

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
食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
(H30-食品-一般-006)

平成 30 年度～令和 2 年度 総合研究報告書

研究代表者 渡邊 治雄

令和 3 (2021) 年 3 月

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 30 年度～令和 2 年度 総合研究報告書

目次

I. 令和元年度総括研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

研究代表者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 1

II. 平成 30 年度分担研究報告書

1. 地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離される

サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査

研究分担者 四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所 14

2. 家畜、食品由来耐性菌データと JANIS データとの連携；相互比較

研究分担者 菅井 基行 国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター 49

3. 無症状保菌者由来サルモネラの薬剤感受性プロファイル解析に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 69

4. 食品由来サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の耐性分布と遺伝特性に関する研究

研究分担者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管部 79

5. 家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARM と JANIS の連携について

研究分担者 小澤 真名緒 農林水産省動物医薬品検査所 85

6. 食品及びヒト由来カンピロバクター、大腸菌の薬剤耐性菌出現状況の把握

研究分担者 小西 典子 東京都健康安全研究センター 96

7. 食品中の耐性菌汚染、と畜場等における交差汚染の役割解析

研究分担者 浅井 鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 109

8. 食品等から分離される腸内細菌の薬剤耐性調査と遺伝学的伝播様式の解析

研究分担者 富田 治芳 群馬大学大学院医学系研究科 123

9. ヒト・家畜・食品等由来耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子の解析及び伝達過程の関連性の解明

研究分担者 石井 良和 東邦大学医学部微生物・感染症学講座 168

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 174

H30-R2 年度 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

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

代表研究者 渡邊治雄 国立感染症研究所

研究要旨：

3年間の研究により以下の成果を得た。

- 1) 全国23の地方衛生研究所の協力のもと食品由来のサルモネラ、カンピロバクター、大腸菌の耐性菌のモニタリング体制を構築した。
- 2) その結果得られたデータを、「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2018-2020」、および WHO GLASS に提供し、国内、国外に我が国の耐性菌情報を発信できた。
- 3) 食品由来細菌の薬剤耐性データを JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合し、動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチに基づく把握ができるようになった。
- 4) サルモネラ (*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* に関して)、カンピロバクターに関しては、鶏、食品、ヒトから分離される菌の薬剤耐性プロファイルが相互に類似していることから、耐性菌の伝播が鶏—食肉—人の経路を取っていることが強く示唆された。
- 5) 我が国においてセフトオフィムのブロイラーへの飼料添加物としての使用が自主規制されてから、鶏由来大腸菌の CTX 耐性率が激減してきており、それは鶏肉から分離される大腸菌の CTX 耐性率の低下にも反映していた。
- 6) 健康人由来の大腸菌の CTX 耐性率は毎年約 5 % と減ってははいない。鶏肉を汚染している鶏由来の大腸菌がそのままヒトの大腸菌として人の腸管に定着しているわけではないが、食品由来菌の耐性率との関連性を見ていくためにも、今後も健康人の大腸菌の CTX 耐性率の変動を調査していくことは重要である。
- 7) 市販肉の薬剤耐性菌汚染は、家畜の腸内に保有する細菌が食肉処理工程で枝肉に付着することに起因するが、それは菌の遺伝型解析から、同一個体由来の菌による汚染、および異なる個体由来の細菌による交差汚染の両方があること、また一方、食肉処理業施設の環境材料からの菌による食肉への汚染も認められることが分かった。制御には、食肉処理施設全体の衛生管理が重要である。
- 8) コリスチン耐性株は我が国においても家畜、食品、ヒト由来菌から分離されていた。また、健康人の大腸菌からも分離されており、それらは食肉等の摂取を介しての耐性菌・耐性遺伝子の伝播が起こっていると想定される。我が国においては平成 30 年にコリスチンの家畜への飼料添加物としての指定が取り消され、使用が禁止されたが、依然として *mcr* 遺伝子保有株が分離されており、今後の動向に注意が必要である。
- 9) ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に繋げていくためには、地研による食品由来耐性菌のモニターを継続して実施していく恒常的なネットワーク整備が必要である。将来的には JANIS や JVARM のように事業として対応することが望ましい。

分担研究者：

四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所
菅井基行 国立感染症研究所薬剤耐性
研究センター
大西 真 国立感染症研究所細菌第一部

朝倉宏 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部
川西 路子 農林水産省動物医薬品検査所
小澤真名緒 農林水産省動物医薬品検査所
小西典子 東京都健康安全研究センター

	微生物部
浅井鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学 研究科
富田治芳	群馬大学大学院医学系研究科
石井良和	東邦大学医学部微生物・ 感染症学

A. 研究目的：

AMR National Action Plan (NAP) では、ヒト、動物（家畜含）、食品、環境を含めたワンヘルス・アプローチによる薬剤耐性サーベイランス体制の構築が掲げられている。我々は、ヒト由来細菌のサーベイランス JANIS と家畜由来細菌のサーベイランス JVARM の結果を、JANIS 様式のもとで一元的に比較解析できるシステムを構築した。次の段階としては、そこに食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを取り込み、家畜—食品—ヒト間の耐性菌の流れを一元的に把握し、その動向を把握するとともに、家畜・食品由来耐性菌（耐性遺伝子）が人由来の耐性菌にどのように影響を与えているのかの解析することにより、得られた成果を対策に活かすことが求められている。以下の3課題において成果を上げることが大きな目標にする；1) 食品由来細菌の耐性状況を恒常的に把握する体制を構築することである。NAP には研究班として行うことが記載されているが、恒常性を考慮すると食品由来耐性菌のモニタリングの責任部署を決めておくべきであろう。その部署として、現在のところ全国地方衛生研究所のネットワークを利用することが最適であると思われる。今まで、実際に各都道府県の地方衛生研究所に協力を求め、市販されている食品中の汚染菌の同定およびその菌の耐性状況を調査してきた。その体制の良し悪しについての考察を行う。2) 大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター等を中心に、全国地方衛生研究所等の協力のもとで得られる食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを集計、解析して、国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」に提供する。また、WHO のサーベイランス GLASS に定期的に報告する。3) 家畜、食品、ヒトから分離された薬剤耐性菌（大腸菌を対象にする）／耐性遺伝子の解析を行い、それらの伝播様式を解明

する。菌の伝播に関しては家畜、食品、ヒトから分離される菌の Whole genome sequencing (WGS) のデータの比較解析することにより推測する。

B. 研究方法：

- ① 地方衛生研究所（地研）を主とする食品由来菌耐性サーベイランス：サルモネラ、病原大腸菌、カンピロバクターについて、これまでに確立したプロトコールにしたがって、CLSI ディスク拡散法による薬剤感受性検査を実施した（まずそれぞれの菌を薬剤選択無しで分離しその中の耐性菌の割合を調べる）。検査に用いる感受性ディスク等の試薬、ディスクディスペンサーやノギス等の器具は全ての地研で共通のものを用いた。寒天・血液寒天平板上の感受性ディスクの配置は、阻止円が融合しないように配置した。阻止円径を測定し、結果表に記入した。協力地衛研としては、地理的分布も考慮し、全国から23か所を選定した。（四宮、渡邊、小西）
- ② 家畜—食品—人由来耐性菌のデータの比較：上記によって分離された全食品由来菌株の耐性率データを、既に作成している相互変換ソフトを用いて、JANIS（臨床由来株）および JVARM（家畜由来株）とのデータベースと相互比較し、生態系における耐性菌・耐性遺伝子の流れについて考察した。これらの耐性菌データを、我が国のワンヘルス動向調査の年次報告書に提供した。および WHO の Global Action Plan の一環として実施されている GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) にも報告した。（菅井、川西、小澤、四宮、小西）
- ③ 遺伝子レベルの解析：研究班内のサーベイランス間で共通している薬剤や同系統の薬剤の耐性率の比較、および研究班内で得られた耐性菌（人、家畜、食品由来株）の薬剤耐性菌／耐性遺伝子の詳細解析を行い、どのように伝播しているのかを総合的に解析した。遺伝子解析は短鎖型シーケンサーである MiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeq システム

(Illumina 社)、長鎖型シーケンサーである MinION (Oxford Nanopore Technologies 社)を併用して完全ゲノム配列を構築、およびプラスミドの配列比較を行った。(菅井、朝倉、石井)

- ④ 健康者由来薬剤耐性大腸菌出現状況の把握：健康者糞便由来大腸菌について薬剤感受性試験を行い、耐性菌保持状況を把握した。(小西、大西)
- ⑤ 国産および輸入鶏肉から分離される全大腸菌を対象に薬剤感受性試験を実施し、耐性率の比較：食品由来菌がどの程度、健康人由来大腸菌の耐性率に影響を及ぼしているかを把握する目的で、セフェム系薬剤、フルオロキノロン、コリスチンに対する耐性株については耐性遺伝子保有状況を調べ比較した。(富田、小西、浅井)
- ⑥ 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL)/AmpC 型 β -ラクタマーゼ遺伝子伝達因子の解析：食肉あるいは食用動物を汚染する薬剤耐性菌がヒトの健康へ与える影響を解明するため、ESBL あるいは AmpC 産生大腸菌の全ゲノム解析により菌株遺伝子型ならびにそれらの遺伝子を搭載するプラスミドの構造比較解析を行った。(石井、菅井)

C. 研究結果：

- ① 耐性菌のデータの国内・国外への発信：国内においては、「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2018 から 2020 年度 (<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000691720.pdf>) に提供した。国外においては WHO の GLASS(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System:<https://docs.google.com/spreadsheets/d/157mAK90huHMSvY6zpqxsNSw2BNHgT1fPNq9CYKQsw4/edit#gid=1631684533>) に報告した。また、と畜場由来大腸菌、食鳥処理場由来大腸菌、食鳥処理場由来サルモネラ属菌の薬剤感受性試験成績については、動物医薬品検査所 HP(JVRAM) に掲載した (http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html)。

- ② 地方衛生研究所（地研、全国 23 の地研が参加）を中心にした食品由来株の耐性菌サーベイランス；平成 30～令和 2 年度に、ヒト及び食品から分離されたサルモネラ、大腸菌、カンピロバクターの薬剤耐性状況を、全国で統一されたプロトコルや判定表に基づいて実施し、食品由来耐性菌に関する情報収集体制をさらに強固なものとした。

サルモネラの食品由来株 (715 株) において分離された *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* は、全体の約 8 割を占め、国産鶏肉から検出される主要な血清型と考えられた。血清型に特徴的な耐性としては、*S. Infantis* では CTX, CAZ, CFX 耐性が認められたが、*S. Schwarzengrund* ではほとんど認められなかった。また、*S. Manhattan* では他の 2 種の血清型と異なり、KM 耐性が認められなかった。一方、ヒト由来株の上位 5 位を占めるサルモネラは *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Thompson*, *S. 4:i:-*, *S. Saintpaul* の血清型であった。ヒト由来株と食品由来株の両方で認められ、かつ食品由来株の主要な血清型である *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* について、各種抗菌剤に対する耐性率を比較すると、各血清型ともヒト由来株と耐性傾向が非常に類似していた。食品由来株がヒトサルモネラ症の感染源になっていることが示唆される。

大腸菌株の分類別耐性率は、EHEC 27.6%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 70.6%、その他の大腸菌 72.1%であり、EHEC 以外の下痢原性大腸菌株の耐性率が EHEC 株よりも 2 倍以上高かった。一方、食品（牛肉、鶏肉など）由来株 96 株のうち、51 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 53.1%であった。各種抗菌剤に対する耐性率では、ABPC, ST, CTX, NA 及びキノロン系薬 CPFX, NFLX に対して、EHEC 以外の下痢原性大腸菌が EHEC よりも耐性率が高く、その他の大腸菌はセフェム系薬、キノロン系薬、カルバペネム系薬 MEPM 等に耐性を示し、高度の耐性傾向を示した。EHEC, EHEC 以外の下痢

原性大腸菌株、その他の大腸菌株の間で、抗菌剤に対する耐性率が相当に異なることが明らかにされた。また、大腸菌の種類毎に保有する ESBL 産生遺伝子が異なり、その他の大腸菌では CTX-M-9 グループ、CTX-M-2 グループ、TEM 型が多く検出され、他方、EHEC では CTX-M-1 グループ、TEM 型は検出されたが、CTX-M-9 グループ、CTX-M-2 グループはほとんど検出されなかった。各大腸菌の生息環境（菌の定着部位など）の違いによって、抗菌剤に対する選択圧や薬剤耐性遺伝子の伝達頻度が異なることが可能性として示唆される。なお、JANIS によって各病院から収集される大腸菌は下痢以外の感染部位のものが多く、地研ルートによって収集されたその他の大腸菌に分類されるものに入る。

カンピロバクターについては、*C. jejuni*、*C. coli* 共にヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。*C. coli* は菌株数が多いが、ヒト由来株、食品由来株とも、EM, CPFX, NA に対する耐性率が *C. jejuni* よりも高い傾向を示した。*C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は毎年 50% 程度でほぼ一定であった。一方、*C. coli* は 2011 年～2016 年分離株では耐性率が減少傾向であったが、2017 年は 62.5%、2018 年は 37.5%、2019 年は 68.8% と年によって耐性率は異なっていた。治療の第一選択薬である EM 耐性株の出現率は *C. jejuni* で 3.7% (2011 年) ～0.8% (2014 年) と低い状況で推移している。一方 *C. coli* は *C. jejuni* と比較して耐性率が高い傾向が続いている。2015 年分離株は耐性率 0% であったが、2016 年は 14.3%、2017 年は 25%、2018 年は 62.5%、2019 年は 25% であった。

コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1-10* を検出するための multiplex PCR 法を開発し、2015 年～2019 年分離菌株を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を実施した。サルモネラにおいては、ヒト由来株から *mcr-1* グループ (2 株)、食品由来株から

mcr-5 (1 株) が、それぞれ検出された。一方、ヒト由来大腸菌から *mcr-1* グループ (2 株 : EHEC と下痢原性株) が検出されたが、食品由来大腸菌からは検出されなかった。

③ と畜場・食鳥処理場由来株の解析：

サルモネラの血清型について、食鳥処理場由来と食品 (約 9 割は国産鶏肉) 由来及びヒト由来の比較では、食鳥処理場由来のサルモネラと食品由来サルモネラでは、割合が大きかった上位 5 つの血清型が同じであった。内訳は異なるものの、その 5 つの血清型が全体においてそれぞれ 98% 及び 84% を占め、食鳥処理場由来のサルモネラと食品由来サルモネラで関連性があることが示唆された。一方、ヒト由来株では血清型は食鳥処理場及び食品由来に比べて多様であり、食鳥処理場及び食品由来の上位 5 血清型の占める割合は 24% であった。ヒト由来のサルモネラは鶏及びその食品を介したものの他に多様な原因がある可能性が示唆された。

食鳥処理場由来の大半を占める上位 2 血清型の *S. Schwarzengrund* 及び *S. Infantis* について耐性率を比較した結果、*S. Schwarzengrund* では鶏由来と食品由来は KM, SM, TC で同等の耐性率を示した一方、ヒト由来は KM, CP に対しては鶏由来及び食品由来に比べ低い耐性率を示した。また、CTX 耐性はヒト由来で高かった。*S. Infantis* では、各薬剤について鶏由来と食品由来では同等の耐性率を示した一方、ヒト由来はほとんどの薬剤でそれらよりも低い耐性率を示した。両血清型ともに鶏由来と食品由来での類似性が認められたが、ヒト由来株では耐性率が食品・食鳥処理場と異なる点があることから、ヒトにおける両血清型の由来は鶏及びその食品由来以外にもある可能性が示唆された。

と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来サルモネラにおけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況：大腸菌について、*mcr-2* ～*mcr-4* 及び *mcr-6* ～*mcr-10* 遺伝子についてはいずれの菌株からも分離されな

かった。*mcr-1*は牛、豚、鶏由来株のすべてから検出され、牛由来株では平成28年1株(0.4%：割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成29年1株(0.4%)、平成30年0株(0%)、豚由来株では平成28年3株(3.3%)、平成29年3株(3.6%)、平成30年6株(7.2%)分離され、鶏由来株からは、平成28年2株(1.3%)、平成29年5株(3.3%)、平成30年0株(0%)検出された。また、*mcr-5*遺伝子は牛由来株は平成28年のみ2株(0.8%)、鶏由来株では平成29年のみ1株(0.7%)検出された。サルモネラについて、*mcr*遺伝子はいずれの畜種においても検出されなかった。

家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構：すべての株で、*erm (B)* 遺伝子を保有していなかった。マクロライド耐性に関与する、23s rRNAの変異を保有している株は2株のみであった。その他の18株について、機能が不明な23s rRNAの変異を保有している株が2株あったが、マクロライド耐性機構は不明であった。20株中それぞれの株のSequence Typeには多様性が認められた。

④ 国内・外国産鶏肉から分離された大腸菌の耐性菌出現状況：

国産および輸入鶏肉由来大腸菌株のCTX耐性率およびKM耐性率の変化を示した。国産のCTX耐性率は、2012年には10.4%であったが、2020年は1.0%まで低下していた。また外国産でも24.6%(2011年)から3.5%(2020年)と耐性率は低下していた。一方KM耐性率は、輸入では26.2%(2011年)から3.5%(2020年)と低下していたが、国産では2018年以降、耐性率は30%台と高値である。CTX耐性株の分離は2004年に初めて確認されて以降、2015年から増加し、2017年に分離数が最も多くなったが、2018年からの3年間は減少傾向である。国産鶏肉および輸入鶏肉から分離された大腸菌の薬剤耐性パターンを比較すると、明らかに異なる耐性パターンが異なり、特にKMは国産由来株

で高く、輸入由来株では低かった。日本では2012年以降、セフトオフルのブローラーへの飼料添加物としての使用が自主規制されており、それが国産鶏肉におけるCTX耐性菌の減少にも反映しているのであろう。しかし代わりにKMが使用されているとのことであり、そのためKM耐性率が高い傾向となっていると思われる。

2019年収集のタイ産鶏肉1検体から伝達性*mcr-1*を保持するコリスチン耐性大腸菌が検出された。また2018年に収集したブラジル産鶏肉1検体からVanA型高度耐性VRE(*E. faecium*)株が、また国産(宮崎)鶏肉4検体からVanN型VRE(*E. faecium*)株がそれぞれ検出された(検出率はそれぞれ1.8%、13.3%)。LZD低度耐性腸球菌株(主に*E. faecalis*)が鶏肉検体から検出され、特に国産(群馬)鶏肉からの検出頻度は高度であった(95~100%)。これらの多くは耐性関連遺伝子*optrA*と*fexA*を保持する株であり、PFGE解析とMLST解析から、同一の起源の耐性株が国内地域に拡散している可能性が示された

ESBL産生菌の定量試験を行った。国産鶏肉製品計100検体のうち、ESBL大腸菌は29検体、腸内細菌科菌群は21検体から検出され、これらのいずれかが検出された検体数は41検体にのぼった。ESBL産生大腸菌及び同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ2.34 logCFU/g及び3.06 logCFU/gであり、最大値は2.36 logCFU/g及び3.23 logCFU/gであった。検出下限未満となった検体数は59検体であった。100輸入鶏肉検体からは、定量検出試験を通じ、ESBL産生大腸菌は6検体で共に検出限界値である1.40 logCFU/g、腸内細菌科菌群は6検体より検出され、検出菌数は4検体が1.40 logCFU/g、2検体が1.88 logCFU/gであった。

⑤ 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2018年~2020年に健康者の糞便から分離された大腸菌952株を対象に19薬剤を用いた薬剤感受性試験を行ったと

ころ、いずれか1薬剤以上に耐性を示した株は41.3% (2018年)、39.2% (2019年)、42.3% (2020年)であり、ほぼ横ばい傾向であった。

薬剤別に耐性率をみると、最も耐性率が高かったのはABPCで23.5%、次いでTCおよびNAがそれぞれ20.7%、SM15.5%であった。フルオロキノロン(CPFX, NFLX, OFLX)耐性は7.4%、CTX耐性は5.1%、CFX耐性は1.2%、CAZ耐性は0.2%であった。IPMおよびMEPMに耐性を示した株は認められなかったが、AMK耐性株が1株(2018年)認められた(図7)。

第3世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示した株は2018年が19株(5.3%)、2019年は18株(4.3%)、2020年は13株(4.6%)であった(表2)。これらの菌株のうちESBL産生株は30株、AmpC型βラクタマーゼ産生株は7株であった。ESBL産生株の遺伝子型はCTX-M-9グループが最も多く21株、次いでCTX-M-1グループが6株であった(表3)。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を調べた結果、2018年は3株、2019年は2株で*mcr-1*陽性であった。このことから健康者糞便由来株の中にもプラスミド性コリスチン耐性株が広がっていることが明らかとなった。

⑥ 市販肉の交差汚染経路の解析

市販肉の薬剤耐性菌汚染は、家畜の腸内に保有する細菌が食肉処理工程で枝肉に付着することに起因する。食肉処理施設の枝肉や環境ふき取り材料から様々な細菌が分離されるが、菌の遺伝型解析から、食肉汚染には同一個体由来の菌による汚染、および異なる個体由来の細菌による交差汚染があることが示唆された。また一方、食肉処理業施設的环境材料からの菌による食肉への汚染も認められた。このように、食肉汚染には、家畜の腸内容物による場合、および処理施設等の環境に由来する可能性があることが分かり、食肉処理施設の衛生管理が重要であることが指摘された。

種鶏場及び孵卵場において、感染予防目的で抗菌薬が使用されている実態が明らかとなった。種鶏場や孵卵場で使用された抗菌薬に耐性を示すサルモネラが肉用鶏農場に分布することが示めされた。肉用鶏由来サルモネラの薬剤耐性は、肉用鶏農場で使用される抗菌薬に加え、その上流である種鶏場や孵卵場において使用される抗菌薬の影響を受けることが明らかとなった。

飼育期間中の抗菌剤使用が、薬剤耐性菌の選択圧として作用することは知られている。飼育期間中に投薬する農場では大腸菌を含む腸内細菌科細菌の間で、ESBLプラスミドが伝播することが示唆された。いっぽう、無薬飼育する農場において、ESBL産生*Klebsiella pneumoniae*が初生ヒナを介して農場へ侵入し、ESBLプラスミドが大腸菌へ伝播して1年以上の間農場内に分布したことが示された。無薬農場で認められたことから、ESBLプラスミドの菌種間伝播は、抗菌剤による選択圧がなくても起こっていることが示された。

耐性菌の食品汚染は、生産段階(孵卵、飼育など)において使用した抗菌剤による選択圧で生じた耐性菌を家畜が保持していること、およびその耐性菌がと畜場での食肉処理段階で拡散汚染することによる。

⑦ 耐性菌の遺伝学的解析：転移因子及び伝達性遺伝因子の関与

2008年より収集した臨床由来ESBL産生菌の遺伝学的解析を行った。プラスミド上と染色体上にそれぞれ存在する*bla*_{CTX-M}の周辺構造の類似性を比較した。*bla*_{CTX-M-3}、*bla*_{CTX-M-14}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CTX-M-55}の5'-側には転移因子ISEcp1が共通して認められ、ISEcp1-*bla*_{CTX-M}周辺の塩基配列の構成は大きく異なっていた。このことから、*bla*_{CTX-M}の種類に関わらずISEcp1が転移に重要な働きをしていることが推察された。また、*bla*_{CTX-M-2}は5'-側にISEcp1が存在する株と存在しない株が認められた。このことより、*bla*_{CTX-M-2}の伝播様式は他の*bla*_{CTX-M}とは異なるメカニズムの関与が推定された。

一方で、*bla*_{CTX-M-27} の周辺は 5' -側に *ISEcp1* が存在するタイプと 5' -, 3' -側に転移因子 *IS26* が存在するタイプが認められた。周辺に *IS26* が存在するタイプとして *bla*_{CTX-M-8} があつた。*bla*_{CTX-M} の転移には *ISEcp1* によるものの頻度が最も多く、ついで *IS26* が関与していた。

食品由来菌株として国内小売店で購入した鶏肉から *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有するプラスミド、*bla*_{NDM-1} を保有するプラスミドをもつ肺炎桿菌、国内小売店で購入した生野菜から *bla*_{NDM-1} を保有する IncFII (K) プラスミドを持つ肺炎桿菌、*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} を保有する IncFII (K) プラスミド、*bla*_{OXA-72} を 2 コピー保有する GR2 プラスミドを持つ *Acinetobacter baumannii*、エジプトの牛肉から分離された *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有する IncHI2 プラスミドを持つ *Enterobacter hormaechei* を報告した。。

ESBL および AmpC 産生菌が拡散し始めた時期の菌株を全ゲノム解析することで、それらの耐性遺伝子がどのような伝達性遺伝因子に媒介されてきたのかを明らかにしようとした。*bla*_{CTX-M-14} (1996 年から 2007 年に検出)、*bla*_{CMY-2} (1999 年から 2002 年に検出)、および *bla*_{CTX-M-2} (2001 年から 2004 年に検出) は由来および宿主菌が異なるにも関わらず、それぞれ構造が酷似した IncFII プラスミド、IncA/C プラスミド、および IncN プラスミド上に検出された。また、海外渡航がない患者から分離されたカルバペネマーゼ産生大腸菌を解析した結果、*bla*_{NDM-5} は IncX3 プラスミド上に検出され、そのプラスミドは東京湾の海水から分離された大腸菌から検出された *bla*_{NDM-5} 搭載プラスミドと酷似していた。これらの結果から、各薬剤耐性遺伝子のヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境へ拡散はそれぞれ特定のプラスミドが長期に渡り重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

D. 考察

① 耐性菌データの発信

収集された耐性菌データの国内・国外

への発信を積極的に行った。国内においては、「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書2018から2020年度」に活用された。また、国外においてはWHOのGLASS GLASSに報告した。世界からは我が国の耐性菌の状況が分からないとよくいわれる。いくら良いデータがあつたとしての、それを英文で発信しないと世界からは理解されない。本研究班は我が国のワンヘルスに基づいた家畜—食品—人由来細菌の耐性状況の重要性を指摘した走りであるとともに、その成果を世界に向けて情報発信をしてきたことにおいても果たしてきた貢献度は高いと思われる。

② ワンヘルス・アプローチの継続性の重要性

JANIS 及び JVARM には食品由来薬剤耐性菌の情報は含まれないことから、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチにおいて、地研における食品由来菌の耐性データは重要である。本研究班で開発された相互変換ソフトウェアによって、地研での薬剤耐性菌のデータをこれらと合わせ総合的に解析することが可能となった。今後、三者のデータをナショナルサーベイランスとして充実させ、ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に繋げていくためには、地研による食品由来耐性菌のモニターを継続して実施していく恒常的なネットワーク整備が必要である。将来的には JANIS や JVARM のように事業として対応することが望ましい。

③ 食品由来耐性菌サーベイランスの恒常性

全国 23 地方衛生研究所の協力のもと、日本全国から分離されたヒト（有症者、大部分は便検体）及び食品（大部分は国産鶏肉）由来のサルモネラ、大腸菌の薬剤耐性の調査が精度管理された手法に基づき行える体制が構築された。現在は厚労科研費（3 年間ごと）の研究事業として行っているが、今後はこのサーベイランス体制をどのように維持・発展させるかである。JANIS, JVARM のように担当機関（国研）を決め、国の委託事業として行うのが恒常性という点では最適である。得られたデータを JANIS のフ

フォーマットを用いて解析する方向性であるから、JANIS の担当機関である国立感染症研究所薬剤耐性研究センター（AMR ワンヘルス室が適当）が担当し、地方衛生研究所とのネットワークを構築していくことが一つであろう。その場合、事業費を感染研（国研）から地方衛生研究所に配分することができるのが問題となる。今後費用や人の負担の在り方を含め検討していくことが必要である。

④ 家畜—食品—ヒト由来菌の耐性菌測定上のバイアスおよび問題点；

家畜—食品—ヒト由来耐性菌の耐性率の比較を可能にするため、耐性検査の使用薬剤や検査方法のプロトコールの標準化を進めてきたが、すべてを同一にするのは現在のところ難しい問題がある。JANIS においては、各病院で行われている耐性検査に依存しており、一元的精度管理の下で行われているわけではない。JVARM においては、一元化された精度管理の下で行われている。食品においては、今回の地方衛生研究所における調査においては同一プロトコールで行う体制を確立した。統一的精度管理に関しては、薬剤耐性においては多くの機関（公的、民間の機関など）が関与しているので、大変な課題も多いが、少なくともの National surveillance においてはきちんとすべきであろう。

⑤ 耐性菌の伝播による拡散：

今回の調査で、サルモネラ（*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* に関して）、カンピロバクターに関しては、鶏、食品、ヒトから分離される菌の薬剤耐性プロファイルが相互に類似していることから、耐性菌の伝播が鶏—食肉—人の経路を取っていることが強く示唆された。このルートを制御するには、飼育過程における鶏への抗菌薬の投与を抑制し、耐性菌選択圧を下げるのが肝要である。しかし、鶏の飼育段階ばかりでなく、種鶏や孵化の段階での耐性菌の流入があることが分かっているため、総合的対策が必要である。種鶏は海外から輸入されているものが

多いので、国内だけでなく海外における対策も考慮に入れなければならない問題であろう。また食鳥処理場における解体時の鶏間の垂直・交差汚染および環境からの汚染もあることが分かってきたので、それらへの対策も重要である。

我が国においてセフトオフィムのブローラーへの飼料添加物としての使用が自主規制されてから、鶏由来大腸菌の CTX 耐性率が激減してきており、それは鶏肉から分離される大腸菌の CTX 耐性率の低下にも反映している。一方、健康人由来の大腸菌の CTX 耐性率は毎年約 5% で減ってははいない。鶏肉を汚染している鶏由来の大腸菌がそのままヒトの大腸菌として人の腸管に定着しているわけではないので、鶏肉汚染の CTX 耐性率が減ったからと言って人由来大腸菌の CTX 耐性率が減るという単純なものではないのであろうが、今後健康人の大腸菌の CTX 耐性率の動向を把握していくことは重要であろう。今回の実験で無薬農場つまり抗菌薬による選択がない状況でも、ESBL プラスミドの菌種間伝播が起っていたことが明らかになった。このことは、健康人の腸管内でも一度定着した CTX 耐性菌の耐性遺伝子が腸管内で伝播して維持されており、そのため耐性率はなかなか減弱しないと想定される。

⑥ コリスチン耐性株の伝播：

コリスチン耐性株は最近報告され、世界的に注目されている。今回の調査においても、我が国においても家畜、食品、ヒト由来菌から分離されていた。コリスチンは長らく家畜等に感染予防的に使用されてきているが、人にはその毒性のため使用されてきていなかった。耐性菌が家畜の環境内でコリスチンの使用により選択され、それが食肉に拡散していることは明らかであろう。健康人の大腸菌からも分離されており、それらは食肉等の摂取を介しての耐性菌・耐性遺伝子の伝播が起っていると想定される。CRE の治療にコリスチンの使用が認められるような状況において、コリスチン耐性菌の拡散が危惧されている。我が国に

においては平成30年にコリスチンの家畜への飼料添加物としての指定が取り消され、使用が禁止されたが、依然として *mcr* 遺伝子保有株が分離されており、今後の動向に注意が必要である。

E. 結論

食品由来耐性菌の動向把握を継続的に進めるため、全国23の地方衛生研究所の協力のもとサルモネラ、カンピロバクター、大腸菌の耐性菌のモニタリング体制を構築した。統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本研究班におけるものが我が国においては最初のものである。その結果得られたデータが、「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2018-2020」、および WHO GLASS に提供できた。食品由来細菌の薬剤耐性データを JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合的に解析し、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

なお、家畜、食品およびヒトから分離されるセファロsporin系薬剤およびフルオロキノロン系薬剤耐性大腸菌の分離頻度は、依然として高い状態が続いている。特に人から分離される頻度の増加傾向がみられており、耐性菌の選択圧（不適切使用）を減じる対策の強化が必要である。我が国では家畜等への使用が平成30年に禁じられたコリスチンに対する耐性菌が依然として分離されている。過去に使用された残存の影響なのかを含め、今後の動向を追っていくことは重要である。

G. 原著論文によるもの

(1) 国内合計 3 件 (発表済み 3 件、今年度中発表予定 0 件)

- ① 川西路子:「AMR アクションプランに基づく JVARM の強化、今後の JVARM」、動物用抗菌剤研究会会報
- ② 佐々木貴正・百瀬愛佳・朝倉 宏・浅井鉄夫 孵化場におけるセフチオフル使用中止後のブロイラー鶏群由来および

鶏肉由来サルモネラの薬剤耐性 鶏病研報 56(2), 47-52, 2020.

- ③ 石井良和ら。第31回 日本臨床微生物学会総会・学術集会、令和元年1月31日、金沢、一般演題 (*bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-pST5 プラスミドのカルバペネマーゼ遺伝子獲得に関する研究)

(2) 海外合計 19 件 (発表済み 18 件、今年度中発表予定 1 件)

- ① Suzuki, K., Yossapol, M., Sugiyama, M., Asai, T. Effects of antimicrobial administration on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in broiler flocks. Jpn. J. Infect. Dis. 72(3):179-184, 2019.
- ② Morita M, Shimada K, Baba H, Morofuji K, Oda S, Izumiya H, Ohnishi M. GenomeSequence of a *Salmonella enterica* Serotype Senftenberg Strain Lacking Salmonella Pathogenicity Island-1 and Isolated in Japan. Microbiol Resour Announc. 8(33). pii: e00653-19. 2019.
- ③ Chiba N, Tanimoto K, Hisatsune J, Sugai M, Shibayama K, Watanabe H, Tomita H. Detection of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. J Glob Antimicrob Resist. 16:249-250. 2019.
- ④ Hashimoto Y, Taniguchi M, Uesaka K, Nomura T, Hirakawa H, Tanimoto K, Tamai K, Ruan G, Zheng B, Tomita H, Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding *vanA* and *vanM* gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant enterococci isolate. Front Microbiol. 10:2568. 2019.
- ⑤ M. Kijima, T. Shirakawa, M. Uchiyama, M. Kawanishi, M. Ozawa and R. Koike: Trends in the serovar and antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* from cattle and pigs between 2002 and 2016

- in Japan. Journal of Applied Microbiology. 127: 1869–1875. 2019
- ⑥ Kitagawa H, Ohge, Yu L, Kayama S, Hara T, Kashiya S, Kajihara T, Hisatsune J, Sueda T, Sugai M. *Aeromonas dhakensis* is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan. J Infect Chemother. pii: S1341-321X(19)30270-3. 2019.
 - ⑦ Yamamoto S, Kitagawa W, Nakano M, Asakura H, Iwabuchi E, Sone T, Asano K. Plasmid sequences of four large plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle in Japan. Microbiol Resour Announc. 9(20): e00219–20. 2020.
 - ⑧ Watahiki M, Suzuki M, Aoki M, Kawahara R, Uchida K, Norimoto S, Matsumoto Y, Kumagai Y, Masuda K, Fukuda C, Harada S, Semba K, Suzuki M, Mari Matsui, Suzuki S, Shibayama K, Shinomiya H. Multiplex Polymerase Chain Reaction in a Single Tube for Detecting Genes Encoding Carbapenemase of *Enterobacteriaceae*. Jpn J Infect Dis. 73: 166–172. 2020.
 - ⑨ Sasaki Y, Asai T, Haruna M, Sekizuka T, Kuroda M, Yamada Y. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from pigs in Japan. Jpn J. Vet. Res. 68(3): 197–202, 2020.
 - ⑩ Sasaki Y, Yamanaka M, Nara K, Tanaka S, Uema M, Asai T, Tamura Y. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from pigs at abattoirs in Tohoku region, Japan. J Vet Med Sci. 82(9):1400–1403, 2020.
 - ⑪ Yossapol M, Suzuki K, Odoi JO, Sugiyama M, Usui M, Asai T. Persistence of extended-spectrum β -lactamase plasmids among *Enterobacteriaceae* in commercial broiler farms. Microbiol Immunol. 64:712–718. 2020.
 - ⑫ Hashimoto Y, Kita I, Suzuki M, Hirakawa H, Ohtaki H, Tomita H. First Report of the Local Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci Ascribed to the Interspecies Transmission of a vanA Gene Cluster-Carrying Linear Plasmid. mSphere. 5(2):e00102–20. doi: 10.1128/mSphere.00102–20. 2020.
 - ⑬ Toshiki Kajihara, Koji Yahara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimbene, Visanu Thamlikitkul, John Stelling, Aki Hirabayashi, Eiko Anzai, Satoyo Wakai, Nobuaki Matsunaga, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Motoyuki Sugai, and Keigo Shibayama. Comparison of de-duplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance. PLoS One, 26;15(6):e0228234. doi: 10.1371/journal.pone.0228234. 2020
 - ⑭ Soliman AM, Ramadan H, Ghazy E, Yu L, Hisatsune J, Kayama S, Sugai M, Nariya H, Shimamoto T, Jackson CR, Shimamoto T. Emergence of *Salmonella* genomic island 1 variant SGI1-C in a multidrug-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* ST485 from Egypt. Antimicrob Agents Chemother, 64: 9 e01055–20, 2020.
 - ⑮ Sadek M, Nariya H, Shimamoto T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nordmann P, Poirel L, Shimamoto T. First genomic characterization of *bla*_{VIM-1} and *mcr-9*-coharbouring *Enterobacter hormaechei* isolated from food of animal origin. Pathogens, 9, 687, 2020.
 - ⑯ Khalifa H, Soliman A, Saito T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nariya H, Ahmed A, Shimamoto T, Matsumoto T, Shimamoto T. First report of foodborne *Klebsiella pneumoniae* coharboring *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, and *mcr-9*. Antimicrob

Agents Chemother, 64 aac.00882-20. 2020.

- ⑪ Kitagawa H, Ohge H, Yu L, Kayama S, Hara T, Kashiyama S, Kajihara T, Hisatsune J, Sueda T, Sugai M. *Aeromonas dhakensis* is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan. J Infect Chemother, 26, 316-320, 2020.
- ⑫ Tanimoto K, Nomura T, Hashimoto Y, Hirakawa H, Watanabe H, Tomita H. Isolation of *Serratia fonticola* producing FONA, a minor extended-spectrum β -lactamase (ESBL), from imported chicken meat in Japan. Jpn J Infect Dis. 74(1), 2021.
- ⑬ Sasaki Y, Sakurada H, Yamanaka M, Nara K, Tanaka S, Uema M, Ishii Y, Tamura Y, Asai T. Effectiveness of ear skin swabs for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs at abattoirs. J Vet Med Sci. 2021 (印刷中)

その他の実績 (予定を含む)

学会発表 合計 27 件

- 1. 柴山恵吾. JANIS ならびに日本のワンヘルス薬剤耐性サーベイランスについて. 第3回全国細菌薬剤耐性監視大会、H30年6月30日、中国北京
- 2. 柴山恵吾. 日本のワンヘルス薬剤耐性サーベイランスについて. 第31回外科感染症学会総会、H30年11月29日、大阪、
- 3. 柴山恵吾. JANIS ならびに日本のワンヘルス薬剤耐性サーベイランスについて. 第47回薬剤耐性菌研究会、H30年11月16日、松本市、
- 4. 四宮博人. 食品由来細菌の薬剤耐性モニタリングー特にサルモネラ属菌について. 第71回日本細菌学会総会中国・四国支部総会、2018年10月6日～7日、愛媛大学グリーンホール (松山市)、シンポジウム「薬剤耐性ワンヘルス・アプローチ」S1.
- 5. 山本詩織、森篤志、朝倉 宏. 国内市販

鶏挽肉におけるカルバペネム耐性腸内細菌科菌群の汚染実態に関する検討 (日本防菌防黴学会第45回年次大会、平成30年11月14日、東京、国内市販鶏挽肉中のカルバペネム耐性腸内細菌科菌群汚染実態を報告した)

- 6. 中山達哉, 佐々木貴正, 山口貴弘, 河原隆二, 岡田由美子, 朝倉 宏, 五十君静信. 採卵鶏農場における薬剤耐性大腸菌汚染実態調査 (第39回日本食品微生物学会学術総会、平成30年9月27日、大阪、採卵鶏におけるESBL産生大腸菌の分布実態を報告した)
- 7. 中山達哉, 佐々木貴正, 朝倉 宏, 五十君静信. 食鳥処理場における薬剤耐性大腸菌の汚染実態 (日本食品衛生学会第114回学術講演会、平成30年11月15日、広島、食鳥処理場における耐性菌汚染動態を報告した)
- 8. 浅井鉄夫 Antimicrobial-resistant bacteria in animals (第93回日本感染症学会総会、2019年4月5日、名古屋、動物分野のOne Healthアプローチとその課題について概説した)
- 9. 浅井鉄夫 JVARM とリスク管理措置 (動物用抗菌剤研究会、2019年4月20日、東京、国内の薬剤耐性菌のリスク管理の取組について概説した)
- 10. 浅井鉄夫 畜産分野における薬剤耐性菌の対策と課題 (第89回日本感染症学会西日本地方学術集会・第62回日本感染症学会中日本地方学術集会・第67回日本化学療法学会西日本支部総会、2019年11月8日、静岡県浜松市、畜産分野における薬剤耐性菌対策の現状と今後の課題について概説した)
- 11. 第93回日本細菌学会総会、2020年2月19日 (水)～21日 (金)、名古屋・ウイंक愛知、輸入トリ肉から分離されたFONA産生 *Serratia fonticola* についての研究発表 (予定)
- 12. 第93回日本細菌学会総会、2020年2月19日 (水)～21日 (金)、名古屋・ウイंक愛知、鶏肉より分離したリネゾリドに対して低度耐性を示す腸球菌の解析についての発表 (予定)
- 13. 第46回動物用抗菌剤研究会シンポジウ

- ム 2019 年 4 月 20 日 (土)、日本獣医生命科学大学、AMR アクションプランに基づく JVARM の強化、今後の JVARM
14. 第 31 回日本臨床微生物学会 2020 年 2 月 2 日、石川県立音楽堂、薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランに基づく動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM : Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) の強化について
 15. Shibayama K. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan, 第 15 回全国抗感染薬物臨床薬理学会会議、第 3 回全国細菌薬剤耐性監視大会、第 2 回北京大学医学感染症フォーラム. (英語、口頭) 2018 年 6 月北京.
 16. Shibayama K.、National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan, Tokyo AMR One-Health Conference (英語、口頭) 2019 年 2 月 20 日、東京.
 17. 柴山恵吾、厚生労働省院内感染対策サーベイランス (JANIS) からみた評価と課題、日本感染症学会学術集会総会、2019 年 4 月名古屋
 18. 柴山恵吾、JANIS にみる薬剤耐性菌の推移、日本化学療法学会総会、2019 年 5 月東京
 19. Shibayama K. National Surveillance of Antimicrobial Resistance in Japan, 第 15 回全国抗感染薬物臨床薬理学会会議、第 3 回全国細菌薬剤耐性監視大会、第 2 回北京大学医学感染症フォーラム. (英語、口頭) 2018 年 6 月北京.
 20. 第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19 日 (水) ~21 日 (金)、名古屋・ウイック愛知、鶏肉より分離したリネゾリドに対して低度耐性を示す腸球菌の解析についての発表
 21. 第 46 回動物用抗菌剤研究会シンポジウム 2019 年 4 月 20 日 (土)、日本獣医生命科学大学、AMR アクションプランに基づく JVARM の強化、今後の JVARM
 22. 第 31 回日本臨床微生物学会 2020 年 2 月 2 日、石川県立音楽堂、薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランに基づく動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM : Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) の強化について
 23. 四宮博人、その他。地方衛生研究所におけるヒト及び食品由来薬剤耐性菌のモニタリング、シンポジウム「地方衛生研究所との連携強化」第 94 回日本感染症学会総会、2020 年 8 月 19-21 日、東京、
 24. (IUMS2020、2020 年 11 月 16-20 日、韓国 Daejeon 市 (オンライン)、国内に流通する鶏肉製品における ESBL 産生大腸菌の汚染実態及び分離株の耐性遺伝子伝播効率を発表した。)
 25. (第 94 回日本細菌学会総会、オンライン開催、2021 年 3 月、国内流通鶏肉及び食鳥とたいにおける ESBL 産生大腸菌並びに腸内細菌科菌群の定性・定量的評価を発表予定。)
 26. 谷本弘一、野村隆浩、橋本佑輔、平川秀忠、富田治芳. 鶏肉からの *Serratia fonticola* の分離と minor ESBL である FONA の解析. 第 49 回薬剤耐性菌研究会、2020 年 11 月 13 日、埼玉県熊谷市
 27. Wellcome Trust Conference “Antimicrobial Resistance – Genomes, Big Data and Emerging Technologies (Virtual Conference)”, 2020/11/5. Hinxton, UK. 英国 Wellcome Trust

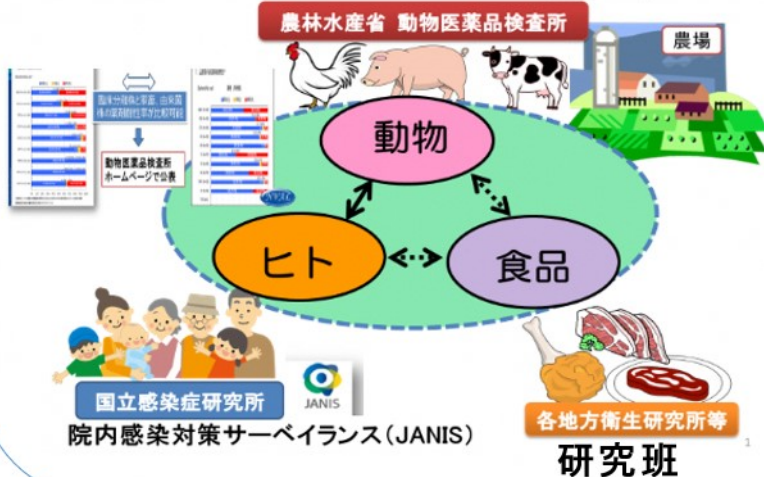
厚生労働省科学研究費H30-R2年度)

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

大腸菌・サルモネラ等
耐性菌・耐性遺伝子

薬剤耐性サーベイランス体制

動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM)



ワンヘルスAMR

動向調査報告書作成・報告
WHO GLASSへの報告



2018~2020年度の報告書を作成
するのに利用された

研究課題 食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

研究目的

- ① 地方衛生研究所のネットワークを中心に大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター等の食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを収集する。
- ② JANIS, JVARM及び食品由来耐性菌のワンヘルスアプローチによる相互のデータの比較・統合、および「ワンヘルスAMR動向調査年次報告書」WHOの薬剤耐性のグローバルサーベイランス(GLASS)にデータ提出する
- ③ 家畜、食品、ヒト由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子の解析を行い、それらの伝播様式を解明。

期待される成果

- 1) 食肉由来の薬剤耐性菌分離状況の把握
- 2) 食肉由来菌と家畜・臨床分離菌との因果関係の解明
- 3) 食肉を介した耐性菌のヒトへの伝播、拡散の制御
- 4) 家畜・ヒト等への抗菌薬適正使用のための科学的根拠

食肉を介した耐性菌の人への伝播・拡散？



研究概要・方法

- 1) 食肉検体(国内産食肉、輸入食肉)の収集
- 2) 食肉からの各種耐性菌(ESBL, Amp^rCMC^r等)の検出
- 3) 食品由来耐性菌データの収集・統合・分析
- 4) と畜場・食鳥処理場汚染および由来耐性株の解析
- 5) 市販肉の交差汚染経路の解析
- 6) 各種耐性遺伝子と伝播経路の分子遺伝学的解析

今年度のこれまでの成果

- 1) 地方衛生研究所のネットワークで鶏肉等の食品由来耐性菌のデータを収集した
- 2) その解析データを「ワンヘルスAMR動向調査年次報告書2018-2020QおよびWHO -GLASSに提供し、我が国の動向を国内・国外に報告した。
- 3) JVARM, JANISおよび食品由来耐性菌の統合総合的に解析できるプラットフォームが確立した。
- 4) コリスチン耐性菌が食鳥処理場由来大腸菌、食肉由来大腸菌、健康者糞便由来大腸菌から分離された。拡散が広がっている現状が明らかになった。
- 5) 健康者由来大腸菌の調査の結果、約6%がGT耐性、約6%がGPF耐性であり、毎年同程度で分離された。かなり高い率の耐性菌が人の腸内細菌叢に存在すること明らかになった。

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

研究分担者

四宮博人 (愛媛県立衛生環境研究所)

研究協力者

調 恒明 (山口県環境保健センター)

小川恵子、大野祐太、三津橋和也、 (北海道立衛生研究所)

宮島祥太、池田徹也、森本 洋

山上剛志、高橋洋平、橋本恭奈、武差愛実 (青森県環境保健センター)

高橋陽子、佐藤千鶴子、小林妙子 (宮城県保健環境センター)

倉園貴至 (埼玉県衛生研究所)

小西典子 (東京都健康安全研究センター)

間 京子、安藤直史、榎本啓吾、横山栄二 (千葉県衛生研究所)

古川一郎、政岡智佳 (神奈川県衛生研究所)

松本裕子、小泉充正、吉野友章 (横浜市衛生研究所)

柳本恵太 (山梨県衛生環境研究所)

木全恵子、前西絵美、加藤智子、磯部順子 (富山県衛生研究所)

綿引正則

東方美保、永田暁洋、横山孝治、芦田澄江 (福井県衛生環境研究センター)

岩崎理美、児玉 佳

柴田伸一郎 (名古屋市衛生研究所)

坂田淳子、西嶋駿弥、梅川奈央、下島晶子 (大阪健康安全基盤研究所)

高橋佑介、若林友騎、河原隆二

福田弘美、東野和直 (堺市衛生研究所)

吉田孝子 (奈良県保健研究センター)

齋藤悦子、荻田堅一、坂野 桂、秋山由美 (兵庫県立健康科学研究所)

川上優太、小谷麻祐子、林 宏樹 (島根県保健環境科学研究所)

川瀬 遵

狩屋英明、森本晃司、仲 敦史 (岡山県環境保健センター)

清水裕美子、佐藤香緒里、池田伸代、 (広島市衛生研究所)

末永朱美、山本泰子、青田達明、竹原佑美

福田千恵美、関 和美、岩下陽子、 (香川県環境保健研究センター)

多田郁美

大羽広宣、藤崎道子、有川衣美、 (北九州市保健環境研究所)

村瀬浩太郎

鈴木仁人、松井真理、鈴木里和、甲斐明美 (国立感染症研究所)

青木紀子、浅野由紀子、氏家絢子 (愛媛県立衛生環境研究所)

矢儀田優佳、山下育孝、木村千鶴子、

阿部祐樹、青野 学、仙波敬子

研究要旨

薬剤耐性菌を制御するためには、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘル
ス・アプローチが重要である。平成 30～令和 2 年度に、地研ネットワークの協力に

より、ヒト及び食品由来サルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて薬剤耐性状況を調査した。前回の研究班での分離株と合わせ、サルモネラに関しては、2015年～2020年に分離されたヒト由来 1,947 株中の 774 株(39.8%)、及び食品由来 715 株中の 651 株(91.0%)が、17 剤中の 1 剤以上に耐性を示した。年次毎の耐性率はほぼ同様であり、現在の日本の状況を反映していると考えられる。2015 年～2020 年分離のサルモネラについて血清型別の詳細な解析を行ったところ、食品由来株では血清型別の耐性傾向に共通する部分が多いがそれぞれに特徴的な点も認められ、ヒト由来株においては血清型別に特徴的な耐性傾向が認められた。また、ヒト由来株のうち食品からも分離された血清型、*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* ではヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。一方、大腸菌については、2015 年～2020 年分離のヒト由来 1,852 株中の 658 株(35.5%)、及び食品由来 96 株中の 51 株(53.1%)が 1 剤以上に耐性を示した。腸管出血性大腸菌(EHEC)以外の下痢原性大腸菌の耐性率が EHEC よりも 2 倍以上高かったが、多剤耐性状況は両者で類似していた。その他の大腸菌（病原因子陰性株など）は 6 剤以上の多剤耐性株が多く、下痢原性大腸菌よりも高度の多剤耐性傾向を示した。カンピロバクターについては、本研究班で作成した全国地研で共通のプロトコル及び判定表を基に、感受性検査と判定を行った。2018 年～2020 年分離の *C. jejuni* と *C. coli* はともにヒト由来株と食品由来株の耐性傾向に強い類似性があり、食品由来耐性菌とヒト由来耐性菌との関連が強く示唆された。以上の薬剤感受性検査に加えて、2015 年～2019 年分離のサルモネラと大腸菌を対象に、基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(ESBL)産生遺伝子、AmpC 型 β -ラクタマーゼ(AmpC)遺伝子、コリスチン耐性遺伝子(*mcr1-10*)の検出を行った。食品由来菌の薬剤耐性調査に関して、統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本研究班で実施されている。これらのデータは、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」及び WHO の GLASS に提供されている。また、JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、ワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

A. 研究目的

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

地方衛生研究所（以下、地研）は、従来から食中毒原因菌等の食品由来細菌の検査を実施しており、当分担班は、全国の地研において収

集されているヒト及び食品由来細菌の薬剤耐性の動向調査を担当している。

平成 30～令和 2 年度に、ヒト及び食品から分離されたサルモネラ、大腸菌、カンピロバクターの薬剤耐性状況を、全国で統一されたプロトコルや判定表に基づいて実施し、食品由来耐性菌に関する情報収集体制をさらに強固にすることを目指した。得られたデータは、WHO グローバルアクションプランの一環として展開されている、GLASS(Global Antimicrobial Resistance Surveillance System)に報告する日本のデータベース構築に提供されるとともに、我が国の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書」に提供され、延いては、ワンヘルス・アプローチに基づく薬剤耐性制御に繋がることが期待される。

B. 研究方法

1. 薬剤耐性調査対象菌株

薬剤感受性検査としては、2018 年～2020 年

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

2. 薬剤感受性検査

協力 23 地研においてサルモネラ属菌（非チフス性）、大腸菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリと判定された菌株を用い、サルモネラと大腸菌については、前回研究班の平成 29 年度研究報告書に記載した方法にしたがい、カンピロバクターについては、末尾に添付した「渡邊班地研グループ薬剤感受性検査プロトコル及び判定表（カンピロバクター）」にしたがって、薬剤感受性検査と判定を実施した。これらの検査に用いる感受性ディスク等の試薬、ディスクディスペンサーやノギス等の器具は全ての地研で共通のものを用いた。寒天・血液寒天平板上の感受性ディスクの配置は、阻止円が融合しないように配置した。阻止円径を測定し、結果表に記入した。

3. 結果の報告・集計と解析

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

4. サルモネラの血清型別薬剤耐性解析

2015 年～2020 年分離のサルモネラを対象に、血清型別に各種抗菌剤に対する耐性率を解析し、血清型間で比較した。

5. β -ラクタマーゼ関連遺伝子の検出

基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBL) 産生遺伝子及び AmpC 型 β -ラクタマーゼ (AmpC) 遺伝子について、2015 年～2019 年分離サルモネラ及び大腸菌のうち、CTX, CAZ, CFX の 1 剤以上に耐性を示す菌株を対象に、末尾に添付した「渡邊班地研グループ ESBL, AmpC 遺伝子検査プロトコル」にしたがって検出を実施した。

6. コリスチン耐性遺伝子の検出

上述のように、コリスチンについては感受性試験のみから SIR 判定ができないため、コリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*10*)のマルチプレックス PCR 法を開発し、2015 年～2019 年分離のサルモネラ株及び大腸菌のうちコリスチン阻止円径が 12 mm 以下の菌株を対象に、末尾に添付した「渡邊班地研グループコリスチン耐性遺伝子検査プロトコル」にしたがって検出を行った。

倫理面への配慮

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

C. 研究結果

1. ヒト及び食品から分離されたサルモネラの内訳と血清型

2015 年～2020 年に収集されたサルモネラは、ヒト由来 1947 株、食品由来 715 株、総計 2662 株で、それぞれの内訳と耐性率を表 1 及び表 2 に示す（株数は 2021 年 2 月 28 日までに集計された暫定的なものである）。1 剤以上に耐性を示した菌株の割合（耐性率）は、ヒト由来株 39.8%、食品由来株 91.0%で、本研究班のこれまでの結果と同様であった。2015 年～2020 年に収集されたサルモネラの H 抗原を含めた血清型別の割合とヒト由来株の上位 10 血清型及び食品由来株の上位 5 血清型を図 1 に示す。図中の「その他」についても大部分は型別されている。

2. ヒト及び食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性状況

2015 年～2020 年に収集されたヒト由来 1,947 株及び食品由来 715 株の 17 剤に対する耐性率を年次別に示す (表 3, 4)。ヒト由来株、食品由来株ともに、TC, SM に対する耐性率が最も高く、ABPC, KM, NA がそれらに続く耐性率であったが、KM, SM, TC, ST は食品由来株で耐性率が高い傾向が見られた。セフェム系薬 CTX, CAZ, CFX 耐性も数%認められ、食品由来株でやや高い傾向であった。一方、アミノグリコシド系薬 GM, AMK、キノロン系薬 CPMX, NFX, FPMX に対する耐性率は低いか、0%であった。カルバペネム系薬 IPM, MEPM に対する耐性菌はほとんど認められなかった。全体として、年次別に顕著な違いは認められなかった。6 剤以上に耐性を示した多剤耐性株 (ヒト由来 37 株、食品由来 61 株) を、それぞれ図 2、図 3 に示す。

3. ヒト及び食品から分離されたサルモネラの血清型別の耐性率の比較

2015 年～2020 年に収集されたサルモネラについて血清型別の詳細な解析を行った。食品由来株 (715 株) において、*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* は、これらで全体の約 8 割を占め、国産鶏肉から検出される主要な血清型と考えられる。*S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* の各種抗菌剤に対する耐性率を年次別に示す (表 5, 6)。また、2015 年～2020 年に収集された *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* の計 577 株の耐性率を図 4 に示す。これらの菌株には共通する点が多いが、それぞれの血清型に特徴的な点も認められた。すなわち、*S. Infantis* では CTX, CAZ, CFX 耐性が認められたが、*S. Schwarzengrund* ではほとんど認められなかった。また、*S. Manhattan* では他の 2 種の血清型と異なり、KM 耐性が認められなかった。以上の傾向は全体としては、各年次の分離株で同様の傾向を示したが、2020 年では 3 種の血清型中の *S. Schwarzengrund* 株数の割合が特に高いことや *S. Infantis* の耐性率がやや低いことなどは、これまでと異なる傾向である。

一方、ヒト由来株の上位 5 位を占める、*S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Thompson*, *S. 4:i:-*, *S. Saintpaul* の各種抗菌剤に対する耐性率を年次別に示す (表 7, 8, 9, 10, 11)。それぞれの血清型で多少の年次間の増減は認められるが、全

体的傾向として血清型別の耐性率に興味深い特徴が認められた。上記 5 種の血清型に *S. Schwarzengrund* を加えた 6 種の血清型株 (2015 年～2020 年分離 1025 株) について相互に比較した (図 5)。*S. 4:i:-* は国産鶏肉からの検出率は低いヒト由来株では主要な血清型の一つで、ABPC, SM, TC に対する耐性率が高かった。国産鶏肉由来株の主な血清型である *S. Infantis* と *S. Schwarzengrund* では ABPC 耐性率は低い SM, TC 耐性率は高かった。一方、鶏肉よりも鶏卵から分離される *S. Enteritidis* では SM, TC 耐性率は低く、本調査において食品からは分離されなかった *S. Saintpaul* 及び *S. Thompson* においても SM, TC 耐性率は低かった。このような傾向は、各年次の分離株で同様の傾向を示した。

次に、2015 年～2020 年分離株について、ヒト由来株と食品由来株の両方で認められ、かつ食品由来株の主要な血清型である *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* について、各種抗菌剤に対する耐性率を比較すると (表 12, 図 6)、両血清型ともヒト由来株と耐性傾向が非常に類似していた。この点についても、各年次の分離株で同様の傾向を示した。

4. ヒト及び食品から分離された大腸菌の薬剤耐性状況

本研究における大腸菌の分類を表 13 に示す。2015 年～2020 年分離のヒト由来大腸菌 1,852 株のうち、17 剤中の 1 剤以上に耐性を示した株は 658 株で、耐性率は 35.5%であった (表 14)。大腸菌株の分類別耐性率は、EHEC 27.6%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 70.6%、その他 72.1%であり、EHEC 以外の下痢原性大腸菌株の耐性率が EHEC 株よりも 2 倍以上高かった。一方、食品 (牛肉、鶏肉など) 由来株 96 株のうち、51 株が 1 剤以上に耐性で、耐性率は 53.1%であった。分類別耐性率は、EHEC 29.4%、EHEC 以外の下痢原性大腸菌 62.9%であった。

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

ヒト由来株のうち、17 剤中の 1 剤以上に耐性を示した EHEC 以外の下痢原性大腸菌の頻度は EHEC より 2 倍以上高かったが (表 14)、多剤耐性傾向については両者間で大きな差がなく、一方、その他の大腸菌では、下痢原性大腸菌と比べて 7 剤～12 剤の多剤耐性株の頻度が高かった (図 7)。各種抗菌剤に対する耐性率

では、ABPC, ST, CTX, NA 及びキノロン系薬 CFPX, NFLX に対して、EHEC 以外の下痢原性大腸菌が EHEC よりも耐性率が高く、その他の大腸菌はセフェム系薬、キノロン系薬、カルバペネム系薬 MEPM 等に耐性を示し、高度の耐性傾向を示した (図 8)。

6. ヒト及び食品から分離されたカンピロバクターの薬剤耐性状況

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

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

ESBL 産生遺伝子及び AmpC 遺伝子の検出方法を図 10 に示す。2015 年～2020 年分離のサルモネラ中で、ESBL 産生菌及び AmpC 産生菌との関連が示唆される、CTX, CAZ, CFX の 1 剤以上に耐性である菌株は、ヒト由来 41 株、食品由来 46 株であった (図 11 左)。このうち、2015 年～2019 年分離のヒト由来 39 株と食品由来 39 株中の ESBL 産生遺伝子及び AmpC 遺伝子を調べると、ヒト由来株では ESBL 産生遺伝子保有が多く、食品由来株では AmpC 遺伝子保有が多い傾向が認められた (図 11 右)。ESBL 産生遺伝子では、ヒト由来株、食品由来株とも、CTX-M-1 グループの保有が多く、TEM 型が次に多かった。

一方、大腸菌では、EHEC と下痢原性大腸菌では CTX 単剤耐性が多く、その他の大腸菌では 3 剤耐性が多かった (図 12 左)。これらの遺伝子を調べると、サルモネラと異なり、AmpC 遺伝子の保有がほとんど認められず、ESBL 産生遺伝子が主として検出された。さらに、大腸菌の種類毎に保有する ESBL 産生遺伝子が異なり、その他の大腸菌では CTX-M-9 グループ、CTX-M-2 グループ、TEM 型が多く検出され、他方、EHEC では CTX-M-1 グループ、TEM 型は検出されたが、CTX-M-9 グループ、CTX-M-2 グループはほとんど検出されなかった (図 12 右)。

8. サルモネラ及び大腸菌におけるコリスチン耐性遺伝子保有状況

コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1-10* を検出する

ための multiplex PCR 法を開発した (添付プロトコル)。この方法により、2015 年～2019 年分離サルモネラのヒト由来株と食品由来株中でコリスチンに対する阻止円径が 12 mm 以下の菌株を対象にコリスチン耐性遺伝子の検出を実施した (表 16a)。ヒト由来株から *mcr-1* グループ (2 株)、食品由来株から *mcr-5* (1 株) が、それぞれ検出された (表 16b)。一方、ヒト由来大腸菌から *mcr-1* グループ (2 株：EHEC と下痢原性株) が検出されたが (表 16d)、食品由来大腸菌からは検出されなかった。

D. 考察

全国 23 地研の協力を得て、2015 年～2020 年にヒト (有症者、大部分は便検体) 及び食品 (大部分は国産鶏肉) から分離されたサルモネラの薬剤耐性状況を調査したところ、ヒト由来株 (1947 株) は 39.8%、食品由来株 (715 株) は 91.0% が、1 剤以上の抗菌剤に耐性を示した。2015 年～2020 年の年次毎の耐性率はほぼ同様に、現在の日本における状況を反映していると考えられる。ヒト由来株の血清型は非常に多様で多くの型が含まれていたが、食品由来株は 5 種類の型が 85% を占め、ある程度限定された血清型が養鶏場等で定着している可能性が示唆された。

多剤耐性状況については、6 剤以上に耐性を示す高度耐性株も、ヒト由来株中に 37 株、食品由来株中 61 株認められた。高度の多剤耐性株ではプラスミドのゲノム解析やその伝達リスクについて調査する必要がある。

2015 年～2020 年に分離されたサルモネラを対象に血清型別の耐性率パターンを解析すると、食品由来 (主として国産鶏肉) 株として主要な *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* では、各種抗菌剤に対する耐性率に共通する部分が多いが、血清型に特徴的な点も認められた。例えば、*S. Manhattan* では KM 耐性が全く認められなかった。このような違いは養鶏場等での使用抗菌剤の種類を反映しているのかもしれない。一方、ヒト由来株においては、血清型別の耐性率に特徴的な点が認められた。それぞれの血清型において、ヒトの感染に至るまでの生息環境における抗菌剤への暴露の違いを反映しているのかもしれない。鶏肉から分離される *S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* は耐性率が高い傾向であった。今回の調査で鶏肉から分離されないか、分離が少ない血清型、*S. Enteritidis*, *S. Thompson*, *S. 4:i:-*, *S. Saintpaul* では、*S. 4:i:-*

を除いて各種抗菌剤に対する耐性率があまり高くない傾向であったが、*S. flexneri* は ABPC, SM, TC に対して耐性率が高く、抗菌剤を投与される食用鶏以外の保菌動物の存在が示唆される。

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

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

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

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

高くないが、サルモネラから 3 株、大腸菌から 2 株検出された。

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

E. 結論

全国 23 地研の協力を得て、2015 年～2020 年に分離されたヒト及び食品由来のサルモネラ、大腸菌、カンピロバクターについて薬剤耐性状況を調査し、耐性データを解析した。食品由来菌の薬剤耐性調査に関して、統一された方法による組織だった全国規模の調査は、本研究班で実施されている。地研における薬剤耐性データを JANIS や JVARM など既存の薬剤耐性データベースと統合し一元化することも本研究班で可能となり、環境—動物—食品—ヒトを包括するワンヘルス・アプローチに基づく感染制御に繋がることが期待される。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記載)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakabayashi Y, Sekizuka T, Yamaguchi T, Fukuda A, Suzuki M, Kawahara R, Taguchi M, Kuroda M, Semba K, Shinomiya H, Kawatsu K. Isolation and plasmid characterisation of *Salmonella enterica* serovar Albany harbouring mcr-5 from retail chicken meat in Japan. FEMS Microbiol Lett. 2020 Aug 1;367(15):fnaa127.

