

(3) 家畜、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析に関する研究

ア. 家畜が保有する薬剤耐性菌の解析（嶋崎洋子（動物医薬品検査所）、臼井優（酪農学園大学））

動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）により収集された家畜由来大腸菌のうちアンピシリンに耐性を示す株（ABPC 耐性株）について、系統発生分類及びβラクタマーゼ遺伝子の解析を実施した。また、βラクタマーゼ遺伝子保有株については「（5）分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

研究内容・方法

本研究は、家畜への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌又は耐性遺伝子が食品等を介してヒトへ伝播し、直接あるいは間接的にヒトの細菌感染症の治療を困難にする危険性を評価するものである。本研究の課題のうち、牛、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析のため、動物医薬品検査所のJVARMで収集された株について解析した。対象とする家畜由来大腸菌は、と畜場において健康な牛より採取した直腸便から分離されたものを主体とし、比較参考として家畜保健衛生所において病畜から採取した牛由来大腸菌、また、と畜場において健康豚の直腸便から分離した豚由来大腸菌についても解析した。対象菌株についてアンピシリン、セファゾリン（CEZ）及びセフォタキシム（CTX）に対する薬剤感受性を確認し、ABPC耐性株については、系統発生分類（Clermontら（2013）の報告）及びβ-ラクタマーゼ遺伝子型別（Dalleneら（2010）の報告）による性状解析を行った。

研究結果

2015～2019年に収集した牛由来大腸菌1261株のうち、ABPC耐性株は86株（6.8%）であり、CEZ及びCTXに耐性の株は、それぞれ11株（0.9%）及び2株（0.3%）であった。ABPC耐性株について系統発生分類を確認した結果、系統型B1が48株（55.9%）と半数以上を占めた（表12）。ABPC耐性株のうち75株（87.2%）でβ-ラクタマーゼ遺伝子が確認され、その殆ど（72株）はTEM型であり、その他にSHV型、CTX-M1型、CTX-M9型及びCIT型が各1株から検出された（表13）。

また、2018年に収集された病気の牛由来大腸菌87株について解析した結果、ABPC耐性株は45株（51.7%）であり、系統発生分類は系統型B1が25株（55.6%）と半数以上を占めた。ABPC耐性株中β-ラクタマーゼ遺伝子を保有する41株ではTEM型が最も優勢（40株（88.9%））であり、次いでCTX-M9型が5株（11.1%）で検出された。

健康な豚由来大腸菌については、2016～2019年に収集した336株のうちABPC耐性株は116株（34.5%）であり、CEZ及びCTXに耐性の株は、それぞれ11株（3.3%）及び4株（1.2%）であった。ABPC耐性株の系統発生分類では、系統型B1及び系統型Aが多く、それぞれ50株（43.1%）及び45株（38.8%）と全体の8割以上を占めた。また、β-ラクタマーゼ遺伝子は114株（98.3%）で確認され、そのうち112株（96.6%）はTEM型であり、その他にCTX-M9が3株（2.6%）から検出された。

以上より家畜由来のABPC耐性大腸菌においては、系統学的分類として牛由来株はB1、豚由来株はB1及びAが最も優勢であること、ABPC耐性大腸菌の約9割がβ-ラクタマーゼ遺伝子を保有し、その殆どはTEM型であることが明らかとなった。なお、病気の牛から分離した大腸菌ではABPC耐性株の分離率やCTX-M型遺伝子の保有率は健康な牛由来大腸菌よりも高いものの、系統学的分類及びβ-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況は健康な牛由来株と同じ傾向が確認された。

βラクタマーゼ遺伝子のうちTEM型、CTX-M1型及びCTX-M9型が確認された228株（一部の株は複数の型を保有）については「（5）分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含

めた比較解析を行った。

表12. 家畜由来ABPC耐性大腸菌の系統発生分類結果

由来		分離年	ABPC 耐性株	系統型								
				A	B1	B2	C	D	E	F	clade I	型別 不能
牛	健康	2015～2019	86 (%)	9 (7.4)	48 (55.9)	0	0	5 (4.4)	6 (5.9)	0	0	18 (26.5)
	病気	2018	45 (%)	8 (17.8)	25 (55.6)	0	2 (4.4)	4 (8.9)	2 (4.4)	3 (6.7)	0	1 (2.2)
豚	健康	2016～2019	116 (%)	45 (38.8)	50 (43.1)	3 (2.6)	7 (6.0)	1 (0.9)	2 (1.7)	4 (3.4)	2 (1.7)	2 (1.7)

表13. 家畜由来ABPC耐性大腸菌のβ-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*)保有状況

由来		分離年	ABPC 耐性株	<i>bla</i> 保有株	<i>bla</i> 型				
					TEM	SHV	CTX-M1	CTX-M9	CIT
牛	健康	2015～2019	86 (%)	75 (87.2)	72 (83.7)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)
	病気	2018	45 (%)	41 (91.1)	40 (88.9)	1 (2.2)	2 (4.4)	5 (11.1)	0
豚	健康	2016～2019	116 (%)	114 (98.3)	112 (96.6)	0	0	3 (2.6)	1 (0.9)

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

イ、排水に存在する薬剤耐性菌の解析（島本整（広島大学）、浅井鉄夫（岐阜大学）臼井優（酪農学園大学））

A、浅井(岐阜大学)

肉牛、肉用鶏、採卵鶏農場では污水处理施設を保有しないため、岐阜県内の豚 4 農場の污水处理施設からの排水を採取した。また、養豚場 4 施設に加えて、牛豚のと場 2 施設、食鳥処理場 2 施設の污水处理施設の計 4 施設の排水を対象とした。いずれの污水处理施設にいても処理前及び処理後のものを採水した。

【材料と方法】

表 14 のとおりサンプルを採取した。

表 14. サンプル詳細

由来污水处理施設		サンプル数 (1 サンプルあたり 100 ml の排水を採水)		サンプル採取日
		処理前	処理後	
豚農場	①	1	1	2020 年 7 月 7 日
	②	1	1	2020 年 7 月 14 日
	③	1	1	2020 年 7 月 31 日
	④	1	1	2020 年 7 月 31 日
と畜場	①	1	1	2020 年 8 月 3 日
	②	1	1	2020 年 7 月 8 日
食鳥処理場	①	1	1	2020 年 6 月 18 日
	②	1	1	2020 年 7 月 15 日

それぞれのサンプルを 10 倍に連続希釈し、それぞれ 100 μ l をクロモアガーECC 培地及びアンピシリン(100mg/l)添加クロモアガーECC 培地へコンラージ棒で塗布し、培養後、大腸菌のコロニー数をカウントした。アンピシリン添加培地にて得られたコロニー数を無添加培地のコロニー数で除することで、アンピシリン耐性菌の割合を算出した（試験 1）。

また、1 サンプル当たり無添加培地において大腸菌が疑われる青色コロニーから最大 3 株を単離し、API20E を用いて菌種を同定し、微量液体希釈法により ABPC、KM、TC、NA、CPFX、CP、ST、CEZ、CTX、MEPM、GM 及び CL に対する薬剤感受性試験を微量液体希釈法で実施した。ブレイクポイント（BP）は CLSI を参照した。（試験 2）

さらに、アンピシリン添加培地より得られたアンピシリン耐性大腸菌株の、 β ラクタマーゼの型別を、既報の multiplex PCR により実施した（Dallene ら（2010）の報告）。（試験 3）

最後に、大腸菌の系統発生分類を既報の multiplex PCR により実施した（Clermont ら（2013）の報告）（試験 4）

【結果と考察】

試験 1 の結果を表 15 に示す。豚農場の污水处理後の排水に含まれるアンピシリン耐性大腸菌数は <10~1700CFU/ml で、放出される大腸菌のうち、30~40%の割合でアンピシリン耐性が認められた。

