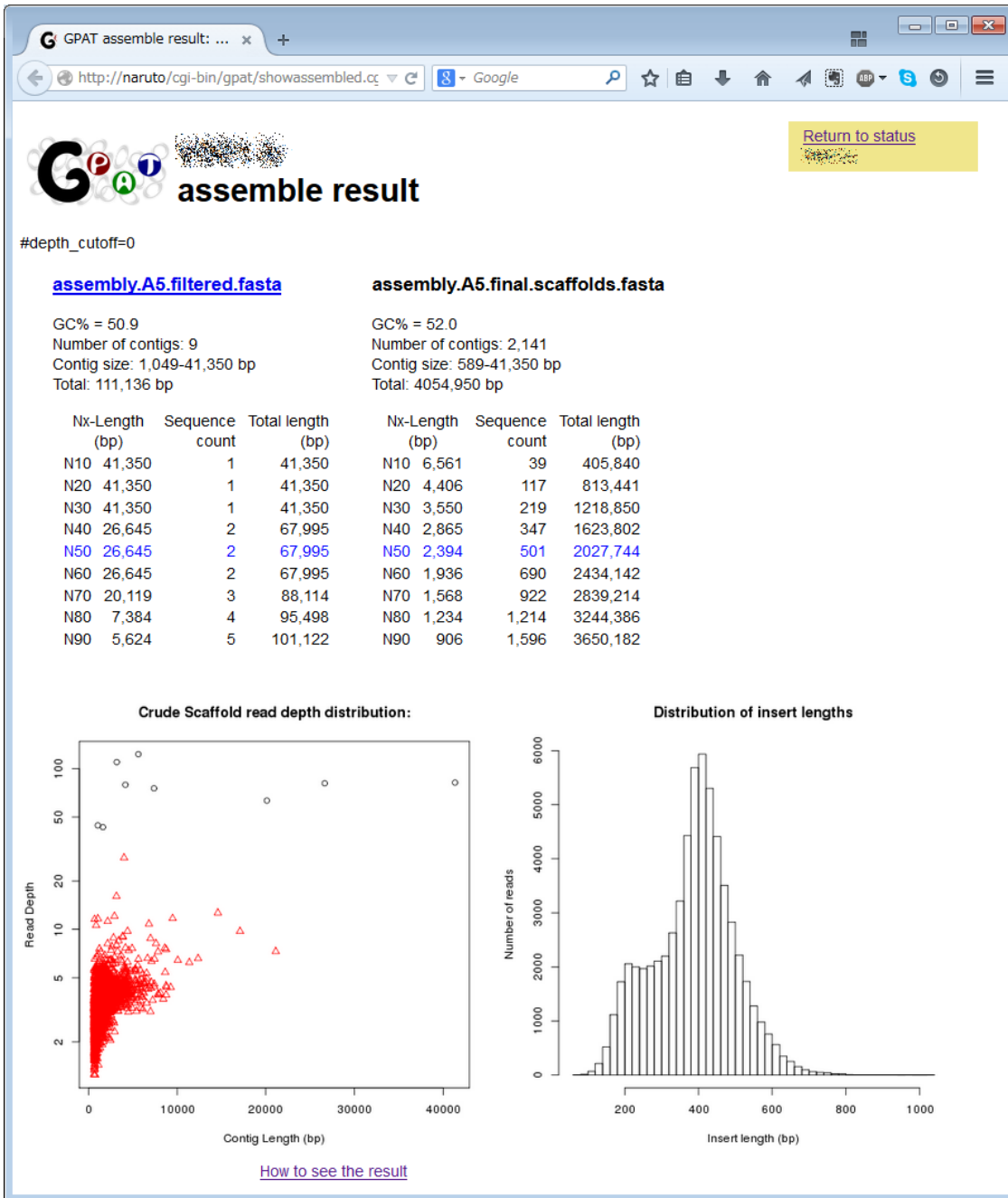
Place: Project Name: ...

Note: ... plasmid size: 110kb, Drug resistance [Change Project Name](#)

Your files: ...\_L001\_R1\_001.fastq.gz  
...\_L001\_R2\_001.fastq.gz [Download](#)

[Show/Hide analysis log](#)

[Reset this analysis](#) [Dispose this data](#)



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=20141020191240190&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 ...  
89% AY458224.gene.p01 *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Newport*

ARDB|dihydropteroate synthase >g|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825\_17 sul1 delta fusion protein fusion ...  
89% g|487652939|ref|WP\_001747810.1| *Proteus mirabilis*

ARDB|dihydropteroate synthase >g|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825\_17 sul1 delta fusion protein fusion ...  
89% g|487652939|ref|WP\_001747810.1| *Proteus mirabilis*

ARDB|dihydropteroate synthase >g|18426916|gb|AAK02048.2|AF261825\_17 sul1 delta fusion protein

Return to status  
Change database:  
-- database --  
-- database --  
plasmid  
nr  
cog  
ardb

GPAT result: [...](#)

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

## BLAST result: assembly v.s. plasmid

Download [raw blast result](#) or [tabular format](#)  
[go to plasmid view](#)