2. 学会発表

- 1) 四宮博人：食品由来細菌の薬剤耐性モニ

タリング—特にサルモネラ属菌について、シンポジウム「薬剤耐性ワンヘルスアプローチ」第71回日本細菌学会中国・四国支部総会、2018.10.6-7、松山

- 2) Yuki Abe, Tsuyoshi Sekizuka, Sachiyo Sonobe, Keiko Semba, Manabu Aono, Makoto Kuroda and Hiroto Shinomiya: A megaplasmid carrying multidrug-resistance genes in *Salmonella* Infantis isolated from patients and broiler meat. 第92回日本細菌学会総会、2019.4.23-25、札幌
- 3) Keiko Semba, Yuki Abe, Sachiyo Sonobe, Manabu Aono, Komei Shirabe, Akei Kai, Keigo Shibayama, Makoto Onishi, Haruo Watanabe and Hiroto Shinomiya: Monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* spp. of food origin from 2015–2017 in Japan. 第92回日本細菌学会総会、2019.4.23-25、札幌
- 4) 四宮博人、浅野由紀子、木村千鶴子、阿部祐樹、森本 洋、高橋洋平、小林妙子、倉園貴至、小西典子、榎本啓吾、政岡智佳、吉野友章、柳本恵太、加藤智子、東方美保、一瀬佳美、柴田伸一郎、高橋佑介、福田弘美、吉田孝子、秋山由美、川瀬 遵、狩屋英明、清水裕美子、福田千恵美、中山志幸、大羽広宣、調 恒明、甲斐明美:2015年～2018年に全国で分離されたヒト及び食品由来各種大腸菌株の薬剤耐性状況、第23回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2019.11.14-15、松山
- 5) 阿部祐樹、木村千鶴子、浅野由紀子、山下育孝、四宮博人: 地方衛生研究所におけるヒト及び食品由来薬剤耐性菌のモニタリング、シンポジウム「地方衛生研究所との連携強化」第94回日本感染症学会総会、2020.8.19-21、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

渡邊班地研グループ薬剤耐性菌検査プロトコル（カンピロバクター）

1. 検査項目

薬剤感受性試験

2. 検体の種類・適用範囲

ヒトおよび食品由来 *Campylobacter jejuni/coli* と判定された菌株

3. 検査法

CLSI 法に準拠したディスク拡散法

4. 実施場所・作業環境

BSL2 かつ管理区域内

5. 検査に使用する試薬及び器具・器材等

1) 試薬・培地等

- ① 薬剤感受性用寒天平板培地：5%羊（馬）脱線維血液加 Mueller-Hinton agar
- ② 菌液調整用：滅菌生理食塩水
- ③ 薬剤ディスク：BD センシディスク
エリスロマイシン（EM）、テトラサイクリン（TC）、セファロチン（CET）
シプロフロキサシン（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、アンピシリン（ABPC）
- ④ 薬剤感受性試験用標準菌株
Staphylococcus aureus ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922

2) 器具・器材等

- ① 白金線，白金耳
- ② センシ・ディスク・ディスペンサー
- ③ ノギス
- ④ 滅菌綿棒
- ⑤ 滅菌ピンセット
- ⑥ ふ卵器：通常のふ卵器の場合は、市販の微好気用ガスキットを利用する。または、微好気培養のできるふ卵器を用いる。
- ⑦ McFarland No.0.5 標準比濁系

6. 操作上の注意について

1) 菌株について

前日に供試菌株を非選択分離培地に分離培養し、1 種類の菌であることを確認した上で使用する。

2) 試薬について

室温に戻してから使用すること。

7. 測定（操作）方法

1) 接種菌液の調整

非選択培地に分離した菌株（36～37℃・48 時間，または 42℃・24 時間培養菌）を滅菌生理食塩水に懸濁し，McFarland 0.5 に調整する。

2) 接種・培養

- ① 調整菌液に滅菌綿棒を浸し，余液を試験管壁で取り除く。ただし，*Campylobacter* 属菌は乾燥に弱いので，固く絞り過ぎないこと。
- ② 5% 羊（馬）脱線維血液加 Mueller-Hinton agar に塗抹する。平板を約 60° ずつ回転させた位置から，3 回塗抹する。綿棒に菌液をつけるのは最初に行った 1 回でよい。
- ③ ディスクディスペンサーを用いてディスクを置く（ディスク配置図参照）。42℃・24 時間，微好気培養する。

注意：①から③の操作は，出来るだけ迅速に行う。菌を塗抹した寒天平板培地を長時間大気中に置かないようにする。

3) 測定

培養後，シャーレの蓋を取って，表から観察し，ディスク周囲に形成された阻止円直径を測定する。

カンピロバクター薬剤耐性判定表（H30-R2 渡邊班地研グループ）

感受性ディスク名	CLSI* または参考値**			標準株***	
	耐性(R) ($\leq$ mm)	中間(I) (mm)	感受性 (S) ($\geq$ mm)	<i>S. aureus</i> ATCC259 23	<i>E.coli</i> ATCC259 22
エリスロマイシン(EM)*	12	13-15	16	22-30	–
テトラサイクリン(TC)*	22	23-25	26	24-30	–
セファロチン(CET)**	阻止円なし (6 mm)	–	–	29-37	–
シプロフロキサシン(CPFX)*	20	21-23	24	22-30	–
ナリジクス酸(NA)**	13	14-18	19	–	22-28
アンピシリン(ABPC)**	13	14-16	17	27-35	–

・判定については感受性ディスク添付文書を参照のこと

* CLSI M45 3rd. ed, 2016

**CET 以外 : T. Luangtongkum *et al.* J.Clin.Microbiol. 45(2): 590-4, 2007; CET: 本研究班

****S. aureus* ATCC25923: CLSI M45 3rd. ed, 2016; *E. coli* ATCC25922: CLSI M100-S23.

ミューラーヒントン寒天培地(血液添加なし)を用い、36～37℃、16～18 時間、好気培養

渡邊班地研グループ ESBL 遺伝子検査プロトコル

1 検査概要

(1) 検査項目

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

(2) 方法

マルチプレックス PCR 法

(3) 検体の種類・適用範囲

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

2 試薬等 (全てヌクレアーゼフリーの遺伝子検査用を使用)

- ・ dH₂O
- ・ Qiagen Multiplex PCR kit Cat No./ID : 206151/206152 キアゲン(株)
- ・ Mix 2μM プライマー (表 1)
- ・ Chelex 100 Resin #142-1253 Bio-Rad(株)
- ・ TE バッファー
- ・ Mix 陽性コントロール (表 2)
- ・ 陰性コントロール (dH₂O)
- ・ アガロースゲル (100~1kbp 程度の分子量用)
アガロース(低電気浸透、高ゲル強度),(微粉末) 商品コード : 02468-66 カライテスク(株) 同等品
- ・ 電気泳動用 Buffer
- ・ EtBr 溶液

表 1 ESBL 遺伝子検査用プライマー一覧

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

表 2 ESBL 遺伝子検査用陽性コントロール一覧

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

3 検査手順

(1) 鋳型 DNA の調整

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

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

(2) PCR 反応液の調整

ア PCR マスターミックスの調整

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

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

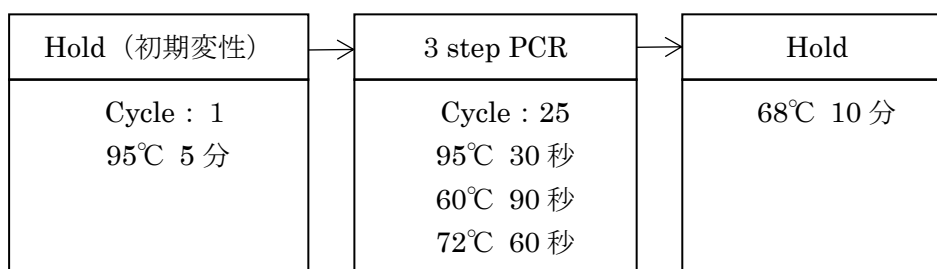
イ 鋳型 DNA 等の添加

- (ア) PCR マスターミックスを分注した PCR 用チューブに陰性コントロール（dH₂O）、鋳型 DNA、陽性コントロールを各 1μL 添加する。
* 送付した陽性コントロールをそのまま使用されますと、バンドがシャープにならず、エキストラバンドかなり濃くでます。適宜 TE 等で希釈して使用してください。
- (イ) PCR を行う。

(3) PCR

以下の条件で PCR を開始する。

(PCR 時間：1 時間 51 分程度 Bio-Rad T100 使用)



(4) 増幅産物の電気泳動

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

4 検査結果報告方法

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

5 参考文献

Quoc Phong Le,1 Shuhei Ueda, Thi Ngoc Hue Nguyen, Thi Van Khanh Dao, Thi Ai Van Hoang, Thi Thuy Nga Tran, Itaru Hirai, Tatsuya Nakayama, Ryuji Kawahara, Thai Hung Do, Quang Mai Vien, Yoshimasa Yamamoto. Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli in Retail Meats and Shrimp at a Local Market in Vietnam. Foodborne Pathog Dis 2015; 12(8):719-725.

6 備考

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

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

渡邊班地研グループ AmpC 遺伝子検査プロトコル

1 検査概要

(1) 検査項目

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

(2) 方法

マルチプレックス PCR 法

(3) 検体の種類・適用範囲

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

2 試薬等 (全てヌクレアーゼフリーの遺伝子検査用を使用)

- ・ dH₂O
- ・ Qiagen Multiplex PCR kit Cat No./ID : 206151/206152 キアゲン(株)
- ・ Mix 2μM プライマー (表 1)
- ・ Chelex 100 Resin #142-1253 Bio-Rad(株)
- ・ TE バッファー
- ・ Mix 陽性コントロール (表 2)
- ・ 陰性コントロール (dH₂O)
- ・ アガロースゲル (100~1kbp 程度の分子量用)
アガロース(低電気浸透、高ゲル強度),(微粉末) 商品コード : 02468-66 サライテスク(株) 同等品
- ・ 電気泳動用 Buffer
- ・ EtBr 溶液

表 1 AmpC 遺伝子検査用プライマー一覧

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

表 2 AmpC 遺伝子検査用陽性コントロール一覧

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

3 検査手順

(1) 鋳型 DNA の調整

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

(2) PCR 反応液の調整

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

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

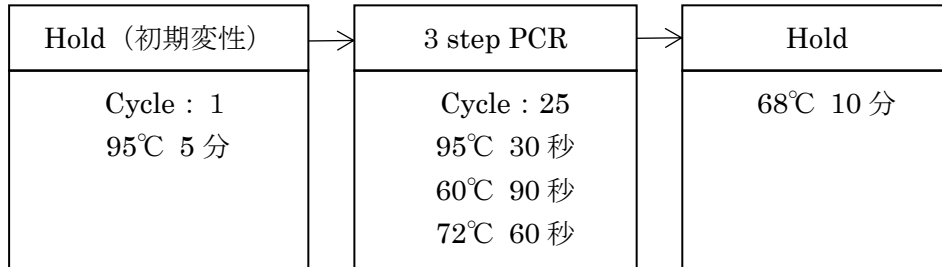
イ 鋳型 DNA 等の添加

- (ア) PCR マスターミックスを分注した PCR 用チューブに陰性コントロール (dH₂O)、鋳型 DNA、陽性コントロールを各 1μL 添加する。
- (イ) PCR を行う。

(3) PCR

以下の条件で PCR を開始する。

(PCR 時間：1 時間 51 分程度 Bio-Rad T100 使用)



(4) 増幅産物の電気泳動

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

4 検査結果報告方法

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

5 参考文献

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

6 備考

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

渡邊班地研グループコリスチン耐性遺伝子検査プロトコル

1 検査概要

(1) 検査項目

コリスチン耐性遺伝子検査

(2) 検体の種類・適用範囲

ヒト（有症者）及び食品由来サルモネラ属菌及び大腸菌（下痢原性大腸菌を含む）のうち、薬剤感受性試験においてコリスチン阻止円径が 11mm 以下及び 12mm の菌株

2 試薬等（全てヌクレアーゼフリーの遺伝子検査用を使用）

・ dH₂O

・ Qiagen Multiplex PCR Plus kit Cat No./ID : 206151/206152 キアゲン(株)

・ Mix 100μM プライマー（表 1）

・ Chelex 100 Resin #142-1253 Bio-Rad(株) 同等品

・ TE バッファー

・ Mix 陽性コントロール

感染研分与 PC-DNA を各 10,000 倍希釈し、等量混合したもの。

・ 陰性コントロール（dH₂O）

・ アガロースゲル（100~1kbp 程度の分子量用）

アガロース(低電気浸透、高ゲル強度),(微粉末) 商品コード：02468-66 サライテスク(株) 同等品

・ 電気泳動用 Buffer

・ EtBr 溶液

表 1 プライマー一覧

<i>mcr</i> 遺伝子	Target		Primer	size(bp)
<i>mcr</i> -1 group	<i>mcr</i> -1, <i>mcr</i> -2, <i>mcr</i> -6	<i>mcr</i> -1G_722F	TGTTTCGTCGTCGGTGAGACG	205
		<i>mcr</i> -1G_926R	TGGTATTTGGCGGTATCGAC	
<i>mcr</i> -4	<i>mcr</i> -4	<i>mcr</i> -4_116	AACAACCAGAAGTTGATCCC	272
		<i>mcr</i> -4_387R	CCCAGTCAGCAGTAGATTGG	
<i>mcr</i> -5	<i>mcr</i> -5	<i>mcr</i> -5_112F	TGGAATGCCCTTCTTGCTGG	310
		<i>mcr</i> -5_421R	ACACGGATACGGCTGCAACC	
<i>mcr</i> -3 group	<i>mcr</i> -3, <i>mcr</i> -7	<i>mcr</i> -3G_848	GCATGTTCTCCAATATGGGG	427
		<i>mcr</i> -3G_1275	GAAATCGGTGTAGCGGATGG	
<i>mcr</i> -8	<i>mcr</i> -8	<i>mcr</i> -8_89F	CACTTTGGCAAACACTATGG	528
		<i>mcr</i> -8_616R	GGTAACCATTTCGTATTACGC	
<i>mcr</i> -9 group	<i>mcr</i> -9, <i>mcr</i> -10	<i>mcr</i> -9G_702F	GGTGATTGGCGAAACGGCAC	635
		<i>mcr</i> -9G_1337R	AGCAGCACGGTGTGTACTG	

3 検査手順

(1) 鋳型 DNA の調整

- ア 1.5mL チューブに 5% Chelex TE を 100 μ L ずつ分注する。
- イ ディスポニードルを用いて、平板上の単コロニーを釣菌し、アのチューブに懸濁する。
- ウ 100℃ 10 分加熱し、10,000rpm 10 分遠心して上清を鋳型 DNA とする。
鋳型 DNA は 4℃ で保存する（長期保存は -20℃）。

(2) PCR 反応液の調整

ア PCR マスターミックスの調整

- (ア) Qiagen Multiplex PCR Plus kit を用いる。
- (イ) 以下の分量で PCR マスターミックスを調整する。
- (ウ) 調整した PCR マスターミックスを PCR 用チューブに 9 μ L ずつ分注する。

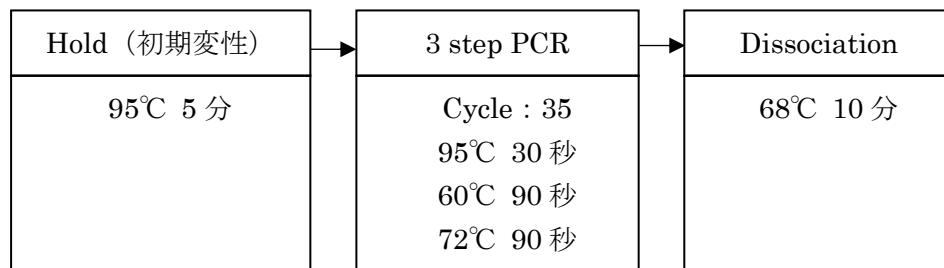
菌株数（調整反応液数）	最終濃度	1 反応液	10(12)	20(22)
2×Multiplex PCR Master mix (μ L)	× 1	5	60	110
プライマーミックス (2 μ L)	0.2 μ M	1	12	22
Q-Solution		1	12	22
CoralLoad Dye, ×10		1	12	22
dH ₂ O		1	12	22
合計液量 (μ L)		9	63.0	198.0

イ 鋳型 DNA 等の添加

- (ア) PCR マスターミックスを分注した PCR 用チューブに dH₂O、鋳型 DNA、Mix 陽性コントロールを各 1 μ L 添加する。
- (イ) チューブにキャップをし、卓上遠心機で遠心後、PCR 反応を行う。

(3) PCR 反応

以下の条件で PCR 反応を開始する。



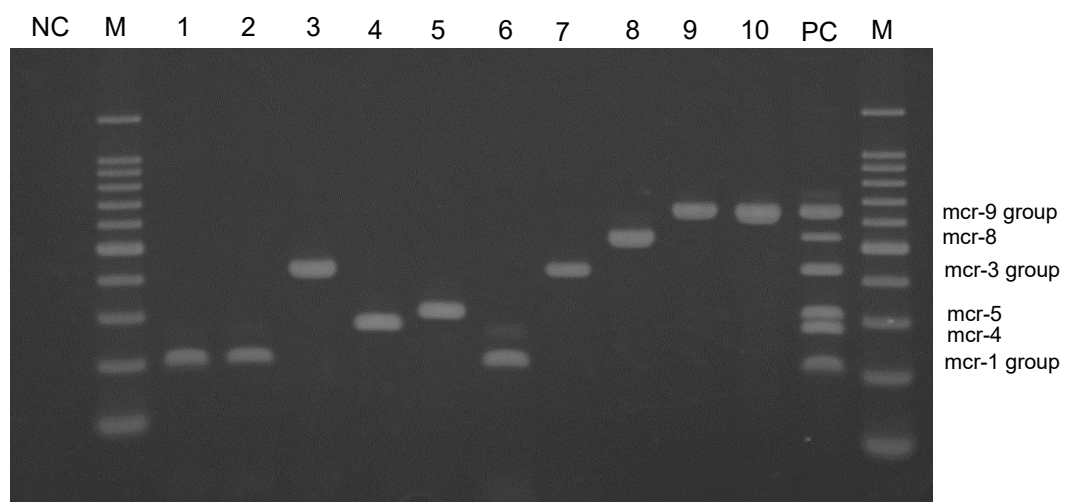
(5) 増幅産物の電気泳動

2.5%アガロースゲルで電気泳動（100V 30 分程度）を実施し、EtBr 染色を行う。

5 検査結果報告方法

結果報告は別添ファイル（コリスチン耐性遺伝子報告用）に入力して報告する。

参考資料：コリスチン耐性遺伝子マルチプレックス PCR 結果



- No.1 : mcr-1
- No.2 : mcr-2
- No.3 : mcr-3
- No.4 : mcr-4
- No.5 : mcr-5
- No.6 : mcr-6
- No.7 : mcr-7
- No.8 : mcr-8
- No.9 : mcr-9
- No.10 : mcr-10

表 1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の薬剤耐性状況
(2015-2020 年分離株* n=2662)

(2021/2/28 時点)

由来		菌株数	耐性菌株数 #	耐性率
ヒト由来		1947	774	39.8%
食品由来	国産鶏肉	633	581	91.8%
	外国産鶏肉	47	38	80.9%
	その他・不明	35	32	91.4%
	合計	715	651	91.0%

*各年の 1 月～12 月に分離された菌株

#17 抗菌剤中 1 剤以上に耐性(R)を示した菌株

表 2. ヒト由来サルモネラ株の検体別内訳と耐性率
(2015-2020 年分離株 n = 1947)

(2021/2/28 時点)

検体名	菌株数	耐性菌株数	耐性率
糞便・便	1571	634	40.4%
血液・静脈血	41	15	36.6%
尿・中間尿	37	14	37.8%
菌株	27	7	25.9%
膿	7	5	71.4%
喀痰	1	0	0.0%
胆汁	2	1	50.0%
その他	13	6	46.2%
不明・空白	248	92	37.1%
合計	1947	774	39.8%

図 1. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型(2015-2020 年分離株)

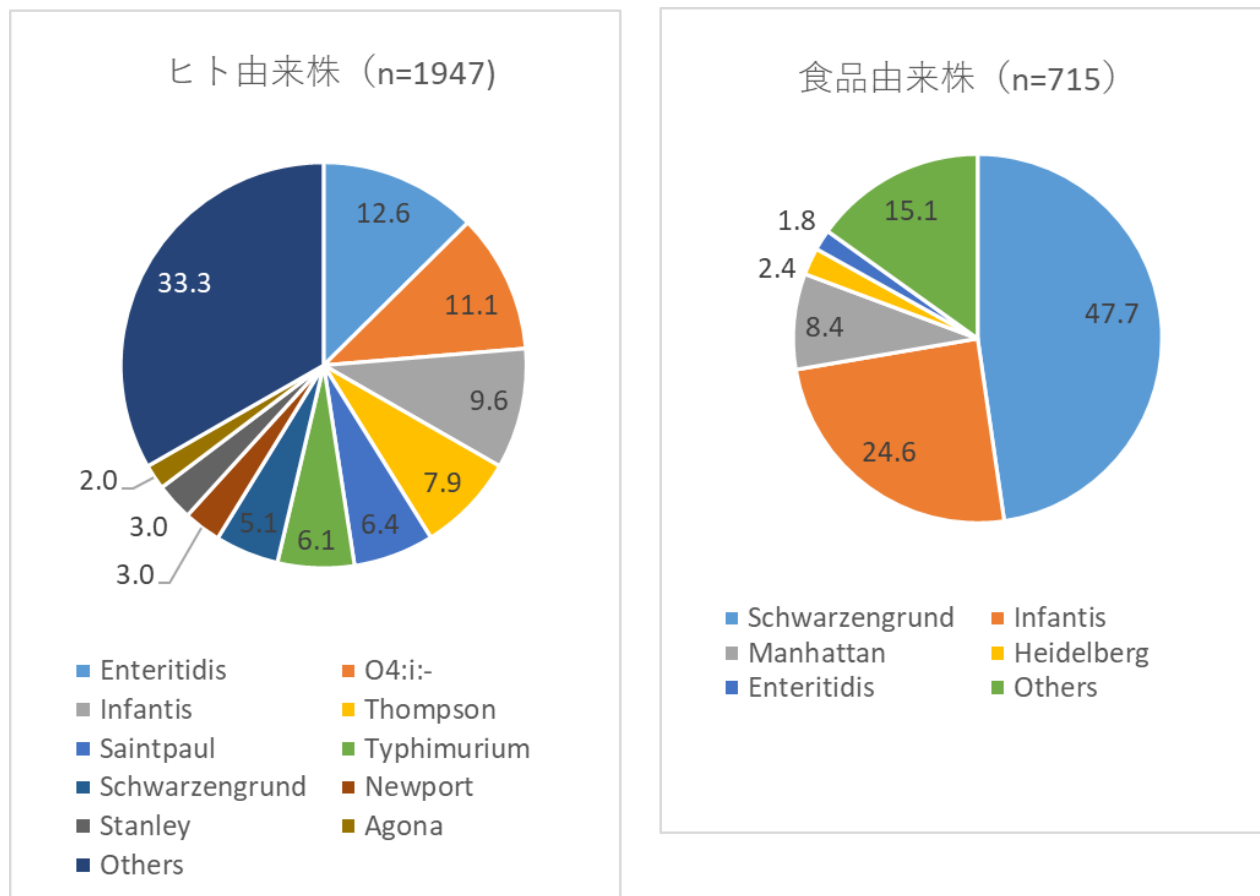


表 3. ヒト由来 non-typhoidal *Salmonella* spp の耐性率(2015-2020 年)

	2015 (n=387)	2016 (n=360)	2017 (n=409)	2018 (n=315)	2019 (n=265)	2020 (n=211)	計 (n=1947)
ABPC	17.3	18.1	15.6	19.4	14.7	14.7	16.8
GM	0.3	0.6	0.7	0.6	1.5	0.5	0.7
KM	5.9	11.7	7.3	8.3	6.4	6.2	7.8
SM	27.4	30.0	26.4	29.2	23.8	25.6	27.3
TC	32.6	29.2	27.1	25.4	22.6	26.1	27.6
ST	4.4	6.7	7.8	6.3	3.4	9.0	6.2
CP	2.3	6.4	5.1	6.0	5.3	5.2	5.0
CTX	0.3	2.5	3.2	3.2	1.5	0.9	2.0
CAZ	0.3	2.2	1.7	1.9	0.8	0.9	1.3
CFX	0.0	1.4	0.5	0.6	0.0	0.9	0.6
FOM	0.0	0.3	0.2	0.3	0.4	0.5	0.3
NA	7.0	8.1	8.8	5.7	4.2	5.2	6.8
CPFX	0.3	0.8	1.7	0.3	0.4	0.0	0.7
NFLX	0.3	0.8	0.5	0.0	0.8	0.0	0.4
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.1
1 剤以上耐性数	164	161	152	125	89	83	774
1 剤以上耐性率	42.4	44.7	37.2	39.7	33.6	39.3	39.8

各年 1 月～12 月に分離された菌株

表 4. 食品由来 non-typhoidal *Salmonella* spp の耐性率(2015-2020 年)

	2015 (n=156)	2016 (n=110)	2017 (n=86)	2018 (n=108)	2019 (n=126)	2020 (n=129)	計 (n=715)
ABPC	17.9	13.6	11.6	12.0	11.1	12.4	13.4
GM	0.0	0.9	1.2	0.0	0.0	0.0	0.3
KM	48.1	47.3	45.3	50.0	57.1	65.9	52.7
SM	82.7	70.9	69.8	77.8	64.3	70.5	73.1
TC	85.9	76.4	73.3	78.7	70.6	82.9	78.6
ST	19.9	16.4	12.8	38.0	25.4	24.8	23.1
CP	7.1	10.0	2.3	8.3	4.0	7.0	6.6
CTX	5.1	5.5	8.1	6.5	6.3	4.7	5.9
CAZ	4.5	6.4	8.1	6.5	4.8	3.9	5.5
CFX	2.6	3.6	8.1	4.6	5.6	5.4	4.8
FOM	0.0	0.9	1.2	0.0	0.0	0.0	0.3
NA	18.6	18.2	14.0	16.7	27.0	23.3	20.0
CPFX	0.0	0.9	1.2	0.0	0.0	0.0	0.3
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1 剤以上耐性数	143	96	77	98	113	124	651
1 剤以上耐性率	91.7	87.3	89.5	90.7	89.7	96.1	91.0

図 2.6 剤以上に耐性を示したヒト由来サルモネラ株(2015-2020 年分離 37 株)

分層年	案例 配比率	ABPC	GM	KM	SM	TC	ST	CP	CTX	CAZ	CFX	FOM	NA	CPFX	NFLX	AMK	IPM	MEPM
2018	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
2018	6	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S
2016	6	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2018	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2018	6	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	I	I	S	S	S	S
2017	6	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2016	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2017	6	R	S	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S
2019	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2020	6	R	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S
2020	6	R	S	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S	I	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	I	S	S	S	S
2017	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S
2017	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S
2017	7	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	S	S	S
2019	7	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	I	I	S	S	S	S
2019	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2020	7	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2016	8	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	I	S	S	S
2018	8	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2017	8	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	I	S
2017	8	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S
2017	8	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	I	S	S	S
2017	8	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S
2019	8	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	I	S	S	S	S
2020	8	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	R
2016	9	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S
2017	9	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2019	9	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S
2016	10	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	I	S
2016	10	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	S
2018	11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
2017	11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S

図 3.6 剤以上に耐性を示した食品由来サルモネラ株(2015-2020 年分離 61 株)

分層年	系列 屬性數	系列屬性																
		ABCP	GM	KM	SM	TC	ST	CP	CTX	CAZ	CFX	FOM	NA	CPFX	NFLX	AMK	IPM	MEPM
2015	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2015	6	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2016	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2017	6	R	R	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2017	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2017	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2017	6	R	S	R	S	R	I	S	I	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2017	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2018	6	R	S	R	R	R	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	I	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2018	6	S	S	R	R	R	S	R	S	S	I	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	I	R	S	S	R	R	R	I	R	I	S	S	S	S
2019	6	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
2019	6	R	S	S	I	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2019	6	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2020	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2020	6	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2020	6	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2020	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S
2020	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
2020	6	R	S	S	R	R	I	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2020	6	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2016	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2017	7	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2017	7	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
2017	7	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2018	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2019	7	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2020	7	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2020	7	R	S	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2015	8	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2016	8	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S
2016	8	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2016	8	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2018	8	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
2018	8	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2020	8	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S
2015	9	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S

表5. 食品由来 <i>S.Infantis</i> の耐性率 (2015-2020年)							
	2015 (n=65)	2016 (n=33)	2017 (n=19)	2018 (n=27)	2019 (n=24)	2020 (n=8)	計 (n=176)
ABPC	10.8	12.1	5.3	14.8	8.3	37.5	11.9
GM	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6
KM	46.2	42.4	15.8	33.3	37.5	62.5	39.8
SM	81.5	72.7	68.4	85.2	58.3	50.0	74.4
TC	89.2	81.8	68.4	85.2	58.3	37.5	78.4
ST	18.5	30.3	0.0	44.4	12.5	0.0	21.0
CP	3.1	3.0	0.0	0.0	0.0	12.5	2.3
CTX	4.6	6.1	5.3	11.1	8.3	12.5	6.8
CAZ	3.1	9.1	5.3	11.1	0.0	12.5	5.7
CFX	4.6	9.1	5.3	14.8	8.3	25.0	8.5
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	3.1	9.1	0.0	3.7	16.7	0.0	5.7
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表6. 食品由来 <i>S.Schwarzengrund</i> の耐性率 (2015-2020年)							
	2015 (n=47)	2016 (n=38)	2017 (n=45)	2018 (n=51)	2019 (n=66)	2020 (n=94)	計 (n=341)
ABPC	17.0	5.3	0.0	7.8	3.0	5.3	6.2
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	85.1	86.8	77.8	80.4	92.4	74.5	82.1
SM	93.6	78.9	82.2	76.5	74.2	79.8	80.4
TC	95.7	84.2	80.0	86.3	81.8	93.6	87.7
ST	36.2	18.4	24.4	56.9	43.9	29.8	35.5
CP	19.1	13.2	4.4	9.8	6.1	5.3	8.8
CTX	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	1.1	0.6
CAZ	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.3
CFX	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0	1.1	0.6
FOM	0.0	2.6	2.2	0.0	0.0	0.0	0.6
NA	25.5	21.1	6.7	23.5	27.3	20.2	21.1
CPFX	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図 4. 主要な食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015-2020 年分離株 n = 577)

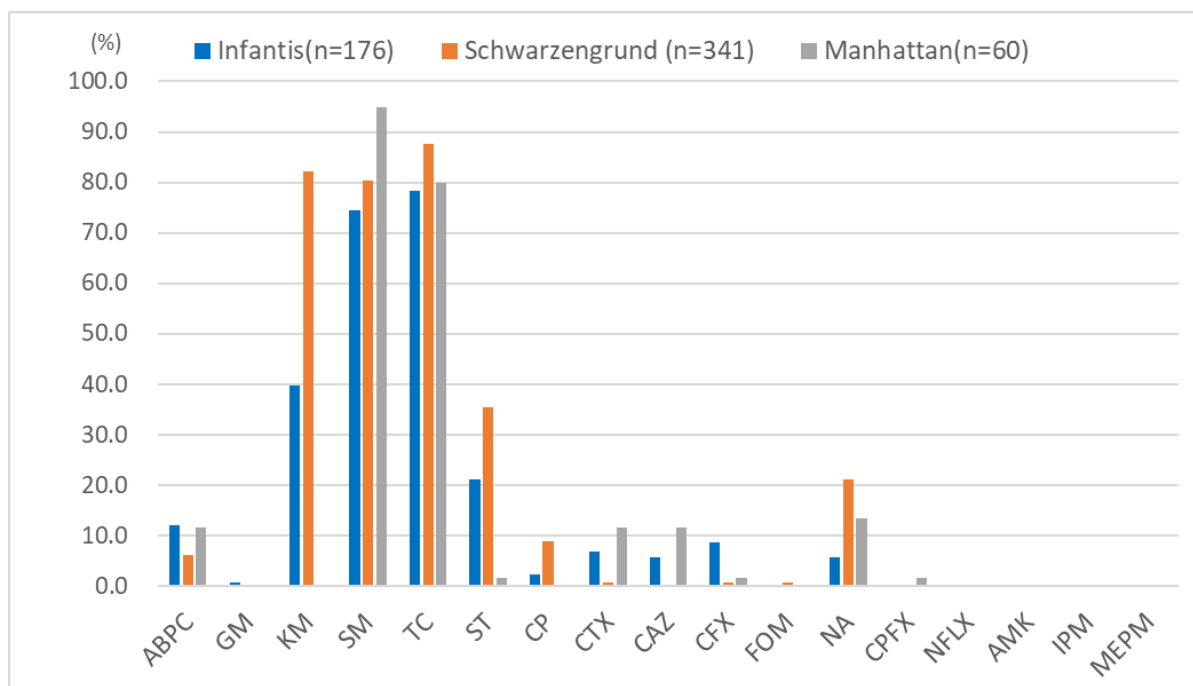


表7. ヒト由来 *S. Infantis* の耐性率 (2015-2020年)

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	計
	(n=34)	(n=48)	(n=48)	(n=22)	(n=16)	(n=19)	(n=187)
ABPC	0.0	2.1	0.0	9.1	6.3	5.3	2.7
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	20.6	14.6	6.3	22.7	12.5	5.3	13.4
SM	29.4	33.3	20.8	50.0	31.3	26.3	30.5
TC	47.1	33.3	22.9	54.5	37.5	47.4	37.4
ST	14.7	14.6	2.1	18.2	0.0	21.1	11.2
CP	0.0	0.0	0.0	9.1	6.3	5.3	2.1
CTX	0.0	0.0	0.0	4.5	6.3	5.3	1.6
CAZ	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.3	0.5
CFX	0.0	2.1	0.0	0.0	0.0	5.3	1.1
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	0.0	0.5
NA	8.8	4.2	8.3	0.0	12.5	5.3	6.4
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表8. ヒト由来 <i>S. Enteritidis</i> の耐性率 (2015-2020年)							
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	計
	(n=39)	(n=41)	(n=50)	(n=43)	(n=37)	(n=35)	(n=245)
ABPC	5.1	19.5	6.0	7.0	5.4	0.0	7.3
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	2.6	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
SM	12.8	12.2	14.0	14.0	5.4	2.9	10.6
TC	10.3	2.4	6.0	9.3	5.4	2.9	6.1
ST	5.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.7	1.6
CP	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
CTX	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
CAZ	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4
CFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FOM	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.4
NA	10.3	26.8	14.0	25.6	10.8	14.3	17.1
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表9. ヒト由来 <i>S. Thompson</i> の耐性率 (2015-2020年)							
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	計
	(n=28)	(n=28)	(n=30)	(n=29)	(n=27)	(n=11)	(n=153)
ABPC	0.0	10.7	0.0	0.0	7.4	0.0	3.3
GM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
KM	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
SM	7.1	7.1	3.3	6.9	0.0	0.0	4.6
TC	3.6	7.1	6.7	0.0	0.0	0.0	3.3
ST	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
CP	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
CTX	0.0	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0
CAZ	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
CFX	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
FOM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NA	0.0	0.0	0.0	3.4	0.0	0.0	0.7
CPFX	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
NFLX	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表10. ヒト由来 S. 4:i:- の耐性率 (2015-2020年)							
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	計
	(n=60)	(n=37)	(n=36)	(n=36)	(n=23)	(n=24)	(n=216)
ABPC	71.7	64.9	77.8	86.1	82.6	79.2	75.9
GM	1.7	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.9
KM	3.3	5.4	2.8	8.3	4.3	4.2	4.6
SM	73.3	70.3	80.6	91.7	82.6	70.8	77.8
TC	85.0	62.2	77.8	80.6	65.2	50.0	73.1
ST	5.0	10.8	5.6	8.3	8.7	0.0	6.5
CP	3.3	10.8	8.3	13.9	8.7	4.2	7.9
CTX	0.0	2.7	2.8	2.8	0.0	0.0	1.4
CAZ	0.0	2.7	2.8	0.0	0.0	0.0	0.9
CFX	0.0	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.5
FOM	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
NA	1.7	2.7	5.6	0.0	0.0	0.0	1.9
CPFX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
NFLX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表11. ヒト由来 S.Saintpaul の耐性率 (2015-2020年)							
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	計
	(n=27)	(n=26)	(n=42)	(n=10)	(n=8)	(n=12)	(n=125)
ABPC	7.4	7.7	14.3	10.0	0.0	8.3	9.6
GM	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.8
KM	0.0	3.8	4.8	0.0	0.0	0.0	2.4
SM	3.7	3.8	11.9	0.0	0.0	8.3	6.4
TC	40.7	15.4	21.4	10.0	12.5	25.0	23.2
ST	0.0	11.5	16.7	10.0	12.5	8.3	10.4
CP	3.7	0.0	14.3	0.0	12.5	0.0	6.4
CTX	0.0	0.0	11.9	0.0	0.0	0.0	4.0
CAZ	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.8
CFX	0.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
FOM	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.8
NA	7.4	3.8	19.0	0.0	0.0	0.0	8.8
CPFX	3.7	0.0	9.5	0.0	0.0	0.0	4.0
NFLX	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
AMK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

図 5. 主要なヒト由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015-2020 年分離株 n = 1025)

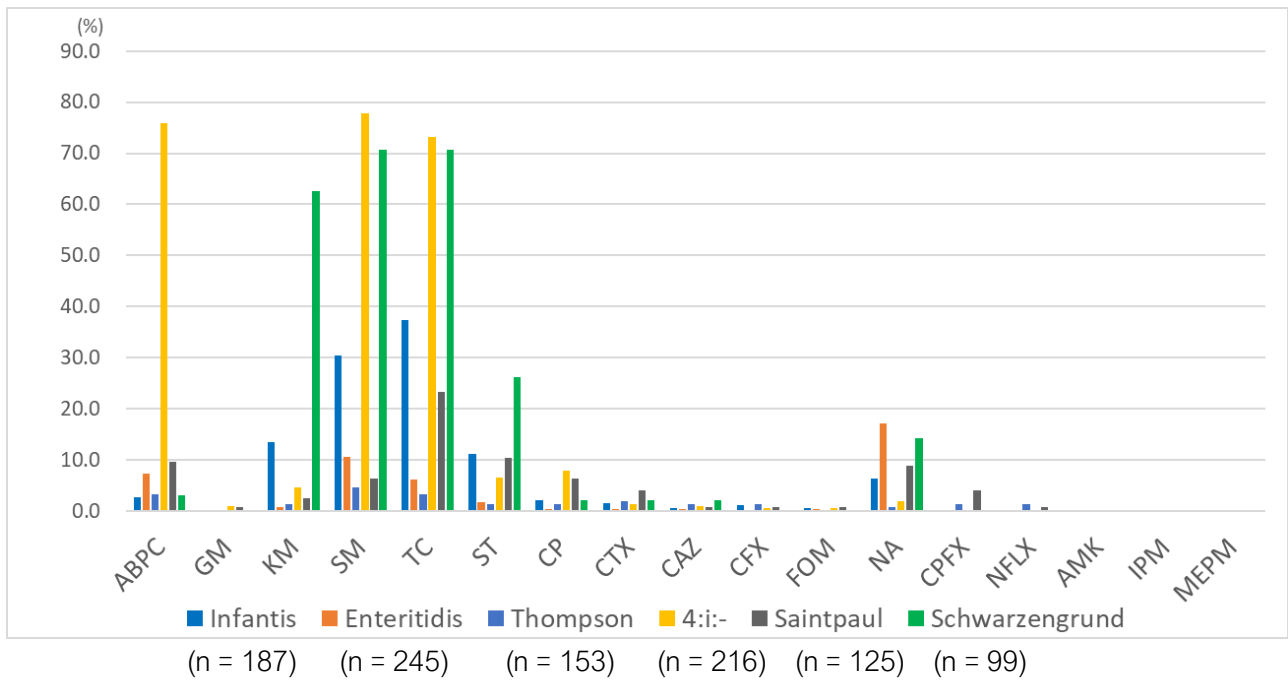


表12. ヒト及び食品から検出される *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Manhattan* の耐性率 (2015-2020年)

	Infantis			Schwarzengrund			Manhattan	
	ヒト (n=187)	食品 (n=176)		ヒト (n=98)	食品 (n=341)		ヒト (n=45)	食品 (n=60)
ABPC	2.7	11.9		3.1	6.2		2.2	11.7
GM	0.0	0.6		0.0	0.0		0.0	0.0
KM	13.4	39.8		62.2	82.1		0.0	0.0
SM	30.5	74.4		71.4	80.4		88.9	95.0
TC	37.4	78.4		70.4	87.7		84.4	80.0
ST	11.2	21.0		25.5	35.5		0.0	1.7
CP	2.1	2.3		1.0	8.8		0.0	0.0
CTX	1.6	6.8		2.0	0.6		0.0	11.7
CAZ	0.5	5.7		2.0	0.3		0.0	11.7
CFX	1.1	8.5		0.0	0.6		0.0	1.7
FOM	0.5	0.0		0.0	0.6		0.0	0.0
NA	6.4	5.7		14.3	21.1		8.9	13.3
CPFX	0.0	0.0		0.0	0.3		0.0	1.7
NFLX	0.0	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0
AMK	0.0	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0
IPM	0.0	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0
MEPM	0.0	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0

図 6. ヒト及び食品由来サルモネラ株の血清型別薬剤耐性率
(2015-2020 年分離株) (表 12 のグラフ)

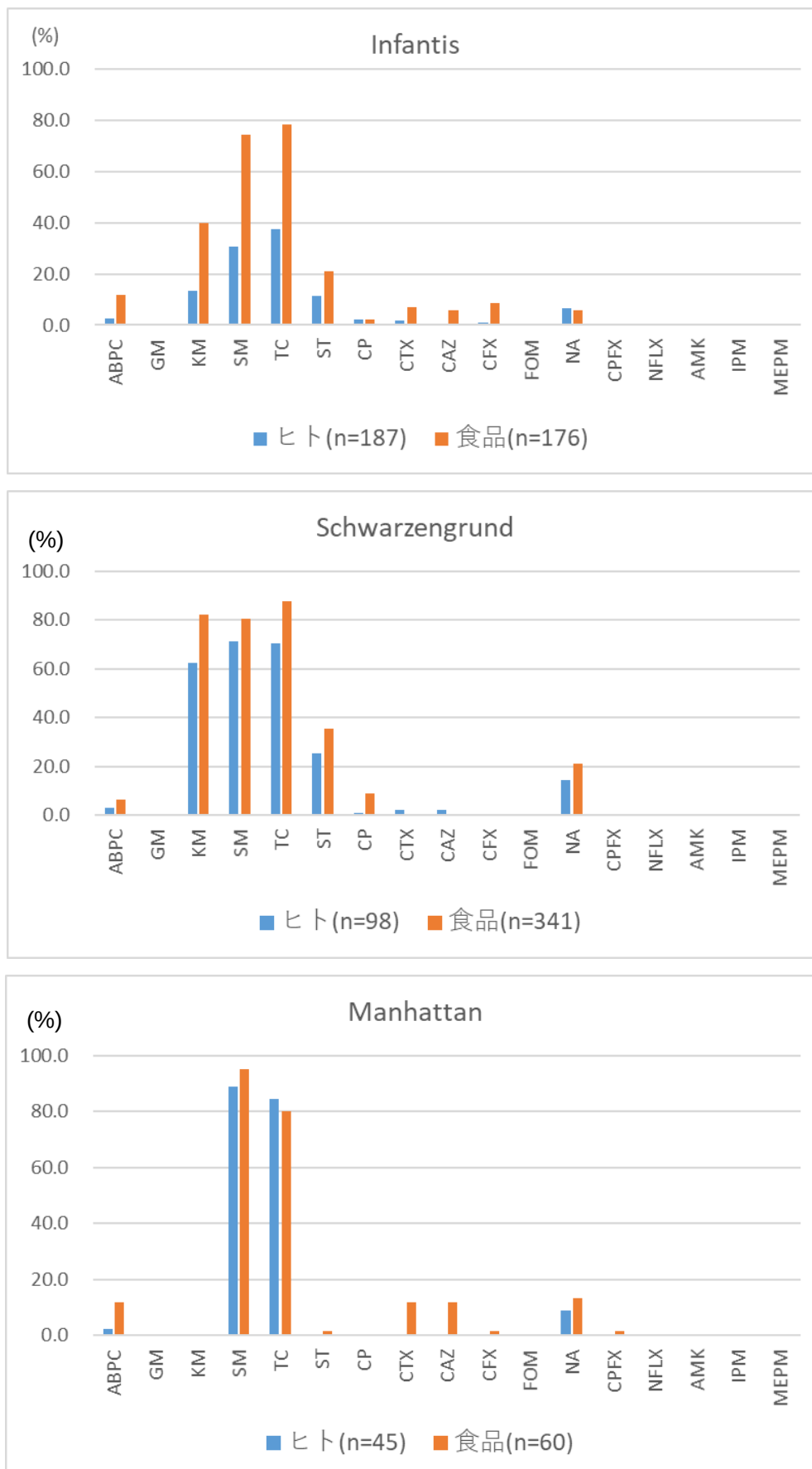


表13. 本研究で用いた大腸菌株の分類

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

(病原微生物検出情報Vol.33 No.1表1を改変)

表14. ヒト及び食品由来大腸菌株の薬剤耐性状況
(2015～2020年分離株)

ヒト由来株 (n=1852)					食品由来株 (n=96)				
	分類	株数	耐性数	耐性率		分類	株数	耐性数	耐性率
2015	EHEC	130	39	30.0	2015	EHEC	4	1	25.0
	下痢原性	23	20	87.0		下痢原性	2	2	100.0
	その他	12	6	50.0		その他	0	0	—
	計	165	65	39.4		計	6	3	50.0
2016	EHEC	115	35	30.4	2016	EHEC	5	2	40.0
	下痢原性	32	24	75.0		下痢原性	2	2	100.0
	その他	24	15	62.5		その他	0	0	—
	計	171	74	43.3		計	7	4	57.1
2017	EHEC	191	68	35.6	2017	EHEC	0	0	—
	下痢原性	26	18	69.2		下痢原性	9	5	55.6
	その他	28	23	82.1		その他	19	12	63.2
	計	245	109	44.5		計	28	17	60.7
2018	EHEC	471	110	23.4	2018	EHEC	1	0	0.0
	下痢原性	56	35	62.5		下痢原性	15	9	60.0
	その他	36	26	72.2		その他	13	8	61.5
	計	563	171	30.4		計	29	17	58.6
2019	EHEC	282	73	25.9	2019	EHEC	2	1	50.0
	下痢原性	35	24	68.6		下痢原性	2	1	50.0
	その他	27	20	74.1		その他	1	0	0.0
	計	344	117	34.0		計	5	2	40.0
2020	EHEC	326	93	28.5	2020	EHEC	5	1	20.0
	下痢原性	25	18	72.0		下痢原性	5	3	60.0
	その他	13	11	84.6		その他	11	4	36.4
	計	364	122	33.5		計	21	8	38.1
計	EHEC	1515	418	27.6	計	EHEC	17	5	29.4
	下痢原性	197	139	70.6		下痢原性	35	22	62.9
	その他	140	101	72.1		その他	44	24	54.5
	計	1852	658	35.5		計	96	51	53.1

下痢原性EC：ETEC, EIEC, EPEC, EAggEC, 他の下痢原性EC

その他：病原因子陰性株及び病原因子未検査株

食品由来株には外国産のものも含む

図7. ヒト由来大腸菌株の多剤耐性状況
(2015～2020年分離株の1剤以上耐性株)

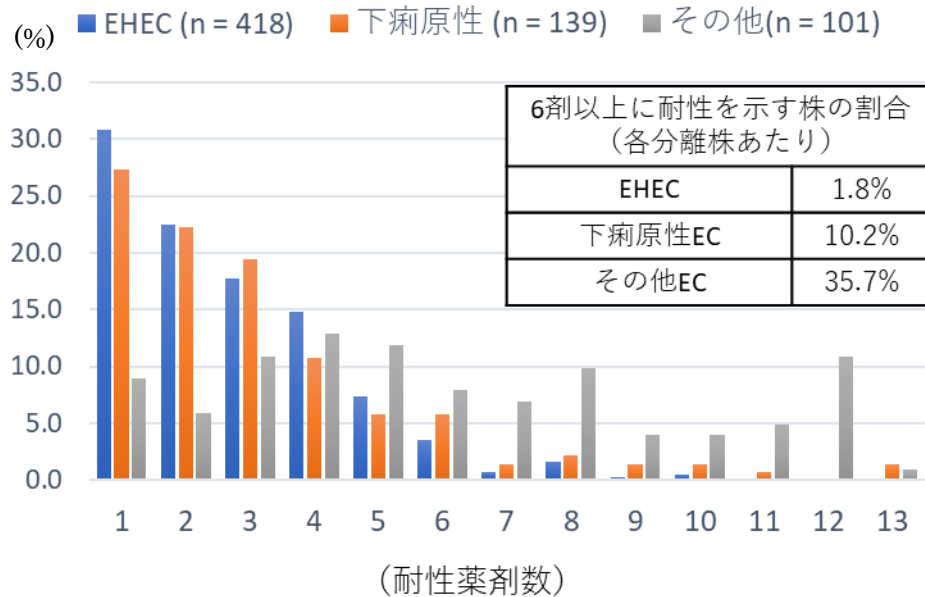


図8. ヒト由来大腸菌株の各種薬剤耐性率
(2015～2020年分離株)

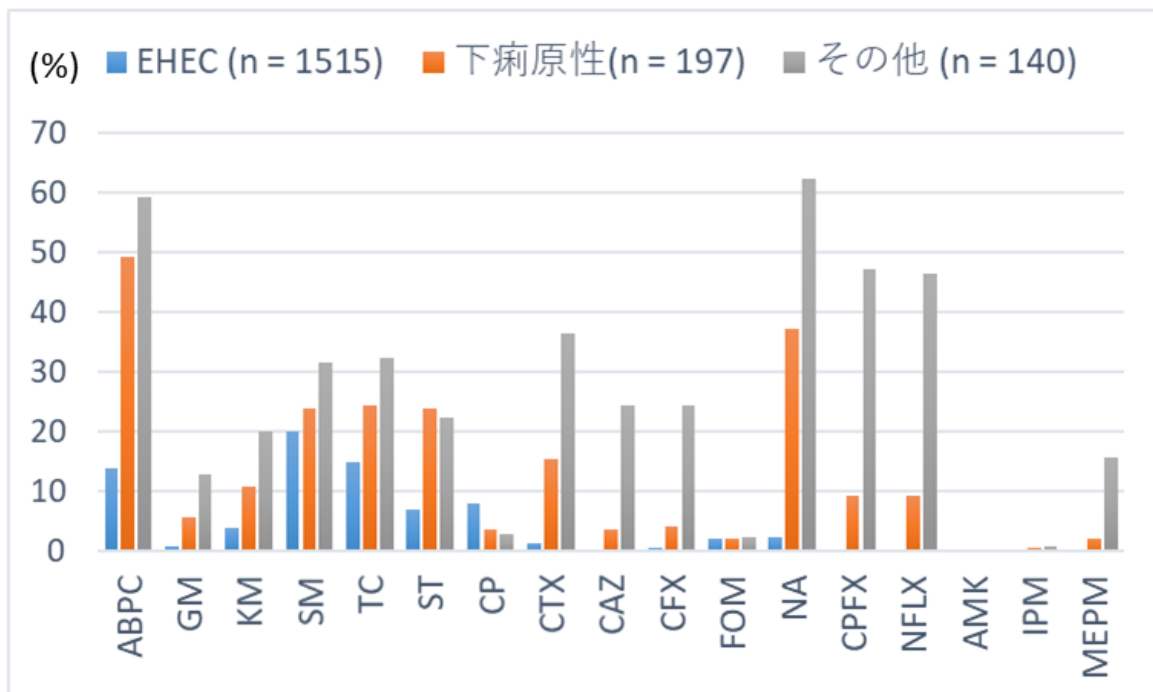


表15. ヒト及び食品由来*C. jejuni/coli* の耐性率
(2018～2020年分離株)

ヒト由来C.jejuni及びC.coliの耐性率(2018-2020)															
	2018				2019				2020				2018-2020		
	jejuni (n=94)	coli (n=6)	合計 (n=100)		jejuni (n=145)	coli (n=10)	合計 (n=155)		jejuni (n=100)	coli (n=7)	合計 (n=107)		jejuni (n=339)	coli (n=23)	合計 (n=362)
EM	2.1	16.7	3.0		1.4	10.0	1.9		0.0	28.6	1.9		1.2	17.4	2.2
TC	16.0	33.3	17.0		31.0	30.0	31.0		28.0	57.1	29.9		26.0	39.1	26.8
CET	92.6	100.0	93.0		98.6	100.0	98.7		99.0	100.0	99.1		97.1	100.0	97.2
CPFX	44.7	83.3	47.0		66.9	80.0	67.7		55.0	42.9	54.2		57.2	69.6	58.0
NA	45.7	83.3	48.0		66.2	80.0	67.1		56.0	42.9	55.1		57.5	69.6	58.3
ABPC	11.7	33.3	13.0		23.4	40.0	24.5		13.0	14.3	13.1		17.1	30.4	18.0
1剤以上耐性数	89	6	95		145	10	155		100	7	107		334	23	357
1剤以上耐性率	94.7	100.0	95.0		100.0	100.0	100.0		100.0	100.0	100.0		98.5	100.0	98.6

食品由来C.jejuni及びC.coliの耐性率(2018-2020)															
	2018				2019				2020				2018-2020		
	jejuni (n=60)	coli (n=12)	合計 (n=72)		jejuni (n=74)	coli (n=12)	合計 (n=86)		jejuni (n=103)	coli (n=8)	合計 (n=111)		jejuni (n=237)	coli (n=32)	合計 (n=269)
EM	0.0	25.0	4.2		1.4	25.0	4.7		0.0	50.0	3.6		0.4	31.3	4.1
TC	25.0	58.3	30.6		31.1	66.7	36.0		28.2	50.0	29.7		28.3	59.4	32.0
CET	100.0	100.0	100.0		100.0	100.0	100.0		99.0	100.0	99.1		99.6	100.0	99.6
CPFX	35.0	58.3	38.9		44.6	58.3	46.5		41.7	50.0	42.3		40.9	56.3	42.8
NA	35.0	58.3	38.9		44.6	58.3	46.5		42.7	50.0	43.2		41.4	56.3	43.1
ABPC	30.0	16.7	27.8		18.9	50.0	23.3		21.4	25.0	21.6		22.8	31.3	23.8
1剤以上耐性数	60	12	72		74	12	86		102	8	110		236	32	268
1剤以上耐性率	100.0	100.0	100.0		100.0	100.0	100.0		99.0	100.0	99.1		99.6	100.0	99.6

図9. ヒト及び食品由来
C. jejuni/coli 株の薬剤耐性率
(上表のグラフ)
(2018～2020年分離株)

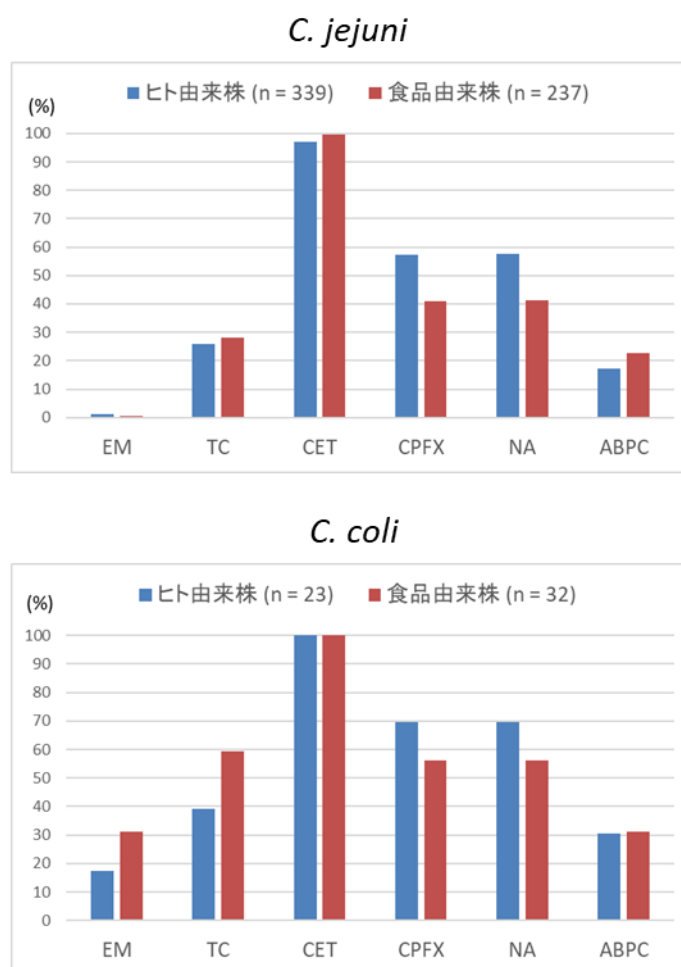


図10. サルモネラ株及び大腸菌株におけるESBL産生遺伝子及びAmpC遺伝子の検出

対象菌株：2015～2019年分離サルモネラ属菌株及び大腸菌株のうち、CTX, CAZ, CFXの1剤以上に耐性を示す菌株

方法：菌株から抽出したゲノムDNAを鋳型にPCR反応で検出

ESBL 遺伝子検査用プライマー一覧				AmpC 遺伝子検査用プライマー一覧			
遺伝子型		Primer	size(bp)	遺伝子型		Primer	size(bp)
TEM型	TEM-410F	GGTCGCCGCATACACTATTCTC	372bp	FOX型	FOXMF	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190bp
	TEM-781R	TTTATCCGCCTCCATCCAGTC			FOXMR	CAAAGCGCGTAACCGGATTG	
SHV型	SHV-287F	CCAGCAGGATCTGGTGGACTAC	231bp	EBC型	EBCMF	TCCGTAAGCCGATGTTGCGG	302bp
	SHV-517R	CCGGGAAGCGCCTCAT			EBCMR	CTTCACTGCGGCTGCCAGTT	
CTX-M-1型	cbxm1-115F	GAATTAGAGCGGCAGTCGGG	588bp	ACC型	ACCMF	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346bp
	cbxm1-702R	CACAACCCAGGAAGCAGGC			ACCMR	TTCCGCCAATCATCCCTAGC	
CTX-M-2型	cbxm2-39F	GATGGCGACGCTACCCC	107bp	DHA型	DHAMF	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405bp
	cbxm2-145R	CAAGCCGACCTCCCGAAC			DHAMR	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
CTX-M-8/25型	cbxm8g25g-533F	GCGACCCGCGCGATAC	186bp	CIT型	CITMF	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462bp
	cbxm8g25g-718R	TGCCGGTTTTATCCCCG			CITMR	TTTCTCTGAACGTGGCTGGC	
CTX-M-9型	cbxm9-16F	GTGCAACGGATGATGTTCCG	475bp	MOX型	MOXMF	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520bp
	cbxm9-490R	GAAACGTCTCATCGCCGATC			MOXMR	CACATTGAATAGGTGTGGTGC	

図11. ヒト及び食品由来サルモネラ株のESBL産生遺伝子及びAmpC遺伝子保有
(2015～2019年分離株)

ヒト由来株					食品由来株				
分離年	耐性数	CTX	CAZ	CFX	分離年	耐性数	CTX	CAZ	CFX
1 2015	5	R	R	S	1 2015	9	R	R	R
2 2016	2	R	S	S	2 2015	6	R	R	R
3 2016	6	R	R	R	3 2015	8	R	R	R
4 2016	5	R	R	S	4 2015	5	R	R	S
5 2016	7	R	R	S	5 2015	5	R	R	S
6 2016	7	R	R	S	6 2015	5	R	R	S
7 2016	7	R	R	S	7 2015	6	R	R	S
8 2016	8	R	R	S	8 2015	7	R	I	R
9 2016	10	R	R	R	9 2016	6	R	R	R
10 2016	10	R	R	R	10 2016	8	R	R	R
11 2016	3	S	S	R	11 2016	8	R	R	R
12 2016	2	S	S	R	12 2016	7	R	R	S
13 2017	7	R	R	S	13 2016	7	R	R	S
14 2017	7	R	R	S	14 2016	5	R	R	S
15 2017	5	R	R	S	15 2016	7	I	R	R
16 2017	5	R	R	S	16 2017	7	R	R	R
17 2017	7	R	S	S	17 2017	7	R	R	R
18 2017	4	R	S	S	18 2017	7	R	R	R
19 2017	8	R	I	S	19 2017	6	R	R	R
20 2017	8	R	I	S	20 2017	6	R	R	R
21 2017	2	R	S	S	21 2017	6	R	R	R
22 2017	8	R	S	S	22 2017	6	R	S	S
23 2017	8	R	R	R	23 2017	6	I	R	R
24 2017	9	R	R	R	24 2018	7	R	R	R
25 2017	11	R	R	S	25 2018	8	R	R	R
26 2018	2	R	I	S	26 2018	8	R	R	R
27 2018	6	R	I	S	27 2018	7	R	R	R
28 2018	6	R	R	R	28 2018	5	R	R	S
29 2018	4	R	I	I	29 2018	7	R	R	S
30 2018	3	R	R	S	30 2018	6	I	I	R
31 2018	7	R	R	S	31 2018	6	R	R	R
32 2018	3	R	S	S	32 2019	6	R	R	R
33 2018	7	R	R	S	33 2019	6	R	R	R
34 2018	8	R	R	R	34 2019	6	R	R	R
35 2018	11	R	R	S	35 2019	6	R	R	R
36 2019	7	R	R	S	36 2019	6	R	R	R
37 2019	7	R	R	S	37 2019	5	R	R	S
38 2019	8	R	S	S	38 2019	3	R	I	R
39 2019	9	R	S	S	39 2019	5	R	I	R
40 2020	7	R	R	R	40 2020	6	R	R	R
41 2020	8	R	R	R	41 2020	8	R	R	R
					42 2020	7	R	R	R
					43 2020	6	R	R	R
					44 2020	6	R	R	R
					45 2020	5	R	S	R
					46 2020	5	I	S	R

耐性遺伝子	ヒト由来株	食品由来株
ESBL (gr: group)		
CTX-M-1 gr.	11	6
CTX-M-2 gr.	1	1
CTX-M-8/25 gr.	0	0
CTX-M-9 gr.	6	0
SHV型	1	0
TEM型	6	6
AmpC		
ACC型	0	0
CIT型	5	22
DHA型	1	0
EBC型	0	3
FOX型	0	0
MOX型	0	0

図12. ヒト由来大腸菌株のESBL産生遺伝子及びAmpC遺伝子保有
(2015～2019年分離株)

分離年	耐性数	CTX	CAZ	CFX
1 EHEC 2016	3	R	I	S
2 EHEC 2016	1	R	S	S
3 EHEC 2017	3	R	S	S
4 EHEC 2018	2	R	I	S
5 EHEC 2018	2	R	I	I
6 EHEC 2018	2	R	I	S
7 EHEC 2018	3	R	R	S
8 EHEC 2018	2	R	S	S
9 EHEC 2019	2	R	S	S
10 EHEC 2019	2	R	S	S
11 EHEC 2019	2	R	I	S
12 EHEC 2019	2	R	I	S
13 EHEC 2019	2	R	I	S
14 EHEC 2019	2	R	S	S
15 EHEC 2019	2	R	I	S
16 EHEC 2019	2	R	I	S
17 EHEC 2019	2	R	S	S
18 EHEC 2019	2	R	I	S
19 EHEC 2019	2	R	I	S
20 EHEC 2019	2	R	I	S
21 EHEC 2020	8	S	S	R
22 EHEC 2020	8	S	S	R
23 EHEC 2020	8	S	S	R
24 EHEC 2017	9	S	S	R
25 EHEC 2017	10	S	S	R
26 EHEC 2017	10	S	S	R
27 下痢性株 2015	2	R	S	S
28 下痢性株 2016	6	R	S	S
29 下痢性株 2015	2	R	S	S
30 下痢性株 2015	4	R	S	S
31 下痢性株 2016	3	R	S	S
32 下痢性株 2016	2	R	S	S
33 下痢性株 2016	2	R	I	S
34 下痢性株 2019	4	R	S	S
35 下痢性株 2016	4	R	R	S
36 下痢性株 2016	3	R	S	S
37 下痢性株 2017	4	R	S	S
38 下痢性株 2020	6	R	S	S
39 下痢性株 2018	3	R	I	S
40 下痢性株 2018	5	R	S	S
41 下痢性株 2018	5	R	S	S
42 下痢性株 2019	3	R	S	S
43 下痢性株 2019	4	R	S	S
44 下痢性株 2019	4	R	R	S
45 下痢性株 2020	9	R	I	S
46 下痢性株 2020	9	R	R	R
47 下痢性株 2018	5	S	S	S
48 下痢性株 2018	10	R	R	R
49 下痢性株 2019	2	R	S	S
50 下痢性株 2020	2	R	S	S
51 下痢性株 2020	2	R	S	S
52 下痢性株 2019	11	R	R	S
53 下痢性株 2018	13	R	R	R
54 下痢性株 2018	13	R	R	R
55 下痢性株 2020	2	R	I	S
56 下痢性株 2020	5	R	S	S
57 下痢性株 2018	2	I	I	R
58 下痢性株 2018	2	I	I	R
59 下痢性株 2019	3	S	S	R
60 下痢性株 2020	4	S	S	R

分離年	耐性数	CTX	CAZ	CFX
61 その他 2015	8	R	R	R
62 その他 2015	10	R	R	R
63 その他 2016	2	R	S	S
64 その他 2016	6	R	R	S
65 その他 2016	6	R	R	S
66 その他 2017	5	R	S	S
67 その他 2017	8	R	R	R
68 その他 2017	11	R	R	R
69 その他 2017	12	R	R	R
70 その他 2017	11	R	R	R
71 その他 2017	12	R	R	R
72 その他 2017	9	R	I	R
73 その他 2017	12	R	R	R
74 その他 2017	7	R	R	R
75 その他 2017	8	R	R	R
76 その他 2017	5	R	S	I
77 その他 2017	6	R	R	S
78 その他 2017	5	R	S	S
79 その他 2017	9	R	R	S
80 その他 2017	12	R	R	I
81 その他 2018	12	R	S	R
82 その他 2018	8	R	R	R
83 その他 2018	5	R	S	S
84 その他 2018	7	R	S	S
85 その他 2018	5	R	S	S
86 その他 2018	6	R	S	R
87 その他 2018	8	R	I	S
88 その他 2018	7	R	S	I
89 その他 2018	13	R	R	R
90 その他 2018	11	R	R	R
91 その他 2018	9	R	R	R
92 その他 2018	12	R	R	R
93 その他 2018	12	R	R	R
94 その他 2018	12	R	R	R
95 その他 2018	12	R	R	R
96 その他 2019	8	R	S	S
97 その他 2019	5	R	S	S
98 その他 2019	8	R	R	R
99 その他 2019	10	R	R	R
100 その他 2019	11	R	R	R
101 その他 2019	9	R	R	R
102 その他 2019	10	R	R	R
103 その他 2019	12	R	R	R
104 その他 2019	8	R	R	R
105 その他 2020	6	R	S	S
106 その他 2020	2	R	S	S
107 その他 2020	11	R	R	R
108 その他 2020	12	R	R	R
109 その他 2020	10	R	R	R
110 その他 2020	8	R	R	R
111 その他 2020	7	R	S	S
112 その他 2017	3	I	I	R
113 その他 2019	9	S	S	R

耐性遺伝子	EH EC	下痢原性	その他
ESBL (gr: group)			
CTX-M-1 gr.	16	13	8
CTX-M-2 gr.	1	2	16
CTX-M-8/25 gr.	0	0	0
CTX-M-9 gr.	0	9	18
SHV型	0	0	0
TEM型	16	9	16
AmpC			
ACC型	0	0	0
CIT型	0	0	1
DHA型	0	0	2
EBC型	0	0	0
FOX型	0	0	0
MOX型	0	0	0

表16. サルモネラ株及び大腸菌株におけるコリスチン耐性遺伝子 mcr-1～10 の検出（2015～2020年分離株中の阻止円径12 mm以下の株について遺伝子検出を実施）

表16a サルモネラ株

		11mm以下	12mm
ヒト由来	2015	4	69
	2016	9	33
	2017	3	64
	2018	1	22
	2019	6	7
	小計	23	195
食品由来	2015	3	25
	2016	2	10
	2017	1	1
	2018	0	2
	2019	6	1
	小計	12	39
合計		35	234

表16b

耐性遺伝子	ヒト由来株	食品由来株
mcr-1group	2	0
mcr-4	0	0
mcr-5	0	1
mcr-3group	0	0
mcr-8	0	0
mcr-9group	0	0

表16c 大腸菌株

		分類	11mm以下	12mm
ヒト由来	2015	EHEC	2	11
		下痢	0	0
		その他	0	0
	2016	EHEC	0	8
		下痢	0	1
		その他	0	0
	2017	EHEC	6	25
		下痢	0	1
		その他	1	3
	2018	EHEC	5	33
		下痢	1	3
		その他	6	4
	2019	EHEC	0	13
		下痢	0	0
		その他	2	0
	合計		23	102

