

研究成果報告書

研究科題名	多剤耐性サルモネラの食品を介した健康被害のリスク評価に関する研究
主任研究者名	所属： 国立大学法人 帯広畜産大学 氏名： 牧野 壮一（研究課題番号：0504）

1. 研究の概要

世界中で、家畜飼育や水産養殖において、治療・予防や発育促進のために、多くの抗菌性物質が使用されてきた。一般的に抗菌性物質の使用により薬剤耐性菌が選択されることはよく知られているが、近年、特に畜産分野において選択される薬剤耐性菌が、食品を介してヒトに伝播し健康に影響を及ぼす可能性について、国内外の関心が集まっており、そのためのリスク評価の実施が必要であると考えられている。即ち、薬剤耐性菌が食品を介してヒトへ伝播し、ヒトが当該細菌による

感染症を発生した場合の治療効果の減弱が起きる可能性や、ヒトの体内で薬剤耐性の感受性菌への伝達による新たな薬剤耐性菌の出現の可能性などが危惧されている。しかし、これらの可能性の科学的な検証は行われておらず、しかも数多くの食品媒介感染症の中からハザードの特定は困難である。そこで、薬剤耐性菌の出現が及ぼすヒトの健康への被害の可能性を科学的に検証し、抗菌性物質のリスク評価の基礎データとすることを目的として、本研究を実施する。

本研究では、食品媒介性病原菌の種類は多いため、最終的には個々の病原体における個々の薬剤耐性についてリスク評価の実施が必要であるが、サルモネラに着目して実施する。その理由は、(1)家畜の疾病としても発生頻度が高く、(2)人獣共通感染症として、主に畜産物からヒトに伝播し、食中毒としても発生が多く、(3)遺伝学的な解析が充分行われ、実験室内で扱いやすい、(4)DT104サルモネラを中心に多剤耐性化する傾向が強くなり、(5)現在までサルモネラの薬剤耐性の調査研究成果が蓄積されている、(6)サルモネラを研究成果は他の腸管系病原菌にも応用可能であり、(7)サルモネラでは細菌学的検査法が確立されている、からである。

具体的な研究内容は、(1)家畜およびヒトの抗菌性物質の使用状況の把握、(2)家畜生産から食卓までの薬剤耐性菌の分離調査、(3)輸入食品の薬剤耐性菌の分離調査、(4)薬剤耐性決定因子（耐性因子）の試験管内および体内での伝達に関する研究、(5)動物用抗菌物質のヒト用抗菌性物質との交叉耐性の可能性の検証、(6)薬剤耐性菌に関する情報収集と解析、(7)薬剤耐性菌の食品を介した健康被害に関する解析、である。これらの研究は、耐性因子の中からハザードとなる対象を特定し、それに対する、発生評価、暴露評価、影響評価およびリスクの推定まで実施可能であり、抗菌性物質の食品健康影響評価のモデル的な科学的根拠を提示できると考えられる。

研究実施体制は主任研究者 牧野壮一を中心に、以下の課題を分担して班を組んだ。

- (1) 動物由来サルモネラの薬剤耐性、および動物性抗菌剤の使用に関する研究：動物衛生研究所 北海道支所・内田郁夫、帯広畜産大学・武士甲一、牧野壮一
- (2) 国産及び輸入鶏肉製品における耐性菌分離調査：帯広畜産大学・武士甲一、牧野壮一、川本恵子
- (3) 耐性出現頻度および耐性因子の体内での伝達に関する研究：帯広畜産大学・牧野壮一、川本恵子
- (4) 分子シミュレーションによる薬剤耐性メカニズムの解析：帯広畜産大学・牧野壮一（研究協力者：国立医薬品食品衛生研究所・安全情報部・中野達也）
- (5) 耐性菌に関する情報収集及び解析：帯広畜産大学・門平睦代

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要
個々の課題について示す。

①動物由来サルモネラの薬剤耐性、および動物性抗菌剤の使用に関する研究

動物衛生研究所・環境・常在疾病研究チーム(北海道支所) 内田郁夫
帯広畜産大学・武士甲一、牧野壮一

(1) 研究成果と概要

1) 目的

サルモネラは食中毒の主要な原因菌であり、なかでもネズミチフス菌 (*Salmonella* Typhimurium (ST)) は牛のサルモネラ症の原因菌としても重要である。ST は多剤耐性菌の出現も問題となっており、特に、フルオロキノロン系やセフェム系薬剤に対する耐性菌の出現が危惧される。この課題においては、家畜における耐性菌の出現状況調査の一環として、牛由来 ST の薬剤耐性に関する調査を実施する。

2) 方法

- ①1982年から2005年に分離された牛由来株397株の各種薬剤に対する耐性を1濃度ディスク法(センシディスク)によりスクリーニングした。
- ②エンロフロキサシン (ERFX) およびナリジクス酸 (NA) に対する最小発育濃度 MIC を測定した。
- ③ディスク法でセファゾリン (CEZ) 耐性となった菌株について、MIC を測定した。
- ④パルスフィールド電気泳動 (PFGE) は常法により実施した。

3) 結果の概要 (全年度通して)

- ① アンピシリン(A)、クロラムフェニコール(C)、ストレプトマイシン (S)、サルファー剤 (Su)、テトラサイクリン(T)、カナマイシン(K)、ナリジクス酸(N)の7剤に対する薬剤耐性を、1濃度ディスク法(センシディスク)によりスクリーニングしたところ、単剤耐性が17株(4.3%)、2剤耐性が21株(5.3%)、3剤耐性6株(1.5%)、4剤耐性9株(2.3%)、5剤耐性279株(70%)、6剤耐性41株(10%)であった。フェージ型DT104の特徴であるA、C、S、Su、Tの5剤に対する耐性株が195株(49%)みられ、2002年からこれにNあるいはKを加えた6剤耐性株の増加がみられた(表1)。
- ② ERFXのMICは $0.03 \mu\text{g/ml} \sim 4 \mu\text{g/ml}$ で、NAに耐性を示した7株はERFXのMICが $4 \mu\text{g/ml} \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ となり、NA耐性株がERFX低感受性となる傾向を示した(表2)。NA耐性となった7株において、*gyrA* 遺伝子の点変異にもとづくアミノ酸置換、が認められた(表3)
- ③ 1983年分離株2株と2004および2005年分離株28株にセファゾリン耐性株が検出された。1983年分離株のMICは $16 \mu\text{g/ml}$ から $32 \mu\text{g/ml}$ 、2004年分離株においては $128 \mu\text{g/ml}$ 以上であった(表4)。
- ④ 2004年および2005年分離のセファゾリン耐性株のPFGEプロファイルはお互いに同一であり、単一のクローンであることが示唆された。また、このプロファイルは1983年分離株のものとは異なっていた(図1)。

表1 牛由来STの薬剤耐性型

薬剤耐性型	分離年																	計
	S57	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	
ACSSuTK																18	17	35
ACSSuTN				2										4				6
ASSuTK														15	18	37	13	83
ACSSuK			1															1
ACSSuT			3		6	34	15	14	10	15	30	5	13	14	28	7	1	195
ASSuT									1		1		2					4
ASuTK															2		1	3
CSSuT			1															1
SSuTN				1														1
SSuT									1		2				1	1		5
STK	1																	1
ASu											1							1
CSu													1					1
SuT														3		9		12
SuN				1														1
SSu						2	1			1	2							6
S										1								1
Su	2	2	1										1	2	1	3	2	14
T			1													1		2
—				1									2	2	5	8	6	24
計	3	2	7	5	6	36	16	14	10	19	33	8	17	42	55	84	40	397

A, アンピシリン;C, クロラムフェニコール;S, ストレプトマイシン;Su, スルファメチゾール;T, テトラサイクリン;K, カナマイシン;N, ナリジクス酸;—, 耐性なし

表2 ナリジクス酸とエンロフロキサシンのMIC

NA MIC (μ g/ml)	ERFX											計						
	≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32							
128<					2*	2	2	1										7
128																		0
64																		0
32																		0
16					1													1
8			34	6														40
4	37	289	2															328
≤ 2	6																	6
計	43	323	8	1	2	2	2	1	0	0	0							382

* : 菌株数

②国産及び輸入鶏肉製品における耐性菌分離調査

帯広畜産大学・武士甲一、牧野壮一、川本恵子

日本国内で流通する鶏肉（国産及び輸入品）のサルモネラ属菌，カンピロバクター属菌及びリステリア属菌による汚染実態および薬剤耐性を調査し，当該食品を介した食中毒の発生の可能性について考察した。

1. 研究の成果と概要

試験に供した当該製品は 100 検体で，その内訳は国産 65 検体，ブラジル産 23 検体，米国産 11 検体及び中国産 1 検体である。サルモネラ属菌、リステリア属菌ならびにカンピロバクター属菌の検査結果を簡単にまとめた表を下記に示す。

(1) サルモネラ属菌

供試 100 検体のうち，16 検体からサルモネラ属菌が分離され（汚染率 16.0%），鶏肉のサルモネラ属菌による汚染率は高いことが判明した。国産の 15 検体から O4 群，O7 群，O8 群，O UT(Untypable)の血清型が分離され，また，ブラジル産の 1 検体から O9 群が分離された。見掛け上国産鶏肉の汚染率が輸入品よりも高い傾向にあるが，このことは，輸入品が長期間冷凍状態で保存されることにより，死滅もしくは VBNC 状態に陥っていることに起因し，必ずしも輸入品の汚染率が低いとは考えられない。サルモネラ属菌による危害発生を未然に防止するためには，低温保存，十分な加熱調理，調理後の迅速摂取を徹底する必要がある。以下，サルモネラ属菌の検査プロトコールを試験法 1 に示す。