Return to status  
 Inverse mode  
 Show All Hide All

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

96.0%	* JN883043	pSH111_166 165791 circular	Salmonella enterica subsp. e
92.4%	* AB277724	pP91278 131520 circular	Photobacterium damselae subsp
92.4%	* AB277723	pP99-018 150157 circular	Photobacterium damselae sub
96.0%	* FJ621586	peH4H 148105 circular	Escherichia coli strain H4H plasm
96.0%	* FJ621587	pAMD4528 158213 circular	Salmonella enterica strain AM
96.0%	* CP000604	pSN254 176473 circular	Salmonella enterica subsp. enter
82.3%	* JN687470	pMR0211 178277 circular	Providencia stuartii plasmid pM
96.0%	* HQ023862	pUMNK88 160573 circular	Escherichia coli UMNK88 plasm
92.7%	* CP000609	pIP1202 182913 circular	Yersinia pestis biovar Orientalis
92.6%	* JQ824049	pTC2 180184 circular	Providencia stuartii plasmid pTC2,
92.7%	* CP008225	pKPH53 105874 circular	Klebsiella pneumoniae subsp. pn
96.0%	* HQ023863	pAPEC1990_61 161081 circular	Escherichia coli strain AF
93.4%	* JQ010884	pR55 170810 circular	Klebsiella pneumoniae plasmid pR55
88.3%	* JN157804	pNDM-KN 162746 circular	Klebsiella pneumoniae strain K
95.5%	* JX141473	pR148 165906 circular	Aeromonas hydrophila plasmid pR1

GPAT result tabular for: [...](#)

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

Project: [...](#)  
 Query: scaffold1.1|size48513, length = 48513  
 Subject: JN687470|pMR0211|178277|circular, length = 178277  
 Annotai: 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
100	88	0	0	1	88	127317	127230	0.0	174.0
96	476	19	0	91	566	108535	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
100	7563	0	0	16869	24431	165790	173352	0.0	14990.0
100	20	0	0	18116	18135	79462	79443	0.0	40.1
99	4931	1	0	24427	29357	173347	178277	0.0	8767.0
100	21	0	0	24843	24863	53920	53900	0.0	42.1
99	19156	2	0	29358	48513	1	19156	0.0	37960.0
100	19	0	0	35035	35053	36499	36481	0.0	38.2
100	19	0	0	45479	45497	33086	33068	0.0	38.2
100	64	0	0	48450	48513	21155	21082	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/showingblast.cgi?ID=...


**BLAST result: assembly v.s. incdb**

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

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

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

[scaffold2.1 length= 9124 nt](#)



98% 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](#)  
(37,282 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	<i>in silico</i> PCR typing in GPAT	PBRT kit PCR-based replicon typing Carattoli A, Bertini A, Villa L, et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. <i>J Microbiol Methods</i> 2005;63:219-28.
A/C	O	O
B/O	O	O
FIA	O	O
FIB	O	O
FIB-M	O	O
FIC	O	O
FII	O	O
FIK	O	O
FIS	O	O
H1	O	O
H2	O	O
HIB-M	O	O
I1	O	O
I2	X	O
K	O	O
L/M	O	O
N	O	O
P	O	O
R	O	O
T	O	O
U	O	O
W	O	O
X1	O	O
X2	O	O
Y	O	O

GPAT

http://naruto/cgi-bin/gpat/showStatus.cgi?group=...

List of: ...

Group	ID	Species Name	Collector name	Organization	Host	Place	Year	Quality	Genome	Number	Contigs	GC%	Contig length	Total size	NOI size	Number	Comment	Inc type	Ref. genes
1	...	...	...	K.pneumoniae	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	N/A	...
2	...	...	...	K.pneumoniae	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...
3	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	N	...	
4	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	PBRT_PAT	...	
5	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...	
6	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...	
7	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...	
8	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...	
9	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...	
10	...	...	...	E.coli	human	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	-	...	

図3 GPAT 実行結果画面。パラメータ設定、進捗状況確認など。de novo assembly 結果。ORF 検索結果。ORF の blast 検索結果。、既知の plasmid に対する同源性検索結果。Inc タイプの推定結果。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 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

## 研究要旨

わが国における薬剤耐性菌のモニタリング/サーベイランスシステムである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を、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）事業のデータと比較可能な形式でデータベース化したうえで再集計を行った。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うえで、2003 年から 2013 年までの薬剤耐性率の推移を比較した。JANIS データでみられる大腸菌のセファロsporin、フルオロキノロンの顕著な耐性化は JVARM データで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。今後継続的に JANIS データと JVARM データを比較するにあたっては、薬剤感受性を測定する抗菌薬の共有が重要と考えられた。

### A．研究目的

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、昨年度、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した。今年度は、JVARM の実データを昨年度構築したデータベースに取り込み、現在 JANIS 事業で実施している集計方法に準じて再集計することで、JANIS と JVARM、それぞれの薬剤耐性率を直接比較した。

### B．研究方法

#### 1. JVARM データの格納

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、昨年度構築した JVARM データベースに格納した。

#### 2. 主要抗菌薬における薬剤耐性の比較

JVARM と JANIS における薬剤耐性率の年次推移を比較した。JVARM データについては測定された MIC 値から CLSI2007 のブレイクポイントを用いて感性（S）、中等度耐性（I）、耐性（R）を判定した。CLSI2007 の基準がない抗菌薬については、同じく CLSI が定めている動物用抗菌薬の基準である M31-A3/VET01-S2 を用いた。また JVARM では 2010 年以降、測定抗菌薬が一部変更されたため、同系統の抗菌薬を用いて年次推移とした。具体的には、セフトオフルからセフトキシム（広域セファロsporin）とエンロフロキサシンとシプロフロキサシン（フルオロキノロン）である。

JANIS の 2007 年以降の薬剤耐性率は検査部門公開情報年報の薬剤耐性率を使用した。検査部門年報は CLSI2007 のブレイクポイントを用いて SIR を判定している。一方、2006 年以前の公開情報年報は参加

医療機関が報告した SIR に基づいて集計されており、医療機関によっては中等度耐性以上 (I or R) の形式で報告している場合もあるため、本研究における耐性を R と I or R と定義した。また、JANIS 公開情報では集計されていない抗菌薬については、2013 年の耐性率のみ、2013 年 1 月から 2013 年 9 月の JANIS データより医療機関が報告した SIR を抽出して集計した。

