

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：H 2 4 - 食品 - 一般 - 0 0 8)

平成 24 ～ 26 年度総合研究報告書

(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 24-26 年度総合研究報告書

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 24-26 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

ト部 尚久 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
	柴山 恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部
	鈴木 里和	国立感染症研究所 細菌第二部
	松井 真理	国立感染症研究所 細菌第二部

() JANIS と JVARМ の連携.....

研究分担者	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
	川西 路子	動物医薬品検査所 検査第二部
	比企 基高	動物医薬品検査所 検査第二部
	山根 一和	川崎医科大学 公衆衛生学

(I) 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

3 . 平成 2 4 - 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 24-26 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業
総合研究報告書
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：治療不可能な多剤薬剤耐性菌による感染症が世界的な問題となっている。2013 年開催の G8 主要 8 カ国学術会議で薬剤耐性菌体策の重要性・緊急性について合意が確認され、2014 年には米国ホワイトハウスからこの問題の声明が出された。特に食品由来耐性菌のヒトへの伝播と拡散問題が危惧されている。WHO は 2015 年の総会に、耐性菌コントロールのための Global action plan を提案し、加盟国に 5 年間の行動計画を立てることを求めようとしている。その中で家畜、食品、ヒトから分離される耐性菌の発生動向調査(サーベイランス)の確立を最優先課題として各国に求めようとしている。3 年間の本研究では、我が国で行っている家畜由来耐性菌サーベイランス(JVARM)とヒト由来細菌の耐性菌サーベイランス(JANIS)の統合を行い、家畜 ヒトの耐性菌の流れを総合的に解析する体制を作ることを行った。その結果、いくつかのことが明らかになった。JANIS と JVARM のデータの統合は可能であるが、使用している薬剤やブレイクポイントに違いがあるので、その調整が必要である、プロイラーのセファロスポリン耐性大腸菌の頻度とヒトの大腸菌の耐性頻度との間に関連性が見られた、プロイラーのセファロスポリン耐性大腸菌の頻度は 2011 年以降セフトリオフルが鶏卵に使用されなくなってから急激に減少したが、ヒトにおいては低下が見られていない。鶏の大腸菌とヒトの大腸菌の ST 遺伝型には違いが見られるが、耐性遺伝子は ST 遺伝型が異なる鶏とヒトの大腸菌で共通性が見られる。プロイラーの耐性大腸菌はヒトの中で維持されないが、耐性遺伝子がヒトの大腸菌に伝播している可能性が示唆される。そのため、一端ヒトの大腸菌に入り込んだ耐性遺伝子は、ヒトにおいて抗菌薬の選択圧がかかっている限りは、耐性菌は維持される可能性がある。今後も、家畜、食品、ヒトの耐性菌のサーベイランスの維持とその解析結果の利用は耐性菌コントロールにとって重要である。

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. 研究結果概要

1) WHO AMR-TAG (2015 年 5 月)において、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、厚生省、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。10月のWHO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) 2014年12月のスエーデンでの会議；切り札といわれるカルバペネム剤に対する耐性菌の増加と近年新しい抗菌薬の開発が停滞していること等により、薬剤耐性菌による感染症の健康被害に対する脅威が増加してきている。WHOは、耐性菌に対するグローバルな対策が緊急の課題であるとの認識のもと2015年のWHAにglobal action planを提出することにしている。その対策の一つとして、世界における耐性菌の現状を科学的に裏打ちされたデータにより周知させ、対策に結びつけるため、グローバルな耐性菌サーベイランスの強化を打ち出した。今回は、WHO加盟国間におけるヒトへの耐性菌による感染症のサーベイランスの試行を開始するための足場作りの話し合いが行われた。

耐性菌サーベイランスの意義：

- ・耐性菌による疾患負荷の解明（耐性菌および感受性菌によっておこる疾患の頻度およびそ

れによる死亡率の把握）

- ・医療現場への耐性菌情報の提供と治療判断の支援
- ・耐性菌対策の効果判定（耐性菌による high risk 部署の把握と対策、耐性菌の伝播に関する研究および対策、その効果の評価）
- ・新規な耐性菌の迅速把握
- ・Stakeholders への耐性菌に関する情報提供と耐性菌に対する認知度の向上

WHO の役割：

各国が標準的方法により耐性菌に関連する情報を収集・解析し、耐性菌コントロールに活用することを支援する。そのために国際的協力によるプラットフォームを提供する

耐性菌はヒトばかりでなく、動物、環境等からも分離され、耐性菌および耐性遺伝子はその間を循環しているので、耐性問題のコントロールのためには関係機関（WHO ばかりでなく国連の Food and Agriculture 部門、Animal Health の国際機関）の連携が重要である。また、各国の関係する各省庁間の連携も重要である。

WHO の提案による国際的初期フェーズにおけるサーベイランス試行

Easy implementation（優先順位が高い病原体、抗菌薬の種類、検体採取部位による感受性および耐性菌数）のものから始める

Pathogen 病原体：

優性順位：公衆衛生的に脅威となり患者の健康に重大なる影響を及ぼすもの

- ・Blood stream infection（菌血症）：
Acinetobacter spp., *E.coli*,
K.pneumoniae, *S. aureus*,
S.pneumoniae
- ・Urinary-tract infection（泌尿器感染）：*E. coli*, *K. pneumoniae*
- ・Diarrhea diseases（下痢性疾患）：
Salmonella spp., *Shigella* spp.
（*Campylobacter* も加えるべきとの意見あり）
- ・STI（性感染症）：
N.gonorrhoeae

（呼吸器感染症の追加を提案する意見もあったが、感染症起炎菌と判断しやすい上記の感染部位をまずは対象とする）

対象となる菌と薬剤：（地域により異なるので 下記のもの推奨、強制的ではない）

- ・腸内細菌叢：カルバペネム、広域セファロスポリン、フルオロキノロン
- ・淋菌：アミノ配糖体、広域セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライド（スペクチノマイシンを入れる提案もあり）
- ・ブドウ球菌：メチシリン
- ・肺炎球菌：ペニシリン

収集すべき情報

(1) Blood stream infection：発熱、悪寒、戦慄などの臨床症状を伴い菌を分離；菌血症感染者の入院数
培養に供された血液試料数
分離菌の耐性を調べられた血液試料数耐性菌の数

(2) Urinary-tract infection：臨床所見 + 1 種類の菌が 10^5 cfu/ml 以上分離される；

培養に供された検体数

感受性菌による感染数

耐性菌による感染数

(3) Diarrhea diseases: 患者下痢便からの菌の分離（蔓延国では血便患者を対象）；*Shigella*, non-typhoid *Salmonella* の感受性および耐性菌分離数

(4) *N. gonorrhoea* : sample: urine for men, urethral meatus for women; スメア材料から Gram+ の intracellular diplococcic を EM で検出、及び菌培養。耐性菌検査（ceftriaxone and cefixime を使用）

感受性菌による感染者数

耐性菌による感染者数

年齢、地域、感染部位

（淋菌については、菌の分離が難しくこのラボでも高い頻度で分離することができるわけでないこと、近年は核酸を用いた検査法を用いているところが多いことより、初期フェーズの対象にすることは難しいとの意見あり）

各国の役割：

(1) 機関：

国の機関：国の標準品等の準備や EQA の施行、各検査機関との調整機能、中央におけるデータ収集、解析・還元

ふつう見られない耐性菌が分離された時の確認、解析、耐性機構の解析、アウトブレイクの遺伝型解析

地域検査機関（病院、民間、PHI）：

現場での耐性菌の検査、対応責任書の指名、

EQA への参加

Quality management system の導入；ISO or CLSI に基づく (Quality control testing, external quality assessment の実行)

(2) 耐性検査法：cost-effective で簡便な方法が良い

Disk diffusion 法が一般的（CLSI, EUCAST により推奨された ISO 法）

Gradient diffusion 法：Disk diffusion 法がない菌に使うのが良い

Automated methods: ISO に準拠しているものであること

(3) データの収集

最小限：

- ・性別
 - ・年齢
 - ・検体採取の日時と採取部位
 - ・菌種
 - ・感受性試験の結果
 - ・入院日
 - ・患者番号（疫学データとラボデータの照合を可能にさせる）
- その他の望ましいデータ（AMR による患者の転帰を調べる）
- ・死亡
 - ・ICU への転院
 - ・治療の無効
 - ・退院等

(4) data analysis

WHO は WHONET-like を推奨（だが、これに限ったわけではないことを示唆）

WHO 試行への参加について：

WHO は各国に試行の参加を求めている。今回の参加国の間では積極的参加（69%）、条件整えば参加（31%）でほとんどが参加を希望。要請があれば他の国を支援する（83%）であった。

感染研の立場：原則として参加の方向であると話す。今後具体的にどのようにするかは WHO により提案される。WHO と参加国（国自体あるいは National reference laboratory との間で結ぶかは今後の検討）との間での MOU が結ばれてから試行が行われる予定。

日本としては JANIS のシステムにおけるデータの提供等であれば可能との返事をした。WHO とし

ては、日本の経験の提供、他の国のシステムとの比較をしてもうするためにも参加を希望している。積極的に参加して日本の経験や状況を世界に示すことは意義のあることである。

- 3) 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 との比較を行った。JVARM から、肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌、計 6798 株のデータを JANIS-JVARM 連携用データベースに格納した。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。これらの株の薬剤感受性パターンを JANIS と比較した。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ている。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。セファゾリンとセフトオフル/セフォタキシムについては、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オフル耐性とセフォタキシム耐性も、同様の傾向を示しているが、2009 年まではセフトオフル、2010 年以降はセフォタキ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 1)
- 4) 1999 年の JVARM の開始時から、プロイラー由来大腸菌で第 3 世代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 $IncI1$ 、 $IncI$ 、 $IncA/C$ 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。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。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。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。一方、セファロスポリン耐性率の減少とは対称的に KM および SM の耐性率の上昇がプロイラー由来大腸菌全体およ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_{CMY-2} 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 -ラクタマーゼ遺伝子 bla_{CTX-M} とは異なった。

- 5) 市販の鶏肉では 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) ESC に耐性を示し、同じ地域で分離されたプロイラー由来大腸菌とヒト由来大腸菌を比較したところ、大腸菌遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子型には共通性が認められた。プロイラーとヒトで定着できる大腸菌は異なるが、プラスミド等を介した耐性遺伝子の伝播は起こっている可能性が考えられた。

- 7) 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。
- 8) カンピロバクターの市販鶏肉、牛肝臓、ヒト臨床分離菌株の MLST 遺伝子型別により検討した結果、人臨床株の推定食品は、鶏肉 50%、牛（レバー生食等）10%、その他 10%、不明 30%と推定することができた。この結果を基に分離株のフルオロキノロンに対する耐性率を由来別に比較すると、人臨床分離株の耐性獲得率が、鶏分離株と牛分離株の耐性率の中間となることが理解できる。
- 9) 2012～2014 年の 3 年間にヒトおよび食品から分離されたサルモネラは、共に 305 株であった。サルモネラによる食中毒は 1989 年頃から血清型 Enteritidis による鶏卵を原因とする食中毒の多発により激増したが、2000 年頃から減少している。しかし、2012～2014 年の 3 年間においても変わらず血清型 Enteritidis が多く分離されている。一方、食品からは血清型 Infantis が多く分離され、本血清型が全体の 46.2%を占めた。Infantis が検出された食品は、全て生の鶏肉（内臓肉を含む）であった。多く検出された血清型 Infantis、Typhimurium および Enteritidis について耐性率を比較した。血清型 Infantis では、ヒト由来株 65.6%、食品由来株 89.2%で、3 薬剤、4 薬剤、5 薬剤耐性が多い傾向であった。Typhimurium では、ヒト由来株 66.7%、食品由来株 75.0%であった。5 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌の割合は、ヒト由来株の方が高く、2012 年にはヒト由来株で 10 薬剤、8 薬剤耐性株が分離されている。血清型 Enteritidis では、耐性率が他の 2 血清型株に比べて低く、ヒト由来株 48.8%、食品由来株 20.0%であった。また、単剤耐性菌のみであった。この様に血清型によって薬剤耐性は異なることが明らかとなった。
- 10) リステリアに関しては、4 年間の罹患患者合計は 307 例、病床規模に応じた補正を行い算出された罹患率は 1.06～1.57/100 万人で、4 年間の平均年間罹患率は 1.40/100 万人であった。2011 年では、国内の患者数は 200.9 名と推定された。
- 11) 家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）について、2010 年に牛由来 MRSA（sequence type（ST）121）1 株が分離され、2012 年に 1 農家の豚 4 頭より MRSA（ST398）11 株が分離された。本 MRSA ST398 の SCCmec 型は、classA-A1B3 で新規の型であった。当該 MRSA ST398 の起源を探るべく

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コアグラゼ陰性ブドウ球菌（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。

- 12) VRE の調査ではブラジル産輸入鶏肉およびデンマーク産鶏肉から VanA 型 VRE(*E. faecium*)株が検出された。一方、異なる産地の国内産鶏肉検体から複数の VanN 型 VRE(*E. faecium*)株が検出された。その多くが同じ宿主遺伝子型であったことから、同一起源の VanN 型 VRE 株による国内の家畜環境中（養鶏）での伝播・拡散が示唆された。一部の株はフランスの VanN 型臨床分離株と類似の遺伝型であり、臨床株と環境株との関連性が強く疑われた。今後、国内のヒト環境への新規 VanN 型 VRE の伝播・拡散、および感染に注意する必要がある。

C. 考察

我が国のサーベイランスと耐性菌対策の問題点：

- (1) 我が国の耐性菌サーベイランス事業としては、ヒトを対象（JANIS；厚生省事業）としたものと動物を対象（JVARM；農林省の事業）としたものの 2 本が動いている。また、厚生科学研究事業（「食品安全推進研究」渡邊班）として JANIS と JVARM の統合の試行を行っている。JANIS は院内感染症関連細菌が主な対象であるので、下痢性疾患や性感染症に対する耐性菌の把握ができていない。下痢性細菌に対しては、食中毒との関連性が強いので、地方衛生研究所や民間検査機関のデータを利用する必要がある。それらのデータを JANIS に統合できるかの検討が必要である。性感染症（特に淋菌）に関しても、泌尿器関連病院のデータを JANIS の中に統合できるかの検討が必要である。WHO 等への報告などのように対外的に国としてのサーベイランスのデータを示す場合、および耐性菌に対する総合的対策を立てる場合には、上記のサーベイランスのデータを統合的に収集できる体制が必要であろう。]
- (2) JANIS はそもそも医療現場における耐性菌の現状把握（菌種、各薬剤に対する耐性菌の割合、その動向）を目的としたもので、耐性菌による感染症の疾病負荷の把握・評価を直接の目的とはしていなかった。そのため、治療や対策後の耐性菌感染症患者の転帰（死亡、悪化、完解等）についての情報は得られていない。今後は、耐性菌対策の効果を把握するためには耐性菌感染症の予後等の情報収集も念頭に入れるべきである。耐性菌対策の大きな目標は、耐性菌の数を減らすこともさることながら、耐性菌感染症による患者の死亡

数を減らすことにもある（感染症への対応としての視点）。しかし、現在の JANIS で死亡率の把握をすることが難しいのなら、死亡率は、疾患負荷の算定を目的とした研究事業との組み合わせで、推定するのが合理的であろう。

- (3) 耐性菌（耐性遺伝子も）はヒト・動物（食品も含）環境（土壌、水系など）を循環しており耐性菌の最終的なコントロールのためには、上記3者を対象としての総合的対策が重要である。トを対象としたものは厚労省、動物を対象にしたものは農林省、環境を対象にしたものは環境省と別れている。また、院内感染症は医政局、食中毒細菌は食品安全部、泌尿器系細菌感染症＋下痢性細菌感染症（および院内感染に関与する耐性菌の一部）は健康局と対応部署が分かれている。今後、WHO が示す global action に対応していくためには、これらへの対策を総合的に intersectional に企画・対処する部署（or 委員会等）の設置が必要であろう。この10年以上にわたり新規抗菌薬は市場にほとんど出てきていない。たとえ、創出されたとしても今までのような使用方法ではすぐに耐性菌によって覆い尽くされる。先を見据えた

対応を行う時期である。

E. 結論

我が国で行っている家畜由来耐性菌サーベランス(JVARM)とヒト由来細菌の耐性菌サーベランス(JANIS)の統合を行い、家畜 ヒトの耐性菌の流れを総合的に解析する体制を作ることを行った。そのデータを比較すると、ブロイラーのセファロスポリン耐性大腸菌の頻度とヒトの大腸菌の耐性頻度との間に関連性が見られることがわかった。ブロイラーのセファロスポリン耐性大腸菌の頻度は2011年以降セフォティオフルが鶏卵に使用されなくなってから急激に減少したが、ヒトにおいては低下が見られていない。市販の鶏肉から分離される耐性頻度の低下が見られていないことから、家畜の現場の耐性状況がヒトの現場に反映するまでには、時間的要素等が複雑に絡んでくることが考えられた。また、ブロイラーの耐性大腸菌はヒトの中で定着をしていなく、耐性遺伝子がヒトの大腸菌に伝播している可能性が示唆される。そのため、一端ヒトの大腸菌に入り込んだ耐性遺伝子は、ヒトにおいて抗菌薬による選択圧がかかると維持される可能性がある。

図1. JANIS (ヒト) 集計プログラムを利用したJVARM (家畜) 及び食品由来耐性菌データの集計

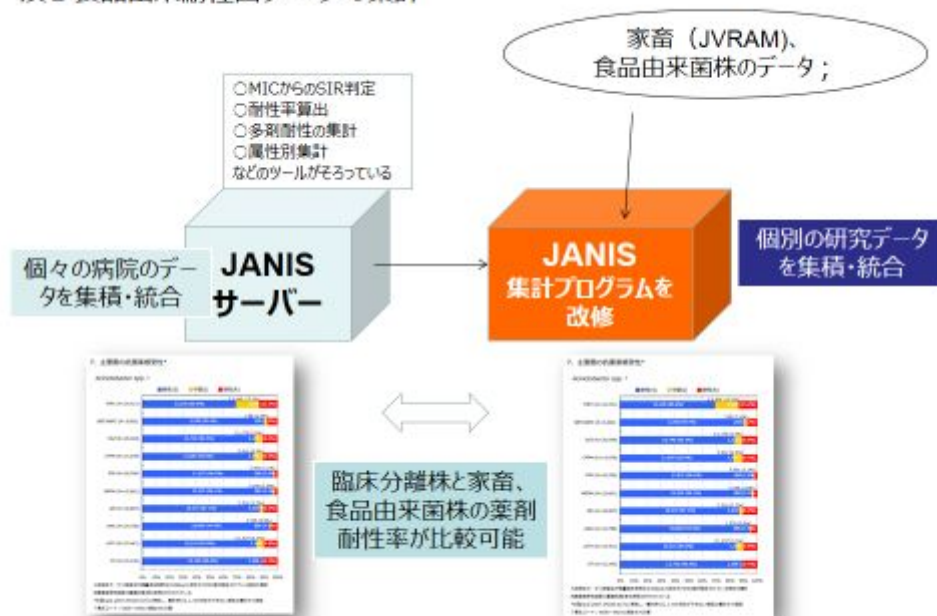
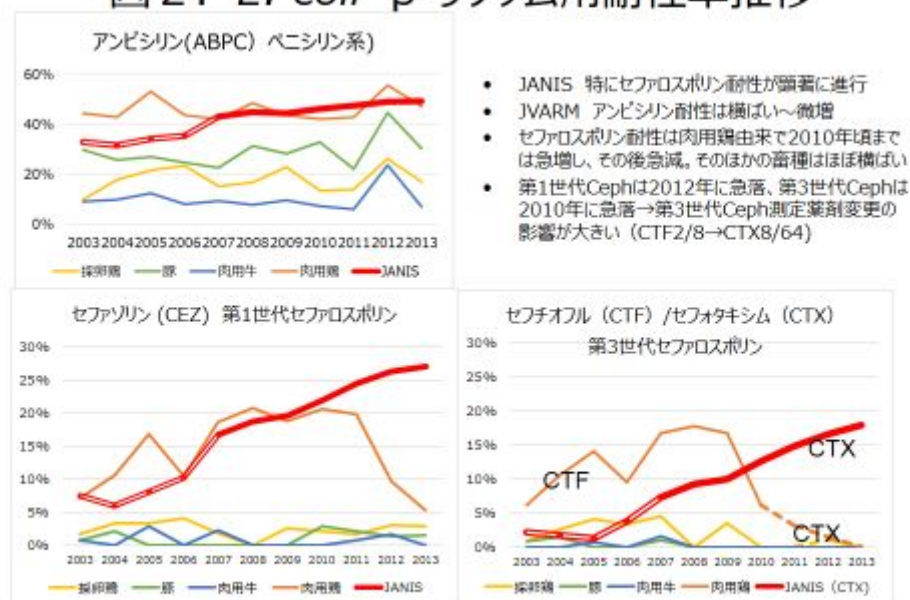


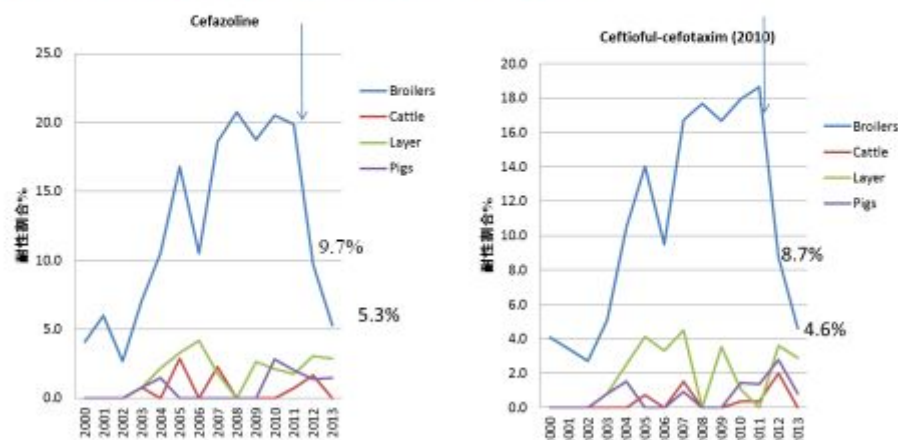
図2. *E. coli* β-ラクタム剤耐性率推移



E. coli β-ラクタム剤耐性：ヒト由来株と肉用鶏のセフトリオキサム耐性率に2011年まで相関があったが、2012年以降ギャップが出てきた。その理由は何か？

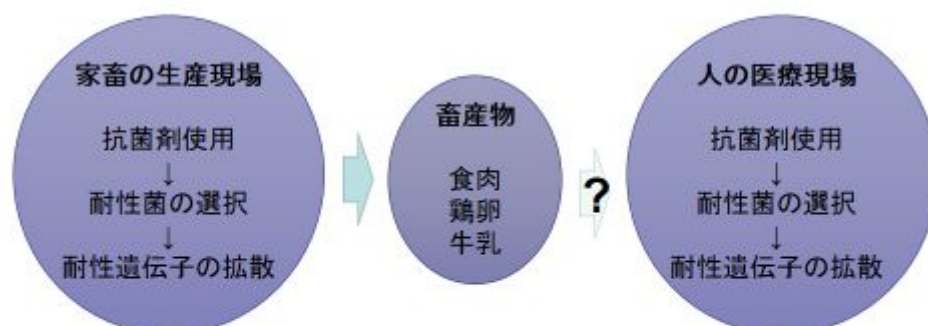
図3. 家畜由来株セファロスポリン耐性の推移

ふ化場において自発的にセフトイオフルの使用を2010~2011年から禁止している。その後急速に鶏由来(ブロイラー)の大腸菌のセファロスポリン耐性率が低下してきた。選択圧の減少により耐性率の減少が起こる



前図において、ヒトのセファロスポリン耐性率が減少していないのは何故か？今後徐々に低下するのか？一端増加したものは ヒトの腸管の中で維持されるのか？

図4. 薬剤耐性菌の選択と伝播、動向調査の統合化とコントロール対策への貢献



まとめ:

- 1) 家畜現場での抗菌薬の使用が耐性菌を選択している。それがヒトの現場における耐性菌に影響を及ぼしているが、単純に菌の伝播だけではなく耐性遺伝子の伝播が重要である可能性高い。
- 2) 家畜、食品、ヒトの抗菌薬耐性の動向を一元的に解析できるサーベランス体制を確立させる。その結果を関係機関(WHO等)に提供し、耐性菌対策に活かす

平成 24-26 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。また、グローバル化する薬剤耐性の問題に対応するため、サーベイランス体制の国際化への対応のための基礎的な情報収集を行うことも本研究の要素の一つである。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解析法ならびに新規要素の検討を行った。

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。

サルモネラは 2,500 種以上の血清型を含み、全世界に渡りさまざまな流行を繰り返している。わが国では 1990 年代と比較してサルモネラによる食中毒は減少しているが、*Salmonella enterica* serovar Infantis (SI) などが鶏肉から高頻度に分離され、また、ヒトから分離される血清型でも上位に位置している。SI はサルモネラの中でも比較的多剤耐性の傾向が顕著であると考えられており、本研究ではその遺伝学的背景を知るために、分離菌株の解析を行った。

グローバル化する薬剤耐性の問題について、

海外における食水系感染症も重要な要素の一つである。

Tham らは海外渡航歴のある下痢症患者を対象に薬剤耐性大腸菌の検査を実施したところ、24%から基質拡張型ラクタマーゼ産生性大腸菌が検出され、そのうち 90%が *bla*_{CTX-M} 遺伝子陽性を示した(Scand. J. Infect. Dis, 2010; 42:275-280)。そこで、本研究では海外渡航者由来の下痢原性大腸菌コレクションを対象に、アジスロマイシンに着目し耐性株の検査を実施した。アジスロマイシンは近年腸チフスの治療でも使われており、今後、耐性の出現が懸念される薬剤の一つである。

最後に、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。STEC 感染症は現在わが国で最も重要な食品由来感染症の一つであり、その耐性の傾向は 1 つの指標となりうる。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。最小発育阻止濃度 (MIC) は Etest もしくは微量液体希釈法を用いた。(ただし、上記サブテーマによって試験していない薬剤もある。) ニトロフラントインについては Etest もしくは 20 mg/ml 溶液 15 μ l (300 μ g) をディスクにしみこませて試験した。

2. MAMA - PCR による SNP 解析：SI 9 株を次世代シーケンサー・イルミナにより解析し、共通なコアゲノムの比較から single

nucleotide polymorphism (SNP) を見出した。そこから代表的な部分を選択し、各箇所の SNP アリルが 2 種類 (例：A か T、G か C など) であったことから、PCR による mismatch amplification mutation assay (MAMA) が可能となるようにプライマーを設計した。Conventional PCR によっていずれのアリルであるか決定した。

3. 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。

4. AZM 耐性遺伝子のスクリーニング：既報に従い、*mphA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* 遺伝子の有無を PCR によって試験した (Emerg Infect Dis. 2009;15(10):1648-50.)