(2) リステリア属菌

供試 100 検体のうち，リステリア属菌は 64 検体から検出された（汚染率 64.0%）。このうち *L. monocytogenes* は 48 検体から検出され（汚染率 48.0%），また，*L. innocua* 及び *L. welshimeri* などのリステリア属菌が同時に検出された試料は 33 検体であった。このうちリステリア属菌は国産鶏肉の 44 検体から検出され，また，輸入品の 20 検体から検出された。今回は，*L. monocytogenes* の血清型および病原性因子ならびに遺伝学的解析を行わなかったが，本菌は食中毒菌に指定されているのでその取扱いについては十分に注意する必要がある。以下，リステリア属菌の検査プロトコールを試験法 2 に示す。

(3) カンピロバクター属菌

供試 100 検体のうち，カンピロバクター属菌は 59 検体から検出された（汚染率 59.0%）。このうち *C. jejuni* は 56 検体から検出され（汚染率 56.0%），また，*C. coli* は 3 検体から検出された（汚染率 3.0%）。分離された 59 株の *C. jejuni* のうち 30 株はナリジクス酸に耐性で，分離された 3 株の *C. coli* のうち 2 株はナリジクス酸に耐性であった。カンピロバクター属菌は国産品の 53 検体から，また，輸入品の 6 検体から検出され，サルモネラ属菌による汚染と同様，国産鶏肉の汚染が見掛け上輸入品よりも高い汚染率を示したが，このことは長期間の冷凍保存による本菌の死滅あるいは VBNC への移行によると考えられた。以下，カンピロバクター属菌の検査プロトコールを試験法 3 に示す。

(4) 薬剤耐性

薬剤耐性菌の調査は、分離されたサルモネラの薬剤耐性を調べるために，センシディスク (Becton Dickinson) を使用した。使用方法はマニュアルに従った。以下に示す 8 種類の抗生物質に対するディスクを使用した：ampicillin (Am) 10µg, chloramphenicol (Cm) 30µg, kanamycin (Km) 30µg, nalidixic acid (Nal) 30µg, streptomycin (Sm) 10µg, sulfisoxazole (Su) 250µg, tetracycline (Tc) 30µg and gentamicin (Gm) 10µg。カンピロバクター属菌に関しては，nalidixic acid (Nal) 30µg のみを調べた。その結果、次の表に示すようにカンピロバクター属菌は数多くが nalidixic acid 耐性であ

り、キノロン耐性菌が国内外を問わず分離されることが明らかとなった。また、サルモネラ菌に関しては、全て、sulfisoxazole と tetracycline 耐性菌で、他の薬剤に対しては感受性であった。

輸入および国産鶏肉のサルモネラ・カンピロバクター・リステリア検査結果

鶏肉の種類	検体数	サルモネラ属菌	カンピロバクター属菌	リステリア属菌
		陽性数	陽性数 (うち NA*耐性率)	陽性数 (うち LM**汚染率)
国産鶏肉	65	15	53 (30%)	44 (66%)
輸入鶏肉	35	1	6 (83%)	20 (80%)

*NA:ナリジクス酸

**LM:*L. monocytogenes*

試験法 1 : サルモネラ属菌

1 試験対象食品

食肉製品

2 試験法の原理

緩衝ペプトン水での前培養及び選択増菌培養を行い、選択分離培地で増殖されたものに対してサルモネラ属菌の性状検査を行い確認する。

3 試験法の出典

- (1) 食品,添加物等の規格基準(昭和34年12月28日厚生省告示第370号)
- (2) 食品衛生法施行規則及び食品,添加物等の規格基準の一部改正について
(平成5年3月17日 衛乳第54号)
- (3) 食品衛生検査指針(微生物編)、厚生労働省監、2004年

4 器具及び試薬と、その調製方法

(1) 器具装置

- ア 天秤
- イ ストマッカー
- ウ 孵卵器
- エ オートクレーブ
- オ 乾熱滅菌器
- カ 試料採取用具：ハサミ、スパーテル、ピンセット等を滅菌缶などに入れ、160～180℃
60分間の乾熱滅菌又は、121℃15分間の高圧滅菌をし、使用直前まで滅菌状態を保ったもの。
- キ 滅菌容器(カップ、ストマフィルター等)
- ク ガラス器具(フラスコ、試験管、広口瓶 等)
- ケ 滅菌ピペット、滅菌チップ、クレイギー管

(2) 試薬・培地等

- ア 増菌培地
 - (ア) 緩衝ペプトン水(BPW : Buffered Peptone Water)
- イ 選択増菌培地
 - (ア) ラパポート培地(RV培地)(栄研)
100℃、20分間加熱溶解後に15mlずつ分注して使用する。

- ウ 分離培地（市販の生培地の利用）
 - (ア) 硫化水素産生により判定できる培地（下記のうち1種類）
 - a SS-PLUS 寒天（極東）
 - b DHL 寒天（日本ビオメリュー）
 - c SS 寒天（日本ビオメリュー）
 - (イ) 硫化水素非産生でも判定できる培地(必要に応じて使用)
 - a クロモアガーサルモネラ（関東化学）
 - b BGS（ブリリアントグリーン寒天にスルファピリジンを添加：OXOID）
 - c BGM（改良ブリリアントグリーン寒天：OXOID）
- エ 確認培地
 - (ア) TSI 寒天（アイサイエンス）
 - (イ) LIM 培地（アイサイエンス）
 - (ウ) シモンズクエン酸培地、VP 半流動培地（アイサイエンス）
- オ 診断用免疫血清（デンカ生研）
 - (ア) O 抗原診断用免疫血清
 - (イ) H 抗原診断用免疫血清及び相誘導用免疫血清
- カ 簡易同定キット（API20E）

5 試験方法

(1) 試料調整

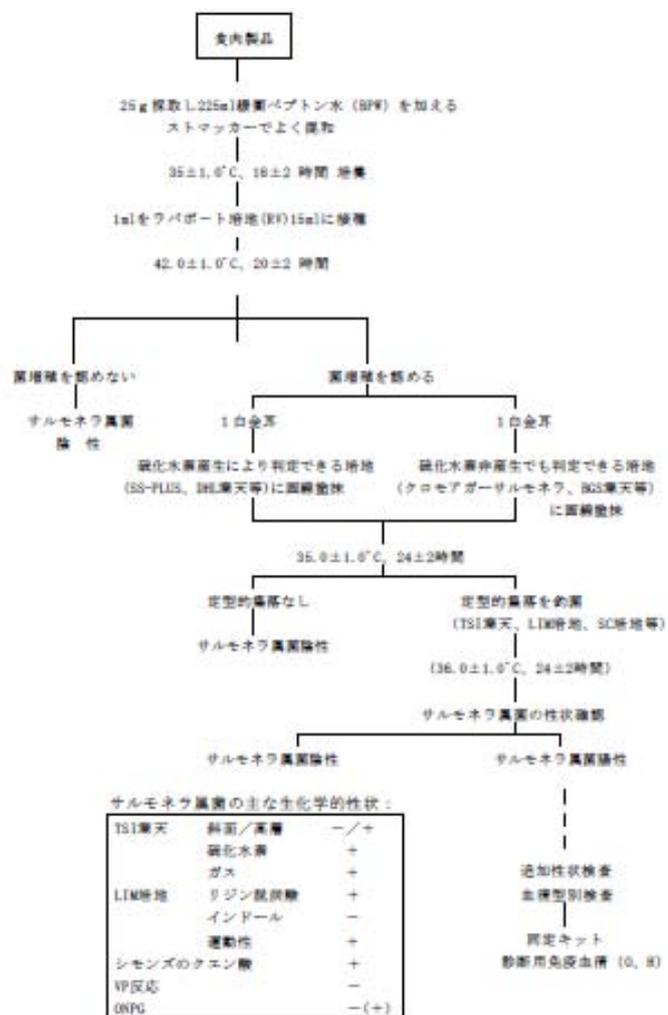
切断すべき面をアルコール綿でよく消毒した後、滅菌した器具を用いて無菌的に切断し、その断面の中央部から 25g を無菌的に採り試料とする。

(2) 試験法

ア 試料 25g を無菌的に細切し BPW 225ml に混和し、 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 18 ± 2 時間培養した後、培養液 1 ml をラパポート培地(RV 培地)15 ml に接種して、 $42.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 20 ± 2 時間培養し、菌増殖を認めないものは、サルモネラ属菌陰性とする。

イ 菌増殖を認めた場合は、直ちに 1 白金耳量を 2 種類の分離平板培地（硫化水素産生により判定できる培地（5(2)ウ(ア)のいずれか 1 枚）及び必要に応じて硫化水素非産生でも判定できる培地（5(2)ウ(イ)のいずれか 1 枚）に画線塗抹し、 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養する。

ウ 各分離平板培地に発育・増殖したサルモネラ属菌の定型的集落を鈎菌して、TSI 寒天、LIM 培地およびシモンズクエン酸寒天に接種し、 $35.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 24 ± 2 時間培養後、サルモネラ属菌の性状を示したものについてはサルモネラ属菌と判定し、血清学的試験及び生化学的試験（同定用キットの使用も可。）を行いサルモネラと同定し、サルモネラ属菌陽性とする（血清学的試験及び生化学的試験の詳細は食中