JANIS と JARM 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。フルオロキノロン系について、JANIS ではレボフロキサシンの耐性率を示し、一方、JARM ではエンロフロキサシンとシプロフロキサシンを示した。JARM でのテトラサイクリンについては JANIS のミノサイクリンのデータを用いた。

表 1、表 2 に JANIS と JARM において測定されている抗菌薬および SIR 判定基準を示す。

## C. 結果

### 1. JARM データ概要

肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌、計 6798 株のデータがデータベースに格納された。畜種の内訳は、肉用牛が最も多く 34%をしめ、その他の畜種はいずれも 22%であった。年別、畜種別の株数を図 1 に示す。畜種の割合は期間を通じて変化はなかったが、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。

### 2. 主要抗菌薬における薬剤耐性の比較

図 2～図 7 に JANIS と JARM データに基づく、大腸菌おける各抗菌薬に対する耐性率の推移を示す。

図 2～図 4 は、 $\beta$ -ラクタム剤に対する耐性率の推移である。図 2 の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た。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。図 3 と図 4 はそれ

ぞれ、一般的には第 1 世代と第 3 世代と呼ばれるセファロスポリン系抗菌薬である、セファゾリンとセフトリオキサシムの耐性率を示す。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リオキサシム耐性も、同様の傾向を示しているが、2009 年まではセフトリオキサ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。

図 5 はフルオロキノロン耐性率の推移である。JANIS ではセファロスポリン系同様、過去 10 年間に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、JARM データではいずれの畜種においても過去 10 年間にこのような耐性率の増加傾向は認めない。

図 6 はクロラムフェニコール耐性率の推移である。ヒト臨床では現在クロラムフェニコールの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。ただ、JANIS データベース上での 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。JARM 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。

図 7 はテトラサイクリン/ミノサイクリンの耐性率である。JARM、JANIS 共に 10 年間継続したデータは得られていないが、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

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、 $\beta$ -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  $\beta$ -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、鶏プ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  $\beta$ -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ピ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

10 年間のみでの比較では、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。

#### F . 健康危害情報

なし

#### G . 研究発表

なし

#### H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

表1 JANIS JVARM において薬剤感受性試験を実施、もしくは集計している抗菌薬

JVARM 測定抗菌薬		JVARM		JANIS		JANIS 345,381 株の E. coli のうち MIC 測定株割合
		2003-2009	2010-2013	2003-2006	2007-	
1216	ABPC (アンピシリン)					64.19%
1537	CEZ (セファゾリン)					67.44%
1636	CTX (セフトキシム)					54.50%
1801	KM (カナマイシン)			×	×	0.07%
1821	GM (ゲンタマイシン)					64.16%
2101	TC (テトラサイクリン)			×	×	0% (MINO66.99%)
2201	CP (クロラムフェニコール)					5.28%
2401	NA (ナリジクス酸)			-	-	ND
2521	CPFX (シプロフロキサシン)					33.05% (LVFX65.52%)
2726	ST (スルファメトキサゾール/トリメトプリム)					54.36%
A002	BCM (ピコザマイシン)			×	×	
A003	CTF (セフチオフル)			×	×	
A005	DSM (ジヒドロストレプトマイシン)			×	×	
A006	ERFX (エンロフロキサシン)			×	×	
A008	TMP (トリメトプリム)			×	×	

表2 SIR 判定基準

抗菌薬コード		CLSI2007		M31-A3/VET01-S2		CLSI2012	
		S 基準	R 基準	S 基準	R 基準	S 基準	R 基準
1216	ABPC (アンピシリン)	8	32				
1537	CEZ (セファゾリン)	8	32			2	8
1636	CTX (セフトキシム)	8	64			1	4
1801	KM (カナマイシン)	16	64				
1821	GM (ゲンタマイシン)	4	16				
2101	TC (テトラサイクリン)	4	16				
2201	CP (クロラムフェニコール)	8	32				
2401	NA (ナリジクス酸)	16	32				
2521	CPFX (シプロフロキサシン)	1	4				
2726	ST (スルファメトキサゾール/トリメトプリム)	2/38	8/152			2/38	4/76
A002	BCM (ピコザマイシン)					128*JVARM 基準	
A003	CTF (セフチオフル)			2	8		
A005	DSM (ジヒドロストレプトマイシン)					32*JVARM 基準	
A006	ERFX (エンロフロキサシン)			0.25	2		
A008	TMP (トリメトプリム)	4	16	8	16	8	16