一方、と畜場及び食鳥処理場の処理水ではほとんど大腸菌が認められなかった。これは、汚水処理施設の処理能力に起因していることが示唆された。

表 15. 排水に存在する大腸菌数とアンピシリン耐性大腸菌数

区分	記号	汚水処理前 大腸菌数 CFU/ml (参考)	汚水処理後 大腸菌数 CFU/ml	処理後/ 処理前 (%)	汚水処理後 アンピシリン 耐性大腸菌 CFU/ml	AMP 耐性%
農場 (豚)	PA	216,000	4,300	1.99	1700	39.5
	PB	74,000	840	1.14	240	28.6
	PC	37,000	<10	<0.03	<10	NA
	PD	351,000	150	0.04	40	26.7
食肉処理場	SA (鶏)	87,000	<10	<0.01	<10	NA
	SB (牛豚)	10,300	600	5.83	<10	NA
	SC (鶏)	33,000	<10	<0.03	<10	NA
	SD (牛豚)	10,400	10	0.10	<10	NA

試験 2 の結果を表 16 に示す。4 農場の汚水処理前後の排水から 18 株、2 食鳥処理施設の汚水処理前後の排水から 7 株、2 と畜場の汚水処理前後の排水から 10 株を分離した。

分離された大腸菌 35 株の薬剤感受性を調べたところ、7 薬剤に対する耐性が認められ、ABPC と TC に対する耐性割合が高かった。CEZ、CTX、MEPM、GM および CL に対する耐性は認められなかった。

ABPC 耐性を示した 16 株について β ラクタマーゼの型別を実施したところ、全て 16 株の ABPC 耐性菌は *bla*_{TEM} を保有していた。

表 16. 由来別汚水処理前後の排水から分離した大腸菌の薬剤感受性

	ABPC	KM	TC	NA	CPFX	CP	ST
養豚場 (n=18)	8 (44.4)	0	7 (38.9)	0	0	2 (11.0)	4 (22.2)
食鳥処理場 (n=7)	5 (71.4)	2 (28.6)	6 (85.7)	1 (14.3)	0	0	3 (42.9)
と畜場 (n=10)	3 (30.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)
総計 (n=35)	16 (45.7)	3 (8.6)	15 (42.9)	2 (5.7)	1 (2.9)	3 (8.6)	8 (22.9)

株数を示し、カッコ内の数値は%を示す。

アンピシリン添加培地より分離された食鳥処理施設の処理前排水由来のアンピシリン耐性株3株、食鳥処理施設の処理前排水由来を3株、農場の処理前後排水由来24株の β ラクタマーゼ型を調べたところ、全て *bla*_{TEM} を保有していた。 β ラクタマーゼ遺伝子保有株については「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

試験4の結果を図9に示す。養豚場の排水から分離した大腸菌の系統は、A0、A1およびB1が主で、その他、B2とD1が認められた。養豚場排水由来大腸菌では、アンピシリン添加の有無に関わらずA0、A1およびB1が同程度の割合であった。食鳥処理場排水由来大腸菌では、アンピシリン非添加培地で分離した株はB1が優勢で、アンピシリン添加培地で分離した3株では、2株がA0であった。と畜場由来サンプルからアンピシリン非添加培地で分離した株の構成比はB1タイプが主で、アンピシリン添加培地で分離した3株では、A0、A1及びB1が1株ずつ認められた。

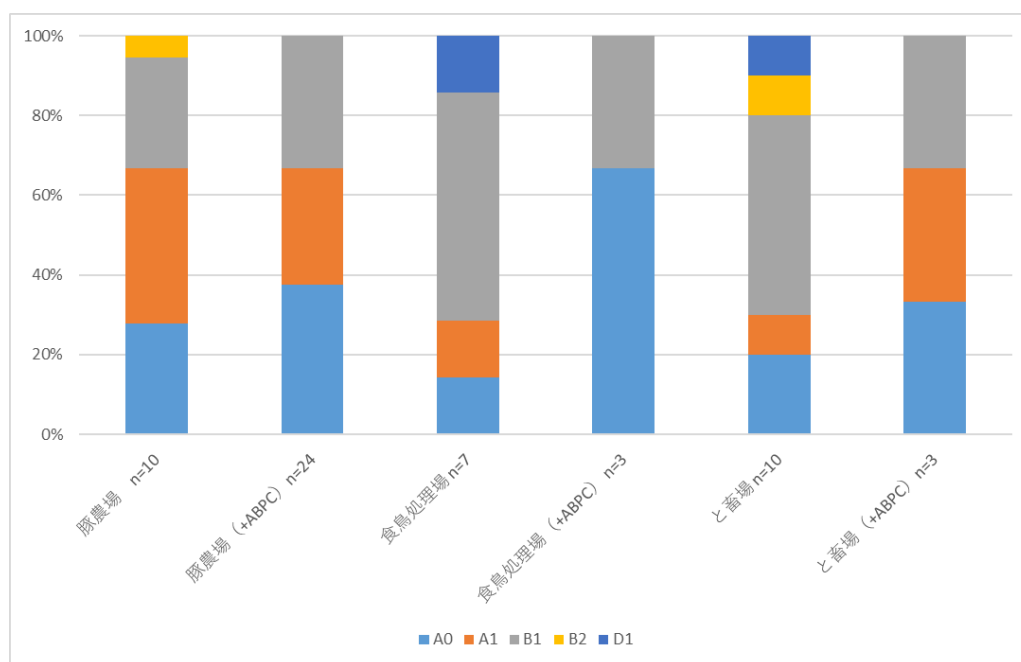


図9. 由来別大腸菌の系統分類

(+ABPC は、アンピシリン添加培地で分離された大腸菌の結果を示す)

β ラクタマーゼ遺伝子のうちTEM型が確認された株については「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

B. 臼井（酪農学園大学）

北海道オホーツク地域において、10 酪農場の排水が流入する河川水 10 箇所を対象に、農場から 50m 以内の水を採水し、大腸菌、アンピシリン耐性大腸菌の分離を行った。

【材料と方法】

採水されたサンプル 10 サンプルについて、クロモアガー-ECC 培地及びアンピシリン含有(100mg/L) クロモアガー-ECC 培地を用いて大腸菌の分離を行った。サンプル当たり大腸菌が疑われるコロニー3 株を単離し、MALDI-TOF MS を用いて同定し、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を行った(12 薬剤)。βラクタマーゼの型別は、既報の multiplex PCR により実施した (Dallene ら (2010) の報告)。大腸菌の系統分類は、既報の multiplex PCR により実施した (Clermont ら (2013) の報告)

【結果と考察】

合計 57 株の大腸菌が分離された。そのうち、14 株がアンピシリン耐性大腸菌であった。アンピシリン耐性大腸菌の性状を以下の表 17 に示す。

14 株中 11 株は *bla*_{TEM} 遺伝子、3 株は *bla*_{CTX-M} 遺伝子を保有していた。また、系統発生分類の結果、2 株が A 型、7 株が B1、5 株が D 型であった。これらの株のうち、*bla*_{TEM} 陽性株 7 株について、他の由来とのゲノム比較のため NGS 解析を実施し「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