毒原因物質、サルモネラの SOP を参照)。その他の性状を示した場合は陰性とする。

6 結果の取り扱い

食肉製品(非加熱食肉製品、特定加熱食肉製品、加熱殺菌後容器包装食肉製品)

成分規格：サルモネラは陰性でなければならない。

7 検査結果の記録作成方法

別に定める記録表により作成する。

試験法 2：リステリア属菌

1 試験対象食品

食肉製品および食品全般

2 試験法の原理

リステリア属菌の中で、ヒトあるいは動物に起病性のある *Listeria monocytogenes* を選択培地で増菌させ、選択分離培地で分離し、性状等検査を行い、*L.monocytogenes* を検出する。

3 試験法の出展

(1)食品衛生検査指針(微生物編)：厚生労働省監修、2004年

(2)食品微生物検査マニュアル(新版)：栄研器材(森地敏樹監修)、2002年

(3)乳及び乳製品のリステリアの汚染防止について：厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知、衛乳第169号、平成5年8月2日

4 器具および試薬とその調整法

(1)器具・装置

ア 天秤

イ ストマッカー

ウ オートクレーブ

エ 滅菌採取器具

ハサミ、スパーテル、ピンセット等を滅菌缶などに入れ、160～180℃で60分間乾熱滅菌、または121℃で15分間高圧蒸気滅菌し、使用直前まで滅菌状態を保持する

オ 乾熱滅菌器

カ 滅菌シャーレ

キ 試験管

ク 三角フラスコ・メスシリンダー

ケ 恒温水槽

コ 滅菌ストマッカー用袋

サ 孵卵器(30℃、35℃)

シ 滅菌スピッツ

ス 顕微鏡

セ 恒温槽

(2)試薬、培地等

ア アルコール綿：カット脱脂綿に消毒用アルコールをしみこませ密閉容器に保管。

イ ハーフ・フレーザー培地(OXOID)

フレーザーブイオン 25.8g を蒸留水 450ml に溶解後、121℃、15分間高圧蒸気滅菌する。約50℃に冷却後にハーフ・フレーザーサプリメント(エタノール 5ml：蒸留水 5ml で溶解：OXOID)2 vial を無菌的に添加し、十分に攪拌する。

ウ フレーザー培地

フレーザーブイオン 28.7g を蒸留水 500ml に溶解後、121℃、15分間高圧蒸気滅菌する。

約50℃に冷却後にフレーザーサプリメント(エタノール 5ml：蒸留水 5ml：OXOID) 1vial を無菌的に添加し、十分に攪拌する。10ml ずつ滅菌試験管に分注する。

エ パルカム寒天

パルカム寒天基礎培地(OXOID)34.5g を 500ml の蒸留水に溶解後、沸騰するまで加熱する。121℃、15 分間高圧蒸気滅菌し、約 50℃に冷却後、パルカム選択サプリメント(OXOID)1 vial を無菌的に添加し、十分に攪拌した後にシャーレに分注し、クリーンベンチ内等で固化させる。

オ クロモアガー・リステリア

クロモアガー・リステリア基礎培地 58.0g を 1,000ml の蒸留水に溶解し、121℃、15 分間高圧蒸気滅菌する。約 50℃に冷却後、サプリメント(蒸留水を加えてスターラーなどで完全に溶解させる。溶解が困難なため、30 分以上は攪拌し、クリーム状の液にする)を加え、基礎培地を穏やかに攪拌しながら良く混和させ、無菌的にシャーレへ分注し、固化させる。

カ 6%酵母エキス加トリプトソイ寒天(TSYEA：斜光法による発色)

キ 血液寒天(溶血性、CAMP 試験：市販品)

CAMP 試験用菌株：*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Rhodococcus equi ATCC 6939

Listeria monocytogenes ATCC 19115

ク 3%過酸化水素水(カタラーゼ試験)

ケ グラム染色液

コ VP 半流動培地および VP 試薬

サ 糖分解試験

CTA Medium(BBL)を基礎培地として、0.5%にキシロース、ラムノースおよびマンニットを添加し、加熱溶解後に小試験管に 3ml ずつ分注し、115℃、15 分間滅菌する。

シ カシトン培地(運動性、菌株保存：市販品)

ス 同定キット(API Coryne：日本ビオメリュー)

5 試験方法

(1)試料の調整

検体を容器包装のまま採取し、表面を消毒用アルコール綿でよく拭いた後、滅菌器具を用いて無菌的に細切して、その 25g を試料とする。

(2)検査手順

ア 増菌培養

ア) 試料 25g をストマッカー袋に入れ、これに 225ml のハーフ・フレイザー培地を加えて約 60 秒間ストマッカーでホモジナイズする。

イ) 30±1℃、24±2 時間培養する。

ウ) ハーフ・フレイザー培地の培養液 0.1ml をフレイザー培地 10ml に接種する。

エ) 35±1℃、48±2 時間培養する

イ 分離培養

ア) 培養液をパルカム寒天およびクロモアガー・リステリア寒天へ画線塗抹する。

イ) 35±1℃、24 時間(クロモアガー・リステリア寒天)～48 時間(パルカム寒天)培養する。

エ) 疑わしい集落

パルカム寒天：約 2mm、灰緑色、中央に



くぼみ、赤い培地に黒色のハロー形成。

クロモアガー・リステリア：水色の集落に円形のハロー形成。*L.ivanovii* が同様の集落を示す場合がある。

わ) 疑わしい集落を 5 個釣菌し、血液寒天あるいは TSYEA 培地に塗抹する。

か) 30±1℃、24±2 時間培養する。

を) 羊血液寒天での β-溶血あるいは TSYEA 培地での斜光法により真珠様青緑色を示した場合に疑わしい集落として以下の性状検査を行う。

ウ 性状検査

ア) 表 1 *Listeria monocytogenes* の性状

性状試験項目	性状
グラム染色	陽性、無芽胞、単桿菌
カタラーゼ試験	+
運動性	+(傘状発育)
VP 反応	+
β-溶血	+
糖分解試験	
ラムノース	+
キシロース	-
マンニット	-
CAMP 試験： <i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Rhodococcus equi</i>	-

イ) グラム染色

常法どおりに行う。

ロ) カタラーゼ試験

スライドガラス上で 3% H_2O_2 と被検菌を混ぜ合わせ、気泡の出たものを陽性とする。

エ) 運動性

カシトン培地に線刺して、25±1℃、2～5 日間培養する。

5 日間培養のほうに傘状発育(表層から 3～5mm 下)が明瞭となる。

VP 半流動培地での傘状発育は明瞭ではない。

カ) VP 反応

VP 半流動培地に線刺し、30±1℃、2～3 日間培養した後に VP 試薬を添加し、赤色になった場合を陽性とする。

キ) 糖分解試験

糖分解試験用培地に接種し、35±1℃、3 日間培養後に黄色に変化した場合を陽性とする。

ク) CAMP 試験

* 羊血液寒天へ *Staphylococcus aureus* および *Rhodococcus equi* を平行に塗抹する。

* 両菌種の間被検菌を 2～3mm 離して直角に塗抹する。

* 35±1℃、18～24 時間培養する。

* *L.monocytogenes* の β 溶血は狭い範囲で認められ、*S.aureus* でのみ β 溶血部分で鮮明に増強されるが、*R.equi* での溶血の増強は認められない。

L.monocytogenes の一部の株で *R.equi* でも溶血が増強されるものがある。

* *L.ivanovii* の β 溶血は幅広く、*R.equi* でのみ増強(錨状)が認められる。

(3) 検査にあたっての注意事項

ア) 検体の取扱いおよび試験操作等において、試験室内事故(L.A.)が生じないように充分注意する。

り)次の場合は L.A.とし、原因を究明し、改善策を講じた後に保存試験品を用いて再検査を行う。

＊培地対照から菌が検出された場合

＊試験工程で汚染されたことが明らかな場合

＊その他不相当と思われる場合

り)試料採取後の残余の検体は滅菌容器に入れ、速やかに冷凍保存する。

6 結果の取り扱い

(1)陽性の場合、陽性/25g とする。

7 結果の評価方法

(1)成分規格：ナチュラルチーズは陰性でなければならない。

(2)リステリア属菌の中で *L.monocytogenes* のみがヒトに病原性があることから、食品検査では *L.monocytogenes* のみが検査対象となる。

8 検査記録の作成

検査記録の作成は別に定める検査作業記録簿および検査結果記録簿による。

試験法 3：カンピロバクター属菌

1 試験対象食品

食肉製品

2 試験法の原理

カンピロバクター属菌の中で、食中毒に関連のある高温性カンピロバクターをスキロー寒天を用いて 42℃で微好気培養して検出する。

3 試験法の出展

(1)食品衛生検査指針(微生物編)：厚生労働省監修、2004 年

(2)食品微生物検査マニュアル(新版)：栄研器材(森地敏樹監修)、2002 年

4 器具および試薬とその調整法

(1)器具・装置

ア 天秤

イ ストマッカー

ウ 混合ガス孵卵器(微好気培養用)

エ コロニーカウンター

オ オートクレーブ

カ 滅菌採取器具

ハサミ、スパーテル、ピンセット等を滅菌缶などに入れ、160～180℃で 60 分間乾熱滅菌、または 121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌し、使用直前まで滅菌状態を保持する