表16d

耐性遺伝子	EHEC	下痢原性	その他
mcr-1group	1	1	0
mcr-4	0	0	0
mcr-5	0	0	0
mcr-3group	0	0	0
mcr-8	0	0	0
mcr-9group	0	0	0

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 30～令和 2 年度 分担（総合）研究報告書

分担課題 家畜、食品由来耐性菌データと JANIS データとの連携；相互比較

研究分担者	菅井 基行	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	センター長
研究協力者	柴山 恵吾	国立感染症研究所細菌第二部	部長
	鈴木 里和	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	松井 真理	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	鈴木 仁人	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	矢原 耕史	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	平林 亜希	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	川上 小夜子	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	Liansheng Yu	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	鹿山 鎮男	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	久恒 順三	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	荒井 千夏	国立大学法人広島大学大学院医系科学研究科細菌学	
	島本 整	国立大学法人広島大学大学院統合生命科学研究科食品生命科学	
	梶原 俊樹	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	近藤 恒平	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	
	杳野 祥子	国立感染症研究所薬剤耐性研究センター	

研究要旨

平成 30 年度以降、JANIS を中心としたヒト由来検体集計データを WHO GLASS に提出し GLASS report に掲載された。GLASS の重複処理と JANIS の重複処理の違いを整理し、その違いによる集計値のズレが軽微であることを示した。WHO GLASS 方式により都道府県単位で集計したデータを国立国際医療研究センターのワンヘルスプラットフォームに提供し web 閲覧を可能にした。広島大学院内感染症プロジェクト研究センターにて 2008 年から収集した臨床分離 ESBL 産生株のうち初期の株を用い、ESBL 遺伝子保有状況、レプリコン型別により大腸菌 22 株、肺炎桿菌 8 株、*Proteus mirabilis* 2 株を選択し、合計 25 株分のプラスミド完全塩基配列を取得した。食品由来菌株として国内小売店で購入した鶏肉から *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有するプラスミド、*bla*_{NDM-1} を保有するプラスミドをもつ肺炎桿菌、国内小売店で購入した生野菜から *bla*_{NDM-1} を保有する IncFII(K) プラスミドを持つ肺炎桿菌、*bla*_{NDM-1}、*bla*_{CTX-M-15} を保有する IncFII(K) プラスミド、*bla*_{OXA-72} を 2 コピー保有する GR2 プラスミドを持つ *Acinetobacter baumannii*、エジプトの牛肉から分離された *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有する IncHI2 プラスミドを持つ *Enterobacter hormaechei* を報告した。本研究班で構築した multiplex PCR による *mcr-1*～*mcr-10* の検出方法について作業手順書を作成し、地方衛生研究所に PCR 陽性コントロールとともに手順書を配布した。

（2 段で記載）

A. 研究目的

ワンヘルスアプローチによる薬剤耐性サーベイランス体制構築を目的として、動物医薬品検査所ならびに地方衛生研究所と協力し、人由来細菌

のサーベイランス JANIS、家畜由来細菌のサーベイランス JVARM、ならびに食品由来細菌の薬剤耐性に関するデータを抽出、集計、統合し解析して、継続的に相互のデータ比較を行う。大腸菌、腸球

菌、サルモネラについて、JANIS、JVARM のデータ比較を行う。サルモネラについては食品由来細菌のデータについても比較する。薬剤耐性に関する国のサーベイランスデータを用いて、ワンヘルスアプローチをナショナルレベルのデータで進めるのがこの研究の特色である。結果を研究班に提供し、家畜、食品、人の中での薬剤耐性菌／遺伝子の伝播状況の総合的な理解に資する。

また、WHO は 2015 年から薬剤耐性のグローバルサーベイランス (GLASS) を開始し、各国にナショナルデータの提出を求めている。GLASS はまず人由来検体から始め、将来的に食品由来検体も加えることが検討されている。この研究では分担者四宮（地方衛生研究所）ならびに分担者大西（国立感染症研究所細菌第一部）の協力も得て GLASS に提出するための各菌種のデータを JANIS その他の調査から収集、集計する。GLASS は JANIS が通常実施している集計とは異なる集計手法を指定しているため、通常の JANIS の集計とは別途に集計を行い、GLASS が指定するファイル形式ファイルを作成し、GLASS に提出する。

ESBL 産生腸内細菌目細菌に関する基盤情報を整えるため、広島県で経年的に分離した ESBL 産生株からヒト由来代表株を選択し、その Inc 型別を行う。選択した代表株についてゲノム解析を実施し、経年的な分子疫学解析を行うとともに家畜由来の ESBL 産生菌のプラスミドとの比較を行う。また、食品から分離される薬剤耐性菌について、すでに市場に出回っている野菜からの薬剤耐性菌の分離を試みる。

またプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr* は現在 *mcr-1* から *mcr-9* までのバリエーションが存在するが、国内では *mcr-1*, -3, -5 が検出されている。地方衛生研究所、酪農学園大学、広島大学などの本研究班の研究分担者またはその関係機関と連携して収集された家畜由来または食肉由来 *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性腸内細菌科細株において *mcr* 遺伝子保有プラスミドを含むゲノム解析を行い、プラスミドの比較解析を通して国内での *mcr* 保有株の分子疫学を明らかにする。

B. 研究方法

大腸菌、腸球菌の薬剤耐性について、JANIS で集計されている入院患者全検体由来のデータと、JVARM で集計されている牛、豚、鶏由来のデータを比較し、情報をホームページ等で公開する。大腸菌、腸球菌、サルモネラについて、JANIS、JVARM のデータ比較を行う。JVARM のデータは分担者の川西、サルモネラは分担者の四宮より提供を受ける。JANIS では、各菌種とも数万株の規模のデータを集計する。JVARM ならびにサルモネラでは数百株の規模のデータを集計する。サルモネラにつ

いては食品由来細菌のデータについても比較する。サーベイランス間で共通している薬剤や同系統の薬剤の耐性率を比較したデータを研究班に提示して、研究班内で人、家畜、食品の間で薬剤耐性菌／耐性遺伝子がどのように伝播しているのかを総合的に解析するための情報に資する。なお、一般公開する比較データについては農水省、厚労省と十分に協議し、一般国民や畜産など関係業界に情報が適切に伝わるように十分留意する。ホームページは国立国際医療研究センターが設置するワンヘルス Web ホームページを用い、掲載データは研究班で作成する。

GLASS については、これまでに作成した解析プログラムを用いて引き続きデータの集計を進める。H31 年度は 2018 年のデータを集計し、GLASS が指定するデータ形式のファイルを作成して提出する。GLASS が求めるデータのうち、大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii*、黄色ブドウ球菌、肺炎球菌については JANIS のデータベースから必要なデータを抽出する。サルモネラについては、分担者の四宮が全国の地方衛生研究所と協力して収集するデータを提供してもらう。淋菌、赤痢菌については分担者の大西が収集するデータを提供してもらう。それぞれの菌種で、数百から数万株のデータを集計する予定である。これらのデータをもとに、GLASS が指定するデータ形式のファイルを作成する。

ヒト由来 ESBL 産生株は広島県内の医療施設にて分離された菌株を使用した。また、野菜からの薬剤耐性菌の分離は選択培地を使用し、菌種同定を MALDI Biotyper にて実施するとともに、薬剤感受性パターンの測定を行った。細菌ゲノムの解析は短鎖型シーケンサーである MiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeq システムにて行い、MLST (multilocus sequence typing) による菌株遺伝型の型別、ResFinder による薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finder による保有プラスミドの型別を行った。必要に応じて、MinION を併用して完全長塩基配列を構築し、プラスミドの配列比較を行った。

腸内細菌科細菌における *mcr* 遺伝子保有コリスチン耐性株は、地方衛生研究所、酪農学園大学、広島大学などの研究班の分担または関係機関と連携して収集する。連携研究機関では、主にディスク法による薬剤感受性試験の結果を指標に耐性菌株を収集し、*mcr* 遺伝子の検出を multiplex PCR にて検討する。感染研では、菌種同定の確認を MALDI Biotyper (Bruker 社)、より詳細な薬剤感受性パターンの測定を MicroScan Walkaway (Beckman Coulter 社) を用いてそれぞれ行う。細菌ゲノムの解析は短鎖型シーケンサーである MiniSeq/MiSeq/HiSeq/NovaSeq システム

(Illumina 社) にて行い、MLST (multilocus sequence typing) による菌株遺伝型の型別、ResFinder による薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finder による保有プラスミドの型別を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行う。各耐性株の代表株を選別し、長鎖型シーケンサーである MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) を併用して完全ゲノム配列を構築し、BLAST と ACT (Artemis Comparison Tool) によるプラスミドの配列比較を行う。

(倫理面への配慮)

匿名化済のデータを統計法に基づいて研究利用する。

C. 研究結果

平成 30 年度に GLASS に提出した集計データが受理され、初めて GLASS report early implementation 2017-2018 に掲載された。翌年度以降も GLASS に継続してデータを提出し、受理された。さらに、GLASS の重複処理と JANIS の重複処理の違いを整理し、その違いによる薬剤耐性率の集計値のずれが軽微であることを示した論文を国際誌に発表し Wellcome Trust 主催の国際カンファレンス発表した (口頭発表部門の第二位に選ばれた)。また、WHO GLASS 方式により都道府県単位で集計したデータを、国立国際医療研究センターのワンヘルスプラットフォームに提供し、Web から閲覧可能にした。

広島大学 院内感染症プロジェクト研究センターにて 2008 年より収集した臨床由来 ESBL 産生株を今回の検討に使用した。収集対象菌種は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* であり、収集開始当時の基準であった CLSI M100-S18 に準拠し Double-disk synergy test (DDST) や PCR にて薬剤耐性遺伝子の確認を実施済の 10,259 株 (図 1) を用いた。これらの株から広島由来 ESBL 株の基本構成を確認する目的で、サーベイランス初期の株から完全長塩基配列を取得する株を選択した。菌種や PCR 結果より得られた ESBL 遺伝子保有状況およびレプリコンタイプの情報をもとに代表株 32 株を選択した。内訳は、大腸菌 22 株、*K. pneumoniae* 8 株、*Proteus mirabilis* 2 株であった (図 2)。

短鎖型シーケンサー (MiniSeq/ MiSeq/ HiSeq/ NovaSeq システム) および長鎖型シーケンサー (MinION/ GridION) にて完全長塩基配列決定を実施した。ResFinder による薬剤耐性遺伝子の検出、Plasmid Finder による保有プラスミドの型別を行い、菌株のメタデータと組み合わせた分子疫学解析を行った。

ESBL 別では、

*bla*_{CTX-M-1} group 8 株
*bla*_{CTX-M-2} group 5 株
*bla*_{CTX-M-8} group 3 株
*bla*_{CTX-M-9} group 9 株

の合計 25 株分のプラスミド完全長塩基配列が得られた (図 3)。

菌種別に見た場合、大腸菌ではプラスミドのみに *bla*_{CTX-M} を保有するものが 12 株、染色体のみに *bla*_{CTX-M} を保有するものが 3 株、それぞれ完全長塩基配列が得られた。5 株は、染色体とプラスミドの両方に ESBL 遺伝子の存在が認められた。染色体とプラスミドで異なる種類の *bla*_{CTX-M} を保有する株は認められなかった (図 4)。*K. pneumoniae* ではプラスミドのみに *bla*_{CTX-M} を保有するものが 8 株、染色体とプラスミドの両方に *bla*_{CTX-M} を保有するものが 3 株認められた。大腸菌と同様に、染色体とプラスミドで異なる種類の *bla*_{CTX-M} を保有する株は認められなかった (図 5)。

プラスミドの Inc type 別で比較解析を実施した (図 6~9)。IncN のように、基本骨格は保持しながら付加領域は比較的多様な構成のもの (図 6) がある一方で、IncII1, IncB/O/K/Z, IncFII のようにプラスミド全体を通して比較的高い相関性が維持されている Inc type が存在した (図 7~9)。

次に、プラスミド上と染色体上にそれぞれ存在する *bla*_{CTX-M} の周辺構造の類似性を比較する目的で、*bla*_{CTX-M} の 5' -および 3' -側のそれぞれ 5kb 周辺の塩基配列解析を行った (図 10)。*bla*_{CTX-M-3}、*bla*_{CTX-M-14}、*bla*_{CTX-M-15}、*bla*_{CTX-M-55} の 5' -側には転移因子 *ISEcp1* が共通して認められ、*ISEcp1*-*bla*_{CTX-M} 周辺の塩基配列の構成は大きく異なっていた (図 11~14)。このことから、*bla*_{CTX-M} の種類に関わらず *ISEcp1* が転移に重要な働きをしていることが推察された。また、*bla*_{CTX-M-2} は 5' -側に *ISEcp1* が存在する株と存在しない株が認められた (図 15)。このことより、*bla*_{CTX-M-2} の伝播様式は他の *bla*_{CTX-M} とは異なるメカニズムの関与が推定された。一方で、*bla*_{CTX-M-27} の周辺は 5' -側に *ISEcp1* が存在するタイプと 5' -, 3' -側に転移因子 *IS26* が存在するタイプが認められた (図 16)。このように、周辺に *IS26* が存在するタイプとして *bla*_{CTX-M-8} があつた (図 17)。全国的にも分離報告数が少ない *bla*_{CTX-M-8} 保有プラスミドを比較したところ、医療施設や菌種が異なってもプラスミドの基本骨格の相関性が高いことが判明した。*IS26* による転移の報告は多数存在するが、なぜ周囲を *IS26* で囲まれているながら *bla*_{CTX-M-8} 保有プラスミドの構造が安定に保持されているのかは不明である。

これら *bla*_{CTX-M} 周辺の転移因子に着目して解析した結果をまとめた (図 18)。*bla*_{CTX-M} は *ISEcp1* に

よる転移の頻度が最も多いと推定され、ついで IS26 によるものも確認された。

今後、プラスミドの完全塩基配列データを引き続き経年的に取得すると共に、家畜由来の ESBL 産生菌のプラスミドとの比較を行う予定である。

食品由来の菌株における解析として、エジプトの牛肉から分離された *bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を同時に保有する *Enterobacter hormaechei* について完全塩基配列を解析したところ、これらの薬剤耐性遺伝子は共に IncHI2/pMLST1 plasmid 上に存在することが判明し、そのプラスミドを pMS37a (270.9 kb) と名付け報告した (Pathogens, 9, 687, 2020)。また、国内の食料品店の鶏肉から分離された *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, *mcr-9* 保有 *Klebsiella pneumoniae* (LM22-1 株) の解析を実施し、*bla*_{VIM-1} と *mcr-9* を保有する IncHI2A プラスミドに pLM22-1-VIM-1 (281, 251 bp) と名付けるとともに *bla*_{NDM-1} を保有するプラスミドに pLM22-1-NDM-1 (124, 214 bp) と名付け、解析の結果を報告した (Antimicrob Agents Chemother, 64 aac. 00882-20, 2020)。また国内の小売業者から購入した生野菜より *bla*_{NDM-1} を保有する IncFII(K) プラスミドを持つ肺炎桿菌、*bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} を保有する IncFII(K) プラスミド、*bla*_{OXA-72} を 2 コピー保有する GR2 プラスミドを持つ *Acinetobacter baumannii* を分離し、解析結果を報告した (Applied Environ. Microbiol. In press)。Salmonella で報告されていた Salmonella genomic island のサブタイプを、エジプトにおける患者の尿路由来多剤耐性 *Klebsiella pneumoniae* Kpu48 株が保有する例を初めて報告した (Antimicrob Agents Chemother, 64: 9 e01055-20, 2020)。

本研究班の研究分担者である四宮博人、その研究協力者である浅野由紀子 (愛媛県立衛生環境研究所) と連携し、本研究班で構築した multiplex PCR による獲得性コリスチン耐性遺伝子 *mcr* (*mcr-1*~*mcr-10*) の検出手法に関して、作業手順書を作成した。また、協力機関である他の地方衛生研究所にその手順書と PCR の陽性コントロールを配布し、食肉からコリスチン耐性株のスクリーニングを行った。また広島大学病院で保存されている血液由来検体から分離された *Aeromonas caviae* が国内で初めて *mcr-3* 遺伝子保有株であることを見出し報告した (Microbil. Res. Announcements accepted)。

D. 考察

本研究班で開発したプログラムにより、GLASS へのデータ提出が可能になっただけでなく、重複処理という薬剤耐性サーベイランスの基本問題

に関する研究成果を国際誌に発表することができ、さらに集計データを Web サイト経由でわかりやすくオープンにすることが出来た。

E. 結論

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Toshiki Kajihara, Koji Yahara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimbene, Visanu Thamlikitkul, John Stelling, Aki Hirabayashi, Eiko Anzai, Satoyo Wakai, Nobuaki Matsunaga, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Motoyuki Sugai, and Keigo Shibayama. Comparison of de-duplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance. PLoS One, 2020 Jun 26;15 (6):e0228234. doi: 10.1371/journal.pone.0228234

Soliman AM, Ramadan H, Ghazy E, Yu L, Hisatsune J, Kayama S, Sugai M, Nariya H, Shimamoto T, Jackson CR, Shimamoto T. Emergence of *Salmonella* genomic island 1 variant SGI1-C in a multidrug-resistant clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* ST485 from Egypt. Antimicrob Agents Chemother, 64: 9 e01055-20, 2020.

Sadek M, Nariya H, Shimamoto T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nordmann P, Poirel L, Shimamoto T. First genomic characterization of *bla*_{VIM-1} and *mcr-9* coharbouring *Enterobacter hormaechei* isolated from food of animal origin. Pathogens, 9, 687, 2020.

Khalifa H, Soliman A, Saito T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nariya H, Ahmed A, Shimamoto T, Matsumoto T, Shimamoto T. First report of foodborne *Klebsiella pneumoniae* coharboring *bla*_{VIM-1}, *bla*_{NDM-1}, and *mcr-9*. Antimicrob Agents Chemother, 64 aac. 00882-20, 2020.

Kitagawa H, Ohge H, Yu L, Kayama S, Hara T, Kashiya S, Kajihara T, Hisatsune J, Sueda T, Sugai M.

Aeromonas dhakensis is not a rare cause of *Aeromonas* bacteremia in Hiroshima, Japan. J Infect Chemother, 26, 316-320, 2020.

Ahmed M Soliman, Hirofumi Nariya, Daiki Tanaka, Liansheng Yu, Junzo Hisatsune, Shizuo Kayama, Kohei Kondo, Motoyuki Sugai, Toshi Shimamoto, Tadashi Shimamoto
Vegetable-derived carbapenemase-producing high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST15 and *Acinetobacter baumannii* ST2 clones in Japan: co-existence of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-66}, *bla*_{OXA-72}, and *AbaR4*-like resistance island from the same sample. Applied and Environmental Microbiology (AEM0216620R2), accepted.

Liansheng Yu, Hiroki Kitagawa, Shizuo Kayama, Junzo Hisatsune, Hiroki Ohge, and Motoyuki Sugai
Complete genome sequence of *Aeromonas caviae* strain MS6064, the *mcr-3* carrying clinical isolate from Japan. Microbiology Resource Announcements

(MRA01037-20R1), accepted.

2. 学会発表

Koji Yahara, Toshiki Kajihara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimbene, Visanu Thamlikitkul, John Stelling, Aki Hirabayashi, Eiko Anzai, Satoyo Wakai, Nobuaki Matsunaga, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Motoyuki Sugai, and Keigo Shibayama. Comparison of deduplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance. Antimicrobial Resistance - Genomes, Big Data and Emerging Technologies. November 5. Hinxton, UK.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

図表を添える

図 1

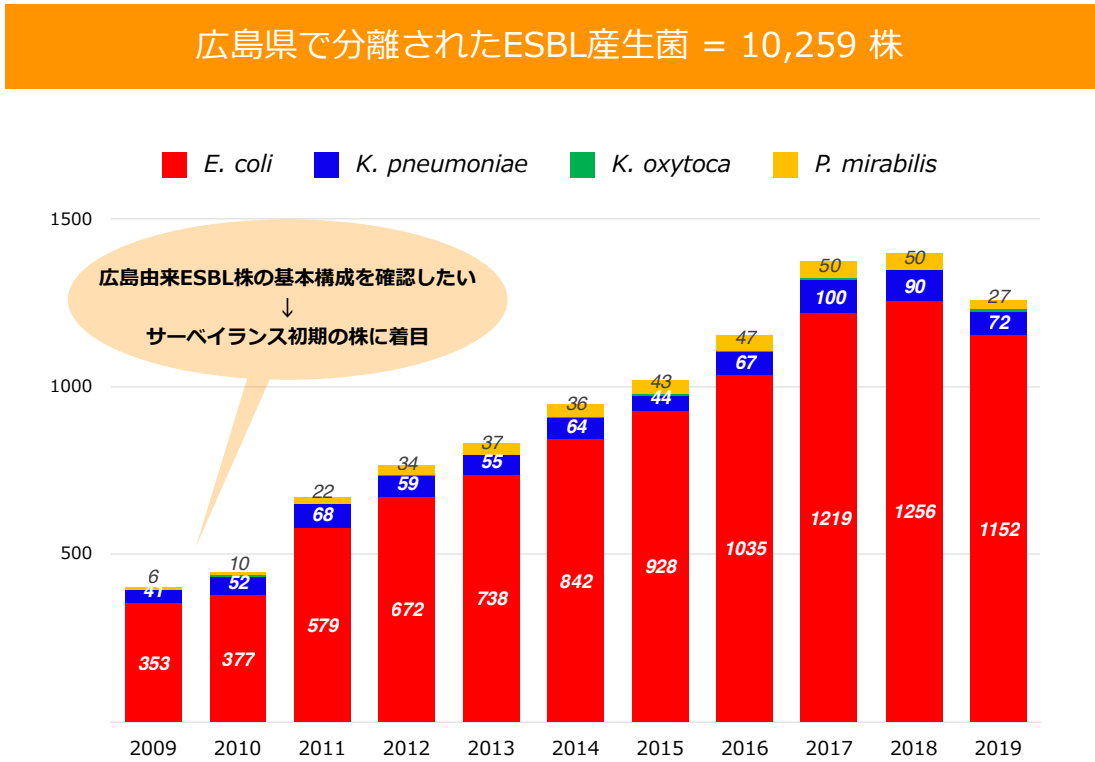


図 2

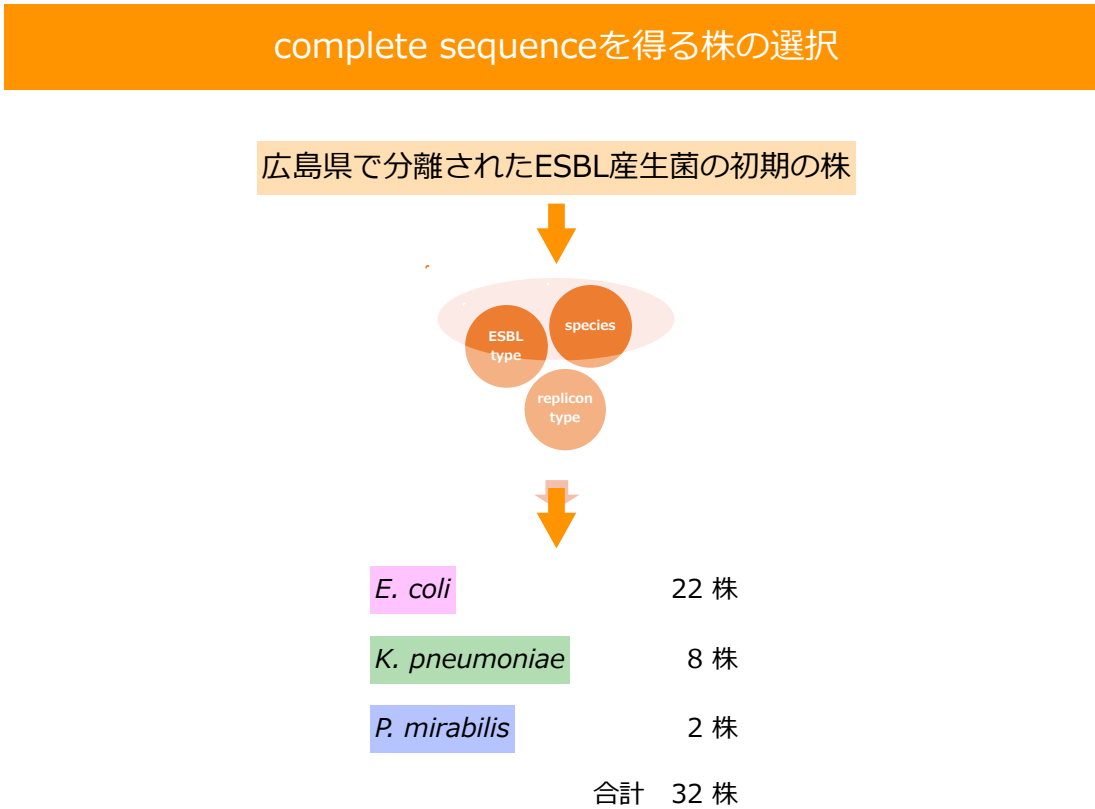


図 3

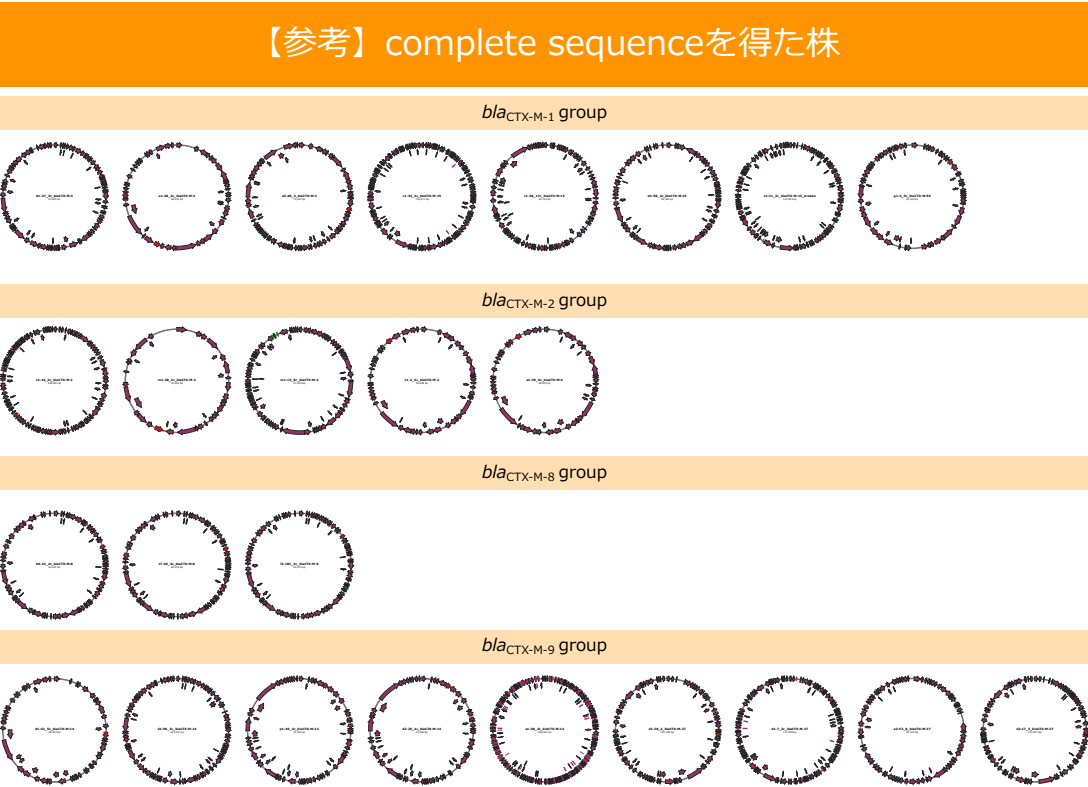
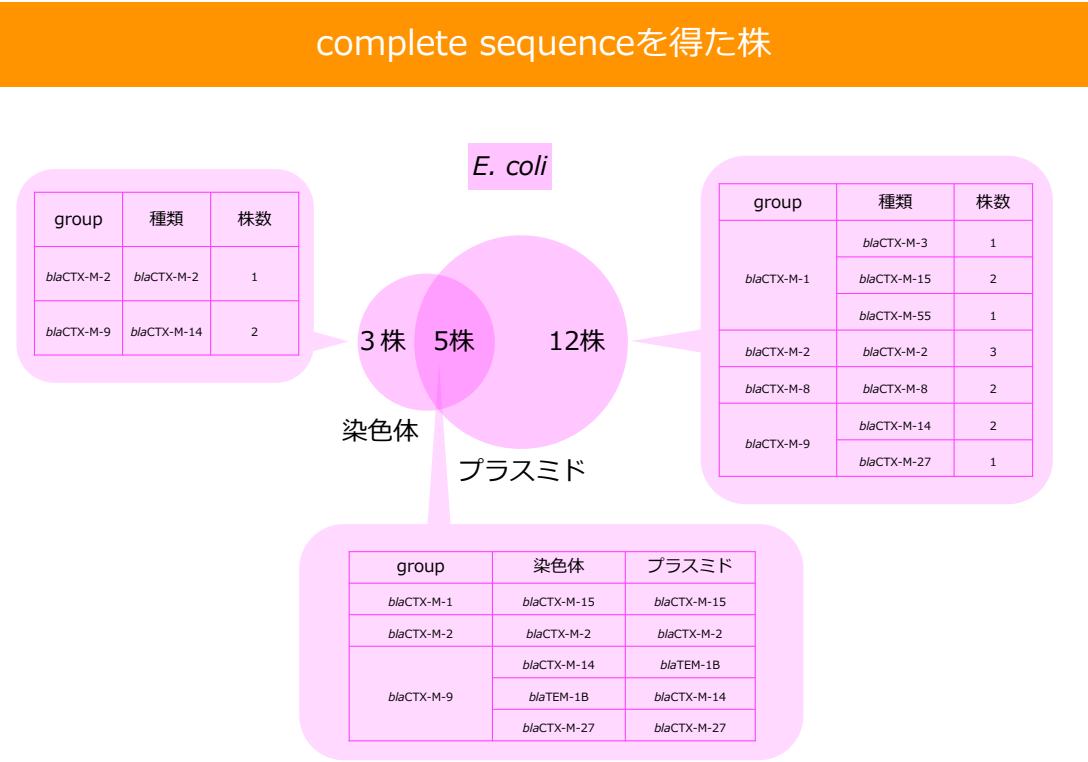


図 4



complete sequenceを得た株

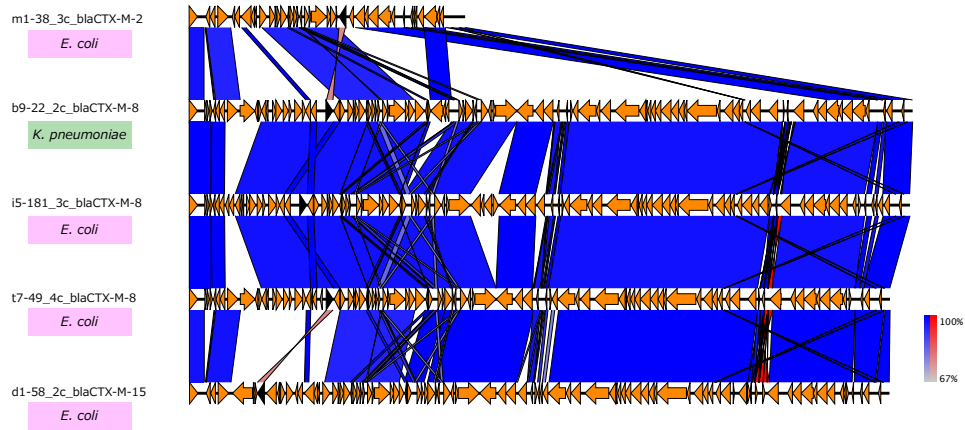


IncN plasmidの比較



図 7

IncI1 plasmidの比較



医療施設と菌種は異なるが、b9-22とt7-49は相同性が高い

図 8

IncB/O/K/Z plasmidの比較

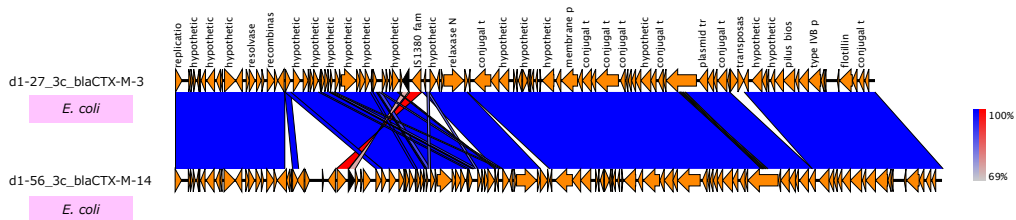


图 9

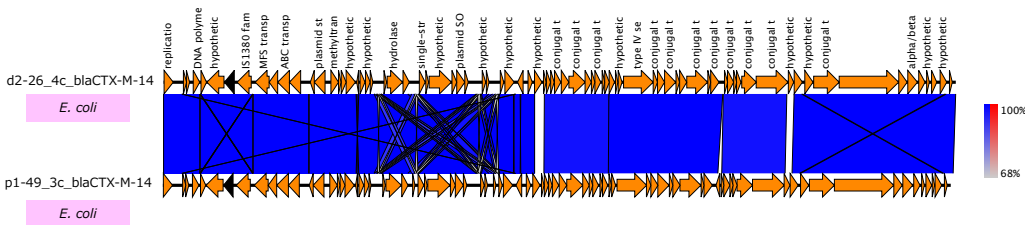
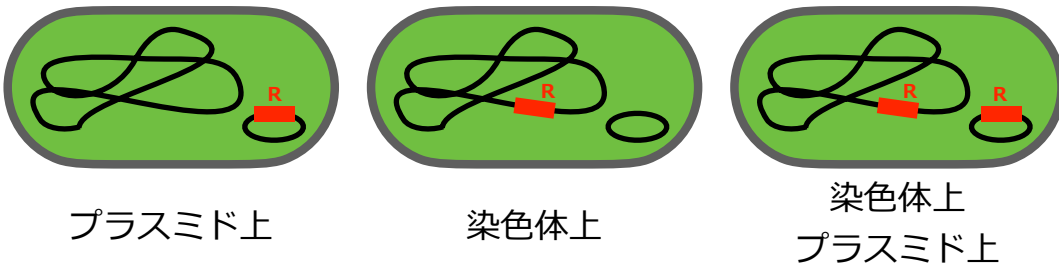


图 10

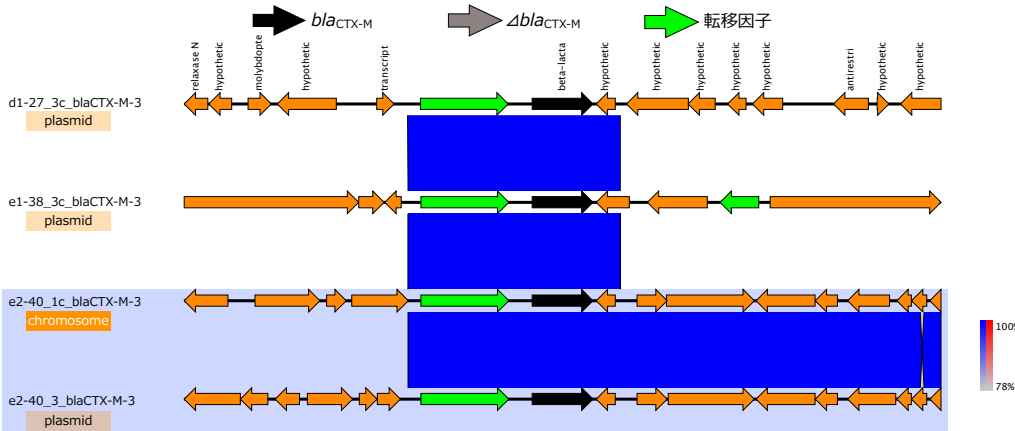
*bla*_{CTX-M}の周辺構造は？



プラスミド上と染色体上の塩基配列比較するため、
*bla*_{CTX-M}の5 kb周辺配列を比較

11

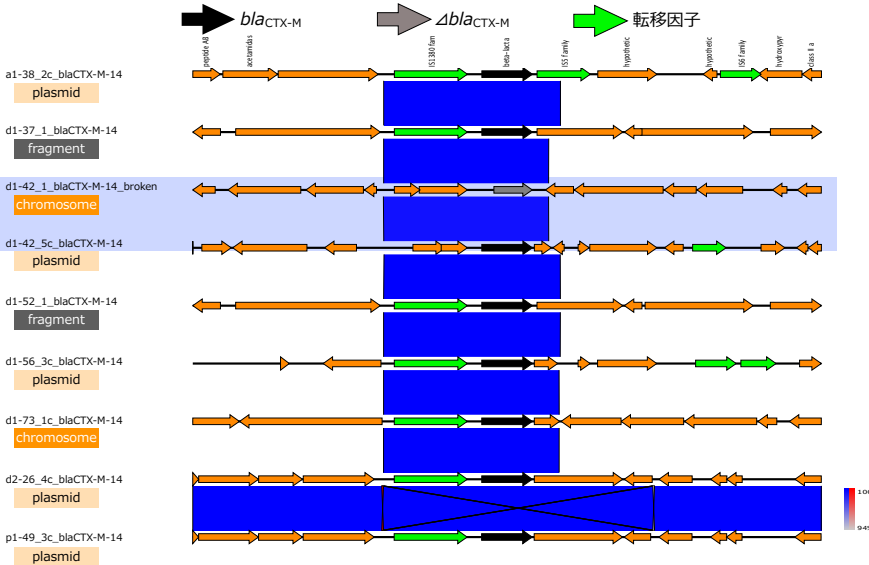
*bla*_{CTX-M-3}の周辺構造



*bla*_{CTX-M-3}の5'側にはISE*cp1*が認められたが、それ以外の構造は大きく異なっていた。

图 12

*bla*_{CTX-M-14}の周辺構造



*bla*_{CTX-M-14}の5'側にはISE_{Ecp1}が存在し、その周辺は異なる

図 1 3

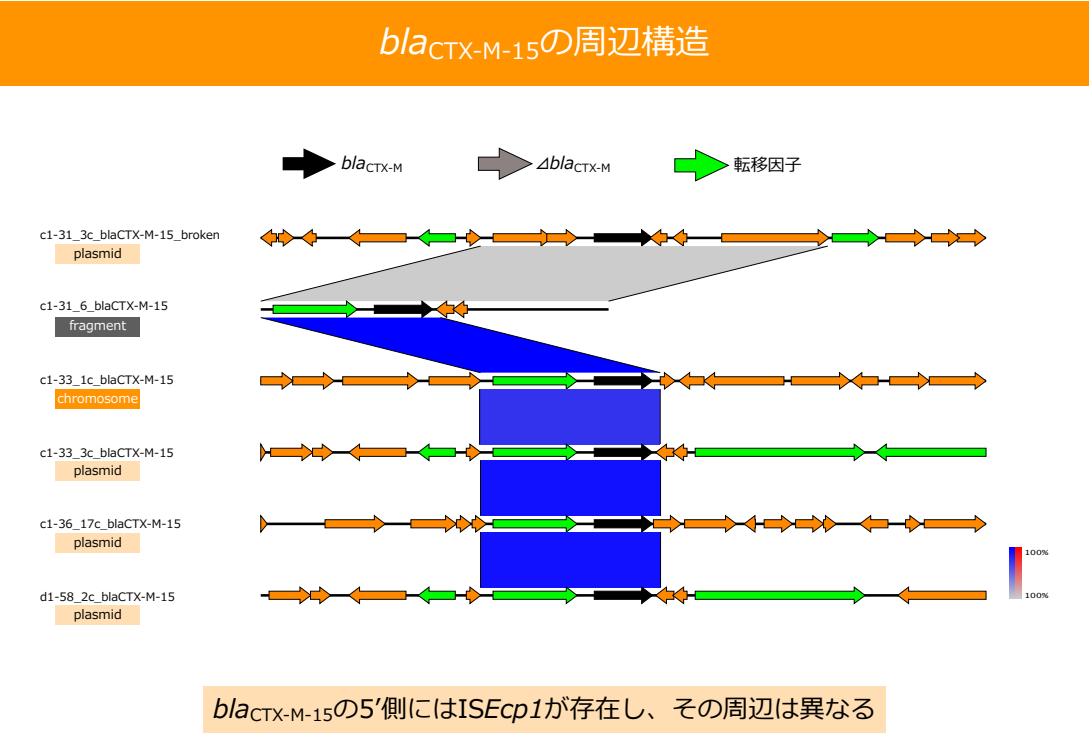


図 1 4

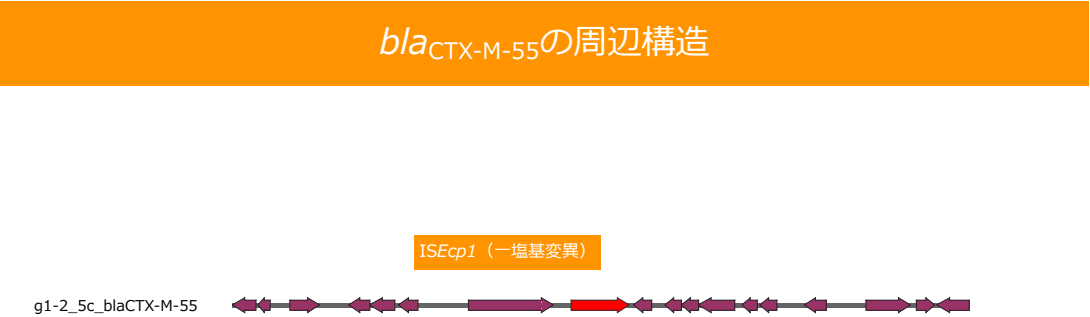


図 1 5

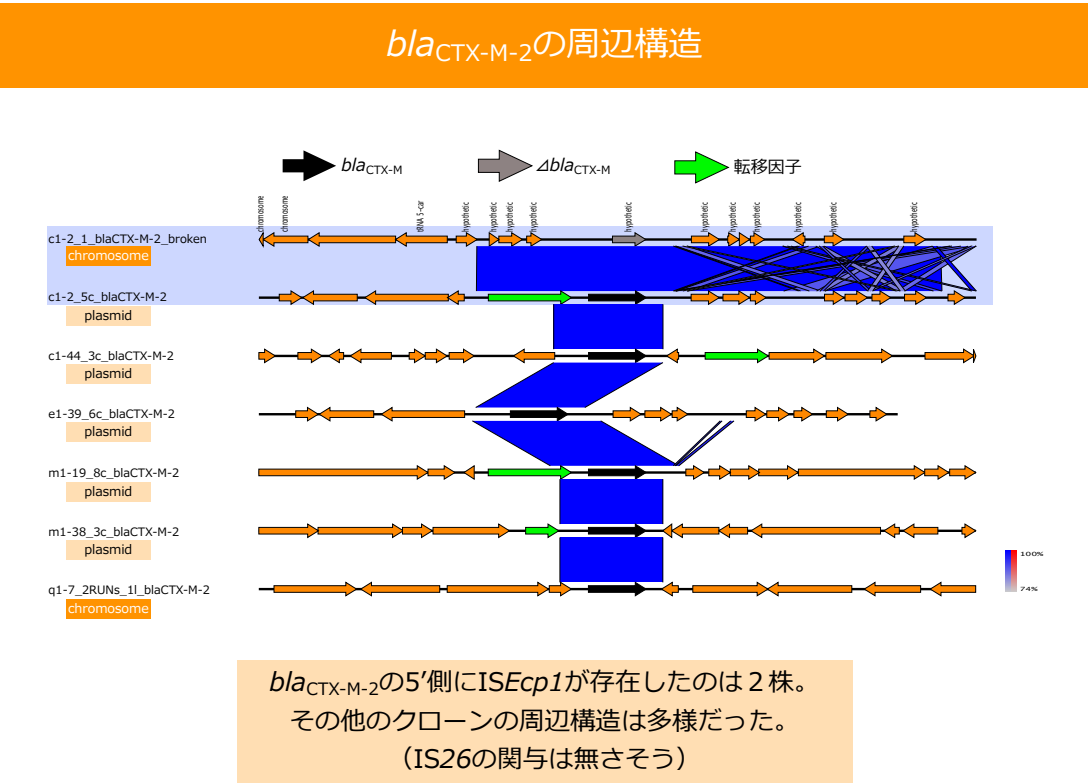


図 1 6

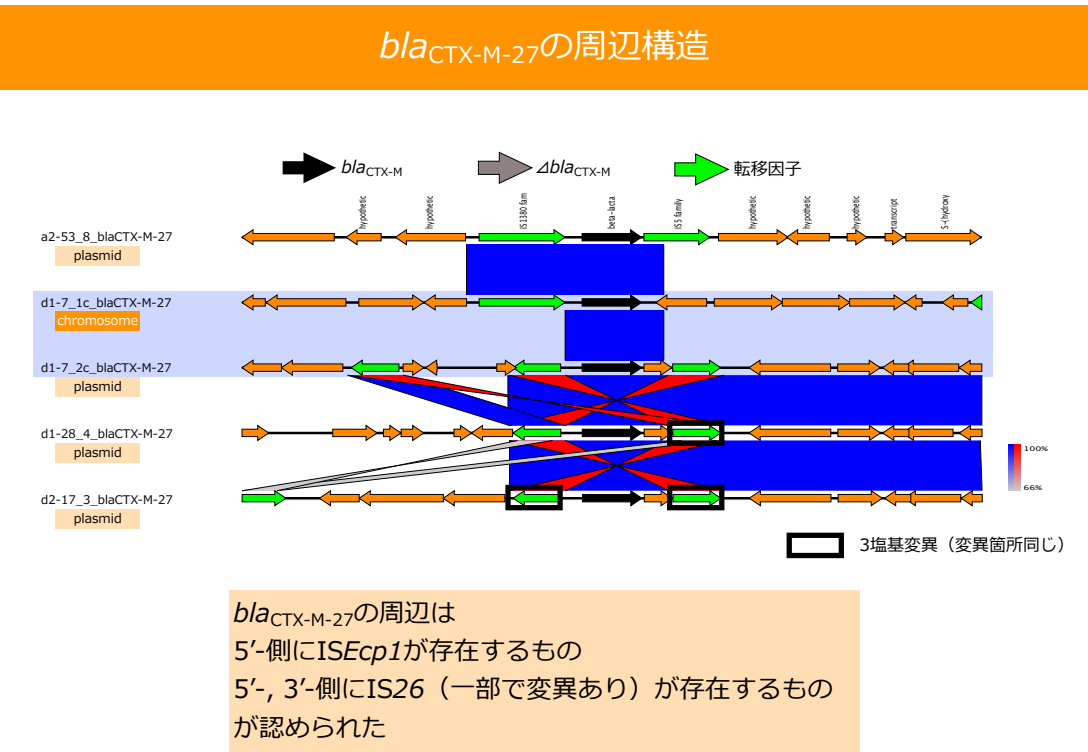


図 1 7

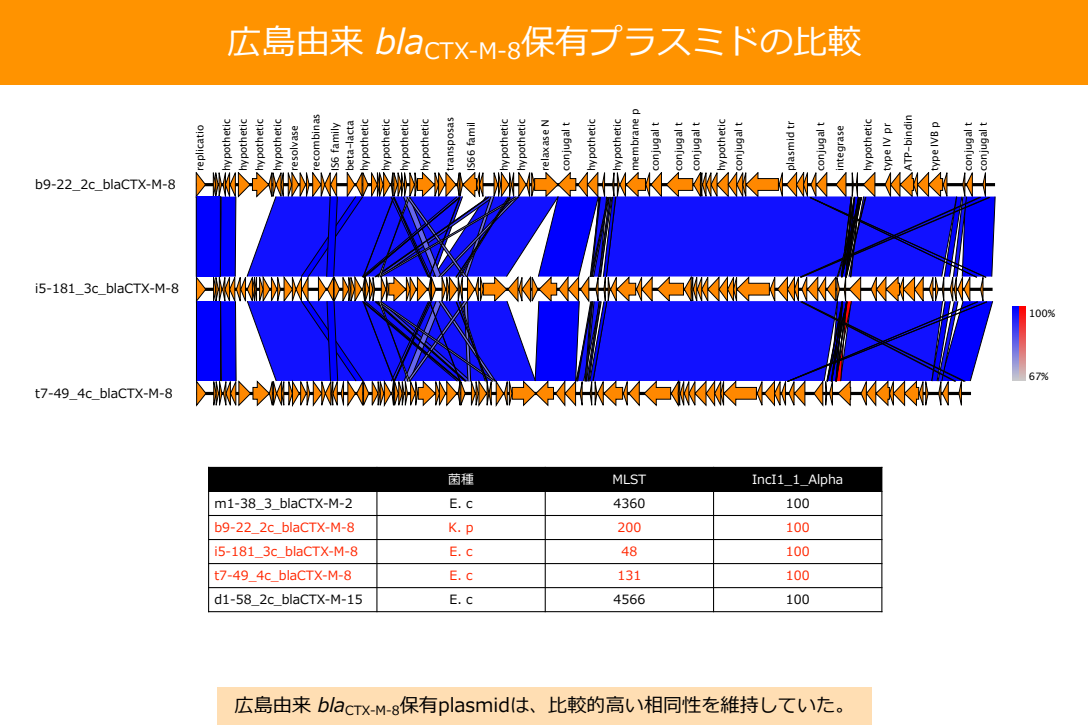


図 1 8

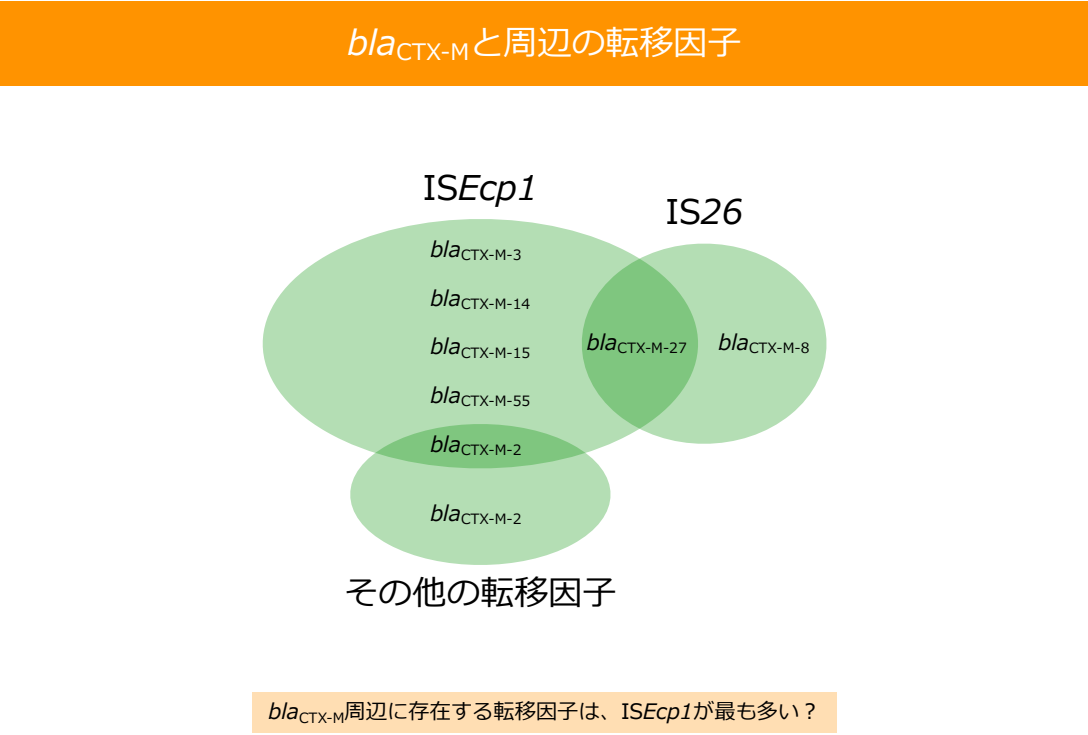


表 1 共同研究機関で分離された薬剤耐性菌の NGS 解析結果および論文投稿状況

Strain name	Species	Isolation Source	解析状況
48-1 (Kpu48)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{SHV-27}</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>) : length=5154267 (incomplete) plasmid (<i>dfrA7</i> , <i>sul1</i>) : length=222698 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1B}</i>) : length=30445 (complete)
48-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{SHV-27}</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>) : length=5396391 (incomplete) plasmid (<i>dfrA7</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i>) : length=222732 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1B}</i>) : length=30433 (complete)
59	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>aadA7</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>qnrA1</i> , <i>bla_{OXA-10}</i>) : length=4223152 (complete) plasmid (<i>flor</i>) : length=6972 (complete)
96	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>aadA7</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>bla_{CMY-2}</i> , <i>qnrA1</i> , <i>bla_{OXA-10}</i>) : length=4193451 (incomplete) plasmid (<i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>flor</i>) : length=112932 (complete) plasmid : length=9035 (complete)
105	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome : length=4059013 (incomplete) plasmid : length=9008 (complete) plasmid : length=3446 (complete)
218	<i>Providencia stuartii</i>	Clinical	chromosome : length=4467400 (complete)
301A	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>dfrA1</i> , <i>aadA1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>flor</i> , <i>sul2</i>) : length=4202900 (complete)
126	<i>Proteus mirabilis</i>	Clinical	chromosome (<i>aadA2</i> , <i>flor</i> , <i>sul2</i>) : length=4128302 (complete) plasmid : length=6314 (complete)
LM22-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Food (chicken)	chromosome (<i>bla_{SHV-71}</i>) : length=5293597 (complete) plasmid (<i>bla_{VIM-1}</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>dfrA1</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{CTX-M-9}</i> , <i>mcr-9</i>) : length=281251 (complete) plasmid (<i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>bla_{OXA-9}</i>) : length=124214 (complete)
65-VIM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical	plasmid (<i>bla_{VIM-28}</i>) : length=66324 (complete)
56	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{GES-1}</i>) : length=6955839 (incomplete) plasmid (<i>bla_{VIM-28}</i>) : length=360340 (complete)
71	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clinical	chromosome (<i>bla_{GES-1}</i> , <i>bla_{OXA-488}</i>) : length=4333331 (incomplete) plasmid (<i>bla_{VIM-28}</i>) : length=361985 (complete) plasmid : length=191992 (complete) plasmid : length=6889 (complete)
37	<i>Enterobacter cloacae</i>	Food (beef)	chromosome : length=4673152 (complete) plasmid (<i>bla_{VIM-1}</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> , <i>mcr-9</i>) : length=270915 (complete) plasmid : length=129016 (complete) plasmid : length=108277 (complete) plasmid : length=6851 (complete)
42	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Food (minced meat)	chromosome (<i>bla_{OXA-488}</i>) : length=4020969 (incomplete); (<i>bla_{VIM-24}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>sul1</i>) : length=1146675 (incomplete) plasmid : length=193321 (complete) plasmid : length=6901 (complete)
Kpn AO15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vegetable (organicitalian parsley)	chromosome (<i>bla_{SHV-28}</i>) : length=5273076 (complete) plasmid (<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i>) : length=201745 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{OXA-9}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>aac(6')-Ib</i>) : length=122804 (complete) plasmid (<i>bla_{CTX-M-14b}</i>) : length=67119 (complete) plasmid : length=9294 (complete)
Kpn AO22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Vegetable (organicbaby leaf mix)	chromosome (<i>bla_{SHV-28}</i>) : length=5270888 (complete) plasmid (<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>bla_{TEM-1A}</i>) : length=201745 (complete) plasmid (<i>bla_{TEM-1A}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{OXA-9}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>aac(6')-Ib</i>) : length=122804 (complete) plasmid (<i>bla_{CTX-M-14b}</i>) : length=67119 (complete) plasmid : length=9294 (complete)
Aba AO22	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vegetable (organicbaby leaf mix)	chromosome (<i>bla_{ADC-25}</i> , <i>bla_{OXA-66}</i>) : length=3954640 (complete) plasmid : length=110967 (complete) plasmid (<i>bla_{OXA-72}</i>) : length=10880 (complete)

論文accepted

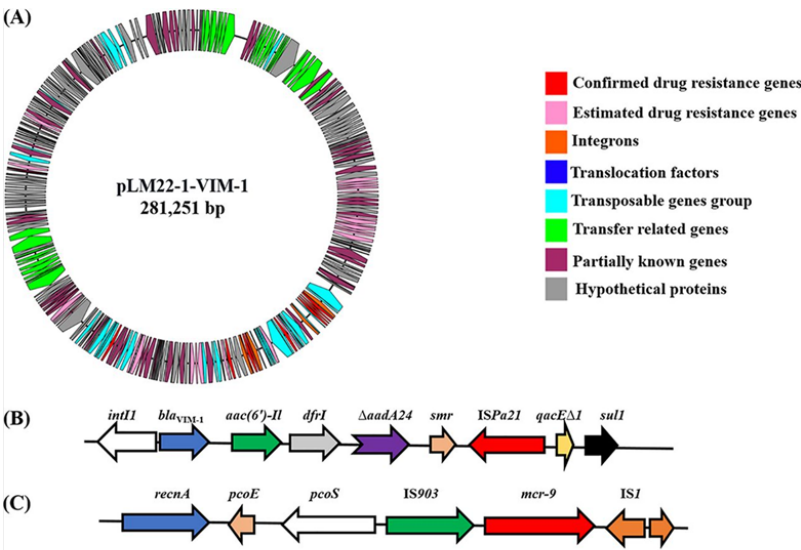


FIG 1 Analysis of the IncHI2A plasmid pLM22-1-VIM-1 carried by the foodborne carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strain LM-22-1. (A) Circular map of pLM22-1-VIM-1. (B) The genetic environment of the *bla*_{VIM-1} gene, which lies within a class 1 integron. (C) Genetic context of the *mcr-9* gene.

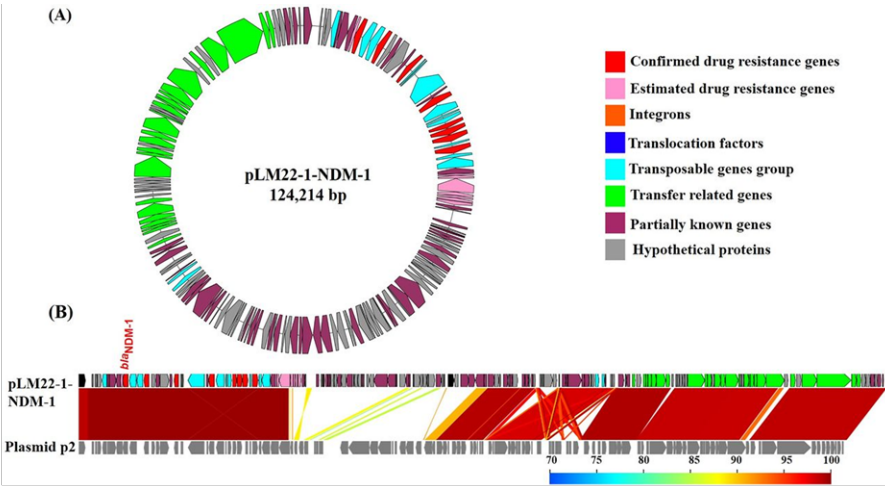
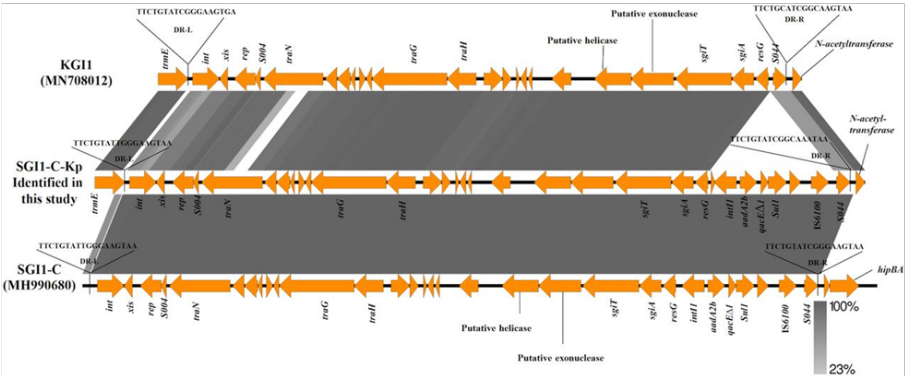


FIG 2 Analysis of the IncFII(K) plasmid pLM22-1-NDM-1 carried by the foodborne carbapenem-producing *K. pneumoniae* strain LM-22-1. (A) Circular map of pLM22-1-NDM-1. (B) Comparative sequence analysis of the *bla*_{NDM-1}-encoding plasmid pLM22-1-NDM-1 to a related *bla*_{NDM-1} IncF plasmid p2 (GenBank accession number CP009115.1) harbored by another *K. pneumoniae* strain.

chromosome



Ahmed M. Soliman et al. Antimicrob. Agents Chemother. 2020; doi:10.1128/AAC.01055-20

plasmids

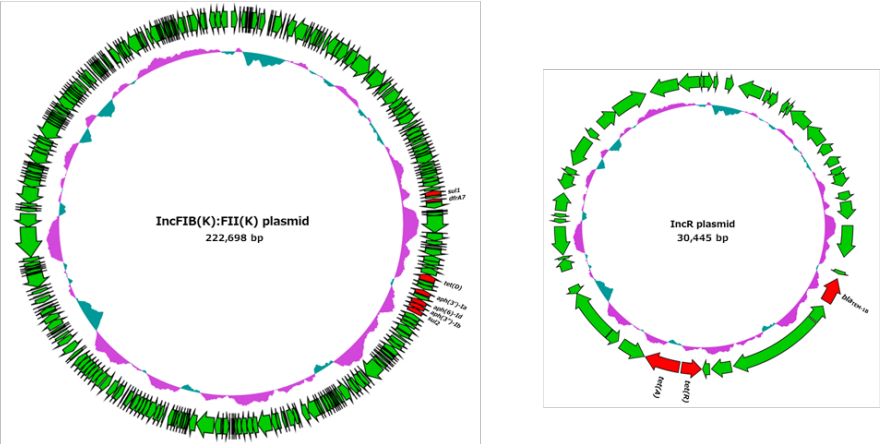
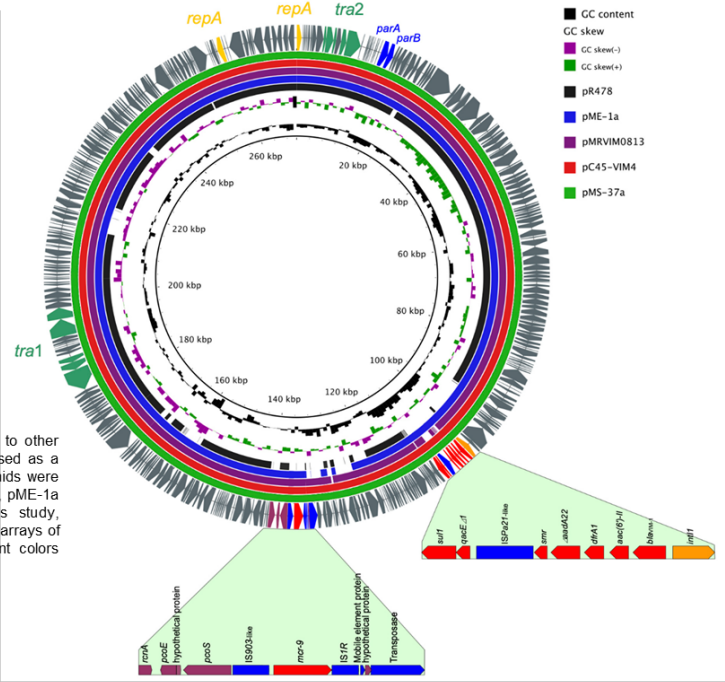


Table 1. Characteristics of chromosome and plasmids harbored by *E. hormaechei* MS37.

Genetic Element	Size (bp)	MLST	pMLST	Plasmid Incompatibility Group	Antibiotic Resistance Gene(s)
Chromosome	4,673,152	ST279	NA	NA	<i>fosA</i> , <i>bla</i> _{ACT-16}
pMS37a	270,915	NA	ST1	IncHI2/IncHI2A	<i>sul1</i> , <i>mcr-9</i> , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>tet(A)</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>ΔaadA22</i> , <i>dfrA1</i>
pMS37b	129,016	NA	Unknown	IncC	NA
pMS37c	108,277	NA	Unknown	IncFIB	NA
pMS37d	6851	NA	Unknown	ColRNAI	NA

NA, not applicable.

Figure 1. Circular map of *bla*_{VIM-1} and *mcr-9*-coharbouring IncHI2 plasmid compared to other reported similar plasmids. The complete sequence of pMS37a (the outer circle) was used as a reference plasmid. The circular maps were generated using the BRIG software and plasmids were included in the following order (inner to outer circles): pR478 (GenBank ID: BX664015.1), pME-1a (CP041734), pMRVIM0813 (KP975077), pC45-VIM4 (LT991958), and pMS37a (this study, accession no. CP053191). The resistance loci were highlighted in full (the gene cassette arrays of class 1 integron and the genetic structure surrounding the *mcr-9* gene). The different colors indicate different plasmids and are listed in the color key.



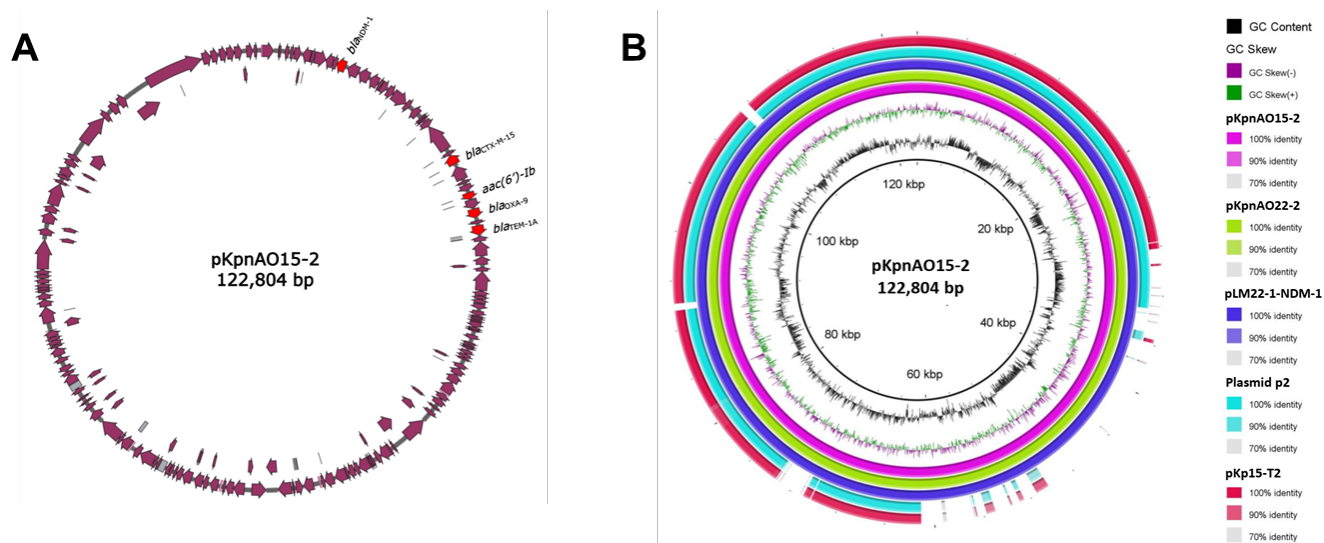


FIG 1. Plasmid structure of pKpnAO15-2, and pKpnAO22-2 identified in this study and comparison with other similar plasmids. Both the plasmids were IncFII(K):IncR-type of 122,804 bp in length and shared >99.99% nucleotide identity (A). Genes and open reading frames (ORFs) are shown as arrows with their transcriptional orientations indicated by arrowheads. This figure was generated using the BRIG tool (<http://brig.sourceforge.net/>) (B). The whole sequence of pKpnAO15-2 was used as a reference. The plasmids were included in the following order: pKpnAO15-2 (identified in this study), pKpnAO22-2 (identified in this study), pLM22-1-NDM-1, plasmid p2 (CP009115.1), and plasmid pKp15-T2 (MN657248.1) (B).