図1 JVARM集計データ・年別・畜種別、2003-2013

N=6798

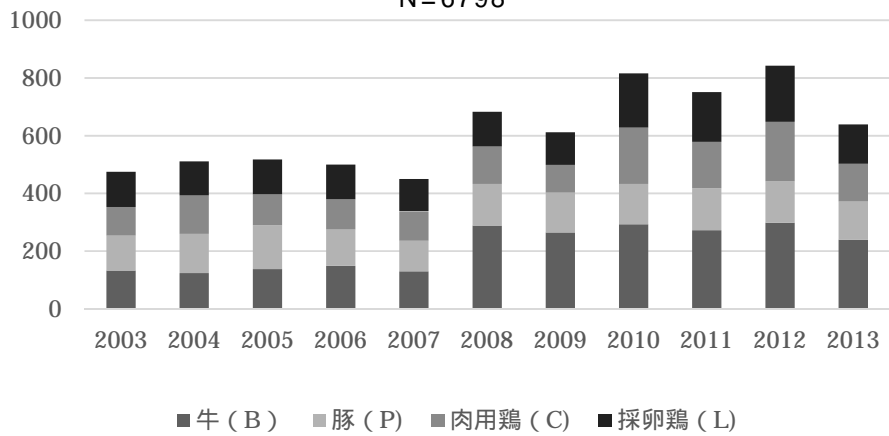


図2 大腸菌におけるアンピシリン(ABPC)耐性菌割合

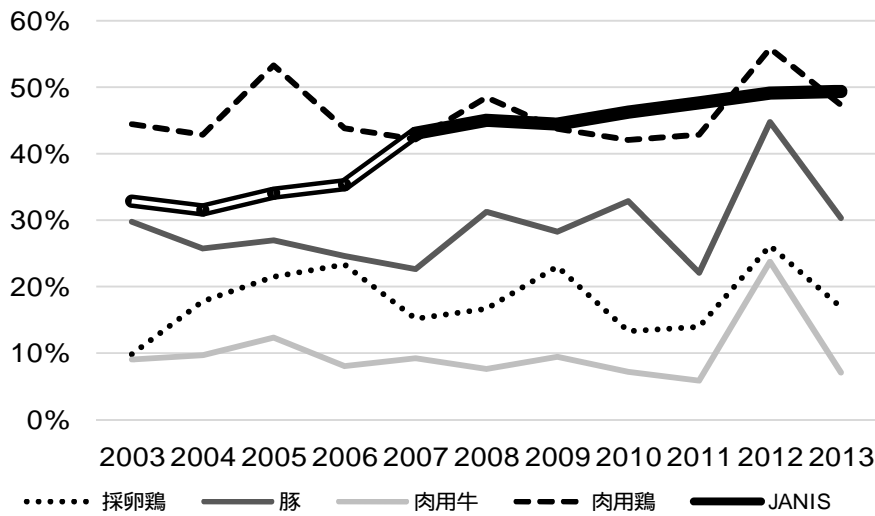


図3 大腸菌におけるセファゾリン (CEZ)耐性菌割合

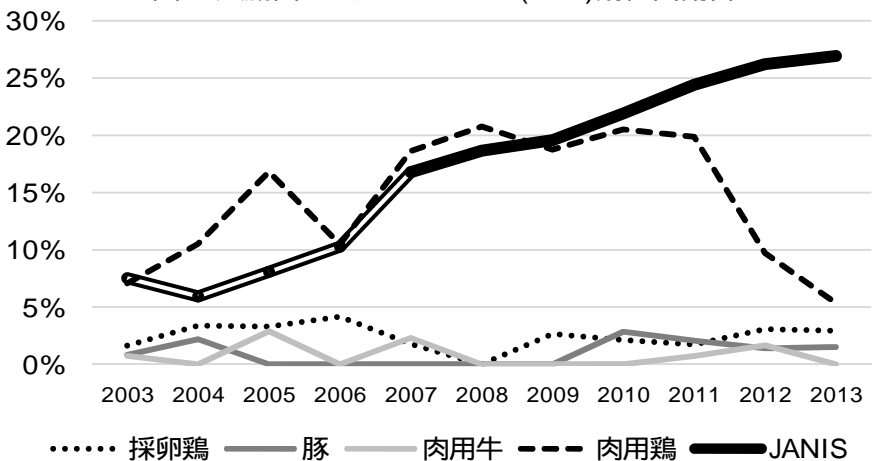


図4 大腸菌におけるセフチオフル（CTF）/セフォタキシム（CTX）耐性菌割合

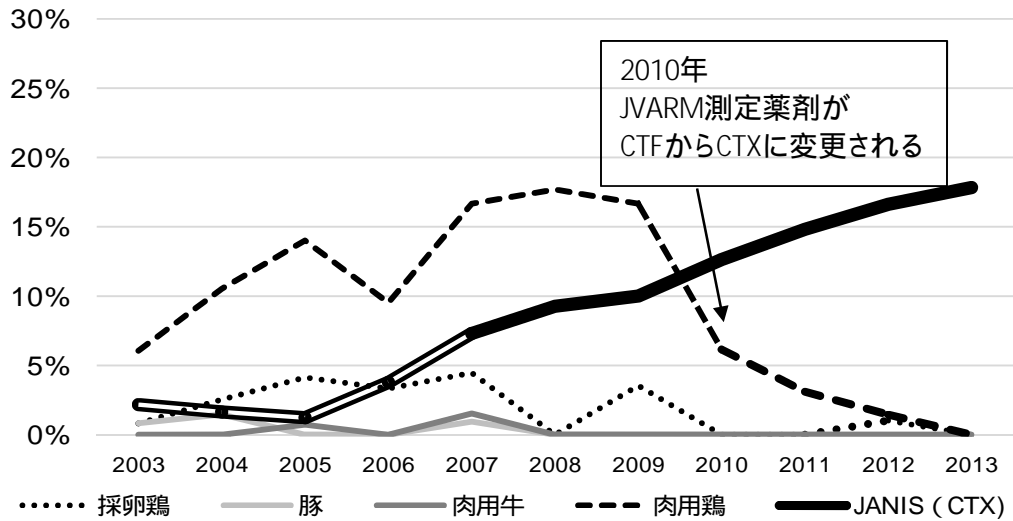


図5 大腸菌におけるエンロフロキサシン（ERFX）/シプロフロキサシン（CPFX）レボフロキサシン（LVFX）耐性菌割合

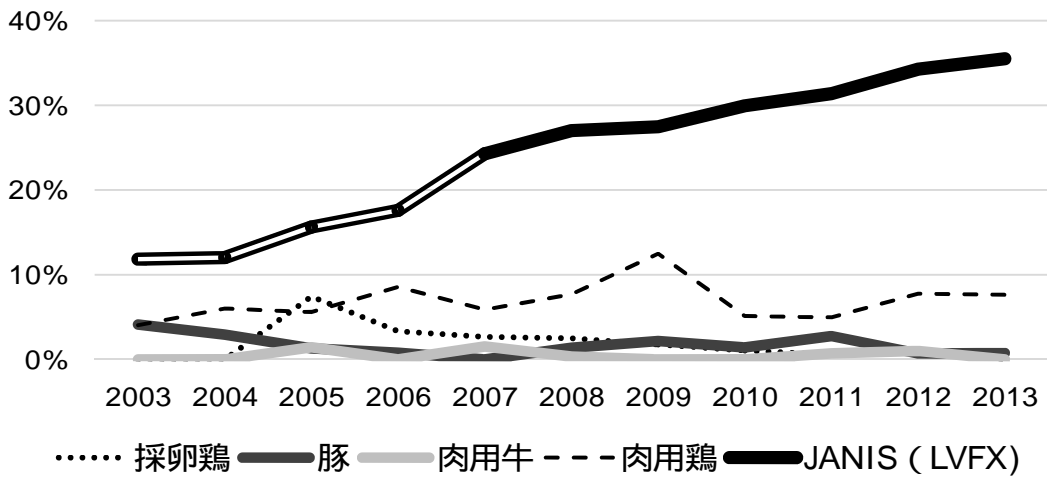


図6 大腸菌におけるクロラムフェニコール（CP）耐性菌割合

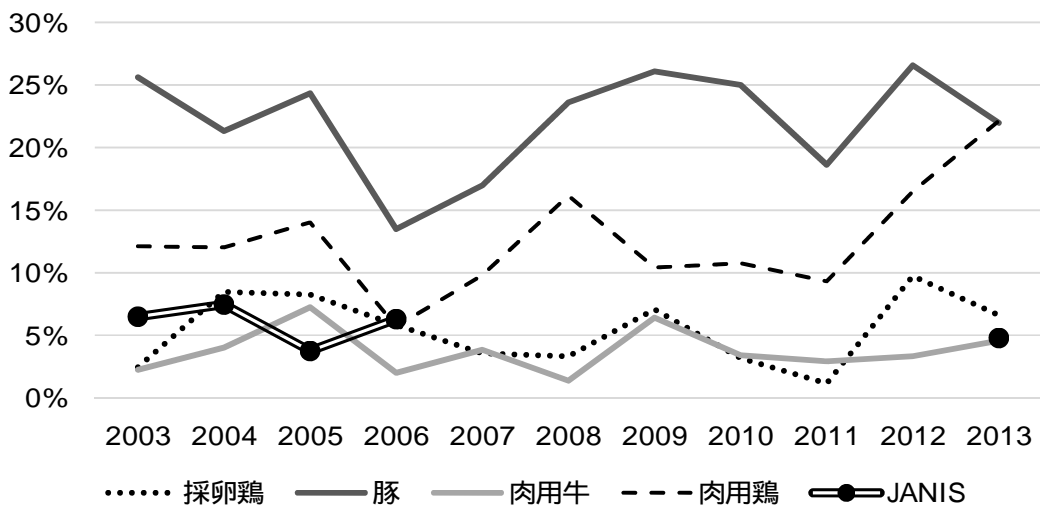
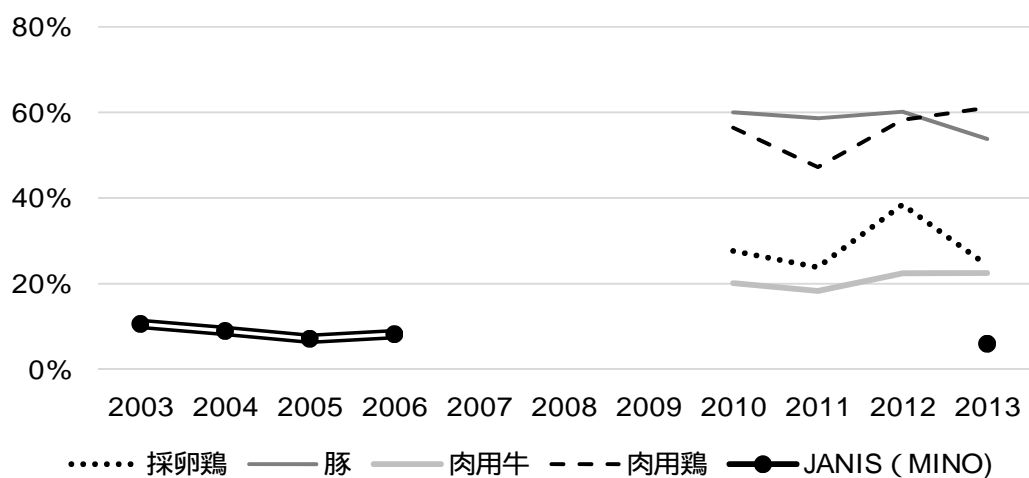


図7 大腸菌におけるテトラサイクリン (TC) /ミノサイクリン (MINO)  
耐性菌割合



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 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）について国内で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。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、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%）、一方 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。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。VRE については、ブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE（*E. faecium*）を検出した（頻度 1.3%）。また我々が 2011 年に環境中（国内産鶏肉）から初めて分離し報告した新規の VanN 型 VRE が、今回収集した産地の異なる国内産鶏肉 2 検体から検出された。PFGE 解析と MLST 解析から、これらの株は互いに同一由来であり、さらには 2011 年に報告した VRE 株とも同一の起源であった。