表 17. 酪農場流入河川由来アンピシリン耐性大腸菌の性状

Strain Name	Origin	系統分類	<i>bla</i> gene	MIC (mg/L)												NGS解
				ABPC	CEZ	CTX	SM	GM	KM	TC	NA	CPFX	CL	CP	TMP	
9-2	オホーツク 9	B1	TEM	>128	16	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.25	>128	>16	実施
1A-1	オホーツク 1	D	TEM	>128	16	≦0.5	>128	4	>128	>64	>128	>4	0.25	>128	≦0.25	実施
1A-2	オホーツク 1	A	TEM	>128	>128	2	>128	4	>128	>64	>128	0.5	1	>128	≦0.25	実施
1A-3	オホーツク 1	D	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	>128	>4	0.25	>128	≦0.25	
4A-1	オホーツク 4	A	TEM	>128	16	≦0.5	>128	4	16	>64	4	0.06	1	8	>16	実施
4A-3	オホーツク 4	B1	TEM	>128	16	≦0.5	>128	4	>128	>64	>128	>4	1	>128	0.5	実施
6A-1	オホーツク 6	D	CTX-M-1	>128	>128	>64	32	4	16	2	2	0.06	1	8	≦0.25	実施
6A-2	オホーツク 6	D	CTX-M-1	>128	>128	>64	16	4	16	2	2	≦0.03	0.5	8	≦0.25	
6A-3	オホーツク 6	D	CTX-M-1	>128	>128	>64	32	2	16	2	2	≦0.03	0.5	8	≦0.25	
7A-1	オホーツク 7	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	16	>64	2	≦0.03	1	4	≦0.25	実施
7A-3	オホーツク 7	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	16	>64	4	0.06	0.5	8	≦0.25	
9A-1	オホーツク 9	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.5	>128	>16	
9A-2	オホーツク 9	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.5	>128	>16	
9A-3	オホーツク 9	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.5	>128	>16	

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

C. 島本

【研究内容・方法】

広島県内（6カ所）の下水処理施設の放流口付近より環境水（河川水または海水）を3回ずつ採取した（表18）。具体的には、汚水と雨水を同じ管に流して集める合流式処理施設が3カ所、汚水と雨水を別の管で集める分流式の処理施設が3カ所である。また、下水処理水の放流口が河川となっている施設が1カ所（淡水）、放流口が河口付近の河川である施設が2カ所（汽水）、放流口が海である施設が3カ所（海水）である。

表 18. 下水処理施設の情報とサンプリング実施日

サンプリング 場所	処理方法	水域	実施日		気温 (°C)	備考
A	分流式	淡水	1	2020/12/16	3.0	
			2	2021/6/8	25	
			3	2021/10/18	19	
B	合流式	汽水	1	2021/4/15	14	2回目のサンプリング時は前日の天気が雨
			2	2021/6/14	23	
			3	2021/11/26	14	
C	合流式	汽水	1	2021/4/15	14	2回目のサンプリング時は前日の天気が雨
			2	2021/6/14	23	
			3	2021/12/7	11	
D	分流式	海水	1	2021/5/11	20	
			2	2021/6/21	27	
			3	2021/10/18	19	
E	合流式	海水	1	2021/5/11	20	
			2	2021/6/21	27	
			3	2021/10/18	19	
F	分流式	海水	1	2021/6/14	23	満潮時にサンプリング
			2	2021/11/26	14	
			3	2021/12/7	11	

採水サンプルから細菌を分離するにあたり、採水サンプルを濃縮するため、以下の方法でフィルターろ過を行った。孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター（Mixed Cellulose Ester、ADVANTEC）を使用して 1 L の採水サンプルをろ過した。フィルターを 10 mL の PBS（phosphate buffered saline、リン酸緩衝生理食塩水）の中に入れてボルテックスミキサーで激しく攪拌したものを 100 倍濃縮原液とした。濃縮原液を PBS で適切に希釈し、一般生菌数については標準寒天培地（NA）、アンピシリン耐性菌数は NA に 100 mg/L のアンピシリンを添加した培地（NA100）に 100 μL ずつ塗抹し、37°C で 24 時間培養した。3 枚の NA に生育したコロニー数をカウントして平均値を求め生菌数とした。また、3 枚の NA100 に生育したコロニー数をカウントして平均値を求めてアンピシリン耐性菌数とした。アンピシリン耐性化率（％）を（アンピシリン耐性菌数）／（生菌数） $\times 100$ によって求めた。

大腸菌群および腸内細菌科細菌を分離するため、濃縮原液を CHROMagar ECC および 100 mg/L アンピシリン添加 CHROMagar ECC に塗抹し、大腸菌である可能性が高い青色コロニーと大腸菌群である可能性が高い赤色コロニーの中から 3 個以上選択継代した。また、大腸菌や大腸菌群の細菌が得られにくい可能性を考えて濃縮原液を LB 液体培地に接種して 37°C で一晩増菌培養し、同様に CHROMagar ECC

とアンピシリン添加 CHROMagar ECC に塗抹した。前述の菌原液を塗抹した培地上に生育したコロニーを優先的に選択し、青色または赤色コロニーが得られなかった場合には増菌培養後に CHROMagar ECC (±アンピシリン) に生育した青色または赤色コロニーを選択した。いずれの培地にも青色または赤色コロニーが生育していなかった場合は、白色コロニー(大腸菌群以外)を選択し、以下の実験に用いた。さらに、カルバペネム耐性菌の分離を目的として 2 mg/L のメロペネムを添加した MacConkey 寒天培地を用い、生育したコロニーを選択した。

得られた 231 株の分離株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子を中心とした 19 の薬剤耐性遺伝子と rRNA 遺伝子を同時に検出可能な multiplex PCR 法 (EicosaPlex PCR) によって耐性遺伝子の検出を行った (Nariya et al., 2019)。また、薬剤耐性遺伝子を保有していた 57 株について、アンピシリン (ABPC)、アミカシン (AMK)、アズトレオナム (AZT)、セフトラジジム (CAZ)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、シプロフロキサシン (CPFX)、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST) の 10 剤に対するディスク法を用いた分離菌株の薬剤感受性試験を行った。薬剤ディスクは KB ディスク (栄研化学) を用い、ディスクに添付された判定基準によって感受性の判定を行った。そして、それらの菌株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、菌種の同定を行った。さらに、*bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子が陽性の株については、short read によるドラフトゲノム解析を行い、(感染研・菅井グループ)、「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

【研究結果・考察】

各採水サンプルにおける一般生菌数とアンピシリン耐性菌数にはばらつきがあり、アンピシリン耐性率は 4.27%~17.1%と大きな開きがあった (図 10)。雨水と汚水を別の管で流す分流式と比較して雨水と汚水を同じ管で流す合流式は、大雨の後に未処理の汚水を河川や海に流すことがあるため、雨の後には下水処理水放流口付近の生菌数が多くなることが予想される。両者を比較すると、生菌数、アンピシリン耐性菌数、いずれも合流式処理場放流水の方が多く (図 11A)、アンピシリン耐性化率も合流式下水処理施設の方が高いことが示された (図 11B)。しかし、数値のばらつきが多かったため統計解析の結果、アンピシリン耐性菌数のみ有意の差が認められた ($p < 0.05$)。