キ 乾熱滅菌器

ク 滅菌シャーレ

ケ 試験管

コ 三角フラスコ

サ 恒温水槽

- シ 滅菌ストマッカー用袋
- ス 滅菌コンラージ棒
- セ 孵卵器
- ソ 滅菌スピッツ
- タ 遠心器

(2)試薬、培地等

- ア アルコール綿：カット脱脂綿に消毒用アルコールをしみこませ密閉容器に保管。
- イ スキロー寒天(変法スキロー培地 EX：日水)
- ウ 血液寒天(市販品)、ミューラーヒントン寒天(市販品)
- エ 感受性ディスク(NA, CET : 30 μg)
- オ オキシダーゼ試験紙
- カ 3%過酸化水素水
- キ グラム染色液
- ク 普通ブイヨン
- ケ プレストンカンピロバクター選択サプリメント(OXOID：SR117)
- コ カンピロバクター発育サプリメント(OXOID：SR84)
- サ プレストンのカンピロバクター選択増菌培地

普通ブイヨン(日水)15gを蒸留水 475mlに懸濁し、加温溶解後 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌し、室温まで冷却する。次いで 25ml の馬溶血液、選択サプリメント 1 バイアル (1:1 アセトン・蒸留水)2ml および発育サプリメント 1 バイアルを無菌的に添加する。

- シ 馬溶血液
- ス 馬尿酸ナトリウム
- セ ニンヒドリン試薬

アセトン 50ml とブタノール 50ml にニンヒドリン 2g を溶解し、褐色瓶に入れ、室温保存する。

- ソ ペプトン(Difco)
- タ 同定キット(API Campy：日本ビオメリユール)

5 試験方法

(1)試料の調整

検体を容器包装のまま採取し、表面を消毒用アルコール綿でよく拭いた後、滅菌器具を用いて無菌的に細切して、その 25g を試料とする。

(2)検査手順

ア 試料の作成

試料 25g をストマッカー袋に入れ、これに 225ml のカンピロバクター増菌培地を加えて約 60 秒間ストマッカーでホモジナイズし、試料とする。

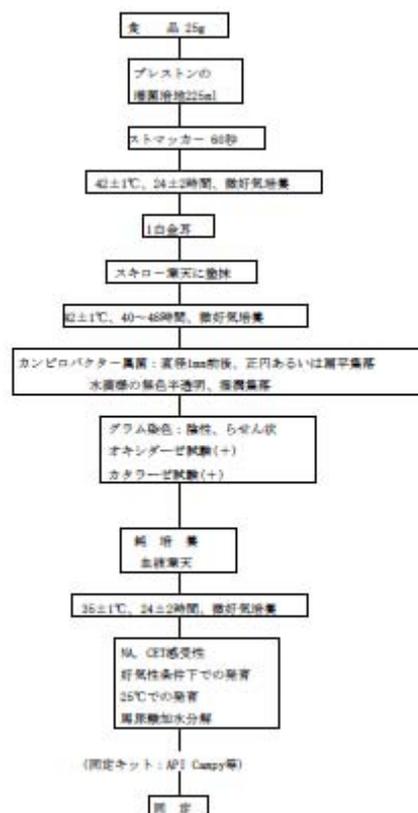
イ 増菌培養

試料をストマッカー袋のまま、42±1℃、24±2 時間微好気培養する。

ウ 分離培養

スキロー寒天に塗抹し、42±1℃、40～48 時間、微好気培養する。

エ 同定菌種同定は血液寒天で純培養し、生化学性状等



の検査を (3)ウおよびフローチャート(表 1 を参照)従って同定する。

(3)検査にあたっての注意事項

ア スキロー寒天の表面が湿潤しているとカンピロバクター属菌は遊走するので、よく乾かしてから使用する。

イ 馬溶血液の作り方

市販の馬血液を用いて、凍結・融解を 4 回以上行う。

ウ 生化学性状等の検査方法

①好気培養での発育

血液寒天に塗抹し、35±1℃、48 時間好気培養して、発育の有無を観察する。

②オキシダーゼ試験

新鮮培養菌を用いて、オキシダーゼ試験紙により行い、青紫色になったものを陽性とする。

③カタラーゼ試験

スライド

ガラスに 3%過酸化水素水を一滴とり、血液不含培地の新鮮培養菌と混ぜ合わせ、ガス(泡)が発生したものを陽性とする。

④NA および CET 感受性試験 (KB 法)

NA: R(≤13mm)、I(14~18mm)、S(≥19mm)CET: R(≤14mm)、I(15~17mm)、S(≥18mm)

⑤馬尿酸加水分解

1%馬尿酸ナトリウム液 0.4ml に培養菌を濃く浮遊させ、35℃±1℃で 2 時間反応後、3,000rpm・20 分遠心沈殿し、その上清にニンヒドリン試薬を 0.1ml 添加して、35± 1℃、30~60 分間反応させた後に濃紫色になったものを陽性とする。

陽性対照には 2%グリシン水溶液または既知陽性菌株を用いる。

6 結果の取り扱い

(1)増菌培養で陽性の場合、陽性/25g とする。

(2)結果の評価方法

ア 次の場合は試験室内事故(L.A.)として記録するとともに、原因を究明し、改善措置を講じた後に保存検体を用いて再検査する。

- ① 空試料(陰性対象)から菌が検出された場合。
- ② ②試験途中で汚染されたことが明らかな場合。
- ③ その他検査が不相当と思われる場合。

7 検査記録の作成

検査記録の作成は別に定める検査作業記録簿および検査結果記録簿による。

表1 高病原性カンピロバクター属の主な鑑別性状

	<i>C. jejuni</i> <i>doylei</i>	<i>C. jejuni</i> subsp.	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
オキシダーゼ	+	+	+	+
カタラーゼ	+	d	+	+
硝酸塩還元	+	-	+	+
25℃発育	-	-	-	-
42℃発育	+	-	+	+
馬尿酸加水分解	+	d	-	-
NA感受性 (30 μg)	S*	S	S*	R
CET感受性 (30 μg)	R	S	R	R
亜硝酸塩還元	-	-	-	-
1%グリシン加での発育	+	+	+	+
酸化水素 (TSI寒天)	-	-	-	-
酢酸インドキシル	+	+	+	-
ウレアーゼ	-	-	-	d

+: 陽性, S: 感受性, -: 陰性, R: 耐性, d: 菌株により異なる

*: 国内分離株の10~20%に耐性株がある

③耐性出現頻度および耐性因子の体内での伝達に関する研究

帯広畜産大学・牧野壮一、川本恵子

1. 目的

サルモネラ菌は世界の主要な食品媒介病原体として知られており、動物由来食品の汚染は人間のサルモネラ感染症の主要原因である。最近、人間と動物において、抗生物質は広く使用されており、耐性菌の出現の大きな要因となっている。特に、1984年に最初にイギリスで検出された多剤耐性サルモネラ、*S. Typhimurium* DT104 が出現し問題となってきた。耐性遺伝子が他の細菌種に容易に水平伝播し、その結果、耐性菌により人間や動物の化学療法に深刻な障害になる可能性が危惧されている。日本でも、薬剤耐性サルモネラの分離が報告されている。この研究では、豚におけるサルモネラの汚染状況の把握と薬剤耐性菌の出現、および耐性遺伝子の伝播について研究を行い、食肉から人へ耐性菌が移る可能性について検討した。

2. 方法

食肉検査所にて、計 103 個の糞便、および 1 個の肉のサンプルを集め、サルモネラの分離・同定を行った。サンプル各 0.1g を 0.9ml のバッファー・ペプトン水と混合し、18 時間、37℃で培養した。翌日、培養液の 0.1ml を 10ml のラポポート培地（関東化学株式会社）に接種し、24 時間、42℃で培養した。培養液の一部を DHL 寒天（栄研化学株式会社）と CHROMagar TM Salmonella（関東）上で培養した。サルモネラの同定には、TSI 培地（栄研）と LIM 培地（栄研）が使用された。サルモネラ血清型別は、Salmonella 診断用抗血清（デンカ生研）によって決定された。

分離されたサルモネラの薬剤耐性を調べるために、センシディスク（Becton Dickinson）を使用した。使用法はマニュアルに従った。以下に示す 8 種類の抗生物質に対するディスクを使用した：ampicillin (Am) 10μg, chloramphenicol (Cm) 30μg, kanamycin (Km) 30μg, nalidixic acid (Nal) 30μg, streptomycin (Sm) 10μg, sulfisoxazole (Su) 250μg, tetracycline (Tc) 30μg and gentamicin (Gm) 10μg。次に、分離されたサルモネラの遺伝学的相関性を調べるために、制限酵素 *Xba*I と *Bln*I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>) の方法に従った。

S. Typhimurium は抗生物質に耐性であったので、No.7 株が R プラスミドを保有しているかどうか、液体およびフィルタによる伝達接合試験で調べた。受容菌は大腸菌 C600 (Rif^r) と *S. Typhimurium* LT2 (Nal^r) 株を使用し、No.7 株をドナー株として使用した。L-ブロス为基础培地として使用した。ドナー株と受容株を混合し、transconjugant は Rif 100μg/ml もしくは Nal 50μg/ml を含む DHL 寒天上で、さらに Am 100μg/ml, Tc 30μg/ml, Cm 30μg/ml および Km 50μg/ml を含む DHL 寒天上で選択した。ネズミ体内で耐性遺伝子が伝達するかどうかを、*S. Typhimurium* No.7 株と *S. Typhimurium* LT2 株の同量をネズミ体内に経口的に接種し、耐性遺伝子を獲得した LT2 株を糞便から分離し、頻度を調べた。