5. プラスミドの解析：供試菌株からプラスミドを抽出し、大腸菌 K-12 株 (DH5 等) に形質転換を行った。当該耐性に基づく培地を使い形質転換体を選択した。形質転換体からパルスフィールドゲル電気泳動法用のプラグを調製した。当該プラグを S1 ヌクレアーゼ処理し PFGE につけ、プラスミドと推定されるバンドを切り出し、DNA を精製した。精製 DNA を Illumina NEXTERA XT kit にてライブラリーを作製した。Miseq シーケンサーにて読後、情報解析を行った。

C. 研究結果および考察

1. サルモネラに関する研究

1-1. SI ゲノム解析：

SI 国内分離株 9 株に関してイルミナによりゲノム解読を行った。これと公開されている参照 SI 株のゲノム情報（1 株）とを比較した。その結果、コアゲノムの ORF 上に存在する SNP が 825 箇所同定された。解析した分離株は、ヒト由来株が 3、鶏肉など非ヒト由来株が 6 であった。ヒト由来 1 株および非ヒト由来 6 株はいずれも 4 剤以上に耐性を示した。残りのヒト由来 2 株は A 耐性および感受性であった。前者 7 株（grR）に共通で、他の 2 株（+ゲノム参照株）（grS）に共通でない SNP を抽出したところ、16 箇所が当該条件を満たした（図 1-1 および表 1-1）。このうち、*nfsA* および *nhnB* 遺伝子は、grR 株において終止コドンへの置換があった。*nfsA* および *nhnB* はともに nitroreductase をコードしており、ニトロフラントインなどのニトロフラン系抗菌剤への感受性に影響しうることが示唆されていた。

1-2. ニトロフラントイン感受性試験：

上記結果から、SI grR 株と grS 株とではニトロフラン系抗菌剤への感受性に違いがあることが考えられた。そこで、ディスク法によりニトロフラントインへの感受性を試験した。その結果、grS 株では 19mm および 23mm の阻止円が観察されたのに対し、grR 株では 10-11mm の阻止円が観察された。供試菌株数を、計 98 株に増やして試験を行った結果、阻止円の大きさが 17mm 以上（grS が含まれる）と 14mm 以下（grR が含まれる）の 2 つのグループに大別された（表 1-2）。

1-3. MAMA-PCR による SNP 解析：

上記 grS-R 間で異なる SNP のうち、*nfsA* および *nhnB* を含めた 7 か所に関して、これらを識別する MAMA-PCR 用のプライマーを設計した。参照株 + grS 株と同じ遺伝子型を G1、grR 株と同じ遺伝子型を G2 とした。上記 98 株中、海外参照株 1 株を除き、7 か所すべてが G1 か、G2 かのどちらかのタイプとなった（G1 は 34 株、G2 は 63 株）。これと感受性試験の結果を合わせると、G1 は grS に、G2 は grR に一致した（表 1-2）。

上記の結果から、SI にはニトロフラントインに対する感受性を指標に 2 つのグループがあり、これらはゲノム上の複数の SNP ともリンクし、少なくとも 2 つの系統があることが示唆された。

2. 渡航者由来大腸菌に関する研究

2-1. AZM 耐性株のスクリーニング

渡航者下痢症由来大腸菌コレクション 63 株の AZM に対する MIC の分布は 0.125 ~ > 256 であった（図 2-1）。便宜的に break point を 32 とし、3 株が耐性と考えられた。

2-2. 耐性遺伝子の検索

上記耐性株 3 株（#42、81、99）に対し、AZM 耐性に関係している報告のある *mphA*、*ermA*、*ermB*、*ermC* 遺伝子の有無を PCR により検索した。その結果、3 株とも *mphA* が陽性であることが判明した。*mphA* 遺伝子は macrolide 2'-phosphotransferase をコードしており、これは AZM を修飾して不活化すると考えられている。

2-3. プラスミドの解析

上記 3 株より市販キットにてプラスミド DNA を抽出し、DH5a 等の大腸菌 K-12 株に形質

転換を行った。#81 及び #99 については AZM 耐性形質転換体を得ることができた。#42 についてはアンピシリン耐性の形質転換体を、#99 についてはさらにテトラサイクリン耐性の形質転換体を得た。

これらの形質転換体から PFGE 用のプラグを調製し、S1 ヌクレアーゼ消化後に PFGE でプラスミド DNA を分離した（図 2-2）。分離されたプラスミドと推定されるバンドを切り出し、Miseq により解析を行った。その結果、表 2-1 に示すように、28～68kb の大きさのプラスミドの配列が得られた。*inc* タイプは FII、FII-FIC もしくは K であった。形質転換体を選択した際に使用した薬剤に対応した耐性遺伝子が確認された。AZM 耐性を示したプラスミドには *mphA* 遺伝子が確認され、その周囲のコアな遺伝子構造は #81、#99 と同様であったが、さらに周辺の遺伝子構造は異なっていた（図 2-3）。両者は大きさも 68kb、28kb と大きく異なっており、#99 プラスミドには *bla* に加え、*aad* および *su11* 遺伝子も見出された。

#81 および #99 の保有する病原性遺伝子は *aggR* であり、所謂 EAEC (Enteraggregative *E. coli*) に分類される。EAEC に関しては、2011 年にドイツで発生した STEC 0104 集団事例の株も、EAEC から派生してきているものと考えられており、当該菌も AZM ではないが、CTX に耐性を持っていた。今回、EAEC13 株中 2 株で AZM 耐性株が確認され、一方 ETEC46 株からは AZM 耐性株を確認できなかった。このことから EAEC が耐性を獲得しやすいことが窺える。また、AZM は腸チフス・パラチフスでの治療にも使われることから、本耐性の

動向には注意を払う必要があると考えられた。

3 . STEC 薬剤耐性に関する研究

3 - 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 3-1 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% 程度の耐性率を示した。

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、セフトキシム、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、セフトetan、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。

3 - 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、セフトキシム、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 3-2 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 O 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 3-1）。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。

4 . 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 のディスク法の中間判定は 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 4-1 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 4-2）。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

本研究で SI について複数の系統の存在が示唆された。国際的なサーベイランスではゲノム解析をどこまで行うか、今後議論の余地があるが、薬剤耐性の伝播の背景を知るうえで、ゲノム解析の重要性は増していくと考えられる。

渡航者による海外からの薬剤耐性の移動が本研究からも示唆された。これは、当該地域の食品によるものであると考えられるが、その薬剤耐性に関する調査のギャップを埋めていくことは肝要であると考えられる。

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、セフトキシム、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、上述したようにゲノム解析を中心とした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

Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y. Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive phage type 104. Emerg Infect Dis. 2013 May;19(5):823-5.

Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-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.

泉谷秀昌：WHO-AGISAR について。動物用抗菌剤研会報、第 34 巻、13-18、2012 年 11 月。

泉谷秀昌：食品を介した抗生物質耐性菌の世界的感染拡大について。日本食品微生物学会、第 31 巻第 2 号、57-62、2014 年 6 月。

泉谷秀昌：WHO-AGISAR について。獣医畜産新報、第 68 巻第 2 号、92-96、2015 年 2 月。

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。

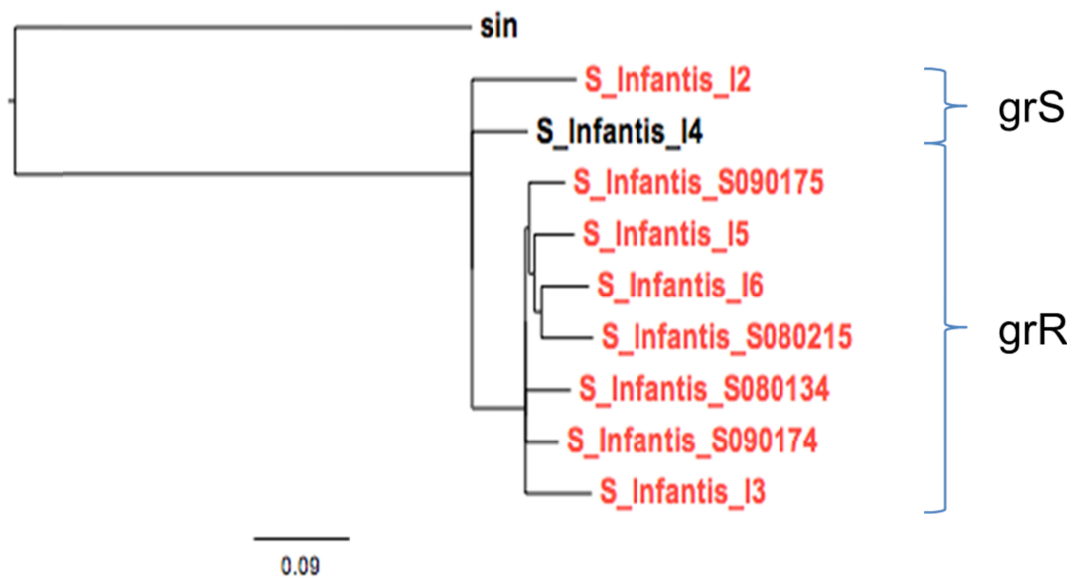


図 1-1 . SI SNP 系統解析

表 1-1 . grS-grR 間で異なる SNP

gene	product	grS	grR	mama target
ybbO	short chain dehydrogenase	L	P	y
nhnB	dehydropteridine reductase	Q	*	y
nfsA	nitroreductase A	W	*	y
ybjN	sensory transduction regulator	D	E	y
ycbW/zapC	duf1379 family	W	L	
	NADH dehydrogenase	D	N	
PBP	penicillin-binding protein	D	N	
	methyl-accepting chemotaxis protein II	V	G	
pduS	propanediol utilization ferredoxin	A	T	
menF	isochorismate synthase	L	Q	y
nrdE	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha	A	V	
alaS	alanyl-tRNA synthetase	D	N	
sitA	Iron transport protein periplasmic-binding protein	T	R	
recC	exonuclease V subunit gamma	D	A	
yifB	ATP-dependent protease	T	S	y
tyrB	aromatic amino acid aminotransferase	G	E	y

表 1-2 . ニトロフラントイン感受性と MAMA-PCR による SNP 型別

感受性試験(ディスク法300ug)														
Genotype	9	10	11	12	14	17	18	19	20	21	23	26	27	総計
G1						2	7	4	11	7	1	1	1	34
G2	10	31	16	5	1									63
1111222*	1													1
総計	11	31	16	5	1	2	7	4	11	7	1	1	1	98

MAMA-PCR の対象は *tyrB*, *yifB*, *menF*, *ybjN*, *nfsA*, *nhnB*, *ybbO* (表 1 右カラムを参照)。

*,海外参照株

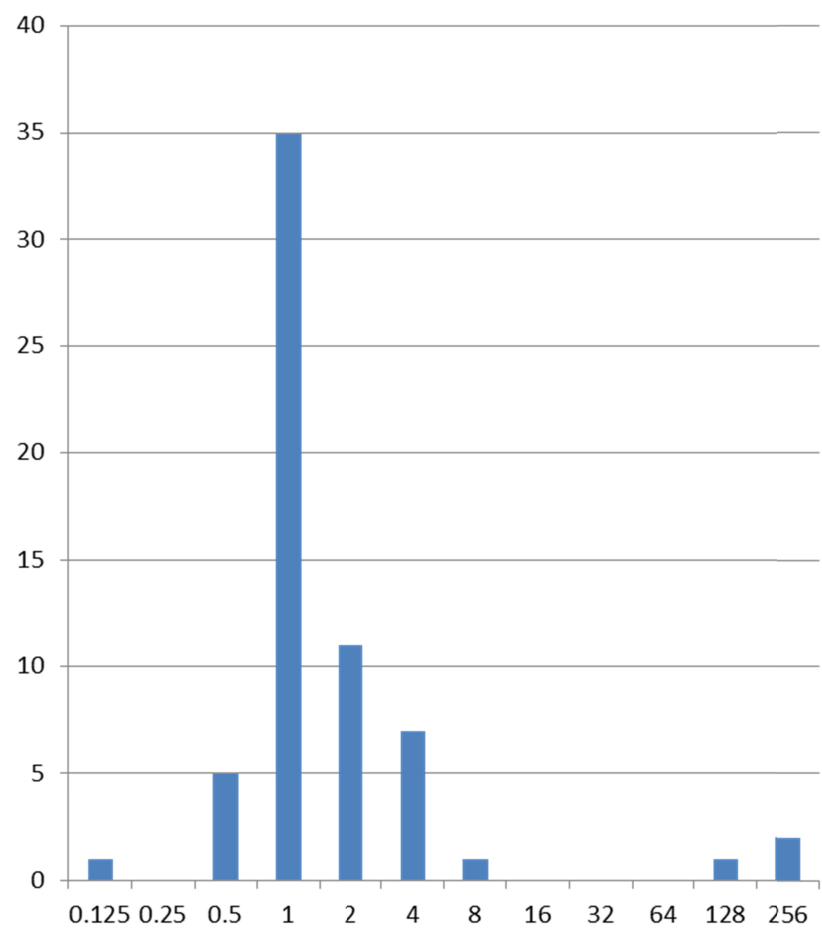


図 2-1 . 渡航者由来大腸菌の AZM に対する MIC 分布

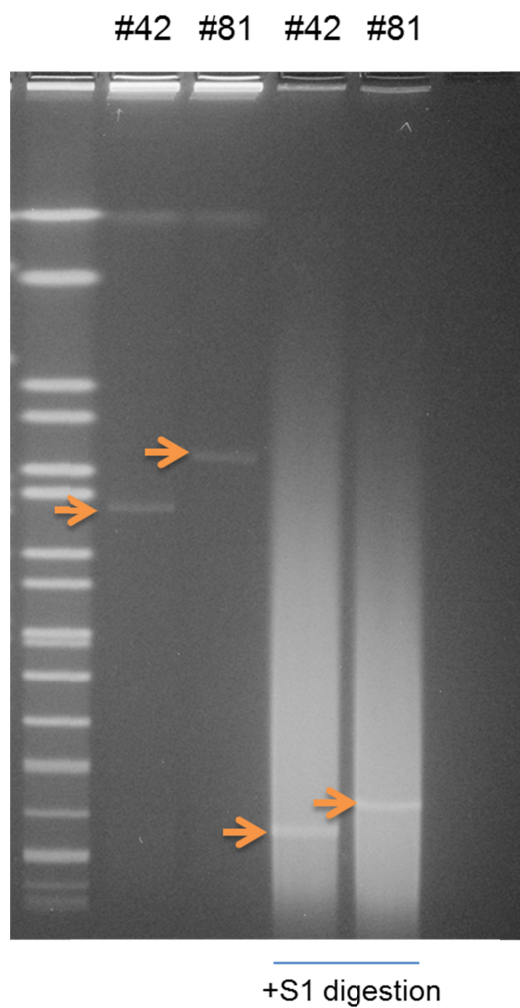
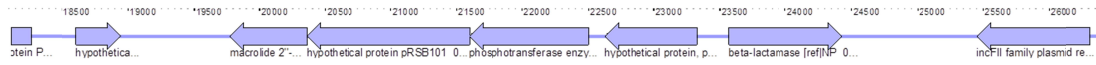


図 2-2 . S 1 - PFGE 解析例

	(vir)	size	contig	inc	R gene
#42	(<i>daa</i>)	50581	1	FII	<i>bla</i>
#81	(<i>aggR</i>)*	68194	1	FII	<i>bla</i> , <i>mphA</i>
#99azm	(<i>aggR</i>)	28377	2	FII-FIC	<i>bla</i> , <i>mphA</i> , <i>aad</i> , <i>sul1</i>
#99tc	(<i>aggR</i>)	54143	6	K	<i>tet</i> (<i>classA</i>)

表 2-1 . プラスミドの配列解析結果

#81



#99azm

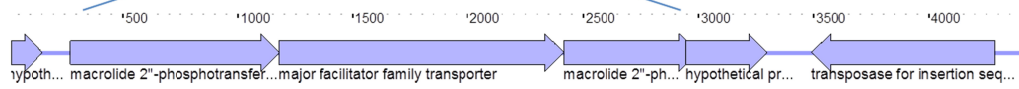


図 2-3 . # 81 および # 99 プラスミドの *mphA* 遺伝子周辺領域。
(# 81 と # 99 とでは逆向きになっている。)

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 3-1 . 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 3-2 . STEC 薬剤耐性分布 (1 濃度スクリーニング、2013、N=3200)

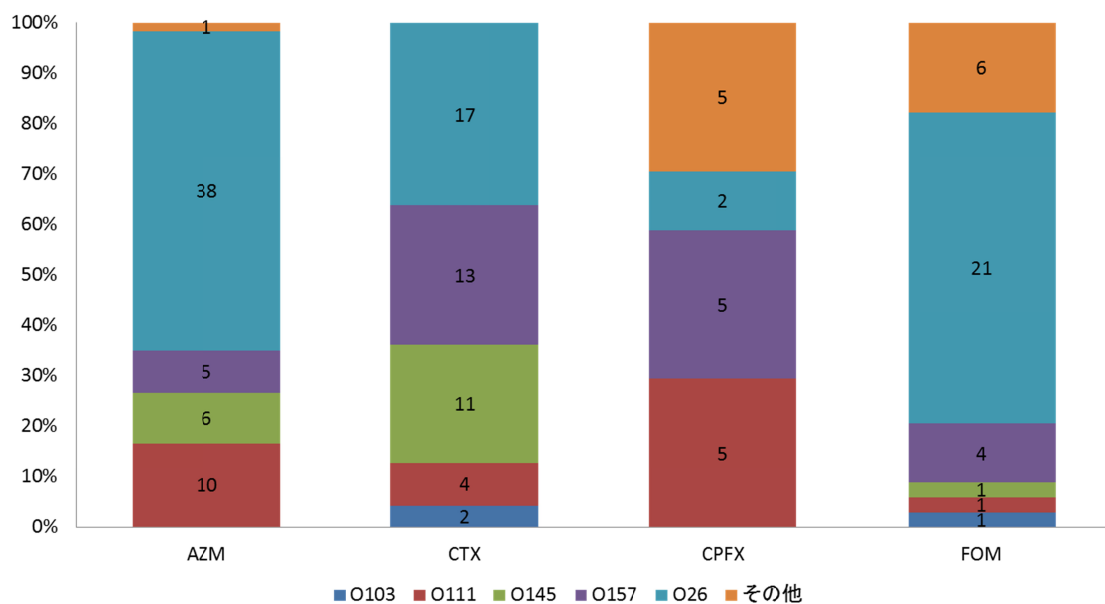


図 3-1 . 各耐性における血清群分布。AZM、アジスロマイシン；CTX、セフトキシム；CPFX、シプロフロキサシン；FOM、ホスホマイシン。

	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 4-1 .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
総計	4	1	1	1	5	15	13	95	107	96	67	2	8	1	416

表 4-2 . 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 24-26 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 2012 年から 2014 年に埼玉県内でヒト等から分離された食中毒菌を対象に、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。

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 453 株で型別不能を除くと 56 血清型に型別された。薬剤感受性では 171 株（37.7%）が供試した 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示し、CTX 耐性株が 4 株、フルオロキノロン剤耐性株が 2 株分離された。また、動物由来株として、伴侶動物のイヌ 356 頭、ネコ 87 頭および野生アライグマ 553 頭の検査を行い、イヌ 5 頭、ネコ 1 頭およびアライグマ 13 頭からサルモネラが分離された。イヌとネコを対象とした ESBL 産生菌の検索では 47 株が分離された。

赤痢菌では、CTX 耐性株が 4 株、フルオロキノロン剤耐性株が 6 株分離され、血清型は全て *S. sonnei* であった。フルオロキノロン剤耐性株が分離された患者にはインドやカンボジアへの渡航歴があった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 450 株が分離され、薬剤感受性試験では、450 株中 62 株（13.8%）が供試薬剤のいずれかに耐性を示した。CTX 耐性株が 2 株、フルオロキノロン剤耐性株が 1 株分離された。ヒト糞便からの ESBL 産生菌の検索では、720 検体中 52 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 307 検体を供試し、サルモネラは鶏肉 29 検体中 10 検体および豚肉 15 検体中 1 検体から、カンピロバクター

は鶏肉 29 検体中 12 検体、ESBL は鶏肉 25 検体中 15 検体並びに生力キ 8 検体中 2 検体から検出された。サルモネラは全株、カンピロバクター分離株は 1 株を除き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 161 検体中 19 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

・ 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2012年から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453株は型別不能を除き56血清型に型別され、*S. Enteritidis*が49株と最も多く分離された。次いで*S. Saintpaul*が39株、*S. Thompson*が27株であった。

この453株について薬剤感受性試験を実施した結果、171株(37.7%)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49株中28株(57.1%)が耐性を示した。*S. Schwarzengrund*は供試20株中1株を除き耐性であった。

分離株の区分別耐性パターンを表2に示す。NA耐性が28株と最も多く、次いでSM・TC・Su耐性が19株、SM・TC・KM・

Su耐性が16株であった。また、CTX耐性株が4株、フルオロキノロン剤耐性株が2株分離された(表3)。CTX耐性菌は同じ08群のサルモネラであるが、06因子の有無により血清型名が異なる2株から分離された。この2株が保有する耐性遺伝子は同じCTX-M-2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*が分離され、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356頭、ネコ87頭および野生アライグマ553頭の検査を行い、イヌ5頭(1.4%)、ネコ1頭(1.1%)およびアライグマ13頭(2.4%)からサルモネラが分離された。薬剤感受性は、アライグマから分離された1株を除き供試した16薬剤に対して感受性を示した。

(3) 動物由来ESBL産生菌

イヌとネコを対象としたESBL産生菌の検索では42株が分離された。ESBL産生菌の検索ではイヌ354頭中40頭(11.3%)、ネコ84頭中2頭(2.4%)から分離された(表5)。イヌ由来株はCTX-M-1group、CTX-M-8groupあるいはCTX-M-9groupのいずれかを、ネコ由来株はCTX-M-1groupかCTX-M-2groupのいずれか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複数株確認された。

(4) 赤痢菌

赤痢菌では、CTX耐性株が4株、フル

オロキノロン剤耐性株が 6 株分離され、血清型は全て *S. sonnei* であった。CTX 耐性株は同じトルコツアーに参加した 4 名から分離され、薬剤耐性パターンも耐性遺伝子 (CTX-M-1group) も同一であった。フルオロキノロン剤耐性株が分離された患者にはインドやカンボジアへの渡航歴があった (表 6)。

(5) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で 2012 年から 2014 年に、ヒトから分離された腸管出血性大腸菌 450 株の血清型別分離状況を表 7 に示した。最も多く分離された血清型は、O157:H7 が 316 株、次いで、O26:H11 が 65 株、O157:H- が 29 株の順であった。分離 450 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 62 株 (13.8%) であった (表 8)。CTX 耐性株が 2 株、フルオロキノロン剤耐性株が 1 株分離された。CTX 耐性株は、O121:H19(VT2) で CTX-M-65 を保有する株と、O26:H1 (VT1) で CTX-M-14 を保有する株であった。この O26:H1 は 23 名の感染者が確認された保育園集団感染事例で分離されたが、CTX 耐性株は 1 株のみであった。フルオロキノロン剤耐性株は、OUT:H- (VT1) であった。CTX 耐性株は腹痛、下痢、血便の症状を呈した患者から分離されたが、フルオロキノロン剤耐性株は無症状の業態者検便受診者から分離された。

(7) ヒト由来 ESBL 産生菌

ESBL 産生菌の検索では、720 検体中 52 検体から分離された (表 9)。CTX-M-9group 保有株が 29 株と最も多かった。ディスク法による感受性試験で

は、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分離された。

(8) カンピロバクター

2012 年から 2014 年に食中毒疑いで搬入された事例の臨床材料から分離したカンピロバクターは 96 株で、すべて *C. jejuni* であった (表 10)。薬剤感受性試験では 96 株中 63 株 (65.6%) が供試した 6 薬剤のいずれかに耐性を示し、そのうち 50 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