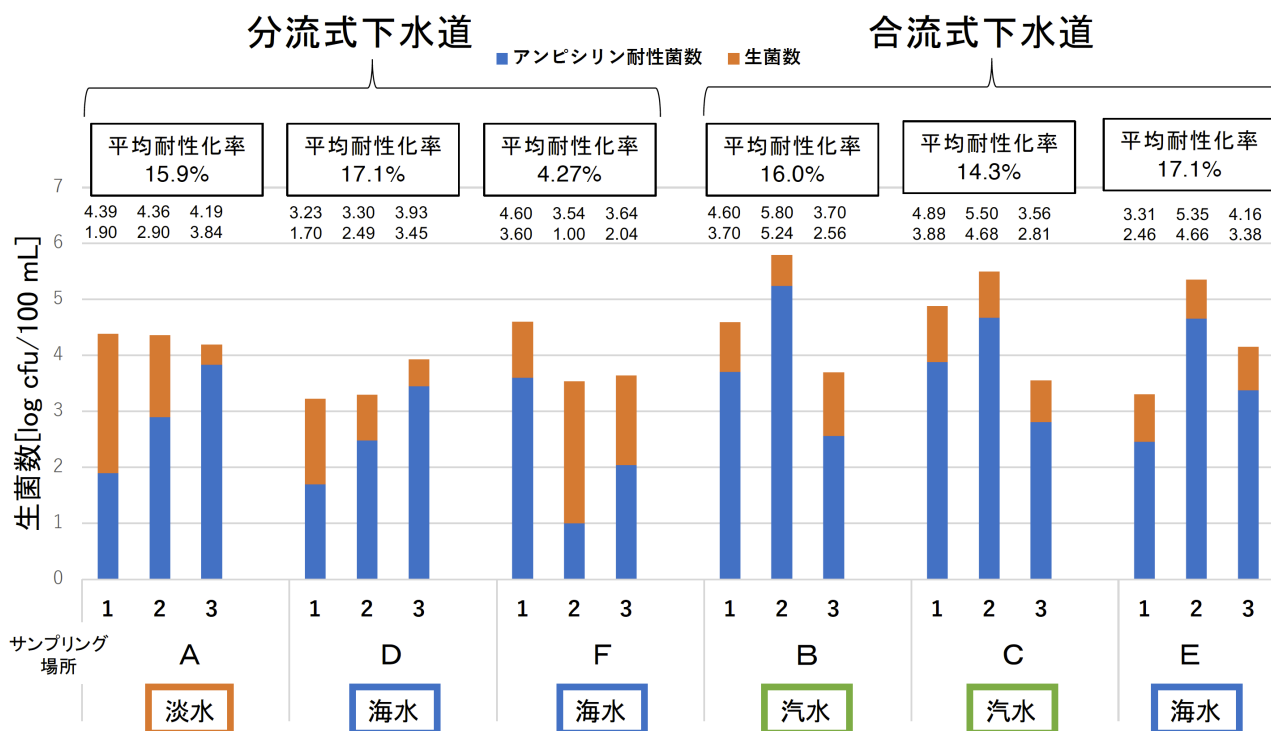


図 10. 各採水地点における生菌数とアンピシリン耐性菌数

左側 3 カ所が分流式下水処理施設、右側 3 カ所が合流式下水処理施設である。各グラフバーのオレンジ色が生菌数、青色がアンピシリン耐性菌数を表しており、上部の数値の上段が生菌数 (log cfu/100 mL)、下段がアンピシリン耐性菌数 (log cfu/100 mL) を表している。また、その上には 3 回のアンピシリン耐性化率の平均値を示した。

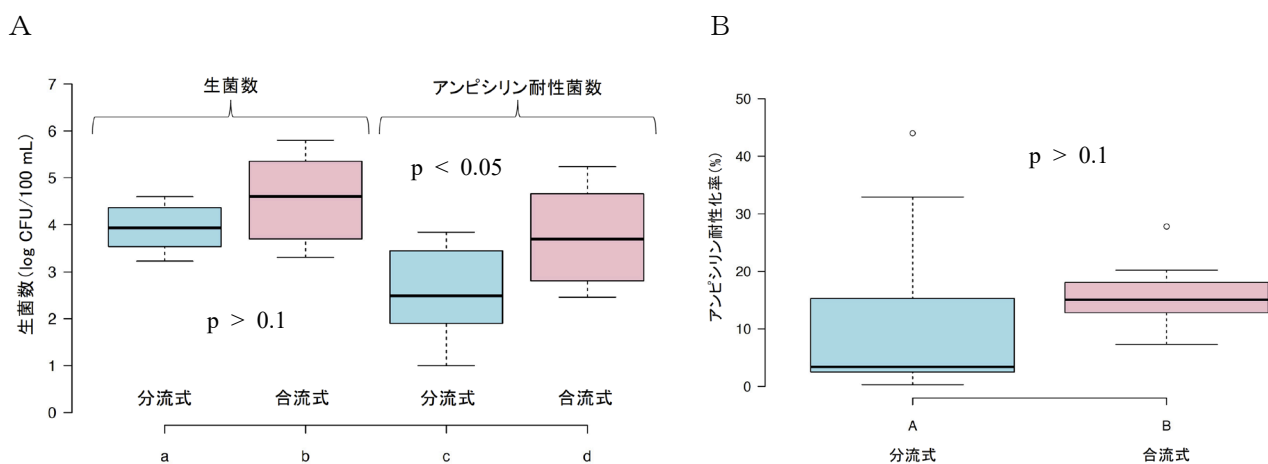


図 11. 下水処理放流水の生菌数とアンピシリン耐性菌数 (A) およびアンピシリン耐性化率 (B) グラフの作成は BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>) によって行った。2 群間の有意差解析は、Wilcoxon の順位和検定 (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/wilc.html>) を利用した。

計 18 回の採水サンプルより 231 株の分離株が得られた。分離株について EicosaPlex PCR 法による薬剤耐性遺伝子の検出を行った。検出された耐性遺伝子の分布状況を下水処理施設ごとにまとめた (表

19)。 *bla*_{TEM} 遺伝子や ESBL 遺伝子である *bla*_{CTX-M} 遺伝子、耐性遺伝子カセットを転移させるインテグロンが比較的高い頻度で検出された。全体的に合流式下水処理施設の方が耐性遺伝子を保有している割合が高い傾向にあった。

表 19. 各分離菌株の薬剤耐性遺伝子分布

		β-lactamase					<i>aac</i> (6′)-Ib	Integron	
		CTX-M	TEM	SHV	OXA-2	AmpC		<i>intI1</i>	<i>intI2</i>
分流式	A(39株)	3 (7.7)	1 (2.6)	1 (2.6)	—	3 (7.7)	1 (2.6)	3 (7.7)	2 (5.1)
	D(39株)	—	1 (2.6)	—	—	5 (12.8)	—	—	—
	F(35株)	4 (11.4)	4 (11.4)	—	1 (2.9)	2 (5.7)	—	4 (11.4)	1 (2.9)
合流式	B(41株)	9 (22.0)	4 (9.8)	3 (7.3)	—	3 (7.3)	1 (2.4)	3 (7.3)	—
	C(31株)	3 (9.7)	6 (19.4)	—	—	3 (9.7)	1 (3.2)	5 (16.1)	—
	E(46株)	—	5 (10.9)	—	—	9 (19.6)	—	6 (13.0)	—
合計(231株)		19 (8.2)	22 (9.5)	4 (1.7)	1 (0.4)	25 (10.8)	3 (1.3)	20 (8.7)	3 (1.3)

数値は菌株数、括弧内はそれぞれの下水処理施設分離株に占める割合 (%) を表している。

次に、AmpC 以外の耐性遺伝子保有株 (57 株) について、ディスク法による薬剤感受性試験を行った。用いた抗生物質は、表 20 に示す 10 種類である。3 種類以上の異なるグループの抗生物質に耐性を示す多剤耐性菌は 26 株 (45.6%, 26/57) 確認された (サンプリング場所 A: 4 株、B: 8 株、C: 6 株、E: 4 株、F: 4 株) (補助資料 6)。合流式下水処理施設でのみ検出された耐性菌株も比較的多かった (表 20)。また、同じ菌株について 16S rRNA 遺伝子の配列を決定し、菌種の同定を行った。その結果、大腸菌 (*Escherichia coli*) が最も多く 35 株であった (補助資料 6)。次いで多かった菌種は、同じ大腸菌群である肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) が 5 株であった。