3. 結果

全てのサンプルのうち 15 サンプルから、サルモネラが分離された。血清型別による内訳は、*S. Typhimurium* が 7 (6.7%)、*S. Derby* が 2 (1.9%)、*S. Southampton* が 2 (1.9%)、そして *Salmonella* (O4:d,-) が 4 (3.8%) 検体の分離であった (表 1)。*S. Typhimurium* は 4 農場から分離された。薬剤耐性については、分離された *S. Typhimurium* は全てが 1~5 種類の抗生物質に耐性があったが、他の血清型は調べた種類の抗生物質に対して感受性であった (表 1)。多剤耐性 *S. Typhimurium* に関して、DT104 に特異的なプライマーセット、DT104-F (5'-GTCAGCAGTGTATGGAGCGA-3') と DT104-R (5'-AGTAGCGCCAGGACTCGTTA-3')、による PCR を行ったが、DT104 は分離できなかった。PFGE 解析では、*Bln*I および *Xba*I 切断により、5 パターンに分類された (表 1, 図 1, 図 2, 図 3)。さらにタイプ X2 と B2 は、わずかの差により 3 パターンに分類された (表 1, 図 1)。また、すべての株のプラスミドプロファイル調べても、わずかの差はある

ものの、大きいプラスミドを保有していた。伝達試験の結果、Am, Km および Tc 耐性 transconjugant は、大腸菌 C600 と *S. Typhimurium* LT2 では約 10^{-3} の頻度で得られた。ネズミを用いた伝達試験の結果、Km と Tc 耐性の transconjugant は *S. Typhimurium* LT2 で、約 10^{-6} の頻度で分離された。

4. 考察

S. Typhimurium No.1 株の PFGE パターンは、薬剤耐性パターンが異なるにもかかわらず、別の農場から採取された No.11 and No.14 株と同じパターンを示していた (表 1, 図 1)。同様に、*S. Southampton* No.10 株と No.15 株の PFGE パターンはお互いほとんど同じであった (表 1, 図 3)。また、農場 II では、分離日付が 2 週間の間隔があったにもかかわらず、4 株の *Salmonella* (O4: d) では同じ PFGE パターンを示した (表 1, 図 2, 図 4)。これらの結果は、似た遺伝子型をもつサルモネラがブタおよび農場間で既に広まっていることを示しているのかもしれない。また、今回の調査では DT104 と同じパターンを示すブタ由来検体はなかった。DT104 はこれまで一般的にヒトや牛から分離・同定されてきたが、日本のブタの中であまり広く分布していないのかもしれない。

ネズミの体内で耐性遺伝子が他の菌に伝達したことから、耐性菌により汚染された食品を摂取すると、腸管において新たな耐性菌が出現がする可能性が示唆された。

キーワード：サルモネラ，薬剤耐性，豚

表 1. Antimicrobial resistance patterns and genotypes of *Salmonella* isolates

Isolates	Isolation date	Source	Farm	Resistant pattern	PFGE pattern		Ability of conjugal transfer
					XbaI	BlnI	
<i>S. Typhimurium</i> No. 1	2006/12/14	Stool	I	CmSu	X1	B1	-
<i>S. Typhimurium</i> No. 2	2006/12/14	Meat	II	AmKmSuTc	X2a	B2a	-
<i>S. Typhimurium</i> No. 4	2006/12/14	Stool	II	AmKmSuTc	X2b	B2b	-
<i>S. Typhimurium</i> No. 6	2006/12/14	Stool	II	AmKmSuTc	X2b	B2c	-
<i>S. Typhimurium</i> No. 7	2006/12/14	Stool	II	AmKmSuTcSm	X2a	B2c	+
<i>S. Typhimurium</i> No. 11	2006/12/15	Stool	III	Su	X1	B1	NT
<i>S. Typhimurium</i> No. 14	2006/12/15	Stool	IV	Su	X1	B1	NT
<i>Salmonella</i> (O4:d,-) No. 3	2006/12/14	Stool	II	-	X3	B3	NT
<i>Salmonella</i> (O4:d,-) No. 5	2006/12/14	Stool	II	-	X3	B3	NT
<i>Salmonella</i> (O4:d,-) No. 8	2006/12/21	Stool	II	-	X3	B3	NT
<i>Salmonella</i> (O4:d,-) No. 9	2006/12/21	Stool	II	-	X3	B3	NT
<i>S. Southampton</i> No. 10	2006/12/21	Stool	II	-	X4	B4	NT
<i>S. Southampton</i> No. 15	2006/12/21	Stool	V	-	X4	B4	NT
<i>S. Derby</i> No. 12	2006/12/15	Stool	VI	-	X5	B5	NT
<i>S. Derby</i> No. 13	2006/12/15	Stool	VI	-	X5	B5	NT

NT: Not tested

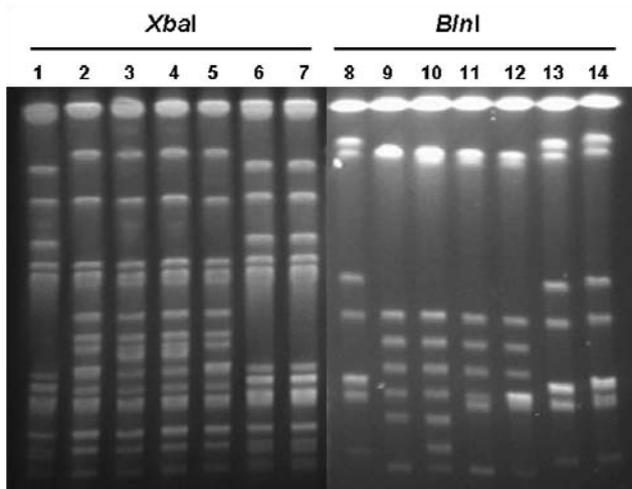


图1. PFGE pattern of *S. Typhimurium* isolates. Total DNA of isolates No.1 (lanes 1 and 8), No.2 (lanes 2 and 9), No.4 (lanes 3 and 10), No.6 (lanes 4 and 11), No.7 (lanes 5 and 12), No.11 (lanes 6 and 13), No.14 (lanes 7 and 14) was digested with *XbaI* (lanes 1 to 7) or *BlnI* (lanes 8 to 14).

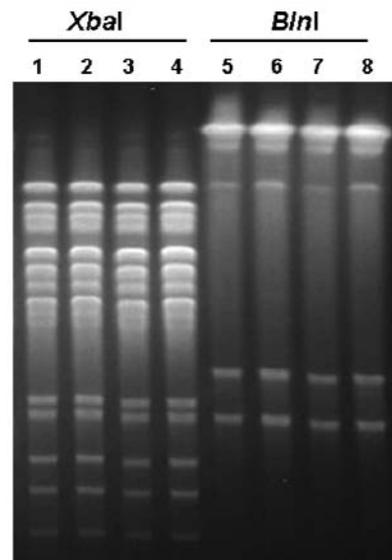


图2. PFGE patterns of *Salmonella* UT(O4:d-) isolates. DNA of isolates No.3 (lanes 1 and 5), No.5 (lanes 2 and 6), No.8 (lanes 3 and 7), No.9 (lanes 4 and 8) was digested with *XbaI* (lanes 1 to 4) or *BlnI* (lanes 5 to 8).

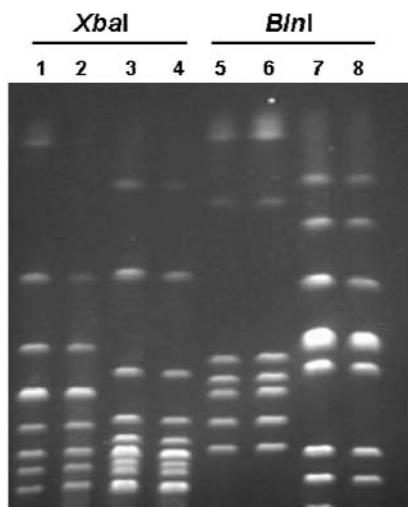


图3. FGE patterns of *S. Southampton* and *S. Derby*. DNA isolates No.10 (lanes 1 and 5), No.15 (lanes 2 and 6), No.12 (lanes 3 and 7), No.13 (lane 4 and 8) was digested with *XbaI* (lanes 1 to 4) or *BlnI* (lanes 5 to 8). Lane M: *S. cerevisiae* DNA as the size marker.

④分子シミュレーションによる薬剤耐性メカニズムの解析

帯広畜産大学・牧野壮一（研究協力者：国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部 中野達也）

1. はじめに

京都大学の北浦によって提案されたフラグメント分子軌道(FMO)法は、タンパク質や DNA のような巨大分子系の電子状態を高速かつ高精度に計算できる方法である。我々のグループでは、FMO 法に基づいたタンパク質と医薬品のような化学物質との相互作用を高精度に予測するための分子シミュレーションプログラム ABINIT-MP を開発している。

本研究では、 β -ラクタム系抗菌薬の薬剤耐性に重要な役割を果たしている β -ラクタマーゼと、キノロン系及びフルオロキノロン系抗菌薬の標的タンパク質である DNA ジャイレースの A サブユニット(GyrA)について、ABINIT-MP を用いた相互作用解析を行い、薬剤耐性の分子メカニズムについて解析を行った。平成 17, 18 年度は、 β -ラクタマーゼと、WHO でランク I に分類されている抗菌性物質の中のセフェム系抗菌薬について、平成 19 年度は、キノロン系及びフルオロキノロン系抗菌薬について解析を行った。