2012 年 7 月から 2015 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 307 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 29 検体中 10 検体および豚肉 15 検体中 1 検体から、カンピロバクターは鶏肉 29 検体中 12 検体、サルモネラは全株、カンピロバクター分離株は 1 株を除き供試薬剤のいずれかに耐性を示し、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)。

食肉からの ESBL 産生菌の検索では、鶏肉 25 検体中 15 検体並びに生力キ 8 検体中 2 検体から検出された (表 12)。

(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 161 検体中 19 検体から、サルモネラは 1 検体から分離された。薬剤感受性は、サルモネラが KM・GM に耐性を示し、カンピロバクターは 9 株がフルオロキノロン剤に耐性であった (表 13)。

D. 考察

ヒト由来サルモネラで供試 16 薬剤のいずれかに対して耐性を示したのは、453 株中 171 株(37.7%)であったが、年別にみると 2012 年は 35.7%、2013 年は 35.1%、2014 年は 43.0%であり、耐性率の上昇が見られた。また、CTX 耐性株が 4 株、フルオロキノロン剤耐性株が 2 株分離されたが、全て異なる血清型であり、その拡がり懸念される。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。今後ともその動向を注視する必要がある。

動物由来では、イヌ、ネコおよび野生化アライグマからサルモネラが分離されたが、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、2006 年にはネコからフルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が分離されており、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はヒトへの影響も少なくないことから、今後も監視していく必要がある。

腸管出血性大腸菌は、供試 16 薬剤に対する耐性率は 13.8%であったが、分離株全てが耐性であった O111:H-のように耐性率が高い血清群があった。

ヒトやイヌおよびネコの糞便を材料と

した ESBL 産生菌の検索では、ディスク法による感受性試験で、2012 年と 2013 年にディスク法で CTX とフルオロキノロン剤耐性を示す大腸菌 025:H4 が分離されていた。近年、CTX-M-15 産生大腸菌 ST131 という特定のクローンの検出数が世界中で増加している。この大腸菌の抗原は 025:H4 であることが多く、今後は、それらとの関連を検討する必要があると思われる。

E. 結論

ヨーロッパやアメリカでその拡がり懸念される MLST 型 ST198 の *S. Kentucky* が初めて県内で確認され、CTX とフルオロキノロン剤耐性を示す大腸菌 025:H4 が分離された。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、腸管出血性大腸菌および赤痢菌感染事例において、CTX 耐性菌やフルオロキノロン剤耐性株が分離された。

G. 研究発表

準備中

H. 知的所有権の取得状況

なし

平成 24～26 年度 食品の安全確保推進研究事業
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」
研究分担報告書

分担課題名 ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究

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

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

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

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

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

1. カンピロバクターの耐性菌出現状況

1) 供試菌株

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

2) 薬剤感受性試験

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

2. サルモネラ分離状況および薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

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

2) 薬剤感受性試験

アンピシリン (ABPC), セフォタキシム (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), スルフィソキサゾール (SIX), ホスホマイシン (FOM), アミカシン (AMK), イムペネム (IPM), メロペネム (MEPM) の 17 薬剤を供試し、米国臨床検査標準化委員会 (CLSI) の方法に従い、センジディスク (BD) を用いた KB 法で薬剤感受性を調べた。

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

3) ESBL 産生菌の遺伝子型

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

3. VRE 検出状況

1) 供試菌株

1999 年から 2012 年に東京都内で流通した鶏肉から分離された VanA 型 VRE 24 株を供試した。分離された鶏肉の原産国は、日本 (2 株), ブラジル (8 株), タイ (8 株), インドネシア (3 株), フランス (2 株), マレーシア (1 株) である。

2) MIC の測定

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

3) VanA 型耐性遺伝子の解析

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

C. 研究結果

1. カンピロバクターの薬剤耐性菌出現 状況

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

2. サルモネラ分離状況および耐性菌出 現状況

1) サルモネラの検出状況

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

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

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

2) サルモネラの薬剤耐性菌出現状況

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

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

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

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

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

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

3. 鶏肉由来 VRE の特徴

1) 鶏肉由来 VRE の TEIC に対する MIC

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

2) トランスポゾン Tn1546 中の遺伝子変異

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

の変異を調べる予定である。

E. 結論

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

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

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

F. 健康危機情報

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

G. 研究発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

I. 特許取得

無し

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」
分担研究報告書(平成 24-26 年度)

食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネジメント

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

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

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

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

研究協力者

東邦大学医学部微生物・感染症学講座 石井良和、
ト部尚久、青木弘太郎

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 朝
倉宏、山本詩織

A. 研究目的

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

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

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

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

B. 研究方法

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

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

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

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

鶏肉およびヒトから分離された CTX-M-8 産

生大腸菌 10 株（鶏肉由来：4 株，健康人由来：5 株および臨床材料由来：1 株）について、ゲノム DNA を抽出し、NGS MiSeq（イルミナ社）を用いてドラフトゲノム解読を実施した。ドラフトゲノム塩基配列より、Center for Genomic Epidemiology の Web ツール MLST1.7 を用いた（<http://www.genomicepidemiology.org/>）Multilocus 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：メロペナム市販後調査で全国医療施設から収集された臨床分離株が保有する薬剤耐性の解析、課題番号：25050，課題名：微生物学実習における医学部 2 年次学生が保菌する薬剤耐性菌の分離検出、課題番号：26055，健康人が保菌する薬剤耐性菌の動向調査、課題番号：26056，課題名：健康人が保菌する ESBL 産生大腸菌の過去 21 年間の経年推移）。

C. 研究結果

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A. 鶏肉由来菌株の遺伝子型

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

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

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

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

B. ヒト由来菌株の遺伝子型

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

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

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

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

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

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

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

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

2 . 学会発表

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

平成24-26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である Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System（JVARM）事業より、収集された健康なブロイラー由来の大腸菌において、人の医療で重要とされる第3世代セファロスポリンに対する耐性率は、2000~2003年では3.8%であったが、2010~2012年では約20%と増加が顕著であった。このことを受けた国内の養鶏団体がセフトオフルの使用に関する自主規制（2012年3月）を行った結果、ブロイラーにおけるセファロスポリン耐性の割合は2012年-2013年度には、2011年度と比べて有意に減少した。なお、自主規制前後で優勢なβ-ラクタマーゼ遺伝子（*bla_{CMY2}*）、レプリコン型（IncK）は変わらず、人の臨床分離株で主に報告される遺伝子（*bla_{CTX-M}*）とは異なった。

家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）について、2010年に牛由来MRSA（sequence type（ST）121）1株が分離され、2012年に1農家の豚4頭よりMRSA（ST398）11株が分離された。本MRSA ST398のSCC*mec*型は、classA-A1B3で新規の型であった。当該MRSA ST398の起源を探るべく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コアグラゼ陰性ブドウ球菌（MRCNS）のSCC*mec*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年以降ブロイラーに

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。米国やカナダのブ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から 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。

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 :sequence type (ST)398)が注目されているが、国内の家畜に由来する MRSA の報告は少ない。国内で分離された家畜由来 MRSA について情報を蓄積するため、各種薬剤に対する感受性及び分子遺伝疫学解析を実施する。さらに、LA-MRSA の起源を確認するため、家畜由来メチシリン耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌（MRCNS）、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）及び MRSA について各種薬剤に対する感受性試験及び分子遺伝疫学解析を実施した。

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 *C. 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 及びセフトロキシム

（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 μ 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、ダイレクトシーケンシングにより決定した。

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) LA-MRSA の調査

1) 各種家畜由来 MRSA の分布調査及び MRSA の遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性

2010 年に家畜から分離された黄色ブドウ球菌 122 株の薬剤感受性を調べた。アンピシリン（ABPC）耐性 9 株を対象にオキサシリン（OXA）感受性と耐性遺伝子（*mecA*）に基づき MRSA を検索した。牛から分離された MRSA 1 株の遺伝子型を調べた。遺伝子型は、multilocus sequence typing (MLST)、SCC*mec* 型と *spa* type を決定した

2) 豚農場由来 MRSA の分布調査及び性状解析

2012 年に、東北、関東、中部及び九州地方の計 50 農場、500 頭の豚を対象とした調査より関東の 2 農場 5 頭より MRSA 14 株（1 検体最大 3 株）が分離された。本研究では、1 頭当たり 1 株を代表株として、薬剤感受性、MLST、SCC*mec* 型と *spa* type を検索し、その後、ST398 を示した株については次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを解析した。

3) 国内豚由来 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 OXA 及びセフトロキシン(CFX)の MIC を測定し、MSSA と決定した後にそれぞれの株について 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 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 SCCmec 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 JVARМ で健康家畜より分離された EM 耐性 *Campylobacter 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ケンスにより塩基配列を確認した。

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 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) LA-MRSA の調査

1) 各種家畜由来 MRSA の分布調査及び MRSA の遺伝子型及び抗菌性物質に対する感受性

黄色ブドウ球菌 122 株(牛由来 109 株、豚由来 5 株及び鶏由来 8 株)の薬剤感受性試験には、7 薬剤を供した。いずれの薬剤に対する耐性率も 10%未満であった(表 5)。

ABPC 耐性は、牛由来 6 株と豚由来 3 株で認められ、起立不能牛の後肢関節膿瘍由来 1 株が、MRSA であった。MRSA1 株では、OXA の MIC が 4 μ g/ml (Etest)で、SCCmecV 型、MLST 型は ST121 で、spa-type は t5110 であった。耐性型は、 β -ラクタム系以外に GM 耐性であった。

2) 豚農場由来 MRSA の性状解析

1 農場 4 頭由来 11 株は、全て ST398 で、SCCmec 型と spa type は欧米で報告されているものとは異なる新規のものであった。薬剤耐性型は、ABPC-TC-EM-SM-CP-GM 耐性、または、ABPC-TC-EM-SM-CP 耐性を示した。

全ゲノム解析では、ST398 4 株中 1 株(No. 274-1)で比較的良好に解読できた。コアゲノムは ST398 の 08BA02176 株と非常に近いが、SCCmec 型は、新規の型である classA-A1B3 と同定された。本株は、meca の他、フルオロキノロン(norA)、マクロライド(erm(B)、erm(T))、テトラサイクリン耐性(tet(38)、tet(L)、tet(M)、tet(S))遺伝子を保有していた。本株は、ヘモリジン遺伝子は保有したが、PVL やエンテロ

トキシンの遺伝子は保有していなかった。

他 1 農場で分離された MRSA は、ST5 で、SCCmec 型と spa type は t002 であった。薬剤耐性型は、ABPC-EM-TC-CP 耐性を示した。

3) 国内の豚由来 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 SCCmec 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)。ダイレクトシーケンスにより *erm*(B)遺伝子は、Qin らの報告した MDRGI 領域ではなく、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が認められた。

D. 考察

1999 年の JVARM の開始時から、ブロイラー由来大腸菌で第 3 世代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

IncII、IncIy、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 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。2012 年および 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。

一方、セファロスポリン耐性率の減少とは対称的に KM および SM の耐性率の上昇がブロイラー由来大腸菌全体およ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*_{CMY-2} 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*_{CTX-M} とは異なった。

トランスコンジュガントの解析では *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 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 ST398 が分離されている。

本調査では、2010 年に牛由来の MRSA (ST121) が分離された。その遺伝子型は、国内(佐渡島)の小児の鼻粘膜及び皮膚病変から分離された株と同一であったが、薬剤耐性型は GM のみに耐性で小児分離株と異なっていた。また 2012 年、1 農場の豚にお

いて MRSA ST398 の分布が確認されたが、ゲノム解析により SCCmec 型が欧米等で報告されているものとは異なる新規のものであった。この 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 SCCmec 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 型かつ薬剤耐性型、また MRCNS には同じ SCCmec 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の 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ではなく、*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性があると考えられた。

E. 結論

ブロイラーにおけるセフトオフルの使用に関する自主規制(2012 年)後、セファロスポリン耐性大腸菌は有意に減少した。

国内の 1 農家の豚より MRSA ST398 が分離され、欧米の LA-MRSA とは異なる新規の SCCmec 型であった。本 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. 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.
2. 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.

(2) 海外

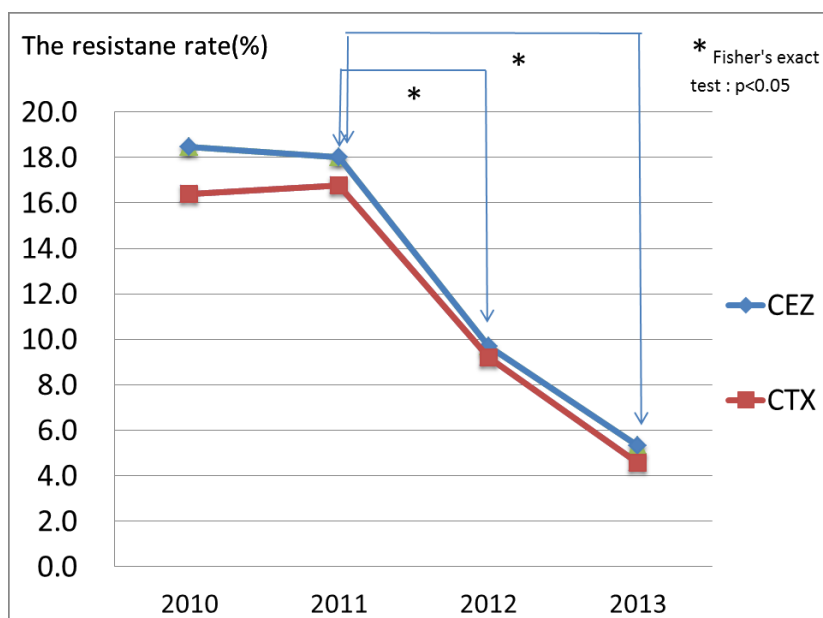
1. Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. 2013. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*CMY-2 gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 10(3): 243-249.
2. Usui, M., Nagai, H., Hiki, M., Tamura, Y., Asai, T. 2013. Effect of antimicrobial exposure on *acrAB* expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis*. *Front Microbiol.* 4:53, 2013.
- 3 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 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

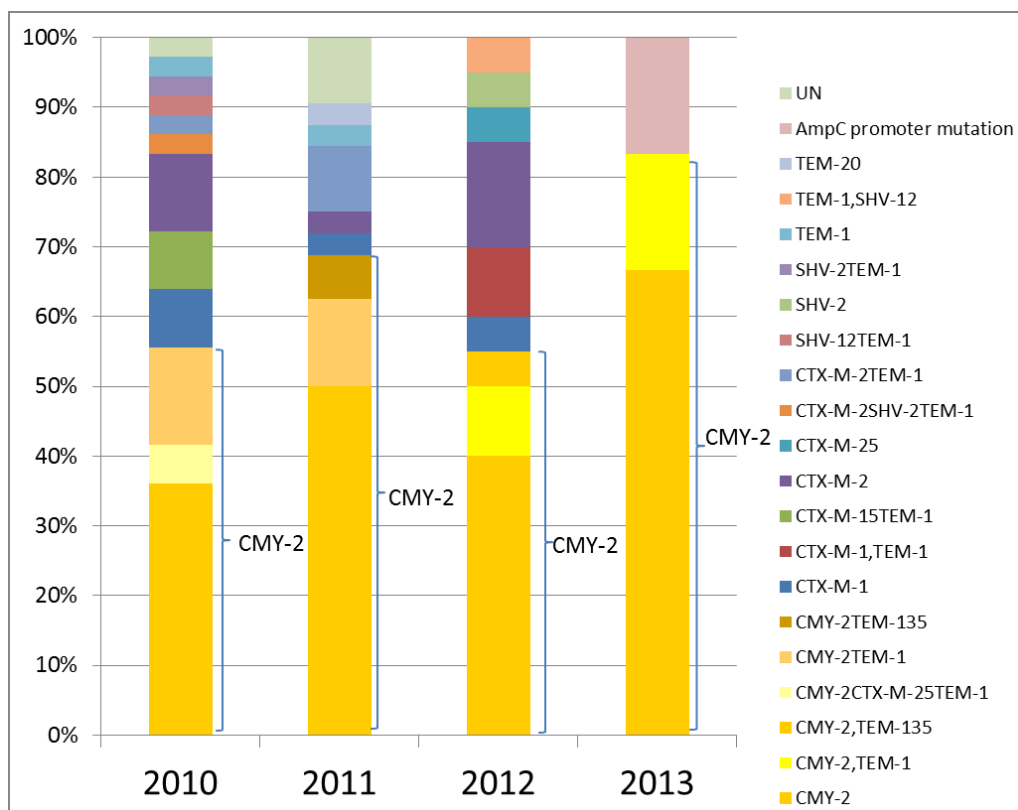


図3 伝達株のレプリコン型別

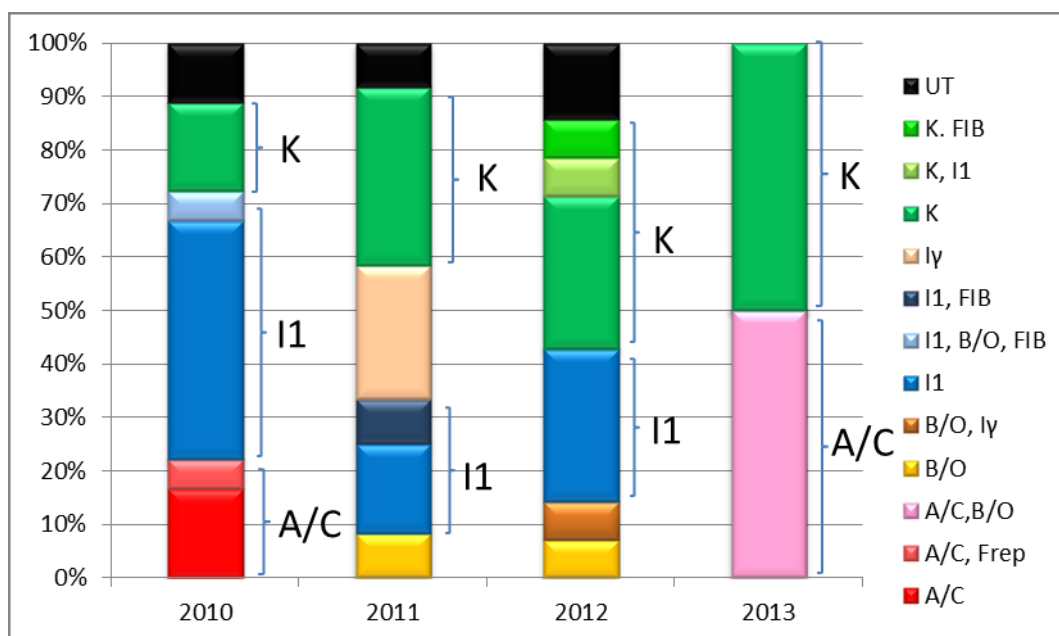


表1 プロイラー由来大腸菌及び第3世代セファロスポリン耐性 (CTX 4 µg/mL) 大腸菌における各種薬剤に対する耐性

	<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	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
kanamycin	13.3	a 14.3	a 27.7	b 24.4	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	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 ブロイラー由来 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 2011年病勢鑑定材料から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤耐性菌の分布

薬剤(Break point)	牛 (n=109)	豚 (n=5)	鶏 (n=8)
Ampicillin (0.5)	6	3	0
Streptomycin (64)	7	0	0
Gentamicin (16)	1	0	0
Tetracycline (16)	0	3	3
Erythromycin (8)	2	1	4
Chloramphenicol (32)	0	1	0
Ciprofloxacin (4)	0	0	2

表4 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	EM-CP (2), EM (1)
	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5 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>	+	-	-

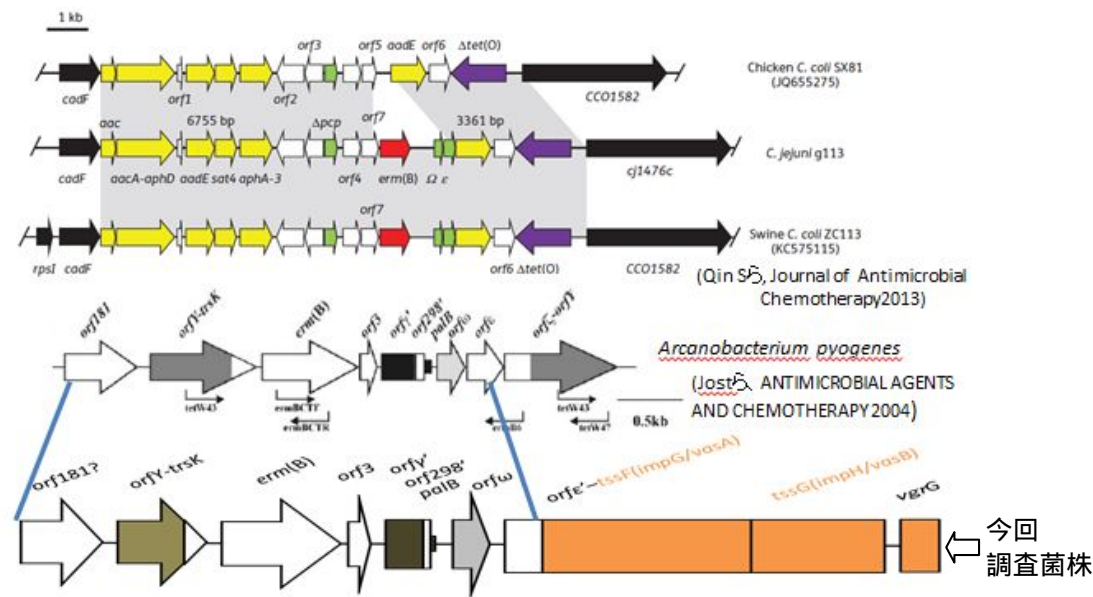
表 6 家畜由来 *C.coli* のエリスロマイシンに対する MIC 分布

	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					
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 7 *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」

総合分担研究報告書

分担課題名：家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析

研究分担者：秋庭正人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
研究協力者：楠本正博 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
研究協力者：岩田剛敏 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
研究協力者：黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者：関塚剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨

家畜、家禽の生産現場における抗菌剤の使用が薬剤耐性菌の選択につながり、畜産物を介してその耐性菌に感染することでヒトに健康被害をおよぼす可能性を検証する目的で 2 つの研究を実施した。南九州で分離されたプロイラーおよびヒト由来広域スペクトラムセファロスポリン耐性大腸菌を比較したところ、大腸菌遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子型には共通性が認められた。プロイラーとヒトで定着できる大腸菌は異なるが、プラスミド等を介した耐性遺伝子の伝播は起こっている可能性が考えられた。また、近年ヒトと家畜で *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12:i:- (4:i:-) の分離頻度が上昇している。国内のヒト、動物、環境に由来する 4:i:- 51 株を解析したところ、本菌の遺伝子型別法としては PFGE と MLVA が優れており、これらの組み合わせにより、さらに詳細な型別が可能となることが示された。ヒトおよび家畜由来株で識別不能となる株が一部、認められたほか、多剤耐性を示す一群の菌株がヒトと豚から分離されており、豚肉を介したヒトへの薬剤耐性菌伝播の可能性が示唆された。

A．研究目的

家畜、家禽の生産現場における抗菌剤の使用が薬剤耐性菌の選択につながり、畜産物を介してその耐性菌に感染することでヒトに健康被害をおよぼす可能性が古くから指摘されている。本課題では家畜とヒトから大腸菌やサルモネラを分離し、その薬剤感受性を調査するとともに、両者の類似性を様々な角度から検証することで、この仮説を検証することを目的とした。このため、以下に示

す 2 つの研究を実施した。

まず、家畜からヒトへの伝播が確認できる可能性の高い家畜および薬剤耐性菌として、プロイラーと広域スペクトラムセファロスポリン (ESC) 耐性大腸菌を調査対象とした。加えて調査地域を限定することにより、家畜からヒトへの耐性菌伝播が確認できるか否かを調査した。また、ヒトと家畜で同時に分離頻度の上昇している病原菌は両者の間に何らかの関連が存在する可能性が考えられ

る。*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- (4:i:-) は血清型 Typhimurium (4,[5],12:i:1,2) の単相変異株と考えられており、多くの先進国で最も高頻度にヒトから分離されるサルモネラ血清型の1つとなっている。わが国のヒト由来株の中では2000年代後半から目立ち始め、2014年にはEnteritidisに次いで最も分離頻度の高い血清型となった。本菌の家畜からの分離頻度も近年、上昇していることから、本血清型のヒト由来株と家畜由来株を比較することで、家畜からヒトへの薬剤耐性菌伝播が確認できるか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 南九州でヒトおよびプロイラーから分離された大腸菌の比較

菌分離、同定、遺伝子型別、および血清型別

鹿児島県の食鳥処理場においてプロイラー盲腸便を採取し、個体ごとに大腸菌の分離を試みた。糞便希釈液を0.5mg/L セフトキシム加マッコンキー寒天培地に塗布し、得られた赤色コロニーの生化学的性状をAPI 20E (BioMerieux) で確認し、大腸菌と同定した。ヒト由来株については鹿児島大学より分与を受けた小児下痢症由来 ESC 耐性大腸菌15株を供試した。

大腸菌の7つのhousekeeping遺伝子(*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icaD*, *mdh*, *purA*, *recA*)をPCRで増幅後、その塩基配列を決定し、MLST website (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>)のプロトコールに従い遺伝子型(sequence type: ST)を決定した。ST131と型別された大腸菌については市販の抗血清を用いてO抗原とH抗原の型別を行った。