表 20. 薬剤耐性遺伝子保有株の薬剤耐性表現型の解析

		AMP	CTX	CAZ	AZT	MEPM	CP	CL	AMK	CPFX	ST
分 流 式	A(9株)	9 (100)	4 (44.4)							4 (44.4)	4 (44.4)
	D(1株)	1 (100)									
	F(11株)	10 (90.9)	4 (27.3)							4 (36.4)	5 (45.5)
合 流 式	B(17株)	17 (100)	8 (47.1)		1 (5.9)		1 (5.9)	3 (23.5)	1 (5.9)	5 (29.4)	8 (47.1)
	C(11株)	11 (100)	3 (27.3)	3 (27.3)	2 (18.2)	2 (18.2)	1 (9.1)		1 (9.1)	4 (36.4)	3 (27.3)
	E(8株)	7 (87.5)					2 (12.5)	2 (25.0)		2 (25.0)	5 (62.5)
合計(57株)		55 (96.5)	19 (33.3)	3 (5.3)	3 (5.3)	2 (3.5)	4 (7.0)	5 (8.8)	2 (3.5)	19 (33.3)	25 (43.9)

各抗生物質欄の数値は菌株数、括弧内はそれぞれの下水処理施設分離株に占める割合 (%) を表している。枠で囲んだ菌株は、合流式下水処理施設でのみ検出されたものを意味する。

ABPC, アンピシリン; AMK, アミカシン; AZT, アズトレオナム; CAZ, セフトアジジム; CL, コリスチン; CP, クロラムフェニコール; CPFX, シプロフロキサシン; CTX, セフトキシム; MEPM, メロペネム; ST, スルファメトキサゾール・トリメトプリム

これらの菌株の中から同一サンプルから分離された類似の菌株を除いた 22 株 (大腸菌 18 株、大腸

菌以外 4 株) の TEM または CTX-M 陽性株について、ドラフトゲノム解析を行った (表 21)。その結果、TEM-1A 保有株が 1 株、TEM-1B 保有株が 7 株、CTX-M-14 保有株が 3 株、CTX-M-27 保有株が 4 株、TEM-1B と CTX-M-14 両保有株が 1 株、TEM-1B と CTX-M-15 両保有株が 2 株、TEM-1B と CTX-M-27 両保有株が 1 株であった。その他には、テトラサイクリン耐性を付与する *tet* 遺伝子、クロラムフェニコール耐性を付与する *catA*、*cmlA*、*floR* 遺伝子、マクロライド耐性を付与する *mph* 遺伝子、ホスホマイシン耐性を付与する *fosA* 遺伝子、キノロン耐性遺伝子 *qnr* や薬剤排出ポンプ遺伝子である *oqxAB* など多数の薬剤耐性遺伝子が検出された。この結果より複数の耐性遺伝子を含む多剤耐性菌が下水放流水を介して拡散している可能性が示唆された。

表 21. *bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子を保有する株のドラフトゲノム解析と耐性表現型解析

菌株名	処理場	菌種	耐性遺伝子	薬剤耐性表現型
CAH-1-1	A	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>mph</i> (A), <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i>	ABPC, CTX, CPFX, ST
CE-1-1	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>sitABCD</i> , <i>mph</i> (A), <i>sul1</i> , <i>qacE</i> , <i>aadA5</i> , <i>dfrA17</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	ABPC, CTX, CPFX, ST
CE-1-2	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{LAP-2} , <i>qnrS1</i> , <i>tet</i> (A), <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>formA</i>	ABPC
CE-1-4	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>sitABCD</i> , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>sul2</i>	ABPC, CP, ST
CAE-1-1	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>formA</i> , <i>sitABCD</i> , <i>mdf</i> (A), <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>tet</i> (A)	ABPC, CTX, ST
CAE-1-4	B	<i>Raoultella planticola</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>fosA</i> , <i>bla</i> _{PLA2b} , <i>oqxB</i> , <i>oqxA</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>dfrA14</i> , <i>qnrB1</i>	ABPC, CTX, AZT, ST
ME-1-1	B	<i>Morganella morganii</i>	<i>catA2</i> , <i>bla</i> _{DHA-13} , <i>tet</i> (D)	ABPC, CL
CE-2-4	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>mdf</i> (A), <i>aac</i> (3)-IIa, <i>formA</i>	ABPC, CTX, CPFX
CAE-2-4-1	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>catA</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)	ABPC, CTX, CPFX, ST
CS-1-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>formA</i>	ABPC, CPFX
CAS-1-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>aac</i> (3)-IIa	ABPC, CAZ, CTX, AZT, CPFX
CS-2-1-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sitABCD</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catA</i> , <i>formA</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>tet</i> (A)	ABPC, CTX, AZT, ST
CS-2-3	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>cmlA1</i> , <i>qacE</i> , <i>tet</i> (B), <i>mph</i> (A), <i>dfrA1</i>	ABPC, CTX, CPFX, ST
CAS-2-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>aph</i> (6)-Id, <i>dfrA14</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (A), <i>sitABCD</i>	ABPC, ST
CAS-2-2	C	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CMY-48} , <i>aac</i> (3)-IIa, <i>mph</i> (A), <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i>	ABPC, ST
CT-1-5	D	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>tet</i> (B)	ABPC
CAA-1-1	E	<i>Escherichia coli</i>	<i>mdf</i> (A), <i>formA</i>	ABPC, CPFX, ST
CAA-1-2-①	E	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>tet</i> (B)	ABPC
CAA-1-5-r	E	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>bla</i> _{PLA1b} , <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>floR</i> , <i>tet</i> (A), <i>qnrS1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	ABPC
MA-1-1-b	E	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>aac</i> (3)-IIa, <i>tet</i> (B)	ABPC, CPFX, ST
CN-1-3	F	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i>	ABPC, CTX, AZT, ST
CAN-1-3	F	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	ABPC

ゲノムデータに基づく菌種の同定は DFAST、耐性遺伝子の検出は ResFinder を利用して行った。青字は *bla*_{TEM} 遺伝子、赤字は *bla*_{CTX-M} 遺伝子を表している。薬剤耐性表現型は、ディスク試験の結果耐性を示した薬剤名を記載した。略称は表 3 と同じである。

(注) 当初 26 株についてゲノム解析を行ったが、ゲノム解析の結果同一株であると判断された 4 株についてはすべてのリストから除外した。

【文献】

Nariya H., Soliman, A.M., Shimamoto, T., Shimamoto, T. (2019) First detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from retail vegetable in Japan. 第 92 回日本細菌学会総会 (札幌市), 4 月 23 日～25 日。

補助資料 6 下水放流水 (環境水) より分離された菌株リスト (耐性遺伝子が検出された菌株のみ)
Eicosa-Plex PCR 法によって耐性遺伝子が検出された菌株をまとめた。

菌株名の最初の C は CHROMagar 培地より単離された菌株、CA はアンピシリンを添加した CHROMagar 培地より単離された菌株、M はコリスチンを添加した MacConkey 寒天培地より単離された菌株、MM はメロペネムを添加した MacConkey 寒天培地より単離された菌株を示している。C、CA、M、MM の次の H は「サンプリング場所 A」で分離された菌株、S は「サンプリング場所 C」で分離された菌株、E は「サンプリング場所 B」で分離された菌株、A は「サンプリング場所 E」で分離された菌株、T は「サンプリング場所 D」で分離された菌株、N は「サンプリング場所 F」で分離された菌株をそれぞれ示している。アルファベットの次の数字がそれぞれの採水場所でのサンプリング回を示しており、ハイフンの次の数字がそれぞれの菌株番号である。

”Resistance genes (PCR)” は、Eicosa-Plex PCR 法によって検出された AmpC 以外の耐性遺伝子を示している。int11 はクラス 1 インテグロンを表しており、括弧内は検出された耐性遺伝子カセットを示している。”AmpC genes” は、PCR によって検出された AmpC 遺伝子の種類を示している。オレンジ色でハイライトした耐性遺伝子は、ゲノム解析によって同定された耐性遺伝子である。”Species” は、16S rRNA 遺伝子配列より同定された菌種名を示している。なお、菌種が未同定または同定できなかった株は空欄となっている。菌種名をブルーでハイライトした菌株は、ゲノム解析の結果より同定した菌種名を表している。”Resistance phenotypes” は、ディスク法の結果明らかになった薬剤耐性表現型を示しており、耐性 (Resistance) となった薬剤名を記載した。”-” は調べた 10 の薬剤に対してすべて感受性 (Sensitive) となったものであり、空欄は薬剤感受性試験を行わなかった菌株を示している。黄色でハイライトした耐性表現型は、多剤耐性であることを示している。