#### A. 研究目的

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し低いが、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：国内産食肉は国内 3ヶ所の食肉検査所からそれぞれ鶏肉 30 検体、あるいは 40 検体を収集した。海外食肉は各年度に検疫所で取り扱う輸入鶏肉（ブラジル産 78 検体、フランス産 6 検体、米国産 4 検体、タイ産 1 検体の合計 89 検体）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。

#### 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

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。それぞれ ABPC 添加（80mg/L）LB 液体培地 3 ml で一夜培養し、0.1 ml を二種類の薬剤添加 DHL 寒天培地（CAZ を 1 mg/L または CTX を 1mg/L 含む）に塗布した。それぞれの平板上の発育コロニーを 2 個ずつ釣菌し、純培養後チトクロム・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 2 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。

##### 2) VRE の検出

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、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*, *vanC1*, *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 シークエンス解析 (Big Dye primer 法) PFGE 解析、MLST 解析を行った。

**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

1) ESBL 生産菌および AmpC 生産菌の調査・検出のために 2013 年度 (2014 年 2 月) に収集した国内産鶏肉 100 検体、輸入鶏肉 89 検体の合計 189 検体を解析した。食肉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 (図 1、図 2)。国内産食肉と輸入食肉との比較では ESBL 生産菌は国内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%)。国内産食肉由来 ESBL 生産菌および輸入食肉由来 ESBL 生産菌の検出結果、及び耐性遺伝子型の解析の詳細を図 3、図 4 に示す。また同様に AmpC 生産菌の遺伝子解析結果は図 5 に示す。耐性遺伝子型の解析では ESBL 生産菌は CTX-M 型が多く、国内産は CTX-M-1 (71%)、輸入食肉は CTX-M-2 (58%)、CTX-M-8/25 (22%) が主に分離された。一方、AmpC 生産菌では国内外共にほとんどの食肉由来株において耐性遺伝子は CIT 型であった。また今回、食肉から分離された ESBL 生産株、AmpC 生産株 (合計 155 株) の菌種としては *Escherichia coli* が最多 (93%) であり、次いで *Proteus mirabilis* (2%)、*Enterobacter cloacae* (2%) が多く分離された (図 6)。

2) 2014 年 2 月に収集した食肉 (鶏肉) 189 検体のうち、輸入鶏肉 1 検体 (ブラジル産) から VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された (表 1)。ブラジル産鶏肉における検出率としては 1.3% (1/78 検体) 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 2)。これらの 2 検体は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 である (図 7)。今回の調査で、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 8)。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 3)。これらの結果は今回検出した VanN 型株が同一由来であり、かつ 2011 年の分離株とも同一の起源を持つことを示している。

### D. 考察

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。昨年度、一昨年度の本調査、研究での各耐性腸内細菌科菌の検出頻度は他の報告とは異なり (時には 80% 上の検出率)、それぞれ全体で 10% 程度と比較的低かった。その原因として、検体を LB 液体培地で前培養する際に、薬剤を入れずに単純な増菌操作のみをしたことが考えられた。本年度の調査では、検出率の改善を目的として、前培養液に抗菌薬を加え (ABPC:80mg/L)、増菌処理を行った。今回の検出方法により、昨年度と比べ、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。一方で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ことから、その機関での検体の採取方法や送付方法などに手技的な問題が考えられた。

これまでの調査と同様、今回もブラジル産鶏肉から頻度は低いものの (分離率 1.3%)、VanA 型 VRE が検出された。グリコペプチド系抗菌薬であるアバ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。ブラジルでの家畜への抗菌薬投与の規制管理状況は不明であるが、一度、環境中 (家畜腸管内) で増加した VRE は、抗菌薬による選択圧の非存在下であっても比較的長期に存続することが推測される。

一方、今回、日本の環境中 (複数の食肉検体) から以前分離した VRE と同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株を複数分離した。これらの結果は、これらの VRE 株は同一の起源を持ち、この VanN 型 VRE が既に国内の環境中に伝播、拡散していることを示唆している。

### E. 結論

国内産鶏肉及びの輸入鶏肉から ESBL 生産および AmpC 生産腸内細菌科菌 (主に大腸菌) をそれぞれ 54%、20% の頻度で検出した。

ブラジル産輸入鶏肉から VanA 型 VRE が 1.3% の頻度で検出された。異なる産地の国内産鶏肉検体から同一由来と考えられる VanN 型 VRE 株を複数分離されたことから、VanN 型 VRE 株の国内の環境での伝播・拡散が強く疑われた。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kudo M, Nomura T, Yomoda S, Tanimoto K, Tomita H. Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* over a long period in a university hospital in Japan. *Microbiology Immunology*.

58:607-614, 2014.

- 2) Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein BacL<sub>1</sub> of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala<sup>2</sup>-crossbridged peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 197:286-295, 2015.

## 2. 学会発表

- 1) Nomura H, Tomita H. Analysis of VanN-type vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolates in Japan. 4th ASM Conference on Enterococci. March 5-7, 2014 Cartagena, Colombia.
- 2) 菅貴則、谷本弘一、富田治芳. 食肉から分離された ESBL 産生腸内細菌科菌について .第 87 回日本細菌学会 . 2014 年 3 月 26 日 東京 .
- 3) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、谷本弘一、富田治芳 .日本の VanN 型 VRE について .第 87 回日本細菌学会総会 . 2014 年 3 月 28 日 東京 .