薬剤感受性試験

市販の薬剤感受性ディスクを用いて下記のESCに対する感受性を調べた; セフトジジム, CAZ; セ

フトキシム, CTX; セフトキシチン, FOX。

プラスミド解析

野外分離株の保有するプラスミドはKado-Liuの方法で分離し、アガロースゲル電気泳動により確認した。また、大腸菌MC1061を受容菌とした接合伝達法、または大腸菌DH5を受容菌とした形質転換法により薬剤耐性(R)プラスミドの単離を試みた。単一のRプラスミドを保有する受容菌からプラスミドを分離し、制限酵素消化後の泳動像を比較した(Restriction-fragment-length polymorphism: RFLP解析)。制限酵素としてHindとSalIを用いた。

また、一部大腸菌プラスミドの宿主域を明らかにする目的で、それらプラスミドの*Salmonella* Typhimurium LT2株、*Salmonella* Infantis L-3701株、*Citrobacter freundii* ATCC8090株、*Klebsiella pneumoniae* ATCC9997株、*Enterobacter cloacae* ATCC13047株、*Escherichia coli* ATCC14763株、*Escherichia coli* MC1061株に対する伝達性を調べた。

薬剤耐性遺伝子およびレプリコン型の解析

ESC耐性を規定する遺伝子を特定するため、国立感染症研究所細菌第2部の方法に従ってPCRおよび増幅産物の塩基配列解析を行った。また、ESC耐性遺伝子が存在するRプラスミドのレプリコン型を決定するため、PCR-based replicon typing (Carattoli et al., 2005, J Microbiol Methods 63:219-228)を実施した。

2. 国内で分離された*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4:i:- の解析

供試菌

県の衛生研究所または家畜保健衛生所で2000～2010年に分離同定された4:i:- 51株を実験に供した。由来はヒト、牛、豚、鶏、ペンギン、カラス、オウインコ、豚肉、河川水である。

PCR

4:i:-と Typhimurium との関連を明らかにする
目的で、Typhimurium を同定するための m-PCR
(Akiba et al., 2011, J Microbiol Methods
85:9-15)および IS200-PCR(Echeita et al., 2001,
J Clin Microbiol 39:2981-2983)を実施した。ま
た、Typhimurium を含む限られた血清型が保有す
る病原性プラスミドのマーカーである *spvB* 遺伝
子を検出する PCR を実施した。

プラスミド解析

野外分離株の保有するプラスミドは Kado-Liu
の方法で分離し、アガロースゲル電気泳動により
確認した。

ファージ型別

Typhimurium 型別用ファージによるファージ型
別は国立感染症研究所細菌第一部で実施した。

薬剤感受性試験

市販の薬剤感受性ディスクを用いて下記 10 薬
剤に対する感受性を調べた；アンピシリン、セフ
ァゾリン、カナマイシン、ストレプトマイシン、
テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ホス
ホマイシン、コリスチン、スルファメトキサゾー
ル、ナリジクス酸。

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) に
よる型別

制限酵素 BlnI 消化後のゲノム DNA を 1% アガロ
ースゲルに包埋し、TBE 緩衝液中、6V/cm、14 で
泳動した。装置はCHEF DR (Bio-Rad Laboratories
社)を用い、スイッチ時間 2.2~63.8 秒で 19 時間
泳動した。得られた泳動像は TIFF ファーマットで
保存し、Fingerprinting informatics software
(Bio-Rad Laboratories 社)を用いてダイスの係
数に基づくクラスター解析を行い、系統樹を作成
した。

Multilocus variable-number tandem repeat
analysis (MLVA) による型別

既報 (Lindstedt et al., 2004, J Microbiol

Methods 59:163-172) の手法に従い、ゲノム上の
5 つの部位 (STTR-9、STTR-5、STTR-6、STTR-10pI、
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_downl
oad.html](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html)) を用いて Nei 's diversity indices を
算出した。

型別法の識別力判定

Simpson 's diversity index (DI) と 95%信頼
区 間 は Epicompare version 1.0
(<http://www3.ridom.de/epicompare/>) を用いて
算出した。

C. 研究結果

1. 南九州でヒトおよびブロイラーから分離され
た大腸菌の比較

菌分離成績

2010 年 5 月~2011 年 5 月に採材した 14 農場由
来、45 サンプルの全てから CTX に耐性を示す大腸
菌が分離された。原則的に 1 サンプルから 1 株を
解析に供したが、45 サンプル中 1 サンプルのみ、
大腸菌 2 株を解析に供した。

ブロイラー由来大腸菌性状解析結果

ブロイラー由来大腸菌 46 株に 32 の ST を認め、
うち 8 つ (ST2787-ST2794) は本研究で新たに登録
されたものである。ESC 耐性を規定するプラスミ
ド (ESCP) のレプリコン型は 6 種 (I1-I、FIB、
K、B/Q、FIC、Y) で、単一のプラスミドから 2 つ
までのレプリコン型が検出できた。ラクタマー
ゼ遺伝子として SHV-2、SHV-12、CTX-M-14、CTX-M-15、

CMY-2 が検出された (図 1)。

異なる鶏群由来株で同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合は認められた。具体的には *bla_{CMY-2}* を載せた Inc11-I プラスミドを保有する ST68 が鶏群 B と L で、*bla_{CMY-2}* を載せた IncK、B/O プラスミドを保有する ST68 が鶏群 L と M で分離された (図 1)。

また、異なる ST で同じ RFLP パターンを示す ESCP を保有する場合は認められた。具体的には HindIII と SalI 消化後に同じ泳動像を示す Inc11-I プラスミドが ST2787 と 2789 に属する大腸菌から、IncK、B/O プラスミドが ST117、ST2794、ST68 に属する大腸菌から分離された (図 2)。

Inc11-I プラスミドおよび IncK、B/O プラスミドの宿主域を明らかにする目的で伝達試験を行ったところ、両プラスミドが同種および異種細菌に接合伝達されることが示された (表 1)。

ヒト由来大腸菌の解析結果

ヒト由来大腸菌 15 株に 11 の ST を認め、うち 2 つ (ST3026、ST3475) は本研究で新たに登録されたものである。ラクタマーゼ遺伝子型として SHV-12、CTX-M-2、CTX-M-14、CTX-M-15 が検出された。ST131、O25:H4、CTX-M-15 保有菌の分離頻度は世界的に高いとされる。我々のヒト由来株の中に ST131 が 3 株、ST131 とは 1 つのアレル (*adk*) が異なる ST3475 が含まれていたため諸性状を確認したところ、上記の株と性状の全く一致する株は含まれなかった (表 2)。

ブロイラー由来株とヒト由来株の比較

ブロイラー由来株とヒト由来株で認められた合計 39 の ST のうち、ST38、ST68、ST162 は共通して認められた (表 3)。これら菌株のラクタマーゼ遺伝子型はブロイラー由来株でいずれも CMY-2、ヒト由来株は CTX-M-14 または SHV-12 であった (表 4)。また、ブロイラー由来株とヒト由来株で認められる合計 6 つのラクタマーゼ遺伝子型のうち

CTX-M-14、CTX-M-15、SHV-12 は共通して認められた (表 5)。

2. 国内で分離された 4:i:- の解析

PCR およびプラスミド解析

未実施の 2 株を除き、全ての供試菌株は m-PCR により Typhimurium と判定された。また、Typhimurium 特異的 IS200 も同様に検出できた。53 株中 39 株が 94 kb プラスミドを保有しており、保有の有無と *spvB* 遺伝子検出の有無が一致したことから、本プラスミドは Typhimurium 特異的病原性プラスミドであることが示唆された (表 6)。

薬剤感受性

51 株中 12 株は 2~4 薬剤に耐性を示した (表 6)。

ファージ型

供試菌 51 株中 13 株は既知ファージ型に型別された。内訳は DT193 が 8 株、DT26 が 3 株、DT120 と DT27 がそれぞれ 1 株認められた。34 株は既知溶菌パターンに当てはまらなかったが、複数の菌株で同じ溶菌パターンを示す場合は認められ、RDNC-a~e と命名した。4 株は型別不能であった (表 6)。

PFGE 型

BlnI-PFGE により 28 のプロファイルが観察された (DI, 0.94; 95%CI, 0.91-0.98)。クラスター解析の結果、7 つのプロファイル群 (クラスター C、D、G、H、J、L、M) と 7 つのプロファイル (A、B、E、F、I、K、N) が認められた。最優勢のクラスター C (20 株) には 5 つのプロファイル (C1-C5) が含まれていた。他の 6 つのクラスターには 2~4 のプロファイルが含まれ、それらは 2~7 株から構成されていた (図 3)。

MLVA 型

MLVA では 27 のプロファイルが観察された (DI, 0.96; 95%CI, 0.93-0.98)。5 つのローカスの多様性の程度は異なっており、Nei's diversity indices は STTR-3, 0.52; STTR-5,

0.74; STTR-6, 0.83; STTR-9, 0.58; STTR-10pl, 0.85 と算出された。作成した MST から 8 つのクラスター(1~)と 5 つのプロファイル(~)が認められた。最優勢なクラスター は 2 つの MLVA プロファイルを含み、13 株から構成されていた。クラスター は 7 つの MLVA プロファイルを含み、11 株から構成されていた。他のクラスターは 1~5 つのプロファイルを含み、2~8 株から構成されていた(図 4)。

PFGE と MLVA の組み合わせによる型別

PFGE と MLVA の型別の組み合わせにより 34 の Combination type (CT) (DI, 0.97; 95% CI, 0.94-0.99)が観察された。最優勢の CT3 (PFGE, C1; MLVA, a) は同じ町内の異なる農家で分離された 8 株から構成されていた。CT6 (PFGE, C3; MLVA, c) は異なる町の牛に由来する 2 株とヒト由来 1 株から構成されていた。CT7 (PFGE, C3; MLVA, b) は異なる散发事例のヒト由来 2 株、豚由来 1 株、下水由来 1 株から構成されていた。CT18 (PFGE, G1; MLVA, f) は同じ町内の異なる散发事例から分離されたヒト由来 4 株から構成されていた。CT30 (PFGE, L1; MLVA,) と 32 (PFGE, M1; MLVA,) は、それぞれ同じ町内の異なるサンプルから分離された 2 株から構成されていた(図 3)。

ヒト由来株とそれ以外の株の関連

本研究では PFGE と MLVA の組み合わせによる型別で牛由来 2 株(6 型の C9 および C10 株)と豚肉由来 1 株(7 型の M1 株)が、それぞれヒト由来株(H6 および H10 株)と識別不能であった。6 型の牛由来株はアンピシリン耐性、ヒト由来株は供試した全ての薬剤に感受性を示す点で異なっていたが、これらの株は全て 2008 年に岩手県内で分離された株であった。7 型の豚肉およびヒト由来株は供試した全ての薬剤に感受性であった。これら 2 株は共に秋田県内の分離株であるが、分離年は 2 年異なっていた(図 3)。

類似度の高い菌株をグループとして見たとき、PFGE C3 型の中にはヒト由来株の他、牛、鶏、豚肉、河川水由来株が含まれていたが分離県や分離年は一定でなかった。PFGE 型別の相同係数 70% をカットオフ値としたとき、H~K 型を 1 つのクラスターと見ることができる。これら菌株は多剤耐性を示し、ヒト由来 2 株の他は主に豚由来株で占められていたが、分離地や分離年は一定でなかった。このうちヒト由来 2 株と豚由来 1 株のファージ型は 193 であった(図 3)。

D. 考察

1. 南九州でヒトおよびブロイラーから分離された大腸菌の比較

ブロイラー生産現場における ESC 耐性菌の蔓延は日本のみならず世界的に問題となっているが、その背景として ESC の適用外使用が疑われている(Dutil et al., Emerg Infect Dis, 16:48-54, 2010)。我々の解析でも異なる鶏群由来株で同じ ST と ESC 耐性プラスミドを保有する場合が認められた。これは鶏群間に共通する汚染源が存在することを示唆しており、ブロイラー農場の上流に位置する孵化場などで ESC の適用外使用が行われていることを示唆する成績かも知れない。

異なる ST 間で同じ RFLP パターンを示す株が認められたことは、ST 間でプラスミドの伝達が起こっていることを示唆する成績と考えられた。また、ブロイラー由来大腸菌が保有する ESCP が異種細菌に接合伝達し得ることが示されたことは、ESC 耐性の伝播にプラスミドが重要な役割を果たすことを示唆している。

ブロイラー由来株とヒト由来株の比較では合計 39 の ST のうち、共通する ST が 3 つのみで、それらの菌株が保有するラクタマーゼ遺伝子は異なっていた。ブロイラーとヒトで定着できる大腸菌の遺伝子型は異なることを示唆する成績かも知れ

ない。一方、合計6つのラクタマーゼ遺伝子型のうち、3つはプロイラー由来株とヒト由来株で共通していた。ヒト由来株にCMY-2 ラクタマーゼ保有菌が含まれないのは、分離法が異なるためと考えられるので、保有するラクタマーゼ遺伝子型は類似性が高いと考えて良い。つまり、プロイラーとヒトで定着する大腸菌の遺伝子型は異なるが、何らかの形で耐性遺伝子の交換は起こっている可能性が考えられた。

2. 国内で分離された4:i:-の解析

型別法の識別力を比較するための指数としてDIが用いられる。これは型別した集団の中から2株を無作為に選んだとき、それらが異なる型に型別される確率を示す。本研究においてPFGEとMLVAのDIは、それぞれ0.94および0.96と算出され、MLVAの識別力の方が若干高かった。これら2つを組み合わせることにより、DIは0.97と算出され、単独で用いるより識別力が高くなることが示された。

一部のヒトおよび家畜由来株でPFGEとMLVAの組み合わせ型別で識別できない株が認められた。すなわち、組み合わせ型別6型のC9およびC10株は2008年に岩手県の牛から分離されている。これらと識別不能なヒト由来H6株も2008年の岩手県分離株であり、薬剤感受性に若干の相違が認められたものの、何らかの疫学的関連が疑われる。また、2005年に秋田県の豚肉から分離された組み合わせ型別7型のM1株は2007年に秋田県のヒトから分離されたH10株と識別不能であった。これらは供試薬剤の全てに感受性を示す点でも一致しており、特定の菌株が地域で維持されていた可能性が示唆される。

一方、複製の回数に応じて菌株には変異が蓄積され、徐々に遺伝子型が変化することが知られている。したがって、遺伝子型が完全に一致する場合だけでなく、類似度の高い菌株をグループとし

て捉える視点も必要である。PFGE型別の相同係数70%をカットオフ値としたとき、H~K型を1つのクラスターと見ることができる。分離地や分離年は一定でないが、これら菌株は2~4剤に耐性を示すという共通の特徴が認められた。本クラスターのヒト由来株の他は主に豚由来株で占められていたことは興味深い。ヨーロッパでは4:i:-の感染源は豚であるとされており、それらの多くが国内株で認められるASSuTに耐性を示すファージ型193であることが報告されている(Hauser et al., 2010, Appl Environ Microbiol 76:4601-4610)。本クラスターに含まれる菌株のうち、ヒト由来2株と豚由来1株はファージ型193であることから、少なくともこれら3株はヨーロッパと何らかの関連を有するのかもしれない。また、これらの成績は豚肉を介して薬剤耐性菌がヒトに感染する可能性を示唆する成績と考えられる。

E. 結論

ESCに耐性を示し、同じ地域で分離されたプロイラー由来大腸菌とヒト由来大腸菌を比較したところ、大腸菌遺伝子型に共通性は認められなかったが、耐性遺伝子型には共通性が認められた。プロイラーとヒトで定着できる大腸菌は異なるが、プラスミド等を介した耐性遺伝子の伝播は起こっている可能性が考えられた。

4:i:-の型別法としてはPFGEとMLVAが優れており、これらの組み合わせにより、さらに詳細な型別が可能となる。国内のヒト、動物、環境に由来する51株を解析したところ、ヒトおよび家畜由来株で識別不能となる株が一部認められた。また、多剤耐性を示す一群の菌株がヒトと豚から分離されており、豚肉を介したヒトへの薬剤耐性菌伝播の可能性が示唆された。

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G . 健康危害情報

なし

H . 研究発表

(紙上発表)

1. Shahada F, Chuma T, Kosugi G, Kusumoto M, Iwata T, Akiba M. Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. *Poult Sci.* 92(6):1641-9, 2013.
2. Chuma T, Miyasako D, Dahshan H, Takayama T, Nakamoto Y, Shahada F, Akiba M, Okamoto K. Chronological Change of Resistance to β -Lactams in *Salmonella enterica* serovar Infantis Isolated from Broilers in Japan. *Front Microbiol.* 4:113, 2013.
3. 秋庭正人 . 薬剤耐性遺伝子の伝播機構 . 化学療法の領域 . 29:1282-1291, 2013
4. Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M. Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium. *PLoS ONE* 9(8): e104380.
5. Ido N, Iwabuchi K, Sato Y, Sato Y, Sugawara M, Yaegashi G, Konno M, Akiba M, Tanaka K, Omoe K, Uchida I. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- isolates from humans, animals, and river water in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Med Sci.* (in press)

表 1 . 大腸菌由来薬剤耐性プラスミドの伝達頻度

受容菌	供与プラスミド	
	pE0074	pE0080
	IncI1-I γ	IncK, B/O
	95 kb	80 kb
	bla _{CMY-2}	bla _{CMY-2}
Salmonella Typhimurium LT2	3.2×10^{-5}	1.1×10^{-8}
Salmonella Infantis L-3701	3.8×10^{-8}	5.0×10^{-7}
Citrobacter freundii ATCC8090	1.3×10^{-3}	8.0×10^{-8}
Klebsiella pneumoniae ATCC9997	7.5×10^{-6}	1.6×10^{-8}
Enterobacter cloacae ATCC13047	4.6×10^{-2}	1.0×10^{-5}
Escherichia coli ATCC14763	5.0×10^{-9}	4.3×10^{-10}
Escherichia coli MC1061	1.9×10^{-3}	6.0×10^{-7}

表 2 . 鹿児島大学より分与を受けた小児下痢便由来大腸菌 15 株の解析結果

番号	採材	MLST	O 抗原	H 抗原	ESBL	AggR
E570	2005	ST457	UT	NT	CTX-M-2	-
E571	2005	ST405	UT	NT	CTX-M-15	-
E572	2007	ST70	167	NT	CTX-M-2	-
E573	2007	ST457	UT	NT	CTX-M-2	-
E574	2008	ST3475	25	4	CTX-M-2	-
E575	2008	ST1148	168	NT	CTX-M-15	-
E576	2009	ST3026	169	NT	SHV-12	-
E577	2009	ST131	153	4	CTX-M-15	-
E578	2009	ST68	UT	NT	SHV-12	-
E579	2010	ST162	145	NT	SHV-12	-
E580	2010	ST131	63	UT	CTX-M-14	+
E581	2010	ST131	25	4	CTX-M-14	-
E582	2010	ST38	142	NT	CYX-M-14	-
E583	2010	ST297	86a	NT	CTX-M-14	-
E584	2010	ST38	127	NT	CTX-M-14	-

表 3 . プロイラーおよびヒト由来株における遺伝子型の分布

MLST	プロイラー 由来	ヒト由来	MLST	プロイラー 由来	ヒト由来
ST10	2		ST1079	1	
ST38	1	2	ST1101	1	
ST68	4	1	ST1140	1	
ST70		1	ST1148		1
ST115	2		ST1201	1	
ST117	3		ST1251	1	
ST131		3	ST1485	2	
ST156	1		ST2075	1	
ST162	1	1	ST2307	2	
ST226	1		ST2787	1	
ST297		1	ST2788	1	
ST359	3		ST2789	1	
ST366	2		ST2790	1	
ST371	1		ST2791	1	
ST373	1		ST2792	2	
ST405		1	ST2793	2	
ST457		2	ST2794	1	
ST602	1		ST3026		1
ST752	2		ST3475		1
ST949	1				

表 4 . 遺伝子型が同じ株の耐性遺伝子

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

表 5 . プロイラーおよびヒト由来株における
ESC 耐性遺伝子の分布

耐性遺伝子	プロイラー 由来	ヒト由来
CTX-M-2		4
CTX-M-14	3	5
CTX-M-15	3	3
SHV-2	1	
SHV-12	2	3
CMY-2	32	

表 6 . サルモネラ 04:i:- の性状解析結果

株	由来	分離年	PCR 結果 ^a			94 kb P ^b	ファージ型 ^c	薬剤耐性 パターン ^d
			m-PCR	IS200	spvB			
H1-4	ヒト	2006	+	+	+	+	193	-
H5	ヒト	2007	+	+	-	-	193	ASSu
H6	ヒト	2008	+	+	+	+	RDNC-a	-
H7	ヒト	2003	+	+	+	+	193	-
H8	ヒト	2007	+	+	+	+	26	-
H9-11	ヒト	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
H12	ヒト	2004	+	+	-	-	RDNC-c	-
H13	ヒト	2007	+	+	-	-	193	SSuT
H14	ヒト	2002	+	+	+	+	UT	ASuT
C1	牛	2003	+	+	+	+	RDNC-a	-
C2	牛	2005	+	+	+	+	RDNC-a	-
C3-4	牛	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
C5-8	牛	2008	+	+	+	+	RDNC-a	-
C9-10	牛	2008	+	+	+	+	RDNC-a	A
C11	牛	2004	+	+	+	+	RDNC-a	-
C12	牛	2005	+	+	+	+	120	-
C13	牛	2005	+	+	+	+	RDNC-b	-
C14	牛	2008	+	+	-	-	UT	ASSuT
C15	牛	2007	+	+	+	+	RDNC	-
C16	牛	2010	+	+	+	+	RDNC-a	-
C17	牛	2010	+	+	+	+	RDNC-b	A
S1	豚	2008	+	+	-	-	UT	ASSuT
S2	豚	2009	+	+	-	-	UT	ASSu
S3	豚	2002	+	+	-	-	RDNC-d	SSu
S4	豚	2003	+	+	-	-	RDNC-d	SSuT
S5	豚	2008	+	+	-	-	193	SSuT
S6	豚	2009	+	+	+	+	27	ASSuT
K1	鶏	2001	+	+	+	+	RDNC-b	-
K2	鶏	2004	+	+	-	-	RDNC	-
K3	鶏	2005	+	+	-	-	RDNC-c	-
K4	鶏	2006	+	+	-	-	RDNC-c	-
K5	鶏	2010	+	+	+	+	RDNC	ASuT
B1	ペンギン	2009	+	+	+	+	RDNC	-
B2-3	カラス	2000	+	+	+	+	RDNC-e	-
B4	オウインコ	2005	+	+	+	+	RDNC-e	-
M1	豚肉	2005	+	+	+	+	RDNC-a	-
M2	豚肉	2007	+	+	+	+	RDNC-a	-
R1	河川水	2007	+	+	+	+	26	-
R2	河川水	2007	+	+	+	+	RDNC-a	ASu
R3	河川水	2007	+	+	+	+	26	-

^a+, 増幅陽性; -, 増幅陰性; ND, 未実施^bP, プラスミド; +, 保有; -, 非保有^cRDNC, Reacted but did not conform (既知の溶菌パターンに該当せず); RDNC-a~e, 同じアルファベットの RDNC 株の中で同じ溶菌パターンであることを示す; UT, 型別不能; ND, 未実施^dA, アンピシリン; S, ストレプトマイシン; Su, スルファメトキサゾール; T, テトラサイクリン; -, 全ての薬剤に感受性