ウ. 野菜が保有する薬剤耐性菌の解析（島本整（広島大学））

【研究内容・方法】

2年間の研究期間で、補助資料7のとおり、市販の野菜200サンプルを購入し、試験に用いた。

購入した野菜を未洗浄の状態で25 g採取し、225 mLの滅菌BPW (buffered peptone water, 緩衝ペプトン水) に加え、ストマッカーで1分間処理した。野菜残渣を除いた液を菌原液とし、PBS (phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水) で10~10000倍に希釈して標準寒天培地 (NA) および100 mg/L アンピシリンを含むNA (NA100) に100 μ Lずつ塗抹し、37°Cで24時間培養した。コロニーカウントの際は、コロニーをカウントできる希釈を接種した培地を選択し、3枚のNAに生育したコロニー数をカウントして平均値を求め生菌数とした。また、3枚のNA100に生育したコロニー数をカウントして平均値を求めてアンピシリン耐性菌数とした。そして、アンピシリン耐性化率(%)を(アンピシリン耐性菌数) / (生菌数) $\times$ 100によって求めた。さらに、大腸菌群および腸内細菌科細菌を分離するため、菌原液をCHROMagar ECC および100 mg/L アンピシリン添加CHROMagar ECCに塗抹し、大腸菌である可能性が高い青色コロニーと大腸菌群である可能性が高い赤色コロニーの中から3個以上選択し継代した。また、大腸菌や大腸菌群の細菌が得られにくい可能性を考えて菌原液をLB液体培地に接種して、37°Cで一晩増菌培養し、同様にCHROMagar ECCとアンピシリン添加CHROMagar ECCに塗抹した。前述の菌原液を塗抹した培地上に生育したコロニーを優先的に選択し、青色または赤色コロニーが得られなかった場合には、増菌培養後にCHROMagar ECC (±アンピシリン) に生育した青色または赤色コロニーを選択・継代した。いずれの培地にも青色または赤色コロニーが生育していなかった場合は、白色コロニー (大腸菌群以外) を選択し、以下の実験に用いた。(試験1)

さらに、上記の分離より得られた大腸菌群あるいは腸内細菌科細菌を中心とした計1,142株の分離株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子を中心とした複数の薬剤耐性遺伝子を同時に検出可能なmultiplex PCR法 (Eicosaplex PCR) によって耐性遺伝子の検出を行った (Nariyaら (2019) の報告)。多数検出されたAmpC遺伝子を除き、検出された耐性遺伝子の塩基配列を決定し、耐性遺伝子型を明らかにした (補助資料8)。(試験2)

また、1,142株の分離株の中から耐性遺伝子を保有していた株を中心に227株について、ディスク法によるアンピシリン (AMP)、セフトキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ)、アズトレオナム (AZT)、メロペネム (MPM) に対する薬剤感受性試験を行った。令和3年度は、CHROMagar培地とアンピシリン添加CHROMagar培地より分離されたすべての菌株について、分離された152株まで薬剤感受性試験を行った。しかし、耐性遺伝子が検出されなかったものに対して薬剤感受性試験を行うことは、時間と経費を考えると非効率的と考えたため、令和4年度は、AmpC以外の耐性遺伝子が検出された菌株 (75株) に絞って薬剤感受性試験を行った。薬剤ディスクはKBディスク (栄研化学) を用い、添付の判定基準によって感受性の判定を行った。補助資料8に記載の52株と多剤耐性の *Stenotrophomonas maltophilia* 4株と大腸菌11株の計67株については、16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定することによって菌種の同定を行った。また、大腸菌と同定された11株については、Clermontらの方法によって phylotyping を行った (Clermontら (2013) の報告)。(試験3)

最後に、*bla*_{TEM}遺伝子または*bla*_{CTX-M}遺伝子が陽性となった13株について、MiniSeq (Illumina) を用いて short read によるドラフトゲノム解析を行った (感染研・菅井グループ)。得られたゲノム配列データについては、「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。詳細な試験方法と結果は (5) 参照。(試験4)

【研究結果・考察】

試験 1 の結果を図 1 2 と補助資料 7 に示す。

市販野菜 200 サンプルについて、生菌数とアンピシリン耐性菌数について調べたところ、生菌数の平均値は 6.36 log CFU/g、アンピシリン耐性菌数の平均値は 5.52 log CFU/g であった（図 1 A、補助資料 7）。アンピシリン耐性化率はサンプルによるばらつきが大きく、野菜 200 サンプルの平均値は 31.0% であった（図 1 B、補助資料 7）。大腸菌については、2.5%（5/200 サンプル）から分離された。

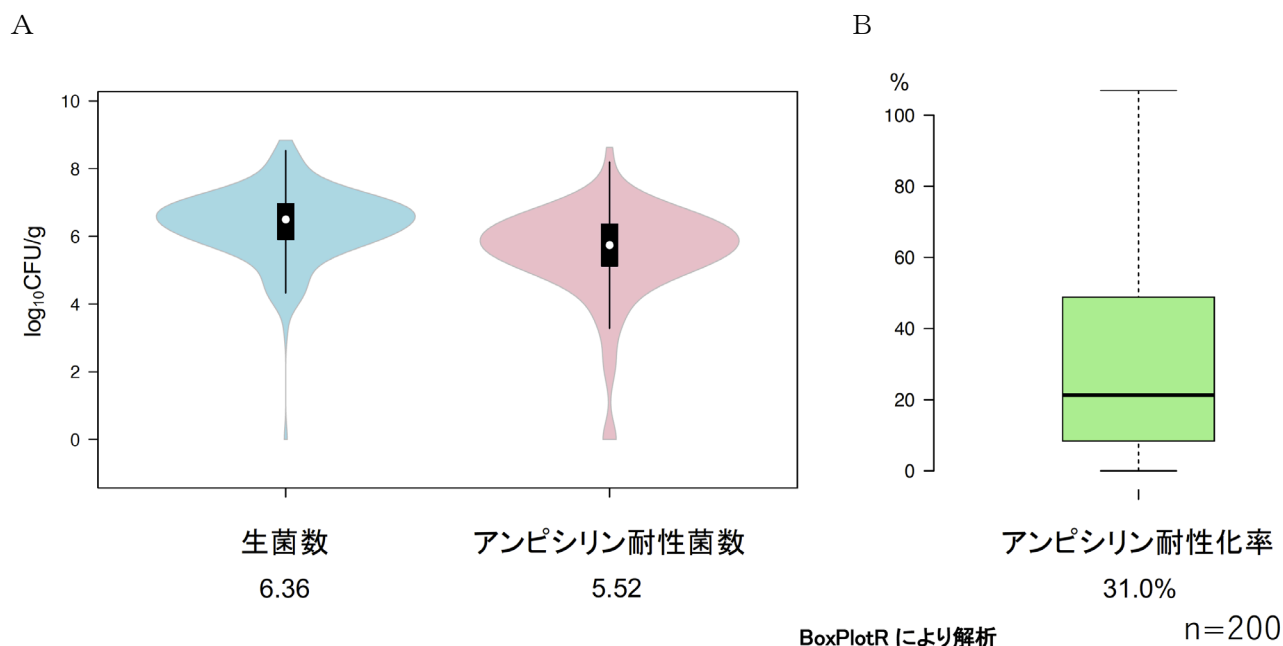


図 1 2. 市販野菜サンプルにおける生菌数とアンピシリン耐性菌数（A）およびアンピシリン耐性化率（B）

試験 2 の薬剤耐性遺伝子の検出結果を補助資料 8 に示す。

200 サンプルより得られた全 1,142 株の分離株について multiplex PCR による薬剤耐性遺伝子の検出を行ったところ、384 株で薬剤耐性遺伝子が検出された。*bla*_{CTX-M} 遺伝子グループが 76 株 (6.7%)、*bla*_{TEM} 遺伝子が 19 株 (1.7%)、*bla*_{SHV} 遺伝子グループが 5 株 (0.44%)、AmpC 遺伝子グループが 280 株 (24.5%) において検出された。なお、4 株 (0.35%) についてはクラス 1 インテグロン (3 株) または *aac* (6')-Ib (1 株) が検出されたが、β-ラクタマーゼに関する遺伝子は検出されなかった。