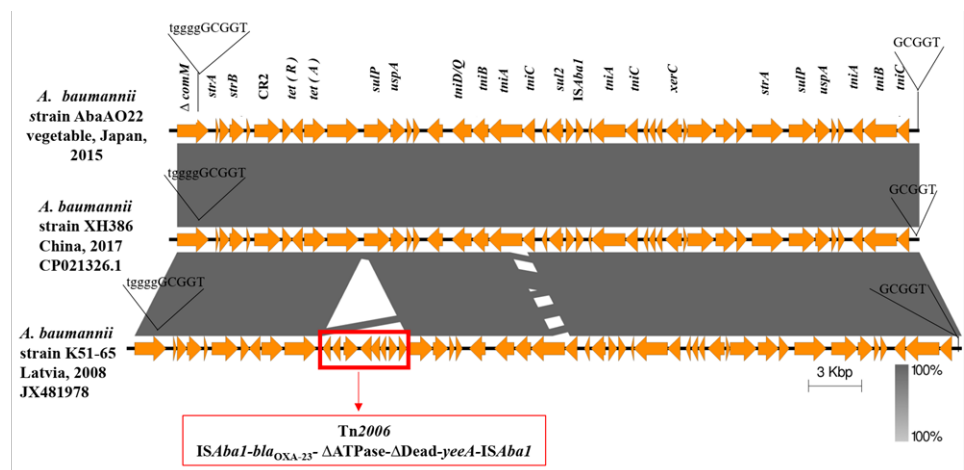
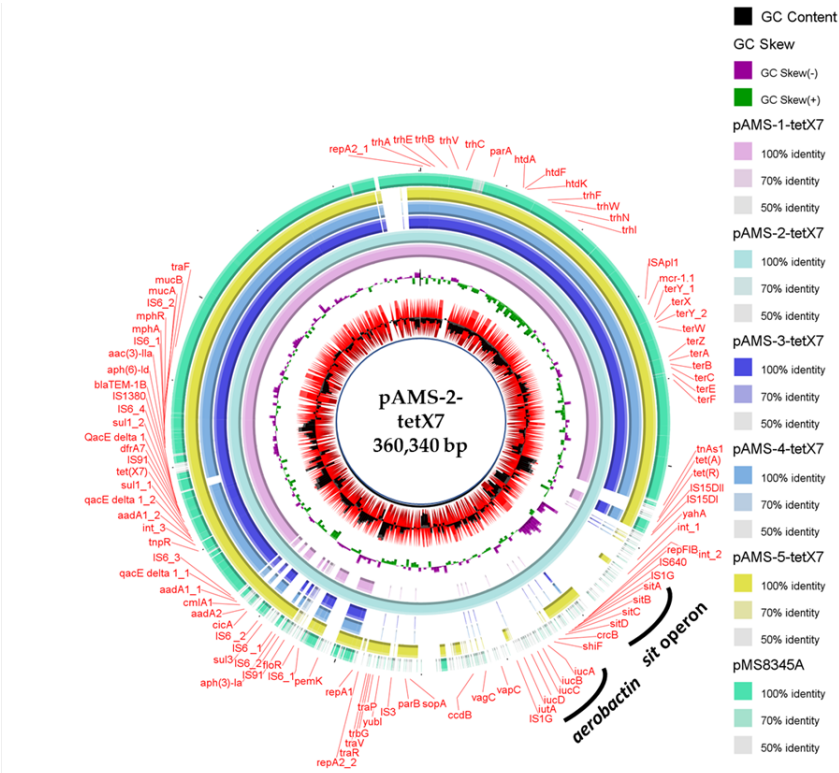


FIG 3. Genetic structures of AbaR4-AO22 and other related AbaR4-like GIs. Genes and open reading frames (ORFs) are shown as arrows with their transcriptional orientations indicated by arrowheads. The figure was drawn using the EasyFig tool (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>). AbaR4-AO22 was integrated into the chromosomal comM gene and was flanked by a 5-bp target site duplication of 5'-GCGGT-3'. AbaR4-AO22 was identical to AbaR4 from *A. baumannii* strain XH386 (CP021326.1) but lacking Tn2006 (ISAbal-blaOXA-23-ΔATPase-ΔDead-yeeA-ISAbal) identified in AbaR25 (JX481978).



Schematic representation of IncHI2 plasmid carrying tet(X7) and mcr-1.1 (A), the genetic environment of tet(X7) (B), and IncFII plasmids carrying fosA4 (C) identified from the genome sequences of *E. coli* strains analyzed in this study. Only one IncHI2 plasmid, pMS8345A, carrying tet(X7) and mcr-1.1 from *E. coli* strain MS8345, Qatar (accession no. CP025402.1) have been detected from NCBI GenBank and was included in the figure. Linear comparison of the contigs carrying tet(X7) detected in this study with the chromosomal contig carrying tet(X7) from *Pseudomonas aeruginosa* strain Pa-3, Pakistan (accession no. JAATVZ010000055.1) and part of the IncHI2 plasmid, pMS8345A, carrying tet(X7) from *E. coli* strain MS8345, Qatar (accession no. CP025402.1).

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
分担課題 無症状保菌者由来サルモネラの薬剤感受性プロファイル解析に
関する研究

研究分担者 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部・部長)
研究協力者 泉谷秀昌 (国立感染症研究所・細菌第一部・室長)

研究要旨

この研究では、サルモネラヒト由来株に焦点をあてて解析する体制構築を目指した。食品からヒトへの菌の伝播を考えるうえで重要な健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスを除くサルモネラ (non-typhoidal *Salmonella*, NTS) 症は食中毒の中で件数、患者数とも上位を占めることが知られている。また、食品由来感染症（食中毒として捉えることができない事例を含む）としても、カンピロバクター感染症とともに未だ多数の症例が国内で存在することが推定されている。サルモネラ属菌による食品由来推定患者数は年間 14～25 万人程度（2005～2008）とされている（平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業『食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究』：分担研究「宮城県における積極的 食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定」 分担研究者 窪田邦宏、春日文子、2010、p. 117-136.）。

大規模流通食品の汚染が、直接大規模事例につながる危険がある。そのため、散发例の把握、食品汚染の実態の把握からリスク要因を抽出し、NTS 対策の効率化、高度化が望まれる。また、薬剤感受性プロファイルを理解することで、NTS の動物-ヒト間の伝播の様子を探る上でも分離株の詳細な検討が必要である

本研究では、国立感染症研究所で収集された NTS 株の整理をするとともに、健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った

B. 研究方法

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

業務従事者の検便を実施している検査会社から、2013 年から 2017 年に分離された血清群 04、08 及び 09 の株の分与を受け、これについて H 型別及び薬剤感受性試験を行った。

薬剤感受性試験はディスク法を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン (ABPC もしくは A と略記)、ストレプトマイシン (SM もしくは S)、テトラサイクリン (TC もしくは T)、カナマイシン (KM もしくは K)、クロラムフェニコール (CP もしくは C)、ST 合剤 (Sx)、ゲンタマイシン (GM もしくは G)、ナリジクス酸 (NA もしくは N)、セフトキシム (CTX もしくは Ct)、セフトジジム (CAZ もしくは Cz)、セフトキシチン (FOX)、シプロフロキサシン (CPFX もしくは Cp)、ホスホマイシン (FOM もしくは F)、アミカシン (AMK)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、アジスロマイシン (AZM もしくは

Zm) の 17 薬剤であった。

上記供試菌株のうち、主要血清型もしくは CTX 等重要な薬剤に耐性を示した株 106 についてゲノム解析を行い、耐性遺伝子の分布を調べた。

供試菌株から DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン社) によりゲノム DNA を調整、Nextera XT DNA Library Preparation Kit 及び MiSeq Reagent Kit v3 (イルミナ社) によりショートリードデータを取得した。リードデータから SPAdes を用いて配列をアッセンブルし、当該配列データを Bionumerics にとりこみ耐性遺伝子の検索を行った。

倫理面への配慮

いずれも菌株のみの解析であり、個人情報 は連結不可能匿名化されている。

C. 研究結果

血清型別、薬剤感受性試験に供試した株は 04 群 736 株、08 群 449 株、09 群 131 株であった。

1. 04 群の結果 (図 1a、2a) :

主な血清型の内訳は Schwarzengrund 34%、04:i:- 14%、Agona 10%、Saintpaul 9%、Typhimurium 8% であった。主要薬剤に対して 50% 以上耐性となったのは Schwarzengrund (SM : 70%、TC : 74%、KM : 74%)、04:i:- (ABPC : 78%、SM : 79%、TC : 84%)、Typhimurium (ABPC : 57%、SM : 51%) であった。

2. 08 群の結果 (図 1b、2b) :

主な血清型の内訳は Manhattan 27%、Newport 18%、Corvallis 11%、Litchfield 8%、Nagoya 5% であった。主要薬剤に対して 50% 以上耐性となったのは、Manhattan (SM : 88%、TC : 84%)、Kentucky (ABPC : 56%、TC : 75%、CPFX : 69%)、Hadar (TC : 85%、KM : 54%)、Blockley (ABPC : 91%、CP : 100%、SM : 100%、TC : 82%、KM : 100%、AZM : 91%) であった。

3. 09 群の結果 (図 1c、2c) :

主な血清型の内訳は、Enteritidis 75%、Panama 8%、Javiana 5% であった。主要薬剤に対して 50% 以上耐性となったのはなかつ

た。

上記薬剤耐性に係る遺伝的背景を調べるためゲノム解析を行った。ゲノム解析に供試した 106 株の血清型の内訳は、04:i:- (14)、Agona (9)、Albany (1)、Blockley (10)、Heidelberg (2)、Indiana (1)、Kentucky (11)、Manhattan (17)、Muenchen (1)、Saintpaul (3)、Schwarzengrund (28)、Stanley (1)、Typhimurium (8) であった。04:i:-、Agona、Manhattan、Schwarzengrund、Typhimurium は主要血清型の観点から、それ以外の血清型はセフトキシム、シプロフロキサシンなどの重要な薬剤に対する耐性の観点から選択された。

4. テトラサイクリン耐性遺伝子 (図 3)

tetA、*tetB*、*tetG*、*tetM* が検出された。*tetA* が最も高頻度 (64%) かつ広範な血清型に検出された。*tetB* は 04:i:- のみに、*tetG* は Typhimurium のみに検出された。

5. サルファ剤耐性遺伝子 (図 2)

sul1、*sul2*、*sul3* がそれぞれ 51%、14%、3% の頻度で検出された。いずれも複数の血清型に分布していた。

6. アミノグリコシド耐性遺伝子-1 (図 4)

aadA1、*aadA2*、*aadA7*、*aadA17*、*aadA24* が検出された。*aadA1* が最も高頻度 (42%) かつ広範な血清型に検出された。*aadA7* の検出頻度は 9% であったが、検出された血清型は Kentucky のみであった。

7. トリメトプリム耐性遺伝子 (図 5)

dfrA1、*dfrA12*、*dfrA14* が検出された。*dfrA14* の検出頻度が 17% と最も高く、その 78% が Schwarzengrund であった。

8. アミノグリコシド耐性遺伝子-2 (図 6)

aph(3')-Ia、*aph(3'')-Ib*、*aph(3')-IIa*、*aph(4)-Ia*、*aph(6)-Ic*、*aph(6)-Id* が検出された。*aph(3')-Ia*、*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id* の検出頻度が高く、それぞれ 31%、24%、25% であった。*aph(3')-Ia* は Blockley と Schwarzengrund に、*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id* は 04:i:- と Blockley に多く見られた。

9. β ラクタマーゼ関連遺伝子 (図 7)

TEM、CARB、CTX-M、SHV など 9 種類の遺伝子が検出された。最も検出頻度が高かったのは *bla*TEM-1B で 24%、次いで *bla*CTX-M-15 の 9%であった。前者は 04:i:-、Kentucky、Typhimurium に、後者は Blockley において多く検出された。

10. クロラムフェニコール耐性遺伝子 (図 8)

catA1、*catA2*、*cmlA1* の 3 種類が検出され、その頻度は併せて 14%であった。*catA2* が 10%の検出頻度で、そのほとんどは Blockley において検出された。

11. キノロン耐性遺伝子

キノロン耐性に係る *gyrA* 遺伝子などにおける点変異が検出された株は 19%であった。Kentucky は 11 株すべてにおいて点変異が検出され、GyrA に 2 か所 (S83F+D87N)、ParC に 1 か所 (S80I) の 3 重変異を有していた。他に 3 重変異を有していたのは Indianal 株であった。

D. 考察

サルモネラ属菌は様々な動物へ適応することでその多様性を獲得してきたと考えられている。各血清型のサルモネラ属菌の宿主域により、リスク食品や接触感染のリスクが規定される。ヒトへは、食品を介する感染が主であり、一部ヒトと動物の接触によるヒト感染が存在する。ヒトーヒトの直接感染のリスクは腸チフス原因菌（チフス菌、パラチフス菌）ほど明確ではないが、調理従事者の保菌が食品の汚染の原因となることは否定できない。

サルモネラ属菌がヒト腸管内に存在している状態（健康保菌）についての知見には限りがある。本研究では、これらの分離株を詳細に解析することでサルモネラ属菌の耐性化機構の一つの側面を考察することを目的としている。

2013 から 2017 年に分離された健康保菌者由来サルモネラ 1,316 株について血清型別及び薬剤感受性試験を行った。04 群及び 08 群は多様な血清型が検出されたが、09 群は Enteritidis が 75%を占め、多様性の低さが顕著であった。また薬剤耐性も 09 群に

おいては全般に低かった。

04 群及び 08 群では Schwarzengrund、Manhattan などの主要な血清型では SM、TC あるいは KM などの共通の薬剤に耐性を示す株が多かった。一方で、04 群の Saintpaul、Stanley、08 群の Newport、Corvallis、Litchfield などのようにほとんどの薬剤に感受性を示す血清型もあり、血清型によって薬剤耐性の分布に多様性が観察された。

2013 から 2017 年に分離された健康保菌者由来サルモネラのうち 106 株についてゲノム解析を行い、主要な薬剤に対する耐性遺伝子を検索した。

主要血清型である（04:i:-、Agona、Manhattan、Schwarzengrund、Typhimurium）において多く見られる SM、TC 耐性について、前者は *aadA1* が、後者は *tetA* が大きく関与していることが示唆された。一方で、04:i:- については *tetB* が、Typhimurium には *tetG* が、*aadA7* については Kentucky が特異的に関連していることも示唆された。

サルファ剤耐性遺伝子 *sul* は比較的広く検出された。一方で、トリメトプリム耐性遺伝子 *dfp* は主に Schwarzengrund に偏って検出された。ST 合剤耐性は上記耐性遺伝子の組み合わせによるが、ゲノム情報から単独耐性について情報が得られた。

KM 耐性に係る耐性遺伝子 *aph* は 6 種類検出された。Schwarzengrund では *aph(3')-Ia* が、04:i:-では *aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id* が Blockley では上記 3 種類が高頻度に検出され、血清型によって遺伝子の分布が異なることが示唆された。

ABPC 耐性に係る *bla* 遺伝子としては TEM1b が多く検出され、複数の血清型に分布していた。CARB-2 は Typhimurium でのみ検出された。CTX 耐性に係る遺伝子としては CTX-M-15 が Blockley に、TEM-52b が Manhattan に偏って検出された。

CM 耐性に係る遺伝子としては *catA2* が Blockley に偏って検出された。また *floR* が Typhimurium をはじめ複数の血清型において検出された。

キノロン耐性に係る遺伝子として *gyrA*、*parC* に点変異が検出された株が、特に

Kentucky において顕著であった。海外でもニューキノロン耐性 Kentucky ST198 は問題となっており、本研究の Kentucky 株もこれらと関係する可能性が考えられる。

全般的に *tetA*、*aadA1* などの広範に分布する耐性遺伝子もあるものの、同じ薬剤耐性でも *aph* 遺伝子のように血清型によって分布の組み合わせが異なるもの、*tetB* のように特定のサブタイプが特定の血清型に偏って検出されるものなど、遺伝的背景も多様性があることが示唆された。

E. 結論

検便検査会社の協力をえて、04 群、08 群及び 09 群サルモネラ属菌の性状解析を実施するための体制の構築を始め、血清型、薬剤耐性、並びに耐性の遺伝的背景の多様性が明らかとなり、多様なサルモネラが健康保菌者から分離されていることが示され

た。今後の解析の参照として重要な知見であると考ええる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

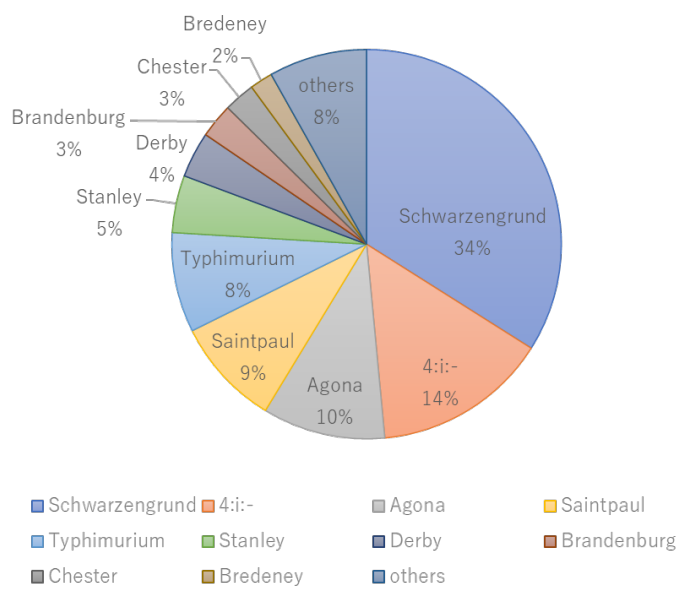
2. 学会発表

特になし。

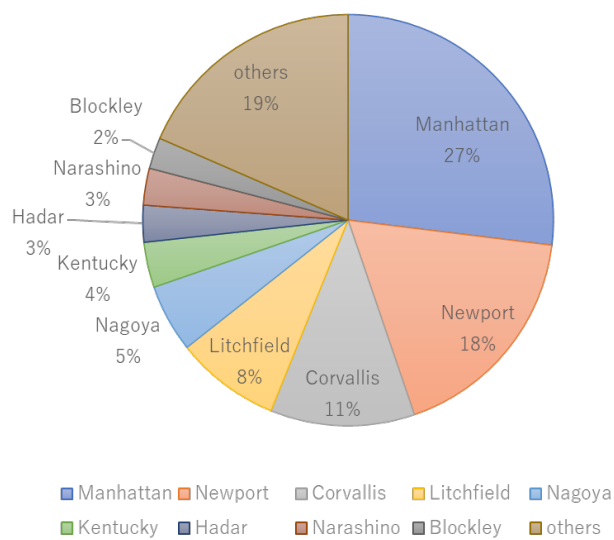
H. 知的財産権の出願・登録状況

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

図1 サルモネラ血清型分布 (a) 04 群、(b) 08 群、(c) 09 群
(a)



(b)



(c)

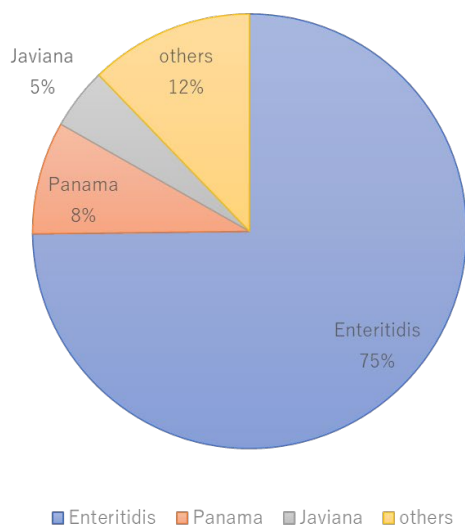


図2 サルモネラ薬剤耐性率 (a) 04 群、(b) 08 群、(c) 09 群

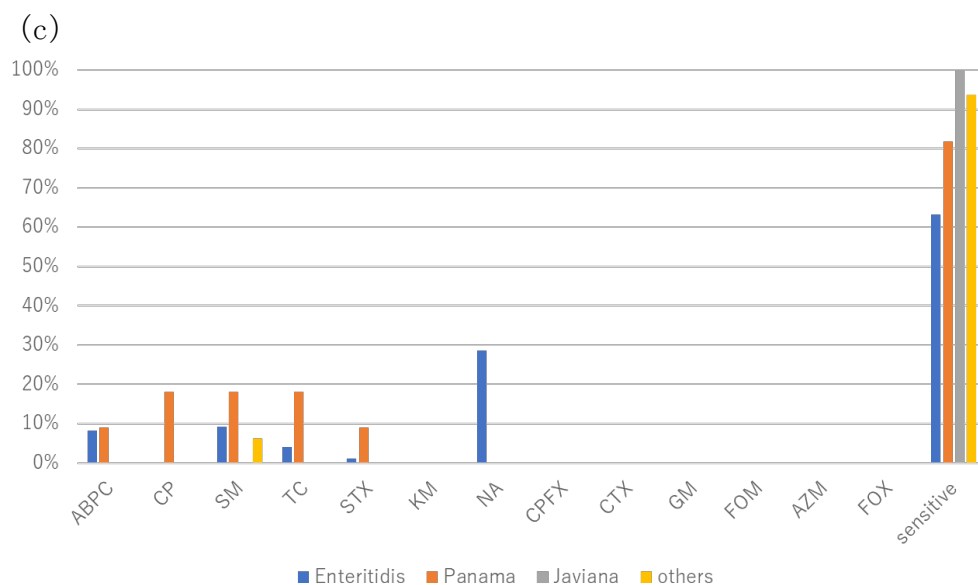
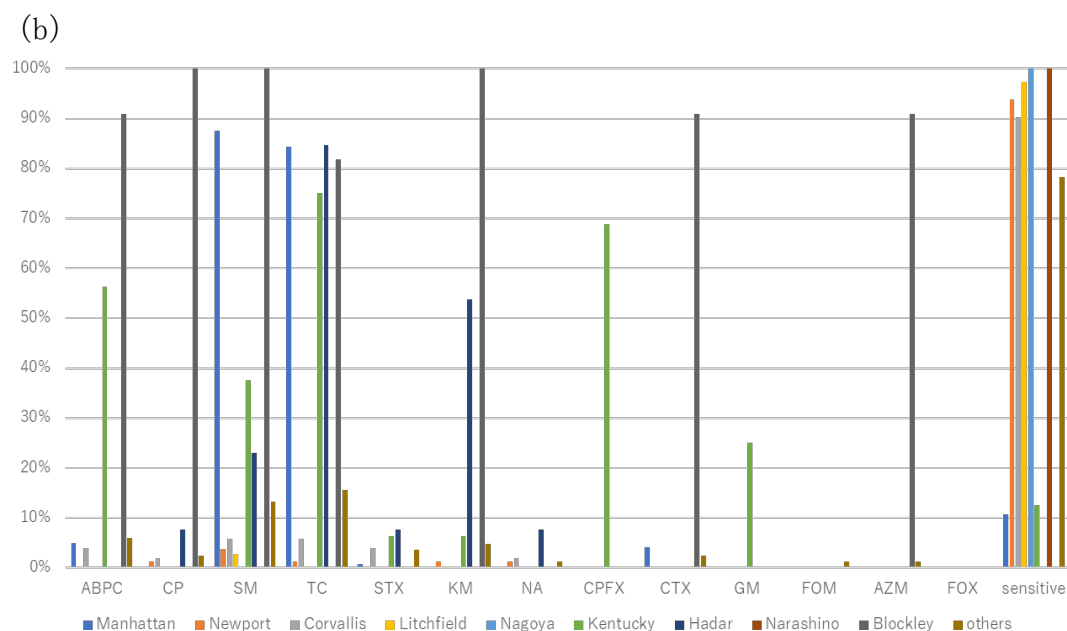
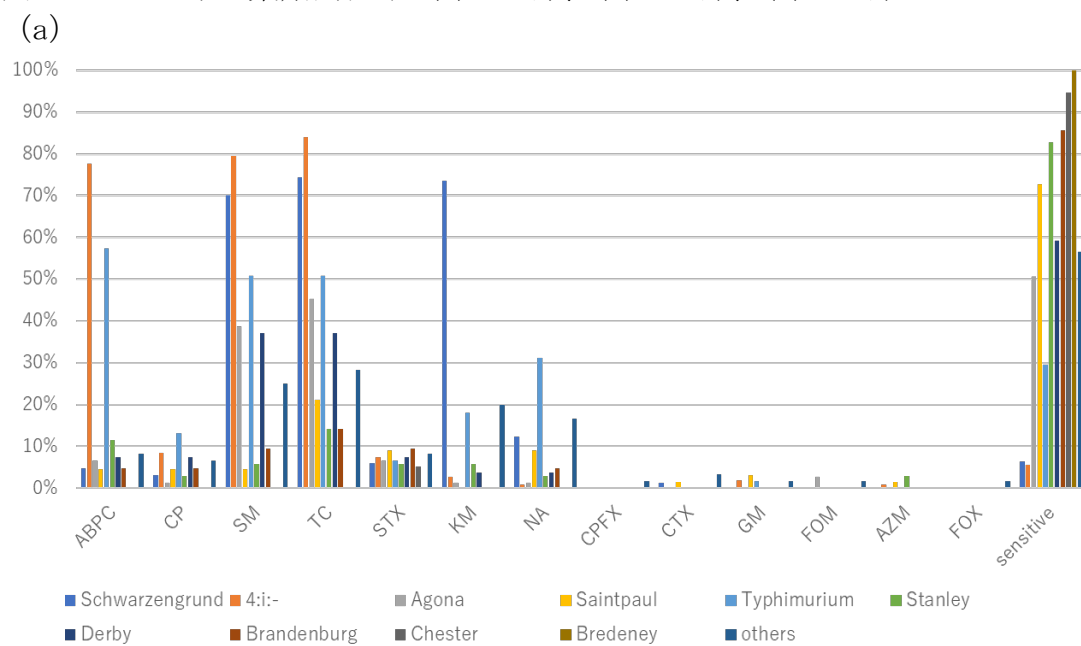


図4 テトラサイクリン耐性遺伝子の分布（下段の数字は供試菌株数；以下の図に関しても同じ）

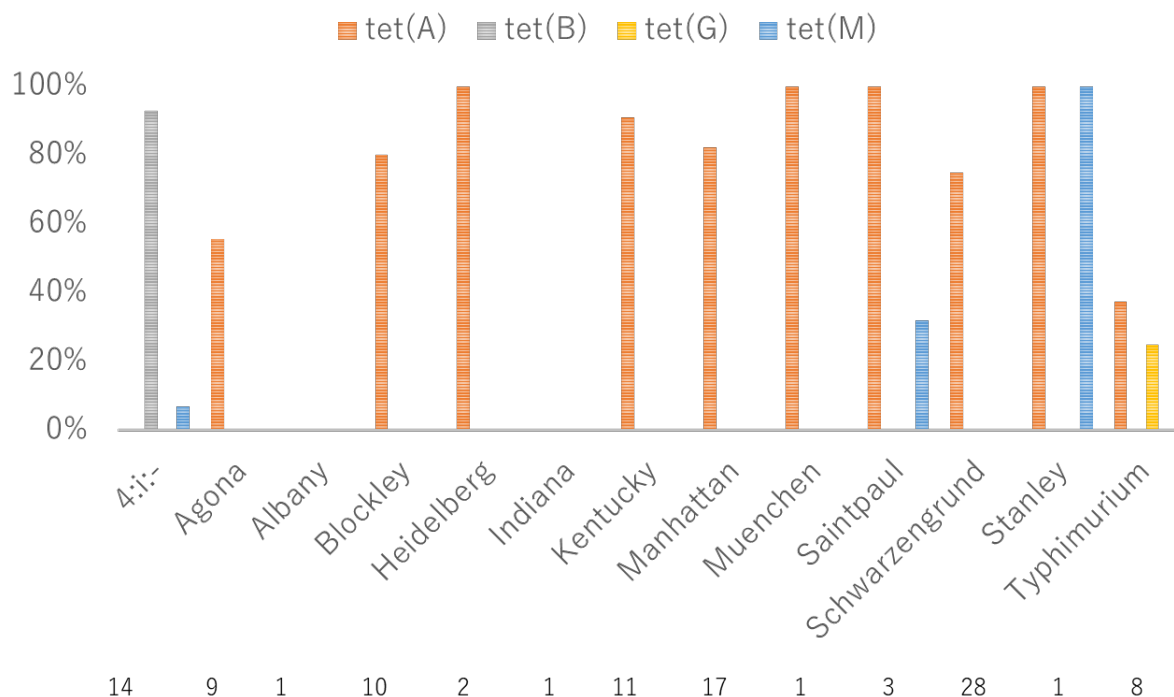


図5 サルファ剤耐性遺伝子の分布

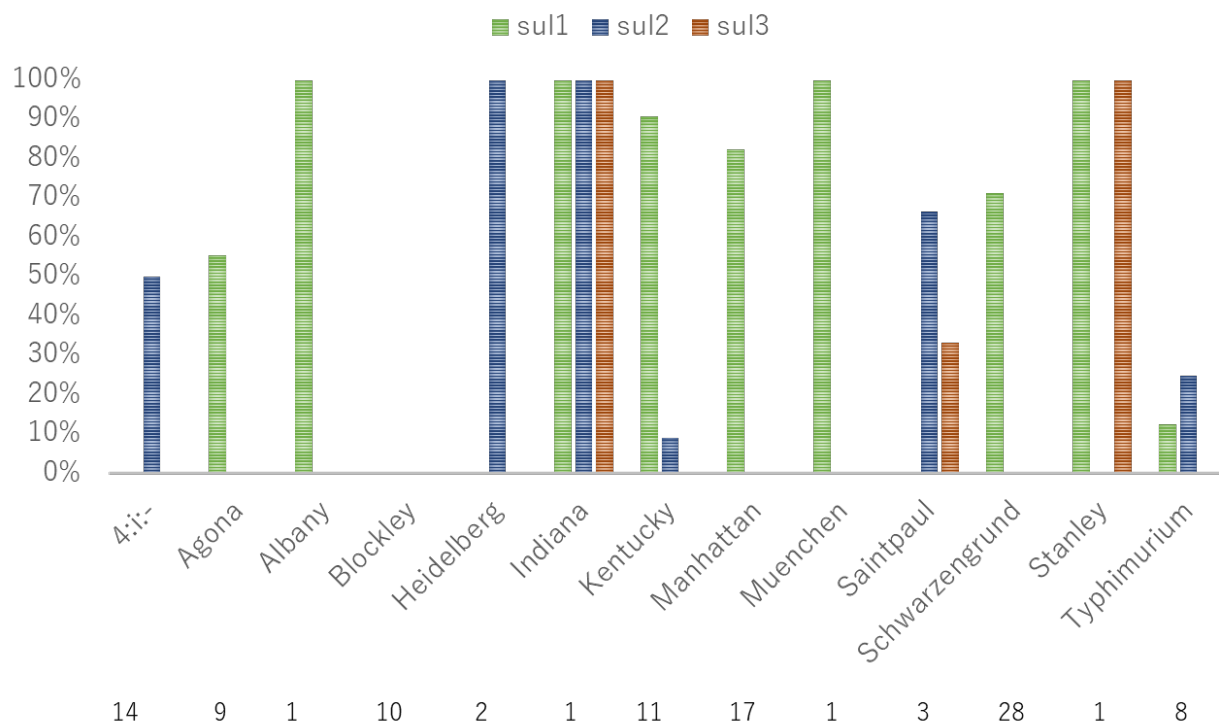


図6 アミノグリコシド耐性遺伝子 *aadA* の分布

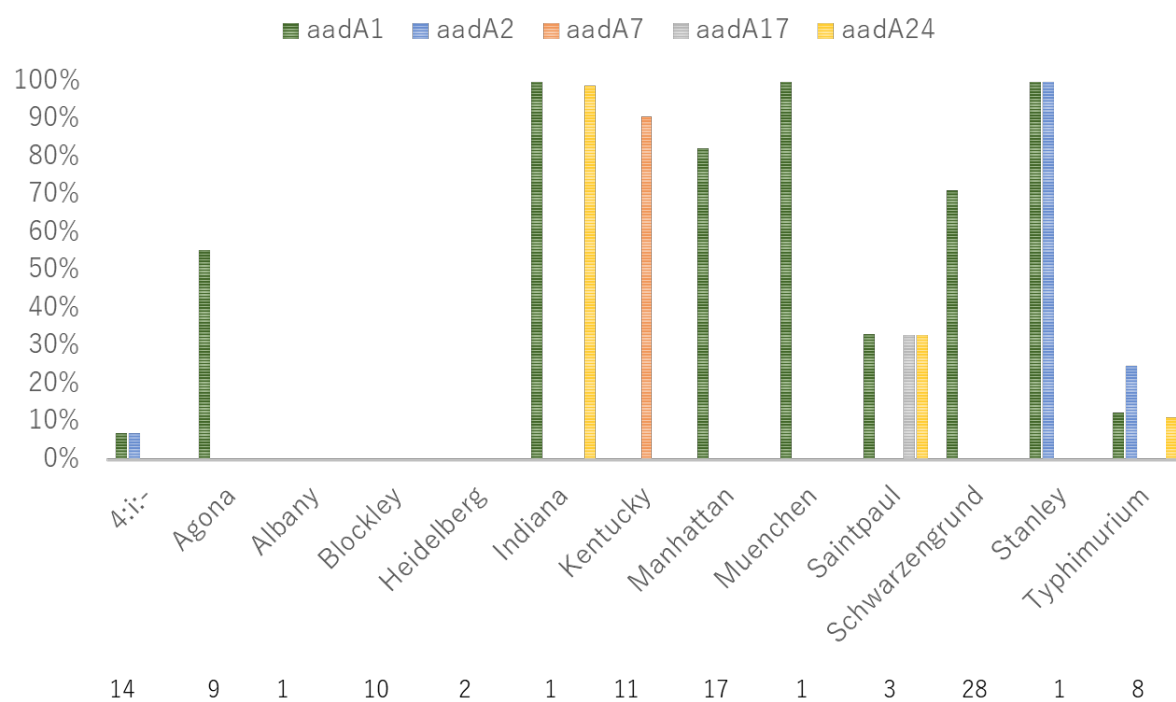


図7 トリメトプリム耐性遺伝子の分布

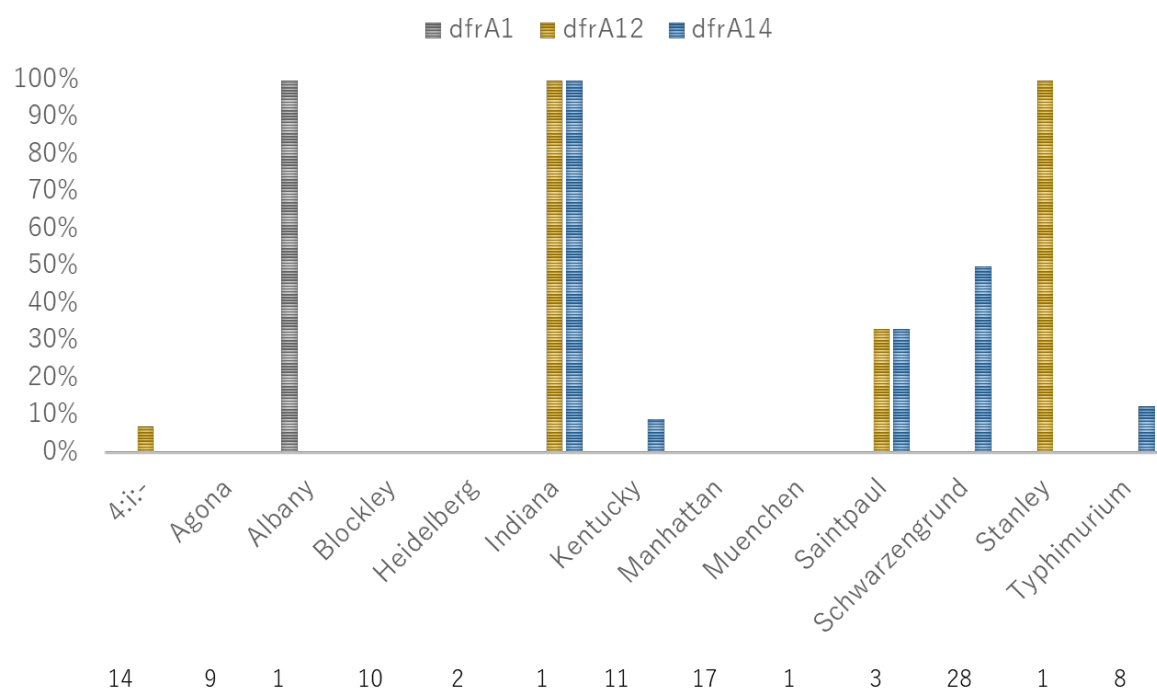


図8 アミノグリコシド耐性遺伝子 *aph* の分布

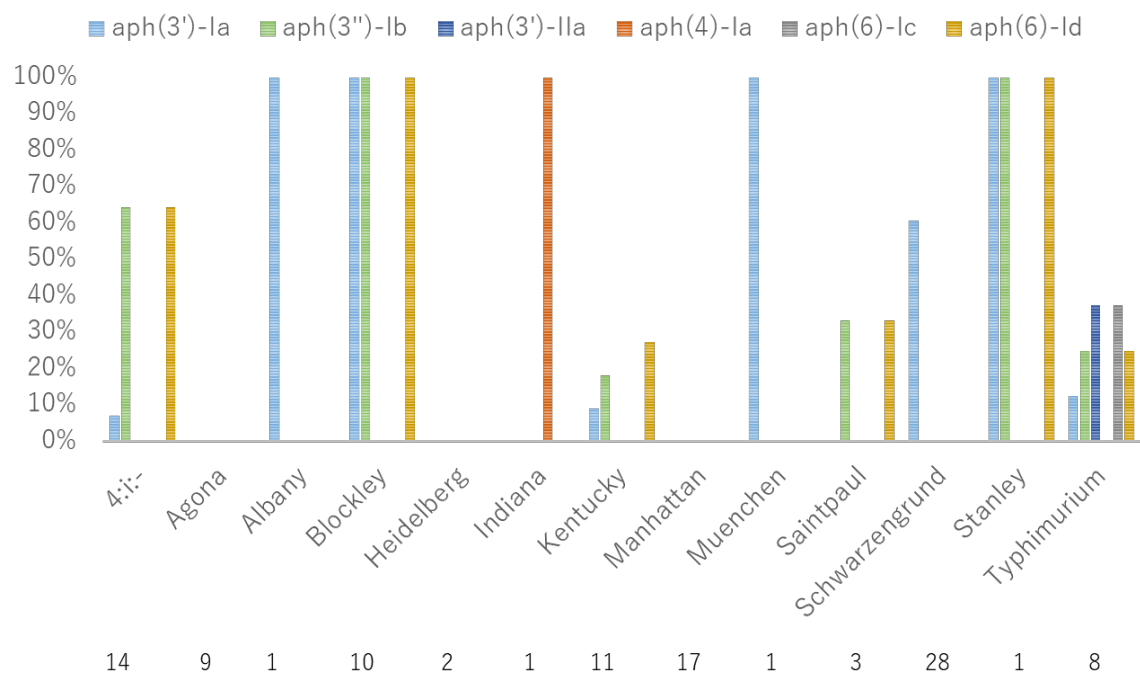


図9 β -ラクタマーゼ関連遺伝子の分布

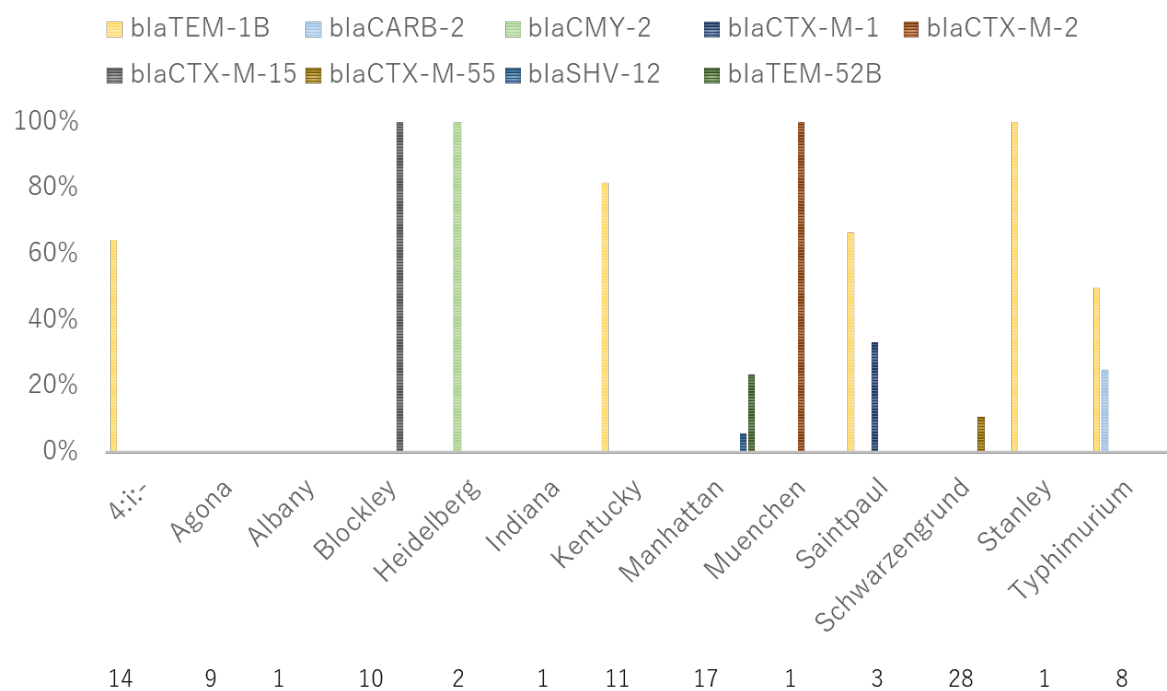
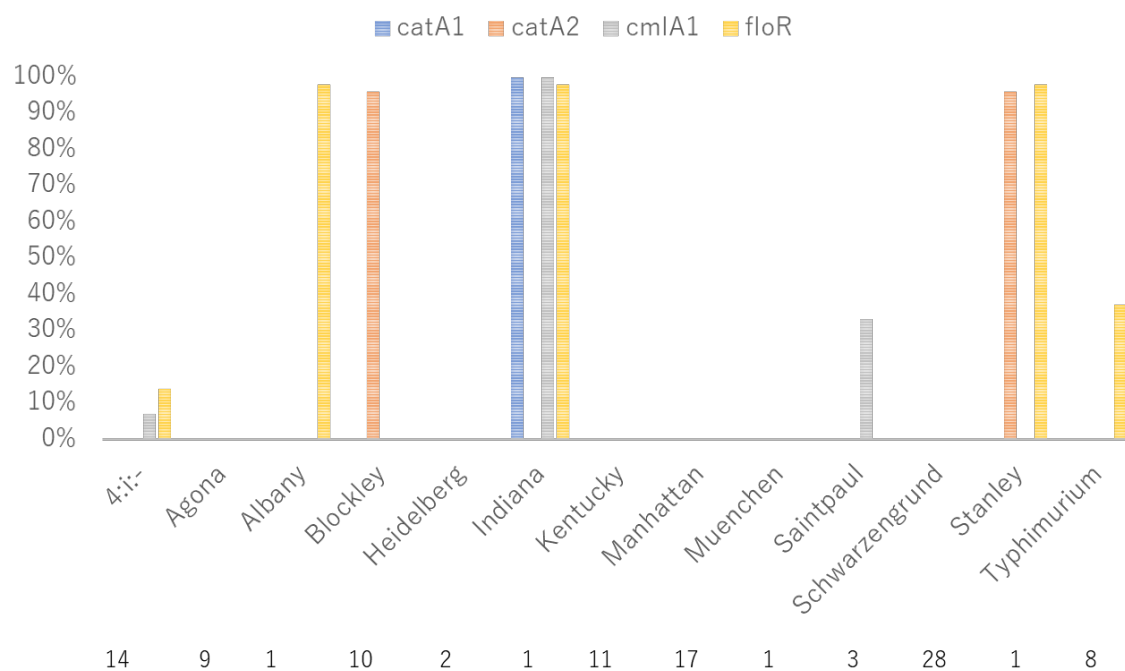


図 10 クロラムフェニコール耐性遺伝子の分布



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）
「食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究」

分担総合研究報告書

食品由来サルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の耐性分布と
遺伝特性に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	佐々木貴正	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	町田李香	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	中山達哉	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	中村寛海	大阪健康安全基盤研究所微生物部微生物課
研究協力者	坂田淳子	大阪健康安全基盤研究所微生物部細菌課
研究協力者	清水秀樹	山梨県食肉衛生検査所
研究協力者	森 篤志	日本食品検査首都圏事業所
研究協力者	村上覚史	東京農業大学農学部
研究協力者	五十君静信	東京農業大学応用生物科学部

研究要旨：輸入・国産鶏肉計 205 検体及び国産食鳥と体 100 検体における ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌等の定量的汚染実態を解析した。鶏肉検体では ESBL 産生大腸菌は 35 検体で定量検出され、平均汚染菌数は 1.50logCFU/g であったほか、食鳥と体検体では 12 検体で定量検出され、平均汚染菌数は 1.66 logCFU/g であった。計 177 分離株の薬剤耐性状況として、 β ラクタム系抗菌剤に加え、TC に耐性を示した菌株は 78.0%となったほか、SM 耐性は 65.0%の分離株で認められる等、5 剤以上の抗菌剤に耐性を示す株は全体の 74%を占めた。分離株の β ラクタマーゼ遺伝子型は CTX-M-1 型が 41.2%、CTX-M-2 型は 26.0%、CTX-M-9 型は 22.6%となり、同 3 型で全体の 89.8%を占めた。また、Inc 型は IncF が全株で陽性となったほか、IncI1 も 43.5%で陽性を示した。鶏肉由来大腸菌とマウス糞便懸濁液の共培養を通じ、IncI1 プラスミドの水平伝達を確認され、生体内での薬剤耐性プラスミドの水平伝達が生じ得る事象を確認した。また、国内のヒト及び動物由来 *C. coli* の薬剤感受性を解析した結果、ヒト臨床分離株は鶏由来株と共に、CPFX、NA、TC 等に対する高い耐性率を認めた一方、豚由来株では EM、TC 等への耐性傾向を示した。豚由来代表株の ST-1562 株はゲノム上に TC、ABPC 耐性遺伝子等を遺伝子クラスターとして保有していたほか、EM 耐性は一塩基置換により獲得されたこと等から豚はヒトの直接的な *C. coli* 感染源として機能している状況にはないと目された。肉用鶏由来サルモネラ分離株では *S. Schwarzengrund* が高頻度に検出され、国産鶏肉分離株でも同様の傾向を示したが、輸入鶏肉分離株では同血清型は認められず、国内の肉用鶏に広く分布している血清型であることが示唆された。国産食鳥と体由来サルモネラ分離株は KM 及び TC 耐性率が高く、輸入鶏肉由来サルモネラ分離株では β ラクタム系抗菌剤への耐性率が高い傾向にあった。

A. 研究目的

ESBL/AmpC β ラクタマーゼ産生大腸菌は鶏肉から高率に検出される状況にあるとされ、当

該食品を介したヒト健康被害との関連性も推察されている。現在、当該耐性菌の汚染実態に関する報告の多くは、定性的な汚染実態あるい

は分離株の特性に留まることが多いが、食品のリスク評価を行う上では定量的データに基づいた分析が国際標準となっている。

本分担研究では、こうした状況を踏まえ、国産・輸入鶏肉並びに、国内の食鳥処理場で解体処理過程にある食鳥と体を対象として、ESBL 産生菌の定性・定量的汚染実態を調査し、分離株の薬剤感受性を検討した。あわせて、鶏及び鶏肉等におけるサルモネラ属菌及びカンピロバクターの汚染実態、並びに分離株の薬剤感受性等について検討を行った。

B. 研究方法

1. 鶏肉及び食鳥と体からの ESBL 産生菌の定量・定性検出試験と薬剤感受性試験

国産鶏肉 100 検体、輸入鶏肉 105 検体、並びに国産食鳥と体 100 検体を対象に、ESBL 産生菌定量試験に供するため、検体 25g に緩衝ペプトン水 (BPW) 100mL を加えてホモジナイズ後、同懸濁液 200 μ L をクロモアガー-ESBL 寒天培地 (CHROMagar) に塗抹し、37°Cにて 24 時間培養を行い、同培地上に発育した定型集落を計数することで定量菌数を求めた。また、上述の検体 25g にセフォタキシム (CTX) 1 μ g/mL 含有 BPW225mL を加えて 10 倍乳剤を調整した後、37°Cで 24 時間増菌培養を行い、増菌培養液一白金耳量をクロモアガー-ESBL 寒天培地に画線塗抹して 37°C24 時間培養を行うことで、ESBL 産生大腸菌の発育を確認した。陽性と判定された集落は、分離を行い、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験に供した。

2. β ラクタマーゼ遺伝子型別及び Incompatibility plasmid 型別試験

ESBL 産生大腸菌分離株の β ラクタマーゼ遺伝子型別は PCR 法によった。CTX-M 型 β ラクタマーゼを産生する ESBL 産生大腸菌株、並びに何れかの薬剤に耐性を示したサルモネラ属菌株については、PCR 法を用いた

Incompatibility (Inc) plasmid 型別試験に供した。

3. IncI1 プラスミドの接合伝達試験

鶏肉由来 ESBL 産生大腸菌株が保有する IncI1 プラスミドの blaCTX-M-1 下流域に mClover3 ORF を相同組み換えにより導入し、これを再び同大腸菌株に組み入れた。同株を Donor としてマウス糞便乳剤と共培養を行い、mClover3 の蛍光を呈する集落数の動態を観察した。

4. サルモネラの定性検出試験及び性状試験

鶏肉・食鳥と体検体からのサルモネラ属菌の定性検出試験については、項 1 の試験検液を 37°C24 時間で増菌培養後、ラパポート・バシリアディス (RV) 培地で二次増菌培養し、一白金耳量をクロモアガーサルモネラ培地 (関東化学) に画線塗抹してサルモネラ属菌を単離した。サルモネラ分離株は、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験並びにサルモネラ免疫血清「生研」を用いた血清型別を行った。

5. *C. coli*分離株の薬剤感受性試験及びゲノム解析

ヒト臨床分離株計 42 株、鶏・牛・豚由来株各 25 株、及びカモ由来株 2 株を対象として、CLSI 法に準じて薬剤耐性試験を行った。また、豚由来代表株である ST-1563 株 4 株より DNA を抽出し、Ion CHEF/S5 を用いてゲノム情報を収集・解析した。

6. 採卵鶏からのサルモネラ及びカンピロバクター定性検出試験

採卵鶏農場にて、各群 3 羽の総排泄腔スワブを採材し、サルモネラ及びカンピロバクター定性検出試験を実施した。得られた分離株については、CLSI 法に準じた薬剤感受性試験を行った。

C. 研究結果

1. 食鳥と体検体における ESBL 産生菌の検出状況.

食鳥と体計 100 検体のうち、大腸菌は 12 検体、腸内細菌科菌群は 27 検体より検出され、同対象菌の何れかが検出された検体数は 30 検体にのぼった。ESBL 産生大腸菌および同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ 2.61 logCFU/g 及び 2.45 logCFU/g であり、最大値は 3.26 logCFU/g 及び 3.11 logCFU/g であった。検出下限未満となった検体数は 70 検体であった。なお、ESBL 産生大腸菌の陽性率は 47.0% であった。

2. 鶏肉検体における ESBL 産生菌の検出状況. (国産鶏肉検体)

国産鶏肉製品計 100 検体のうち、大腸菌は 29 検体、腸内細菌科菌群は 21 検体検出され、これらのいずれかが検出された検体数は 41 検体にのぼった。ESBL 産生大腸菌及び同腸内細菌科菌群の平均値は、それぞれ 2.34 logCFU/g 及び 3.06 logCFU/g であり、最大値は 2.36 logCFU/g 及び 3.23 logCFU/g であった。検出下限未満となった検体数は 59 検体であった。ムネ・モモの部位別に ESBL 産生菌の検出菌数を比較したが、両部位間の成績に有意差は認められなかった。ESBL 産生大腸菌の陽性率は 69.0% であった。

(輸入鶏肉検体)

定量検出試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 6 検体で共に検出限界値である 1.40 logCFU/g、腸内細菌科菌群は 6 検体より検出され、検出菌数は 6 検体が 1.40 logCFU/g、2 検体が 1.88 logCFU/g であった。また、クロモアガー上に発育した他の色調を呈する集落は計 49 検体で認められ、うち 26 検体は 1.40 logCFU/g 未満、23 検体は 1.40-1.99 logCFU/g、1 検体は 2.00

logCFU/g 以上 (3.03 logCFU/g) であった。なお、定性試験を通じ、ESBL 産生大腸菌は 105 検体中 51 検体 (48.6%) より検出された。

3. 鶏肉及び食鳥と体検体由来 ESBL 産生大腸菌株の薬剤耐性状況

ESBL 産生大腸菌分離株の薬剤耐性率は、AMP, CEZ, CTX が 100% の耐性率を示したほか、TC 耐性が 78.0%、SM 耐性が 65.0%、ST (SMX/TMP) 耐性が 58.2% の順に高値を示した。

4. 鶏肉及び食鳥と体検体由来 ESBL 産生大腸菌の遺伝特性

ESBL 産生大腸菌分離株の遺伝特性として、 β ラクタマーゼ型は CTX-M-1 型が 41.2%、CTX-M-2 型は 26.0%、CTX-M-9 型は 22.6% となり、同 3 型で全体の 89.8% を占めた。また、Inc 型は IncF が全株で陽性となったほか、IncI1 も 43.5% で陽性を示した。

5. IncI1 プラスミドの接合伝達試験

鶏肉由来大腸菌株と C57/BL6 マウス大腸内容 10 倍乳剤を混合し、2 時間培養し、得られた蛍光発現集落 100 個を釣菌して、遺伝子同定したところ、全て Donor とは異なる大腸菌であったことから、共培養を通じて Donor からの IncI1 プラスミドの接合伝達が行われたと解釈した。

6. 輸入冷凍鶏肉及び食鳥と体におけるサルモネラ属菌の検出状況と分離株の血清型.

輸入冷凍鶏肉 105 検体中、サルモネラ属菌は 21 検体 (20.0%) から検出された。分離株の血清型は Enteritidis が 7 株と最も多く、Heidelberg (3 株)、Minnesota (3 株) が次いで多い状況であった。

また、食鳥と体 130 検体からは 67 検体 (53.6%) より当該菌が分離された。最終的に分離された計 85 株の血清型別内訳としては、Schwarzengrund が 52 株 (61.2%) と高い占有率を示し、Yovokome が 4 株 (4.7%)、Typhimurium が 3 株 (3.5%) とこれに続いた。

薬剤感受性試験の結果、輸入冷凍鶏肉由来の 21 株のうち 17 株 (80.9%)、食鳥と体由来の 85 株のうち 53 株 (62.4%) は何れかの薬剤に耐性を示した。また、5 剤以上の多剤耐性はそれぞれ 7 株 (33.3%) 及び 13 株 (15.3%) で認められた。薬剤別の耐性率は、輸入冷凍鶏肉分離株では AMP 及び CEZ が共に 76.2%と最も高く、次いで NA が 61.9%であったのに対し、食鳥と体分離株では KM が 52.9%と最も高く、TC が 36.5%とこれに続く状況であった。

輸入鶏肉由来株を対象とした Inc 型別試験を通じ、全分離菌株は IncF 型陽性を示した。このうち、5 剤に耐性を示した 7 株は、何れも IncA/C 陽性を示した。また、CTX 耐性を示した 2 株からは、IncI1 が検出されたが、CTX-M 遺伝子は検出されなかった。

7. *C. coli* の薬剤感受性及びゲノム解析.

ヒト由来 *C. coli* 42 株の薬剤耐性プロファイルは、NA 耐性が 29 株 (69%)、TC 耐性が 26 株 (62%)、CPFEX 耐性が 25 株 (60%) の順に高く、EM 耐性は 2 株 (5%) のみであった。ニワトリ由来 25 株では、ヒト由来株と同様に CPFEX と NA 耐性が 18 株 (72%)、TC 耐性が 15 株 (60%) と高く、ウシ由来株は TC 耐性が 2 株 (8%)、CPFEX が 3 株 (12%) であった。ブタ由来 25 株は、ABPC と TC 耐性が 22 株 (88%) と高率であったほか、EM 耐性も 14 株 (56%) と他宿主由来株に比べ高い傾向を示した。

ブタ由来代表株で TC/EM 共耐性を示した ST-1562 株について、ドラフトゲノム配列デー

タを取得し、薬剤耐性遺伝子を探索したところ、当該株はプラスミドの有無にかかわらず、何れもゲノム上に耐性遺伝子を保有していることが明らかとなった。

8. 採卵鶏におけるサルモネラ属菌及びカンピロバクターの保菌並びに薬剤感受性

サルモネラ属菌は 49 農場中 6 農場 (13%) から分離され、A 農場由来 *S. Altona* は TP 耐性、D 農場由来 *S. Albany* は SM 耐性であった。サルモネラワクチン接種との関係では、ワクチン接種を実施している A・B 農場でもサルモネラが分離されたが、ワクチン成分とは異なる血清型 O 群のみが検出されていた。

カンピロバクターは全農場から分離され、71%は若齢・高齢両鶏群共に陽性であった。分離株の薬剤耐性状況として、若齢群の CPFEX 耐性は高齢群よりも有意に高かったほか、AMP 耐性は約 3 割で認められた。

D. 考察

国内で製造加工される過程にある食鳥と体検体からは、ESBL 産生大腸菌が高率で分離された。本研究では定性データのみならず定量データの創出をはかった。

概して食品の微生物リスク評価にあたっては、定量的なデータに基づく解析が国際標準となっている。その意味において、本研究班で得られた ESBL 産生菌に関する定量データは、こうしたリスク評価等にあたっての基礎資料としての活用が期待される。

一方、鶏肉喫食に伴うヒト生体内での耐性因子の水平伝播効率については依然として把握されていないが、本研究成果からその可能性が十分に想定されることから、今後は接合伝達性プラスミドの遺伝特性や宿主域の把握等に着

目した検討を行うことが必要と考えられる。

食中毒菌を対象とした薬剤耐性状況を図の上では、対象菌の汚染実態をあわせて捉えることも必要不可欠である。既報として、肉用若鳥の鶏肉及び内臓肉等からは、サルモネラ属菌及びカンピロバクターが高率に検出されているが、本研究で実施した採卵鶏を対象とした両食中毒菌分離株の薬剤感受性試験結果は、肉用若鳥で認められる高い薬剤耐性率に比べ、相対的に低い傾向にあると考えられる。採卵鶏は肉用若鳥に比べ、長期的な飼育がおこなわれていることから、こうした飼育期間の差異が当該菌の薬剤耐性率と関連する可能性も示唆された。

カンピロバクターのうち、肉用若鳥由来株については、高い CPFX 耐性率を示す傾向が近年続いているとされるが、*C. jejuni* による CPFX 耐性獲得は *gyrAB* 遺伝子の点変異による割合が極めて高い。同剤耐性獲得が既に一定程度浸淫している現状からの大きな耐性率低減は、生産段階での同薬剤使用中止のみによっては期待し難いと思われる。一方、近年穏やかな上昇傾向を示す同菌のテトラサイクリン耐性については、ESBL 産生菌と同様に、プラスミド性の水平伝播により獲得される割合が高いとされ、生産農場等での使用制限等による効果は相対的に期待度が大きいとも目される。生産段階等における薬剤の使用制限設定や家畜・家禽のモニタリングを実施する際には、対象菌のこれまでの耐性率等の疫学実態のみに執着することなく、薬剤耐性獲得機序を十分に考慮することがより合理的と考えられる。また、プラスミド性の耐性伝播機構についても更なる研究が必要であろう。

E. 結論

国内外を問わず、鶏肉等では高率に ESBL 産生大腸菌汚染が生じていたが汚染菌数は総じて低く、温度管理や交叉汚染排除等、食品とし

ての衛生管理の徹底により増殖を防止することが食品を介した耐性菌の伝播防止に重要となる可能性が示された。また、採卵鶏は肉用若鳥に比べ、相対的に低いサルモネラ・カンピロバクター汚染率を示し、また薬剤耐性状況も異なる可能性を示唆する知見を得た。サルモネラについては国内の肉用鶏に特定の血清型が広く分布している状況が確認できた。カンピロバクター・コリについては豚では EM 耐性率が高く、ゲノム特性等からも人の食中毒の原因として機能している可能性は低いと考えられた。引き続き、継続的な食品モニタリングを行うと共に、薬剤耐性菌の食品への拡散防止措置の効果の検証、更には食品の喫食を介した耐性菌伝播リスクを定量的に予測或いは解析していくこと等が必要と思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asakura H, Sakata J, Nakamura H, Yamamoto S, Murakami S. Phylogenetic diversity and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* from humans and animals in Japan. *Microbes and Environments*. 2019. 34(2): 146-154.
- 2) 山本詩織、森篤志、朝倉宏：国内市販鶏挽肉におけるカルバペネム耐性菌の汚染実態調査. *日本防菌防黴学会誌*. 2019. 47(2):47-51
- 3) Yamamoto S, Nakayama T, Asakura H. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* CRB139-1 isolated from poultry meat in Japan. *Microbiol. Res. Announc.* 2020. 9(12): e00075-20.
- 4) 佐々木貴正、米満研三、上間匡、五十君静信、朝倉宏。採卵養鶏場のサルモネラ汚染実態と有効なサルモネラ汚染低減対策の推定. *鶏病研究会報*. 2019. 55: 159-163.

- 5) 佐々木貴正、上間匡、百瀬愛佳、米満研三、浅井鉄夫、朝倉宏：2食鳥処理場におけるブロイラー群および胸肉のカンピロバクター・サルモネラ汚染状況と薬剤耐性。鶏病研報。2020. 50: 153-158.