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録       なし
3. その他







## 研究発表(平成26年度)

### 学会発表一覧表

発表者氏名	発表タイトル名	学会名	開催年月日	開催地
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
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
福田昭、 臼井優、 大久保寅彦、 田村豊	薬剤耐性遺伝子はイエバエ腸管内で接合伝達する	第87回日本細菌学会	2014年3月28日	東京
大久保寅彦、 臼井優、 田村豊	ドブネズミ由来 <i>Enterococcus faecalis</i> の遺伝子的特徴について-市街地と無人島の比較-	第87回日本細菌学会	2014年3月28日	東京
臼井優、 岡健太郎、 高橋志達、 稲松孝思、 神谷茂、 田村豊	子豚糞便から分離された <i>Clostridium difficile</i> リボタイプ078と欧州で分離されたリボタイプ078の比較	第81回日本細菌学会北海道支部会	2014年8月29日	札幌
福田昭、 臼井優、 大久保寅彦、 田村豊	薬剤耐性大腸菌はイエバエの発育環で維持される	第81回日本細菌学会北海道支部会	2014年8月29日	札幌
大久保寅彦、 福田昭、 田中和之、 臼井優、 田村豊	腸球菌の薬剤耐性性状と人為的影響の関係	第81回日本細菌学会北海道支部会	2014年8月29日	札幌

白井優、 酒見蓉子、 内田郁夫、 田村豊	豚へのフルオロキノロン剤投 与及び群飼育がフルオロキノ ロン耐性カンピロバクターの 選択・拡散に与える影響	第157回日本獣医学会	2014年9月9日	札幌
白川崇大、 福田昭、 大久保寅彦、 白井優、 田村豊	農場由来耐性菌ベクターとし ての八工の役割	第157回日本獣医学会	2014年9月9日	札幌
工藤逸美、 白井優、 田村豊	畜舎で使用される消毒薬が <i>Escherichia coli</i> の薬剤排泄 ポンプに与える影響	第157回日本獣医学会	2014年9月9日	札幌
川崎ななみ、 白井優、 田村豊	遺伝子導入による多剤耐性大 腸菌の感受性回復の可能性	第157回日本獣医学会	2014年9月9日	札幌
鈴木要人、 白井優、 岡健太郎、 高橋志達、 稲松孝思、 神谷茂、 田村豊	イヌ糞便由来 <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> とヒト臨床由来株の比 較	第157回日本獣医学会	2014年9月9日	札幌
長藤巨、 白井優、 岡健太郎、 高橋志達、 山口博之、 田村豊	Flavophospholipolによる薬剤 耐性遺伝子の接合伝達阻害作 用	第157回日本獣医学会	2014年9月9日	札幌
白井優、 大久保寅彦、 福田昭、 高田秀重、 鈴木聡、 田村豊	水圏環境からの薬剤耐性遺伝 子伝播における八工の役割	環境微生物系合同大 会2014	2014年10月23日	浜松
大久保寅彦、 白井優、 鈴木聡、 高田秀重、 田村豊	バンコク周辺の水圏環境にお ける薬剤耐性菌とその耐性遺 伝子の解析	環境微生物系合同大 会2014	2014年10月23日	浜松

白井優、 中島千絵、 館野翔、 田勢準也、 小野崎正修、 大曾根司郎、 鈴木定彦、 田村豊	CAMERA法による野外サンプル (鶏肉及び鶏糞便)からの薬 剤耐性カンピロバクターの迅 速検出法	第7回日本カンピロバ クター研究会	2014年12月11日	東京
中島千絵、 白井優、 鈴木晴香、 小野崎正修、 大曾根司郎、 田村豊、 鈴木定彦	DNAアレイ技術を応用した新た なカンピロバクター同定・薬 剤耐性検出法の開発	第7回日本カンピロバ クター研究会	2014年12月11日	東京
Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda	ポスター発表 Plasmidome Community Network Analysis For Antimicrobial Resistance.	第54回Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)	2014年9月5日~9日	ワシント ンDC 米国
山下明史、 関塚剛史、 黒田誠	ポスター発表 2P-089 Plasmidome network analysis	2014年日本細菌学会総 会	2014年3月26-28日	東京
Nomura H, <u>Tomita H</u>	Analysis of VanN-type vancomycin resistant <i>Enterococcus faecium</i> isolates in Japan.	4th ASM Conference on Enterococci.	March 5-7, 2014	Cartagena, Colombia
菅貴則、 <u>谷本弘一</u> 、 <u>富田治芳</u>	食肉から分離されたESBL産生腸 内細菌科菌について	第87回日本細菌学会	2014年3月26日	東京
野村隆浩、 柴山恵吾、 荒川宜親、 <u>谷本弘一</u> 、 <u>富田治芳</u>	日本のVanN型VREについて	第87回日本細菌学会総 会	2014年3月28日	東京

## 研究発表(平成26年度)

### 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M.	Characterization of <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> -carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing <i>Salmonella enterica</i> isolates from chicken meat with a common supplier in Japan.	Antimicrob Agents Chemother	Dec; 58(12)	7545-7	2014
Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S	Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of <i>Campylobacter jejuni</i> ST-4526 and ST-4253 in Japan.	J Appl Microbiol.	114(5)	1529-1538	2013
Hiki,M., Usui,M., Akiyama T., Kawanishi, M., Tsuyuki, M., Imamura, S., Sekiguchi, H., Kojima A., Asai, T	Phylogenetic grouping, epidemiological typing, analysis of virulence genes, and antimicrobial susceptibility of <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy broilers in Japan.	Irish Veterinary Journal.			2014
Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M.	Characteristics of <i>Salmonella enterica</i> serovar 4,[5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium.	PLoS ONE	9(8)	e104380	2014