*bla*_{CTX-M} 遺伝子グループの多くが RAHN、OXY、FONA などの細菌が本来保有している *bla* 遺伝子であり、*bla*_{CTX-M} 遺伝子と同定されたものはわずかであった。検出された *bla*_{TEM} 遺伝子はすべて TEM-1 であった。今回の結果より野菜から分離された菌株の約 4 分の 1 が AmpC 遺伝子を保有していることがわかった。また、AmpC の中でも MIR/ACT が最も多く、222 株より検出された。

試験 3 の薬剤感受性試験の結果を表 22 と補助資料 8 に示す。

耐性遺伝子を持った野菜分離菌は、アンピシリンのみに耐性を示すものが多かった。また、カルバペネマーゼ遺伝子を含む耐性遺伝子はいずれも検出されなかったが、メロペネム耐性を示す株が 4 株得られ (CHA2-2, CHA2-3, CHA5-2, CHA11-1)、すべて *Stenotrophomonas maltophilia* という多剤耐性菌であった (この 4 株は、耐性遺伝子が検出された株ではないので、補助資料 8 には未記載)。

一方、1,142 株中大腸菌はわずか 11 株であり、いずれの株も調べた薬剤耐性遺伝子は保有しておらず、すべて薬剤感受性であった。大腸菌 11 株についてタイピングを行ったところ、A 型が 1 株、B1 型が 4 株、B2 型が 3 株、E 型が 3 株という結果であった（表 23）。

表 22. 薬剤耐性遺伝子を保有する野菜分離菌株の薬剤耐性表現型の解析

Antibiotic	Resistant No. (%)	Intermediate No. (%)	Sensitive No. (%)
AMP (10 µg)	148 (65.2)	16 (7.0)	63 (27.8)
CTX (30 µg)	21 (9.3)	11 (4.8)	195 (85.9)
CAZ (30 µg)	8 (3.5)	2 (0.9)	208 (91.6)
AZT (30 µg)	14 (6.2)	5 (2.2)	217 (95.6)
MEM (10 µg)	4 (1.8)	0 (0.0)	223 (98.2)

(n=227)

AMP, アンピシリン; CTX, セフトキシム; CAZ, セフトジジム; AZT, アズトレオナム; MEM, メロペネム

表 23. 分離された大腸菌の系統分類の結果

Strain	Phylo-type	Vegetable
CH8-1	A	オクラ
CH9-1	B1	パセリ
CH125-1	E	ルッコラ
CH125-2	E	ルッコラ
CH125-3	E	ルッコラ
CH147-1	B1	ズッキーニ
CH147-2	B1	ズッキーニ
CH147-3	B1	ズッキーニ
CH165-1	B2	ベビーリーフ
CH165-2	B2	ベビーリーフ
CH165-3	B2	ベビーリーフ

なお、ルッコラ（野菜サンプル 125）由来の 3 株、ズッキーニ（野菜サンプル 147）由来の 3 株、ベビーリーフ（野菜サンプル 165）由来の 3 株については、それぞれ同一菌株である可能性が高い。

試験 4 のゲノム解析の結果を表 24 に示す。

bla_{TEM} 遺伝子または *bla_{CTX-M}* 遺伝子を保有する野菜分離菌株について、short read によるドラフトゲノム解析を行った。同一サンプルから分離された類似の菌株などを除いた 7 株について解析結果をまとめた（表 24）。いくつかの分離株については複数の耐性遺伝子が検出され、多剤耐性菌であることが明らかになった。特に、サムライネギより分離された 2 株の *Kluyvera sichuanensis* は、*bla_{CTX-M}* 遺伝子の新たな variant を保有していることが明らかになった。

表 24. *bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子を保有する野菜分離菌株のドラフトゲノム解析

Strains	Species*	Sources	Resistance genes**
CHA4-2	<i>Pantoea eucrina</i>	ニラ	<i>bla</i> _{TEM-1C}
CHA20-1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	キャベツ	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aadA16</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>arr-3</i> , <i>bla</i> _{KLUC-2} , <i>bla</i> _{KLUC-3} , <i>dfrA27</i> , <i>floR</i> , <i>qacE</i> , <i>qnrB6</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
CH150-1	<i>Kluyvera sichuanensis</i>	サムライネギ	<i>bla</i> _{CTX-M} (new variant), <i>fosA3</i>
CH150-2	<i>Kluyvera sichuanensis</i>	サムライネギ	<i>bla</i> _{CTX-M} (new variant), <i>fosA3</i>
CHA113-3	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	キュウリ	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>mdf(A)</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aph(6)-Id</i>
CHA91-2	<i>Pantoea eucrina</i>	ニラ	<i>bla</i> _{TEM-1C} , <i>oqxB</i>
CHA96-3	<i>Enterobacter soli</i>	レタス	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>oqxB</i> , <i>oqxA</i> , <i>bla</i> _{ACT-6} , <i>fosA</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>tet(D)</i>

黄色でハイライトした遺伝子は *bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子を表している。

ゲノムデータに基づく菌種の同定は DFAST、耐性遺伝子の検出は ResFinder を利用して行った。

200 サンプルの市販野菜より 1,142 株を分離し、解析を行った。薬剤耐性遺伝子はある程度検出されたが、 β ラクタマーゼ遺伝子は AmpC 遺伝子が多く、そのほとんどは細菌が本来保有する内因性の耐性遺伝子であり、転移性を有するプラスミド性のもの (TEM、SHV、CTX-M など) は、他の由来サンプルと比較して少なかった。また、野菜分離菌の中に大腸菌は少なく、わずか 5 つの野菜サンプル (8、9、125、147、165) より分離されたのみであった (表 23)。しかも、今回分離された 11 株の大腸菌はいずれも調べた範囲の耐性遺伝子を保有しておらず、薬剤感受性であった。しかし、野菜から多剤耐性株が分離され、*bla*_{CTX-M} 遺伝子については新たな variant も検出されたことから、今後も野菜由来細菌のモニタリングを続けていく必要があると考えられる。

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Nariya H., Soliman, A.M., Shimamoto, T., Shimamoto, T. (2019) First detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from retail vegetable in Japan. 第 92 回日本細菌学会総会 (札幌市), 4 月 23 日～25 日.