現在蔓延している抗菌薬耐性菌における代表的な耐性メカニズムは、抗菌薬を不活性化する酵素の産生である。これらの酵素には、抗菌薬を分解する加水分解酵素と、抗菌薬の構造の一部を修飾する修飾酵素の 2 種類があるが、臨床的には β -ラクタム系抗菌薬を分解する β -ラクタマーゼが重要である。 β -ラクタマーゼは、 β -ラクタム系抗菌薬の β -ラクタム環の CN 結合を加水分解で開裂させ、抗菌薬を不活性化する。 β -ラクタマーゼは、活性中心に Zn(II)等の二価の金属イオンを必要とする class B 型酵素 (metallo- β -lactamase) と、活性部位にセリン残基を有する class A, C, D 型酵素 (serine- β -lactamase) の 4 種類に分類される。 β -ラクタマーゼによる抗菌薬の不活性化には、 β -ラクタマーゼと抗菌薬の結合性と反応性の二つの要因が大きく影響していると考えられるが、平成 17, 18 年度は、class A 基質拡張型 β -ラクタマーゼ(extended-spectrum β -lactamase; ESBL)のうち、日本国内に広く分布している Toho-1 (CTX-M-44)とセフトキシム(CTX)の結合性について、FMO-HF/6-31G 計算による相互作用解析を行った。

本プロジェクトの平成 18 年度の研究成果として、保存ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*; ST)株から見つかったナリジクス酸(Nalidixic Acid; NA)耐性株においては、LT2 株を基準として、gyrA 遺伝子の点変異に基づくアミノ酸置換、Ser83→Tyr、Ser83→Phe、及び Asp87→Asn が報告されており、これら NA 耐性株は、キノロン系薬剤である NA だけでなく、フルオロキノロン系薬剤であるエンロフロキサシン(Enrofloxacin; ERFX)にも低感受性の傾向を示した。ERFX の代謝物であるシプロフロキサシン(Ciprofloxacin; CPMX)はヒト臨床において使用されており、NA 耐性株のキノロン系及びフルオロキノロン系薬剤に対する耐性メカニズムを解析することは、ヒトの健康への被害の可能性を予測する上でも重要と考えられる。そこで平成 19 年度は、キノロン系及びフルオロキノロン系薬剤の標的タンパク質である DNA ジャイレースの A サブユニット(GyrA)について ab initio FMO 計算を行い、アミノ酸置換と耐性発現の関係について考察を行った。

2. 研究の成果と概要

2.1 セフトキシム(CTX)と Toho-1 (CTX-M-44)の相互作用解析

計算方法

最初に、FMO 計算に用いる Toho-1-CTX 複合体構造について検討を行った。図 1 に、Toho-1 E166A mutant (PDB ID: 1BZA; resolution: 1.80Å) [1] と、Toho-1 E166A mutant とセフトキシム(CTX)のアシル-酵素中間体の構造 (PDB ID: 1IYO; resolution: 1.80Å) [2]を、主鎖の C α で重ね合わせた構造を示した。C α の位置の RMSD は、0.032Å であり、CTX の結合によって Toho-1 E166A mutant の全体構造は大きく変化していないことが分る。

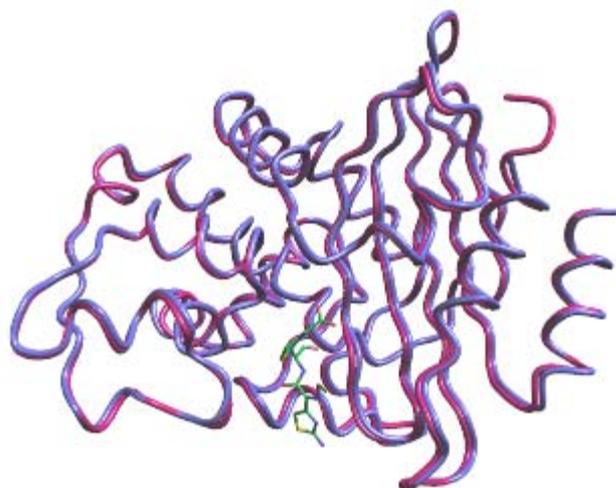


図 1 Toho-1 E166A mutant とセフトキシム(CTX)のアシル-酵素中間体の重ね合わせ構造 (青が Toho-1 単体、赤がアシル-酵素中間体を示す)

図 2 に、CTX の周辺 4Å 以内にあるアミノ酸残基を示した。CTX が結合することにより、主鎖と比較すると側鎖の構造変化は大きい傾向にあるが (側鎖まで含めた重ね合わせの RMSD は 0.056Å)、活性の中心となる Ser70 はほとんど動いていないことが分る。

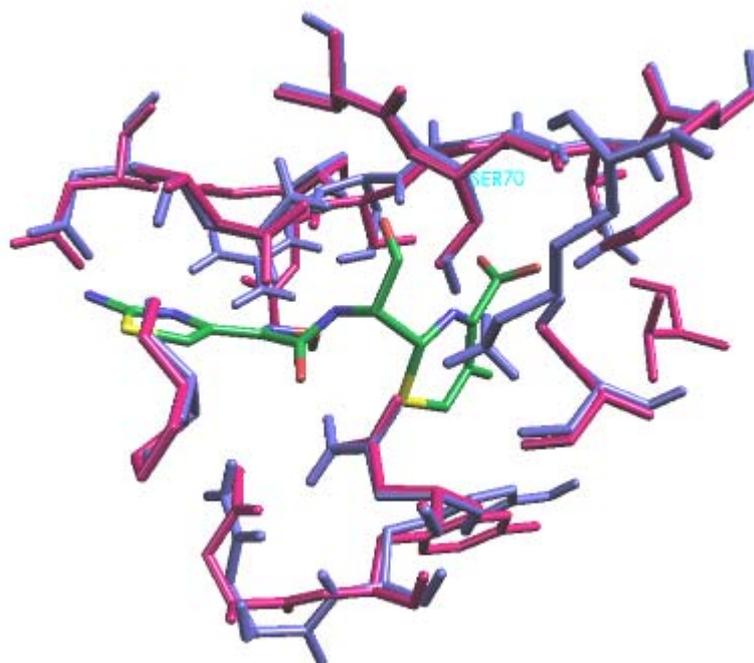


図 2 Toho-1 E166A mutant とセフトキシム(CTX)のアシル-酵素中間体の重ね合わせ構造 (CTX から 4Å 以内のアミノ酸残基のみ表示。青が Toho-1 単体、赤がアシル-酵素中間体を示す)

これらのことから、CTX の結合による Toho-1 の構造変化は小さいと考えられるため、Toho-1 E166A

mutant とセフトキシム(CTX)のアシル-酵素中間体の構造 (PDB ID: 1IYO)を元に、反応前の Toho-1(E166A)-CTX 複合体のモデリング構造を Molecular Operating Environment (MOE)を用い、以下の手順で作成した。

- (1) PROTEIN DATA BANK から 1IYO.pdb をダウンロード
- (2) 1IYO.pdb から溶媒分子を削除
- (3) CTX 部位を図 3 に示したような反応前の構造に修正
- (4) REDUCE で水素原子を付加
- (5) 付加した水素原子、CTX 部位、及び CTX 部位から 4Å 以内にあるアミノ酸残基について、MMFF94X 力場を用い構造最適化

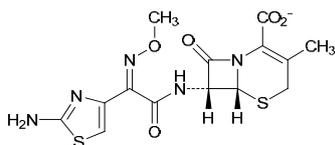


図 3 反応前の CTX 部位

次に、E166A のミューテーションを行う前の Toho-1 についても解析を行うために、Toho-1(E166A)-CTX 複合体のモデリング構造を元に、Ala166 をグルタミン酸に置換し、水素原子、CTX 近傍 4Å、及び Glu166 近傍 4Å を MMFF94X で最適化した、Toho-1-CTX 複合体のモデリング構造を作成した (図 4)。

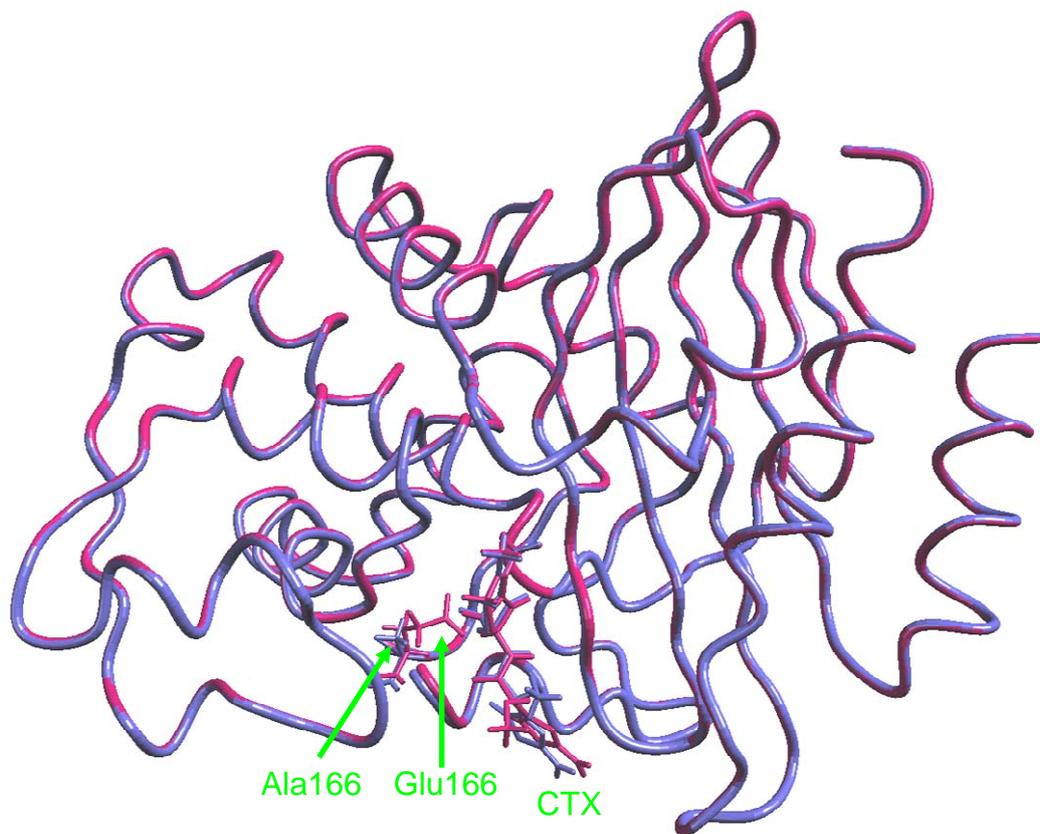


図 4 Toho-1-CTX 複合体 (赤) と Toho-1(E166A)-CTX 複合体 (青) 構造の重ね合わせ

図 5 に、Toho-1-CTX 複合体と Toho-1(E166A)-CTX 複合体で立体構造の差が大きかった部分を示した。Ala166 から Glu166 へ置換することにより、CTX と Asn170, Asp240, Arg274 の距離が短くなるように構造が変化している。