2. 学会発表

- 1) 山本詩織、森篤志、朝倉宏：国内市販鶏挽肉におけるカルバペネム耐性腸内細菌科菌群の汚染実態に関する検討。日本防菌防黴学会第45回年次大会、2018年11月、東京都。
- 2) 中山達哉、佐々木貴正、山口貴弘、河原隆二、岡田由美子、朝倉宏、五十君静信。採卵鶏農場における薬剤耐性大腸菌汚染実態調査。第39回日本食品微生物学会学術総会。平成30年9月、大阪府。
- 3) 中山達哉、佐々木貴正、朝倉宏、五十君静信。食鳥処理場における薬剤耐性大腸菌の汚染実態。日本食品衛生学会第114回学術講演会。平成30年11月、広島。
- 4) 山本詩織、朝倉宏：鶏肉におけるカルバペネム耐性菌汚染実態及び *Stenotrophomonas maltophilia* 分離株のゲノム特性、日本微生物生態学会第33回大会、2019年9月、山梨。
- 5) 山本詩織、川村研二、朝倉宏：外来患者由来ESBL産生大腸菌の分子遺伝学的特性について、第92回日本細菌学会総会、2019年4月、北海道。
- 6) 山本詩織、中山達哉、町田李香、朝倉宏：国内の市販鶏肉におけるESBL産生大腸菌の定性的・定量的評価。第94回日本細菌学会総会、2021年3月、オンライン開催。
- 7) Yamamoto S, Okada Y, Ishii Y, Igimi S,

Asakura H: Prevalence and genetic characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail poultry meat in Japan. International Union of Microbiological Societies Congresses (IUMS 2020), October 2020, South Korea.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成30—令和2年度食品の安全確保推進研究事業

「食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究」

分担課題名：家畜由来腸内細菌の疫学的研究：JVARMとJANISの連携について

分担研究者：小澤 真名緒（農林水産省動物医薬品検査所）（令和元年度から）

分担研究者：川西 路子（農林水産省動物医薬品検査所）（平成30年度まで）

研究協力者：嶋崎 洋子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：松田 真理（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：赤間 亮子（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：古谷 ゆかり（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：原田 咲（農林水産省動物医薬品検査所）

研究協力者：木島まゆみ（農林水産省動物医薬品検査所）（平成30年度まで）

研究協力者：白川 崇大（農林水産省動物医薬品検査所）

研究要旨

薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」が項目として記載されている。本研究では当該データの連携を実施するため、動物由来薬剤耐性菌モニタリング(JVARM)のと畜場及び食鳥処理場由来（平成28～30年度）大腸菌及びサルモネラ、病畜由来（平成25～30年度）サルモネラのMICデータを国立感染症研究所で作成されたアンチバイオグラム作成ソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。また、ヒト、食品及び家畜由来サルモネラ属菌の血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較した。その結果、食鳥処理場由来のサルモネラの血清型は、食品由来のサルモネラと同じ傾向が認められた一方、ヒト由来のサルモネラの血清型は食鳥処理場由来及び食品由来に比べて多様であり、鶏又は食品を介したものの他に多様な原因がある関連性が示唆された。

ヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについて、平成28～30年度に食鳥処理場及びと畜場で分離された大腸菌及びサルモネラのうち、コリスチンのMICが $2\mu\text{g/mL}$ 以上の株についてコリスチン耐性遺伝子(*mcr-1*～*mcr-10*)の保有状況を確認したところ、*mcr-1*遺伝子及び*mcr-5*遺伝子は検出されたが低率（各年、動物種毎に、いずれも8%以下）であった。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ことから、国内における家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構を調査したところ、可動性耐性遺伝子である*erm(B)*は検出されず、国内の農場において*erm(B)*が広まっていないことが示唆された。

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、国内では農林水産省動物医薬品検査

所が基幹検査機関となって実施している動物由来薬剤耐性菌モニタリング(JVARM)が構築されている。

一方、医療の分野においては、医療機関における院内感染の発生状況、薬剤耐性菌の分離状況および

薬剤耐性菌による感染症の発生状況を調査することで、我が国の院内感染の概況を把握し、医療現場への院内感染対策に有用な情報の還元等を行うことを目的に、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）が構築されている。

本研究では、薬剤耐性(AMR)対策アクションプランの戦略 2.5 ヒト、動物、食品、環境等に関する統合的なワンヘルス動向調査の実施の取組において、「ヒト、動物、食品における薬剤耐性に関する動向調査・監視に関するデータ連携の実施」のため、動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）のデータを、国立感染症研究所で作成されたソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。

JVARM で収集されたサルモネラについては、各血清型の割合及び血清型毎の各薬剤の耐性率を、本研究事業において愛媛県立衛生環境研究所の四宮らが報告しているヒト、食品と比較することとした。

また、ヒト用医薬品として注射剤が承認され、医療上重要な抗菌性物質として再認識されているコリスチンについては、伝達性耐性遺伝子 *mcr* が国産の鶏肉からも検出されおり、新たなプラスミド性コリスチン耐性遺伝子 *mcr-10* までは国内外で報告されていることから、家畜で使用するコリスチンのヒト医療への影響について評価するために家畜におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を把握することを目的とした。

さらに、人のカンピロバクター腸炎は、主にマクロライド系抗菌性物質製剤で治療される。カンピロバクターにおいてマクロライド耐性は主に染色体上の遺伝子の突然変異の結果として発現するが、2013 年に中国の豚から分離された *Campylobacter coli* が可動性の耐性遺伝子 *erm (B)* を獲得していることが初めて報告された（Qin ら 2013）。そこで、国内における家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構を調査した。

B. 研究方法

(1)JVARM 由来株のアンチバイオグラムの作成

と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ（平成 28～30 年度）、病畜由来サルモネラ（平成 25～30 年度）の MIC データを、国立感染症研究所

で作成されたアンチバイオグラム作成ソフトに入力し、アンチバイオグラムを作成した。

(2) ヒト、食品及び家畜由来サルモネラの血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率の比較

本研究事業において愛媛県立衛生環境研究所の四宮により報告された平成 27 年～29 年に全国の地方衛生研究所より分離されたヒト及び食品由来のサルモネラと食鳥処理場の鶏由来のサルモネラの各血清型の割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較した。

(3) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来サルモネラにおけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況

平成 28 年度から 30 年度までの MIC が $2 \mu\text{g/mL}$ 以上の株について DNA を抽出し、各コリスチン耐性遺伝子 *mcr-1* から *mcr-10* について、鈴木らが本研究事業において報告しているマルチプレックス PCR 法に基づき、遺伝子を検出した。

(4) 家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構

平成 29 年にと畜場の豚から分離されたマクロライド耐性 *C. coli*19 株及び食鳥処理場の鶏から分離されたマクロライド耐性 *C. jejuni*1 株について、全ゲノム解析によって耐性遺伝子及び遺伝子の変異を確認した。

C. 研究結果

(1) JVARM 由来株のアンチバイオグラムの作成

と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来サルモネラのアンチバイオグラムを CLSI2012 の SIR 基準により作成し（例；図 1：その他は HP 参照）、動物医薬品検査所 HP

（http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/yakuzai_p3-1.html）に掲載した。また、入力データを国立感染症研究所と共有した。

(2) ヒト、食品及び家畜由来サルモネラの血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率の比較

サルモネラの血清型について、食鳥処理場由来と食品（約 9 割は国産鶏肉）由来及びヒト由来の比較（図 2）では、食鳥処理場由来のサルモネラと食品由来サルモネラでは、割合が大きかった上位 5 つの血清型が同じであった。内訳は異なるものの、その 5

つの血清型が全体においてそれぞれ98%及び84%を占め、食鳥処理場由来のサルモネラと食品由来サルモネラに関連性があることが示唆された。一方、ヒト由来株では血清型は食鳥処理場及び食品由来に比べて多様であり、食鳥処理場及び食品由来の上位5血清型の占める割合は24%であった。ヒト由来のサルモネラは鶏及びその食品を介したものの他に多様な原因がある可能性が示唆された。

食鳥処理場由来の大半を占める上位2血清型の *S. Schwarzengrund* 及び *S. Infantis* について耐性率を比較した結果、*S. Schwarzengrund* では鶏由来と食品由来はKM、SM、TCで同等の耐性率を示した一方、ヒト由来はKM、CPに対しては鶏由来及び食品由来に比べ低い耐性率を示した(図3)。また、CTX耐性はヒト由来で高かった。*S. Infantis* では、各薬剤について鶏由来と食品由来では同等の耐性率を示した一方、ヒト由来はほとんどの薬剤でそれらよりも低い耐性率を示した。両血清型ともに鶏由来と食品由来での類似性が認められたが、ヒト由来株では耐性率が食品・食鳥処理場と異なる点があることから、ヒトにおける両血清型の由来は鶏及びその食品由来以外にもある可能性が示唆された。

(3) と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラ、病畜由来サルモネラにおけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況(表1~2、図4)

大腸菌について、*mcr-2*~*mcr-4* 及び *mcr-6*~*mcr-10* 遺伝子についてはいずれの菌株からも分離されなかった。*mcr-1* は牛、豚、鶏由来株のすべてから検出され、牛由来株では平成28年1株(0.4%：割合は、各年の各動物種由来株全株に対するもの)、平成29年1株(0.4%)、平成30年0株(0%)、豚由来株では平成28年3株(3.3%)、平成29年3株(3.6%)、平成30年6株(7.2%)分離され、鶏由来株からは、平成28年2株(1.3%)、平成29年5株(3.3%)、平成30年0株(0%)検出された。また、*mcr-5* 遺伝子は牛由来株は平成28年のみ2株(0.8%)、鶏由来株では平成29年のみ1株(0.7%)検出された。サルモネラについて、*mcr* 遺伝子はいずれの畜種においても検出されなかった。

(4) 家畜由来カンピロバクターにおけるマクロライド耐性機構(図5)

すべての株で、*erm (B)* 遺伝子を保有していなかった。マクロライド耐性に関与する、23s rRNAの変異を保有している株は2株のみであった。その他の18株について、機能が不明な23s rRNAの変異を保有している株が2株あったが、マクロライド耐性機構は不明であった。20株中それぞれの株の Sequence Type には多様性が認められた。

D. 考察

JVARM のデータから家畜由来細菌におけるアンチバイオグラムを作成し、動物医薬品検査所 HP に掲載した。JVARM では平成24年度から、健康家畜由来のモニタリングについては農場由来株だけでなくと畜場及び食鳥処理場由来株について実施しており、平成28年度については農場由来株の調査を中止し、と畜場由来株のみとした。そのため、平成28年度からはJVARM のと畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌についてアンチバイオグラムを作成した。また、本事業において全国の地方衛生研究所において収集された食品由来のサルモネラのモニタリングが開始されたことから、平成25年度~30年度の病畜由来サルモネラ、平成29年度~30年度の食鳥処理場由来のサルモネラについてもアンチバイオグラムを作成した。以上のようにJVARM と JANIS の比較可能なデータを公表し、両者の連携を継続的に実施した。今後「薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書」及び「ワンヘルス Web サイト」に活用することが可能であると考えられる。

食鳥処理場の鶏由来のサルモネラと全国の地方衛生研究所において分離されたヒト及び食品由来のサルモネラの各血清型の割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較したところ、鶏と食品から分離されたサルモネラにおいて、*S. Schwarzengrund* 及び *S. Infantis* の占める割合が高く、鶏と食品由来の両血清型における各薬剤の薬剤耐性率が同等であった。一方、ヒト由来株においては、両血清型における薬剤耐性率は鶏と食品由来株と異なる傾向を示した。そのため、ヒトの両血清型のサルモネラについては、鶏と食品以外の他の感染源がある可能性も考えられた。この血清型の比較については、2019年の「薬剤耐性ワンヘルス動向調査報告書」にも掲載している。今後、

より具体的な由来間の関連性については、全ゲノム解析等による比較を行う必要があると考えられる。

また、プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の動向を把握するため、と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラにおける *mcr-1*～*mcr-10* 遺伝子の保有状況について確認したところ、大腸菌で *mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子が検出されたが保有率は低率であった。

コリスチン耐性については、食品安全委員会におけるリスクの程度は「中等度」との評価を受けて、農林水産省では動物用医薬品としては、これまでに食品安全委員会が「中等度」と評価した医療上重要度の高いフルオロキノロン製剤などと同様、平成 30 年 4 月以降コリスチンを第二次選択薬として位置づけ、飼料添加物としては指定を取り消している。。その後、令和 2 年度に新たな科学的知見を踏まえて食品安全委員会において再評価が行われた結果、リスクの程度は「低度」に引き下げられた。ただし、この評価は上記のリスク管理措置を前提としたものであることから、農林水産省はこれらのリスク管理措置を継続することとしている。現在のところ健康家畜由来大腸菌におけるコリスチンの MIC 分布及び *mcr* 遺伝子の保有率に変動はなく、食鳥処理場由来サルモネラから *mcr* 遺伝子は検出されていない。しかし、来年度以降もコリスチンにおけるリスク管理措置の効果を検証し、ヒト医療への影響について評価するためにも、引き続きと畜場及び食鳥処理場由来大腸菌及びサルモネラにおけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子を調査していく必要があると考える。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。JVARM のと畜場由来カンピロバクターにおいては、*C. jejuni* 及び *C. coli* のエリスロマイシン耐性率は 3%以下及び 20～40% 程度で推移している。平成 26 年度食品安全確保推進研究事業「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」で、JVARM で収集した健康豚由来 *C. coli* において、可動性耐性遺伝子 *erm(B)* の保有を報告した。しかし、今回の調査の結果では、*erm(B)* を保有している株は認められなかった。現時点では、国内の農場で *erm(B)* が広まって

いないことが示唆された。

ただし、調査した 20 株中、マクロライド耐性に関与する、23s rRNA の変異を保有している株は 2 株のみであり、残りの 18 株についてはマクロライド耐性機構が不明であった。新たな耐性因子の可能性も含め、引き続き動向に注意が必要である。

E. 結論

と畜場及び食鳥処理場由来の大腸菌及びサルモネラについてアンチバイオグラムを作成して動物医薬品検査所 HP に掲載した。JVARM と JANIS の比較可能なデータを公表し、両者の連携を継続的に実施した。ヒト、食品及び家畜由来サルモネラ属菌の血清型割合と血清型毎の薬剤耐性率を比較した。その結果、食鳥処理場由来のサルモネラは、食品由来のサルモネラと同じ傾向が認められた一方、ヒト由来のサルモネラとは血清型や薬剤耐性率に異なる傾向があり、ヒト由来株については、鶏又は食品を介したものの他に多様な原因がある可能性が示唆された。

と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌におけるプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の検出の結果、*mcr-1* 及び *mcr-5* 遺伝子は検出されたが検出率は低率であり、*mcr-2*～*mcr-4* 及び *mcr-6*～*mcr-10* 遺伝子についてはいずれの菌株からも検出されなかった。

健康家畜由来マクロライド耐性カンピロバクターにおいて耐性遺伝子の検索を行ったが、可動性耐性遺伝子である *erm(B)* は検出されず、国内の農場において *erm(B)* が広まっていないことが示唆された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 木島まゆみ、川西路子、白川崇大、松田真理：動物由来薬剤耐性モニタリング (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring; JVARM) における最近の取組み, 獣医学雑誌 22: 112-113, 2018.
- (2) Kijima M., Shirakawa T., Uchiyama M, Kawani

shi M., Ozawa M., Koike R. Trends in the serovar and antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* from cattle and pigs between 2002 and 2016 in Japan J Appl Microbiol 127:1869-1875, 2019.

- (3) M. Ozawa, M. Kawanishi, M. Uchiyama, D. Mitsuya, H. Abo, R. Koike and M. Kijima. Correlation of minimum inhibitory concentrations between human and animal antimicrobials against *Escherichia coli* isolated from livestock. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. (in press)

2.学会発表

- (1) 白川崇大、成嶋理恵、小澤真名緒、阿保均、永尾暢子、松田真理、川西路子、木島まゆみ「家畜由来細菌における抗菌剤の最小発育阻止濃度 (MIC) とディスク阻止円径の関係」第 161 回日本獣医学会学術集会 (2018 年 9 月、つくば)
- (2) 川西路子「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランに基づく JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System) の強化についてー愛玩 (伴侶) 動物のモニタリングの取組ー」第 8 回日本医師会・日本獣医師会による連携シンポジウム「家庭内ワンヘルスの取組みー人と動物における薬剤耐性 (AMR) の実態と課題」(平成 30 年 11 月; 日本医師会館大講堂)
- (3) 木島まゆみ「NVAL と FAMIC -AMR に関する活動と OIE コラボレーティングセンターとしての地域への貢献-」薬剤耐性対策の今を知る会〜世界の動き、日本の動き〜 (2018 年 12 月、東京大学)
- (4) 川西路子「動物由来薬剤耐性菌モニタリング (JVARM) の概要と薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランへの対応」平成 30 年度日本獣医師会 獣医学術年次大会(シンポジウム) (2019 年 2 月、新横浜プリンスホテル)
- (5) 川西路子「AMR アクションプランに基づく JVARM の強化、今後の JVARM」第 46 回動物用抗菌剤研究会シンポジウム「JVARM20 周年

を迎えて」(2019 年 4 月; 日本獣医生命科学大学)

- (6) 嶋崎洋子、川西路子「薬剤耐性(AMR)対策アクションプランに基づく動物由来薬剤耐性菌モニタリング(JVARM : Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)の強化について」第 31 回日本臨床微生物学会シンポジウム「日本の薬剤耐性に関するナショナルサーベイランス」(2020 年 2 月、石川県立音楽堂)

3.業界関係者向け説明会

- (1) 松田真理「豚における薬剤耐性菌の動向」平成 30 年度家畜衛生講習会 (豚疾病特殊講習会) (2018 年 7 月、つくば)
- (2) 白川崇大「鶏における薬剤耐性菌の動向」平成 30 年度家畜衛生講習会 (鶏疾病特殊講習会) (2018 年 6 月、つくば)
- (3) 川西路子「薬剤耐性対策アクションプランへの対応及び JVARM の成績」第 39 回 飼料の安全性に関する検討会 (2018 年 7 月、つくば)
- (4) 木島まゆみ「薬剤耐性菌問題について-薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン (2016-2020) における取組みを中心に-」動物医薬品協同組合夏期研修会 (2018 年 8 月、東京)
- (5) 白川崇大、川西路子、成嶋理恵、永尾暢子、阿保均、松田真理、小澤真名緒、木島まゆみ「最近の動物医薬品検査所における薬剤耐性に係る研究業績」第 59 回全国家畜保健衛生業績発表会 (2018 年 9 月、ヤクルトホール; 東京)
- (6) 白川崇大「鶏における薬剤耐性菌の動向」平成 31 年度家畜衛生講習会 (鶏疾病特殊講習会) (2019 年 6 月、つくば)
- (7) 松田真理「豚における薬剤耐性菌の動向」平成 31 年度家畜衛生講習会 (豚疾病特殊講習会) (2019 年 7 月、つくば)
- (8) 嶋崎洋子「薬剤耐性対策アクションプランと JVARM の取り組み」第 40 回 飼料の安全性に関する検討会 (2019 年 8 月、さいたま新都心)
- (9) 嶋崎洋子「薬剤耐性に関する最近の動き」令和元年度第 1 回東海地域生乳安全安心協議会

(2019 年 8 月、名古屋)

- (10) 嶋崎洋子「人獣共通感染症と薬剤耐性菌の現状と対策 薬剤耐性菌対策のワンヘルスに向けた動物分野での取り組み」(2020 年 11 月、波止場会館、日本技術士会神奈川県支部 CPD 講座)
- (11) 「獣医師に求められる薬剤耐性 (AMR) 対策」(2020 年 6 月～2021 年 3 月、全 17 獣医系大学におけるオンライン動画配信及びライブ配信)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

※ JVARM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 アンチバイオグラムの例 (2018年 と畜場由来株)

主要菌の抗菌薬感受性

Escherichia coli

畜種 (肉用牛 N=189)

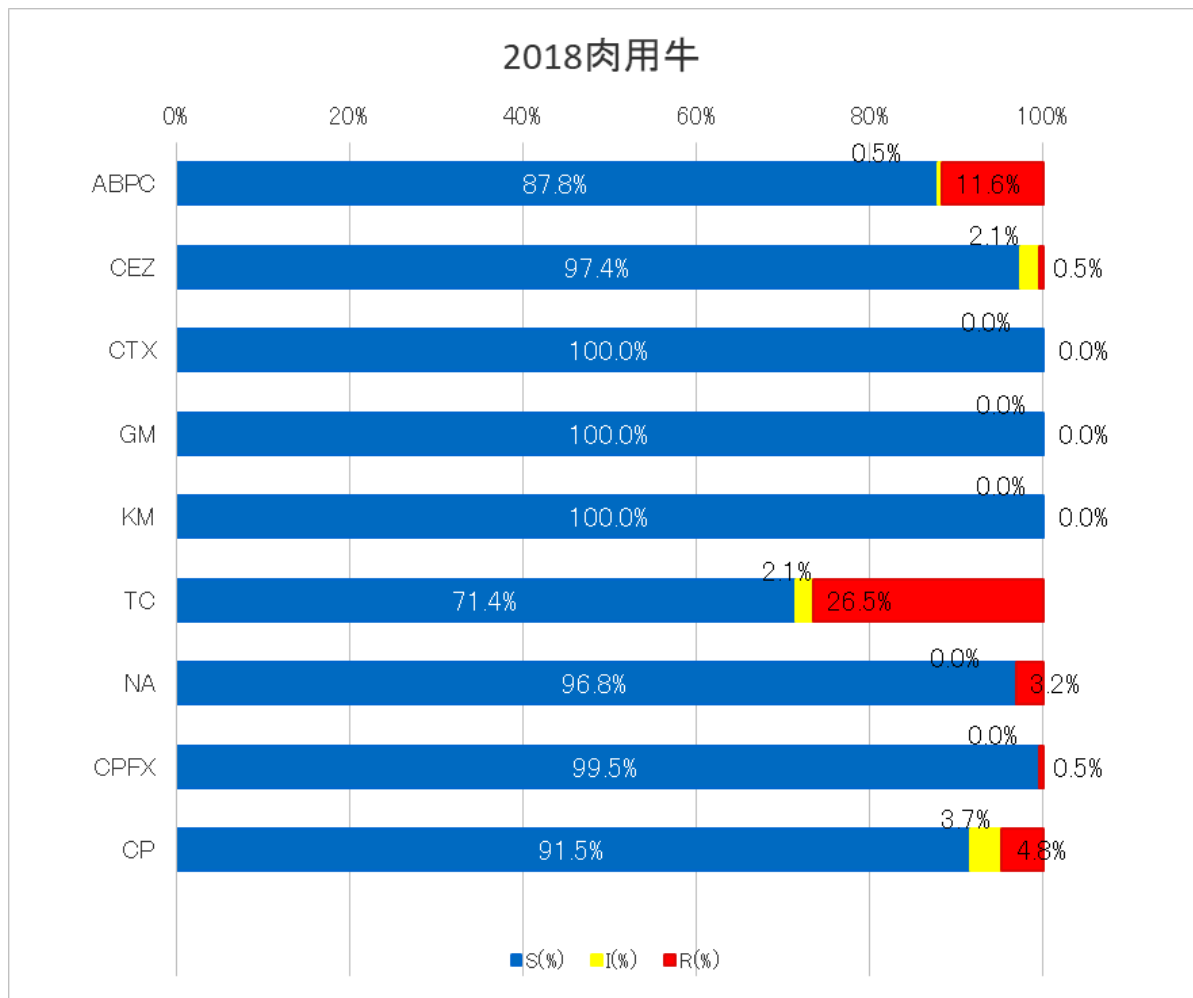


図2 食鳥処理場由来 *Salmonella enterica* の上位5 血清型の食品及びヒト由来における割合（2015-2017）

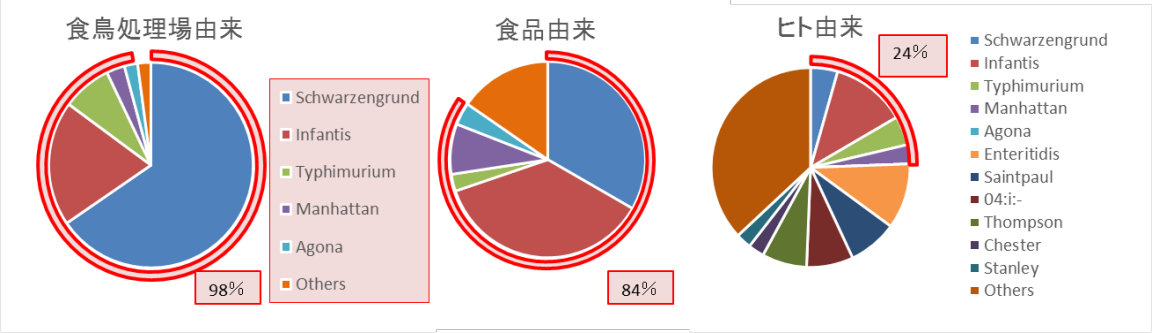


図3 ヒト、食品及び食鳥処理場由来 *S. Infantis* 及び *S. Schwarzengrund* の耐性率（2015-2017）

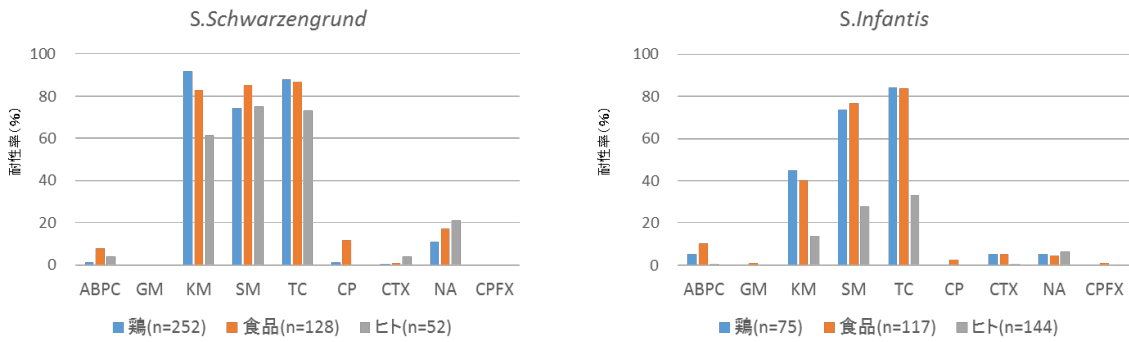
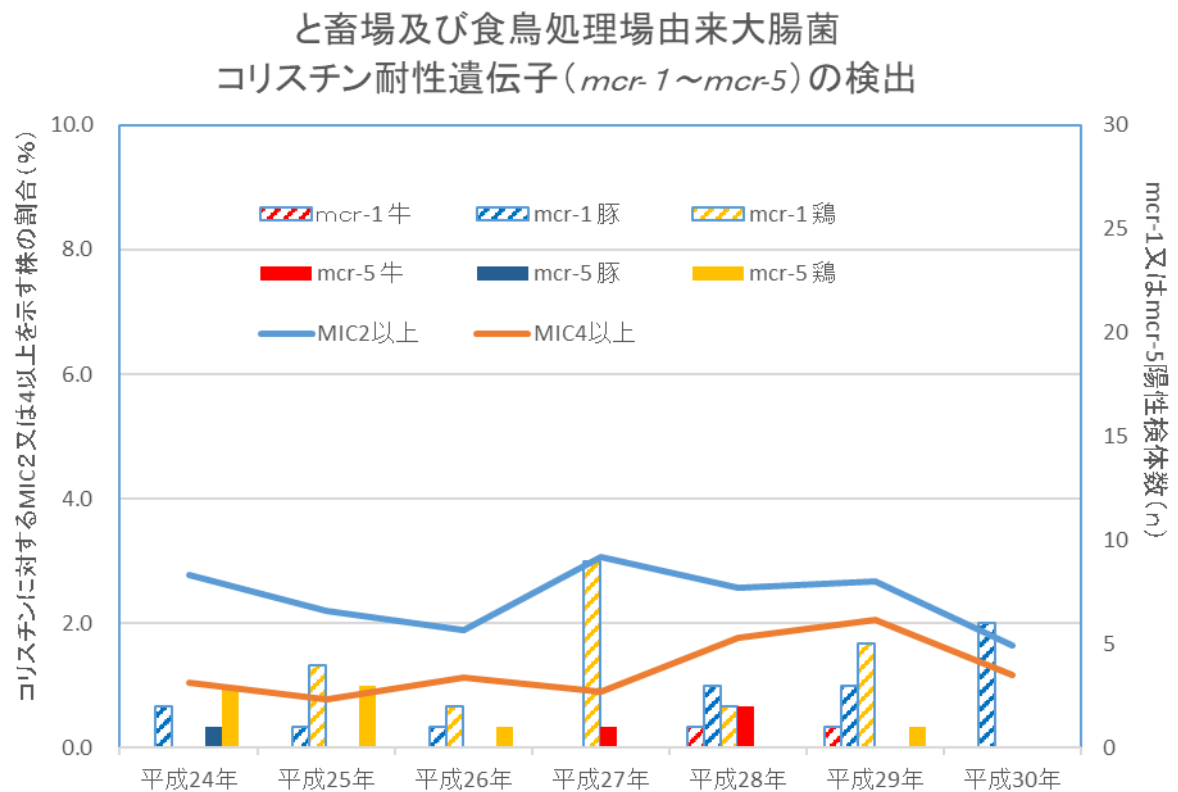


図4 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌コリスチン耐性遺伝子の検出



※平成28年から30年は、*mcr-1* から *mcr-10* を検出

表 1 と畜場及び食鳥処理場由来大腸菌の菌株数及び MIC2 mg/L 以上の菌株数

		平成 30 年	令和元年	令和2年
全株数	牛	258	252	189
	豚	90	83	83
	鶏	158	150	155
MIC2mg/L 以上の株数	牛	4	3	0
	豚	4	3	6
	鶏	5	7	1

表 2 食鳥処理場由来サルモネラの菌株数及び MIC2 mg/L 以上の菌株数

		平成 30 年	令和元年	令和2年
全株数	鶏	104	158	117
MIC2mg/L 以上の株数	鶏	1	52	5

図5 家畜由来カンピロバクターにおける遺伝子的性状

Isolates	Species	Source	Resistance genes	Mutations		Sequence Types
				Macrolide resistance	Streptomycin resistance	
S-SA-29-CC-TP-26-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;blaOXA-489;tet(O)	-	-	828
S-SA-29-CC-TP-27-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;blaOXA-489;tet(O)	-	-	828
S-SA-29-CC-OP-40-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	rpsL p.K43R	828
S-SA-29-CC-TP-68-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;aph(3')-III;blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;tet(O)	-	rpsL p.K43R	828*
S-SA-29-CC-TP-120-1	<i>C. coli</i>	Pig	blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;inu(C);tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	828*
S-SA-29-CC-OP-39-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	854
S-SA-29-CC-TP-125-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	-	854*
S-SA-29-CC-KP-41-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;tet(O)	23S r.2075A>G	rpsL p.K43R	890*
S-SA-29-CC-TP-28-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	1016
S-SA-29-CC-TP-118-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	1016
S-SA-29-CC-TP-47-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;tet(O)	23S r.2075A>G	rpsL p.K43R	1112
S-SA-29-CC-TP-30-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;blaOXA-489;inu(C);tet(O)	-	rpsL p.K88R	1145
S-SA-29-CC-TP-122-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;blaOXA-489;tet(O)	-	-	1145
S-SA-29-CC-TP-87-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O/32/O)	-	rpsL p.K43R	1096
S-SA-29-CC-TP-74-1	<i>C. coli</i>	Pig	blaOXA-193;blaOXA-61;blaOXA-489;blaOXA-453;blaOXA-452;blaOXA-451;blaOXA-450;tet(O)	-	-	1413
S-SA-29-CJ-MiyaC-57-1	<i>C. jejuni</i>	Broiler	tet(O)	-	-	1767
S-SA-29-CC-OP-113-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	2713
S-SA-29-CC-OP-5-1	<i>C. coli</i>	Pig	aadE-Cc;tet(O)	-	-	Unknown
S-SA-29-CC-TP-70-1	<i>C. coli</i>	Pig	aph(3')-III;cat;tet(O)	-	rpsL p.K43R rpsL p.K88R	Unknown
S-SA-29-CC-TP-25-1	<i>C. coli</i>	Pig	tet(O)	-	rpsLp.K43R rpsL p.K88R	Unknown

*: Nearest Sequence Type

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 30～令和 2 年度 分担（総合）研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題 食品及びヒト由来カンピロバクター、大腸菌の
薬剤耐性菌出現状況の把握

研究分担者	小西 典子	東京都健康安全研究センター	微生物部
研究協力者	前田 雅子	東京都健康安全研究センター	微生物部
	小野明日香	東京都健康安全研究センター	微生物部
	赤瀬 悟	東京都健康安全研究センター	微生物部
	畠山 薫	東京都健康安全研究センター	微生物部
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター	微生物部
	鈴木 淳	東京都健康安全研究センター	微生物部
	甲斐 明美	国立感染症研究所 細菌第一部	（客員研究員）

研究要旨

2011 年～2019 年に東京都内の病院で分離された散発患者由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は毎年 50%程度ではほぼ一定であった。一方、*C. coli* では 37.5%～68.8%と年によって耐性率は異なっていた。エリスロマイシン耐性株は *C. jejuni* では 0.8%～3.7%と低い耐性率で推移しているが、*C. coli* では 0%～62.5%であり、年によって耐性率に差が認められた。

2016 年～2018 年分離株を対象に微量液体希釈法による MIC 値の分布を調べた。*C. jejuni* の NA に対する MIC 値は 128 μ g/mL 以上が 54.5%であるが、CPFX に対する MIC 値の分布は 4～128 μ g/mL 以上と広く分散していた。*C. coli* でも同様に、分離株の 52%が NA の MIC 値 128 μ g/mL 以上であるが、CPFX に対する MIC 値は 8～32 μ g/mL に分布していた。各薬剤に対する MIC 値分布を調べることは、ディスク法での判定では知れない耐性化の状況を、より詳細に明らかにするものである。

健康者の糞便から分離された大腸菌 952 株を対象に薬剤感受性試験を実施した結果、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示した株は 39.2%～42.3%とほぼ一定であった。フルオロキノロン耐性率は 7.4%、CTX 耐性率は 5.1%であった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子も 5 株検出されたことから、健康者由来株の中にもプラスミド性コリスチン耐性株が広く分布していることが明らかとなった。

国産鶏肉および輸入鶏肉から分離された大腸菌の薬剤耐性パターンを比較すると、明らかに異なっていた。特に KM は国産由来株で高く、輸入由来株では低かった。日本では 2012 年以降、セフトオフルの自主規制がなされ、代わりに KM を使用していることから、耐性率が高い傾向であると考えられた。CTX 耐性率は国産および輸入由来株共に減少傾向であった。

ヒトおよび食品由来サルモネラの薬剤耐性率を比較すると、食品由来株の方が耐性率は高かった。この傾向は以前から継続している。フルオロキノロン耐性株は 2019 年にヒトから分離された 1 株のみであったが、CTX 耐性株は 2007 年以降毎年分離されている。しかし 2017 年をピークに分離数は減少していた。今後も薬剤耐性菌の動向を注視していく必要がある。

A. 研究目的

薬剤耐性菌は医療の現場のみならず、動物、家畜、水産および環境に至る全ての生態系で発生し拡散している。そのため、薬剤耐性菌の拡散防止のためには我々を取り巻く環境、生態系に関わる全ての分野が一丸となって取り組んでいかなくてはならない。

このような状況のもと、2016 年 4 月に「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン」が策定され、2020 年までの 5 年間の目標と実施すべき具体的な取り組み事項が明確化された。これまでの 5 年間にヒト、動物、環境のそれぞれの分野において様々な取り組みが積極的に行われており、少なくとも人に対する治療薬である経口抗

菌薬の使用量が減少するなど、一定の効果が認められている。

一方、2019 年 12 月、日本では MRSA 菌血症とフルオロキノロン耐性大腸菌による菌血症で年間 8000 名が死亡しているという報告が、国立国際医療研究センター・AMR 臨床リファレンスセンターから報告された。このように現時点においても薬剤耐性菌による脅威は続いており、ヒトの健康を脅かす重大な問題となっている。

薬剤耐性菌の蔓延を防止するためには、その基礎資料となる薬剤耐性菌の変化と特徴、出現状況や拡大傾向を継続的に監視していくことが重要である。そこで食中毒起因菌として重要なカンピロバクター、大腸菌およびサルモネラを対象に薬剤耐性菌出現状況を把握するためのモニタリング調査を中心に研究を行った。

B. 研究方法

1. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

1) ディスク拡散法による薬剤感受性試験

2017 年～2019 年に都内の病院で分離された *C. jejuni* 357 株 (2017 年 : 115 株, 2018 年 : 110 株, 2019 年 : 132 株) および *C. coli* 32 株 (2017 年 : 8 株, 2018 年 : 8 株, 2019 年 : 16 株) を供試した。

供試薬剤は、ABPC、TC、NA、CPFX、EM、CET の 6 薬剤で、方法は、平成 30 年度の本研究班で検討した統一プロトコルに従って実施した。すなわち、平板は 5%馬脱繊維血液加ブルセラ寒天培地を用い、37℃、48 時間培養後に阻止円の測定を行った。

2) 微量液体希釈法による MIC 値の測定

2016 年～2018 年に分離された散発患者由来の *C. jejuni* 341 株および *C. coli* 25 株を供試した。NA、CPFX、LVFX、EM、ABPC の 5 薬剤で、市販のドライプレート (栄研化学) を用いて MIC 値を測定した。

2. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2018 年～2020 年に飲食店従事者で下痢等の消化器症状のない健康者糞便から分離した大腸菌 952 株 (2018 年 : 360 株, 2019 年 : 311 株, 2020 年 : 281 株) を供試した。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験に用いた薬剤は ABPC、CTX、CFX、CAZ、GM、KM、SM、TC、ST 合剤 (ST)、CP、

FOM、NA、CPFX、NFLX、OFLX、AMK、IPM、MEPM、CL の 19 薬剤で、センシディスク (BD) を用いた KB ディスク法で調べた。

3) ESBL 産生菌の検出と遺伝子型別試験

CTX、CFX、CAZ 耐性株については AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) を用いて ESBL または AmpC 産生菌の鑑別を行った。ESBL または AmpC 産生菌と判定された株については市販プライマー (ESBL 遺伝子型別キット、関東化学) を用いた型別試験を実施した。

4) コリスチン耐性大腸菌の検出

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の検出は PCR 法で実施した。2018 年分離株は *mcr-1* および *mcr-2* について、2019 年および 2020 年分離株は *mcr-1*～*mcr-5* についてその保有状況を調べた。

3. 市販流通食肉から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

1) 供試検体

2018 年～2020 年に当所に搬入された国産鶏肉 432 検体および都内スーパーマーケットで購入した輸入鶏肉 90 検体を供試した。

2) 大腸菌分離方法

食肉に緩衝ペプトン水 (BPW) を加え 37℃、18～22 時間培養後、XM-G 寒天培地 (日水製薬) に塗抹分離した。分離平板に発育した大腸菌様集落 (1 検体当たり 2 集落) について TSI 寒天、LIM 培地で生化学的性状を確認し、典型的な生化学的性状を示すものを大腸菌と判定した。

3) 分離された大腸菌の薬剤感受性試験

国産鶏肉由来 677 株 (2018 年 : 241 株, 2019 年 : 238 株, 2020 年 : 198 株) および輸入鶏肉由来 131 株 (2018 年 : 36 株, 2019 年 : 38 株, 2020 年 : 57 株) の大腸菌を供試した。薬剤は健康者由来大腸菌を対象とした薬剤感受性試験と同様の 19 薬剤を供試した。

4. ヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

1) 供試菌株

2018 年～2020 年に東京都内で分離されたヒト由来サルモネラ 336 株、食品由来 359 株および輸入鶏肉由来 17 株を供試した。集団事例由来株は代表株 1 株を計上した (表 1)。

2) 薬剤感受性試験

供試薬剤は大腸菌と同様の 19 薬剤である。CTX 耐性株については AmpC/ESBL 鑑別ディスク (関東化学) を用いて AmpC または ESBL 産生菌の鑑別を行った。さらに ESBL 産生菌を疑う株

については、市販プライマー（ESBL 遺伝子型別キット、関東化学）を用いて型別試験を実施した。

5. 倫理面への配慮

全てのヒト由来株および調査情報は、個人を特定できる情報を含まない状況で収集し、本研究に用いた。本研究についてはオプトアウト方式で公開され、「保有個人データの研究使用の停止申請」を行うことにより当研究から除外が可能である。なお、本研究は東京都健康安全研究センター倫理審査委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

1. ヒト由来カンピロバクターの薬剤耐性菌出現状況

1) ディスク拡散法による薬剤感受性試験

2011 年～2019 年に分離された散発患者由来 *C. jejuni* および *C. coli* のフルオロキノロン耐性率および EM 耐性率の年次推移を図 1 および図 2 に示した。*C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は毎年 50% 程度でほぼ一定であった。一方、*C. coli* は 2011 年～2016 年分離株では耐性率が減少傾向であったが、2017 年は 62.5%、2018 年は 37.5%、2019 年は 68.8% と年によって耐性率は異なっていた。

治療の第一選択薬である EM 耐性株の出現率は *C. jejuni* で 3.7% (2011 年) ～0.8% (2014 年) と低い状況で推移している。一方 *C. coli* は *C. jejuni* と比較して耐性率が高い傾向が続いている。2015 年分離株は耐性率 0% であったが、2016 年は 14.3%、2017 年は 25%、2018 年は 62.5%、2019 年は 25% であった。

2) 微量液体希釈法による MIC 値の測定

2016 年～2018 年に分離された *C. jejuni* 341 株および *C. coli* 25 株を供試した。NA に対する MIC が $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ 以上であったのは、*C. jejuni* では 189 株 (55.4%)、*C. coli* では 13 株 (52.0%) といずれも半数以上を占めていた。CLSI に判定基準が記載されている薬剤は CPF_X と EM であり、それぞれ $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ (CPF_X)、 $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ (EM) が耐性である。CPF_X 耐性は *C. jejuni* では 195 株 (57.2%)、*C. coli* では 11 株 (44.0%)、EM 耐性は *C. jejuni* で 6 株 (1.8%)、*C. coli* で 5 株 (20.0%) であった (図 3, 図 4)。

TC, ABPC, LFLX は CLSI の基準が定められていないため、生物学的ブレイクポイントを設定し耐性率を求めた。3 薬剤のうち ABPC は生物学

的ブレイクポイントの設定ができなかったことから、耐性率の算出は不可能であった。LVFX の生物学的ブレイクポイントは $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ で、*C. jejuni* は 188 株 (55.1%)、*C. coli* は 12 株 (48.0%) が耐性であった (図 5, 図 6)。

2. 健康者糞便由来大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

1) ディスク法を用いた薬剤感受性試験

2018 年～2020 年に健康者の糞便から分離された大腸菌 952 株を対象に 19 薬剤を用いた薬剤感受性試験を行ったところ、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示した株は 41.3% (2018 年)、39.2% (2019 年)、42.3% (2020 年) であり、ほぼ横ばい傾向であった。

薬剤別に耐性率をみると、最も耐性率が高かったのは ABPC で 23.5%、次いで TC および NA がそれぞれ 20.7%、SM 15.5% であった。フルオロキノロン (CPF_X, NFLX, OFLX) 耐性は 7.4%、CTX 耐性は 5.1%、CFX 耐性は 1.2%、CAZ 耐性は 0.2% であった。IPM および MEPM に耐性を示した株は認められなかったが、AMK 耐性株が 1 株 (2018 年) 認められた (図 7)。

2) ESBL 産生菌の検出と遺伝子型別試験

第 3 世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示した株は 2018 年が 19 株 (5.3%)、2019 年は 18 株 (4.3%)、2020 年は 13 株 (4.6%) であった (表 2)。これらの菌株のうち ESBL 産生株は 30 株、AmpC 型 β ラクターマーゼ産生株は 7 株であった。ESBL 産生株の遺伝子型は CTX-M-9 グループが最も多く 21 株、次いで CTX-M-1 グループが 6 株であった (表 3)。

3) コリスチン耐性大腸菌の検出

薬剤感受性試験に供試した株についてプラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を調べた。その結果、2018 年分離株は 3 株、2019 年分離株では 2 株が *mcr-1* 陽性であった。2020 年分離株は全て陰性であった。

3. 市販流通食肉から分離された大腸菌の薬剤耐性菌出現状況

2018 年～2020 年に搬入された国産鶏肉および都内スーパーマーケットで購入した輸入鶏肉からの大腸菌検出数と薬剤感受性試験に供試した大腸菌数を表 4 に示した。

国産由来株と輸入由来株の薬剤別耐性率を比較した結果、国産由来株の方で耐性率が高かったのは ABPC, KM, SM, TC, ST, CP, NA, CPF_X, NFLX, OFLX の 10 薬剤であった。一方、輸入由来株の方が高かったのは GM および CTX, FOM の

薬剤のみで、薬剤耐性傾向は異なっていた（図8）。

国産および輸入鶏肉由来株のCTX耐性率およびKM耐性率の変化を表5に示した。国産のCTX耐性率は、2012年には10.4%であったが、2020年は1.0%まで低下していた。また外国産でも24.6%（2011年）から3.5%（2020年）と耐性率は低下していた。一方KM耐性率は、輸入では26.2%（2011年）から3.5%（2020年）と低下していたが、国産では2018年以降、耐性率は30%台である。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子陽性株は7株検出された。いずれも国産由来株で*mcr-1*陽性であった。

4. 2020年にヒトおよび食品から分離されたサルモネラの薬剤耐性菌出現状況

1) 分離状況

2018年～2020年に東京都内でヒトから分離されたサルモネラは336株で62血清型に分類された（表6）。最も多く分離された血清型は04群Schwarzengrundで42株（12.5%）、次いで09群Enteritidisが25株（7.4%）、04群i：—24株（7.1%）、07群Infantis 22株（6.5%）、04群Typhimurium 19株（5.7%）であった。

一方、食品から検出されたサルモネラは359株で、27血清型に分類された（表7）。食品由来株のほとんどは生の鶏肉または鶏内臓肉からの分離であった。最も多く分離されたのは04群Schwarzengrundで184株（51.3%）と半数以上を占めていた。次いで多かった血清型は07群Infantis 76株（21.1%）、04群Agona 24株（6.7%）、08群Manhattan 12株（3.3%）であった。

2) 薬剤耐性菌出現状況

分離されたサルモネラのうち、供試した薬剤のいずれか1薬剤以上に耐性を示した割合は、ヒト由来株で36.0%（2018年）、39.2%（2019年）、40.7%（2020年）であったが、食品由来株では94.0%（2018年）、88.8%（2019年）、86.6%（2020年）と、食品由来株の方で耐性率が高い傾向が継続していた。

フルオロキノロン系薬剤に耐性を示した株は2019年にヒトから分離された04群Agona 1株のみであった。

CTX耐性株の分離状況を図9に示した。東京都で初めてCTX耐性株が分離されたのは2004年で、2009年以降は毎年分離されている。2015年～2018年は食品由来株で分離株数の増加が認められた。しかし2019年は4株（ヒト由来：

3株、食品由来：1株）、2020年は食品由来株1株のみの検出で、分離数は減少傾向であった。

2018年～2020年に分離された輸入鶏肉由来サルモネラは17株であった。最も多く分離された血清型は04群Heidelbergで6株、次いで021群Minnesota 3株、08群Kentucky 2株であった。2018年と2019年にCTX耐性株が8株分離されたが、全てAmpC型βラクタマーゼ産生菌であった。

D. 考察

カンピロバクター食中毒は依然として多く発生しており、東京都では2020年に発生した食中毒事例114事例中23事例がカンピロバクターによるものであった。新型コロナウイルス感染症の影響のためか2019年より15事例減少したものの、依然として細菌性食中毒の中では最も多い発生数である。

都内病院で分離された散発患者由来*C. jejuni*のフルオロキノロンに耐性株出現状況は62.7%（2012年）から37.1%（2015年）に減少したが、それ以降減少は見られず、50%程度でほぼ横ばいであった。*C. coli*は*C. jejuni*と比較すると耐性率は高い傾向であり、耐性率は最も高いのは87.5%（2011年）、最も低いのは35.7%（2016年）であった。

治療の第一選択薬であるエリスロマイシン耐性率は2011年以降数%程度でほぼ横ばい傾向である。また、*C. coli*のEM耐性率は、2018年分離株の62.5%以外は20%前後で推移しており、2019年分離株でも例年と同様の傾向であった。*C. coli*の耐性率の方が*C. jejuni*よりも高い傾向であるが、*C. coli*の供試数が少ないことから、より正確な耐性率を求めるためにはさらに菌株数を増やして調べる必要があると考えられた。

2016年～2018年に分離された菌株を対象に5薬剤（NA, CPF, LVF, EM, ABPC）についてMICの測定を行った。*C. jejuni*のNAに対するMIC値は128μg/mL以上が54.5%であるが、CPFに対するMIC値の分布をみると4～128μg/mL以上と広く分散していることが明らかとなった。*C. coli*でも同様に分離株の52%がNAに対するMIC値は128μg/mL以上であるが、CPFに対するMIC値は8～32μg/mLに分布している。このことは薬剤耐性が遺伝子上のキノロン耐性決定領域の点変異によりオールドキノロン（NA）からニューキノロン（CPF）に拡散していく過程と一致している。各薬剤に対するMIC値分布を調べることは、ディスク法での

判定では知りえない耐性化の状況を、より詳細に明らかにするものであると考えられた。今後もディスク法と MIC 値分布の比較を行っていく予定である。

市中一般に拡散している薬剤耐性菌の分離状況を把握することを目的として、健康者の糞便から分離された大腸菌を対象に薬剤耐性菌出現状況を調査した。いずれか 1 薬剤以上に耐性を示す株は 42.3% で、2015 年 (46.1%)、2016 年 (37.6%)、2017 年 (36.5%)、2018 年 (41.3%)、2019 年 (39.2%) であり、耐性率はほとんど変わっていない。耐性率が高い薬剤は ABPC が 23.5%、次いで TC および NA がそれぞれ 20.7%、SM 15.5% であった。フルオロキノロン (CPFX, NFLX, OFLX) 耐性は 7.4%、CTX 耐性は 5.1%、CFX 耐性は 1.2%、CAZ 耐性は 0.2% であった。3 年間では ESBL 産生菌は 3.2%、AmpC 型 β ラクターマーゼ産生菌は 0.7% の検出率であった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子の保有状況を調べた結果、2018 年は 3 株、2019 年は 2 株で *mcr-1* 陽性であった。このことから健康者糞便由来株の中にもプラスミド性コリスチン耐性株が広がっていることが明らかとなった。2020 年分離株は陰性であったが、新型コロナウイルス感染症の影響で供試菌株数が少なかったことも原因の一つと考えられた。耐性菌出現状況を正確に把握していくためには、できるだけ多くの菌株を対象に実施していく必要があると考えられた。

市販鶏肉から分離された大腸菌の薬剤別耐性率を比較すると、国産肉由来株と輸入肉由来株で明らかに傾向が異なるパターンを示していた。2020 年の耐性率で比較すると、KM 耐性率は国産肉由来株では 31.8% であるのに対し輸入肉由来株では 3.5% と低い耐性率であった。

国産肉由来株の CTX 耐性率は 2012 年が 10.4% であったが、2019 年は 2.1%、2020 年は 1.0% と調査を始めた 2012 年以降で最も耐性率は低くなった。セフトオフルの自主規制がなされたことで耐性率が顕著に減少し、低い耐性率で推移していることが明らかとなった。また外国産鶏肉由来株でも 2011 年は 24.6% であったが、年々減少し、2020 年は 3.5% の耐性率であった。

2018 年～2020 年に分離されたヒト由来サルモネラは 336 株で 62 種類の血清型に、食品由来株は 359 株で 27 種類の血清型に分類された。

ヒトおよび食品由来ともに多く分離された血清型は 04 群 Schwarzengrund, 07 群 Infantis, 04 群 Typhimurium, 04 群 Agona 等である。少

なくともこれらの血清型は、食品（主に鶏肉および鶏肉内臓肉）がヒトへの感染に影響を与えている可能性の大きいことが示唆された。

分離された株について、供試した 19 薬剤中 1 薬剤以上に耐性を示した割合を比較すると、ヒト由来株では 36.0% (2018 年)、39.2% (2019 年)、40.7% (2020 年) であったが、食品由来株では 94.0% (2018 年)、88.8% (2019 年)、86.6% (2020 年) と、食品由来株の方で耐性率が高い傾向が継続していた。この傾向は 2018 年以前から変わっていない。

CTX 耐性株の分離数は、2018 年の 13 株（ヒト由来 3 株、食品由来 10 株）、2019 年は 4 株（ヒト由来 3 株、食品由来 1 株）であったが、2020 年は食品由来株 1 株のみであった。CTX 耐性株の分離は 2004 年に初めて確認されて以降、2015 年から増加し、2017 年に分離数が最も多く (14 株) になったが、2018 年からの 3 年間は減少傾向である。今後の減少傾向の継続性についても注目していく必要がある。

輸入鶏肉から分離されたサルモネラ 17 株であった。最も多く分離された血清型は 04 群 Heidelberg (6 株) であった。この血清型は国産由来株では全く検出されないことから、ブラジル産鶏肉に特徴的な血清型であると考えられた。CTX 耐性株は 8 株認められ、全て AmpC 型 β ラクターマーゼ産生菌で、ESBL 産生菌は検出されなかった。

AMR 臨床リファレンスセンターの報告によると、全国の抗菌薬販売量は 2013 年と比較して 2019 年は約 10.9% 減少している。特に経口セファロsporin 系薬剤と経口フルオロキノロン系薬剤の減少が大きいというデータである。薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランが策定されてから 5 年が経過し、6 つの各分野それぞれが目標に向かって努力している状況である。今後も引き続き、薬剤耐性菌の変化や拡大傾向など継続的にモニタリングを行い、動向を注視していくことが重要である。

E. 結論

2011 年～2019 年に東京都内の病院で分離された散発患者由来 *C. jejuni* のフルオロキノロン耐性率は毎年 50% 程度でほぼ一定であった。一方、*C. coli* では 37.5%～68.8% と年によって耐性率は異なっていた。エリスロマイシン耐性株の出現率は *C. jejuni* では毎年 0.8%～3.7% と低い耐性率で推移している。一方、*C. coli* では 0%～62.5% であり、年によって耐性率に差が認められた。

2016 年～2018 年分離株を対象に微量液体希釈法による MIC 値の分布を調べた。CLSI に判定基準が記載されている薬剤である CPFX の耐性率は *C. jejuni* で 57.2%, *C. coli* で 44%であった。エリスロマイシン耐性は *C. jejuni* で 1.8%, *C. coli* で 20%であった。各薬剤に対する MIC 値分布を調べることは、ディスク法での判定では知りえない耐性化の状況を、より詳細に明らかにするものであると考えられた。

健康者の糞便から分離された大腸菌 952 株を対象に薬剤感受性試験を行ったところ、いずれか 1 薬剤以上に耐性を示した株の割合は 39.2%～42.3%とほぼ一定であった。フルオロキノロン耐性率は 7.4%, CTX 耐性率は 5.1%であった。プラスミド性コリスチン耐性遺伝子も 5 株検出されたことから、健康者由来株の中にもプラスミド性コリスチン耐性株が広く分布していることが明らかとなった。

国産鶏肉および輸入鶏肉から分離された大腸菌の薬剤耐性パターンを比較すると、明らかに異なる耐性パターンを示した。特に KM は国産由来株で高く、輸入由来株では低かった。日本では 2012 年以降、セフトオフルの自主規制がなされ、代わりに KM を使用していることから、耐性率が高い傾向であると考えられた。CTX 耐性率は国産および輸入由来株共に減少傾向

であった。

ヒトおよび食品由来サルモネラの薬剤耐性率を比較すると、食品由来株の方が耐性率は高かった。この傾向は以前から継続している。

フルオロキノロン耐性株は 2019 年にヒトから分離された 1 株のみであったが、CTX 耐性株は 2007 年以降毎年分離されている。しかし 2017 年をピークに分離数は減少していた。今後も動向を注視していく必要がある。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
準備中

2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得	無し
2. 実用新案登録	無し
3. その他	無し

表1 薬剤感受性試験に用いたサルモネラ菌株数

年	供試菌株数		
	ヒト由来	食品由来	輸入鶏肉由来
2018	139	134	5
2019	143	143	6
2020	54	82	6
合計	336	359	17

集団事例株は代表1株を計上

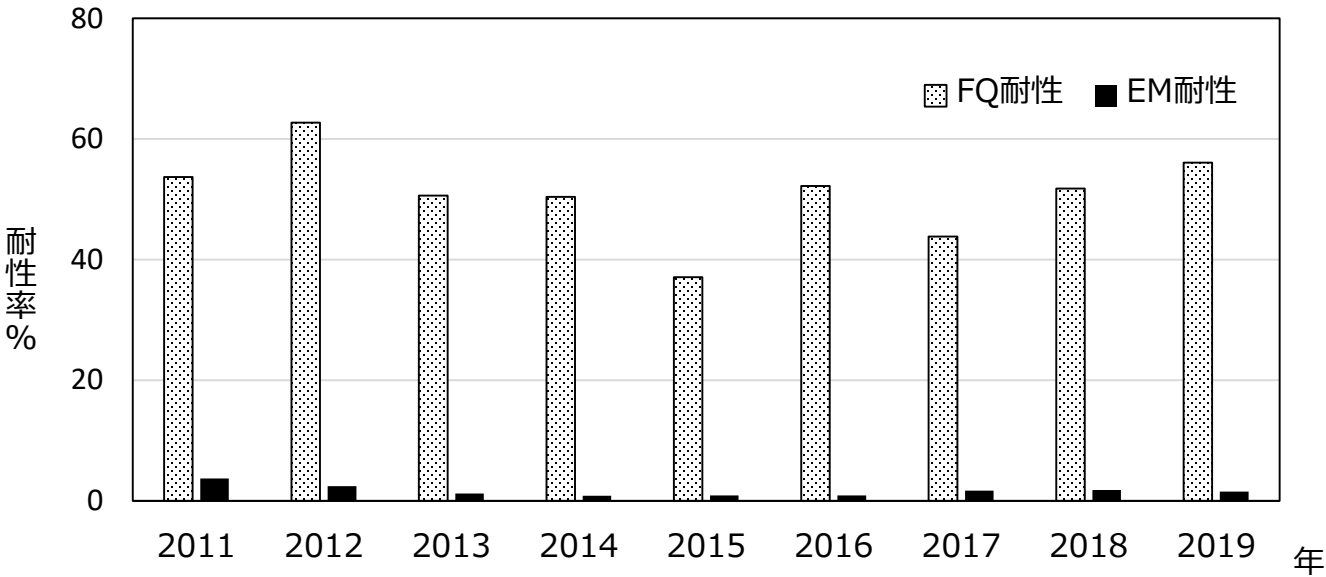


図1. 散発患者由来*C. jejuni* の薬剤耐性菌出現状況（東京都）

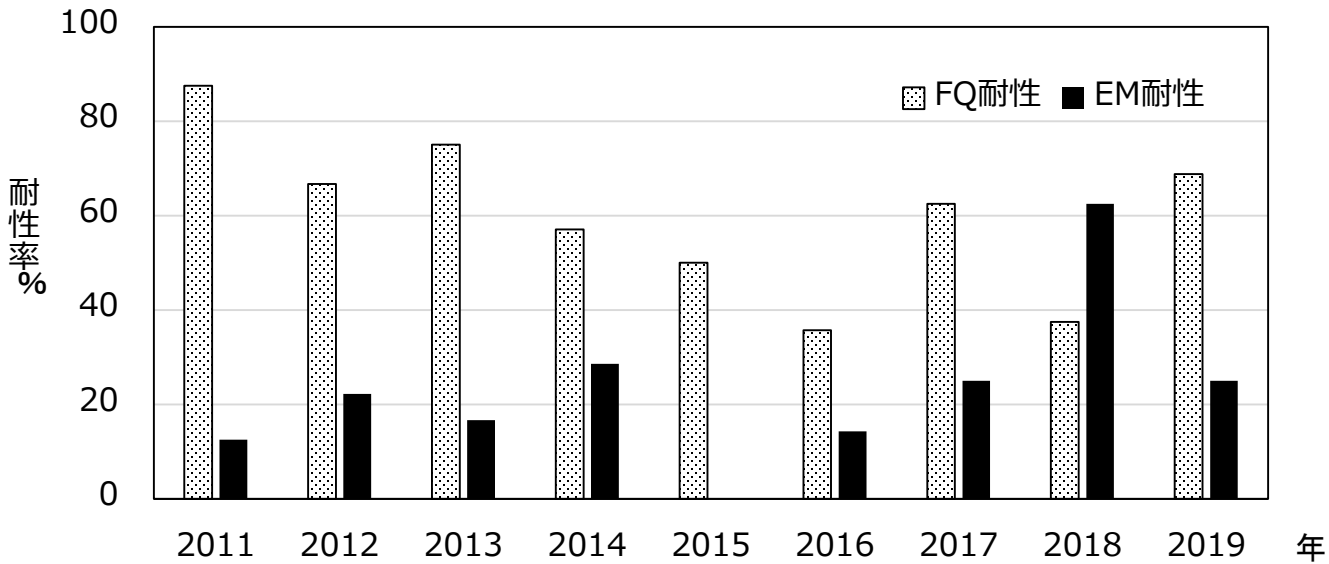


図2 散発患者由来*C. coli* の薬剤耐性菌出現状況（東京都）

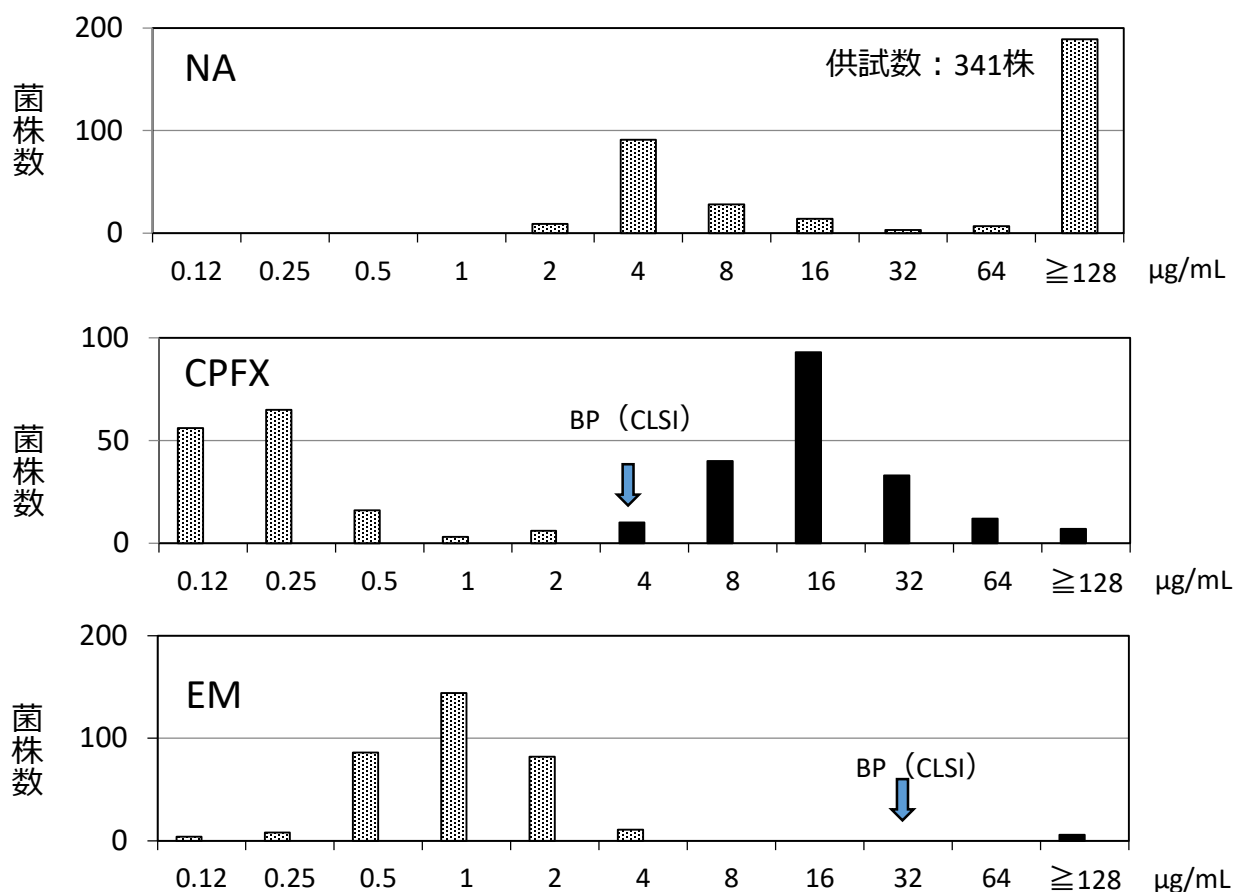


図3. 散発患者由来*C. jejuni* のMIC値分布 (2016年～2018年, 東京都)

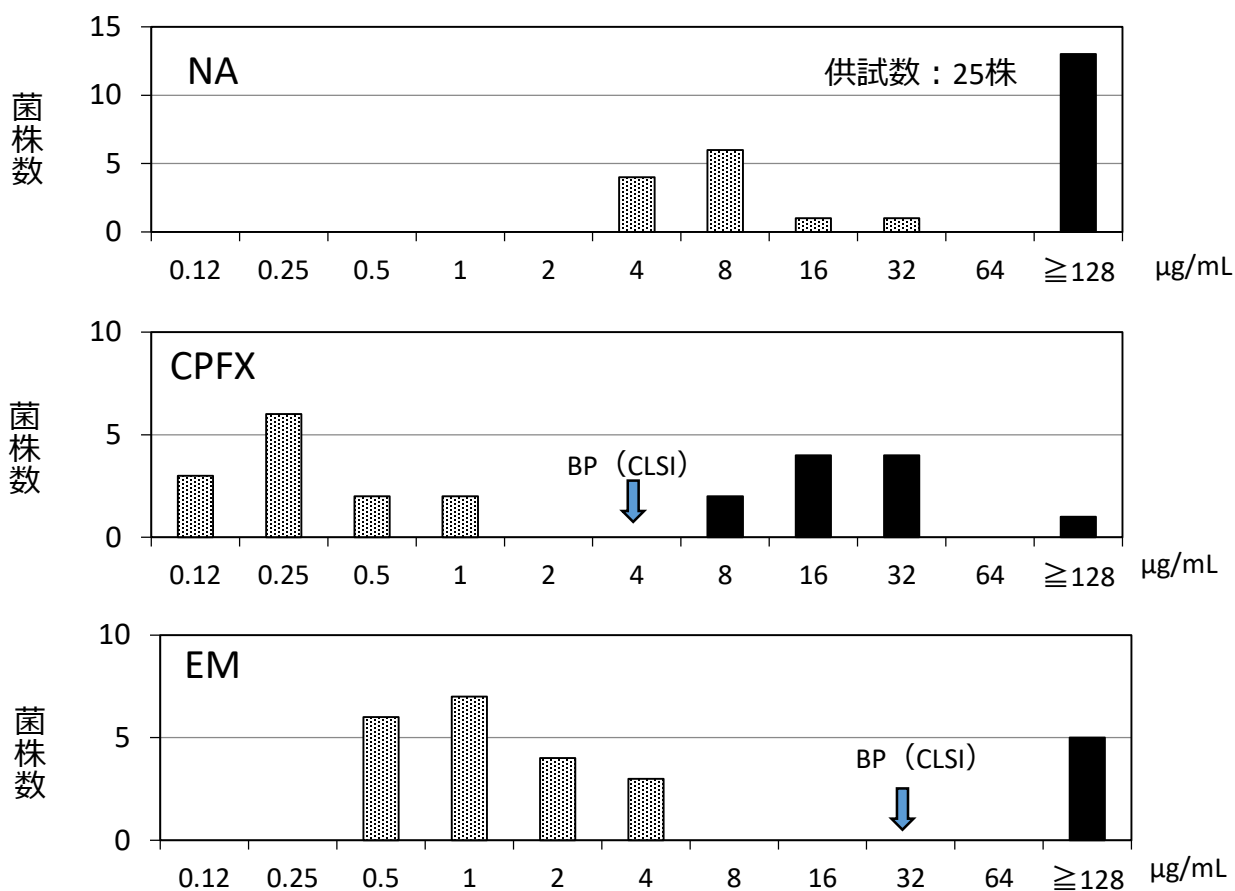


図4. 散発患者由来*C. coli* のMIC値分布 (2016年～2018年, 東京都)

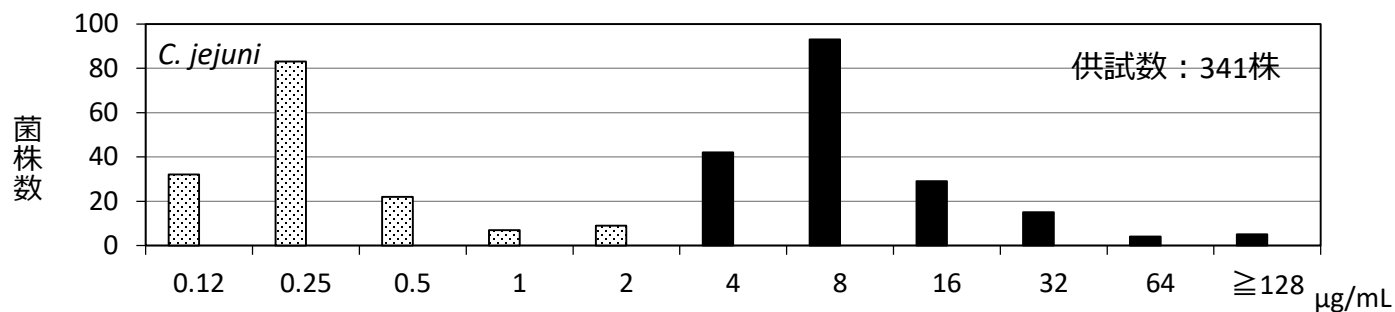


図5. 2016年～2018年に分離された散発患者由来*C. jejuni*のLVFXに対するMIC値分布
(生物学的ブレイクポイント： $\geq 4\mu\text{g/mL}$)

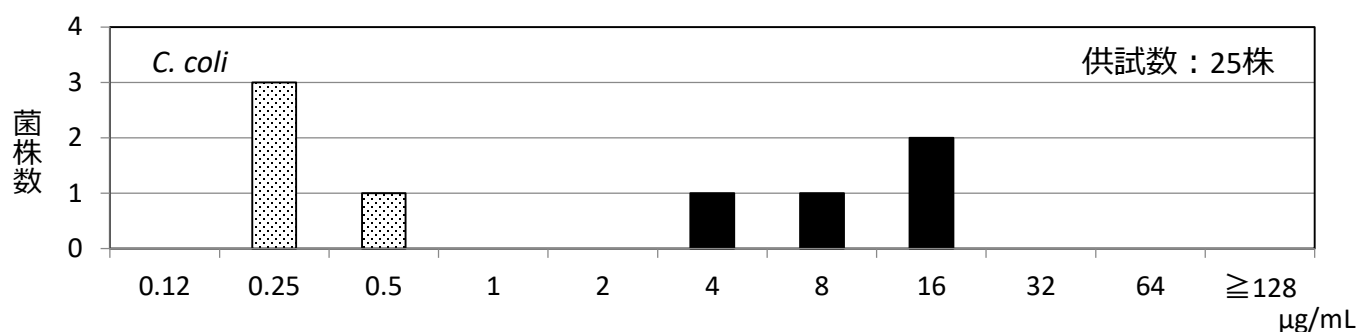


図6. 2016年～2018年に分離された散発患者由来*C. coli*のLVFXに対するMIC値分布
(生物学的ブレイクポイント： $\geq 4\mu\text{g/mL}$)

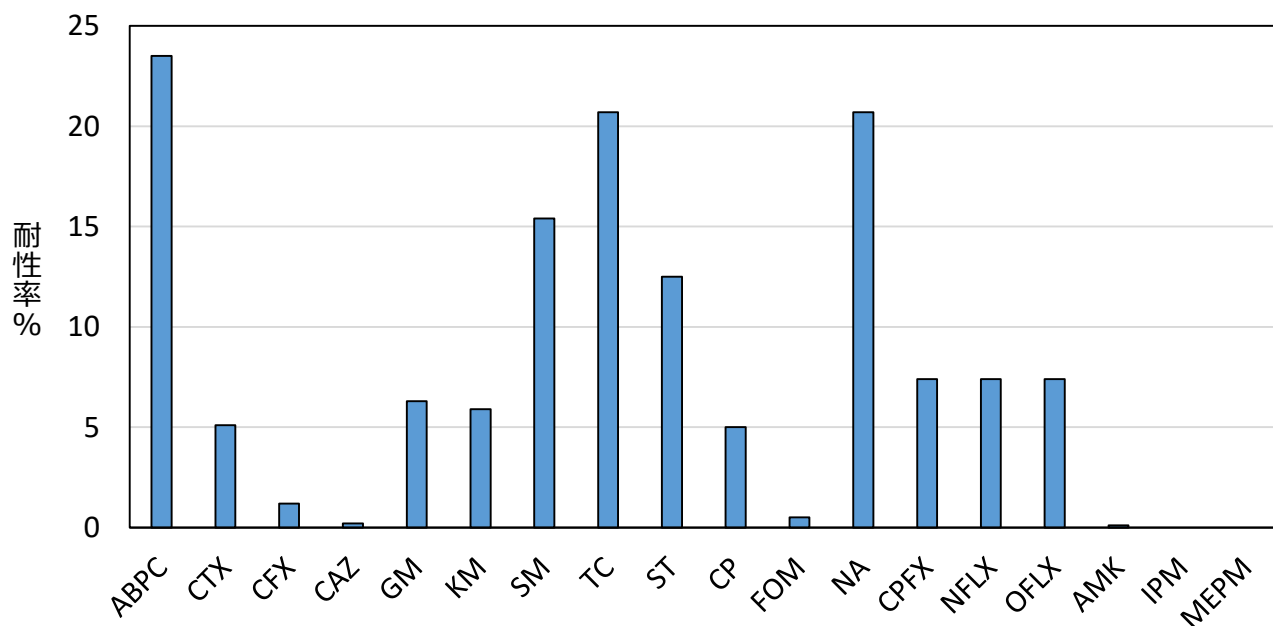


図7. 健康者由来大腸菌の薬剤別耐性菌出現状況 (2018年～2020年, 東京都)