補助資料 7 購入した野菜に関する情報

小売店で市販の野菜を購入し、サンプルとした。購入日、野菜名、産地、生産農家等、購入店舗名を記載した。No. 137～146 は、広島県竹原市の店舗で購入し、それ以外はすべて広島県東広島市の店舗で購入した。No. 7、48、54、141、143、163 の 6 サンプルは、それぞれ土付き野菜であった No. 6、47、53、140、142、162 を水道水で洗浄してサンプルとしたものである。“NA” は野菜 1 g あたりの生菌数 (log PFU/g)、“NA100” は野菜 1 g あたりのアンピシリン耐性菌数 (log PFU/g) を示している。“Rate of Amp^r” は各野菜サンプルの生菌数のアンピシリン耐性化率 (%) を示している。最下段にはそれぞれの平均値を示した。

補助資料 8 野菜より分離された菌株リスト（耐性遺伝子が検出された菌株のみ）

Eicosa-Plex PCR 法によって耐性遺伝子が検出された菌株をまとめた。

菌株名の CH は CHROMagar 培地より単離された菌株を、また CHA はアンピシリンを添加した CHROMagar 培地より単離された菌株を示している。CH または CHA の次の数字は分離した野菜サンプルの番号を表しており、ハイフンの次の数字がそれぞれの菌株番号に該当する。” Resistance genes” は、Eicosa-Plex PCR 法によって検出された AmpC 以外の耐性遺伝子を示している。intI1 はクラス 1 インテグロンを表しており、括弧内は検出された耐性遺伝子カセットを示している。” AmpC genes” は、検出された AmpC 遺伝子の種類を示している。” Species” は、16S rRNA 遺伝子配列より同定された菌種名を示している。なお、菌種が未同定または同定できなかった株は空欄になっている。” Resistance phenotypes” は、ディスク法の結果明らかになった薬剤耐性表現型を示しており、耐性（Resistance）となった薬剤名を記載し、括弧内は中間耐性（Intermediate）となった薬剤名を示している。” x” は、調べた 5 つの薬剤に対してすべて感受性（Sensitive）となったものであり、” - “ は、薬剤感受性試験を行わなかった菌株を示している。黄色でハイライトした菌株は、ゲノム解析を行った株である（表 24）。

(3) 家畜、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析に関する研究
エ. ヒトの臨床例から分離される薬剤耐性菌の解析 (佐藤豊孝 (北海道大学)、高橋聡 (札幌医大))

ヒトの臨床症例から分離された大腸菌について過去の分離株を含めた564株についてアンピシリン (ABPC) に対する感受性を確認し、 β -ラクタマーゼ遺伝子保有細菌については、プラスミド配列を含めた解析を行った。

研究内容・方法

2020 年 4 月から 12 月にかけて、札幌医科大学附属病院のヒト臨床検体から腸内細菌科細菌 (329 株) を分離・収集し、大腸菌を MALDI-TOF MS により同定した。大腸菌だった株は、微量液体希釈法による ABPC の感受性試験から ABPC 耐性率 (BP は 16 mg/L) を算出し、ABPC 耐性株を選択した。また第 3 世代セフォロスポリンであるセフポドキシム (CPDX) (BP は 4 mg/L) およびカルバペネム系抗菌薬であるメロペネム (MEPM) (BP は 2 mg/L) の微量液体希釈法による薬剤感受性試験も行った。これらの分離菌株の、系統発生分類 (phylogenetic grouping) および β -ラクタマーゼ遺伝子の検出を行なった。Phylogenetic grouping は、Clermont らの方法による multiplex PCR を行い、それぞれ Group A, B1, B2, C, E, D, F に分類した。 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出は Dallenne らの方法による multiplex PCR を行い、TEM, SHV, OXA, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group に分類した。加えて、TEM および CTX-M 型の β -ラクタマーゼ遺伝子のバリエーションの決定をサンガーシケン法または全ゲノム解析によって行った。2017-2019 年に本学附属病院の臨床検体から分離・同定済みの大腸菌 375 株においても同様の解析を行った。

研究結果

本学附属病院のヒト臨床検体から大腸菌 189 株を分離・同定した。そのうち、ABPC の MIC が >16 mg/L の大腸菌は 64 株 (ABPC 耐性率は 33.9%) であった (表 25)。CPDX 耐性株 (MIC が >4) は 38 株 (16.8%) であったが、MEPM 耐性株は認められなかった。また、2017-2019 年に同定・保存済みの大腸菌の ABPC 感受性を調査した結果、141 株 (37.6%) の ABPC 耐性大腸菌を認めた。CPDX 耐性株は 63 株 (20.0%) であったが、MEPM 耐性株は認められなかった。

これらの ABPC 耐性大腸菌について phylogenetic grouping を行なったところ、2017-19 年および 2020 年ともに Group B2 が全体の 70% 以上を占め優勢であった (表 26)。その他の Group の分布においても 2017-19 年および 2020 年の間で大きな差は認められなかった。以上から、臨床上問題となる ABPC 耐性大腸菌は系統学的に Group B2 が優勢であると考えられた。

β -ラクタマーゼ遺伝子の検出を行なった結果、2017-19 年および 2020 年ともに TEM が全体の約 60% 近くを占めた (表 27)。次いで、CTX-M-9 group が 19.1% (2017-2019 年) または 32.8% (2020 年) であった。以上から人臨床検体由来大腸菌の ABPC 耐性は TEM または CTX-M-9 group を保有する phylogroup B2 が dominant であることが明らかとなった。

TEM 型の β -ラクタマーゼ遺伝子の多くは TEM-1 型のバリエーションに属していた (表 28)。中でも TEM-1B が優勢であり ABPC 耐性大腸菌全体の約半数を占めた。CTX-M-9 group では、CTX-M-27 が主要なバリエーション (2017-19 年で 11.3%, 2020 年で 23.4%) であり、次いで CTX-M-14 (2017-19 年で 9.4%, 2020 年で 7.8%) であった。以上から人臨床検体由来大腸菌の ABPC 耐性の約半数が TEM-1B 型の β -ラクタマーゼ遺伝子を保有しており dominant となることを明らかにした。

β -ラクタマーゼ遺伝子保有株 156 株については「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」におい

てプラスミド配列を含めた比較解析を行った。本 156 株は、PCR で陽性であった 179 株の β -ラクタマーゼ遺伝子保有株のうち TEM 陽性株全株 (n=121 株) を選択し、TEM 陰性の β -ラクタマーゼ遺伝子保有株 (n= 35 株) を対象として任意に選択した。

表25. ヒト臨床検体由来大腸菌のABPC, CPDX, MEPM耐性率

分離年	株数	耐性率		
		ABPC	CPDX	MEPM
2017-2019	375	37.6% (141)	16.8% (63)	0%
2020	189	33.9% (64)	20.0% (38)	0%

表26. ヒト臨床検体由来大腸菌の系統発生分類 (Phylogenetic group) の結果

分離年	株数	Phylogenetic group						
		A	B1	B2	C	D	E	F
2017-2019	141	0.7% (1)	6.4% (9)	79.4% (112)	2.1% (3)	7.8% (11)	1.4% (2)	2.1% (3)
2020	64	4.7% (3)	6.3% (4)	70.3% (45)	0	14.1% (9)	0	4.7% (3)

表27. ヒト臨床検体由来大腸菌の β -ラクタマーゼの検出結果

分離年	株数	Beta-lactamase genes (<i>bla</i>)					
		TEM	SHV	OXA	CTX-M Group 1	CTX-M Group 2	CTX-M Group 9
2017-2019	141	59.6% (84)	0.7% (1)	2.8% (4)	5.7% (8)	0	19.1% (27)
2020	64	57.8% (37)	0	1.6% (1)	3.1% (2)	0	32.8% (21)

表28. ヒト臨床検体由来大腸菌の各 β -ラクタマーゼ遺伝子のバリエーションの決定

分離年	TEM				CTX-M group 1			CTX-M group 2	CTX-M group 9	
	1A	1B	1C	Other	1	15	55		14	27
2017-2019	2.1% (3)	47.5% (67)	4.3% (6)	5.7% (8)	1.4% (2)	2.8% (4)	1.4% (2)	0	7.8% (11)	11.3% (16)
2020	0	56.2% (36)	0	1.6% (1)	0	3.1% (2)	0	0	9.4% (6)	23.4% (15)

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.