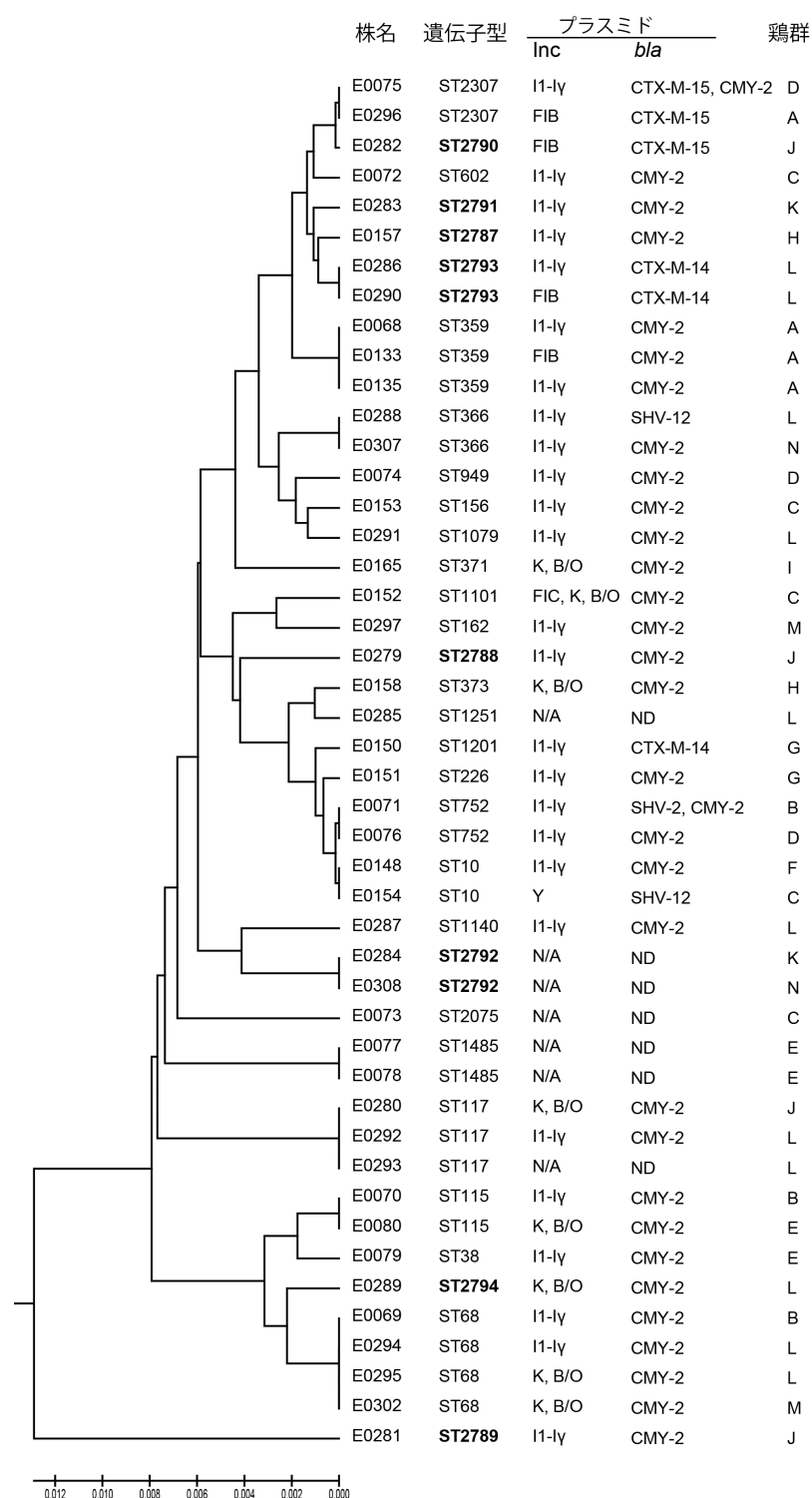


図 1 . ブロイラー由来大腸菌 46 株の遺伝的系統と保有プラスミド

7 つの housekeeping 遺伝子の配列を結合した仮想配列から作成した系統樹の右に株名、遺伝子型 (ST)、ESC 耐性プラスミドのレプリコン型と薬剤耐性遺伝子、分離された鶏群を示した。太字は本研究で登録した新しい ST を示す。

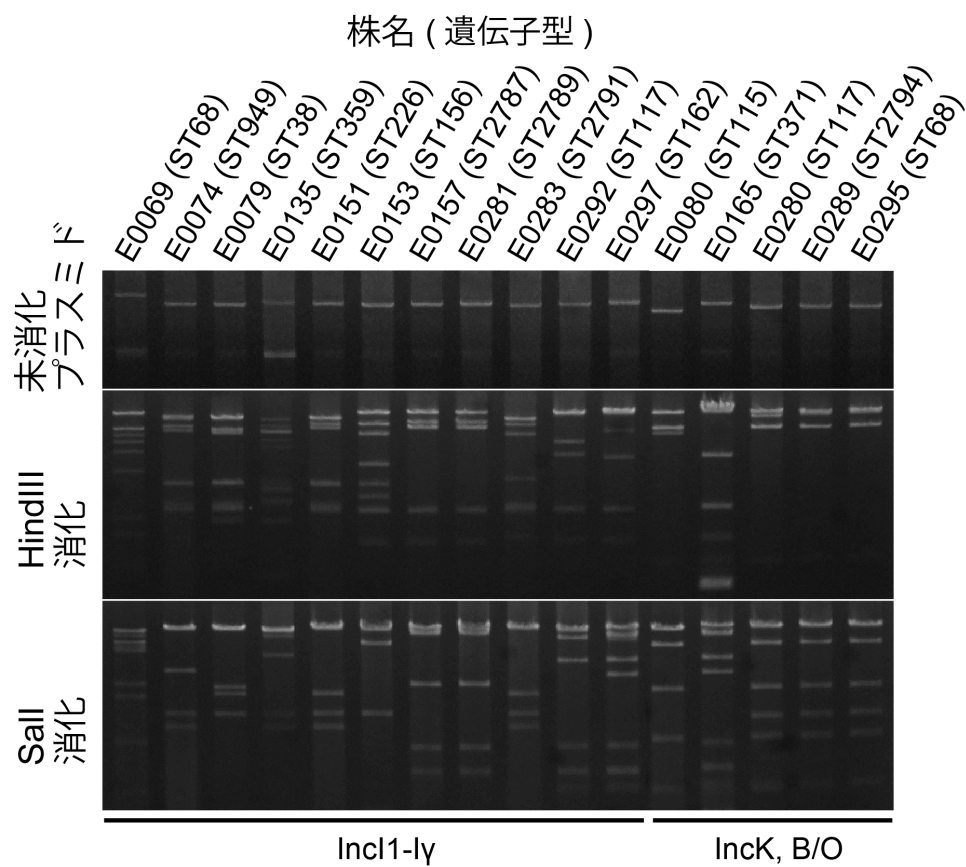


図 2 . プロイラー由来大腸菌プラスミドの RFLP 解析結果

*bla*_{CMY-2} 遺伝子を載せたプラスミドを保有する transconjugant または transformant からプラスミドを抽出し、HindIII または Sall で消化後、電気泳動像を比較した。

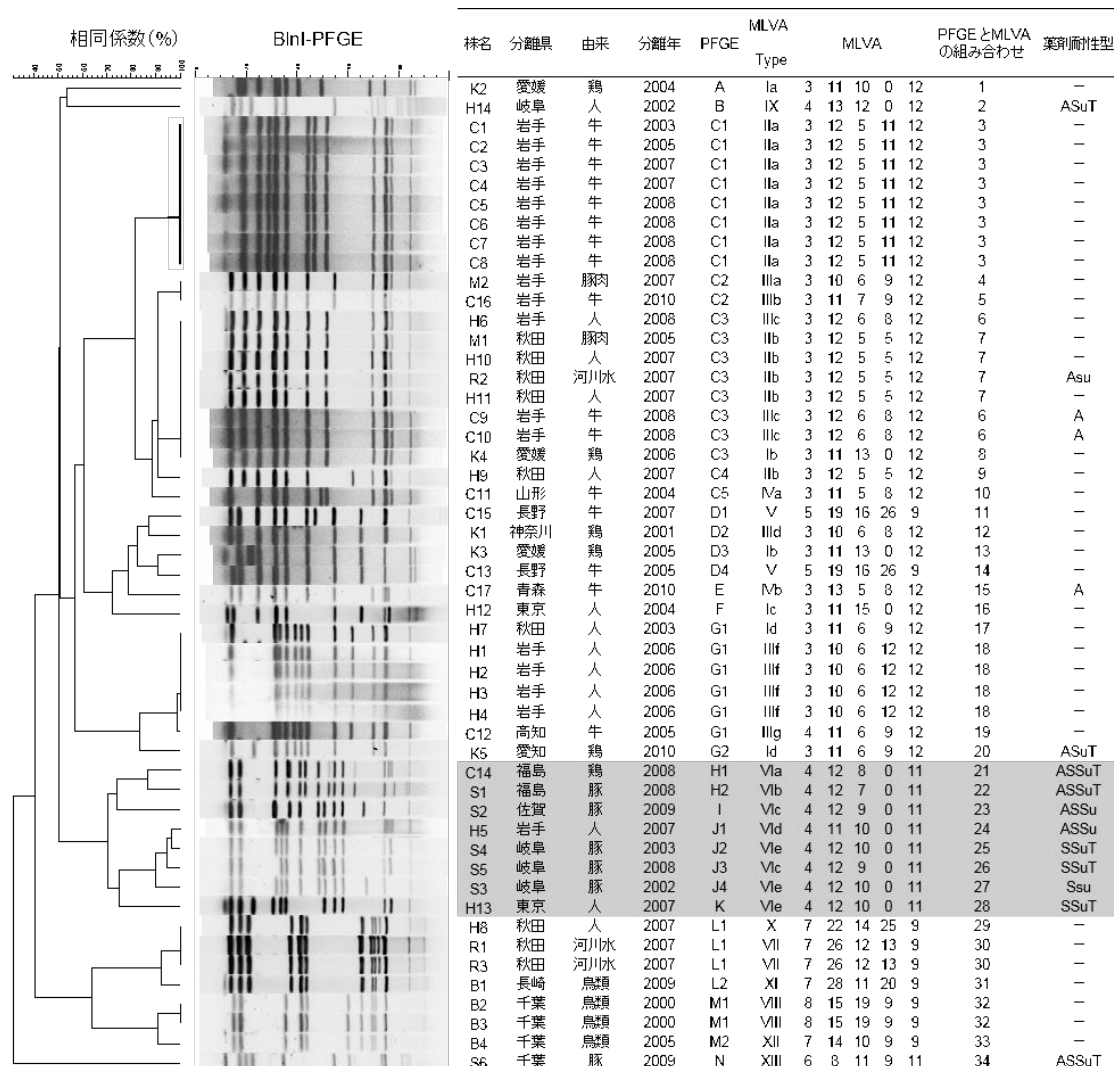


図3. 国内で分離された4:i:-株のPFGEとMLVAによる型別結果

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

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」

平成 24-26 年度 総合分担研究報告書

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。

市販の鶏肉の大腸菌調査では、同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出された。そして ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。鶏肉から検出されるサルモネラの中で最も多い血清型 *Infantis* では、2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いている。しかし他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

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から第三世代セファロスポリン系抗菌剤に耐性の大腸菌やサルモネラ属菌の分離が報告されており公衆衛生上の問題となっている。特に家禽においては、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL)

またはプラスミド性 AmpC 型 β -ラクタマーゼ (AmpC) 産生株の増加が報告されており、ヒトの感染症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。

B. 研究方法

(1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌

2012年に国内産鶏肉55検体、2013年に国内産鶏肉 24 検体を検査した。大腸菌検出は、検体 25g を採取し Bufferd Peptone Water で増菌培養し、分離培養には 2012 年は市販生培地の chromID ESBL のみを、2013 年は chromID ESBL およびセフォキシチン 20μg/mL 加 CHROMagar ECC の 2 種類の平板培地を使用した。

ESBL 産生は CLSI のディスク拡散法、AmpC 産生は 3-アミノフェニルボロン酸を用いたダブルディスクシナジー法で表現型を確認した (図 1)。その後に ESBL 産生菌は遺伝子のグループ型別 (CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-9、CTX-M-8/25、TEM、SHV) を行い、AmpC 産生菌はプラスミド性遺伝子 (ACC、CIT、DHA、EBC、FOX、MOX) の検出を行った。

(2) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生サルモネラ

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、血清型の変化と、ESBL および AmpC の表現型について調べた。

検査方法は、検体 25g を採取し一次増菌培養には Bufferd 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 (プリリアント

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。薬剤を添加した増菌培地および分離培地は使用しなかった。

確認培地でサルモネラの性状を示した株について血清型別と薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性試験は 1 検体につき 1 株、複数の血清型が同一検体から分離された場合は複数株を 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)、スルフィソキサゾール (Su) の 16 剤を供試した。

ESBL および AmpC 産生サルモネラのスクリーニングにはセフポドキシムを用い、セフポドキシム耐性株について ESBL および AmpC 産生性を大腸菌と同じ方法で調べた。

(3) 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。

(4) 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。薬剤感受性試験は鶏肉由来サルモネラと同じ方法で行った。

C. 研究結果と考察

(1) 国内産鶏肉の ESBL および AmpC 産生大腸菌

2012 年は 44 検体 (80.0%) から ESBL 産生大腸菌、2 検体 (3.6%) から AmpC 産生大腸菌が検出された。2013 年は 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%) あり、ESBL のみ検出は 1 検体、AmpC のみ検出は 1 検体であった。また、ESBL 産生大腸菌はすべて chromID ESBL で検出され、AmpC 産生大腸菌はすべてセフォキシチン 20µg/mL 加 CHROMagar ECC で検出され、分離平板による差が明らかになった (表 1)。

2012 年の遺伝子のグループ型別は 46 株で行い、CTX-M-1 グループ 8 株、CTX-M-2 グループ 23 株、CTX-M-8/25 グループ 3 株、CTX-M-9 グループ 5 株、SHV 型 7 株であった。AmpC 産生大腸菌はいずれも CMY-2 であった (表 2)。

2013 年の遺伝子のグループ型別は、ESBL 産生大腸菌では CTX-M-1 グループ 7 株、CTX-M-2 グループ 30 株、CTX-M-8/25 グループ 14 株、CTX-M-9 グループ 25 株、SHV 型 22 株、TEM 型 5 株であった。同一検体由来株でも異なる型が検出され、12 検体で複数の型を検出した。一方、AmpC 産生大腸菌はいずれもプラスミド性の CIT 遺伝子保有であった (表 3)。

2012 年に国内の養鶏団体がセフォ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。

(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、変化が認められている (図 2)。

薬剤感受性試験を実施した 700 株のうちセフポドキシム耐性は 127 株 (18.1%) あり、ESBL 産生菌が 34 株、AmpC 産生菌が 93 株であった。ESBL 産生 34 株の血清型は *S. Infantis* 24 株、*S. Manhattan* 7 株、そして *S. Schwarzengrund*、*S. Hadar*、*S. Typhimurium* が各 1 株であった。AmpC 産生菌ではさらに *S. Infantis* の占める割合が高く、93 株中 90 株が *S. Infantis* であった。他の血清型では *S. Manhattan* のセフポドキシム耐性 7 株が全て ESBL 産生であるなど、血清型による差が認められた (表 4)。

S. Infantis の ESBL および AmpC 産生菌の年次変化をみると、2009 年から AmpC 産生菌の急増が認められ、2013 年も 13 株中 6 株 (46.2%) が AmpC 産生であった (図 3)。

(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7)。

フルオロキノロン耐性率の年次変化：散发下痢症患者由来 *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4)。

(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8)。

D. 結論

市販の鶏肉には ESBL 産生大腸菌と AmpC 産生大腸菌が高率に存在することが明らかになった。そして同一検体から複数の ESBL の型が検出され、さらに AmpC 産生菌も同時に検出される事も判明した。2012 年に国内の養鶏団体がセフォ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 2013 年になっても高率に存在していることが明らかになった。

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の傾向が認められた。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。*S. Infantis* では 2009 年以降 AmpC 産生菌が多い傾向が続いているが、他の血清型ではこのような傾向が認められなかった。

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)

- 1) Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended - Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase - Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. Jpn. J. Infect. Dis.2012, 65: 555-557.
- 2) Harada T, Hirai Y, Itoh T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an IS1203 variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2013, 77: 176-178.
- 3) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 2013, 66: 530-533.
- 4) 田口真澄：食品由来細菌の薬剤耐性の疫学化学療法の領域、29：48-54,2013.

- 5) 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)

(口頭発表)

- 1) 田口真澄、勢戸和子、河原隆二、原田哲也、久米田裕子：鶏肉の ESBL、衛生微生物技術協議会第 33 回研究会、2012 年 6 月、神奈川
- 2) 田口真澄：大阪府におけるカンピロバクター食中毒の動向および鶏肉からのカンピロバクター検出状況、第 5 回日本カンピロバクター研究会、2012 年 11 月、大阪
- 3) 勢戸和子、神吉政史、原田哲也、田口真澄：大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌出血性大腸菌感染症研究会、2013 年 7 月、つくば
- 4) 田口真澄、河原隆二、勢戸和子：市販鶏肉には AmpC 型 β -lactamase 産生大腸菌と ESBL 産生大腸菌が同率に存在する、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月、東京

G.知的財産権の出願・登録状況

なし

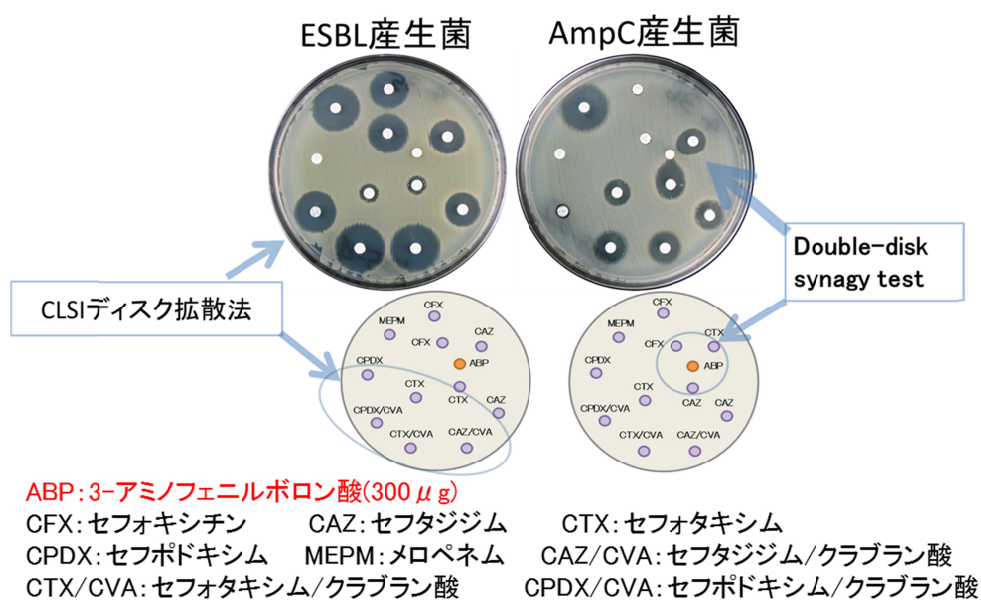


図1 ESBLおよびAmpC産生菌の検出方法

表1 国産鶏肉からのESBL/AmpC産生大腸菌検出

年	検体数	ESBL/AmpC 陽性検体	ESBL産生大腸菌検出		AmpC産生大腸菌検出	
			chromID ESBL agar	セフォキシチン加 CHROMagar ECC	chromID ESBL agar	セフォキシチン加 CHROMagar ECC
2012年	55	46 (83.6%)	44 (80.0%)		2 (3.6%)	
2013年	24	24 (100%)	23 (95.8%)	0	0	23 (95.8%)

表2 2012年のESBL/AmpC産生大腸菌型別成績

型	菌株数	血清型(菌株数)
CTX-M-1	3	O111:H4(2),O8:H19(1)
CTX-M-14	5	O166:HUT(2),OUT(3)
CTX-M-15	2	OUT(2)
ESBL CTX-M-2	23	O166:H45(1),O15:H10(3),O111:HNM(4), O166:HUT(1),O157:HNM(1),OUT(13)
CTX-M-25	3	O166:HUT(1),OT(2)
CTX-M-55	3	OUT(3)
SHV-12	7	O114:HNM(2),O18:H7(1),OUT(3)
AmpC CMY-2	2	OUT(2)

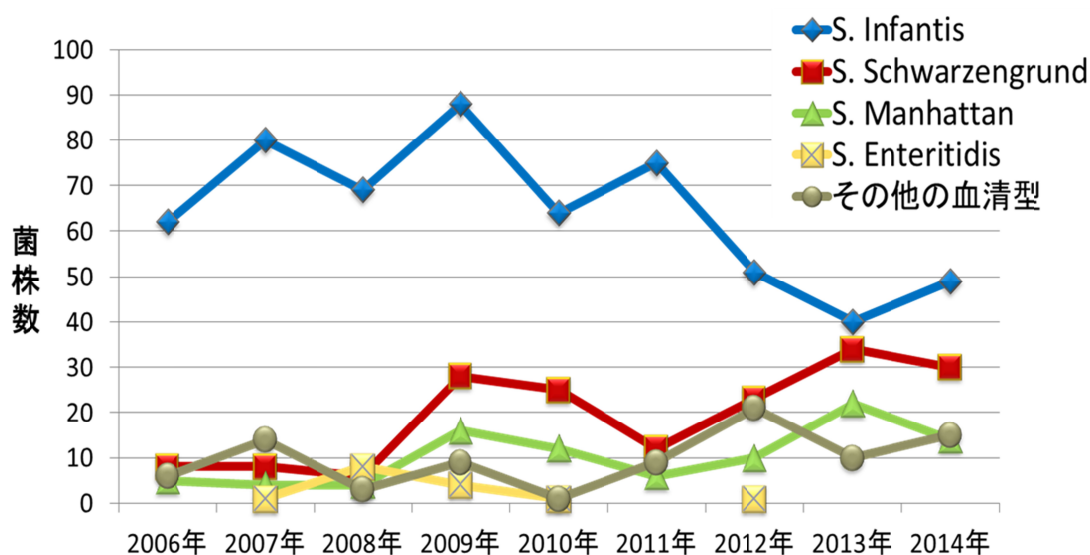


図2 大阪府内で入手した国産鶏肉由来サルモネラの血清型別検出数

表3 2013年のESBL/AmpC産生大腸菌遺伝子型別成績

検体 番号	販売 店	供試 株数	ESBL							AmpC		
			菌株数	CTX-M (グループ)				SHV	TEM	菌株数	CMY-2	CIT まで
				-1	-2	-9	-8/25					
1	Q	9	4		1			3		5	5	
2	Q	10	5	1				4		5	5	
3	R	10	5		2	3				5	5	
4	R	7	4	1	3					3	3	
5	R	4	2		2					2	2	
6	G	10	5		1		3	1		5	5	
7	G	10	5		4	1				5	5	
8	G	10	5	1		2	2			5	5	
9	S	1	0							1	1	
10	T	10	5		4	1				5	2	3
11	T	5	3		3					2	2	
12	U	7	5				5			2	2	
13	U	10	5		1		4			5	5	
14	U	9	5						5	4	4	
15	U	10	5		5					5	5	
16	V	6	1		1					5	5	
17	V	5	5			5				0		
18	V	10	5	2		3				5	5	
19	V	10	5	2		2		1		5	5	
20	W	10	5		3			2		5	5	
21	W	10	5					5		5	5	
22	X	9	5					5		4		4
23	Y	10	5			5				5	5	
24	Y	9	4			3		1		5	5	
合計		201	103	7	30	25	14	22	5	98	91	7

表4 サルモネラのセフトロキシン耐性株数

血清型	菌株数	セフトロキシン 耐性株		
		合計	ESBL	AmpC
<i>S. Infantis</i>	472	114	24	90
<i>S. Schwarzengrund</i>	109	1	1	
<i>S. Manhattan</i>	59	7	7	
<i>S. Hadar</i>	10	1	1	
<i>S. Typhimurium</i>	7	1	1	
<i>S. Heidelberg</i>	1	1		1
<i>S. (1) O7:HNM</i>	1	1		1
<i>S. Enteritidis</i>	15			
その他	26	1		1
合計	700	127	34	93

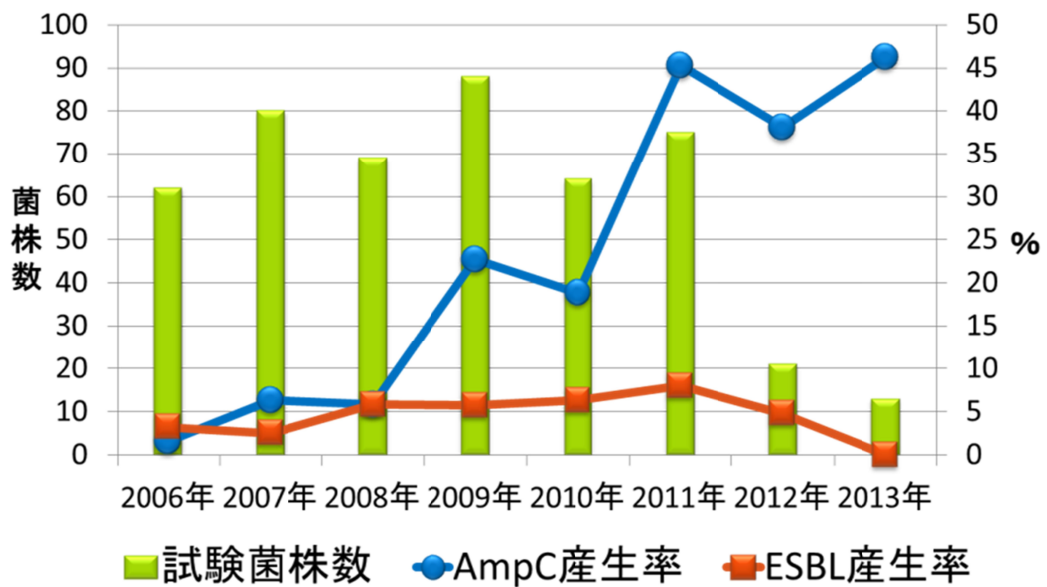


図3 *S. Infantis*のESBLおよびAmpC産生率の年次変化

表 5 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
<i>C. jejuni</i>	NFLX,OFLX,CPFX,NA,EM				1	1	
	NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	25	8	13	4	50	31
	NFLX,OFLX,CPFX,NA	16	6	9	7	38	35
	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
<i>C. coli</i>	NFLX,OFLX,CPFX,NA,TC	1		1	1	3	3
	NFLX,OFLX,CPFX,NA				1	1	3
	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(CPFX)、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 6 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7 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</i> / <i>coli</i> 合計	56	218