1薬剤以上に耐性を示した株の割合

2018年：41.3%, 2019年39.2%, 2020年42.3%

表2. 健康者糞便由来大腸菌のESBLおよびAmpC型βラクタマーゼ産生菌出現状況

年	セファロスポリン系薬剤耐性数 (%)	型別実施数	ESBL	AmpC
2018年	19 (5.3%)	16	9	2
2019年	18 (5.8%)	17	11	2
2020年	13 (4.6%)	13	10	3
合計	50 (5.3%)	46	30	7

表3. 健康者糞便由来ESBL産生大腸菌の遺伝子型

年	供試数	CTX M-group			SHV
		M-1	M-2	M-9	
2018年	9	2	2	4	1
2019年	11	2		9	
2020年	10	2		8	
合計	30	6	2	21	1

表4. 市販鶏肉からの大腸菌検出数と薬剤感受性試験供試菌株数

年	検体	検体数	大腸菌陽性数	%	供試菌株数
2018年	国産	163	132	81.0%	241
	輸入	26	22	84.6%	36
2019年	国産	145	125	86.2%	238
	輸入	30	22	73.3%	38
2020年	国産	124	115	92.7%	198
	輸入	34	31	91.3%	57
合計	国産	432	372	86.1%	677
	輸入	90	75	83.3%	131

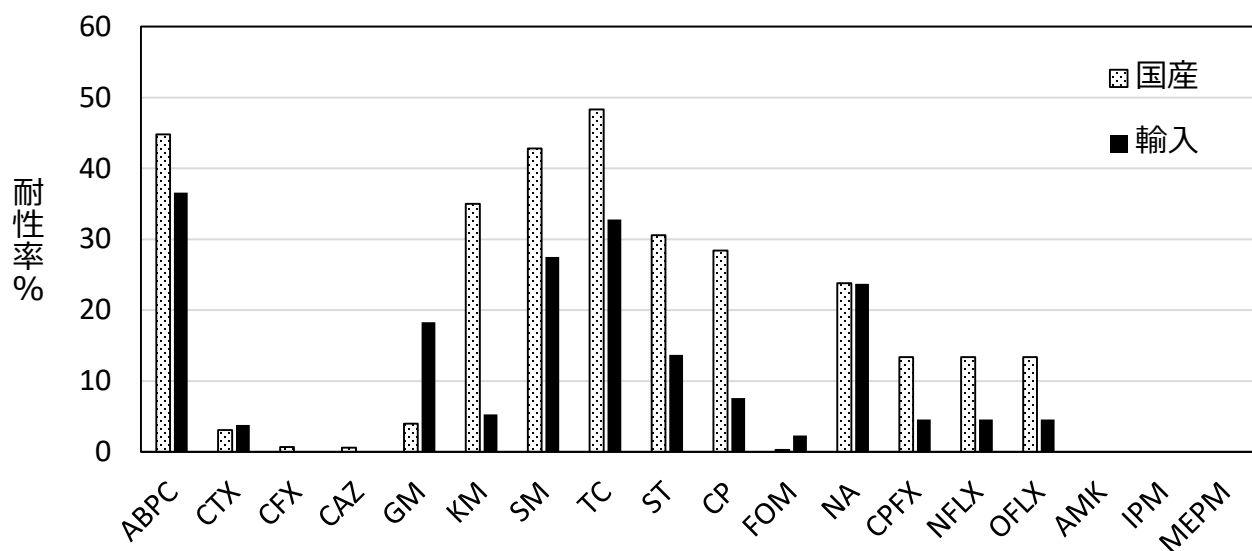


図8. 市販鶏肉由来大腸菌の薬剤別感受性試験成績（2018年～2020年，東京都）

表5. 市販鶏肉由来大腸菌のCTX, KMおよびCPFX耐性率の年次変化

由来	調査年	耐性率 (%)		
		CTX	KM	CPFX
国産	2012	10.4	25.8	16.6
	2015	3.6	46.8	6.5
	2018	5.8	35.7	9.5
	2019	2.1	37.0	13.0
	2020	1.0	31.8	18.7
輸入	2011	24.6	26.2	17.8
	2015	27.0	27.0	29.7
	2018	2.8	8.3	2.7
	2019	5.3	7.9	10.5
	2020	3.5	3.5	1.8

表6. ヒト由来サルモネラの血清型および分離数（2018年～2020年）

O群	血清型	供試菌株数	O群	血清型	供試菌株数
O4	Schwarzengrund	42	O7	Montevideo	2
O9	Enteritidis	25	O8	Nagoya	2
O4	i : -	24	O3,10	Orion	2
O7	Infantis	22	O7	Rissen	2
O4	Typhimurium	19	O38	III b	1
O4	Agona	18	O8	Albany	1
O7	Thompson	18	O18	Cerro	1
O8	Newport	16	O7	Choleraesuis	1
O4	Chester	11	OUT	d : 1, 7	1
O7	Braenderup	9	O4	Derby	1
O8	Colvallis	7	O3,10	Give	1
O4	Stanley	9	O13	Grumpensisi	1
O8	Manhattan	6	O13	Havana	1
O7	Mbandaka	6	O8	i : -	1
O3,10	Anatum	5	O40	Johanesburg	1
O7	Bareilly	5	O7	k : -	1
O8	Bovismorbificans	5	O13	Kedougou	1
O13	Cubana	5	O1,3,19	Liverpool	1
O7	Oranienberg	5	O7	Livingstone	1
O9	Panama	5	O21	Minnesota	1
O4	Saintpaul	5	O3,10	Muenster	1
O8	Altona	4	O8	Narashino	1
O3,10	Amager	4	O7	Ohio	1
O8	Blockley	4	O7	Oslo	1
O4	Brandenberg	4	O38	Perth	1
O4	Sandiego	4	O3,10	Uganda	1
O7	Colindale	3	O6,14	Uzaramo	1
O4	d : -	3	O7	Virchow	1
O8	Litchfield	3	O16	Yoruba	1
O3,10	Weltevreden	3	O7	亜種Ⅱ	1
O1,3,19	Cannstatt	2	O7	運動性 (-)	1
			合計		336

表7. 食品由来サルモネラの血清型および分離数（2018年～2020年）

血清群	血清型	分離数	血清群	血清型	分離数
O4	Schwarzengrund	184	O4	Stanley	2
O7	Infantis	76	O7	Bareilly	1
O4	Agona	24	O4	Bredeney	1
O8	Manhattan	12	O8	Corvalis	1
OUT	r : 1,5	10	OUT	d : -	1
O8	Blockley	7	OUT	d : 1,5	1
O4	i : -	7	O4	Derby	1
O4	Typhimurium	6	O8	Hadder	1
OUT	d : 1,7	4	O7	Hato	1
O7	Thompson	4	O8	Muenchen	1
O3,10	Anatum	3	O8	Newport	1
O7	Rissen	3	O9	Panama	1
O4	運動性 (-)	3	O16	Yovuba	1
O4	Brandenburg	2	合計		359

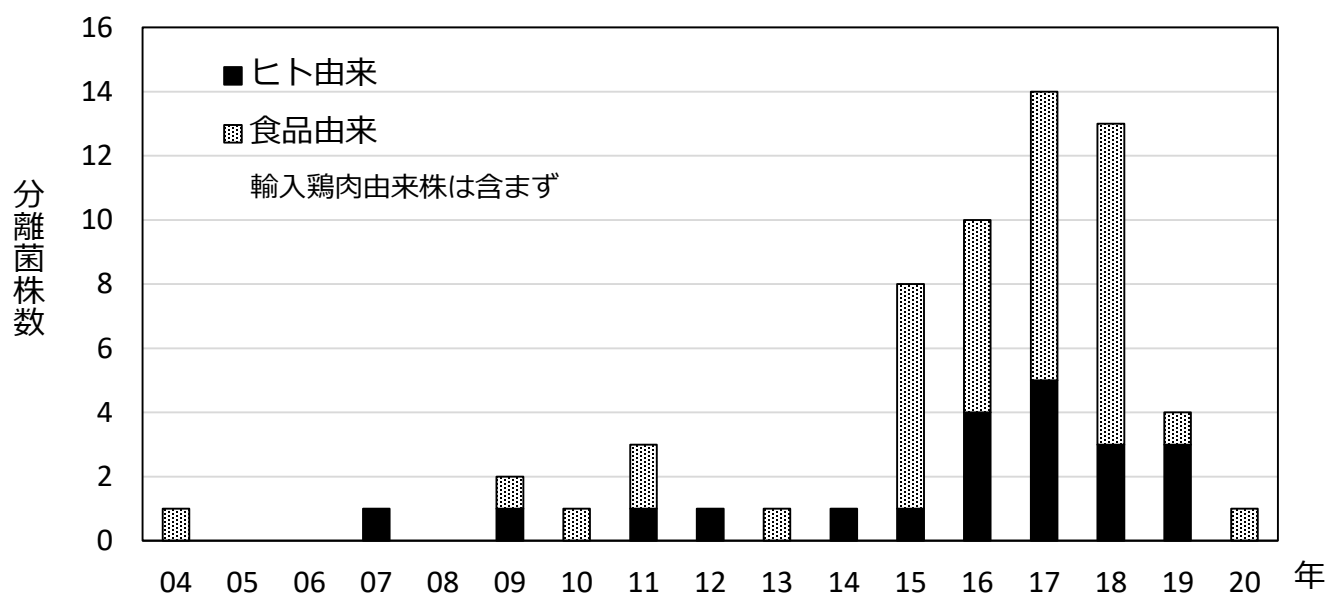


図9. CTX耐性サルモネラの分離状況（東京都）

厚生労働科学研究費補助金補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題名：食品中の耐性菌汚染、と畜場等における交差汚染の役割解析

研究分担者：浅井鉄夫 岐阜大学大学院連合獣医学研究科・教授

研究協力者：杉山美千代（岐阜大学大学院連合獣医学研究科）

市川 隆 （名古屋市食肉衛生検査所）

岩田康一 （名古屋市食肉衛生検査所）

梶本真希 （岐阜県中央食肉衛生検査所）

佐々木貴正 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨

フードチェーンにおける薬剤耐性菌の制御は重要な課題であるが、食肉の細菌汚染には様々な要因が複雑に関与している。本研究では、生産段階と食肉処理工程に着目して、薬剤耐性菌を含む細菌汚染の実態と要因を解明するため、肉用鶏の種鶏場、孵卵場及び生産農場におけるサルモネラと大腸菌、食肉処理施設では出荷豚における家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（LA-MRSA）と食肉処理工程で分離される腸内細菌科細菌等を対象に性状解析した。本研究によって、生産段階を汚染する薬剤耐性菌は、①種鶏場や孵卵場で使用される抗菌剤が素畜（初生ヒナ）の耐性菌保有状況に関与し、②初生ヒナの保有する薬剤耐性菌と③飼育期間に使用された抗菌剤が薬剤耐性菌の分布に関与することが示唆された。また、食肉処理工程の薬剤耐性菌の汚染は、④家畜が保有する腸内細菌科細菌と⑤食肉処理施設の環境汚染等に起因することが示唆された。今後も継続して、国内の畜産現場と食肉における多様な薬剤耐性菌の疫学研究が必要である。

A. 研究目的

食品を介して人へ伝播する薬剤耐性菌を制御する上で、フードチェーンにおける汚染実態の把握が重要な課題である。畜産現場において、抗菌薬は細菌感染症を治療し、安全な畜産物を安定供給するために必要な資材として長い間利用されてきた。しかし、畜産の生産現場で抗菌薬を使用すると薬剤耐性菌が選択され、薬剤耐性菌が食肉を汚染する危険性が懸念されている。肉用鶏に分布する第3世代セファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラは、2005年ごろから増加して、鶏肉の耐性菌汚染が深刻になった。2012年に鶏へのセフトオフルの適応外使用に関して

養鶏業界の自主規制が行われた結果、肉用鶏からの第3世代セファロスポリン耐性大腸菌やサルモネラが減少した（Hiki et al., 2016; Shigemura et al., 2018）。しかし、市販鶏肉から第3世代セファロスポリン耐性菌は高率に分離されている。このように、食肉における薬剤耐性菌の問題は、家畜における薬剤耐性菌の分布実態を反映しない場合もあり、食肉処理される過程での家畜由来の薬剤耐性菌による交差汚染は深刻な問題である。そのため、食肉処理施設における耐性菌の交差汚染を防止することは重要な課題である。

食肉処理施設ではHACCPの導入により衛生管理は改善されているが、依然として食肉から

薬剤耐性菌が分離される。食肉処理施設において汚染が拡大する薬剤耐性菌は、家畜により持ち込まれたものと推察されるが、どのような処理工程で汚染が拡大しているかについては不明な点が多い。

本研究では、食肉処理における交差汚染の対策を構築するため、鶏肉の生産段階として種鶏場、孵卵場と生産農場、食肉処理場及び食肉処理工程を対象に腸内細菌科細菌等を指標に解析している。1年目に、各段階の薬剤耐性菌汚染には、素畜（初生ヒナ）、飼育期間に感染した動物の食肉処理場への搬入、食肉処理工程での環境等複数の要因が存在することが示唆された。そこで、2年目に、飼育動物と処理工程の低減対策と豚における家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（LA-MRSA）のモニタリング方法について検討した。最終年には、枝肉由来腸内細菌科細菌の解析、種鶏場・孵卵場・生産農場における抗菌剤の使用と薬剤耐性菌の分布状況の関係、食肉由来薬剤耐性菌のゲノム解析を行った。

B. 研究方法

（１）市販肉の交差汚染経路の解析

愛知及び岐阜県下の牛及び豚の食肉処理施設（愛知：A処理施設、岐阜：B処理施設）において、「と畜場における枝肉の微生物汚染実態調査」により枝肉等のふき取り材料と環境材料から分離された細菌の同定と薬剤感受性を実施した。同一菌種について、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法で分子疫学解析を実施した。

さらに、同一農場出荷豚の枝肉から同じ PFGE 型の大腸菌が認められたことから、1豚房で飼育される複数の豚が保有する大腸菌の類似性を検討した。養豚場の同一豚房で飼育する3頭の豚から大腸菌を分離し、薬剤感受性と PFGE 解析した。

また、食肉処理場に搬入された豚の糞便由来 *Escherichia albertii* の薬剤感受性と PFGE 解析を行った。

細菌の同定は生化学的性状に基づく同定システム（バイテック）を用い、薬剤感受性試験は、Clinical Laboratory Standards Institute（CLSI）法に準拠したドライプレート（栄研化学、栃木）を用いた微量液体希釈法で実施した。供試薬剤は、アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、メロペナム、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、コリスチン、クロラムフェニコール、トリメトプリム・スルファメトキサゾールの12剤を用いた。PFGEは、CDCのパルスネットのプロトコールに準拠して実施した。

（２）鶏肉のフードチェーンにおける腸内細菌の薬剤耐性獲得ポイントの推定

鶏肉生産企業5社（A～E）の協力の下で、鶏肉フードチェーンにおけるサルモネラの薬剤耐性状況について調査した。A社（九州地方）は、初生ヒナのほとんどを自社生産し、種鶏場でテトラサイクリン、孵卵場でワクチンの卵内接種時にストレプトマイシンを混合使用（ストレプトマイシンの in ovo 使用）していた。B社（中国地方）では、初生ヒナの多くを自社生産し、一部を他社（抗菌薬の使用状況は不明）から購入していた。B社の種鶏場では抗菌薬を使用せず、孵化場でストレプトマイシンの in ovo 使用を実施していた。C社（九州地方）は、初生ヒナのほとんどを関連会社で生産し、関連会社の種鶏場でテトラサイクリン（TC）、孵卵場でカナマイシン（KM）の in ovo 使用していた。D社（東海地方）は、自社で種鶏場も孵卵場も所有せず、初生ヒナを外部購入（抗菌薬の使用状況は不明）していた。E社（東北地方）は、初生ヒナのほとんどを自社生産し、種鶏場ではノルフロキサシンを使用し、孵卵場では抗菌薬を使用していなかった。なお、抗菌薬の使用については、治療目的ではなく、感染症予防目的で使用しているものを記載した。

種鶏場の調査には、新鮮盲腸便（1農場2鶏舎

から採取)を供試した。肉用鶏農場の調査には、食鳥処理場で採取した盲腸内容物(1 鶏群 5 羽)を供試した。孵卵場の調査には、卵内ワクチン接種後に発育中止した鶏卵(死籠り卵: 1 種卵ロット 2 個)を供試した。

サルモネラの分離は、緩衝ペプトン水による前増菌培養後、ハーナ・テトラチオン液体培地(栄研化学社)およびラパポート・バシリアデイス液体培地(関東化学)を用いた増菌培養と遅延二次増菌培養法を併用し、選択培養にはクロモアガー・サルモネラ培地(関東化学)および XLD 培地(関東化学)を用いて実施した。

薬剤感受性試験は、微量液体希釈法を用い、12 剤(アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、コリスチン、クロラムフェニコール及びトリメトプリム)について実施した。

細菌感染症治療に使用する抗菌薬が明らかな肉用鶏を生産する 2 農場(a 農場、b 農場)で分離した ESBL 産生大腸菌のプラスミドを、次世代シーケンサーを用いて解析した。a 農場では無薬飼育されていたが、b 農場では、5~7 日齢でアモキシシリンと 24~26 日齢で ST 合剤が投薬されていた。a 農場で導入した初生びなから分離した CTX-M-25 産生 *Enterobacter cloacae* 2 株と CTX-M-25 産生 *Klebsiella pneumoniae* 1 株及び 1 年後の肥育鶏から分離した CTX-M-25 産生大腸菌 1 株の計 4 株と b 農場の一ロットの飼育期間中に分離した CTX-M-3 産生腸内細菌科細菌 9 株(大腸菌 3 株、*Ent. cloacae* 3 株、*K. pneumoniae* 3 株)を供試した。供試株の PFGE 用プラグを作成し、S1 ヌクレアーゼ処理後電気泳動した。プラスミド領域のゲルから遺伝子を抽出し、Miseq により得られたドラフトゲノムを GPAT で解析した。さらに、変異プラスミドの出現状況と抗菌剤使用の影響を検討した。

(3) 食肉等から分離された薬剤耐性菌の分子疫学解析

【LA-MRSA の分布調査】

84 農場から出荷された 420 頭(各農場 5 頭)の鼻粘膜スワブを収集し、MRSA 検査を実施した(第 1 回調査)。その後、さらに 6 農場(1 農場は第 1 回調査で MRSA 陽性、5 農場は第 1 回調査で MRSA 陰性)から出荷された 30 頭(各 5 頭)から鼻粘膜スワブ及び耳スワブを採取した。

51 農場からと畜場に出荷された豚の耳 102 検体(1 農場当たり 2 頭)を収集して MRSA を検索した。

【LA-MRSA の検査材料の検討】

と畜場において豚の MRSA 汚染実態調査を実施する際の適切な分離材料を検討するため、と畜場において 92 農場 276 頭から鼻腔内壁、耳介背及び枝肉頸部からスワブを採材し、MRSA を検索した。

分離培養は、6.5%NaCl 加トリプトイブ Ⅱ (TSB) で前増菌培養し、セフトキシム・アストレオラム添加 6.5%NaCl 加 TSB を用いて増菌培養した。その後、増菌培養液をクロモアガー-MRSA と MRSA 分離培地 II (栄研) へ塗抹し、MRSA を分離した。分離菌の SCCmec 型、MLST 型、spa 型及び薬剤感受性を常法で調べた。Panton-Valentine-Leukocidin (PVL) 遺伝子及び *czrC* 遺伝子は PCR 法により検出した。亜鉛の MIC は寒天平板希釈法で決定した。

【分離菌株のゲノム解析】

と畜場で採材した豚耳から分離した家畜関連黄色ブドウ球菌(LA-MRSA) 8 株、岐阜大学で保存していた市販国産鶏肉から分離された *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌 12 株を次世代シーケンサーで解析した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

(1) 市販肉の交差汚染経路の解析

2018 年と 2019 年に枝肉ふき取り材料から分離された菌を同定した結果、大腸菌、*K. pneumoniae* が比較的優勢な菌種であった(表 1)。

2018 年に枝肉から分離された大腸菌、*K. pneumoniae*、*Ent. gergoviae*、*K. oxytoca* を PFGE 解析したところ、複数の豚枝肉に由来する大腸菌と *K. pneumoniae* (図 2)、複数の牛枝肉に由来する *K. oxytoca* と *Ent. gergoviae* で同一の PFGE パターンが 2 つ認められた。1 養豚場の 1 豚房飼育する豚 3 頭から分離した大腸菌 30 株の PFGE パターンは、11 に分類された。その内、2 パターンは、3 頭に共通に認められた(図 3)。

食肉加工 5 施設の環境(まな板、処理ライン等)のふき取り材料の検査において、2 施設の複数のふき取り材料から同じ菌種が分離されたため、PFGE 解析を実施したところ、施設②では菌種と PFGE 型は部位ごとに異なっていたが、施設⑤では、同一の PFGE 型の細菌が、複数から分離された(表 2、図 4)。洗浄消毒状況は処理施設ごとの違いが認められた(表 3)

(2) 鶏肉のフードチェーンにおける腸内細菌 A 社については、この 3 年間に種鶏場(種鶏群)、孵卵場(種卵ロット)及び食鳥処理場(肉用鶏群)の 3 地点で調査した。各地点のサルモネラ汚染率は、種鶏群で 10.0% (3/30) (表 4)、種卵ロットで 15.0% (12/80) (表 5) および肉用鶏群で 95.8% (23/24) (表 6) であった。分離されたサルモネラ株の約半数(17/38) がストレプトマイシンとテトラサイクリンの両方に耐性な Manhattan で 3 地点すべてから分離された。次いでストレプトマイシンとテトラサイクリンの耐性を含む多剤耐性 Schwarzengrund で、肉用鶏群の盲腸内容物から分離された。

B、C 及び D 社では、ストレプトマイシンとテトラサイクリンの耐性を含む多剤耐性 Schwarzengrund が最も多かった(表 6)。ただし、

自社の種鶏場(抗菌薬投与なし)および孵卵場(ジヒドロストレプトマイシンの in ovo 投与)を有する B 社は、C 及び D 社と比べ、カナマイシン耐性率が低かった。B 社の肉用鶏農場では、農場単位のオールインオールアウトが未実施であり、敷料として戻し堆肥を利用していた。

E 社の種鶏場では、5.9%の種鶏群からサルモネラが分離されたが、1 株には耐性が認められず、もう 1 株はカナマイシンに対して耐性であった(表 4)。

【腸内細菌科細菌における薬剤耐性プラスミド】

無薬飼育する農場由来 CTX-M-25 産生腸内細菌科細菌 5 株(初生ヒナ由来 *Ent. cloacae* 2 株と *K. pneumoniae* 1 株及び 1 年後の肥育鶏由来大腸菌 1 株)を解析したところ、大腸菌の ESBL プラスミドは、約 1 年前に初生ひなから分離した *K. pneumoniae* のプラスミドと近縁であった(図 5)。

24~26 日齢で ST 合剤を使用されていた農場の同一ロットから分離された CTX-M-3 産生腸内細菌科細菌 9 株(大腸菌 3 株、*Ent. cloacae* 3 株、*K. pneumoniae* 3 株)のプラスミドは、19 日齢で分離された *Ent. cloacae* (3 株中 1 株)のプラスミドを除いて、きわめて類似していた。この *Ent. cloacae* のプラスミドは、*aadA2* と *dfrA12* を保有するクラス 1 インテグロン領域の欠損が認められた(図 6、7)。

(3) 国内豚由来 MRSA の性状解析

東北地方のと畜場で 84 農場 420 頭の豚鼻粘膜スワブでは、MRSA は、9 農場(11%) 13 頭(3.1%)の鼻粘膜スワブから分離され、全て ST398 であった。spa 型は t034(8 農場)と t011(1 農場)で、SCCmec 型は IVa 型(いずれも spa 型は t034: 5 株)及び V 型(spa 型は t011 と t034)であった。V 型株は亜鉛抵抗性遺伝子(*czrC*)保有した。また、関東地方のと畜場で 51 農場 102 頭(2 頭/農場)の豚耳サンプルでは、MRSA は

13 農場 (25.5%) 16 検体 (15.7%) から分離され、ST398 が 7 農場 (13.7%) 8 株、ST5 が 4 農場 (7.8%) 6 株及び ST8 が 2 農場 (3.9%) 2 株であった (表 7)。

と畜場において豚の MRSA 汚染実態調査を実施する際の適切な分離材料を検討するため、と畜場において 92 農場 276 頭から鼻腔内壁、耳介背及び枝肉頸部からスワブを採材し、MRSA は 25 農場 (27.2%) の 48 頭 (17.4%) のいずれかの検体から分離され、耳介背スワブ (40 検体)、鼻腔内壁スワブ (22 検体)、枝肉頸部 (1 検体) の順であった (表 8)。

(4) 食肉等から分離された薬剤耐性菌の分子疫学解析

LA-MRSA (ST398) 8 株は、全て *blaI*、*blaZ*、*ermC*、*tet*(38)、*tet*(M)と *czrC* 陽性であった。7 株が SCCmecIVb で、1 株が SCCmecV だった。SCCmecIVb 7 株のうち、3 株がフロルフェニコール耐性遺伝子 (*fexA*)、4 株が消毒薬耐性遺伝子 (*qacG*) を保有していた。SCCmecV 1 株は、多剤耐性株で、アミノグリコシド (*ant*(6)-Ia)、トリメトプリム (*dfpG*)、フロルフェニコール (*fexA*)、リンコマイシン (*lnu*(B), *lsa*(E)) およびテトラサイクリン (*tet*(K)) の耐性遺伝子を保有していた (表 9)。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) 保有大腸菌 10 株の MLST 型は多様[ST206(2 株、以下 1 株)、ST 10、ST2614、ST101、ST1112、ST135、ST5826、UT (6-5-188-8-24-8-6)、ST1196]であった。*mcr-1* は、IncI2 プラスミド上に存在し、サブタイプは 9 株が *mcr1.1* で 1 株が *mcr1.12* であった。多くの株が多剤耐性で、プラスミド性キノロン耐性遺伝子 (*qnrS13*) を保有する 1 株も認められた (表 10)。

D. 考察

(1) 市販肉におえる薬剤耐性菌の汚染

市販肉の薬剤耐性菌汚染は、家畜の腸内に保

有する細菌が食肉処理工程で枝肉に付着すること起因する。食肉処理施設の枝肉や環境ふき取り材料から様々な細菌が分離され、PFGE 型の同一性から個体が保有する細菌による汚染や交差汚染が示唆された。

本研究では、枝肉のふき取り材料から分離された腸内細菌科細菌を用いて、菌種ごとに PFGE 解析を行った。2020 年度の報告書に示したように、一方、食肉処理業施設の環境材料からの分離菌の PFGE 解析では、施設間の交差汚染の状況に差異が認められ、異なる場所から同一の PFGE 型の細菌が分離された施設も認められた。このように、家畜の腸内容物以外に、処理施設等の環境に由来する可能性があることから、食肉処理施設の衛生管理が重要である。

(2) 鶏肉のフードチェーンにおける腸内細菌の薬剤耐性獲得ポイントの推定

肉用鶏の生産システムにおける抗菌剤使用とサルモネラの薬剤耐性に関して、種鶏場や孵卵場で使用された抗菌薬に耐性を示すサルモネラが肉用鶏農場に分布することが示めされた。また、種鶏場及び孵卵場において、感染予防目的で抗菌薬が使用されている実態も明らかとなった。素ビナのほとんどを自社生産する A 社では、肉用鶏農場と孵卵場で同じ薬剤耐性型のサルモネラ (Manhattan) が分離され、孵化場に浸潤するサルモネラによって肉用鶏農場が汚染することが示唆された。このように、肉用鶏由来サルモネラの薬剤耐性は、肉用鶏農場で使用される抗菌薬に加え、その上流である種鶏場や孵卵場において使用される抗菌薬の影響を受けることが明らかとなった。また、B 社の肉用鶏農場では、第 3 世代セファロスポリン耐性株が今なお分離されており、当該株が農場内に持続的に存在している可能性が示された。

一方、飼育期間中の抗菌剤使用が、薬剤耐性菌の選択圧として作用することは知られている。無薬飼育する農場において、ESBL 産生

Klebsiella pneumoniae が初生ヒナを介して農場へ侵入し、ESBL プラスミドが大腸菌へ伝播して 1 年以上の間農場内に分布したことが示された。無薬農場で認められたことから、ESBL プラスミドの菌種間伝播には、抗菌剤が関与しないことが示された。一方、飼育期間中に投薬する農場で大腸菌を含む腸内細菌科細菌の間で、ESBL プラスミドが伝播することが示唆されたが、投薬前に 19 日齢で分離された ESBL 産生エンテロバクター由来 ESBL プラスミドにおいて、ストレプトマイシン耐性 (*aadA2*) とトリメトプリム耐性 (*dfrA12*) 遺伝子を保有するクラス 1 インテグロン領域の欠損が認められた。このことは、飼育期間中に 2 薬剤に感受性を回復した株が出現したが、その後の投薬 (24~26 日齢で ST 合剤を使用) によって、トリメトプリム耐性を消失したプラスミドが選択されなかったことが示唆された。以上から、細菌間のプラスミド伝播や耐性遺伝子の欠損株の出現には抗菌薬の使用は影響しないが、欠損株の分布にはその後の抗菌剤使用が関与すると考えられた。

(3) 食肉等から分離された薬剤耐性菌の分子疫学解析

LA-MRSA は、ヨーロッパやアメリカでは ST398 が主で、アジアでは ST398 の他 ST9 が分布する。人への伝播には、主に養豚従事者などの畜産関係者への直接的な伝播 (動物由来感染症) と豚肉などの畜産物を介した間接的伝播 (食品媒介感染症) がある。日本において 2012 年 8 月~2013 年 2 月の間に東北地方 (10 農場)、関東地方 (23 農場)、東海地方 (7 農場)、九州地方 (10 農場) で飼育されていた計 500 頭の鼻粘膜スワブを検査し、関東地方の 1 農場の 10 頭中 4 頭から ST398 MRSA が分離されている (Sasaki ら、2020)。このように、国内の一部の地域の養豚場で ST398 MRSA が確認されていた。その後、2018 年の輸入検疫中の豚から ST398 MRSA が分離報告された

(Furuno ら、2018)。輸入豚は繁殖雌豚の生産農場 (種豚場) へ導入される場合が多く、生産された繁殖雌豚は国内の養豚農家へ広く流通する。そのため、国内の豚における ST398 MRSA の調査は喫緊の課題と考えられた。本課題で、東北地方と関東地方のと畜場で調査した結果、LA-MRSA が両地方の養豚場に分布すること、性状解析により多様な遺伝子型であること、多剤耐性 LA-MRSA が分布することを明らかにした。LA-MRSA の分離率は、農場調査に比べ、と畜場段階で実施した方が高い傾向がある。現在までに、中部から九州における調査は未実施であることから、国内の豚における MRSA の分布実態を明らかにするため、全国調査の実施が望まれる。

プラスミド性コリスチン耐性遺伝子 (*mcr-1*) 保有大腸菌を解析した結果、*mcr-1* サブタイプは *mcr1.1* と *mcr1.12* で、IncI2 プラスミド上に存在していたが、10 株の MLST 型は多様であった。これらのことから、鶏肉を汚染するコリスチン耐性大腸菌は多様で、国産肉用鶏の大腸菌間でプラスミド伝播を伴いながら分布していることが示唆された。また、薬剤耐性の保有状況も株間で異なっていた。アミノグリコシド耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、プラスミド性キノロン耐性遺伝子を保有する株も認められ、多剤耐性菌への伝播は抗菌剤治療の選択肢を減少させる原因になるため、継続的な監視を要する。

近年、豚熱 (豚コレラ) や鶏インフルエンザなどの家畜伝染病の防疫のため、農場採材を継続できなくなることがあり、と畜場段階で採材する方が容易な場合もある。しかし、と畜場搬入された家畜における抗菌剤の使用状況を把握することは、管轄の違いにより困難である。今後、家畜保健衛生所や食肉衛生検査所の協力の下で持続性のあるサーベイランス/モニタリングの耐性を構築する必要がある。

E. 結論

薬剤耐性菌による食品の汚染では、生産段階に分布する薬剤耐性菌がと畜場での食肉処理段階で残存することに起因する。生産段階での薬剤耐性菌の分布には、抗菌剤の使用実態が関連する。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Suzuki K, Yossapol M, Sugiyama M, Asai T. Effects of antimicrobial administration on the prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in broiler flocks. *Jpn J Infect Dis.* 72(3):179-184, 2019.
- ② 佐々木貴正・百瀬愛佳・朝倉 宏・浅井鉄夫 孵卵場におけるセフトオフル使用中止後のブロイラー鶏群由来および鶏肉由来サルモネラの薬剤耐性 鶏病研報 56(2), 47-52, 2020.
- ③ Sasaki Y, Asai T, Haruna M, Sekizuka T, Kuroda M, Yamada Y. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from pigs in Japan. *Jpn J. Vet. Res.* 68(3): 197-202, 2020.
- ④ Sasaki Y, Yamanaka M, Nara K, Tanaka S, Uema M, Asai T, Tamura Y. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from pigs at abattoirs in Tohoku region, Japan. *J Vet Med Sci.* 82(9):1400-1403, 2020.
- ⑤ Yossapol M, Suzuki K, Odoi JO, Sugiyama M, Usui M, Asai T. Persistence of extended-spectrum β -lactamase plasmids among Enterobacteriaceae in commercial broiler farms. *Microbiol Immunol.* 64(10):712-718, 2020.
- ⑥ Sasaki Y, Sakurada H, Yamanaka M, Nara K, Tanaka S, Uema M, Ishii Y, Tamura Y, Asai T.

Effectiveness of ear skin swabs for monitoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in pigs at abattoirs. *J Vet Med Sci.* 83(1):112-115, 2021.

- ⑦ 佐々木貴正・浅井鉄夫 国内養豚場の家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌浸潤状況 All about Swine 57-58:37-44, 2021.

2. 学会発表

- ① 浅井鉄夫 「畜産分野における薬剤耐性菌の実態について」、平成 30 年度岐阜県家畜衛生推進者研修会、平成 30 年 6 月 12 日、岐阜県中央家畜保健衛生所、岐阜県
- ② 浅井鉄夫 「畜産における抗菌性物質の使用と耐性菌問題」、One Health シンポジウム、2018 年 7 月 5 日、東京コンファレンスセンター・品川、エランコジャパン株式会社
- ③ 浅井鉄夫 「畜産物の微生物汚染～薬剤耐性菌を中心に～」、平成 30 年度岐阜県食品セミナー、2018 年 10 月 10 日、岐阜県産業技術センター、岐阜県
- ④ 浅井鉄夫 動物由来の薬剤耐性菌について (アルボースセミナー、2019 年 10 月 23 日 大阪・10 月 24 日 名古屋・11 月 12 日 福岡・11 月 28 日 東京、250 名、株式会社アルボース)
- ⑤ 浅井鉄夫 家畜・食肉・ヒトにおけるコリスチン耐性菌の分離状況 (第 94 回日本感染症学会総会、2020 年 8 月 21 日、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

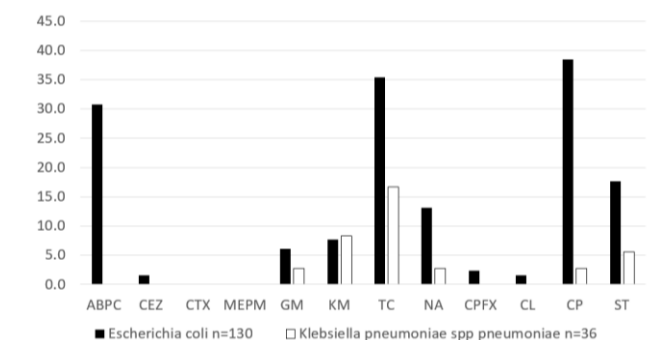
3. その他

なし

表 1 A 食肉処理施設で枝肉から分離された細菌

菌種	2018				2019			
	豚由来		牛由来		牛由来		豚由来	
	検体数	株数	検体数	株数	検体数	株数	検体数	株数
<i>Escherichia coli</i>	37	130	4	6	20	24	6	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>pneumoniae</i>	19	36	1	1	16	16	14	14
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	6	2	3	10	12	5	5
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4	6	4	10	4	4	5	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	4	11	3	3	1	1
<i>Citrobacter youngae/freundii</i>	2	2			1	1	1	1
<i>Pantoea</i> spp			2	6	2	2		
<i>Kluyvera intermedia</i>			1	1	1	1		
<i>Raoultella ornithinolytica</i>			1	1			1	1
<i>Aeromonas sobria</i>	2	4						
<i>Morganella morganii</i> spp <i>morganii</i>	1	3						
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	1	1						
<i>Citrobacter koseri</i>	1	1						
<i>Cronobacter sakazakii</i> group	1	1						
<i>Leclercia adecarboxylate</i>					5	5	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					2	2	2	2
<i>Yersinia enterocolitica/frederikse</i>					2	2		
<i>Serratia liqefaciens</i> group					1	1		
<i>Enterobacter asburiae</i>							1	1
<i>Escherichia hermannii</i>							1	1
合計	80	191	12	39	67	73	38	38

a)



b)

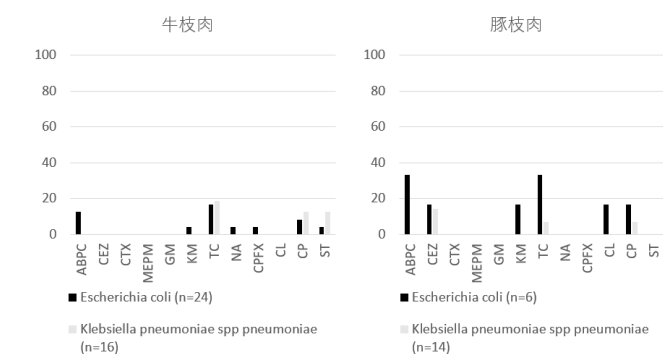


図 1 A 食肉処理施設で枝肉から分離された細菌の薬剤感受性

a)2018 年度、b) 2019 年度

a) 大腸菌



b) *Klebsiella pneumoniae*



図2 豚枝肉由来大腸菌とクレブシエラの PFGE 解析 a)大腸菌、b)*Klebsiella pneumoniae*

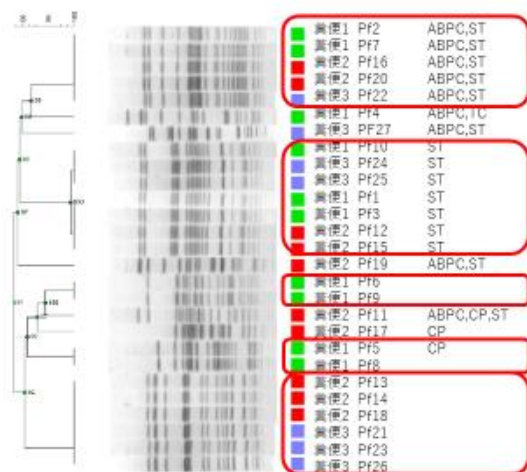


図3 1農場の同居豚から分離した大腸菌の PFGE 及び薬剤感受性

表 2 食肉加工施設で分離された細菌

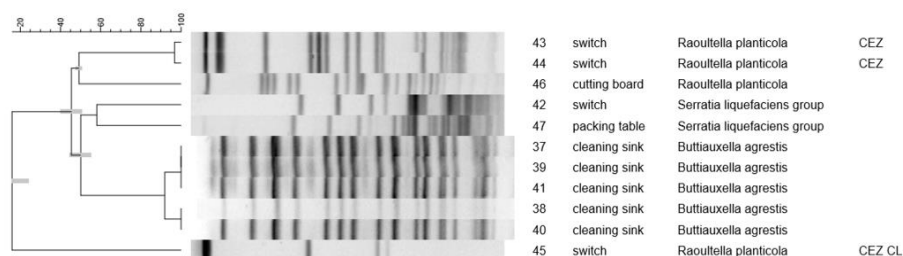
施設②

場所	菌種	株数
洗浄シンク レバー	<i>Buttiauxella agrestis</i>	5
クレーンス イッチ	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
	<i>Raoultella planticola</i>	3
まな板	<i>Raoultella planticola</i>	1
包装台	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1

施設⑤

場所	菌種	株数
コンベア	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
まな板	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
スクレイパー柄	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
クレーンスイッ チ	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
	<i>Serratia liquefaciens</i> group	1
手袋	<i>Enterobacter gergoviae</i>	4
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1

a) 施設②



b) 施設⑤

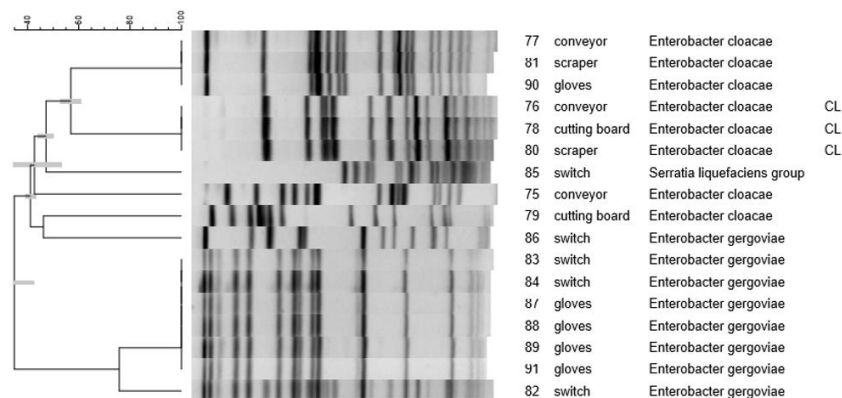


図 4 食肉加工施設で分離された細菌の PFGE 解析

表 3 食肉加工施設における洗浄消毒方法と細菌分離数

施設	床洗浄	熱湯	洗剤	次亜塩素酸	菌数 (CFU/cm ²)					
					シンク レバー	クレーン スイッチ	まな板	包装台	手袋	コン ベア
施設①	-	+	+	+	6					
施設②	高圧洗浄	+	+	+	17	4	1	1		
施設④	-	+	+	+					1	
施設⑤	ブラシ	+	-	+		20	3		11	1
										2

表 4 種鶏場におけるサルモネラ汚染実態調査の結果

企 業	投与抗菌薬	調査鶏群数 陽性／検査	分離株	耐性型
A	OTC	3/30	Manhattan Mahattan Derby	SM-TC SM-TC SM-TC-TMP
E	NFLX	2/34	Schwarzengrund Schwarzengrund	感受性 KM

略語 OTC: オキシテトラサイクリン, TC: テトラサイクリン, NFLX: ノルフロキサシン, SM: ストレプトマイシン, KM: カナマイシン, TMP: トリメトプリム

表 5 孵卵場におけるサルモネラ汚染実態調査の経過

調査地点	in ovo 使用	材料	陽性数/検査数	分離血清型 (株数)	耐性型
孵卵場	DSM	発育中止卵 (死籠り卵)	12/80	Manhattan (5) Infantis (7)	SM-TC SM-TMP

略語 DSM: ジヒドロストレプトマイシン, TC: テトラサイクリン, SM: ストレプトマイシン, TMP: トリメトプリム

表 6 肉用鶏農場におけるサルモネラ汚染実態調査の結果

企 業	投与抗菌薬 (種鶏場)	in ovo 使用 (孵卵場)	鶏群数 陽性/検査	血清型(株数)	耐性株数				
					TC	SM	KM	TMP	CTX
A	OTC	DSM	23/24	Manhattan(13) Schwarzengrund(10)	10 10	13 10	0 2	0 4	0 0
B	不使用	DSM(一部不明)	19/20	Schwarzengrund(15) Infantis(3) Untypable(1)	15 2 1	15 1 1	4 1 0	10 1 1	0 2 0
C	OTC	KM	7/8	Schwarzengrund(7)	6	6	7	6	0
D	不明	不明	5/7	Schwarzengrund(5)	5	5	4	4	0

略号 OTC: オキシテトラサイクリン, TC: テトラサイクリン, DSM: ジヒドロストレプトマイシン, SM: ストレプトマイシン, KM: カナマイシン, TMP: トリメトプリム, CTX: セフトキシム.

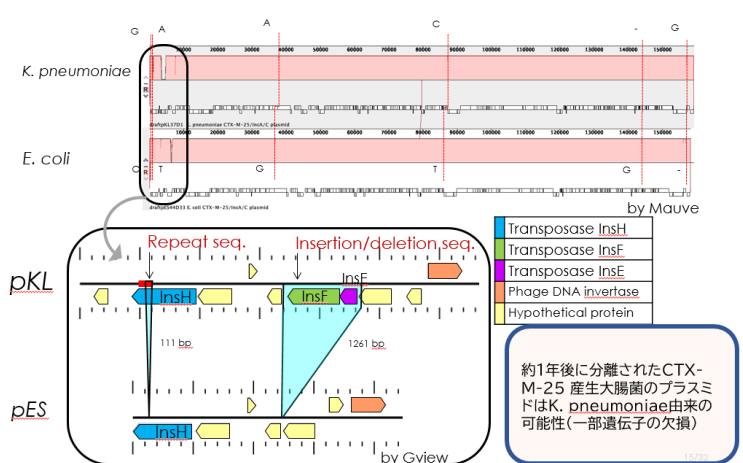
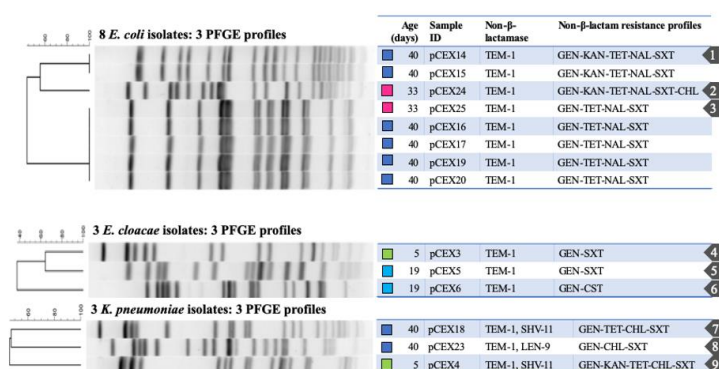
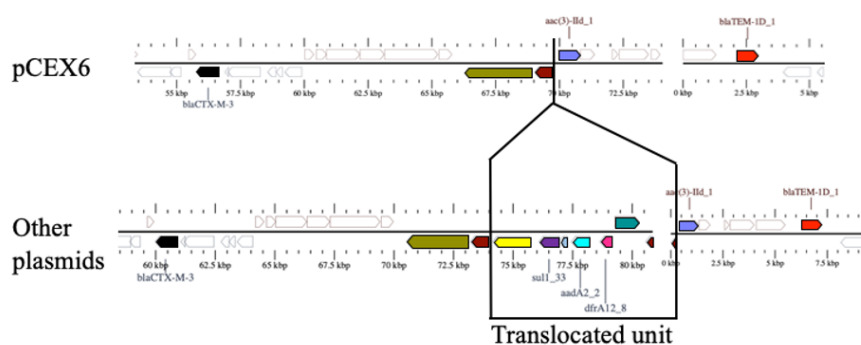


図5 初生びな由来 *K. pneumoniae* と1年後に a 農場で分離した大腸菌の CTX-M-25 プラスミドの類似性



3菌種からPFGE型に基づき菌株を選定してトランスコンジュガントを作成し、プラスミドの比較を行った。

図6 肉用鶏農場(b 農場)の1 鶏群から経時的に分離した腸内細菌科細菌の CTX-M-3 プラスミド保有株の PFGE 解析



CTX-M-3産生腸内細菌科細菌9株（大腸菌3株、*E. cloacae* 3株、*K. pneumoniae*3株）のプラスミドを比較したところ、19日齢時に分離された*E. cloacae*由来プラスミドpCEX6を除いて同一であった。

飼育期間中に遺伝子の一部が欠損する可能性を示唆

図7 肉用鶏農場(b 農場)の1 鶏群から経時的に分離した腸内細菌科細菌の CTX-M-3 プラスミドの比較

表 7 と畜場出荷豚からの MRSA の分離

調査年		農場*	頭数*	ST/spa/SCCmec	調査地域
2017	鼻腔スワブ	9/84 (11.0)	13/420 (3.1)	ST398/t034/V (8) ST398/t011/V (2) ST398/t034/IVa (3)	東北
2018	耳サンプル	13/51 (25.5)	16/102 (15.7)	ST398/t034/IVb (7) ST398/t034/V (1) ST5/t1560/V (3) ST5/t002/UT (2) ST8/t18785/IVa (2)	関東

* 陽性/検査 (%)

表 8 と殺豚 (276 頭) からの MRSA 分離状況

検査頭数	陽性頭数	内訳
276	48	
		耳介背＋鼻腔内壁＋枝肉頸部 1
		耳介背＋鼻腔内壁 14
		耳介背 25
		鼻腔内壁 8

表 9 豚耳から分離した ST398/t034 MRSA における耐性遺伝子の分布

株	県	SCCmec	czrC	耐性遺伝子型
a-1	A	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1</i> ,
a-2	A	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, fexA, str</i> ,
f-1	B	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, str</i> ,
g-1	C	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, qacG</i> ,
h-1	D	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, qacG</i> ,
j-1	A	V	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, fexA, ant(6)-Ia, dfrG, lnu(B), lsa(E), spw, tet(K)</i>
l-1	A	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>blaR1, fexA, qacG, str</i> ,
m-1	E	IVb	+	<i>mecA, blaI, blaZ, erm(C), tet(38), tet(M)</i> <i>fexA, qacG</i> ,

表 10 鶏肉から分離された *mcr* 保有コリスチン耐性大腸菌

Strain No.	Serotype	MLST	<i>mcr</i> gene	Resistance genes against						
			subtype	Amino-glycoside	β -lactam	Phenicol	Tri-methoprim	quinolone	Sulfa	Tetracycline
<u>CL-266</u>	O13/O135:H48	ST 10	<i>mcr</i> -1.1							
<u>CL-276</u>	H34	ST2614	<i>mcr</i> -1.1	<i>aadA5</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id <i>aph</i> (3'')-Ib,			<i>dfrA17</i>	<i>gyrA</i> (S83L)	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)
<u>CL-304</u>	H31	ST101	<i>mcr</i> -1.1	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>aph</i> (6)-Id <i>aph</i> (3'')-Ib,	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>catA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>gyrA</i> (S83L)	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)
<u>CL-21</u>	H27	ST1112	<i>mcr</i> -1.12	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>aph</i> (6)-Id <i>aph</i> (3'')-Ib,				<i>gyrA</i> (S83L)		<i>tet</i> (B)
<u>CL-25</u>	O91:H28	ST135	<i>mcr</i> -1.1	<i>aph</i> (6)-Id						<i>tet</i> (A)
<u>CL-480</u>	O81:H7	ST5826	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1B}		<i>dfrA1</i>	<i>gyrA</i> (S83L)	<i>sul1</i>	<i>tet</i> (A)
<u>CL-230</u>	H52	novel	<i>mcr</i> -1.1					<i>qnrS13</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (A)
<u>CL-184</u>	O91:H28	ST1196	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1B}			<i>gyrA</i> (S83L, D87N)		<i>tet</i> (A)
<u>CL-859</u>	H5	ST206	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1}					
<u>CL-933</u>	H5	ST206	<i>mcr</i> -1.1		<i>bla</i> _{TEM-1}					

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 30～平成 32 年度（令和 2 年度） 分担（総合）研究報告書

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究（H31-食品-一般-006）
分担課題 食品等から分離される腸内細菌の薬剤耐性調査と遺伝学的伝播様式の解析

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・教授）
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・准教授）

研究要旨

この研究では、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 産生菌、AmpC 産生菌、伝達性コリスチン耐性菌）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、リネゾリド（LZD）耐性腸球菌について国内で流通する食肉（鶏肉）検体を調査し、検出・分離された耐性菌の解析を行った。毎年 2 月～3 月に食肉を収集し、平成 30 年度は 186 検体（国産 100、輸入 86）、平成 31 年度（令和元年度）は 176 検体（国産 100、輸入 76）、平成 32 年度（令和 2 年度）は 203 検体（国産 71、輸入 132）検体、3 年間で合計 575 検体（国産 350、輸入 225）について各種耐性菌の定性的検出法による調査研究を行った。鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は年度や生産地によって異なるものの、いずれかの菌が検出される頻度は低いもので 11%から高いもので 61%であった。特に国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、やや高い傾向にあった。耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉と輸入肉のいずれも CTX-M 型が多く、一部の株では TEM 型遺伝子も同時に保持していた。2018 年収集の国内産鶏肉からは CTX-M 型と同様に SHV 型が多く検出された。輸入肉から染色体性 *fonA*（ESBL 遺伝子）を保有する *Serratia fonticola* が ESBL 産生菌として本調査で初めて検出された。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M1（M15/M55）と CTX-M2（M97）が最も多く検出された。輸入肉から CTX-M8（M25）型が毎年分離された。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された。これら食肉由来多剤耐性腸内細菌科細菌の多くは大腸菌であった。これら分離株の多くが薬剤耐性伝達能を示したことから、耐性遺伝子は主に伝達性プラスミド上に存在することが示された。プラスミドレプリコン型は多様であった。2019 年収集のタイ産鶏肉 1 検体から伝達性 *mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌が検出された。また 2018 年に収集したブラジル産鶏肉 1 検体から VanA 型高度耐性 VRE (*E. faecium*) 株が、また国産（宮崎）鶏肉 4 検体から VanN 型 VRE (*E. faecium*) 株がそれぞれ検出された（検出率はそれぞれ 1.8%、13.3%）。LZD 低度耐性腸球菌株（主に *E. faecalis*）が鶏肉検体から検出され、特に国産（群馬）鶏肉からの検出頻度は高度であった（95～100%）。これらの多くは耐性関連遺伝子 *optrA* と *flexA* を保持する株であり、PFGE 解析と MLST 解析から、同一の起源の耐性株が国内地域に拡散している可能性が示された。

A. 研究目的

1) 臨床では多剤耐性の腸内細菌科菌（大腸菌、肺炎桿菌など）が急激に増加している。特に抗菌薬として最も多く使用されている β -ラクタム剤に対して高度耐性を示す ESBL 産生菌、および AmpC 産生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) 多剤耐性グラム陰性菌に対し効果のある抗菌薬としてコリスチンがヒト臨床で注目されている。 β -ラクタム薬とは異なり、コリスチンは細胞壁外膜を標的としており、交叉耐性を示さない。近年、国外の家畜環境から伝達性プラスミドのコリスチン耐性遺伝子 *mcr* を保有する腸内細菌科細菌が報

告され、ヒトへの伝播拡散が報告された。本調査では、食肉検体からのコリスチン耐性腸内細菌科細菌 (*mcr-1*~*mcr-8* 遺伝子) の検出も行なった。

3) 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、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。

4) 近年、VRE などに対するオキサゾリジノン系新規抗菌薬 (タンパク合成阻害作用) としてリネゾリド (LZD) が臨床で使用されている。これまでにリネゾリド耐性に関する複数の耐性遺伝子および耐性機構が知られている。獲得耐性として複数のプラスミド性 (伝達性) の耐性遺伝子とその関連遺伝子 (*cfr*, *optrA*, *poxA*, *fexA*, *fexB*) が報告されており、リネゾリドの使用に伴う選択圧増加による耐性菌の増加、耐性遺伝子の伝播と拡散が危惧されている。そのため本調査2年目の平成31年からはリネゾリド (LZD) に耐性を示す腸球菌株についての調査研究も行った。

B. 研究方法

食肉検体 (表1) :

国内産食肉は国内3ヶ所の食肉検査所からそれぞれ鶏肉30あるいは40検体を収集した。輸入 (国外産) 食肉は各年度に検査所で取り扱う輸入鶏肉、輸入量にあわせを収集した。各施設から送付された検体は速やかに凍結保存とし、順次融解の後、解析を行った。検体採取時期は年度内の2月から3月にかけて行い、検体の解析自体は収集年に (4月以降の次年度も含め) 行った。そのため、実際の検体収集と耐性株の分離解析年と (調査報告) 年度が異なっている。

検出方法 :

1) ESBL 産生菌および AmpC 産生菌 (腸内細菌科菌) の検出

国内の食肉衛生検査所で採集された肉の拭き取り材料を用いた。輸入肉はミンチ肉を用いた。それぞれ ABPC 添加 (40 mg/L) LB 液体培地で一夜培養し、0.1 ml を二種類の薬剤添加 DHL 寒天培地 (CAZ を 1 mg/L または CTX を 1 mg/L 含む) に塗布した。それぞれの平板上の発育コロニーを2個ずつ釣菌し、純培養後チトクロム・オキシダーゼ試験陰性菌のみを選択した。CTX、CAZ に対する MIC 値 2 mg/L 以上の株についてさらに2薬剤阻害実験を行った。ESBL 産生確認のためにクラブラン酸を、AmpC 産生確認のためにボロン酸を用い、阻害剤存在下で寒天平板希釈法により MIC 値が 1/8 以下に低下する事 (3 管以上の差) が確認された株をそれぞれの産生株として以下の実験に用いた。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。

上記の方法で分離された耐性株について耐性の接合伝達実験を行なった。受容菌として大腸菌実験株 C600 (アザイド耐性) および CSH55rif (リファンピシン耐性) を用い、膜フィルターを用いた接合伝達 (37°C、8 時間培養) を行った。選択培地には CTX または CAZ をそれぞれ 1 μg/mL とアザイド 250 mg/L を含む寒天平板を用いた。接合伝達性を認めた株については、プラスミドのレプリコン型を PCR 法によって調べた。

2) コリスチン耐性大腸菌の分離

食肉検体を薬剤非添加の L 培地 (液体) を用いて前培養し、その 0.1 ml をコリスチン 1 mg/L 含有 DHL 寒天培地上に塗布し、培養した。平板上で発育した赤色コロニーを釣菌し (1 検体あたり 2 株)、純培養後に *mcr-1*~*mcr-8* 検出用プライマーを用いたコロニー PCR によって各耐性遺伝子の検出を行った。尚、今回の調査では自然耐性菌の *Proteus* 属菌は解析対象から除いた。

3) VRE の検出

培地 ; 腸球菌分離には Enterococcosel Broth (BBL)、Enterococcosel agar (BBL) および Brain Heart Infusion agar (Difco) を使用した。

用いた薬剤；バンコマイシン（VCM）、テイクプラニン（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、VCM 4 mg/L 加 Enterococcosel Broth で 48 時間選択的増菌後、0.1 ml を VCM 4 mg/L 加 agar 選択培地に塗布し、得られたコロニーを VCM 4 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。選択用寒天平板の培養時間はすべて 37℃、48 時間培養した。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*, *vanCI*, *vanC2/3*, *vanN*, 各種 *ddl* の特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法を用いた。必要に応じて DNA シークエンス解析（Big Dye primer 法）、PFGE 解析、MLST 解析を行った。

4) リネゾリド（LZD）耐性腸球菌の検出培地；腸球菌分離には Enterococcosel Broth（BBL）、Enterococcosel agar（BBL）および Brain Heart Infusion agar（Difco）を使用した。

用いた薬剤；リネゾリド（LZD）

腸球菌の分離；LZD 耐性菌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、LZD 1.5 mg/L 加 Enterococcosel Broth で 48 時間選択的増菌後、0.1 ml を LZD 1.5 mg/L 加 Enterococcosel agar 選択培地に塗布し、得られたコロニーを LZD 1.5 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。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。LZD 耐性腸球菌のプラスミド性（伝達性）耐性遺伝子の検出、および菌種の確認には *cfr*, *optrA*, *poxtA*, *fexA*, *fexB*, 各種 *ddl* の特異的プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法を用いた。必要に応じて DNA シークエンス解析（Big Dye primer 法）、PFGE 解析、MLST 解析を行った。

（倫理面への配慮）

全ての臨床分離株は患者個人を同定でき

る情報を含まない検体として収集し、本研究に用いた。

C. 研究結果

1) ESBL 産生菌および AmpC 産生菌

調査・検出のために収集した鶏肉検体として、平成 30 年度は 186 検体（国産 100、輸入 86）、平成 31 年度は 176 検体（国産 100、輸入 76）、平成 32 年度（令和 2 年度）は 203 検体（国産 71、輸入 132）検体、3 年間で合計 565 検体（国産 271、輸入 294）を調査した（表 1）。尚、2019 年度は宮崎の依頼施設の都合によって検体収集の協力が得られなかった（2020 年 2 月収集予定分）。

鶏肉検体からの ESBL 産生菌および AmpC 産生菌の分離頻度は図 1-1、図 1-2、図 1-3 に示されよう、年度や生産地によって異なるものの、耐性菌が検出される頻度は低いもので 11%（2019 年収集輸入鶏肉）、高いもので 65%（2020 年収集輸入鶏肉）であった。また国産鶏肉からの分離頻度が輸入鶏肉からの分離頻度と比較し、高い傾向にあった。

耐性遺伝子型の解析から ESBL 産生菌は国産肉と輸入肉のいずれも CTX-M 型が多く、一部の株では TEM 型遺伝子も同時に保持していた。（図 2-1、図 2-2、図 2-3）。2018 年収集の国内産鶏肉からは CTX-M 型と同様に SHV 型が多く検出された（図 2-1 左）。比較的希な ESBL 遺伝子の一つである染色体性 *fonA* を保有する *Serratia fonticola* が ESBL 産生菌として本調査で初めて検出され、輸入肉から 3 年間継続して検出された（図 2-1 右、図 2-2 右、図 2-3 右）。CTX-M 型遺伝子として国内産と輸入共に CTX-M1（M15/M55）と CTX-M2（M97）が最も多く検出された。輸入肉から CTX-M8（M25）型が毎年分離された（図 3-1、図 3-2、図 3-3）。AmpC 型遺伝子としては CIT が主に検出された（図 4-1、図 4-2、図 4-3）。これら食肉由来多剤耐性腸内細菌科細菌の多くは大腸菌であった（図 5-1、図 5-2、図 5-3）。上記のように少数だが比較的希な ESBL 産生菌として *Serratia fonticola* が輸入鶏肉から 3 年間、継続して検出された。2018 年はブラジル産鶏肉 3 検体と米国産鶏肉 1 検体から、2019 年はタイ産鶏肉 1

検体から、2020 年はブラジル産鶏肉 7 検体から検出された（表 5）。この菌の染色体性の ESBL 遺伝子である *fonA* の塩基配列の解析から FONA のアミノ酸配列に基づく系統樹解析からは、これらは多様性があるものの極めて近縁であることが示された（図 6）。

鶏肉由来 ESBL 産生株と AmpC 産生株（2018 年分離の 119 株、2019 年分離 65 株、2020 年分離の 93 株）について、膜フィルター上で大腸菌実験株との接合伝達実験を行なった。それぞれの年度で 4.2%、36.9%、34.4% の分離株が薬剤耐性伝達能を示したことから、耐性遺伝子の多くは伝達性プラスミド上に存在することが示唆された。得られた接合伝達株（2018 年分離の 5 株、2019 年分離の 24 株、2020 年分離の 32 株）が保持するプラスミドのレプリコン型を調べたところ、最も多かったのが IncII（45.9%）、次いで IncFIB 型（13.1%）、IncN 型（9.8%）で、それ以外にも少数ではあるが IncA/C 型、IncK 型、IncX 型のプラスミドが検出され多様であった。

2) コリスチン耐性大腸菌の検出

2018 年および 2020 年収集検体において コリスチン含有 DHL 培地（1 mg/L）に発育した（赤色コロニー形成）大腸菌について PCR を行なったところ、の解析では各 *mcr* 耐性遺伝子（*mcr-1*～*mcr-8*）陽性株は検出されなかった。またそれら耐性株（薬剤添加選択培地上に発育した MIC 値 2 mg/L 以上の大腸菌）を用いた接合伝達実験を行なったが、いずれも コリスチン耐性の伝達性も認めなかった。一方、2019 年収集検体から *mcr-1* 遺伝子陽性株（コリスチン MIC: 16 mg/L）がタイ産鶏肉 1 検体から検出された（表 6）。MLST 解析では ST1246 に分類され、既知のクローナル・コンプレックス（クラスター形成）には属さない株であった。接合伝達実験を行なったところ、液体培地中でも高頻度での コリスチン耐性の伝達性を認めた（供与菌当たり 3×10^{-4} ）。この耐性プラスミドの *Inc* は non-typeable であり（以前のブラジル産由来 *mcr-1* プラスミドは incX4）、他の薬剤耐性は示さなかった。

3) VRE の検出

VRE について、2018 年は高度バンコマイシン耐性を示す VanA 型 VRE (*E. faecium*)

株がブラジル産鶏肉検体 1 検体から検出された（表 2-2）。この株をこれまでの 2012 年度（2013 年収集）から 2016 年度（2017 年収集）までの本調査において、ブラジル産輸入鶏肉から継続的に分離されてきた VanA 型 VRE (*E. faecium*) 7 株との比較解析を行った（図 7）。PFGE 解析の結果、全ての株は類似のパターンを示し、また MLST 解析により、これらは全て同一の新規 ST 型に分類され、互いに同一の起源を有する近縁株であることを示している。2019 年収集検体の解析では VanN 型 VRE 型 VRE (*E. faecium*) 株が国産（宮崎）鶏肉 4 検体から検出された（図 8）。今回分離された 6 株の VanN 型 VRE について我々の過去の調査研究において国内鶏肉から分離された VanN 型 VRE 株と比較解析を行った（表 7）。PFGE 解析の結果、4 検体のうち 2 検体から分離された株はこれまでの本調査において、国産鶏肉から継続的に分離されてきた VanN 型 VRE (*E. faecium*) の 2 種類の株とそれぞれ類似のパターンを示した（図 8-1）。また MLST 解析により、これらは PFGE 結果で示された類似株と同一の ST 型に分類され、互いに同一の起源を有する近縁株であることが確認された（図 8-2）。2020 年収集検体の解析ではブラジル産鶏肉 2 検体およびタイ産鶏肉 1 検体から低度耐性 VRE 株（バンコマイシンの MIC 値；4-8 mg/L）が検出された（表 4-2）。Multiplex PCR 法による耐性遺伝子型の解析では、これら VRE 株の耐性型は不明であった。

4) リネゾリド（LZD）耐性腸球菌の検出

本調査研究期間 2 年目の 2019 年と 3 年目の 2020 年には食肉検体由来 LZD 耐性腸球菌の検出と分離、およびそれらの株について既知のプラスミド性（伝達性）LZD 耐性遺伝子とその関連遺伝子（*cfr*, *optrA*, *poxA*, *fexA*, *fexB*）の有無について調査研究を行った。その結果、2019 年収集の国内産鶏肉 45 検体と国外産鶏肉 1 検体から LZD 低度耐性株（MIC: 4-8 mg/L）が検出された（表 8）。国内産の陽性検体は主に国産鶏肉からであり、特に群馬の全 40 検体から LZD 低度耐性 *E. faecalis* (*optrA*+, *fexA*+) 株が検出された。宮崎県産 4 検体から *E. faecium* (*poxA*+, *fexB*+) 株、鹿児島県産 1 検体から *E. faecalis* (*poxA*+) 株がそれぞれ検