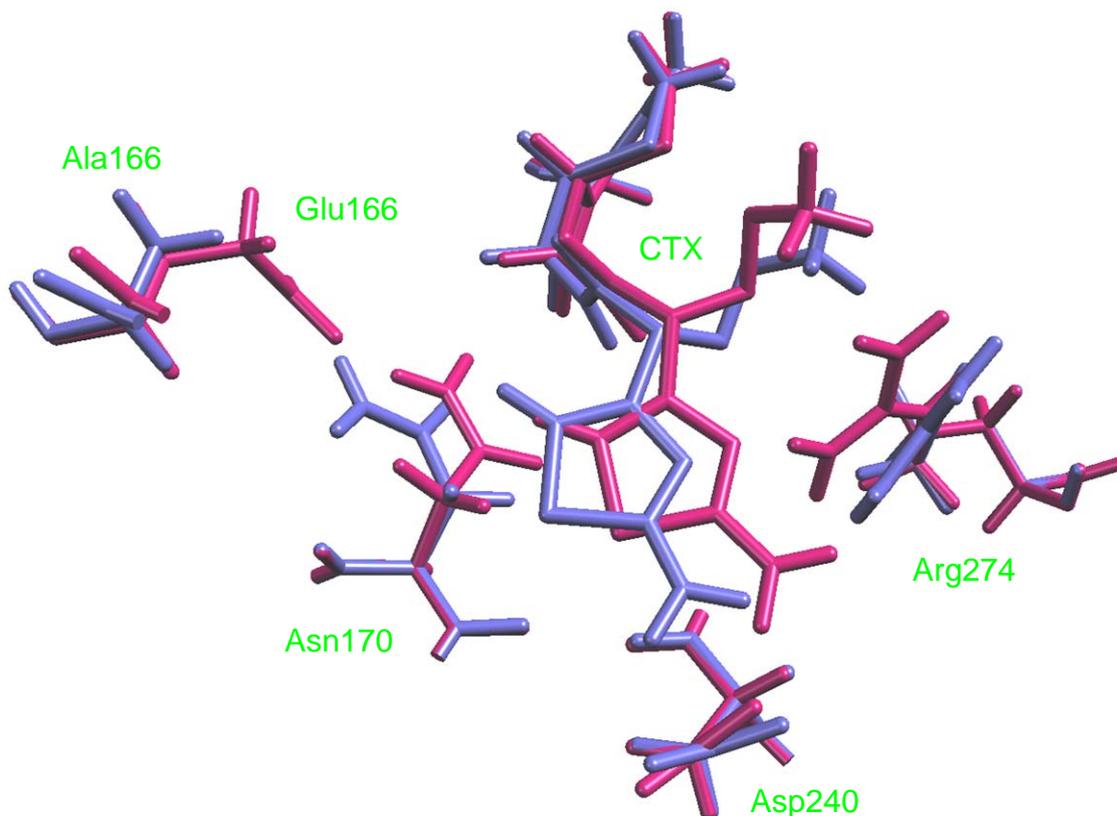


図 5 Toho-1-CTX (赤) と Toho-1(E166A)-CTX (青) のモデリング構造の比較

このようにして作成した Toho-1-CTX 複合体構造の PDB ファイルを用い、FMO 法プログラム ABINIT-MP を用いて、FMO-HF/6-31G 計算を行った。FMO 計算では、アミノ酸 1 残基を 1 フラグメントに分割した。また、CTX 部位は 1 フラグメントとして計算を行った。計算時間は、dual Xeon 3.06GHz, memory 4GB×32 ノードの PC クラスタを用い、Toho-1 (E166A)-CTX 複合体で 7.6 時間、Toho-1-CTX 複合体で 7.7 時間であった。計算結果の解析には、BioStation Viewer Version 7.10 を使用した。

図 6 に FMO-HF/6-31G 計算から得られた、Toho-1 E166A mutant 及び Toho-1 の各アミノ酸残基と CTX のフラグメント間相互作用エネルギー(Inter-Fragment Interaction Energy; IFIE)を示した。この IFIE は、 β -ラクタマーゼの各アミノ酸残基と CTX の間の相互作用エネルギーと見なすことができる。また、全アミノ酸残基について IFIE の和を取った値は、CTX の β -ラクタマーゼに対する結合エネルギーと見なすことができる。IFIE 解析から得られた CTX の Toho-1 E166A mutant に対する結合エネルギーは-313.1kcal/mol、Toho-1 に対する結合エネルギーは-323.1kcal/mol であった。図 6 から、Lys234 と Lys73 が CTX の結合に重要な役割を果たしていることが分る。また、Ala166 が Glu166 に置換されることによる不安定化は 42.6kcal/mol と大きい。Asn170, Gly238, Asp240, Arg274 と CTX の相互作用がそれぞれ、-9.5, -5.1, -10.2, -27.6kcal/mol 安定化するため、Toho-1 の方が Toho-1 (E166A)よりも CTX に対する結合性が約 10kcal/mol 強くなっている。これは、図 5 に示した Asn170, Asp240, Arg274 の構造変化に対応していると考えられる。

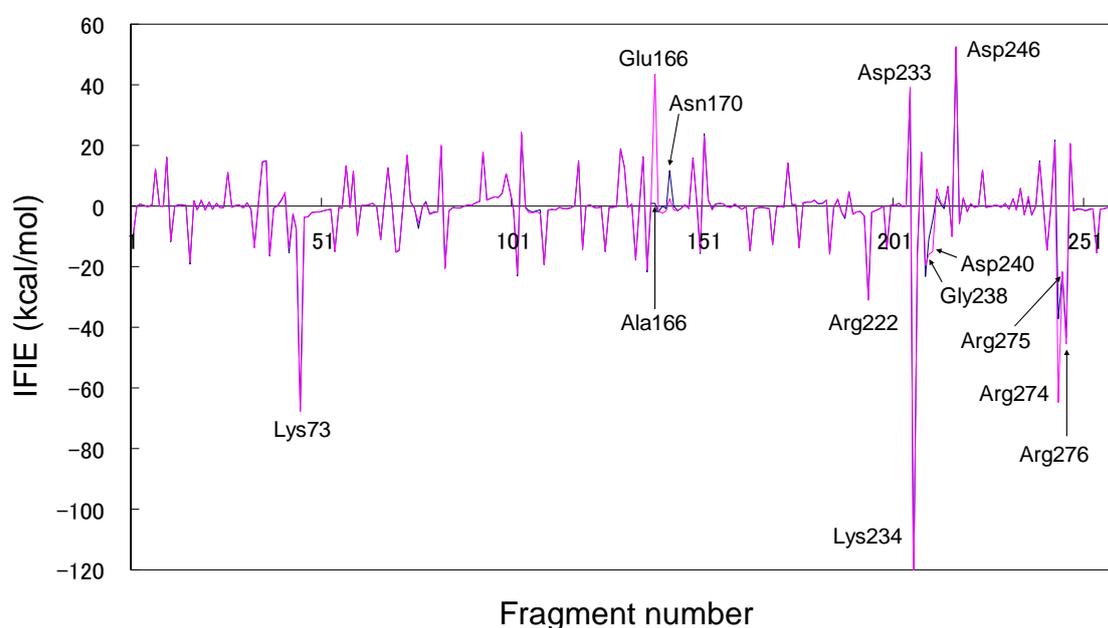
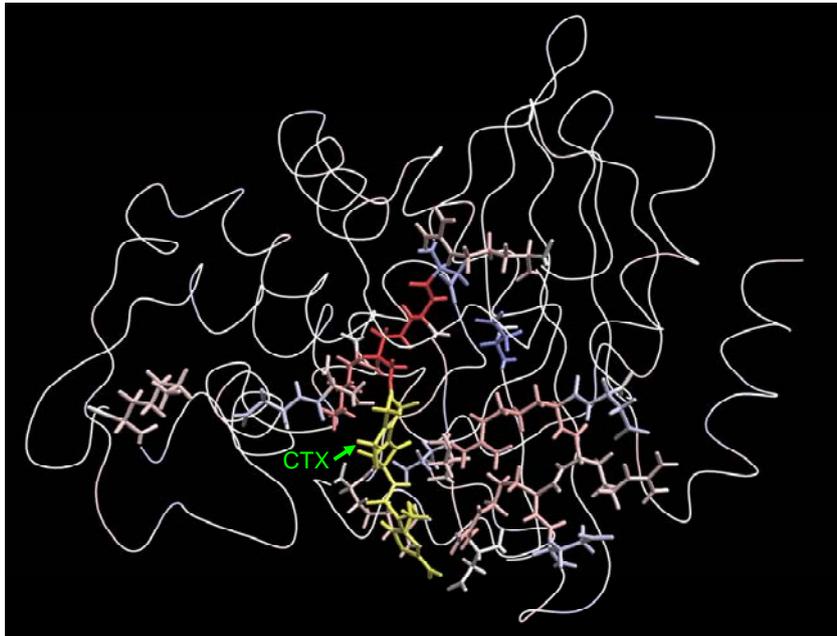
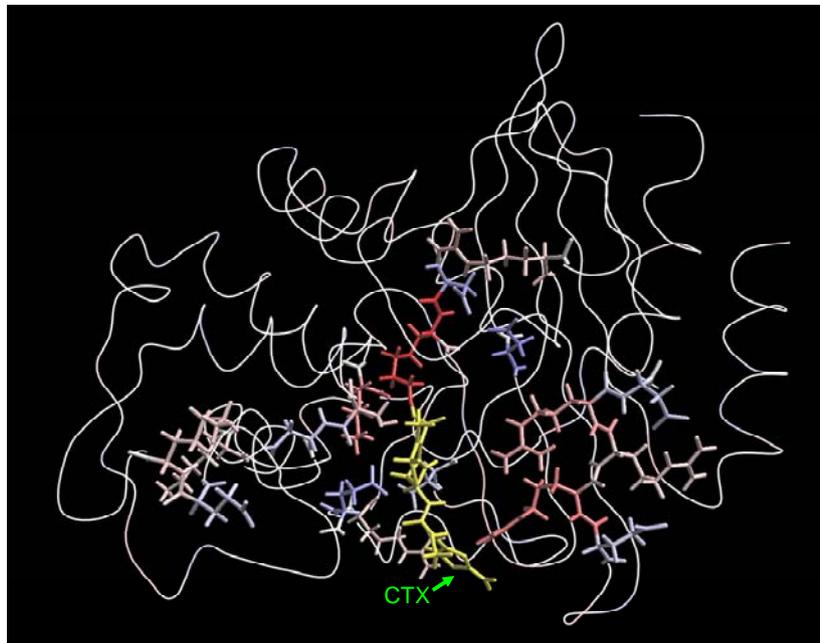