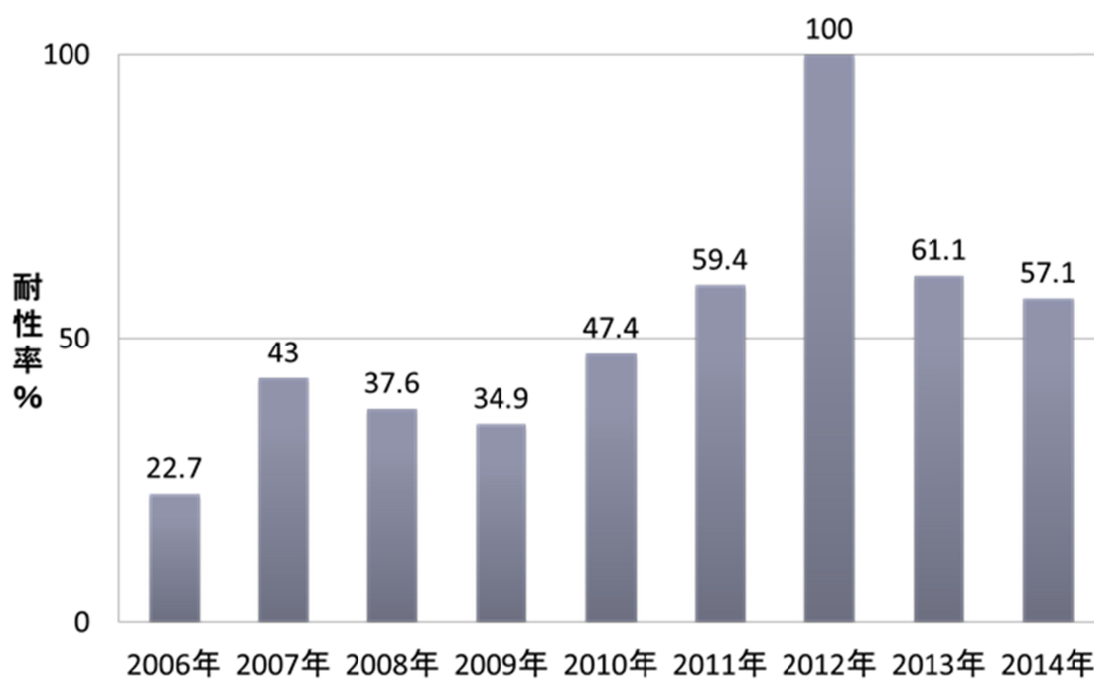


図4 散発下痢症由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率

表8 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	

平成 24-26 年度 厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進研究事業

「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」

分担研究報告書

分担課題名：伴侶動物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群獣医学類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群獣医学類食品衛生学ユニット

研究要旨

伴侶動物では人体用医薬品が汎用され、伴侶動物において出現した薬剤耐性菌がヒトへ伝播し、ヒトの健康へ影響することが懸念されている。しかし、日本における伴侶動物由来菌のヒトの健康への影響についての実態は明らかとなっていない。そこで今回、ネコ由来大腸菌の感受性調査、イヌ由来 *Clostridium difficile* の保有調査、イヌ由来大腸菌のプラスミド性高度アミノグリコシド耐性遺伝子保有調査、動物病院スタッフの MRSA 保有調査を行った。その結果、ネコはセファロスポリン耐性菌やフルオロキノロン耐性菌などを保有していること、イヌはヒトの抗菌薬関連下痢症の原因となり得る *C. difficile* を保有しておりヒト由来株と相同性を示したこと、イヌ由来大腸菌の一部にはプラスミド性高度アミノグリコシド耐性を示す *rmtB* 遺伝子保有株が存在したこと、動物病院勤務の獣医師の 12% が MRSA を保菌していたことが明らかとなった。伴侶動物および伴侶動物に関わる獣医師が、ヒトの医療において重視される薬剤耐性菌を保有しており、伴侶動物とヒト間で伝播している危険性が示唆された。

A. 研究目的

近年、イヌやネコ等の伴侶動物はヒトと共通の場で生活し、ヒトとの接触頻度は極めて高い状況にある。一方、獣医学技術の進展や動物福祉への関心の高まりを背景として、伴侶動物に対してヒトと遜色のない獣医療が求められるよ

うになった。その結果、伴侶動物医療では人体用医薬品の使用が一般化しており、その使用に伴う薬剤耐性菌の出現が問題となっている。

しかし、伴侶動物及び伴侶動物に関わるヒトにおける薬剤耐性菌保有の実態については明らかになっていないことが多く、そのリスクを明

らかにするための研究が必要とされている。

そこで本研究では、イヌと比較して調査成績が少ないネコが保有する大腸菌の薬剤感受性調査、ヒト医療において抗菌薬関連下痢症の原因として問題となっている *Clostridium difficile* のイヌにおける保有状況及びヒト臨床由来株との比較、イヌ由来大腸菌のプラスミド性高度アミノグリコシド耐性株の実態調査、動物病院スタッフの MRSA 保菌調査を行った。

B. 研究方法

1. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

(1) 供試菌株

酪農学園大学附属動物病院および江別市内の 8 ケ所の動物病院に来院したネコから直腸スワブを採取し、菌分離に供した。スワブは DHL 寒天培地に直接塗布し、37℃ 24 時間好気下で培養した。発育した赤色集落を純培養して菌株を得た後、生化学性状試験に基づいて大腸菌 (*Escherichia coli*) と同定し、以降の実験に供した。

(2) 薬剤感受性試験

アモキシシリン (ABPC)、セファレキシン (CEX)、セフトロキム (CPDX)、カナマイシン (KM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、エンロフロキサシン (ERFX) の 7 薬剤について CLSI の方法に準拠した寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

(3) CPDX 耐性株の性状解析

CPDX 耐性であった株を対象に DNA を抽出し、PCR 法によるラクタム耐性遺伝子の検索に供した。検出された遺伝子は塩基配列を解析することでその亜型を決定した。また、これらの株については染色体性 AmpC 過剰産生によるラクタム耐性化の有無を調べるため、ampC プロモーター領域の塩基配列を解析し、点突然変異の有無を確認した。

(4) 病原性解析

CPDX 耐性株について、O 抗原血清型を血清凝集反応 (病原大腸菌免疫血清「生研」、デンカ生検株式会社) により決定した。また、PCR により系統発生分類を決定するとともに病原性遺伝子を検出した。

2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査及びヒト感染症由来株との比較

(1) 供試菌株

動物病院来院犬及びセラピー犬合計 204 頭の糞便からクロストリジウム選択培地 (CCMA-Ex 培地) により *C. difficile* を分離した。一方、ヒト由来 *C. difficile* は、東京都の 2 病院の患者から分離された 73 株を供試した。

(2) 薬剤感受性試験

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 (CLDM)、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。

(3) トキシン産生性

PCR 法によりトキシン A(*tcdA*)、B(*tcdB*)、及びバイナリートキシン(*cdtA/B*)産生性について決定した。

(5) 疫学解析

リボタイピングを実施し、イヌ由来株とヒト由来株でリボタイプが一致した株についてさらに PFGE 解析を行った。

3 .16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

(1) 供試菌株

動物病院来院犬から分離されたイヌ由来大腸菌 212 株を供試した。

(2) 薬剤感受性試験

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。また、16S-RMTase 陽性株については、微量液体希釈法により他の複数の種類の薬剤に対する感受性も決定した。

(3) 16S-RMTase 遺伝子の検出

rmtA, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA* 遺

伝子の保有について PCR により検索した。

(4) 接合伝達試験

16S-RMTase 陽性株について Broth-mating 法による接合伝達試験を行った。

4 . 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

(1) 供試菌株

3 カ所の大学附属動物病院(酪農学園大学、岐阜大学、東京農工大学)の獣医師 50 名、動物看護師 15 名、事務職員 3 名の鼻腔スワブより MRSA を分離した。

(2) 疫学解析

アンケート調査(性別、職業、診療時の衛生管理等 37 項目)を行い、MRSA 分離結果をもとにした統計解析を行った。

C. 研究結果

D. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

(1) 菌分離及び薬剤感受性試験

9 ヶ所の動物病院(A~J)から 92 検体のネコ直腸スワブを採集し、うち 70 検体(76.1%)から大腸菌を分離した。分離菌株のうち 19 株(27.1%)が 1 剤以上の抗菌薬耐性を示し、測定した 7 剤すべてに耐性をもつ株も 1 株存在していた。ABPC および OTC に対する耐性株はそれぞれ全体の 21.4%、15.7%とやや高い傾向を示したが、他の薬剤に対する耐性率はいずれも全体の 5~8%程度であった(表 1)。CPDX 耐

性株(6株、8.6%)やERFX耐性株(3株、4.3%)も確認された。また、施設ごとに耐性菌分離状況を比較した場合、検体数の多かった病院(A, B, H)で多種の耐性菌が検出される傾向にあるものの、その分離率には施設ごとの有意差は認められなかった。

(2) CPDX 耐性株の性状解析(表2)

第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるCPDXに耐性を示した6株について、保有するラクタマーゼの検索を行なった(表2)。被検株のうち、セファロスポリン耐性に関わる因子としてESBLのCTX-M-14およびampC型ラクタマーゼのCMY-2保有株がそれぞれ1株ずつ(CFE5およびCFE3)確認された。また、うち2株(CFE7およびCFE9)については、ESBLやampC型ラクタマーゼは保有していなかったものの、染色体上のampCプロモーター領域の-32部分に変異(T to A)が生じていたことから、染色体性ampC過剰産生株であると考えられた。残り2株(CFE1およびCFE11)については、セファロスポリン耐性に関わる因子を特定することができなかった。

(3) 菌株の病原性試験(表2)

0抗原型別の結果、上記6株はいずれも使用した抗血清と凝集反応を示さなかった。病原性遺伝子に基づく系統発生分類では、系統Aが1株、系統B1が1株、系統B2が3株、系統Dが1株であった(表2)。病原性遺伝子として、全株がアドヘジンをコードする*fimA*, *fimH*遺伝子を保有していたのに加え、系統B2

の3株(CFE7、CFE9、CFE11)は毒素をコードする*hly*, *cnf*遺伝子を保有していた。

2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査及びヒト感染症由来株との比較

(1) 菌分離とトキシン産生性

イヌ糞便204検体中62検体(30%)から68株が分離された。その内32株(47%)が*tcdA/tcdB*陽性で、36株が*tcdA/tcdB*陰性だった。CDT(*cdtA/cdtB*)を保有している株はなかった。

(2) 薬剤感受性

イヌ由来株とヒト臨床由来株の薬剤感受性試験の結果を表3に示す。全てのイヌ由来株とヒト臨床由来株はVCM、MNZに感受性であった。TETに対しては、イヌ由来株及びヒト臨床由来株の両方で耐性割合が低かった。イヌ由来株の薬剤耐性割合はCTRX及びEMで、ヒト臨床由来株の薬剤耐性割合よりも低い傾向を示した。

(3) 疫学解析

リボタイピングの結果、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*tcdA/tcdB*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)。

3 .16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性大腸菌の伴侶動物保有調査

(1) 薬剤感受性試験

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。

(2) 16S-RMTase 遺伝子保有状況

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 4)。*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 4) *bla_{TEM-1}* も保有していた。

(3) 16S-RMTase 保有株の性状

rmtB 遺伝子陽性株について、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 1.7×10^{-5} 及び 2.4×10^{-3})。トランスコンジュガントには GM、AMK 耐性が伝達した。

4 . 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

(1) MRSA の分離

MRSA は獣医師 50 名中 6 名 (12.0%) から分離された。内訳は、酪農学園大学附属動物

病院 5.6% (1/18)、東京農工大学附属動物病院 17.6% (3/17)、岐阜大学附属動物病院 13.3% (2/15) だった。動物看護師及び事務職員からは分離されなかった

(2) 疫学解析

MRSA は獣医師からのみ分離されたため、獣医師 50 名の MRSA 保菌のリスク因子の解析を行った。MRSA 保菌者の 2 週間の診療頭数 (平均 83.3 頭) は、陰性者 (平均 40.3 頭) よりも有意に多かった ($p=0.049$)。

E. 考察

1. ネコ由来大腸菌の薬剤感受性調査及び耐性機構の解明

CPDX 耐性や ERFX 耐性といった、抗菌活性の強い薬剤に対する耐性をもった大腸菌株が低率ながらも分離されたことから、ネコがこうした耐性菌を腸管細菌叢の一部として保菌していたことが確認された。

また、ABPC や OTC など古典的な抗菌薬に対する耐性株が比較的多かったことから、こうした抗菌薬に対する耐性菌がネコにおいても広く拡散していることが示された。一方で、全ての抗菌薬の耐性割合がイヌ分離菌株の約半分であった。このことは、イヌとネコにおける薬剤の使用状況または、ネコ分離菌株の特徴であることが考えられた。

さらに、それぞれの動物病院の間では耐性菌分離率に有意差が認められなかったことから、本研究におけるネコの耐性菌保菌率は特定の動

物病院の治療方針に影響されるものではなく、伴侶動物として飼われているネコ全体に当てはまるものだと考えられた。

ヒトの臨床現場で広がっているセファロスポリン耐性大腸菌の多くは CTX-M 型 β -ラクタマーゼを保有していることが報告されている。一方、今回の研究では分離された CPDX 耐性株が少なく(6 株、8.6%)、ESBL である CTX-M-14 を保有していたのも 1 株だけであったことから、ネコにおいて ESBL 産生大腸菌は拡散していないものと考えられた。

また、被検株のうち 2 株ではセファロスポリン耐性に関わる因子を特定できなかったことから、検索の対象としなかった耐性化因子(minor ESBL など)の存在があったのではないかと考えられた。

CPDX 耐性株はいずれも血清型を特定できず、高病原性の大腸菌は存在しなかった。しかしながら系統発生分類の結果、腸管外病原性株が多いとされる系統 B2 や腸管内病原性株が多いとされる系統 D の株が検出された。また、系統 B2 の株は毒素遺伝子(*hly* および *cnf*)も保有していたことから、ネコが保菌している CPDX 耐性大腸菌がヒトに対してある程度の病原性を示すことが示唆された。

2. イヌ由来 *Clostridium difficile* 保有調査 及びヒト感染症由来株との比較

日本で飼育されるイヌが、比較的高い割合でトキシン 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毒素を保有していたことから、イヌからヒトに伝播した際のリスクは高い。

また、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* の調査がさらに必要であることが示された。

3 .16S-RMTase 保有高度アミノグリコシド耐性 大腸菌の伴侶動物保有調査

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(*rmtB*) 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_{TEM-1}* 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 保有株及びその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。

4. 動物病院スタッフの MRSA 保有状況調査

日本の伴侶動物に携わる獣医師の MRSA 保菌率は一般健康人および医療関係者に比べて高く、さらに海外の獣医師の保菌率(オーストラリア, 4.9%; デンマーク, 3%)に比べて、高い保菌率(12.0%)を示した。以上のことから、日本の伴侶動物獣医療に携わる獣医師のさらなる衛生管理に対する取り組み等が必要であると考えられた。

疫学解析の結果から、MRSA 保菌者は陰性者に比べ、診療頭数が有意に多かった。診療頭数が多いほど、MRSA を保菌する患畜と接触する確率が高まり、診療動物から獣医師へ MRSA が伝播し

たと考えられた。

E. 結論

本研究において、伴侶動物及び伴侶動物に関わるヒトの薬剤耐性菌の実態について、調査を行い、以下の成績が得られた。

1. 伴侶動物として飼育されているネコが、その腸管細菌叢の一部として、セファロスポリン耐性菌やフルオロキノロン耐性菌などの強力な耐性菌を保有しており、ヒトに対しての病原性が疑われる株も存在したことから、その拡散状況については今後も注視する必要がある。

2. 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。

3. 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 保有株及びその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。

4. 日本の動物病院で勤務する獣医師の 12% で MRSA の保菌が認められたことから、獣医師の衛生管理に対する取り組み等が必要であることが示唆された。

伴侶動物とヒトの間での耐性菌及び耐性遺伝子の伝播の可能性は高い。今後、伴侶動物にお

いて出現・拡散する耐性菌及び耐性遺伝子のヒトへの伝播リスクについて、さらに明らかにしていく必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. Baba K, Ishihara K, Ozawa M, Usui M, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 74, 561-565, 2012.
2. Sasaki Y, Usui M, Murakami M, Haruna M, Kojima A, Asai T, Yamada Y.: Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 isolates from beef cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 117-121, 2012.
3. Usui M, Hiki M, Murakami K, Ozawa M, Nagai H, Asai T.: Evaluation of transferability of R-plasmid in bacteriocin-producing donors to bacteriocin-resistant recipients. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 252-255, 2012.
4. Asai T, Hiki M, Baba K, Usui M, Ishihara K, Tamura Y.: Presence of *Staphylococcus aureus* ST398 and ST9 in swine in Japan *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65, 551-552, 2012.
5. Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fujii N.: Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strains isolated in Japan. *Chemotherapy*, 58, 52-59, 2012.
6. Kurosawa A, Imamura T, Tanaka K, Tamamura Y, Uchida I, Kobayashi A, Hata E, Kanno T, Akiba M, Yukawa S, Tamura Y.: Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. *Vet. Microbiol.* 160, 264-268, 2012.
7. Ishihara K, Takahashi R, Andoh M, Makita K, Kamiji S, Ueno H, Muramatsu Y, Tamura Y.: Effects of climatic elements on *Campylobacter*-contaminate chicken products in Japan. *Epidemiol. Infect.*, 140:991-996. 2012.
8. Asai T, Usui M, Hiki M, Kawanishi M, Nagai H, Sasaki Y.: *Clostridium difficile* Isolated from the Fecal

- Contents of Swine in Japan. *J Vet Med Sci.* 75: 539-541. 2013.
9. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. equal distribution H. M and U. M.: Diversity of plasmid replicons encoding the blaCMY-2 gene in broad spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10:243-249. 2013.
 10. Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T.: Effect of antimicrobial exposure on AcrAB expression in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis. *Front. Microbiol.* 4:53. 2013.
 11. Sato T, Okubo T, Usui M, Higuchi H, Tamura Y.: Amino acid substitutions in GyrA and ParC are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves. *J Vet Med Sci.* 75: 1063-1065. 2013.
 12. Usui M, Iwasa T, Fukuda A, Sato T, Okubo T, Tamura Y. The Role of Flies in Spreading the Extended-Spectrum Beta-lactamase Gene from Cattle. *Microbial Drug Resistance.* 19: 415-420. 2013
 13. Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y. : Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance determining region mutations. *Front. Microbiol.* 4:125. 2013.
 14. Ishihara K, Nakajima K, Kishimoto S, Atarashi F, Muramatsu Y, Hotta A, Ishii S, Takeda Y, Kikuchi M, Tamura Y.: Distribution of antimicrobial resistant lactic acid bacteria in natural cheese in Japan. *Microbiol. Immunol.* 57:684-691. 2013.
 15. Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y.: Genomic analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium definitive phage type 104. *Emer.Infect.Dis.*, 19:823-824. 2013.
 16. 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 blaCMY-2 from fecal samples of dogs in Japan. *J Med Microbiol.* 63:263-270. 2014.

17. 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
18. 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.
19. Usui M, Uchida I, Tamura Y.: Selection of macrolide-resistant *Campylobacter* in pigs treated with macrolides. *Vet. Rec.*, 175: 430, 2014.
20. 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.
21. 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_{CMY-2}* from fecal samples of dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 63: 263-270, 2014.
22. 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.
23. 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
24. 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.
25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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
 32. 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.

33. 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 24-26 年度 総合研究報告書

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

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	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
研究協力者	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	松井真理	国立感染症研究所	細菌第二部	

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類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した。次世代シーケンサーで得た解読リードを入力すると、配列のトリミング・アセンブル、遺伝子機能・Inc タイプの推定、薬剤耐性因子の発見までをシームレスに行うことのできる web アプリケーション GPAT(Global Plasmidome Analyzing Tool)を構築した。また、GPAT と連携して複数の plasmid 間での遺伝子の授受関係の解析を容易にする iPAT(inter Plasmid Analyzing Tool)の開発も行った。iPAT により plasmid が保有する遺伝子水平伝達を俯瞰的に眺める事が可能になった。今後、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が望まれる。

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に従った。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に係るシステム開発を行った（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、platanus と price 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た。

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ような仕様にした。

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 日時点のデータを用いた。

GPAT は MiSeq のシーケンス結果だけでなく、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 はパ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う、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システムにした。

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あれば、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、誰しもが使用できる汎用性のある環境整備が望まれる。

GPAT は MiSeq による plasmid のシーケンシングリード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 同士の関係性をネットワーク図として図示することを可能にし、俯瞰的に関連性を理解しやすいシステムとして開発した。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より詳細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)

1. 山下 明史, 関塚 剛史, 黒田 誠
Comprehensive analysis of horizontal plasmid transfer based on a component network analysis: Plasmidome network analysis. 第 36 回日本分子生物学会年会(ポスター発表 2P-0087)(2013 年 12 月 神戸国際会議場)
2. 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.

3. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当なし

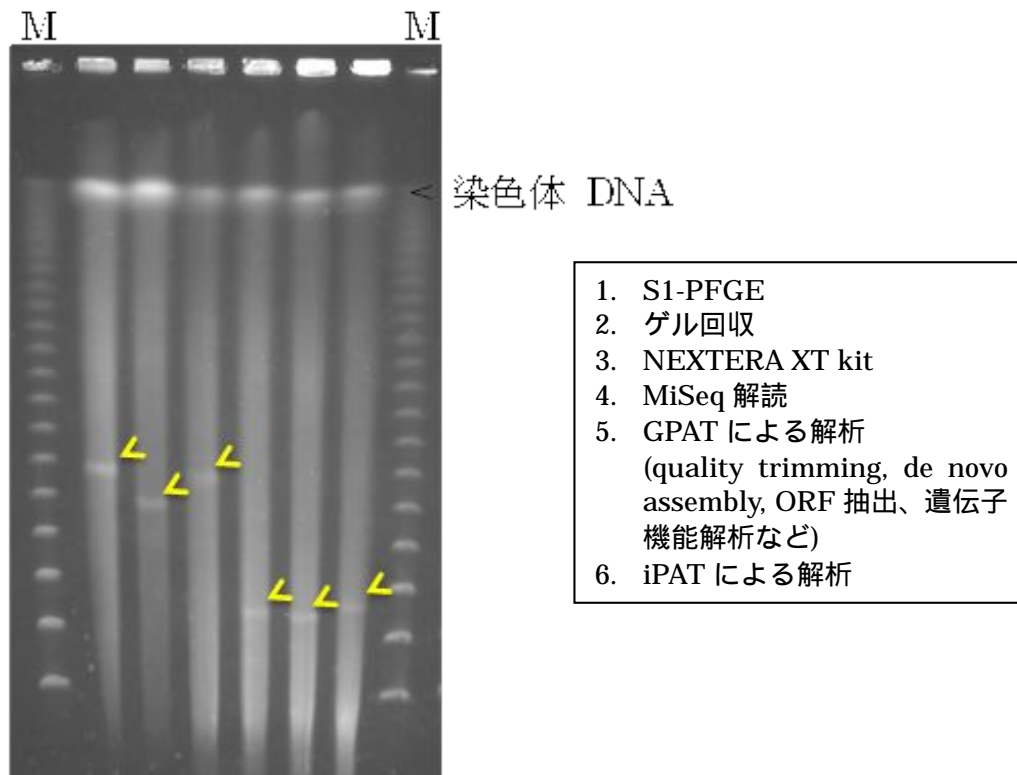


図1 プラスミド DNA の PFGE 分離から配列解読そして情報解析までの流れ。S1-PFGE 泳動図に泳動分離されたプラスミド断片（黄色矢頭）を示す。

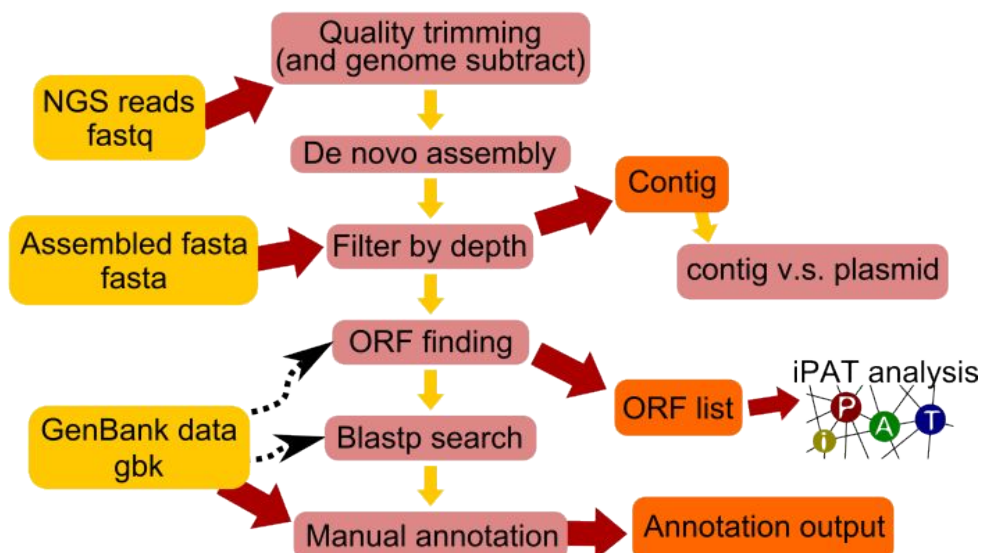


図2 GPAT (Global Plasmidome Analyzing Tool) による plasmid 解析のワークフロー。Quality trimming には skewer または fastq-mcf の後 in house perl スクリプトによる詳細なトリミングを行う。Genome subtract には bwa, samtools, Hydra および in house perl スクリプトを用いる。Assemble には A5_miseq / A5 / spades / PIPr が選択可能である。ORF 推定には prodigal, gmhmm_heuristic および gmhmm が選択可能である。