出された。またタイ産鶏肉 1 検体から *E. faecalis* (*optrA*⁺, *fexA*⁺) 株が検出された。これまでに国内産食肉からの *poxA* 陽性腸球菌の検出の報告はなく、今回が初めてであった。PFGE 解析から、国内産鶏肉由来株では宿主型は地域毎に類似しており、同一起源の株であることが示された (図 9)。また宮崎県産検体から分離された *E. faecium* (*poxA*⁺, *fexB*⁺) の LZD 耐性の一部は伝達性を示した (図 5、表 9)。2020 年収集の国内産鶏肉 41 検体 (産地群馬 39 検体、産地鹿児島 2 検体) と輸入鶏肉 5 検体 (ブラジル 2 検体、タイ 2 検体、トルコ 2 検体) から LZD 低度耐性株 (MIC: 4–8 mg/L) が検出された (表 10)。2019 年と同様に陽性検体は主に国内産地群馬の鶏肉検体からであり、41 検体中 39 検体 (95%) から LZD 低度耐性 *E. faecalis* (*optrA*⁺, *fexA*⁺) 株が検出された。産地鹿児島からの 2 検体からも *E. faecalis* 株が検出されたが、耐性遺伝子は不明であった。またブラジル産、タイ産、およびトルコ産鶏肉検体から耐性株が検出され、タイ産 1 検体からの株を除き、全て *E. faecalis* (*optrA*⁺, *fexA*⁺) であった。図 10 に代表的な耐性株の PFGE 解析と薬剤感受性結果を示すが、産地群馬の株はパターンが同一、あるいは極めて類似していることから、起源が同一の *E. faecalis* (*optrA*⁺, *fexA*⁺) 株がこの地域に拡散している可能性が示された。

D. 考察

耐性菌の定性的検出法を用いた本調査において、国内外産いずれの食肉検体からも ESBL/AmpC 産生腸内細菌科細菌 (主に大腸菌) が比較的高頻度で検出された。特に国内産鶏肉検体からの分離頻度は輸入食肉検体からの検出率よりも高い傾向にあった。しかし、以前の分離頻度と比較して、やや低下している傾向が認められる。地域や施設による検体処理の状況及び輸送形態の違いによる影響も考えられ、ESBL/AmpC 産生菌の検出頻度について、同様の調査を継続し、動向を把握する必要がある。

今回、2019 年に伝達性 (プラスミド性) *mcr-1* を保持するコリスチン耐性大腸菌 1 株がタイ産鶏肉から分離された。近年、中国をはじめ海外の家畜環境中での、腸内細菌科細菌の伝達性コリスチン耐性遺伝子

mcr-1 の急速な拡散と蔓延、ヒトへの伝播が危惧されていることから国内流通食肉の汚染動向の調査は重要である。

VRE に関しては、過去の調査ではしばしばブラジル産鶏肉から臨床で問題となる VanA 型 VRE (*E. faecium*) が検出されていた。今期も分離頻度は低いものの、以前と同様に高度耐性の VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株が検出された (2018 年に 1.9%)。グリコペプチド系抗菌薬であるアボ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、VRE による家畜環境の汚染は激減したものの、いまだに限局した地域での汚染が持続していることが示唆される。一方で日本の鶏肉検体から、同一の宿主遺伝子型を持つ VanN 型 VRE 株が継続的に分離されており、本調査期間中の 2019 年にも国内 (宮崎) から検出された (検出頻度 13.3%)。これらの結果は、同一の起源を持つ VanN 型 VRE が低頻度ではあるものの既に国内の環境中に伝播、拡散していることを示唆している。今回、国産鶏肉から分離された VanN 型 VRE 株はいずれも VCM の MIC 値 4 mg/L と臨床的に問題となる高度耐性株ではなかったが、フランスでは患者の血流感染症の起因菌となった中等度耐性株の報告もあり、VRE の感染対策上は環境調査の対象とすべきである。

2019 年からの調査で、新たにリネゾリド耐性腸球菌の検出とその解析を行った。リネゾリド (LZD) は VRE およびバンコマイシン耐性 MRSA (VRSA) など多剤耐性グラム陽性菌に有効なオキサゾリジノン系の新規治療薬である。臨床における LZD 耐性菌の報告は少ないものの、今後 LZD の臨床での使用量増加に伴い、耐性菌の動向が注目されている。特に獲得耐性として黄色ブドウ球菌や腸球菌で報告されたプラスミド性の高度耐性遺伝子 *cfr* (23S rRNA メチル化酵素遺伝子) や低度耐性遺伝子 (*poxA*, *optrA*; リボソーム保護作用遺伝子) の伝播と拡散が危惧されている。*poxA* および *optrA* はタンパク合成阻害作用を持つ抗菌薬との交差耐性があり、またフェニコール排出遺伝子 *fexA* や *fexB* と常に隣接して存在することが報告されている。そのため動物用抗菌薬として用いられているフェニコール系抗

菌薬による家畜環境中での LZD 耐性遺伝子や LZD 耐性菌の増加、それに伴う環境からヒトへの耐性菌の伝播の可能性も考えられる。本調査では *cfr* 遺伝子陽性の高度耐性株は検出されなかったが、2019 年および 2020 年の調査で LZD 低度耐性腸球菌が国内外の鶏肉検体から分離された。輸入鶏肉からの分離頻度は低かったが、国内産群馬地域の検体から 100% (2019 年)、95% (2020 年) と極めて高い頻度で同一菌種、同一耐性パターン of LZD 耐性腸球菌株が検出された。特に LZD 耐性遺伝子 *optrA* と家畜用抗菌薬フロルフェニコール耐性遺伝子 *fexA* を共に保持する *E. faecalis* が多く分離された。この 2 年間の調査結果は国内群馬地域の養鶏環境中に同一のクローン株が拡散している、あるいはこの地域での食肉処理過程での何らかの共通する汚染等が考えられた。2019 年度収集時の群馬地域の検体採取担当者への確認では、チラー水処理の前に拭き取り検査を行ったとの回答から、検体の汚染は考えにくく、地域環境中での耐性菌の拡散が強く示唆された。今後も継続的な調査による動向把握が必要であり、また交差汚染に留意した検体収集が重要と考える。

E. 結論

国内産鶏肉及びの輸入鶏肉から ESBL 産生または AmpC 産生の多剤耐性腸内細菌科菌（主に大腸菌）が比較的高頻度で検出された。調査期間中に ESBL 産生 *Serratia fonticola* が輸入鶏肉から、また 2019 年にコリスチン耐性大腸菌が輸入食肉（ブラジル産）から検出されており、今後の動向に注意する必要がある。高度耐性 VRE については一部の地域（ブラジル産）で少数の分離のみであり、環境中の汚染状況が改善していることが示された。一方、国内産鶏肉検体から、以前の国内分離株と同一起源である VanN 型 VRE 株が分離されたことから、VanN 型 VRE 株の国内の家畜環境中に拡散し定着していることが示唆された。また LZD 耐性腸球菌が国内外の養鶏環境中、特に一部の国内地域に拡散、定着している可能性が示唆されることから、更なる調査研究が必要と考える。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, Tanimoto K, Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, Tomita H. Dissemination and genetic analysis of the stealthy *vanB* gene clusters of *Enterococcus faecium* clinical isolates in Japan. BMC Microbiology. 18:213, (2018).
- 2) Chiba N, Tanimoto K, Hisatsune J, Sugai M, Shibayama K, Watanabe H, Tomita H. Detection of *mcr-I*-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 16:249-250, (2019)
- 3) Hashimoto Y, Taniguchi M, Uesaka K, Nomura T, Hirakawa H, Tanimoto K, Tamai K, Ruan G, Zheng B, Tomita H. Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding *vanA* and *vanM* gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant enterococci isolate. Front Microbiol. 10:2568, (2019).
- 4) Hirakawa H, Suzue K, Kurabayashi K, Tomita H. The Tol-Pal system of uropathogenic *Escherichia coli* is responsible for optimal internalization into and aggregation within bladder epithelial cells, colonization of the urinary tract of mice, and bacterial motility. Front Microbiol. 10:1827, (2019).
- 5) Hirakawa H, Takita A, Kato M, Mizumoto H, Tomita H. Roles of CytR, an anti-activator of cyclic-AMP receptor protein (CRP) on flagellar expression and virulence in

- uropathogenic *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun. 521:555-561, (2020).
- 6) Hashimoto Y, Kita I, Suzuki M, Hirakawa H, Ohtaki H, Tomita H. First report of the local spread of vancomycin-resistant enterococci ascribed to the interspecies transmission of a *vanA* gene cluster-carrying linear plasmid. mSphere. 5(2): e00102-20. (2020).
- 7) Tanimoto K, Nomura T, Hashimoto Y, Hirakawa H, Watanabe H, Tomita H. Isolation of *Serratia fonticola* producing FONa, a minor extended-spectrum β -lactamase (ESBL), from imported chicken meat in Japan. Jpn J Infect Dis. 74(1):79-81, (2021).
- 1) 谷本弘一, 野村隆浩, 橋本佑輔, 平川秀忠, 富田治芳. 「輸入トリ肉から分離された FONa 産生 *Serratia fonticola*」第 93 回日本細菌学会総会 (名古屋 2020 年 2 月 20 日)
- 2) 野村隆浩, 谷本弘一, 渡邊治雄, 富田治芳. 「鶏肉より分離したリネゾリドに対して低度耐性を示す腸球菌の解析」第 93 回日本細菌学会総会 (名古屋 2020 年 2 月 19 日)
- 3) 谷本弘一, 野村隆浩, 橋本佑輔, 平川秀忠, 富田治芳. 鶏肉からの *Serratia fonticola* の分離と minor ESBL である FONa の解析. 第 49 回薬剤耐性菌研究会, (埼玉県熊谷 2020 年 11 月 13 日)

2. 学会発表

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 | なし |

表1. 調査検体数(毎年2～3月採取)

国内鶏肉(拭き取りスワブ)

	鹿児島県	宮崎県	群馬県	合計
2018年	30	30	40	100
2019年	30	30	40	100
2020年	30	0*	41	71

* 依頼先施設の都合で検体収集の協力が得られなかった

輸入鶏肉(ミンチ肉)

	ブラジル	タイ	米国	デンマーク	アルゼンチン	フィリピン	トルコ	カナダ	スペイン	ポーランド	合計
2018年	55	14	9	4	3	1	0	0	0	0	86
2019年	57	21	10	2	0	0	0	0	1	1	76
2020年	103	12	13	0	0	0	2	1	0	0	132

表2-1. 2018年収集国産鶏肉からの多剤耐性菌分離状況
(陽性検体数)

産地	検体数	腸内細菌科細菌(大腸菌、その他)				腸球菌	
		ESBL	AmpC	コリスチン 耐性	CRE	VRE	LZD耐性*
鹿児島	30	25 (83.3%)	3 (10.0%)	0	0	0	—
宮崎	30	2 (6.7%)	0	0	0	0	—
群馬	40	25 (62.5%)	20 (50.0%)	0	0	0	—
計	100	52 (52.0%)	23 (23.0%)	0	0	0	—

ESBL/AmpC; 第三世代セファロスポリン系抗菌薬分解酵素(産生の多剤耐性菌)
 CRE; カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(いわゆる治療困難となる悪夢の耐性菌)
 VRE; バンコマイシン耐性腸球菌
 LZD; リネゾリド(VREおよびMRSAの治療薬)、*研究調査対象外

表2－2. 2018年収集輸入鶏肉からの多剤耐性菌分離状況
(陽性検体数)

産地	検体数	腸内細菌科細菌(大腸菌、その他)				腸球菌	
		ESBL	AmpC	コリスチン 耐性	CRE	VRE	LZD耐性**
ブラジル	55	18 (32.7%)	3 (5.5%)	0	0	1* (1.8%)	－
タイ	14	1 (7.7%)	0	0	0	0	－
米国	9	2 (23.1%)	0	0	0	0	－
デンマーク	4	0	0	0	0	0	－
アルゼンチン	3	1 (33.3%)	0	0	0	0	－
フィリピン	1	0	0	0	0	0	－
計	86	22 (25.6%)	3 (3.5%)	0	0	1* (1.2%)	－

ESBL/AmpC; 第三世代セファロスポリン系抗菌薬分解酵素(産生の多剤耐性菌)

CRE; カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(いわゆる治療困難となる悪夢の耐性菌)

VRE; バンコマイシン耐性腸球菌、*VanA型 *E. faecium*株(MIC: >256 mg/L)

LZD; リネゾリド(VREおよびMRSAの治療薬)、**研究調査対象外

表3－1. 2019年収集国産鶏肉からの多剤耐性菌分離状況
(陽性検体数)

産地	検体数	腸内細菌科細菌(大腸菌、その他)				腸球菌	
		ESBL	AmpC	コリスチン 耐性	CRE	VRE	LZD耐性
鹿児島	30	12 (40.0%)	8 (26.7%)	0	0	0	1*** (3.3%)
宮崎	30	24 (80.0%)	3 (10.0%)	0	0	4** (13.3%)	4*** (13.3%)
群馬	40	0*	0*	0*	0*	0	40*** (100%)
計	100	36 (36.0%)	11 (11.0%)	0	0	4** (4.0%)	45*** (45.0%)

ESBL/AmpC; 第三世代セファロスポリン系抗菌薬分解酵素(産生の多剤耐性菌)

*群馬産鶏肉検体からの腸内細菌科細菌の検出(増殖)無し

CRE; カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(いわゆる治療困難となる悪夢の耐性菌)

VRE; バンコマイシン耐性腸球菌、**VanN型*E. faecium*株(MIC: 8 mg/L)

LZD; リネゾリド(VREおよびMRSAの治療薬)、***低度耐性株(MIC: 4-8 mg/L)

表3－2. 2019年収集輸入鶏肉からの多剤耐性菌分離状況
(陽性検体数)

産地	検体数	腸内細菌科細菌(大腸菌、その他)				腸球菌	
		ESBL	AmpC	コリスチン 耐性	CRE	VRE	LZD耐性
ブラジル	57	7 (12.3%)	0	0	0	0	0
タイ	21	2 (9.5%)	0	1* (4.8%)	0	0	1*** (4.8%)
米国	10	1 (10.0%)	0	0	0	0	0
スペイン	1	0	0	0	0	0	0
ポーランド	1	0	0	0	0	0	0
計	90	10 (11.1%)	0	1* (4.8%)	0	0	1*** (1.1%)

ESBL/AmpC; 第三世代セファロスポリン系抗菌薬分解酵素(産生の多剤耐性菌)

* *mcr-1*陽性 *E. coli*株 (MIC: 16 mg/L)

CRE; カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(いわゆる治療困難となる悪夢の耐性菌)

VRE; バンコマイシン耐性腸球菌、**VanA型 *E. faecium*株 (MIC: >256 mg/L)

LZD; リネゾリド(VREおよびMRSAの治療薬)、***低度耐性株 (MIC: 4-8 mg/L)

表4－1. 2020年収集国産鶏肉からの多剤耐性菌分離状況
(陽性検体数)

産地	検体数	腸内細菌科細菌(大腸菌、その他)				腸球菌	
		ESBL	AmpC	コリスチン 耐性	CRE	VRE	LZD耐性
鹿児島	30	13 (43.3%)	1 (3.3%)	0	0	0	2* (6.7%)
群馬	41	15 (36.6%)	2 (4.9%)	0	0	0	39* (95.1%)
計	71	28 (39.4%)	3 (4.2%)	0	0	0	41* (57.7%)

ESBL/AmpC; 第三世代セファロスポリン系抗菌薬分解酵素(産生の多剤耐性菌)
 CRE; カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(いわゆる治療困難となる悪夢の耐性菌)
 VRE; バンコマイシン耐性腸球菌
 LZD; リネゾリド(VREおよびMRSAの治療薬)、*低度耐性株(MIC: 4-8mg/L)

表4－2. 2020年収集輸入鶏肉からの多剤耐性菌分離状況
(陽性検体数)

産地	検体数	腸内細菌科細菌(大腸菌、その他)				腸球菌	
		ESBL	AmpC	コリスチン 耐性	CRE	VRE	LZD耐性
ブラジル	103	37 (35.9%)	15 (14.6%)	0	0	2* (1.9%)	2** (1.9%)
米国	13	0	1 (7.7%)	0	0	0	0
タイ	12	1 (8.3%)	0	0	0	1* (8.3%)	2** (16.7%)
トルコ	2	0	0	0	0	0	1** (50%)
カナダ	1	0	0	0	0	0	0
フランス	1	0	0	0	0	0	0
計	132	38 (28.8%)	16 (12.1%)	0	0	3* (2.3%)	5** (3.8%)

ESBL/AmpC; 第三世代セファロスポリン系抗菌薬分解酵素(産生の多剤耐性菌)

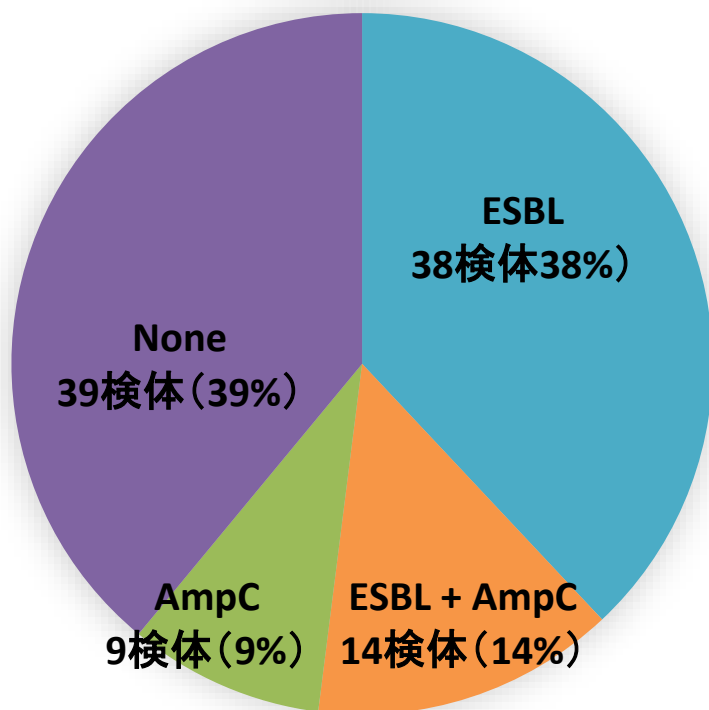
CRE; カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(いわゆる治療困難となる悪夢の耐性菌)

VRE; バンコマイシン耐性腸球菌、*低度耐性株(MIC: 4-8mg/L)

LZD; リネゾリド(VREおよびMRSAの治療薬)、**低度耐性株(MIC: 4-16mg/L) 耐性遺伝子型不明

図1-1. 2018年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

国内（100検体）



輸入（86検体）

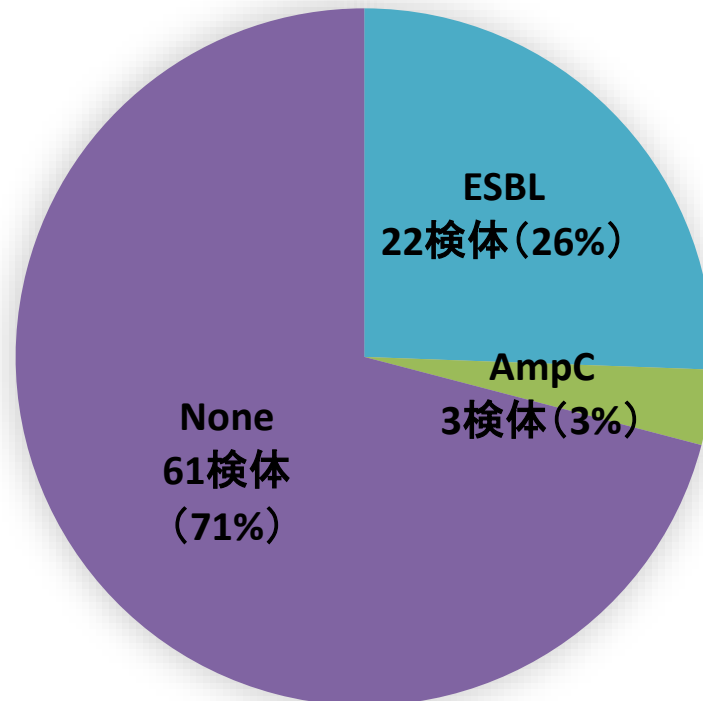
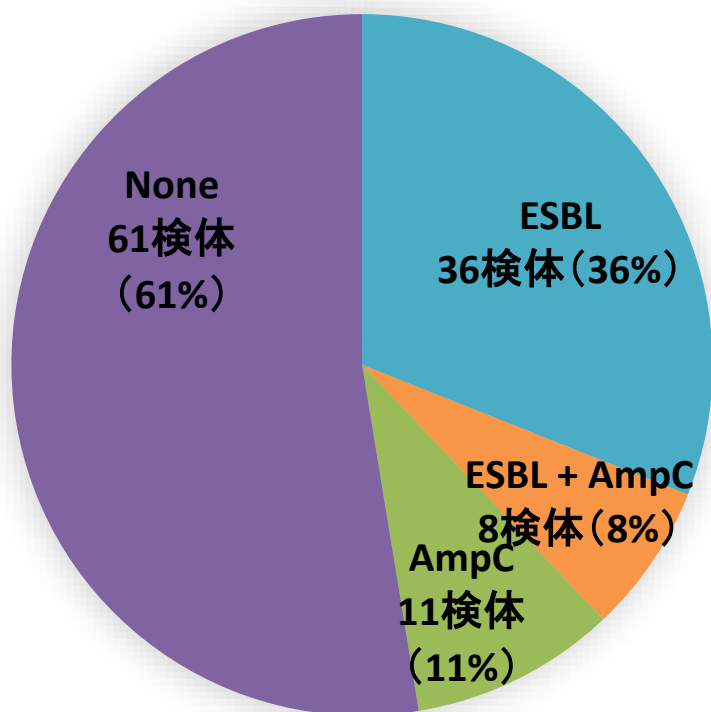


図1-2. 2019年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

国内（100検体）



輸入（90検体）

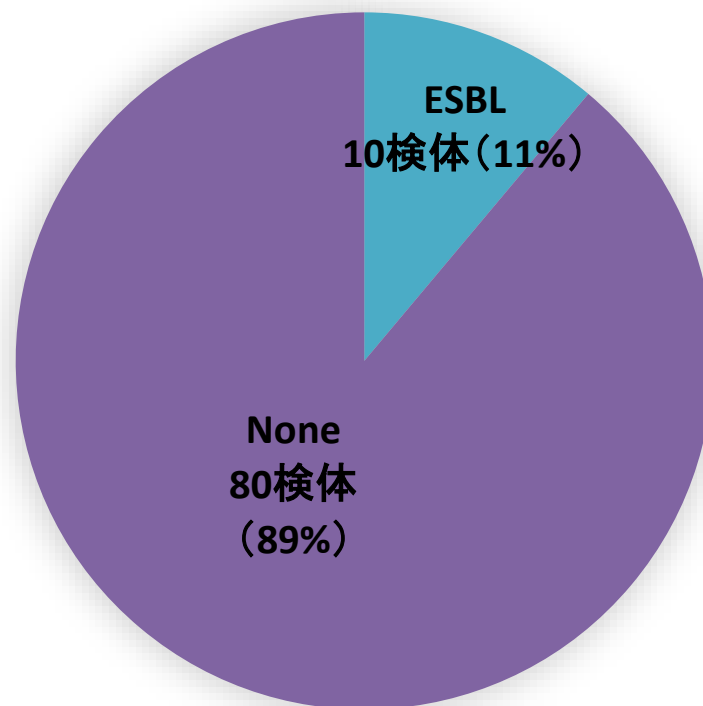
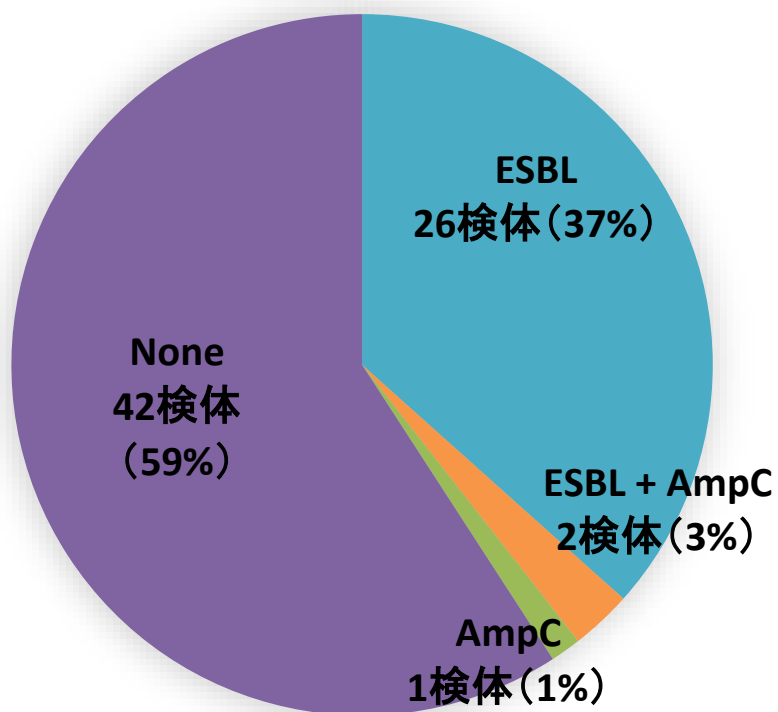


図1-3. 2020年に収集した鶏肉検体における
ESBL / AmpC産生株の分離頻度

国内（71検体）



輸入（132検体）

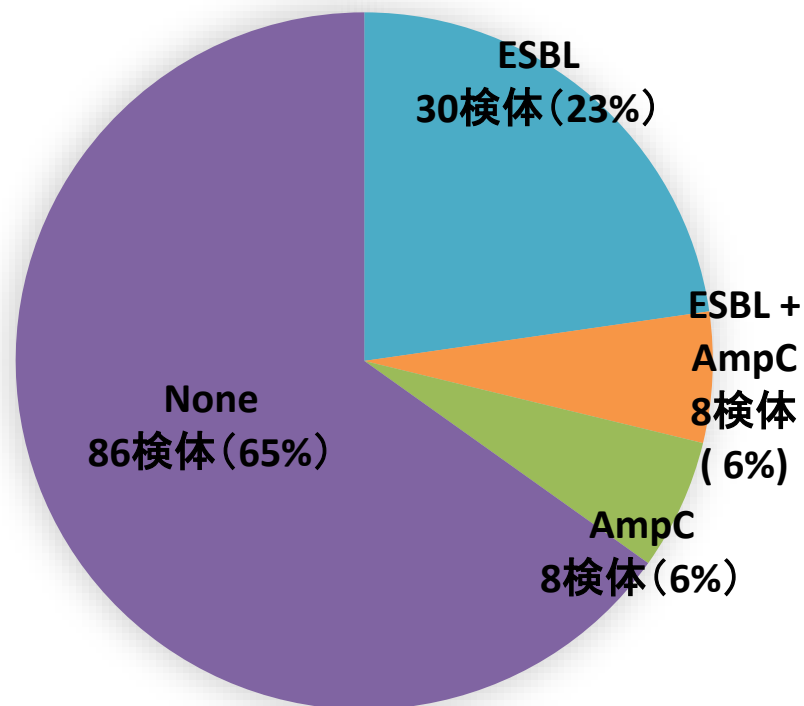


図2-1. 2018年収集検体由来ESBL産生株の耐性遺伝子型別

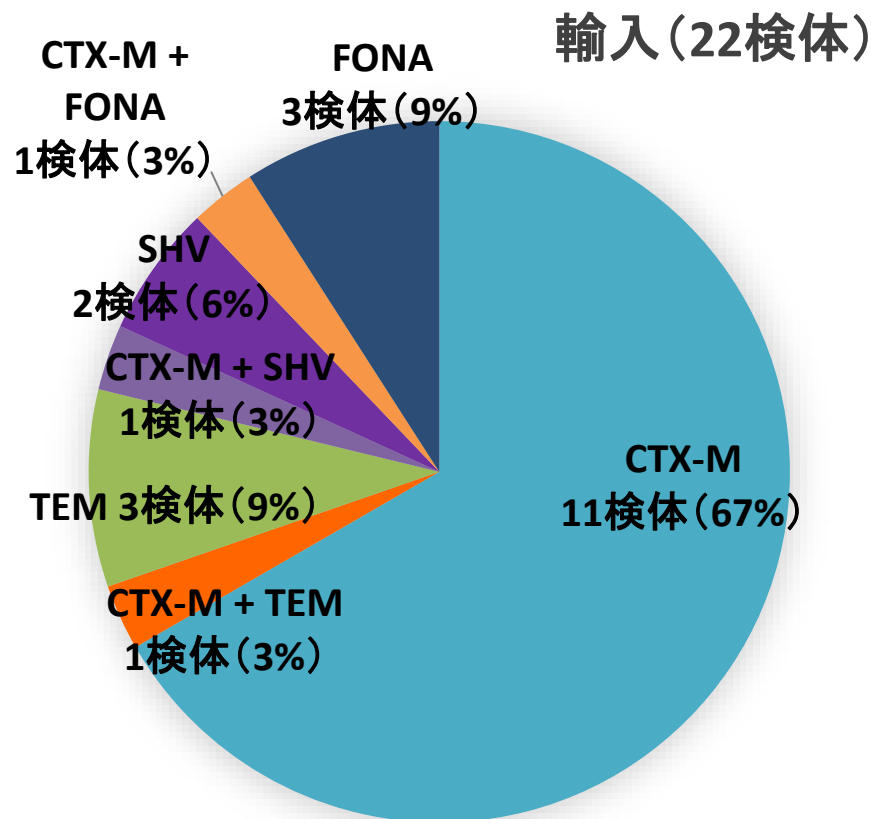
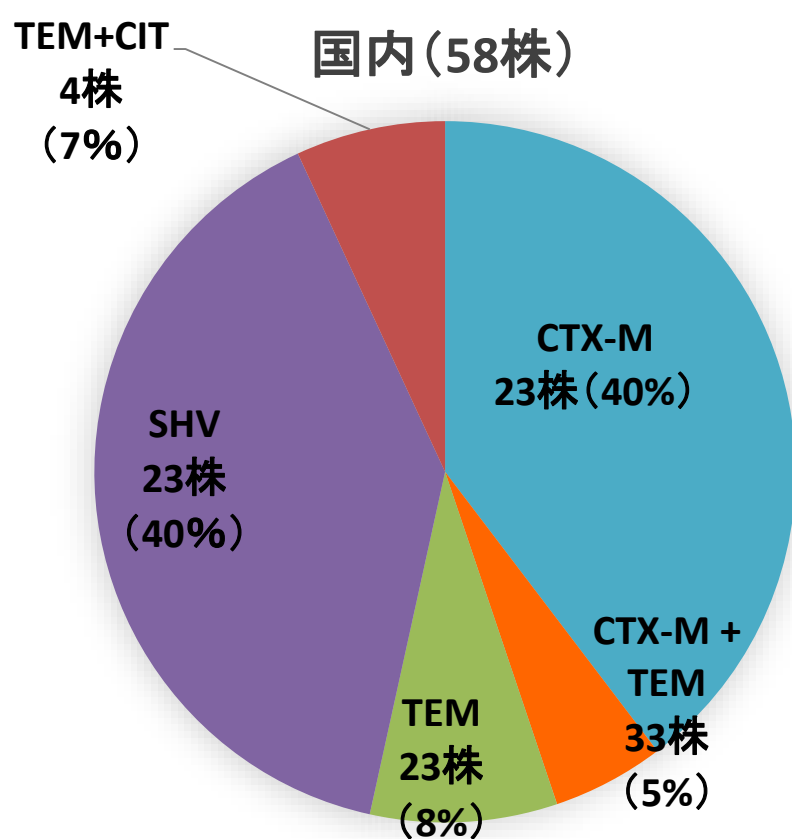


図2-2. 2019年収集検体由来ESBL産生株の
耐性遺伝子型別

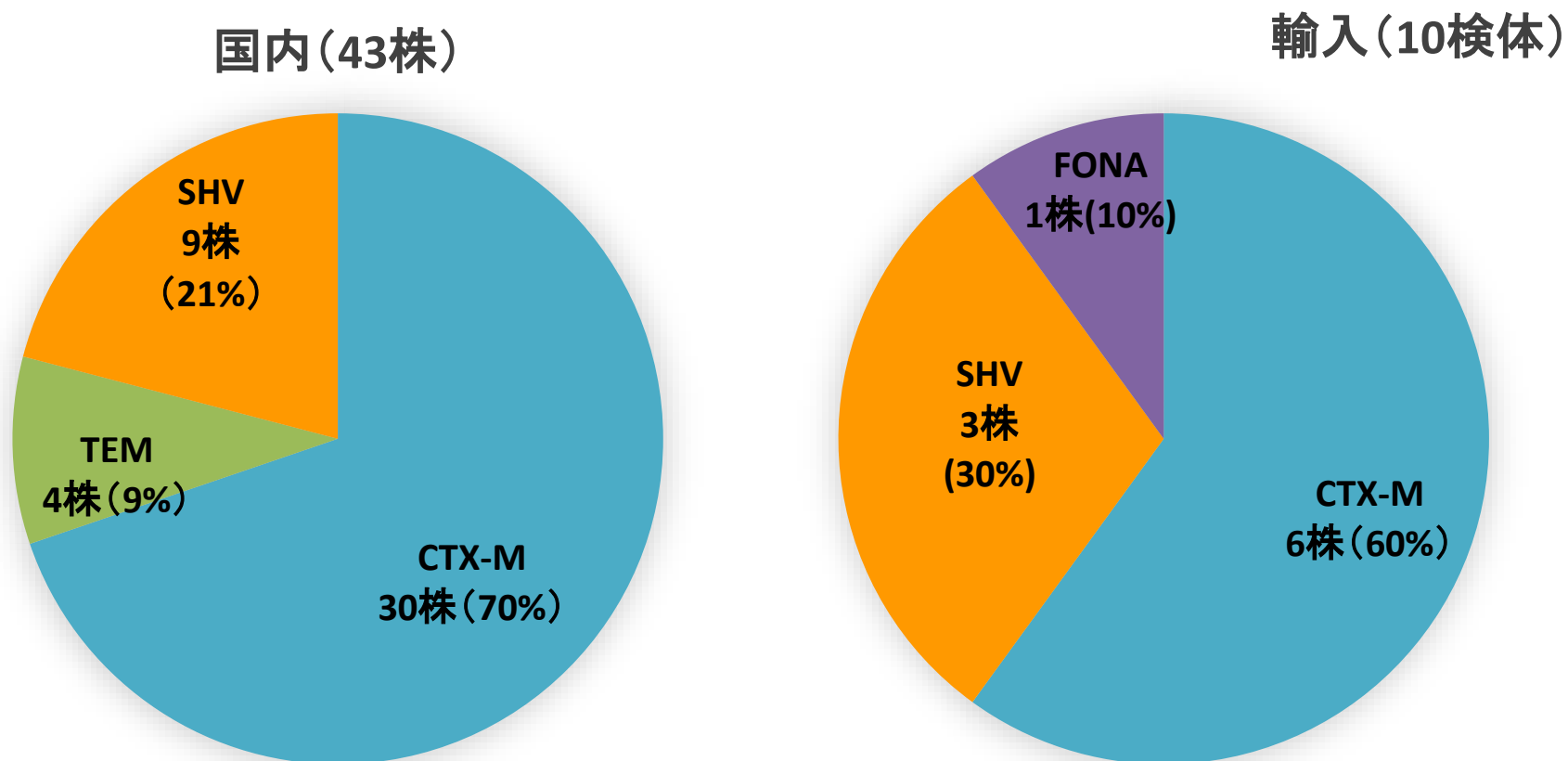


図2-3. 2020年収集検体由来ESBL産生株の
耐性遺伝子型別

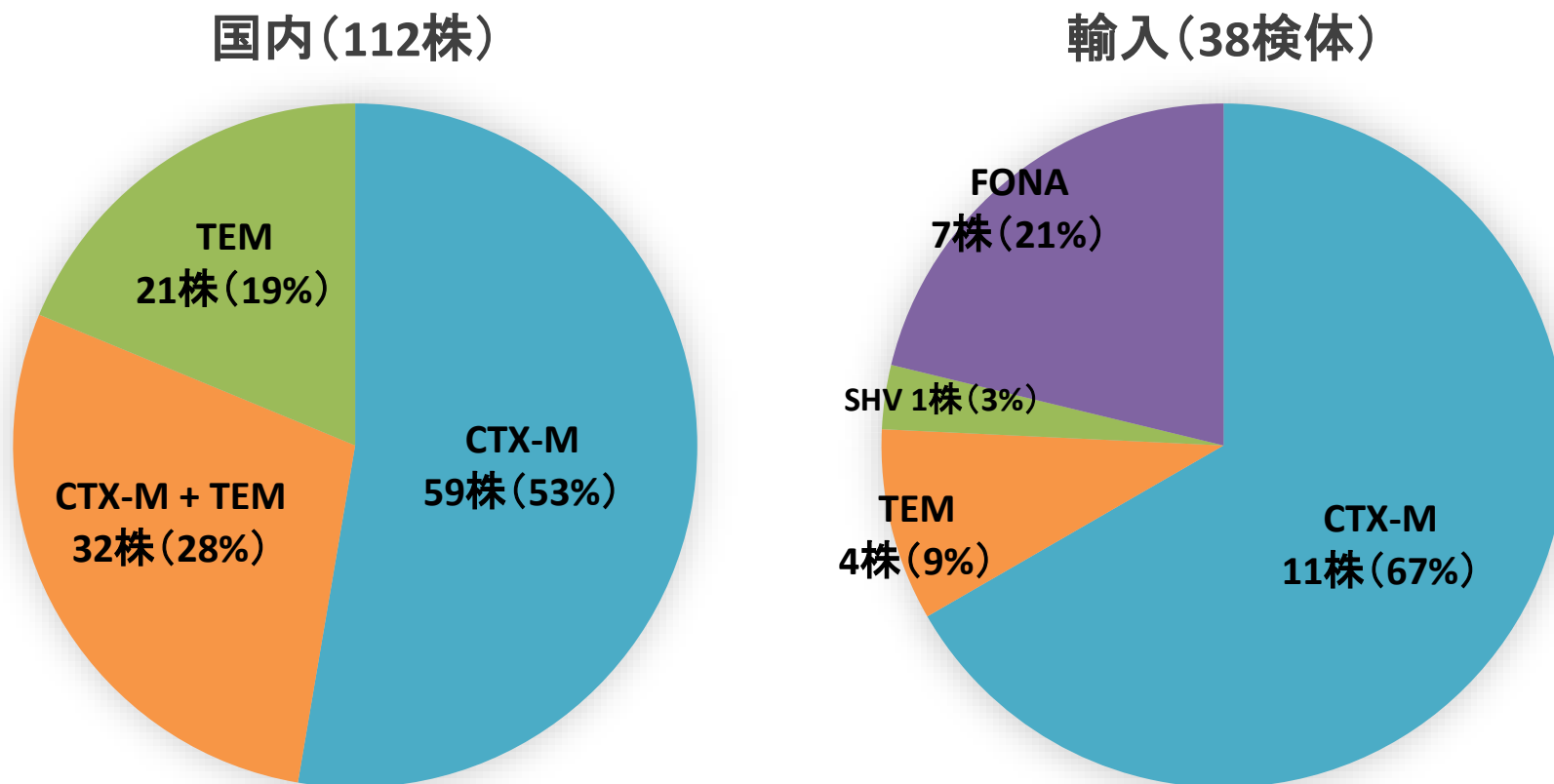


図3-1. 2018年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子型別

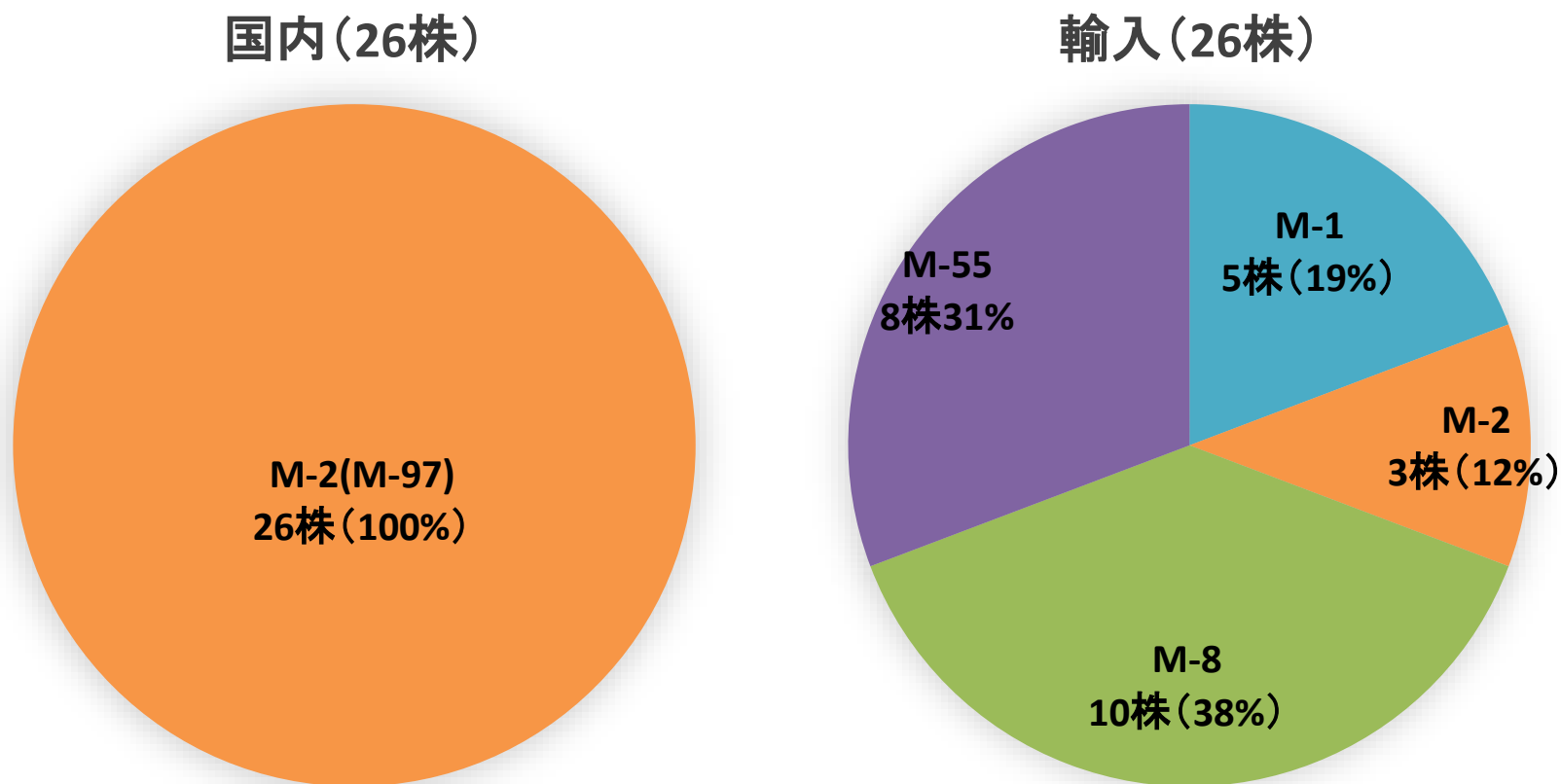


図3-2. 2019年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子型別

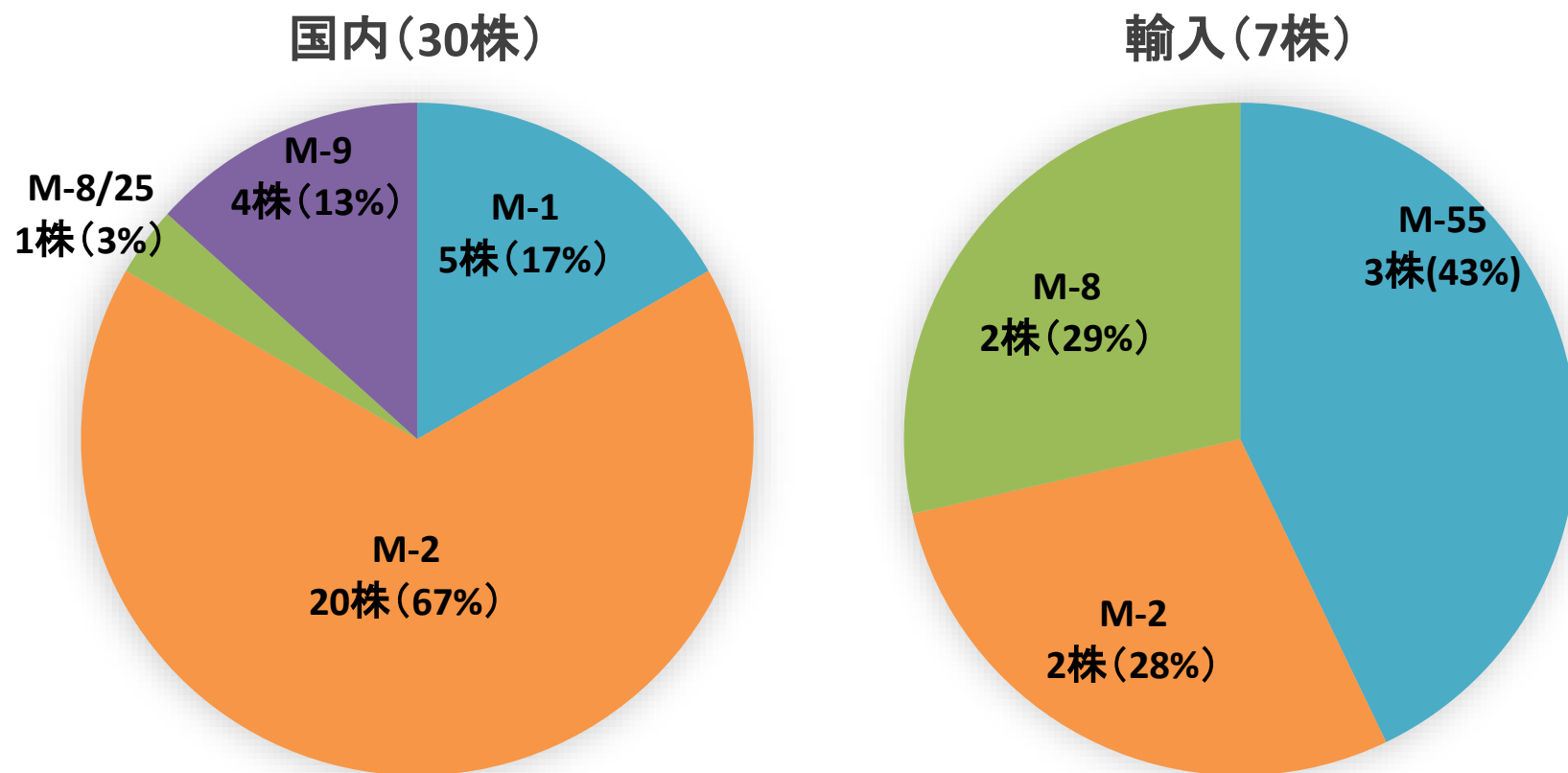


図3-3. 2020年分離のESBL産生株のCTX-M遺伝子型別

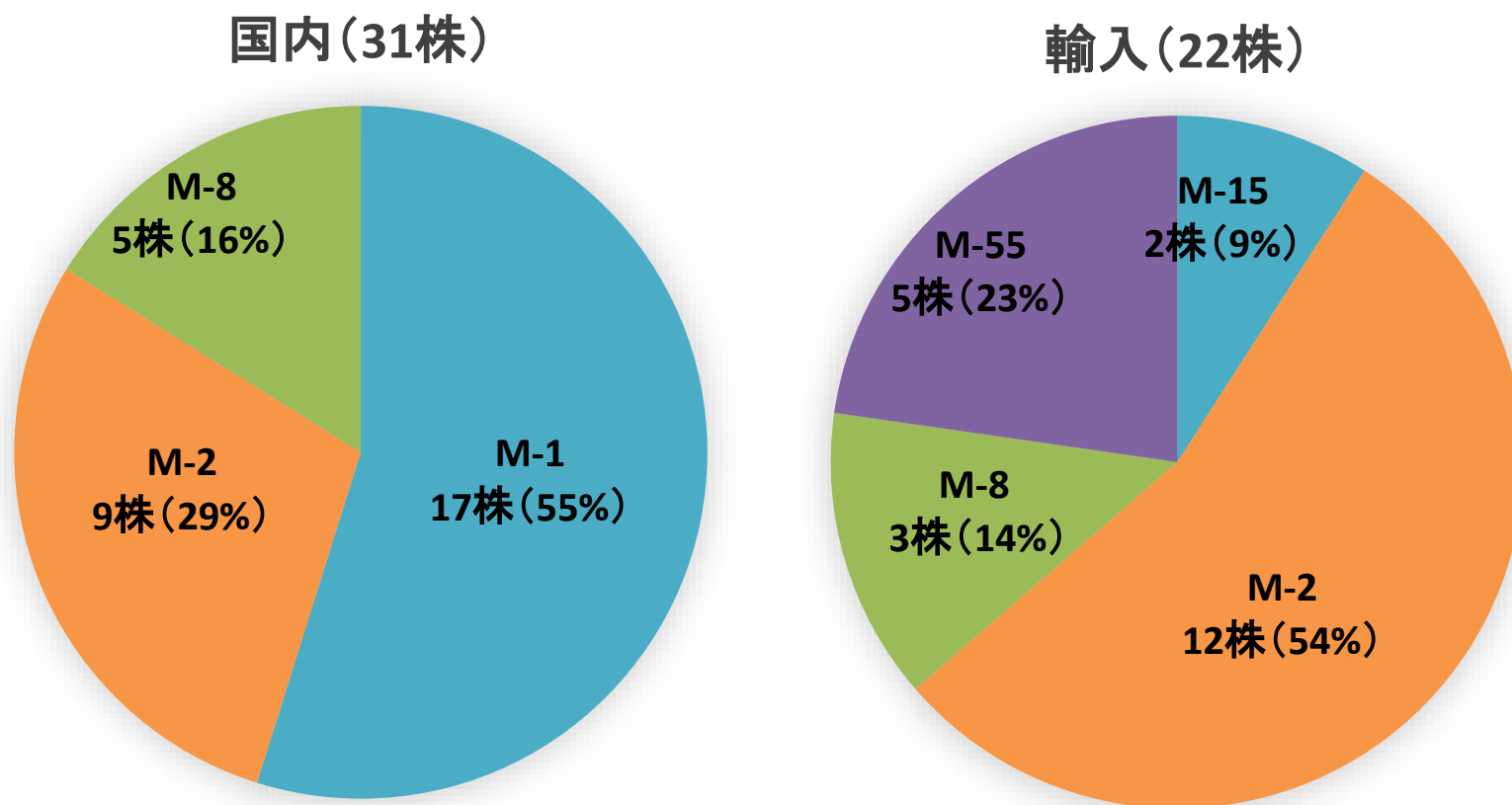


図4-1. 2018年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子型別

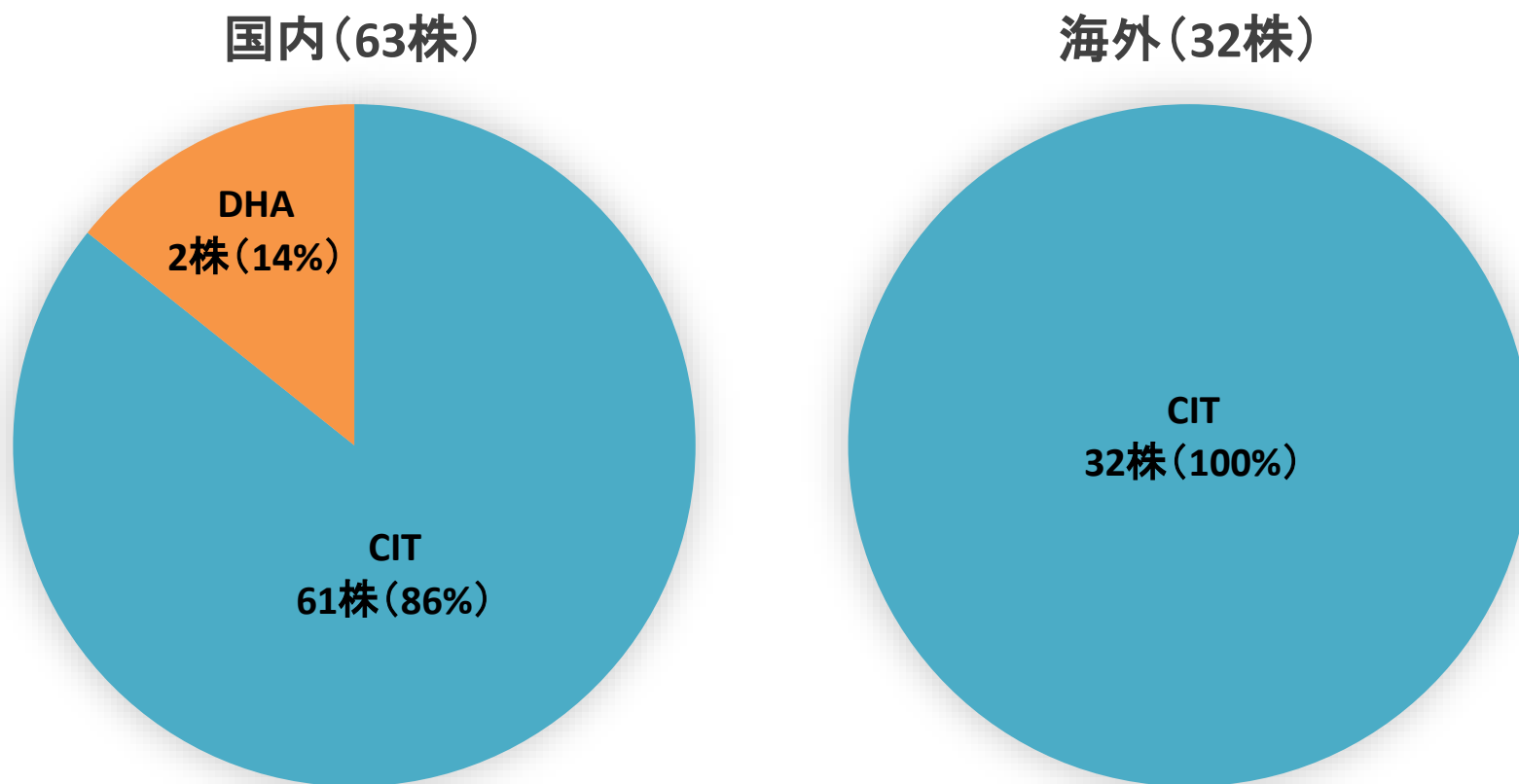
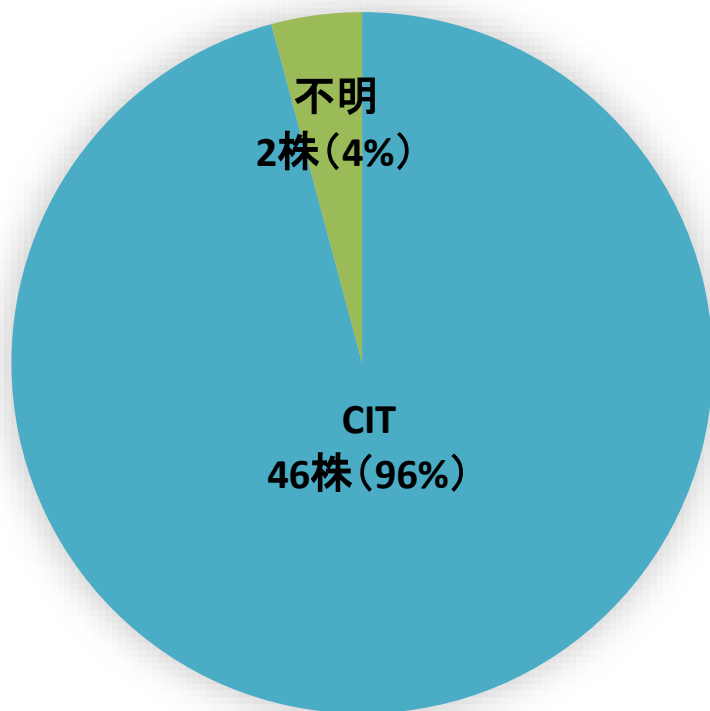


図4-2. 2019年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子型別

国内(48株)



海外(4株)

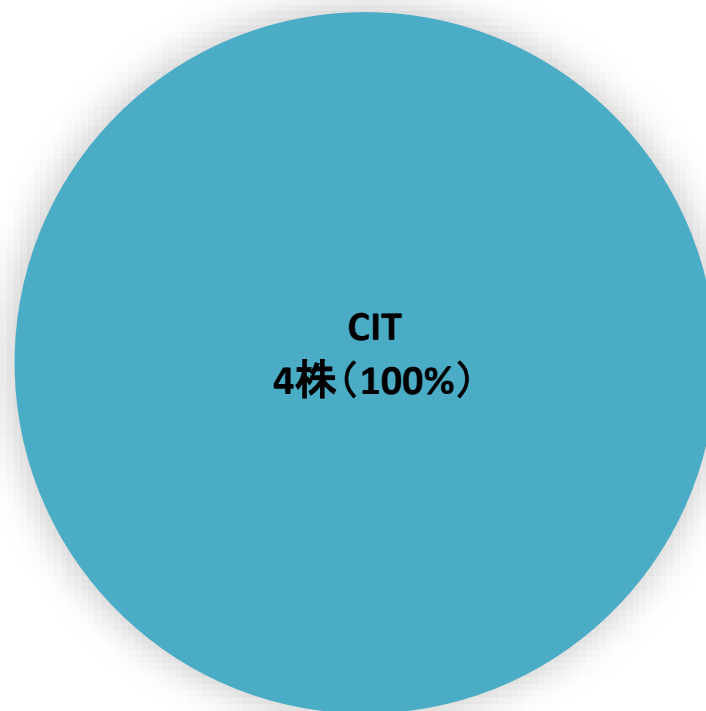


図4-3. 2020年分離のAmpC産生株の耐性遺伝子型別

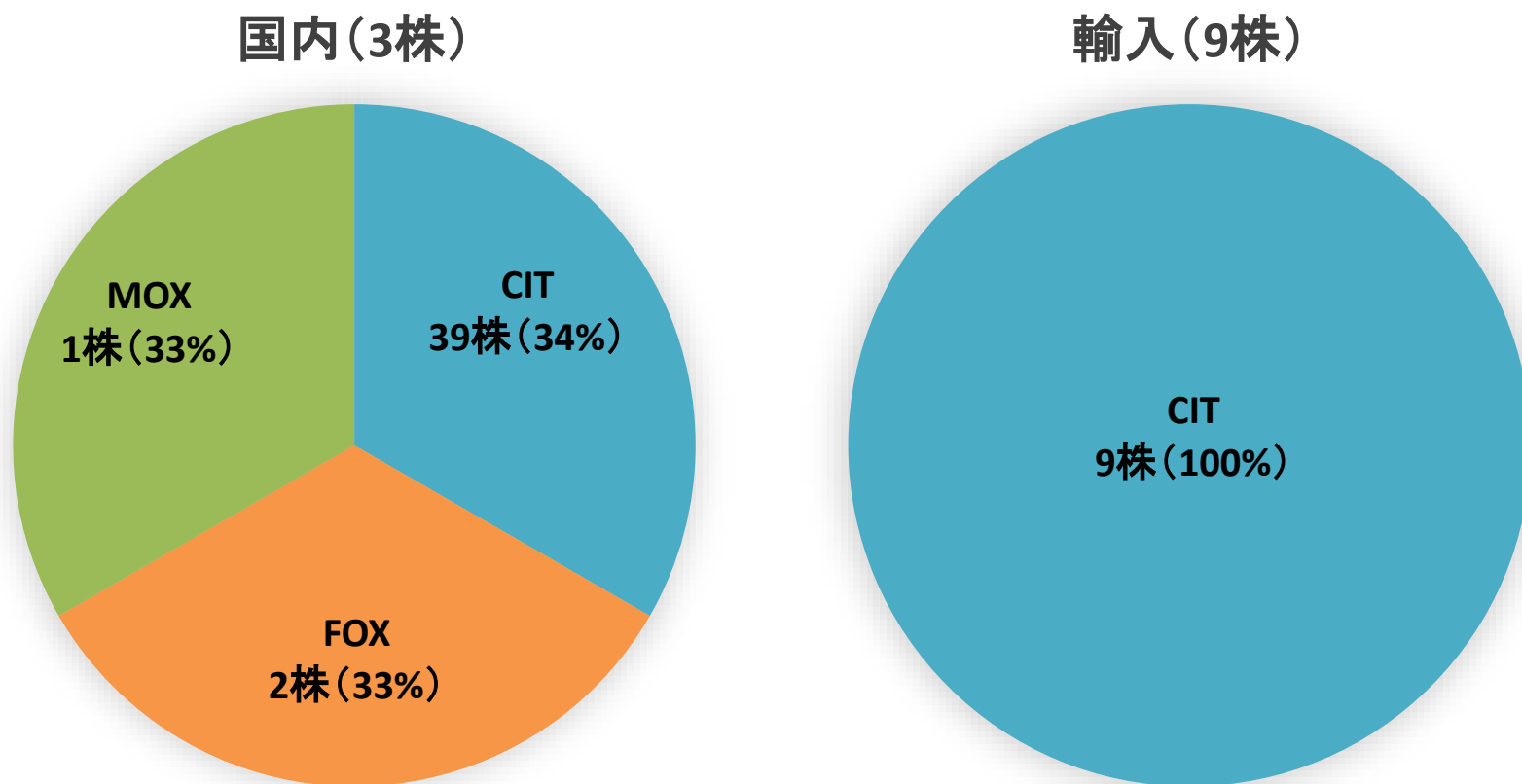


図5-1. 2018年分離鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

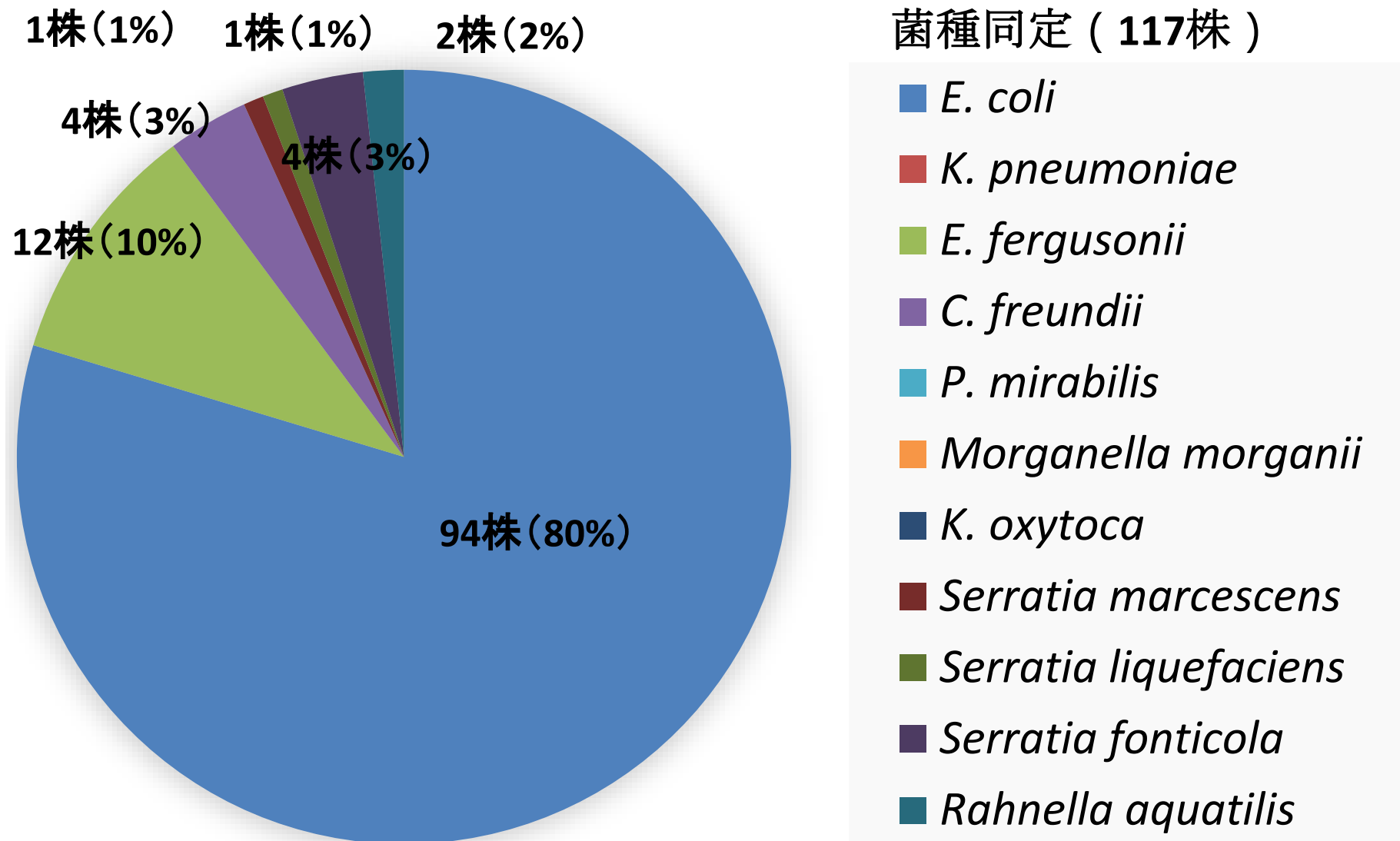


図5-2. 2019年分離鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

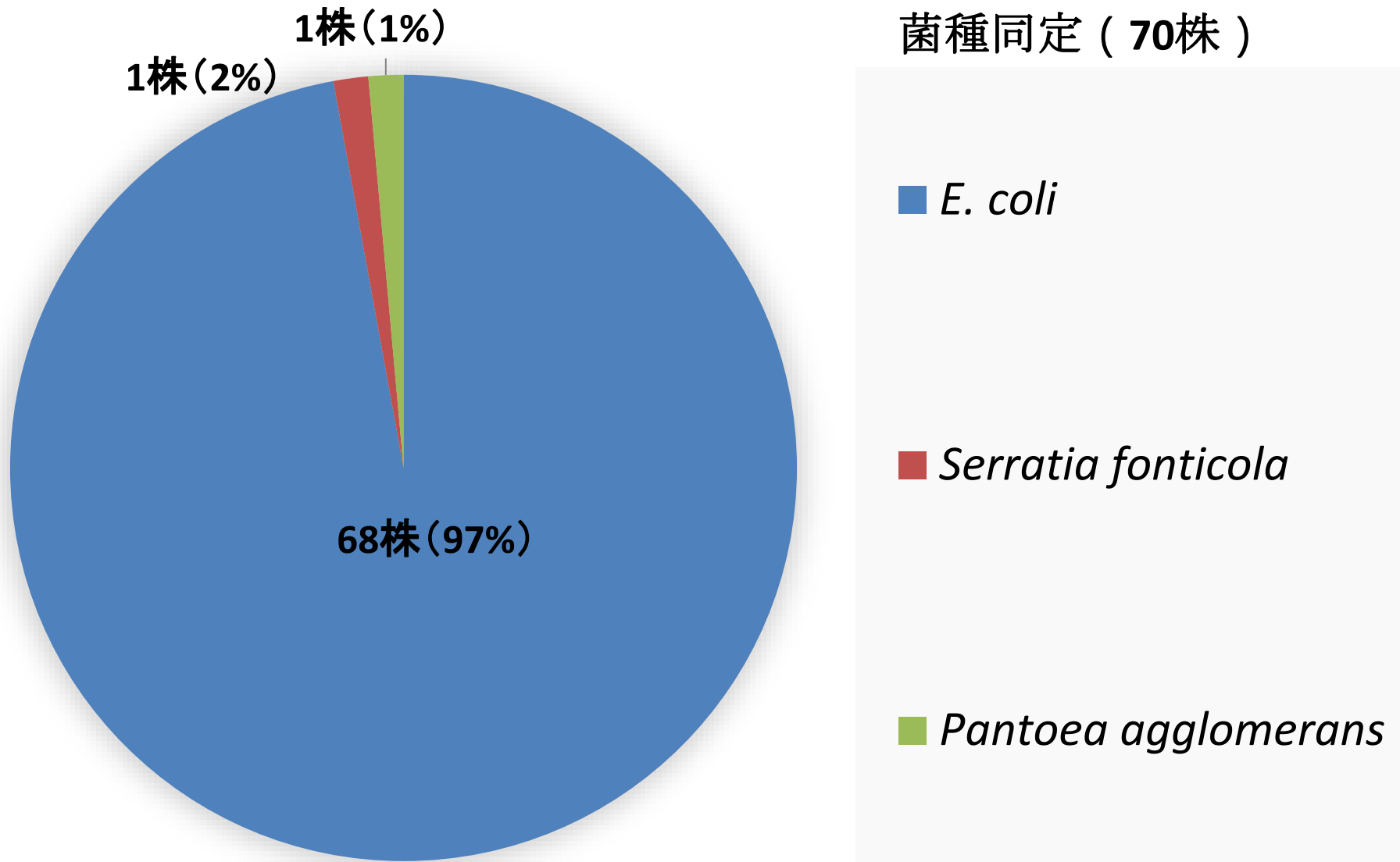


図5-3. 2020年分離鶏肉由来ESBL/AmpC産生株の菌種

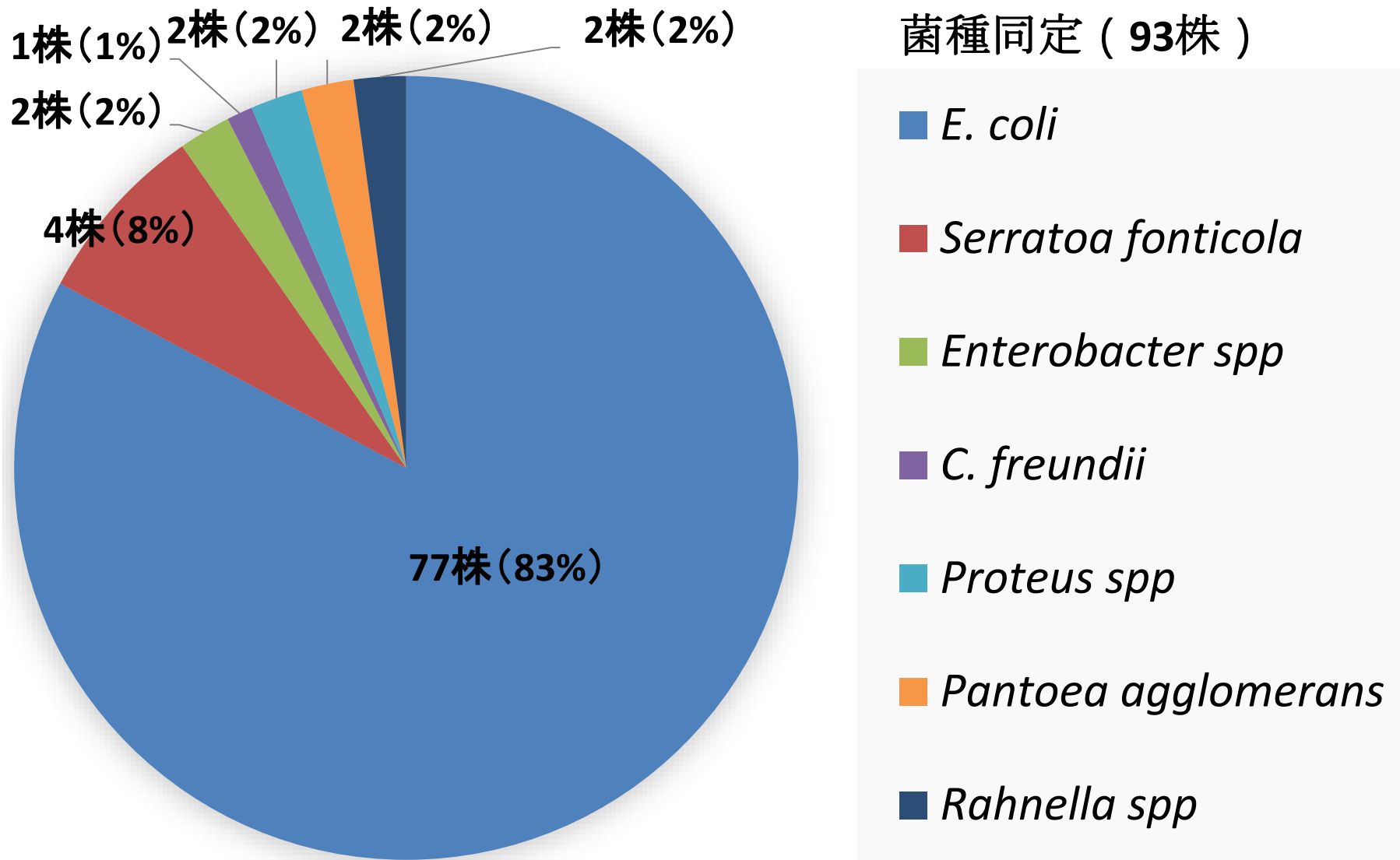


表5－1. 2018年、2019年収集鶏肉由来ESBL産生菌 *fonA*保有*S. fonticola*の薬剤感受性

β-lactam耐性以外に目立った耐性は持っていない

Strain	KT	分離年	原産国	受入 税関	ABPC	CAZ	CAZ/C VA	CTX	CTX/C VA	IPM	MEPM	GM	KM	SM	AMK	TC	CPFX
113	2480	2018	ブラジル	東京	128<	≤1	0.5	>128	0.5	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	4	≤0.25
126	2481	2018	ブラジル	那覇	128<	≤1	0.25	16	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	≤0.25	2	≤0.25
149	2482	2018	ブラジル	小樽	128<	≤1	0.25	4	≤0.25	0.5	≤0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	≤0.25	4	≤0.25
157	2483	2018	US	神戸	128<	≤1	0.5	64	1	1	≤0.25	≤0.25	0.5	2	0.5	4	≤0.25
140	2520	2019	タイ	大阪	128<	≤1	0.5	8	≤0.25	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	1	0.5	4	≤0.25