Ido N, Iwabuchi K, Sato'o Y, Sato Y, Sugawara M, Yaegashi G, Konno M, Akiba M, Tanaka K, Omoe K, Uchida I.	Molecular typing of <i>Salmonella enterica</i> 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)	
Kawahara R, Seto K, <u>Taguchi M</u> , Nakajima C, kumeda Y, Suzuki Y	Characterization of third- generation cephalosporin- resistant Shiga toxin- producing strains of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in Japan.	(投稿中)			
Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y.	Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia, and Thailand).	<i>J. Vet. Med. Sci.</i> ,	76	685-692	2014
Usui M, Sakemi Y, Uchida I, Tamura Y.	Effects of fluoroquinolone treatment and group housing of pigs on the selection and spread of fluoroquinolone-resistant <i>Campylobacter</i> .	<i>Vet. Microbiol.</i> ,	170	438-441	2014
Usui M, Uchida I, Tamura Y	Selection of macrolide-resistant <i>Campylobacter</i> in pigs treated with macrolides.	<i>Vet. Rec.</i> ,	175	430	2014

Usui M, Nanbu Y, Oka K, Takahashi M, Inamatsu T, Asai T, Kamiya S, Tamura Y.	Genetic relatedness between Japanese and European isolates of <i>Clostridium difficile</i> originating from piglets and their risk associated with human health.	<i>Front. Microbiol.</i> ,	5	513	2014
Sato T, Yokota SI, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.	Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 <i>Escherichia coli</i> carrying <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> from fecal samples of dogs in Japan.	<i>J. Med. Microbiol.</i>	63	263-270	2014
Okubo T, Sato T, Yokota SI, Usui M, Tamura Y.	Comparison of broad-spectrum cephalosporin-resistant <i>Escherichia coli</i> isolated from dogs and humans in Hokkaido, Japan.	<i>J. Infect. Chemother.</i>	20	243-249.	2014
Sato T, Yokota SI, Ichihashi R, Miyachi T, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.	Isolation of <i>Escherichia coli</i> strains with AcrAB–TolC efflux pump-associated intermediate interpretation or resistance to fluoroquinolone, chloramphenicol, and aminopenicillin from dogs admitted to a university veterinary hospital.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i> ,	76	937-945	2014
Sato T, Okubo T, Usui M, Yokota SI, Izumiyama S, Tamura Y	Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in <i>Escherichia coli</i> from dairy cattle in Japan.	<i>PLOS One.</i>	9	e96101	2014



Okubo T, Tosaka Y, Sato T, Usui M, Nakajima C, Suzuki Y, Imura S, Tamura Y	Bacterial diversity in sea ice from Southern ocean and the Sea of Okhotsk.	<i>J. Appl. Environ. Microbiol.</i> ,	2	266-272	2014
Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.	Epidemiological analysis of Mechicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> carriage among veterinary staffs for companion animals in Japan.	<i>J. Vet. Med. Sci.</i> ,	76	1627-1629	2014
Ishihara K, Saito E, Shimokubo N, Muramatsu M, Maetani S, Tamura Y.	Mechicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> carriage among veterinary staffs and dogs in private veterinary clinics in Hokkaido, Japan.	<i>Microbiol. Immunol.</i> ,	58	149-154	2014
Makita K, Inoshita K, Kayano T, Uenoyama K, Hagiwara K, Asakawa M, Ogawa K, Kawamura S, Noda J, Sera K, Sasaki H, Nakatani N, Higuchi H, Ishikawa N, Iwano H, Tamura Y	Temporal changes in environmental health risks and socio-psychological status in areas affected by the 2011 tsunami in Ishinomaki, Japan.	<i>Environment and Pollution</i> ,	3	1-20	2014

Tsukamoto N, Ohkoshi Y, Okubo T, Sato T, Kuwahara O, Fujii N, Tamura Y, Yokota S	High prevalence of cross-resistance to aminoglycosides in fluoroquinolone-resistant <i>Escherichia coli</i> clinical isolates.	<i>Chemotherapy</i>	59	379-384	2014
Uchida L, Heriyanto A, Thongchai C, Hanh Tran Thi, Horiuchi M, Ishihara K, Tamura Y, Muramatsu Y	Genetic diversity in the prion protein gene (PRNP) of domestic cattle and water buffaloes in Vietnam, Indonesia and Thailand.	<i>J. Vet. Med. Sci.,</i>	76	1001-1008	2014
Muramatsu Y, Usaki N, Thongchai C, Kramontong I, Kriegsak P, Tamura Y.	Seroepidemiological survey in Thailand of <i>Coxiella burnetii</i> infection in cattle and chicken and presence in ticks attached to dairy cattle.	<i>SE Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.,</i>	45	1167-1172	2014
Harada K, Usui M, Asai T	Application of enrofloxacin and orbifloxacin disks approved in Japan for susceptibility testing of representative veterinary respiratory pathogens.	<i>J. Vet. Med. Sci.,</i>	76	1427-1430	2014
Hiki M, Usui M, Akiyama T, Kawanishi M, Tsuyuki M, Imamura S, Sekiguchi H, Kojima A, Asai T.	Phylogenetic Grouping, Epidemiological Typing, Analysis of Virulence Genes, and Antimicrobial Susceptibility of <i>Escherichia coli</i> Isolated from Healthy Broilers in Japan.	<i>Ir. Vet. J.,</i>	64	14	2014

Kudo M, Nomura T, Yomoda S, <u>Tanimoto K</u> , <u>Tomita H</u> .	Nosocomial infection caused by vancomycin-susceptible multidrug-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> over a long period in a university hospital in Japan.	Microbiology Immunology.	58	607-614	2014
Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, <u>Tomita H</u>	Bacteriocin protein BacL <sub>1</sub> of <i>Enterococcus faecalis</i> targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala <sup>2</sup> -crossbridged peptidoglycan.	<i>Journal of Bacteriology</i> .	197	286-295	2015