GPAT: V001-b

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

Google

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

Upload
[See GPAT change log](#)

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	41056930
100	100	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	17158058
100	100	extended-spectrum beta-lactamase	DQ885477
99	100	tetracycline efflux protein TetA tetracycline resistance protein, class A protein	31795168

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"/>

Run Process

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

Prefixed 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

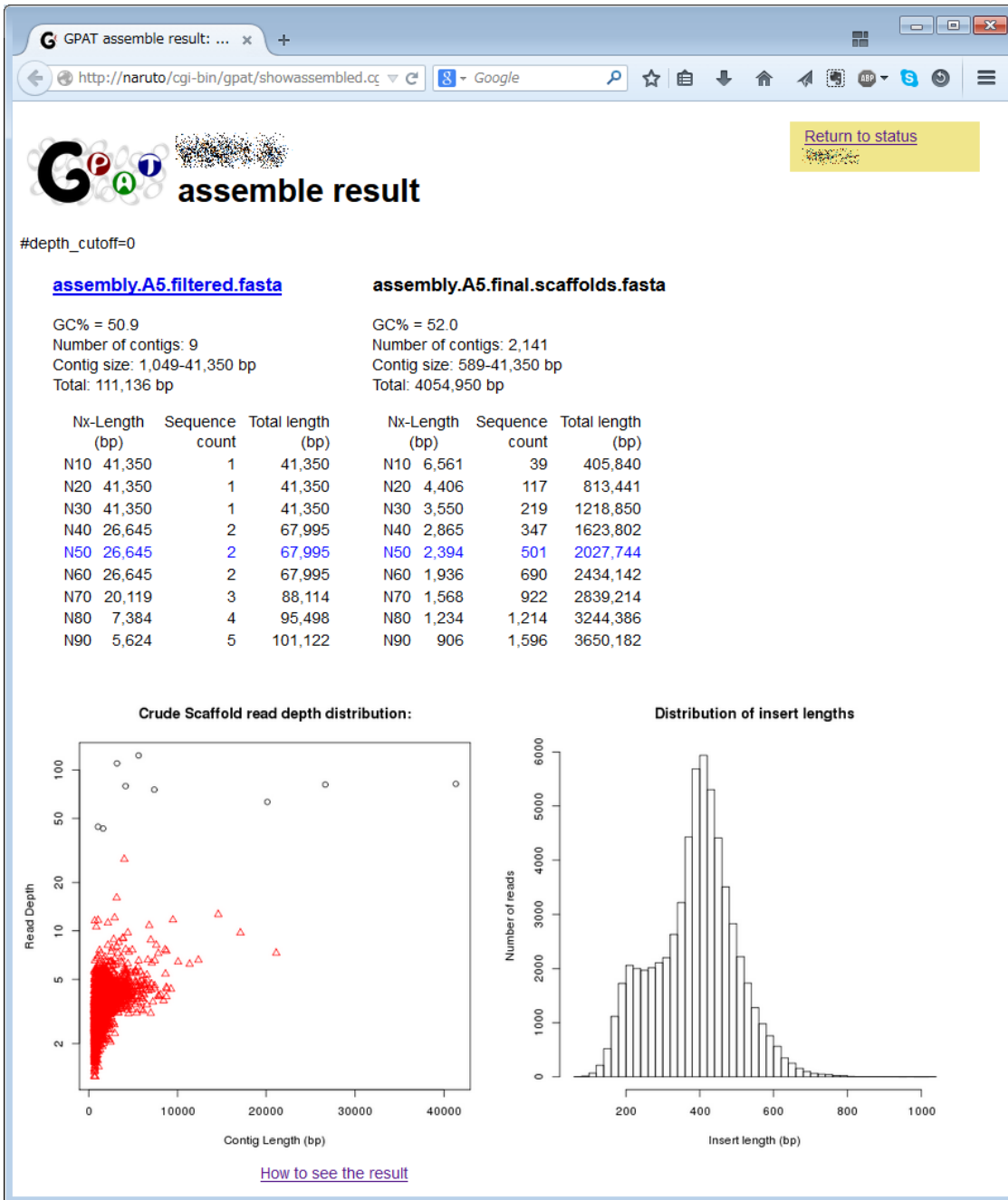
ORF finding mode:	single
Target sequence type:	proteidal

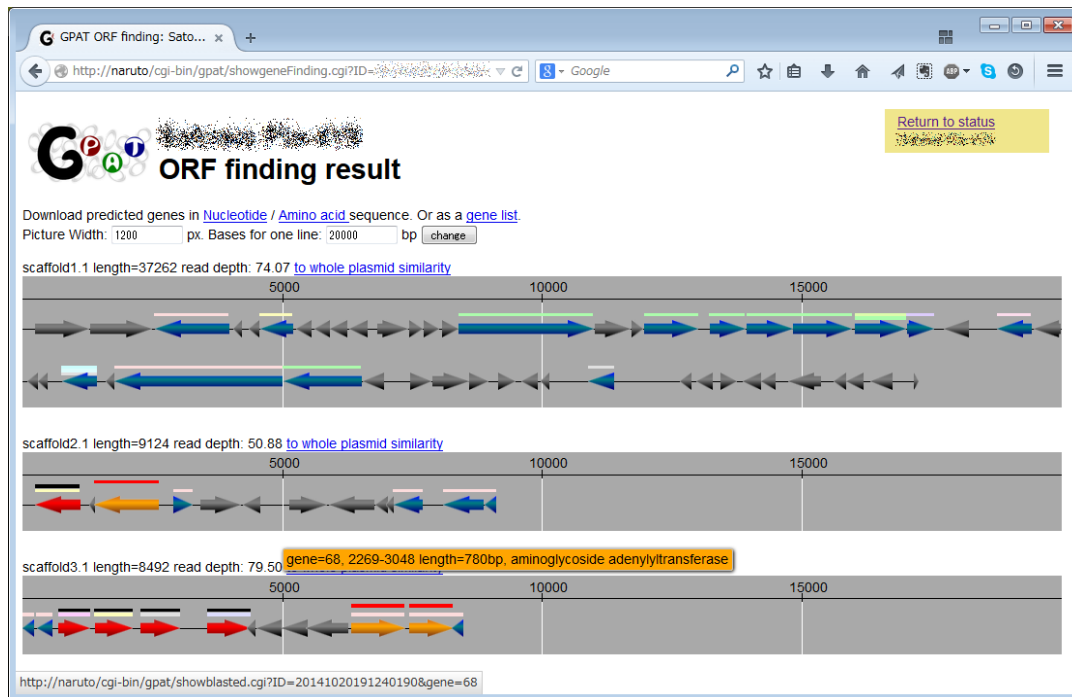
BLAST search settings

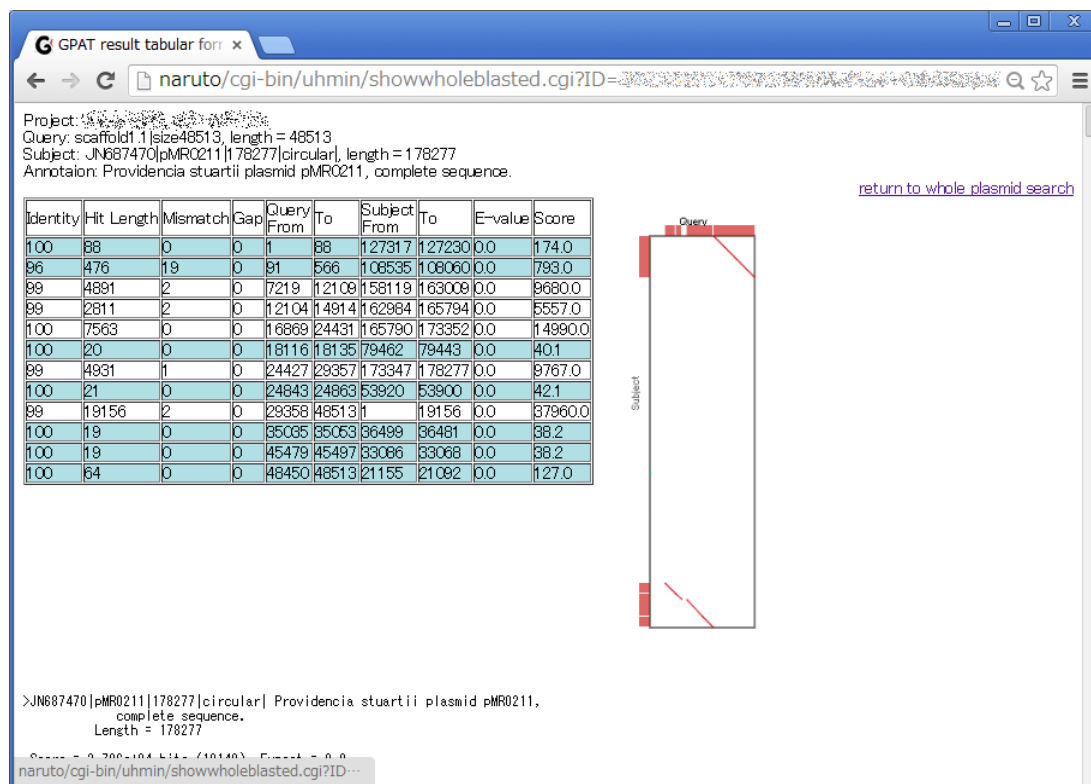
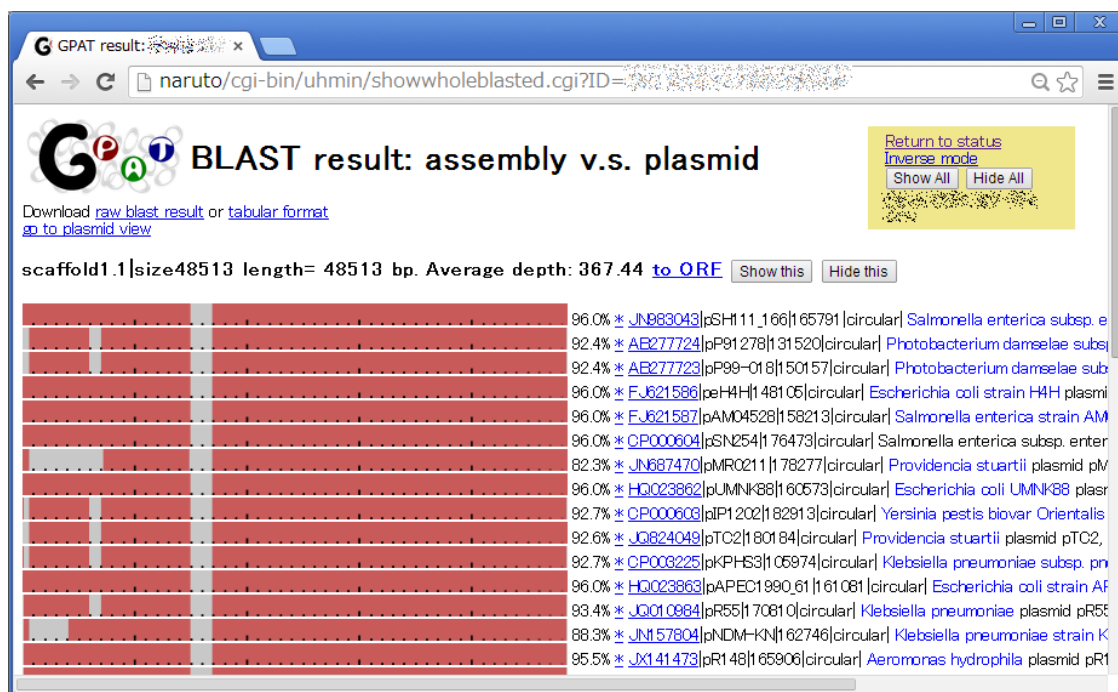
Gapped search:	ON
Filter:	OFF
E-value:	1e-10

Collection: Year: Month: Date: Organism: Escherichia coli Host: ...
Place: ... Project Name: ...
Note: ... plasmid size: 110kb, Drug resistance
Your files: ..._L001_R1_001.fastq.gz
..._L001_R2_001.fastq.gz
[Show/Hide analysis log](#)

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







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 24-26 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
研究協力者	山根一和	川崎医科大学	公衆衛生学

研究要旨

この研究では厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業(JANIS 事業)のデータベースを利用して、国内におけるリステリア感染症の罹患率の推定、及びサルモネラの薬剤耐性の実態について解析を行った。さらに、人と家畜由来の細菌の薬剤耐性を体系的に比較できるようにするため、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と JANIS 事業のデータとを比較可能な形式でデータベース化し集計を行った。日本におけるリステリアの罹患率は 1.06～1.57/100 万人で、4 年間の平均年間罹患率は 1.40/100 万人と算出された。罹患患者数の年齢分布は、65 歳以上の高齢者が 236 人（77.6%）とその多くを占めていた。サルモネラに関しては、家畜や食肉から分離される株は第三世代セファロスポリン耐性が多いと報告されているが、人分離株で薬剤耐性で目立ったものとしてアンピシリンに対して耐性を示すものが約 7%程度あった。フォスホマイシンに対する耐性は約 1%から 2%程度だった。セフトキシム、セフトチジム等の第三世代セファロスポリンに対する耐性株は 1%未満と、家畜の分離菌の状況と乖離があることが分かった。人と家畜由来の薬剤耐性菌の状況をさらに JVARM と JANIS のデータから比較した。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。JANIS データでは近年大腸菌のセファロスポリン、フルオロキノロンの耐性化が著しく増加しているが JVARM データではそのような傾向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。今後は JANIS と JVARM で、測定する薬剤を共通化して、より適切な比較データを出して行く予定である。

A．研究目的

リステリア症は免疫力の低下している患者や高齢者、新生児で髄膜炎、敗血症などの重症感染症となることが多く、食品を介した *Listeria monocytogenes* 感染が原因となる。日本における近年の罹患率は明らかでない。また、サルモネラについては、家畜や食肉で分離される菌株で第三世代セファロスポリンを始めとして様々な薬剤に対して耐性を示す菌株が多く分離されている。人のサルモネラ感染症における薬剤耐性の実態については明らかでない

ので、これらについて、厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)検査部門のデータを用いて調査を行うこととした。また、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、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することとした。

B．研究方法

リステリアの罹患率に関する解析には、2008～2011年にJANIS検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。本邦の全医療機関の病床数の算出には、厚生労働省医療施設調査の結果(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/79-1.html>)を用いた。罹患患者の定義は、血液または髄液から *L. monocytogenes* が分離された患者とし、各年で症例定義に合致する患者データを抽出し、分離された医療機関の病床規模別に、患者数を集計した。JANIS検査部門参加医療機関の病床規模群別罹患患者数を算出した割合で除した値を、国内の各病床規模群別推定罹患患者数とし、その合計を本邦における推定罹患患者数とした。

サルモネラに関しては、2001年から2011年にJANIS検査部門参加医療機関から提出されたデータを用いた。菌種は、医療機関の自動検査機器で一般的に同定される *Salmonella arizonae*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella paratyphi* A、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*、に加え、*Salmonella* spp.として報告されるものを対象とした。抗菌薬は、OTC、NA、CEZ、KM、ABPC、STFX、CPFX、LVFX、MEPM、CTX、CTRX、CPDX-PR、AZT、CAZ、CMZ、ABPC+MCIPC、ABPC+MDIPC、PIPC、IPM/CS、AMK、FOMのデータを収集した。

JANISとJVARMとの連携については、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、JANIS-JVARM連携用データベースに格納して、JVARMとJANISにおける薬剤耐性率の年次推移を比較した。JANISとJVARM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。

倫理面への配慮

JANIS検査部門データは統計法32条に基づく申請を厚生労働省に行い、承認を受けた上で利用した。

C．結果

リステリアに関しては、4年間の罹患患者

合計は307例、病床規模に応じた補正を行い算出された罹患率は1.06～1.57/100万人で、4年間の平均年間罹患率は1.40/100万人であった。2011年では、国内の患者数は200.9名と推定された。サルモネラでは、アンピシリンに対して耐性を示すものが約7%程度あった。フォスフォマイシンに対する耐性は約1%から2%程度だった。セフトキシム、セフトチジム等の第三世代セファロスポリンに対する耐性株は1%未満だった。これらは経年的に耐性率は変化していなかった。レボフロキサシンに耐性を示す株は、2010年までは1%未満だったが、2011年は2.0%だった。

JVARMから、肉用牛、豚、肉用鶏、採卵鶏由来大腸菌、計6798株のデータをJANIS-JVARM連携用データベースに格納した。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。これらの株の薬剤感受性パターンをJANISと比較した。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ている。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。セファゾリンとセフトチオフル/セフトキシムについては、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チオフル耐性とセフトキシム耐性も、同様の傾向を示しているが、2009年まではセフトチオフル、2010年以降はセフトキ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。

フルオロキノロン耐性率については、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、JVARM データではいずれの畜種においても過去 10 年間に於いてこのような耐性率の増加傾向は認めていない。

クロラムフェニコールは、ヒト臨床では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。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。JVARM 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。

テトラサイクリン/ミノサイクリンについては、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

日本におけるリステリア症は、その症例の 3/4 以上が高齢者であり、かつその罹患率は年間 1.00 ~ 1.60/100 万人程度であると推定された。

サルモネラは、家畜や食肉から分離される株は第三世代セファロスポリン耐性が多いと報告されているが、患者からの分離株では 1%未満と、状況が大きく異なった。少なくとも家畜で分離される耐性菌の状況は、そのまま人で分離される耐性菌の状況と関連するものではないことが明らかになった。

さらに JANIS と JVARM の連携で詳細に解析した結果、人と家畜由来の菌株の耐性率は乖離があることが明らかになった。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、 β -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 β -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、鶏ブ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 β -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

JANIS と JVARM の連携用データベースを構築し、人と家畜由来の細菌の薬剤耐性を比較するシステムを構築した。過去 10 年間のみの比較では、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が、今後もシステムの改良を続けながら薬剤耐性の状況について監視を続ける必要がある。

F . 健康危害情報

なし

G . 研究発表

厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた本邦におけるリステリア症罹患率の推定. 山根 一和、鈴木里和 柴山恵吾 病原体微生物検出情報

(IASR) 33(9):247-8, 2012.

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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）
平成 24-26 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）について国内に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。2011 年度と 2012 年度に収集した国内産食肉 271 検体（鶏肉 180、豚肉 91）、輸入食肉 358 検体（鶏肉 157、豚肉 201）の合計 629 検体を調査した結果、ESBL 生産菌は 57 検体陽性（9.1%）、AmpC 生産菌は 39 検体陽性（6.2%）であった。ESBL 生産菌は鶏肉から高頻度で検出され（国内産 20.0%、ブラジル産 21.5%）、AmpC 生産菌の検出率は国内産（9.2%）、輸入食肉（3.9%）であった。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では、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%）、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。各耐性株の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。食肉由来株の各遺伝子型の分離頻度は臨床分離 ESBL 生産株とは異なっていた。また AmpC 生産菌は CIT 型が主であった。これら食肉由来の多剤耐性腸内細菌科菌種としては大腸菌が最も多く検出された。一方、VRE については、2012 年度収集検体のうち、ブラジル産鶏肉 2 検体とデンマーク産鶏肉 2 検体から VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出され、分離頻度はそれぞれ 2.6%、67%であった。また 2013 年度収集検体では、ブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE (*E. faecium*) を検出した（分離頻度 1.3%）。さらに新規 VanN 型 VRE を産地が異なる国内産（宮崎、群馬）鶏肉 2 検体から検出した。PFGE 解析と MLST 解析の結果、これら VanN 型 VRE 株は宿主遺伝子型が互いに同一であった。また 2008 年度と 2010 年度の調査において国内産（宮崎）鶏肉から分離された VanN 型 VRE 株とも宿主遺伝子型が類似することから、これらは全て同一の起源を持つと考えられた。

A. 研究目的（ボンチ絵）

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：国内産食肉は群馬県、宮崎県、鹿児島県の 3 ヶ所で採取、収集した。国外産輸入食肉は各年度に国内検疫所で取り扱う輸入食肉（鶏肉および豚肉）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。2011 年度、2012 年度は鶏肉及び豚肉検体を収集し解析を行ったが、2013 年度は鶏肉検体のみを収集し解析に用いた（表 1、表 2）。尚、検体収集を依頼した協力施設の都合により検体の収集（採取）が各年度の終わり（毎年 2 月）であった。そのため送付された検体の処理、解析が次年度にまたがることとなり、本調査での最終的な結果報告は前年度検体収集分となっている。今回の平成 24-26 年度の報告では、平成 23～25 年度（2011～2013 年度）調査として、実際には 2012 年～2014 年の各 2 月に採取、収集された検体の解析結果を示す。そのため本文と図表中の各年は記載のない限り、各年度を表す。

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(図1)

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。食肉検体からの耐性菌の検出率の改善を目指し、2011年度、2012年度と2013年度とでは検出方法の最初のステップ(検体の前培養と選択培地の種類)を改変(改良)した。2011年度、および2012年度では、それぞれの検体をLB液体培地3mlで一夜培養し(前培養)0.1mlをDHL寒天培地(ABPC 20 mg/L)に塗布した。一方、2013年度では検体をABPC添加(80mg/L)LB液体培地3mlで一夜培養し(前培養)二種類の異なった抗菌薬(CAZ 1mg/LまたはCTX 1mg/L)を添加したDHL寒天培地にそれぞれ培養液を0.1ml塗布した。各選択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二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。本研究での検出方法のサマリーを図1に示す。

2) VREの検出(図8)

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シーケンス解析(Big Dye primer法) PFGE解析、MLST解析を行った。本研究での検出方法のサマリーを図8に示す。

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

本研究では、2011年度と2012年度収集の検体と2013年度収集の検体では、食肉の種類および検出方

法(上記の初期ステップ)が異なっているために、調査(検出)結果を以下別々に示す(各図表)。

1) 今回のESBL生産菌およびAmpC生産菌の調査・検出のために収集し、解析に用いた検体の内訳を表1(国内産食肉)および表2(輸入食肉)に示す。2011年、2012年度の二年間に収集(それぞれ2012年2月、2013年2月に採取)した国内産食肉は271検体(鶏肉180、豚肉91)、輸入食肉は358検体(鶏肉157、豚肉201)で合計629検体であった。また2013年度に収集(2014年2月に採取)した国内産鶏肉は100検体、輸入鶏肉は89検体で合計189検体であった。輸入量の関係から、主な国外産鶏肉はブラジル産であり(8~9割)、国外産豚肉検体は米国産、デンマーク産、カナダ産が多くこれら3カ国で約8割を占めた。

2011年度、2012年度の食肉検体全体での検出頻度はESBL生産菌57検体陽性(9.1%)、AmpC生産菌39検体陽性(6.2%)であった。国内産食肉と輸入食肉との比較ではどちらの耐性菌も国内食肉からの検出率の方が高かった(図2)。ESBL生産菌は鶏肉から高頻度で検出され(国内産20.0%、ブラジル産21.5%)、AmpC生産菌の検出率は国内産で9.2%、輸入食肉で3.9%だった。一方、2013年度収集の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。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%)(図2)。

耐性遺伝子型の解析から2011年、2012年はESBL生産菌としてCTX-M型が多く(図3)、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(図4)。2013年のESBL生産菌の由来検体種類の割合、検出方法は異なっていたが、各耐性遺伝子型の頻度の傾向は同様であった(図4)。これら食肉由来株の各耐性遺伝子型の分離割合は同時期(2012年)の国内での臨床分離ESBL生産株の遺伝子型とは異なっていた(図5)。

AmpC生産菌は国内外の食肉から2011年、2012年は5%、2013年は25%の頻度で検出され(図2)、鶏肉由来株は主にCIT型耐性遺伝子であった(図6)。一方、国外産食肉(鶏、豚)検体からは他にACC型、DHA型、EBC型など多様な型が検出された(図6)。

本調査で検出された多剤耐性腸内細菌科菌種としては2011年、2012年は*Escherichia. coli*が最多であり、次いで*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*が多く分離された(図7)。2013年は*Escherichia. coli*が最多(93%)であり、次いで*Ptoteus mirabilis*(2%), *Enterobacter cloacae*(2%)が多く分離された(図7)。

2) 2012年度及び2013年度収集した食肉検体のVREの検出結果をそれぞれ、表3、表4に示す。

2012年はブラジル産鶏肉2検体、デンマーク産鶏肉2検体からそれぞれVanA型VRE株を検出した。それぞれの検出率は3%、67%であった。またこれらVanA型VREの菌種は全て*E. faecium*であった。国