表5－2. 2020年収集鶏肉由来ESBL産生菌
*fonA*保有*S. fonticola*の薬剤感受性

KT	分離年	原産国	受入 税関	ABPC	CAZ	CAZ/C VA	CTX	CTX/C VA	IPM	MEPM	GM	KM	SM	AMK	TC	CPFX
2563	2020	ブラジル	横浜	128<	≤1	1	64	1	0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	4	≤0.25
2564	2020	ブラジル	横浜	128<	8	2	128	2	0.25	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	2	≤0.25
2566	2020	ブラジル	福岡	128<	8	4	128	4	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	4	≤0.25
2567	2020	ブラジル	東京	128<	2	0.5	4	≤0.25	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	4	≤0.25
2568	2020	ブラジル	仙台	128<	2	≤0.25	8	≤0.25	1	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	4	≤0.25
2569	2020	ブラジル	仙台	128<	2	2	128	1	1	≤0.25	≤0.25	1	1	1	4	≤0.25
2570	2020	ブラジル	福岡	128<	2	2	64	1	0.5	≤0.25	≤0.25	0.5	0.5	0.5	2	≤0.25

図6. 輸入食肉由来株ESBL-FONAの系統樹(アミノ酸配列)

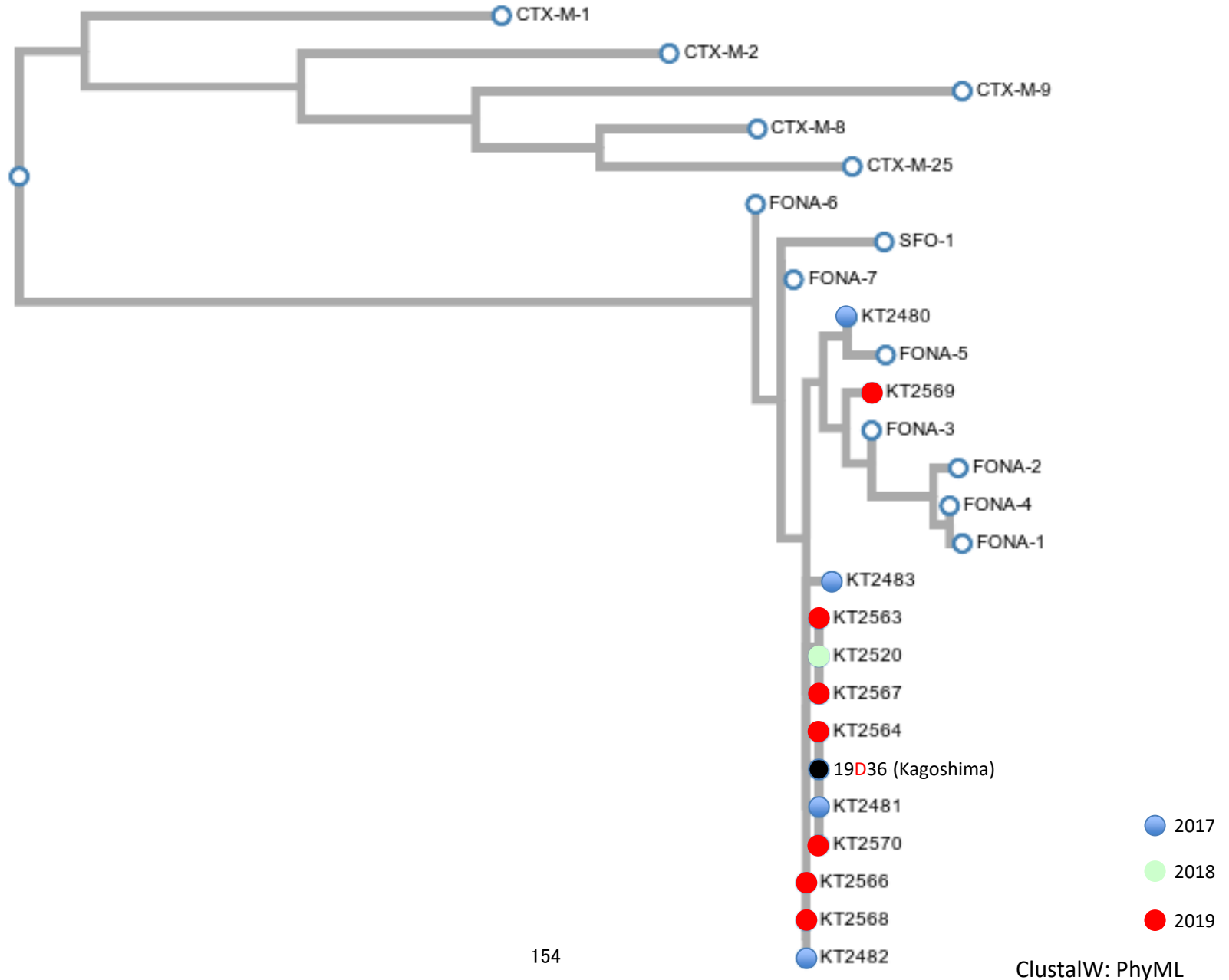
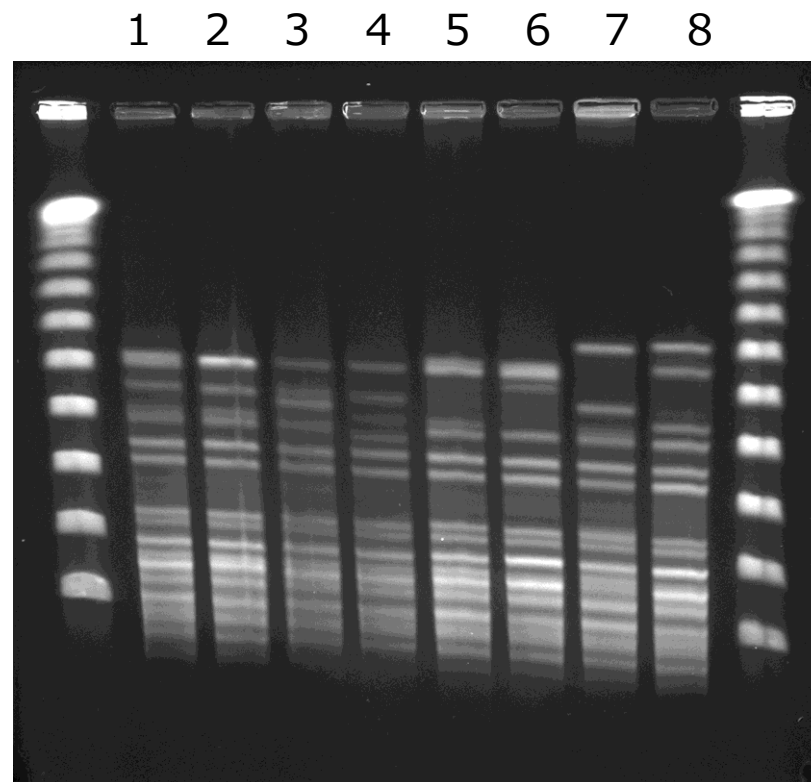


表6. 2019年収集タイ産鶏肉由来*mcr-1⁺ E. coli*株

KT#		分離年	原産国	受入税関	ABPC	IPM	MEPM
#84	2518	2019	タイ	福岡	4	≤0.25	≤0.25
#213	2519	2019	タイ	福岡	4	≤0.25	≤0.25
GM	KM	SM	AMK	TC	CPFX	COL	(mg/L)
≤0.25	2	2	1	4	≤0.25	16	
≤0.25	2	2	1	4	≤0.25	16	

図7. 2018年収集ブラジル産鶏肉由来VanA型VRE (*E. faecium*)

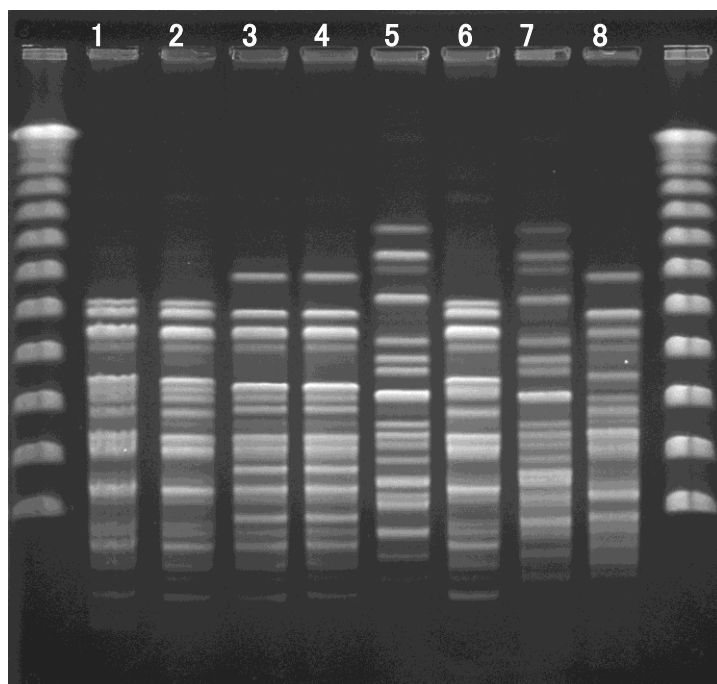


No.	分離年度 (収集年は+1年)	VRE		菌種	Glycopeptide耐性値	
		が分離された 検体番号	遺伝子型		(MIC,µg/ml) (E-TEST)	
					Vancomycin	Teicoplanin
1	2012	66167824	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	1
2	2012	31146693	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	1
3	2013	66201485	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256以上	12
4	2014	66229706	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256以上	3
5	2016	66281173	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	4
6	2016	66272347	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	4
7	2016	31247244	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256	4
8	2017	66300418	<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	256以上	3

表7. 国内(宮崎、群馬)鶏肉検体から分離された
VanN型VRE(*E. faecium*)株のMLST解析

Year	Location	Strain	Allelic profile							ST
			<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
2008	France	UCN-71	25	13	9	33	10	19	6	240
2009	宮崎	AA-22	72	13	9	33	10	19	6	852
2011	宮崎	GU121-1	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	宮崎	AA-412	9	8	14	58	6	27	6	669
2014	群馬	AA-413	9	8	14	58	6	27	6	669
2015	群馬	AA-425	9	8	14	58	6	27	6	669
2015	群馬	AA-423	9	8	14	58	6	27	6	669
2016	群馬	105.1	9	8	14	58	6	27	6	669
2017	群馬	92.1	9	8	14	58	6	27	6	669
2017	群馬	97.1	9	8	14	58	6	27	6	669
2017	群馬	101.1	9	8	14	58	6	27	6	669

図8－1. 2019年収集鶏肉由来VanN型VRE (*E. faecium*) のPFGE解析



AA-22: 2009年度宮崎県より分離

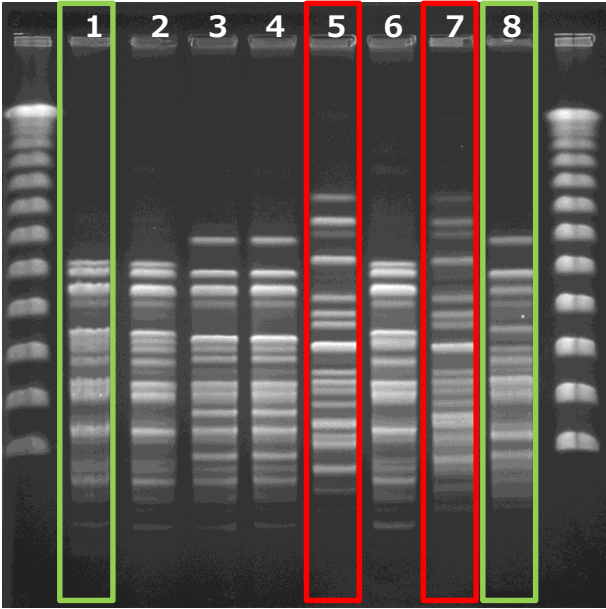
AA-80: 2011年度宮崎県より分離

*Sma*I digest

Lane No.	衛生検査所No.	採取農場及び鶏舎	検査所	県	送付年月日	処理年月日	菌種	遺伝子型	Glycopeptide耐性値 (MIC, µg/ml) (E-TEST)	
									Vancomycin	Teicoplanin
1	2.1	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
2	2.2	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	6	0.75
3	7.1	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
4	7.2	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
5	12.1	C	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	2
6	21.1	D-3	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	2
7	AA-22		宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県		2009年度分離	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	8	1.5
8	AA-80		宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県		2011年度分離	<i>E. faecium</i>	<i>vanN</i>	12	1

- ・ 12.1は2009年度に宮崎県の検体から分離された株(AA-22)と類似
- ・ 7.1と7.2は2011年度に宮崎県の検体から分離された株(AA-80)と類似

図8－2. 2019年収集鶏肉由来VanN型VRE (*E. faecium*) の MLST解析



AA-22: 2009年度宮崎県より分離
AA-80: 2011年度宮崎県より分離
UCN71: 2008年にフランスで分離され2011年に報告された株

Lane No.	strain	allelic profile							ST
		<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>	
1	2.1	9	8	14	58	6	27	6	669
5	12.1	72	13	9	33	10	19	6	862
7	AA-22	72	13	9	33	10	19	6	862
8	AA-80	9	8	14	58	6	27	6	669
	UCN 71	25	13	9	33	10	19	6	240

- ・2.1は2009年度に宮崎県の検体から分離した株 (AA-22) と同一のST669
- ・12.1は2011年度に宮崎県の検体から分離した株 (AA-80) と同一のST862

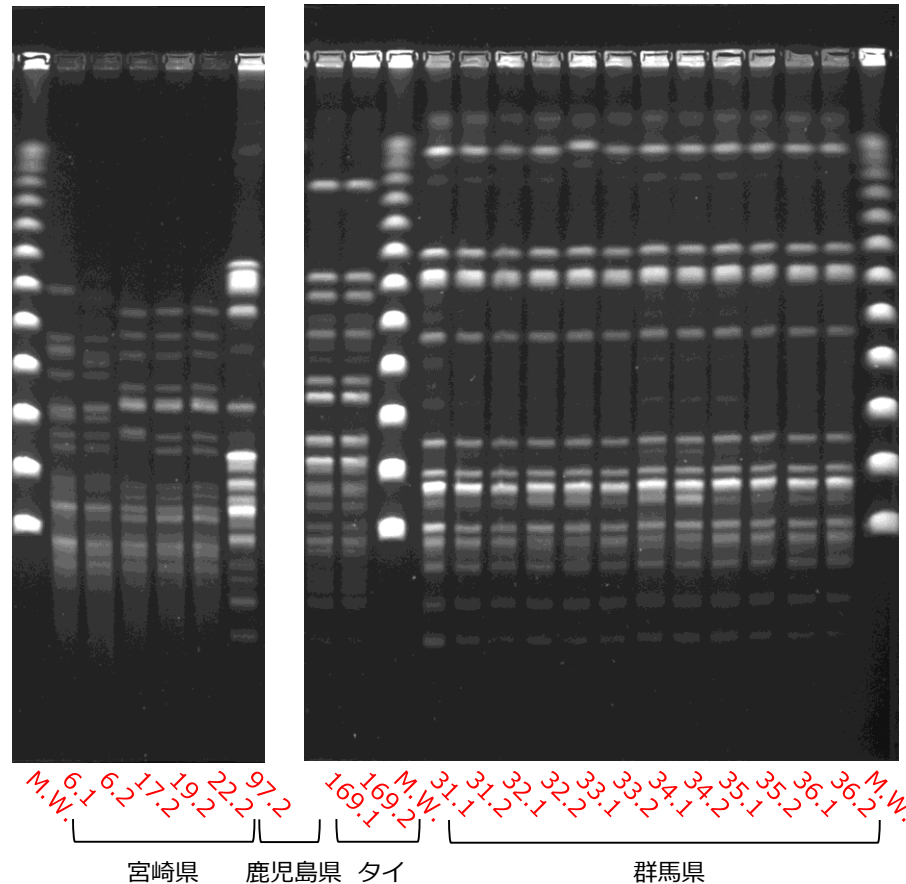
表8－1. 2019年収集鶏肉検体由来LNZ耐性腸球菌

群大No.	検体番号	検体採取鶏舎 (検体採取農場)	送付機関名	検体採取機関名 (検疫所又は検査所)	原産国名	送付年月日	処理年月日	菌種 (DDL)	poxTA	optrA	fexA	fexB
6	6	1 2	A	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
17	17	2	D-1	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
19	19	2	D-2	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
22	22	2	D-3	宮崎高崎食肉衛生検査所	宮崎県	平成31年2月13日	平成31年3月7日	<i>E. faecium</i>	+	-	-	+
97	鹿児島ー27	2	F18-4	鹿児島県鹿屋食肉衛生検査所	鹿児島県	平成31年2月26日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-
169	66348559	1	神戸検疫所輸入食品・検疫検査センター	大阪	タイ	平成31年2月19日	平成31年4月18日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
169	66348559	2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
31	1	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
32	2	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
33	3	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
34	4	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
35	5	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
36	6	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
37	7	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
38	8	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
39	9	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
40	10	1 2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
41	11	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
42	12	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
43	13	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
44	14	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
45	15	1 2	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-

表8-2. 2019年収集鶏肉由来LZD耐性腸球菌

群大No.	検体番号	検体採取鶏舎 (検体採取農場)	送付機関名	検体採取機関名 (検疫所又は検査所)	原産国名	送付年月日	処理年月日	菌種 (DDL)	<i>poxtA</i>	<i>optrA</i>	<i>fexA</i>	<i>fexB</i>
46	16	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
47	17	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
48	18	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
49	19	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
50	20	1	A-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
51	21	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
52	22	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
53	23	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
54	24	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
55	25	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
56	26	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
57	27	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
58	28	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
59	29	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
60	30	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
61	31	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
62	32	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
63	33	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
64	34	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
65	35	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
66	36	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
67	37	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
68	38	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
69	39	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
70	40	1	B-2	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	平成31年2月25日	平成31年3月7日	<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-
		2						<i>E. faecalis</i>	-	+	+	-

図9. 2019年収集鶏肉由来LZD耐性腸球菌のPFGE



- 宮崎県で検出されたLZD低度耐性株は6.1株、6.2株が違う消化パターンを示したが他の株はほぼ同一のパターンを示した
- 群馬県で検出された80株はほぼ同一のパターンを示した(写真は一部のみ)
- 国または県を跨いでの同一パターンの株は存在しなかった

表9. 2019年収集鶏肉由来LZD耐性腸球菌株のMIC値

No.	MIC (mg / L)																		
	LZD	FFC	CP	EM	LCM	TC	TGC	CPFX	FOS	ABPC	BIPM	VCM	TEIC	SM	KM	SPC	GM	RFP	FA
6.1	2	32	8	≥256	≥256	128	≤1	8	32	64	≥256	≤1	0.5	16	≥256	≥256	≤8	≤1	2
6.2	4	32	8	≤1	16	128	≤1	8	32	64	≥256	≤1	0.5	16	64	≥256	≤8	≤1	2
17.2	4	32	8	≤1	16	128	≤1	32	32	64	≥256	2	0.5	≥256	64	32	≤8	≤1	2
19.2	8	32	8	≤1	16	128	≤1	32	32	64	≥256	2	0.5	≥256	64	64	≤8	≤1	2
22.2	4	32	8	≤1	16	128	≤1	32	32	64	≥256	2	0.5	≥256	64	64	≤8	≤1	2
97.2	4	16	4	≤1	64	128	≤1	2	32	≤1	4	2	0.25	64	≥256	64	≥256	≤1	2
169.1	4	64	16	≥256	≥256	128	≤1	2	32	≤1	2	4	0.5	64	≥256	≥256	16	≤1	2
169.2	4	64	16	≥256	≥256	128	≤1	2	32	≤1	2	4	0.5	64	≥256	≥256	16	≤1	2
31.1	4	128	16	8	≥256	128	≤1	2	32	≤1	4	2	0.5	64	64	≥256	16	≤1	4
32.1	4	128	64	≥256	≥256	≥256	≤1	2	32	≤1	4	2	0.25	64	≥256	≥256	≥256	≤1	4
B6.1.5	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128
B6.1.6	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128
B6.1.7	4	64	8	≤1	16	≤1	≤1	2	64	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	64	≤8	≥256	128
B6.2.1	4	64	8	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128
B6.2.5	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128
B6.2.8	8	128	16	≤1	32	≤1	≤1	2	32	≤1	8	≤1	0.5	16	≥256	128	≤8	≥256	128
F6.2.1	4	32	4	≤1	32	≤1	≤1	2	128	≤1	8	2	0.5	64	64	64	16	≥256	≥256
BM4105RF	2	2	≤1	2	32	≤1	≤1	2	32	≤1	16	2	0.25	16	≥256	128	≤8	≥256	≥256
FA2-2	2	2	2	2	64	≤1	2	2	128	≤1	8	2	0.5	64	64	64	16	≥256	≥256
ATCC29212	2	2	2	2	64	32	2	2	32	≤1	2	4	0.5	64	32	64	≤8	≤1	2

- LZD低度耐性10株（宮崎県5株、鹿児島県1株、群馬県2株）と6.1株と6.2株の耐性伝達株（B6.1.5, 7, 8、B6.2.1, 5, 8, F6.2.1）のMIC値を測定
- 6.1株と6.2株のLZD耐性は他のアンピシリン、ビアペナム、テトラサイクリンの各耐性とは独立して伝達

表10-1. 2020年収集鶏肉由来のLZD耐性腸球菌

群大No.	検疫所検体No.	検体採取鶏舎及び港湾	検疫所又は検査所	国又は県	採取年月日	送付年月日	受取年月日	処理年月日	VanPariPC R	poxtA	optrA	fexA	fexB	
LZDr 10.1	鹿児島ー1 0	1		串木野食肉衛生検査所	鹿児島	令和2年2月18日	令和2年2月18日	令和2年2月20日	令和2年3月2日	E. faecalis	-	-	-	-
LZDr 10.2	鹿児島ー1 0	2		串木野食肉衛生検査所	鹿児島	令和2年2月18日	令和2年2月18日	令和2年2月20日	令和2年3月2日	E. faecalis	-	-	-	-
LZDr 25.1	鹿児島ー2 5	1		鹿屋食肉衛生検査所	鹿児島	令和2年2月3日	令和2年2月3日	令和2年2月5日	令和2年3月2日	E. faecalis	-	-	-	-
LZDr 25.2	鹿児島ー2 5	2		鹿屋食肉衛生検査所	鹿児島	令和2年2月3日	令和2年2月3日	令和2年2月5日	令和2年3月2日	E. faecalis	-	-	-	-
LZDr 31.1	1	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 31.2	1	2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 32.1	2	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 32.2	2	2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 33.1	3	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 33.2	3	2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 35.1	5	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 35.2	5	2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 36.1	6	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 36.2	6	2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 37.1	7	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 37.2	7	2	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 38.1	8	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 38.2	8	2	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 40.1	10	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 40.2	10	2	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 41.1	11	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 41.2	11	2	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 42.1	12	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 42.2	12	2	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 43.1	13	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 43.2	13	2	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 44.1	14	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 44.2	14	2	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 45.1	15	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 45.2	15	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 46.1	16	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 46.2	16	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 47.1	17	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 47.2	17	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 48.1	18	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 48.2	18	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 49.1	19	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 49.2	19	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 50.1	20	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 50.2	20	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 51.1	21	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 51.2	21	2	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 52.1	22	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 52.2	22	2	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 53.1	23	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 53.2	23	2	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	

表10-2. 2020年収集鶏肉由来のLZD耐性腸球菌

群大No.	検疫所検体No.	検体採取鶏舎及び港湾	検疫所又は検査所	国又は県	採取年月日	送付年月日	受取年月日	処理年月日	VanPariPC R	poxtA	optrA	fexA	fexB	
LZDr 54.1	24	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 54.2	24	2	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 55.1	25	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 55.2	25	2	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 56.1	26	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 56.2	26	2	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 57.1	27	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 57.2	27	2	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 58.1	28	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 58.2	28	2	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 59.1	29	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 59.2	29	2	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 60.1	30	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 60.2	30	2	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 61.1	31	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 61.2	31	2	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 62.1	32	1	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 62.2	32	2	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 63.1	33	1	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 63.2	33	2	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 64.1	34	1	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 64.2	34	2	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 65.1	35		F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 65.2	35		F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 66.1	36		F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 66.2	36		F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 67.1	37		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 67.2	37		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 68.1	38		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 68.2	38		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 69.1	39		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 69.2	39		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 70.1	40		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 70.2	40		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 71.1	41		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 71.2	41		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	-	+	+	-	
LZDr 72.1	31319779	1		横浜検疫所	ブラジル	平成31年4月10日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月8日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 72.2	31319779	2		横浜検疫所	ブラジル	平成31年4月10日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月8日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 77.1	31321572	1		横浜検疫所	ブラジル	令和1年5月15日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月8日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 77.2	31321572	2		横浜検疫所	ブラジル	令和1年5月15日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月8日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 106.1	31331109	1		横浜検疫所	タイ	令和1年8月28日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月15日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 106.2	31331109	2		横浜検疫所	タイ	令和1年8月28日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月15日	E. faecalis	-	-	-	-
LZDr 172.1	66368061	1	福岡	神戸検疫所	タイ	令和1年9月10日	令和2年6月8日	令和2年6月9日	令和2年7月30日	E. faecalis	-	-	-	-
LZDr 172.2	66368061	2	福岡	神戸検疫所	タイ	令和1年9月10日	令和2年6月8日	令和2年6月9日	令和2年7月30日		-	+	+	-
LZDr 188.1	66371385	1	成田	神戸検疫所	トルコ	令和1年10月21日	令和2年6月8日	令和2年6月9日	令和2年7月30日	E. faecalis	-	+	+	-
LZDr 188.2	66371385	2	成田	神戸検疫所	トルコ	令和1年10月21日	令和2年6月8日	令和2年6月9日	令和2年7月30日		-	+	+	-

群馬39検体78株

鹿児島2検体4株

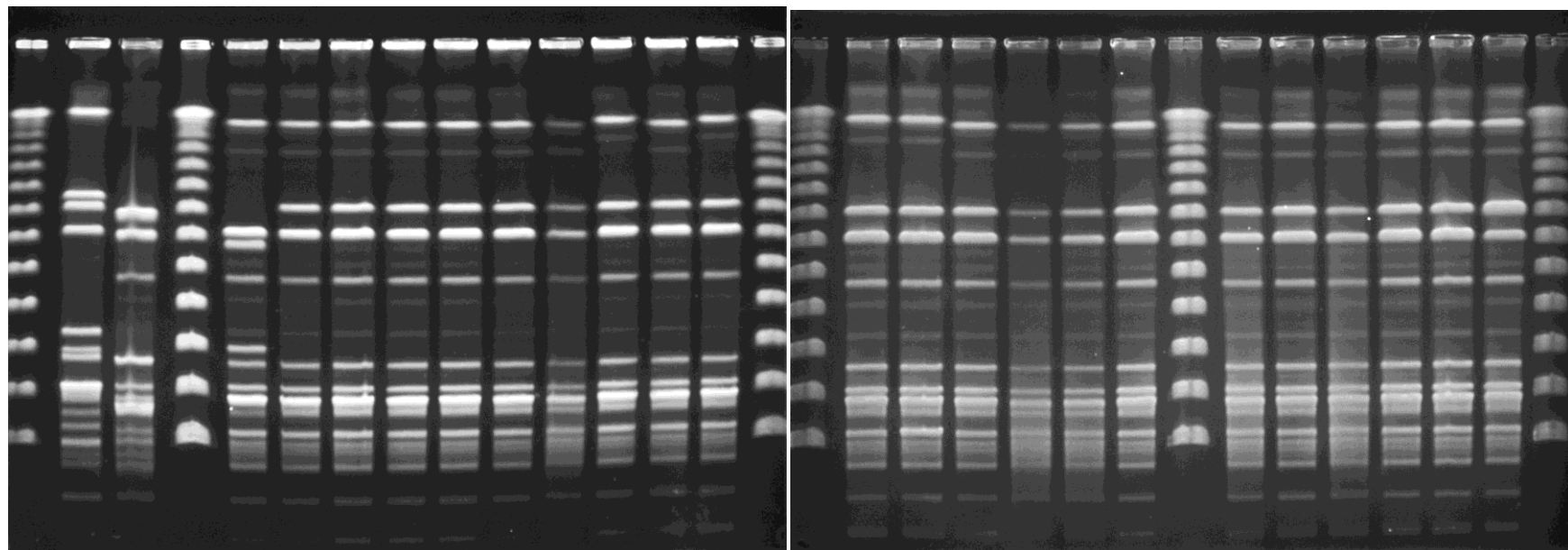
ブラジル2検体4株

タイ2検体4株

トルコ1検体2株

合計92株

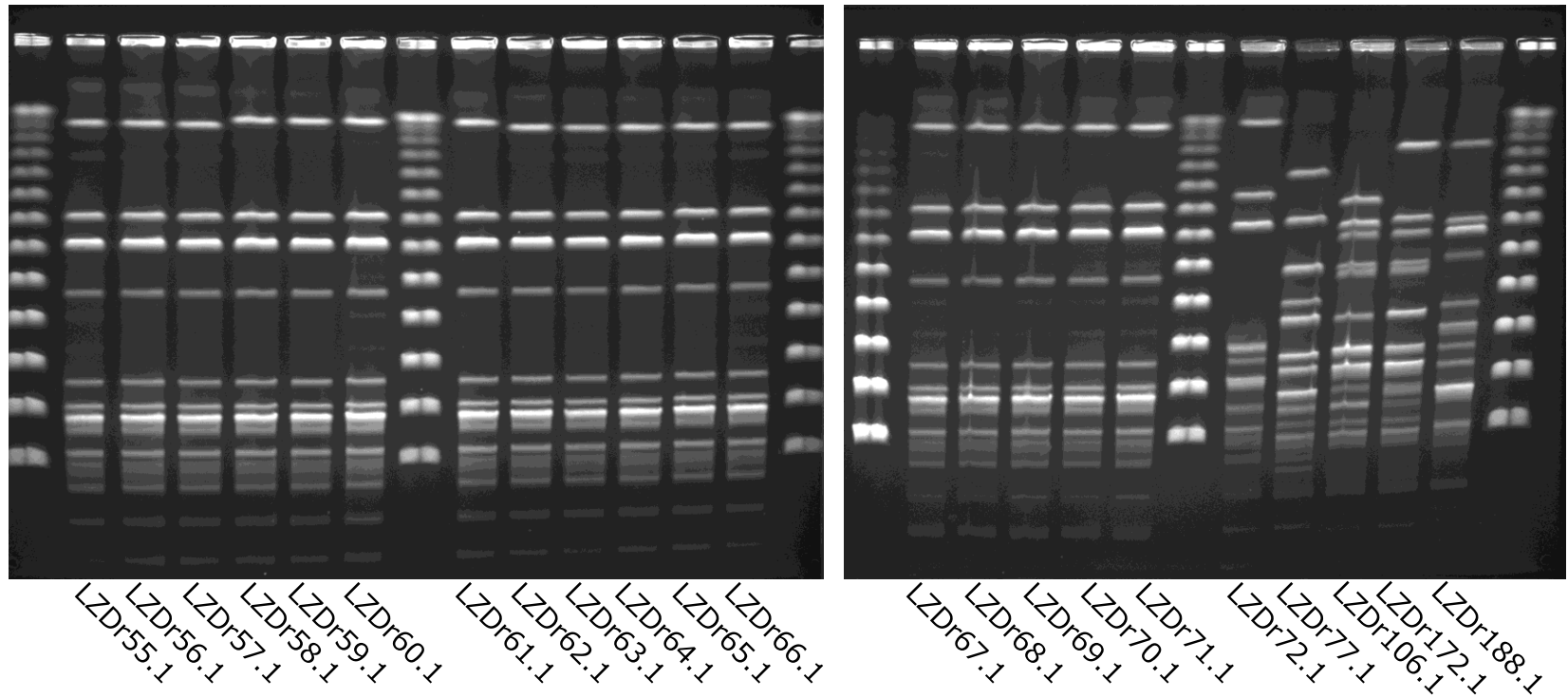
図10-1. 2020年収集鶏肉由来のLZD耐性腸球菌



LZDr10.1 LZDr25.1 LZDr31.1 LZDr32.1 LZDr33.1 LZDr35.1 LZDr36.1 LZDr37.1 LZDr38.1 LZDr40.1 LZDr41.1 LZDr42.1 LZDr43.1 LZDr44.1 LZDr45.1 LZDr46.1 LZDr47.1 LZDr48.1 LZDr49.1 LZDr50.1 LZDr51.1 LZDr52.1 LZDr53.1 LZDr54.1 LZDr55.1

Stock No.	群大No.	検査所検体No.	検体採取鶏舎及び港湾	検査所又は検査所	国又は県	採取年月日	送付年月日	受取年月日	処理年月日	VanPariPCR	LZD	FFC	CP	EM	LCM	TC	TGC	CPFX	FOS	ABPC	MEPM	VCM	TEIC	SM	KM	SPC	GM	RFP	FA	NFT
2019年度 LZDr株	LZDr 10.1	鹿児島 - 1 0	1	串木野食肉衛生検査所	鹿児島	令和2年2月18日	令和2年2月18日	令和2年2月20日	令和2年3月2日	<i>E. faecalis</i>	16	16	16	2	128	2	0.5	2	32	1	4	2	0.5	64	64	128	16	4	4	32
2019年度 LZDr株	LZDr 25.1	鹿児島 - 2 5	1	鹿屋食肉衛生検査所	鹿児島	令和2年2月3日	令和2年2月3日	令和2年2月5日	令和2年3月2日	<i>E. faecalis</i>	4	16	16	64	64	64	0.25	2	32	1	4	2	0.5	128	128	64	16	2	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 31.1	1	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	8	2	0.125	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 32.1	2	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	128	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	8	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 33.1	3	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 35.1	5	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	8	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 36.1	6	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 37.1	7	1	A-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.125	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 38.1	8	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	32	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 40.1	10	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 41.1	11	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 42.1	12	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	32	1	4	2	0.125	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
Stock No.	群大No.	検査所検体No.	検体採取鶏舎及び港湾	検査所又は検査所	国又は県	採取年月日	送付年月日	受取年月日	処理年月日	VanPariPCR	LZD	FFC	CP	EM	LCM	TC	TGC	CPFX	FOS	ABPC	MEPM	VCM	TEIC	SM	KM	SPC	GM	RFP	FA	NFT
2019年度 LZDr株	LZDr 43.1	13	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	8	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 44.1	14	1	B-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 45.1	15	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 46.1	16	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	8	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 47.1	17	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	2	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	2	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 48.1	18	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	1	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 49.1	19	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	2	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 50.1	20	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	1	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 51.1	21	1	C-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月17日	令和2年2月17日	令和2年2月17日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	1	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 52.1	22	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 53.1	23	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	2	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 54.1	24	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	<i>E. faecalis</i>	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	8	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8

図10-2. 2020年収集鶏肉由来LZD耐性腸球菌



Stock No.	群大No.	検査所検体No.	検体採取鶏舎及び港湾	検査所又は検査所	国又は県	採取年月日	送付年月日	受取年月日	処理年月日	VanPanPCR	LZD	FFC	CP	EM	LCM	TC	TGC	CPFX	FOS	ABPC	MEPM	VCM	TEIC	SM	KM	SPC	GM	RFP	FA	NFT	
2019年度 LZDr株	LZDr 55.1	25	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	16	
2019年度 LZDr株	LZDr 56.1	26	1	D-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日																					
2019年度 LZDr株	LZDr 57.1	27	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 58.1	28	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 59.1	29	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	1	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 60.1	30	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	1	16	1	4	2	0.125	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 61.1	31	1	E-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日																					
2019年度 LZDr株	LZDr 62.1	32	1	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 63.1	33	1	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 64.1	34	1	F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 65.1	35		F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	16	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 66.1	36		F-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日																					
Stock No.	群大No.	検査所検体No.	検体採取鶏舎及び港湾	検査所又は検査所	国又は県	採取年月日	送付年月日	受取年月日	処理年月日	VanPanPCR	LZD	FFC	CP	EM	LCM	TC	TGC	CPFX	FOS	ABPC	MEPM	VCM	TEIC	SM	KM	SPC	GM	RFP	FA	NFT	
2019年度 LZDr株	LZDr 67.1	37		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.25	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 68.1	38		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	128	128	≧512	≧512	256	0.5	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 69.1	39		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 70.1	40		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日	4	64	128	≧512	≧512	256	0.25	2	16	1	4	2	0.5	64	≧512	≧512	≧512	1	4	8	
2019年度 LZDr株	LZDr 71.1	41		G-1	群馬県食肉衛生検査所	群馬県	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年2月25日	令和2年3月3日																					
2019年度 LZDr株	LZDr 72.1	31319779	1		横浜検査所	ブラジル	平成31年4月10日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月8日	<i>E. faecalis</i>	8	128	64	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.25	64	64	64	16	2	8	16
2019年度 LZDr株	LZDr 77.1	31321572	1		横浜検査所	ブラジル	令和1年5月15日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月8日	<i>E. faecalis</i>	8	128	64	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	2	0.5	64	64	64	16	2	4	16
2019年度 LZDr株	LZDr 106.1	31331109	1		横浜検査所	タイ	令和1年8月28日	令和2年3月11日	令和2年3月12日	令和2年4月15日	<i>E. faecalis</i>	16	16	32	≧512	≧512	256	0.5	2	32	1	4	4	0.5	64	64	64	16	4	4	8
2019年度 LZDr株	LZDr 172.1	66368061	1	福岡	神戸検査所	タイ	令和1年9月10日	令和2年6月8日	令和2年6月9日	令和2年7月30日	<i>E. faecalis</i>																				
2019年度 LZDr株	LZDr 188.1	66371385	1	成田	神戸検査所	トルコ	令和1年10月21日	令和2年6月8日	令和2年6月9日	令和2年7月30日	<i>E. faecalis</i>																				

研究課題名：食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究

分担課題名：ヒト・家畜・食品等由来耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子の解析及び伝達過程の関連性の解明

研究分担者：石井 良和 東邦大学医学部微生物・感染症学講座・教授

研究参加者：青木 弘太郎 東邦大学医学部微生物・感染症学講座・助教

研究要旨

ヒト、家畜、食品、および伴侶動物に加えて環境に由来する薬剤耐性菌が保有する薬剤耐性伝達因子を解析し、拡散様式ならびに過程を明らかにすることは、薬剤耐性菌を制御する上で重要な情報である。我々のグループでは、ヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境に由来する第三セファロスポリン系薬耐性あるいはカルバペネム系薬耐性腸内細菌目細菌を対象に、全ゲノム解析により薬剤耐性遺伝子ならびに薬剤耐性伝達因子を解析した。その結果、*bla*_{CTX-M-14} (1996年から2007年に検出)、*bla*_{CMY-2} (1999年から2002年に検出)、および *bla*_{CTX-M-2} (2001年から2004年に検出) は由来および宿主菌が異なるにも関わらず、それぞれ構造が酷似した IncFII プラスミド、IncA/C プラスミド、および IncN プラスミド上に検出された。また、海外渡航がない患者から分離されたカルバペネマーゼ産生大腸菌を解析した結果、*bla*_{NDM-5} は IncX3 プラスミド上に検出され、そのプラスミドは東京湾の海水から分離された大腸菌から検出された *bla*_{NDM-5} 搭載プラスミドと酷似していた。これらの結果から、各薬剤耐性遺伝子のヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境へ拡散はそれぞれ特定のプラスミドが長期に渡り重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

薬剤耐性菌の制御にはその拡散様式および過程を理解することが重要である。ヒト、家畜、食品、および伴侶動物に加えて環境に由来する薬剤耐性菌、特に第三セファロスポリン系薬耐性あるいはカルバペネム系薬耐性腸内細菌目細菌を対象に、全ゲノム解析により薬剤耐性遺伝子ならびに薬剤耐性伝達因子を解析することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト、家畜、食品、伴侶動物、および環境に由来する第三セファロスポリン系薬耐性あるいは

カルバペネム系薬耐性腸内細菌目細菌について、東邦大学医学部微生物・感染症学講座保存菌株 (表 1)、伴侶動物およびその飼い主の糞便分離株 (表 2)、および臨床分離株を対象とした。糞便からの大腸菌および ESBL/AmpC 産生大腸菌の分離培養には、クロモアガーECC およびクロモアガーESBL (関東化学) を用いた。生化学的性状による菌種同定および薬剤感受性検査は BD PhoenixTM M50 (ベクトン・ディッキンソン) および NMIC-208 パネルを用いて行った。

全ゲノム解析は次世代シーケンサーの MiSeq (イルミナ) および MinION (オックスフォード ナノポアテクノロジーズ) の2機種を組

合せて行った。2 機種から出力された塩基配列を *in silico* で組み合わせた *de novo* assembly により、完全長ゲノム (各複製単位で環状化) 塩基配列の取得を試みた。得られたゲノムを分子疫学のおよび分子生物学的見地から解析し、得られた結果について解釈した。プラスミド構造の比較ゲノム解析には、類似するプラスミド塩基配列情報を公共データベース (National Center for Biotechnology Information, NCBI) からダウンロードして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、東邦大学医学部倫理委員会の承認 (申請番号: A18029, 課題名: 伴侶動物をはじめとする動物と同一の空間を共有する人がそれぞれ保有するオキシミノセファロスポリン耐性腸内細菌科細菌の細菌学のおよび遺伝学的特徴を明らかにするための研究) 得て行われた。

C. 研究結果

1996 年~2001 年に臨床材料および健常ブロイラーより分離された ESBL あるいは AmpC 型 β -ラクタマーゼ陽性大腸菌それぞれ 14 株および 10 株を対象に全ゲノム解析を行った (表 1)。その結果、臨床材料から分離された大腸菌は全株が *bla*_{CTX-M-14} 陽性だった。一方、健常ブロイラー由来 ESBL 陽性大腸菌は 11 株が *bla*_{CMY-2} 陽性、5 株が *bla*_{CTX-M-2} 陽性だった。

*bla*_{CTX-M-14} 陽性株のうち、9 株が sequence type (ST) 405, 1 株が ST68 だった。(図 1)。これらの菌株は共通して *bla*_{CTX-M-14} 搭載 IncFII プラスミドを保有していた。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、2004 年に香港、2007 年にベトナム、2011 年に中国で分離された菌株から検出された *bla*_{CTX-M-14} 搭載 IncFII プラスミドに構造が酷似していた (図 1)。

*bla*_{CMY-2} は異なる ST に属する 4 株のトリ由来大腸菌から検出された。*bla*_{CMY-2} は plasmid

sequence type (pST) 3 に属する IncA/C プラスミドに搭載されていた。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、1998 年、2002 年、および 2013 年に米国でヒトおよびウシから分離された菌株から検出された *bla*_{CMY-2} 搭載 pST3 IncA/C プラスミドに構造が酷似していた (図 2)。

*bla*_{CTX-M-2} はトリの糞便に由来する異なる 3 つの ST に属する大腸菌から検出された。*bla*_{CTX-M-2} は pST5 に属する IncN プラスミドに搭載されていた。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、2014 年に本邦の患者から分離されたカルバペネマーゼ産生肺炎桿菌が保有した *bla*_{CTX-M-2} および *bla*_{IMP-6} 搭載プラスミドに骨格が酷似していた (図 3)。

海外渡航歴のない患者から分離されたカルバペネム耐性大腸菌を全ゲノム解析した結果、*bla*_{NDM-5} 搭載 IncX3 プラスミドが検出された。既報のプラスミドと類似性を比較した結果、東京湾の海水サンプルから分離された大腸菌から検出された *bla*_{NDM-5} 搭載 IncX3 プラスミドと構造が酷似していた (論文投稿中)。

ペットおよびその飼主の糞便サンプルは、40 組のボランティアに採便キットを送付し、22 組分回収された (表 2)。そのうち 1 組でペットおよび飼主から *bla*_{CTX-M-9} グループが共通して陽性の大腸菌が検出された。さらに、飼主のみから *bla*_{CTX-M-9} グループ陽性大腸菌が検出された組、猫のみから *bla*_{CTX-M-1} グループ陽性大腸菌が検出された組が認められた。今後、菌株の全ゲノムを行う予定である。

D. 考察

本研究では、ESBL および AmpC 産生菌が拡散し始めた時期の菌株を全ゲノム解析することで、それらの遺伝子がどのような伝達性遺伝因子に媒介されてきたのかを明らかにしようとした。*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-2}, および *bla*_{NDM-5} がそれぞれ特徴的なプラスミドに媒介されていたことが明らかになった。さらに、ヒト、動

物、食肉、および環境に由来する遺伝的に関連のない菌株からも構造が酷似したプラスミドが検出されたことから、薬剤耐性遺伝子の幅広い拡散に、それぞれ異なるプラスミドが重要な役割を果たしていたことが示唆された。

E. 結論

*bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{CTX-M-2}, および *bla*_{NDM-5} が広く拡散し始めた時期に分離された菌株を含めて全ゲノム解析を実施したことにより、それぞれの薬剤耐性遺伝子が媒介されてきたプラスミドの特徴を明らかにした。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

表 1. 供試大腸菌の保有薬剤耐性遺伝子、由来および分離年次

ESBL/AmpC	年次	ヒト由来 (株)	動物由来 (株)
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	1996	9	0
	1999	1	0
<i>bla</i> _{CMY-2}	1999	0	2
	2000	0	6
	2001	0	1
	2009	0	2
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	2001	0	3
	2004	0	1
計		10	15

表 2. ペットおよびその宿主糞便から分離された ESBL 産生大腸菌

ペット種	ペア数	ESBL 産生大腸菌	
		宿主	ペット
犬	14	2 (<i>bla</i> _{CTX-M-9G})*	1 (<i>bla</i> _{CTX-M-9G})*
猫	8	0	1 (<i>bla</i> _{CTX-M-1G})
未返送	18	-	-
計	40	2	2

*1 株が同一ペア由来

図 1. *bla*_{CTX-M-14} 搭載 IncFII プラスミド完全長構造比較

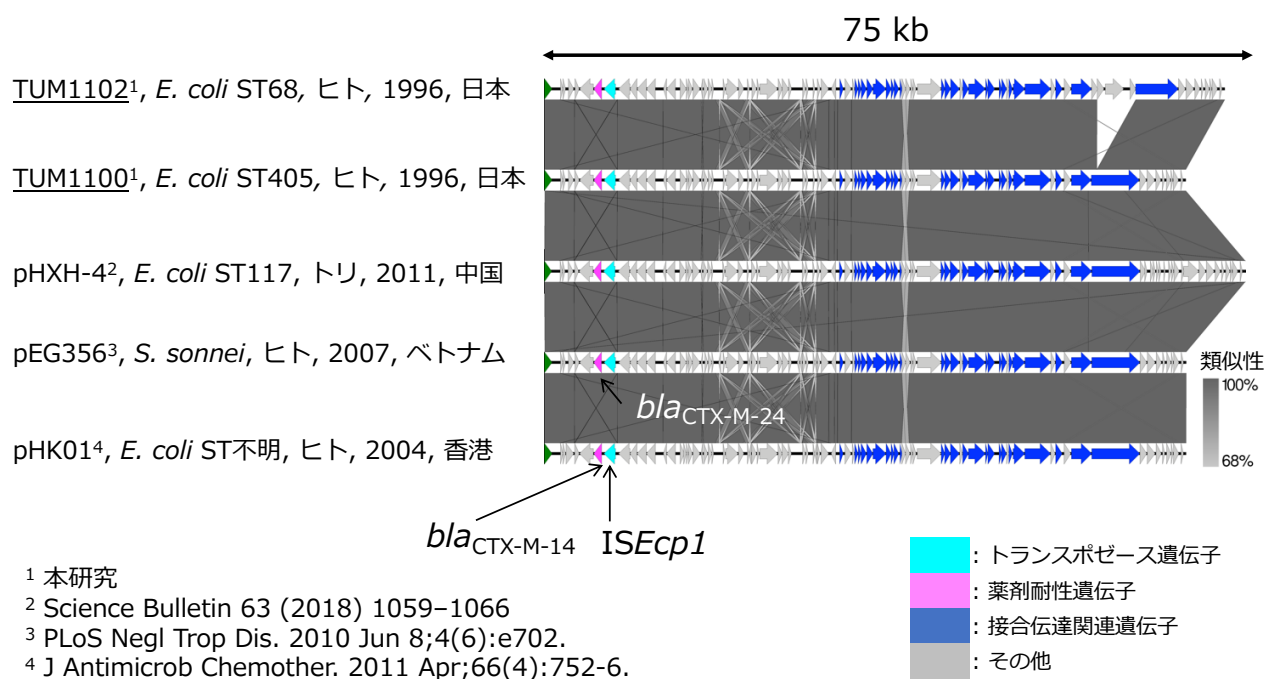


図 2. *bla*_{CMY-2} 搭載 IncA/C-ST3 プラスミド完全長構造比較

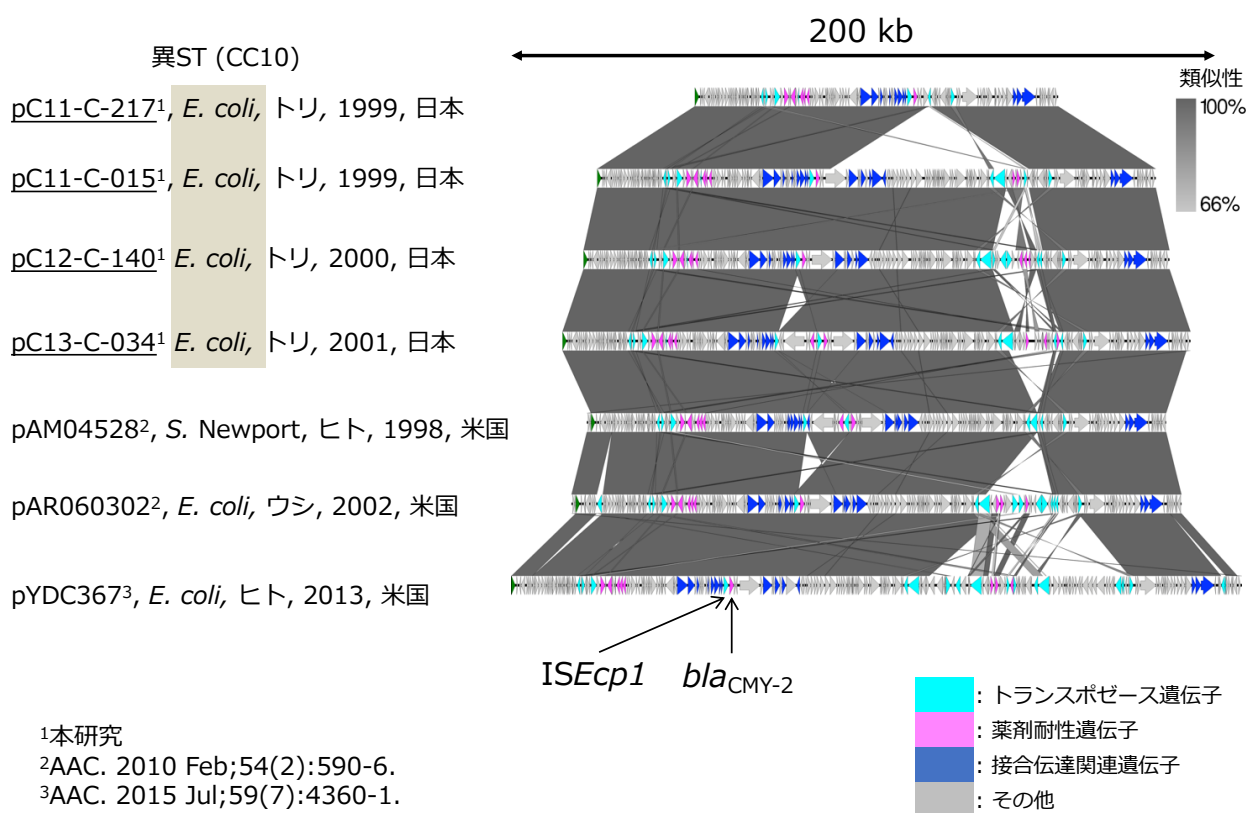


図 3. *bla*_{CTX-M-2} 搭載 IncN-pST5 プラスミド完全長構造比較

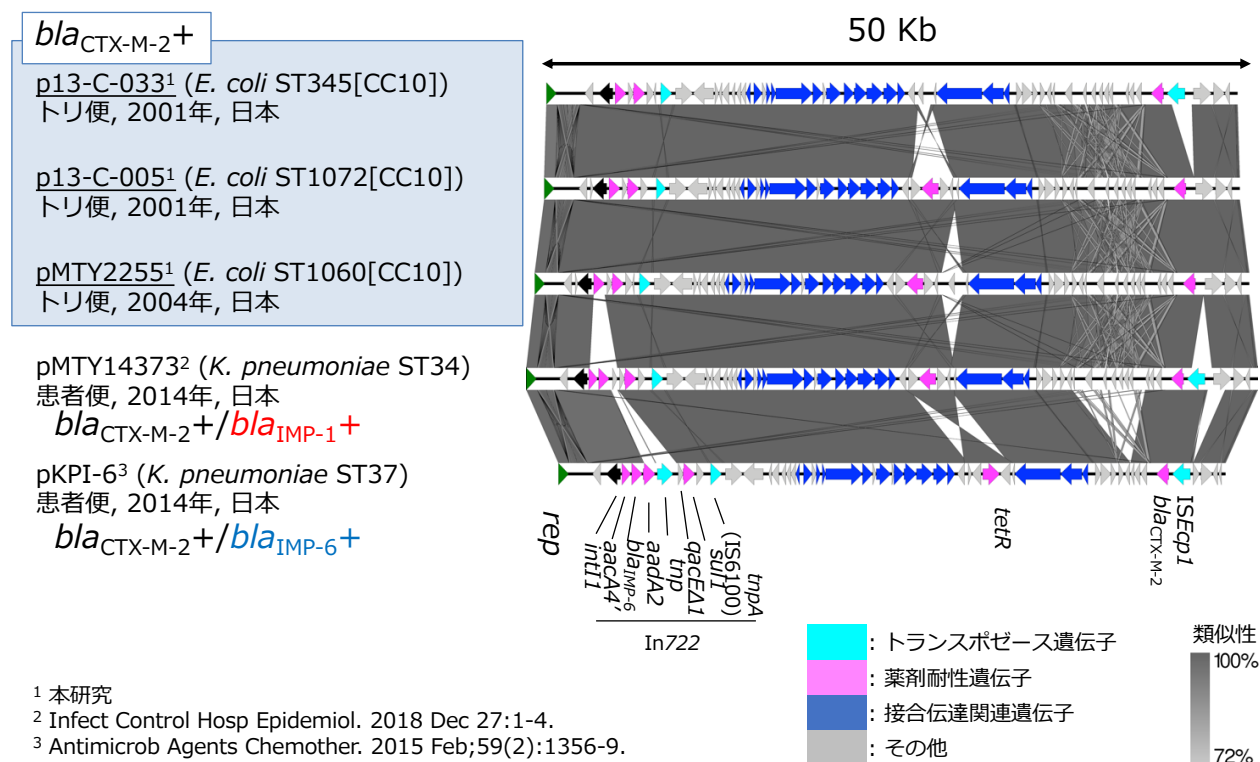
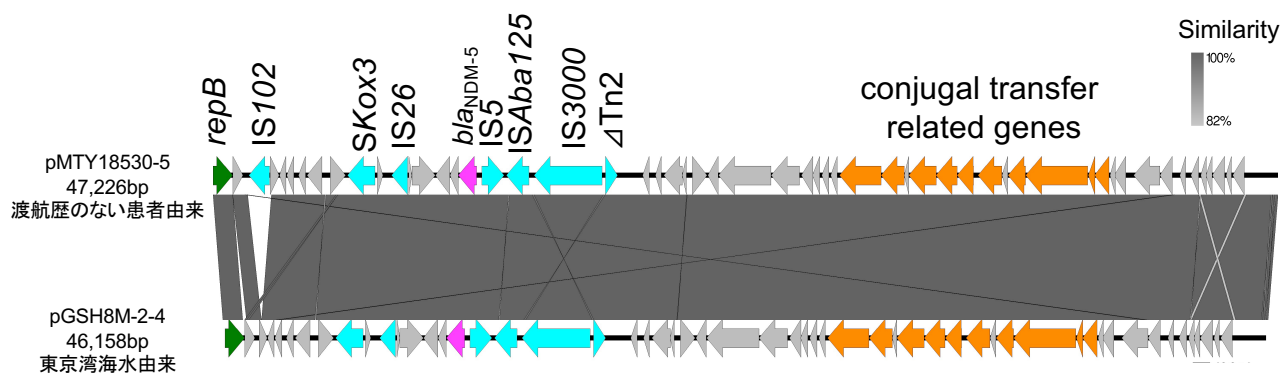


図 4. *bla*_{NDM-5} 搭載 IncX3 プラスミド完全長構造比較 (論文投稿中)



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chiba N., Tanimoto, K., Hisatsune J., Sugai M., Shibayama K., Watanabe H. Tomita H.	Detection of mcr-1 mediated colistin resistance in <i>E. coli</i> isolate from imported chicken meat from Brazil.	J. Glob. Anti-microb. Resist.	16	249-250	2019
Toshiki Kajihara, Koji Yahara, Sergey Romualdovich Eremin, Barbara Tornimbene, Visanu Thamlikitkul, Joahn Stelling, Aki Hirabayashi, Eiko Anzai, Satoru Wakai, Nobuaki Matsunaga, Kayoko Hayakawa, Norio Ohmagari, Motoyuki Sugai, and Keigo Shibayama	Comparison of de-duplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance	PLoS One	15(6)	e0228234	2020
Soliman AM, Ramadan H, Ghannem E, Yu L, Hisatsune J, Kayama S, Sugai M, Nariya H, Shimamoto T, Jackson CR, Shimamoto T	Emergence of <i>Salmonella</i> genomic island 1 variant SGI1-C in a multidrug-resistant clinical isolate of <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST485 from Egypt	Antimicrobial Agents Chemother	64(9)	e01055-20	2020
Sadek M, Nariya H, Shimamoto T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nordmann P, Poirel L, Shimamoto T	First genomic characterization of blaVIM-1 and mcr-9-cointegrating <i>Enterobacter hormaechei</i> isolated from food of animal origin	Pathogens	9(9)	687	2020

Khalifa H, Soliman A, Saito T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, Sugai M, Nariya H, Ahmed A, Shimamoto T, Matsumoto T, Shimamoto T					
Kitagawa H, Ohge H, Yu L, Kayama S, Hara T, Kashiya S, Kajihara T, Hisatsune J, Sueda T, Sugai M	Aeromonas dhakensis is not a rare cause of Aeromonas bacteremia in Hiroshima, Japan	J Infect Chemother	26(2)	316-320	2020
Ahmed M Soliman, Hirofumi Nariya, Daiki Tanaka, Liansheng Yu, Junzo Hisatsune, Shizuo Kayama, Kohei Kondo, Motoyuki Sugai, Toshishi Shimamoto, Tadashi Shimamoto	Vegetable-derived carbapenemase-producing high-risk <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST15 and <i>Acinetobacter baumannii</i> ST2 clones in Japan: co-existence of <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , and <i>AbaR4</i> -like resistance island from the same sample	Applied and Environmental Microbiology	In press		2021
Liansheng Yu, Hiroki Kitagawa, Shizuo Kayama, Junzo Hisatsune, Hiroki Ohge, and Motoyuki Sugai	Complete Genome Sequence of <i>Aeromonas caviae</i> Strain MS6064, a <i>mcr-3</i> -Carrying Clinical Isolate from Japan	Microbiology Resource Announcements	10(9)	e01037-20	2021
Hashimoto Y, Kurushima J, Nomura T, <u>Tanimoto K</u> , Tamai K, Yanagisawa H, Shirabe K, Ike Y, <u>Tomita H</u> .	Dissemination and genetic analysis of the stealthy <i>vanB</i> gene clusters of <i>Enterococcus faecium</i> clinical isolates in Japan.	BMC Microbiology	18	213	2018
Hashimoto Y, Taniguchi M, Uetsuka K, Nomura T, Hirakawa H, <u>Tanimoto K</u> , Tamai K, Ruatana G, Zheng B, <u>Tomita H</u> .	Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding <i>vanA</i> and <i>vanM</i> gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant enterococci isolate.	Front Microbiology	10	2568	2019

Hirakawa H, Suzuki K, Kurabayashi K, <u>Tomita H.</u>	The Tol-Pal system of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> is responsible for optimal internalization into and aggregation within bladder epithelial cells, colonization of the urinary tract of mice, and bacterial motility.	Front Microbiol.	10	1827	2019
Hirakawa H, Tanaka A, Kato M, Mizumoto H, <u>Tomita H.</u>	Roles of CytR, an anti-activator of cyclic-AMP receptor protein (CRP) on flagellar expression and virulence in uropathogenic <i>Escherichia coli</i> .	Biochem Biophys Res Commun.	521	555-561	2020
Hashimoto Y, Kikuchi I, Suzuki M, Hirakawa H, Ohtaki H, <u>Tomita H.</u>	First report of the local spread of vancomycin-resistant enterococci ascribed to the interspecies transmission of a vanA gene cluster-carrying linear plasmid.	mSphere	5(2)	e00102-20.	2020
Tanimoto K, Nomura T, Hashimoto Y, Hirakawa H, Watanabe H, <u>Tomita H.</u>	Isolation of <i>Serratia fonticola</i> producing Fonticoline (FONA), a minor extended-spectrum β -lactamase (ESBL), from imported chicken meat in Japan.	Jpn J Infect Dis.	74(1)	79-81	2021