内産食肉からは高度耐性を示す VRE 株は検出されなかった。

2013 年はブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型 VRE 株が分離され（検出率 1.3%）、菌種は *E. faecium* 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 4）。これらの 2 検体はそれぞれ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 3 月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（*E. faecium* GU121-1 株）である（図 9）。我々は過去の VRE 調査において、2009 年 3 月に収集解析した食肉 8 検体から VanN 型 VRE（*E. faecium*）合計 19 株を分離した（型別不明 VRE として以前保存していた株のレトロスペクティブな解析により新たに判明した）。それら 8 検体は全て国内産鶏肉（宮崎県産）であった。19 株の VanN 型 VRE を PFGE 解析した結果、これらは 6 検体 14 株と 2 検体 5 株の全く異なる 2 つのパターンに分かれた（図 10）。6 検体 14 株の VRE は 2011 年に分離し報告した VanN 型 VRE 株（*E. faecium* GU121-1）と同一の PFGE パターンを示したことから由来が同じクローンと考えられた。他の異なるパターンを示す 2 検体 5 株のうち代表株（*E. faecium* AA-22）を 1 つ選び、宿主染色体遺伝子の MLST 解析を行った。その結果、この株は 2011 年分離の GU121-1 株の ST669 とは全く異なる新規の ST 型（ST862）であった。この新規 ST862 は ST240 と *atpA* 遺伝子配列が 1 塩基異なるのみの *E. faecium* 株でこれらは極めて近縁の遺伝子型を持つことが明らかとなった（表 5）。この ST240 は世界で初めて分離された VanN 型 VRE（*E. faecium* UCN71）株である（図 9、表 5）。ST240 と ST862 は ST669 同様、ヒトや家畜において拡がっている主なクローン株とは異なる別の遺伝子型 *E. faecium* 株であった（図 12）。

今回の調査で 2013 年度に国産鶏肉 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 11）。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 5）。

D. 考察

2011 年、2012 年の調査では食肉検体から ESBL 生産、および AmpC 生産各種腸内細菌科菌を検出した。しかし、検出頻度は他の報告とは異なり（時には 80% 以上の検出率）、それぞれ全体で 10% 程度と高くなかった。その原因としていくつかの理由が考えられた。他の報告の多くは食肉小売店から購入し収集した検体を用いた調査であった。そのため小売店での食肉加工中に環境菌や他の汚染された食肉の耐性菌が処理器具（まな板や包丁）を介し、本来は汚染されていない食肉に付着したために、著しく高い陽性率となった可能性は否定できない。今回私達が

収集した検体は小売店に流通する以前の段階の食肉であった。それらの違いによって見かけ上、検出頻度に大きな差を認めた可能性が考えられた。一方で食肉検体からの検出方法の感度が低かった可能性も考えられた。食肉検体に目的以外の他の菌の付着が多い場合、あるいは検出菌の付着が極めて少ない場合、増菌処理後であっても目的とする菌が検出限界以下になることが考えられる。また食肉収集の過程で凍結溶解が繰り返されるため、また検体収集から検査までの時間経過中に付着菌の大部分が死滅減少してしまったことも予想される。2013 年度には検出率の改善を目指し、検出方法を改変した。最初に検体を ABPC 添加液体培地によって前培養を行い、その培養液を低濃度の CAZ あるいは CTX 添加寒天平板培地へ塗布する操作とした。この改良によって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。本調査研究では、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。検出方法を変更した 2013 年度の某国内施設からの検体では ESBL 生産菌の検出率は 100%（30 検体中 30 検体陽性）であったのに対し、別の施設からは 0%（30 検体全てが陰性）であった。その施設から送付された検体試料のほとんどが乾燥に近い状態であることなど検体の採取方法や送付方法などに手技的な問題もあることが示された。今後、より正確な調査のために各施設での検体採取方法の改善指導が必要であろう。

食肉由来株とヒト由来株（臨床分離株）とでは ESBL 生産株の CTX 型遺伝子の種類とその頻度が異なっていた。これらの結果は一見、家畜環境の耐性菌と臨床の耐性菌とは直接的な関連性が低いことを示している。一方、検出された ESBL 遺伝子型、AmpC 遺伝子型の多くがプラスミド性であるとされることから、伝達性プラスミドを介した腸内細菌科細菌間での耐性遺伝子の伝達による耐性菌の伝播、拡散が生じていることを否定はできない。特に CTX-M1 型耐性遺伝子は食肉由来株でも臨床分離株においても 20%～30% の頻度で分離されている。今後は、これらの共通する特定の耐性遺伝子に着目した、宿主遺伝子型の比較解析、さらには耐性プラスミドの詳細な解析を進める必要がある。

食肉由来の VRE の調査では、2012 年、2013 年と輸入食肉（鶏肉）から VanA 型 VRE（*E. faecium*）が検出された。特にブラジル産鶏肉から頻度は低いものの継続的に VanA 型 VRE が検出されている。また 2012 年には検体数が少ないものの、デンマーク産鶏肉から高頻度（3 検体中 2 検体）で VanA 型 VRE（*E. faecium*）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。ヨーロッパ、特にデンマークでは家畜へのグリコペプチド系抗菌薬使用による環境中での VRE の増加とその人への伝播・拡散の危険性が論議され、早くから使用禁止となり、その後も厳格に規制が行われてい

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、本調査の結果は、一度環境中(家畜腸管内)で増加した VRE は、抗菌薬の選択圧の非存在下であっても、比較的長年に環境中に存続することが推測される。一方、VRE の多くは多剤耐性菌であるためにグリコペプチド系以外の他の家畜用抗菌薬、あるいは飼料添加物としての抗菌物質が現在でも選択圧として働いている可能性が考えられる。今後これら動物用抗菌薬や抗菌飼料添加物と VRE の薬剤耐性との関係を考慮した調査、研究が必要であろう。

VanN 型 VRE(*E. faecium*)はフランスで患者血液から 2008 年に初めて分離され、2011 年に論文報告された新規の VRE である(図 9、表 5)。2013 年度の本調査において、日本の環境中(複数の食肉検体)から互いに類似の遺伝子背景を持つ VanN 型 VRE 株を複数分離した。また過去に収集した食肉検体から得られた耐性株のレトロスペクティブな解析の結果、この VanN 型 VRE は 2008 年度に収集された食肉検体に既に存在していた。さらにその一部の株において宿主菌の遺伝子型がフランスの臨床分離株と極めて類似し、遺伝的な関連性を認めた(表 5)。これらの結果は、新規 VanN 型 VRE は既に日本国内の家畜環境中(養鶏)に拡散していることを示唆しており、同時に VRE において環境からヒト、あるいはヒトから環境への伝播・拡散の可能性を強く示すものと考えられた。VanN 型耐性遺伝子は伝達性プラスミド上に存在することが我々の解析から明らかとなっている。今後、国内で分離された複数の VanN 型 VRE 株におけるバンコマイシン耐性伝達性プラスミドの比較解析によって関連性が明らかになることが期待される。また国内の養鶏用ひな鳥の一部はフランスから輸入されている。日本の鶏肉から分離された VanN 型 VRE はフランスから輸入ヒナ鳥を介し伝播してきた可能性も強く疑われる。今後、フランスで臨床分離された VanN 型 VRE と国内の VanN 型 VRE の比較解析、さらにはフランスから輸入されるヒナ鳥の VRE の保菌状況の調査、研究が望まれる。また国内での養鶏環境における VanN 型 VRE の拡散、汚染状況を正確に把握する必要がある。

一方、他の Van 型 VRE 同様、環境中で増加しつつある新規 VanN 型 VRE が国内のヒト環境中へ伝播、拡散する(既にしている)ことが十分に予想される。今後、ヒト環境、臨床(病院)での VanN 型 VRE 株の分離、感染症の発生が危惧される。

E. 結論

国内外の食肉(豚、鶏)から ESBL 生産および AmpC 生産腸内細菌科菌を検出した。食肉由来の ESBL 生産・AmpC 生産腸内細菌科菌は主に大腸菌であった。

VRE の調査ではブラジル産輸入鶏肉およびデンマーク産鶏肉から VanA 型 VRE(*E. faecium*)株が検出された。一方、異なる産地の国内産鶏肉検体から複数の VanN 型 VRE(*E. faecium*)株が検出された。その多くが同じ宿主遺伝子型であったことから、同一起源

の VanN 型 VRE 株による国内の家畜環境中(養鶏)での伝播・拡散が示唆された。一部の株はフランスの VanN 型臨床分離株と類似の遺伝型であり、臨床株と環境株との関連性が強く疑われた。今後、国内のヒト環境への新規 VanN 型 VRE の伝播・拡散、および感染に注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura T, Tanimoto K, Shibayama K, Arakawa Y, Fujimoto S, Ike Y, Tomita H. Identification of VanN-type vancomycin resistance in an *Enterococcus faecium* isolate from chicken meat in Japan. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 56:6389-6392. (2012).
- 2) Kurushima J, Hayashi I, Sugai M, Tomita H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. *Journal of Biological Chemistry*. 288:36915-36925. (2013).
- 3) 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).
- 4) Kurushima J, Nakane D, Nishizaka T, Tomita H. Bacteriocin protein BacL₁ of *Enterococcus faecalis* targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala²-crossbridged peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*. 197:286-295. (2015).

2. 学会発表

- 1) 野村隆浩、柴山恵吾、荒川宜親、池康嘉、富田治芳 . VanN 型バンコマイシン耐性腸球菌の解析 . 第 86 回日本細菌学会総会 . 2013 年 3 月 20 日 千葉 .
- 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 42 回薬剤耐性菌研究会 . 2013 年 10 月 17 日 静岡 .
- 3) 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.
- 4) 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 .
- 5) 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24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
Shizunobu Igimi, Akiko Ishiwa, Shuko Monden, Yumiko Okada, Hiroshi Asakura, Yoshika Momose, Tetsuo Asai, Akemi Kai, Keiko Yokoyama, Masumi Taguchi, Yoshikazu Ishii, Makoto Kuroda, Haruo Watanabe.	Antimicrobial susceptibility profiles and PFGE typing of <i>Campylobacter jejuni</i> and their implications to public health in Japan.	11th International symposium on toxic microorganisms, "Risk Control and Food Safety", UJNR.	March. 2012.	Tokyo
Francis Shahada, Gakudoh Kosugi, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, Takehisa Chuma, Masato Akiba.	Distribution of extended- spectrum cephalosporin resistance determinants of <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> and <i>Escherichia coli</i> isolated from broilers in southern Japan.	3 rd ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens in Animals, Humans, and the Environment.	June 26, 2012	Aix-en- Provence, France
Francis Shahada 中馬猛久、 小杉岳童、 楠本正博、 岩田剛敏、 秋庭正人	ブロイラーから分離されたサルモネラと大腸菌における広域セファロスポリン耐性因子の分布 .	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月	岩手大
田口真澄、 勢戸和子、 河原隆二、 原田哲也、 久米田裕子	鶏肉のESBL	衛生微生物技術協議 会第33回研究会	2012年6月	神奈川

田口真澄	大阪府におけるカンピロバクター食中毒の動向および鶏肉からのカンピロバクター検出状況	第5回日本カンピロバクター研究会	2012年11月	大阪
臼井 優、 岩佐 友寛、 佐藤 豊孝、 大久保 寅彦 田村 豊	薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割	第79回日本細菌学会 北海道支部総会	2012年8月29日	北海道
佐藤豊孝、 横田伸一、 大久保寅彦、 臼井 優、 藤井暢弘、 田村 豊	犬由来大腸菌におけるフルオロキノロン耐性およびセファロスポリン耐性の関連	第79回日本細菌学会 北海道支部総会	2012年8月29日	北海道
大久保寅彦、 佐藤豊孝、 中村昇太、 飯田哲也、 臼井優、 能田淳、 萩原克郎、 田村豊	南極の氷中に含まれていた細菌叢の解析	第79回日本細菌学会 北海道支部総会	2012年8月29日	北海道
臼井 優、 岩佐 友寛、 佐藤 豊孝、 大久保 寅彦 田村 豊	薬剤耐性大腸菌の畜舎内伝播におけるハエの役割	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
佐藤豊孝、 横田伸一、 大久保寅彦、 臼井 優、 藤井暢弘、 田村 豊	犬由来大腸菌におけるフルオロキノロン耐性およびセファロスポリン耐性の関連	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
小川 紋 佐藤豊孝 大久保寅彦 臼井 優 田村 豊	市販鶏肉由来薬剤耐性サルモネラ属菌における耐性遺伝子の解析	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手

吉沢創太、 大久保寅彦、 佐藤豊孝、 臼井 優、 田中和之、 石塚真由美、 田村 豊	イエネズミ糞便由来大腸菌の 薬剤耐性調査	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
一色 ゆかり 石原 加奈子 臼井 優、 田村 豊	レバー由来及び糞便由来カン ピロバクターの薬剤耐性と遺 伝子型の解析	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
小泉明穂、 石原加奈子、 臼井 優、 菊池直哉、 田村 豊	犬由来メチシリン耐性 Staphylococcus pseudintermedius の分子疫学 解析	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
比企 基高、 浅井鉄夫、 川西路子、 臼井優	健康ブロイラー由来大腸菌に おける系統群別病原遺伝子の 保有状況及び薬剤感受性	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
浅井 鉄夫、 馬場 光太郎、 比企 基高、 臼井 優、 石原 加奈子、 田村 豊	国内の豚から分離された黄色 ブドウ球菌の分子疫学的解析	第154回日本獣医学会 学術集会	2012年9月15日	岩手
下島優香子、 高野智香、 猪股光司、 井田美樹、 西野由香里、 黒田寿美代、 石塚理恵、 横山敬子、 高橋正樹、 仲真晶子、 甲斐明美	牛レバー等内臓肉からのカン ピロバクターおよび腸管出血 性大腸菌検出状況	第 5 回日本カンピロ バクター研究会	2012年11月	大阪

研究発表(平成25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
田口真澄、 河原隆二、 勢戸和子	市販鶏肉にはAmpC型 - lactamase産生大腸菌とESBL産 生大腸菌が同率に存在する、	第87回日本細菌学会 総会	2014年3月	東京
勢戸和子、 神吉政史、 原田哲也、 田口真澄	大阪府で分離された0157以外 の志賀毒素産生性大腸菌（ non-0157 STEC）の特徴- ヒト 由来株と食品由来株の比較、	第17回腸管出血性大 腸菌出血性大腸菌感 染症研究会	2013年7月	つくば
臼井 優	細菌のフルオロキノロン耐性 機構	第155回日本獣医学会	2013年3月29日	東京
臼井優、 南部雪江、 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> とヒト 臨床由来株との比較、	第80回日本細菌学会 北海道支部会	2013年8月30日	北海道
間瀬香織、 臼井優、 大久保寅彦、 岩野英知、 田村豊	犬の膿皮症治療のための <i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i> 特異ファ－ ージの分離と抗菌薬によるファ－ ージ溶菌活性の増強	第64回北海道獣医師 大会	2013年9月6日	北海道
大久保寅彦、 小野匡、 佐藤豊孝、 臼井優、 田村豊	動物病院来院猫からのセファ ロスポリン耐性およびフルオ ロキノロン耐性大腸菌の検出 、	第64回北海道獣医師 大会	2013年9月6日	北海道
南部雪江、 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> とヒト 臨床由来株との比較	第156回日本獣医学会	2013年9月21日	岐阜

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156回日本獣医学会	2013年9月21日	岐阜
野村隆浩、 柴山恵吾、 荒川宜親、 池康嘉、 富田治芳	VanN型バンコマイシン耐性腸 球菌の解析 .	第86回日本細菌学会 総会	2013年3月20日	千葉
菅貴則、 谷本弘二、 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42回薬剤耐性菌研 究会	2013年10月17日	静岡

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</i> <i>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りボタ 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

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
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
工藤逸美、 臼井優、 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、 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
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 <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
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 子伝播におけるハエの役割	環境微生物系合同大 会2014	2014年10月23日	浜松
大久保寅彦、 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

臼井優、 中島千絵、 舘野翔、 田勢準也、 小野崎正修、 大曽根司郎、 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、 臼井優、 鈴木晴香、 小野崎正修、 大曽根司郎、 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24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
Asakura H, Brueggemann H, Sheppard S.K, Ekawa T, Meye T. Fr, Yamamoto S, Igimi S.	Molecular evidence for the thriving of <i>Campylobacter jejuni</i> ST-4526 in Japan.	PLoS One	7(11)	e48394	2012
五十君静信、 朝倉宏、 岡田由美子、 百瀬愛佳	カンピロバクター食中毒制御を目指す基礎研究	日本臨床	70(8)	1298-1303	2012
Asai, T., Hiki, M., Baba, K., Usui, M., Ishihara, K., Tamura, Y.	Presence of <i>Staphylococcus aureus</i> ST398 and ST9 in swine in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	65	551-552	2012
Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T.	Diversity of plasmid replicons encoding the <i>bla</i> CMY-2 gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant <i>Escherichia coli</i> from livestock animals in Japan.	Foodborne Pathog Dis.		(in press)	
Masumi Taguchi, Ryuji Kawahara, Kazuko Seto, Tetsuya Harada, Yuko Kumeda	Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing <i>Salmonella enterica</i> Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011.	Japanese Journal of Infectious Diseases	65	555-557	2012

Baba K, Ishihara K, Ozawa M, Usui M, Hiki M, Tamura Y, Asai T	Prevalence and Mechanism of Antimicrobial Resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> isolates from Diseased Cattle, Swine and Chickens in Japan.	J. Vet. Med. Sci.	74(5)	561-565	2012
Sasaki Y, Usui M, Murakami M, Haruna M, Kojima A, Asai T, Yamada Y.	Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> O157 and O26 isolates from beef cattle.	Jpn. J. Infect. Dis.	65(2)	117-121	2012
Usui M, Hiki M, Murakami K, Ozawa M, Nagai H, Asai T.	Evaluation of transferability of R-plasmid in bacteriocin-producing donors to bacteriocin-resistant recipients.	Jpn. J. Infect. Dis.	65(3)	252-255	2012
Asai T, Hiki M, Baba K, Usui M, Ishihara K, Tamura Y.	Presence of <i>Staphylococcus aureus</i> ST398 and ST9 in swine in Japan	Jpn. J. Infect. Dis.	65(6)	551-552	2012
Yokota S, Sato T, Okubo T, Ohkoshi Y, Okabayashi T, Kuwahara O, Tamura Y, Fujii N.	Prevalence of fluoroquinolone-resistant <i>Escherichia coli</i> O25:H4-ST131 (CTX-M-15-nonproducing) strains isolated in Japan.	Chemotherapy	58(1)	52-59	2012

Kurosawa A, Imamura T, Tanaka K, Tamamura Y, Uchida I, Kobayashi A, Hata E, Kanno T, Akiba M, Yukawa S, Tamura Y.	Molecular typing of <i>Salmonella enterica</i> serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis.	Vet. Microbiol	160(1-2)	264-268	2012
Sato T, Yokota SI, Okubo T, Ishihara K, Ueno H, Muramatsu Y, Fujii N, Tamura Y.	Contribution of the AcrAB-TolC Efflux Pump to High-Level Fluoroquinolone Resistance in <i>Escherichia coli</i> Isolated from Dogs and Humans.	J. Vet. Med. Sci.		(in press)	
Sato T, Yokota S, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura T	Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance of D-O1-ST648 <i>Escherichia coli</i> carrying blaCMY-2 from fecal samples of dogs in Japan.	J Med Microbiol		(in press)	
Ishihara K and <u>Tamura Y</u> et al	Factor associated with antimicrobial-resistant <i>Escherichia coli</i> in zoo animal	Res Vet Sci	93	574-580	2012
Iwamoto T, <u>Tamura Y</u> , Szuki Y and Nasu M et al	Genetic diversity of <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strains isolated from humans, pigs, and human living environment.	Infect Genet Evol	12	846-852	2012

M. Sugawara, F. Shahada, <u>H. Izumiya,</u> <u>H. Watanabe,</u> I. Uchida, Y. Tamamura, M. Kusumoto, T. Iwata <u>M. Akiba</u>	Change in antimicrobial resistance pattern in <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isolates in a beef cattle farm.	J. Vet. Med. Sci.	74 (1)	93-97	2012
G. Chowdhury, G.P.Pazhani, D. Dutta, S. Guin, S. Dutta, S. Ghosh,_ <u>H. Izumiya,</u> M. Asakura, S. Yamasaki, Y. Takeda, E. Arakawa, H. Watanabe, A.K. Mukhopadhyay, M.K. Bhattacharya, K. Rajendran, G.B. Nair, T. Ramamurthy	<i>Vibrio fluvialis</i> in patients with diarrhea, Kolkata, India.	Emerg Infect Dis.	18	1868-71	2012

Chieko Sakano, <u>Makoto Kuroda</u> , Tsuyoshi Sekizuka, Taisei Ishioka, Yukio Morita, Akihide Ryo, Hiroyuki Tsukagoshi, Yuko Kawai, Nobuko Inoue, Hayato Takada, Yumiko Ogasawara, Atsuyoshi Nishina, Masa-aki Shimoda, Kunihisa Kozawa, Kazunori Oishi, Hirokazu Kimura.	Genetic analysis of non-hydrogen sulfide-producing <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium and Infantis isolates in Japan.	J. Clinical Microbio.		(in press)	
山根 一和、 鈴木里和 柴山恵吾	厚生労働省院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた本邦におけるリステリア症罹患率の推定	病原体微生物検出情報 (IASR)	33(9)	247-8	2012

研究発表(平成25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
Kawanishi M, Ozawa M, Hiki M, Abo H, Kojima A, Asai T	Detection of <i>aac(6')-Ib-cr</i> in avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> isolates in Japan.	J Vet Med Sci.		(in press)	
秋庭正人	地球規模で広がる耐性菌 - 抗菌薬の多角的使用とその功罪 - 6 . 薬剤耐性遺伝子の伝播機構	化学療法の領域	29(6)	1282-1291	2013
渡邊 治雄	WHO等による広範囲な耐性菌サーベイランスの取り組み	化学療法の領域	29(6)	26-31	2013
Nomura T. et al.	Identification of VanN-type vancomycin resistance in an <i>Enterococcus faecium</i> isolate from chicken meat in Japan.	Antimicrob Agents Chemother	56	6389-6392	2012
Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S.	Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i> in chicken: collaborative study.	J AOAC Int.	96(5)	991-997	2013

Asakura H, Hashii N, Uema M, Kawasaki N, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yamamoto S.	<i>Campylobacter jejuni</i> pdxA Affects Flagellum-Mediated Motility to Alter Host Colonization.	PLoS One	8(8)	e70418	2013
Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S.	Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of <i>Campylobacter jejuni</i> ST-4526 and ST-4253 in Japan.	J Appl Microbiol.	114(5)	1529- 1538	2013
Sato T, Yokota S, Uchida I, Okubo T, Usui M, Kusumoto M, Akiba M, Fujii N, Tamura Y.	Fluoroquinolone resistance mechanisms in an <i>Escherichia coli</i> isolate, HUE1, without quinolone resistance- determining region mutations.	Front Microbiol	24 May	doi: 10.3389/ fmicb.	2013
Sato T, Yokota S, Okubo T, Usui M, Fujii N, Tamura Y.	Phylogenetic association of fluoroquinolone- and cephalosporin-resistance 2 of D-O1-ST648 <i>Escherichia coli</i> carrying blaCMY-2 from fecal samples of 3 dogs in Japan	J Med Microbiol		in press	
Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T.	Diversity of plasmid replicons encoding the <i>bla</i> _{CMY-2} gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant <i>Escherichia coli</i> from livestock animals in Japan.	Foodborne Pathog Dis.	10	243-249	2013
Usui M, Nagai H, Hiki M, Tamura Y, Asai T.	Effect of antimicrobial exposure on <i>acrAB</i> expression in <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> .	Front Microbiol.	4	53	2013

Francis Shahada, Takehisa Chuma, Gakudoh Kosugi, Masahiro Kusumoto, Taketoshi Iwata, and Masato Akiba	Distribution of extended- spectrum cephalosporin resistance determinants in <i>Salmonella enterica</i> and <i>Escherichia coli</i> isolated from broilers in southern Japan	Poultry Science	92(6)	1641- 1649	2013
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 <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 in different hosts.	Science.Sep 27	341(61 53)	1514-7	2013
Larsson JT, Torpdahl M; MLVA working group (Izumiya H), Møller Nielsen E.	Proof-of-concept study for successful inter-laboratory comparison of MLVA results.	Euro Surveill.	Aug 29 18(35)	20566	2013

Nadon CA, Trees E, Ng LK, Møller Nielsen E, Reimer A, Maxwell N, Kubota KA, Gerner-Smidt P MLVA Harmonization Working Group (Izumiya H).	Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance.	Euro Surveill.	Aug 29 18(35)	20565	2013
Izumiya H, Terajima J, Yamamoto S, Ohnishi M, Watanabe H, Kai A, Kurazono T, Taguchi M, Asai T, Akiba M, Matsumoto Y, Tamura Y.	Genomic analysis of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium definitive phage type 104.	Emerg Infect Dis.	May 19(5)	823-5	2013
Hoang TH, Wertheim H, Minh NB, Duong TN, Anh DD, Phuong TT, Son TH, Izumiya H, Ohnishi M, Shibayama K, Hien NT.	Carbapenem-resistant <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains containing New Delhi metallo- beta-lactamase isolated from two patients in Vietnam.	J Clin Microbiol.	Jan 51(1)	373-4	2013

Chowdhury G, Pazhani GP, Dutta D, Guin S, Dutta S, Ghosh S, Izumiya H, Asakura M, Yamasaki S, Takeda Y, Arakawa E, Watanabe H, Mukhopadhyay AK, Bhattacharya MK, Rajendran K, Nair GB, Ramamurthy T.	<i>Vibrio fluvialis</i> in patients with diarrhea, Kolkata, India.	Emerg Infect Dis.	Nov 18(11)	1868-71	2012
---	---	-------------------	---------------	---------	------

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> _{TEM-52} -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> _{CMY-2} 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, Miyauchi 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</i> <i>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 ₁ of <i>Enterococcus faecalis</i> targets cell division loci and specifically recognizes L-Ala ² -crossbridged peptidoglycan.	<i>Journal of</i> <i>Bacteriology</i> .	197	286-295	2015