図 6 Toho-1 E166A mutant (青) 及び Toho-1 (赤) と CTX のフラグメント間相互作用エネルギー(IFIE)

CTX の周囲のアミノ酸残基の立体配置と、相互作用エネルギーの関係を分かりやすくするために、CTX と各アミノ酸残基の相互作用エネルギーを β -ラクタマーゼの立体構造に色で塗り分けた図を、図 7 に示した。黄色のスティック表示が CTX 部位で、アミノ酸残基は CTX との相互作用エネルギーに応じて、赤(-100kcal/mol)～青(100kcal/mol)で色分けしている。赤が濃いほど CTX と結合的な残基であり、青が濃いほど反発的な残基であることを示している。また、CTX との相互作用エネルギーの絶対値が 20kcal/mol 以上の残基をスティック表示している。

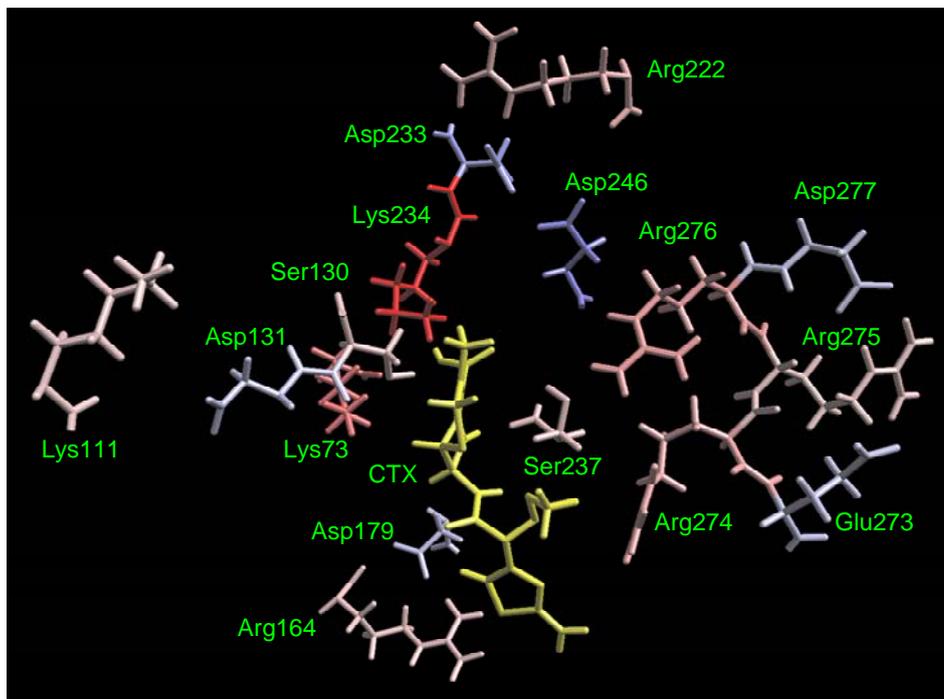


(A)

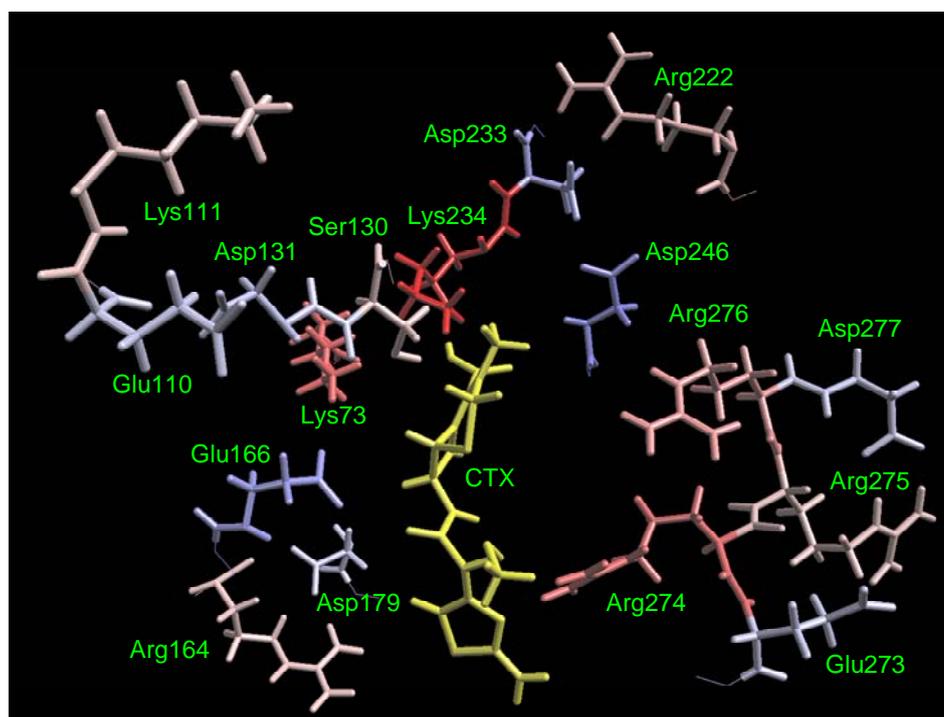


(B)

図 7 Toho-1 E166A mutant (A)と Toho-1 (B)の FMO-HF/6-31G 計算による相互作用解析。黄色のスティック表示が CTX 部位で、アミノ酸残基は CTX との相互作用エネルギーに応じて、赤(-100kcal/mol)～青(100kcal/mol)で色分けして表示している。



(A)



(B)

図 8 Toho-1 E166A mutant (A)と Toho-1 (B)の FMO-HF/6-31G 計算による相互作用解析。黄色のスティック表示が CTX 部位で、CTX との相互作用エネルギーの絶対値が 20kcal/mol 以上のアミノ酸残基のみを、赤(-100kcal/mol)～青(100kcal/mol)で色分けして表示している。

詳細に CTX との相互作用を解析するために、図 8 に CTX との相互作用エネルギーの絶対値が 20kcal/mol 以上の残基のみを示した。これらの残基は、CTX が電荷を持っていることに対応して、Ser130, Ser237 を除いて全て荷電アミノ酸残基である。Toho-1 (E166A)の場合、Lys73(-67.5kcal/mol)、Lys234 (-129.3kcal/mol) の二つの残基だけで全結合エネルギーの 63%を占めている。Toho-1 の場合も同様に、Lys73(-67.8kcal/mol)と Lys234 (-129.3kcal/mol) で 61%を占めており、Lys73 と Lys234

が CTX の結合に特に重要であることが分った。これは、Lys73, Lys234 が CTX のカルボキシ基に近いため、静電的に強く相互作用しているためと考えられる。Glu166 と CTX の相互作用エネルギーは 43.4kcal/mol と大きく反発的であるが、これも静電的な反発によるものと考えられる。Arg274 との相互作用エネルギーは、Toho-1 (E166A) では -37.1kcal/mol であるが、Toho-1 では -64.7kcal/mol と -27.6kcal/mol 安定化している。これは図 5 に示したように、Toho-1 (E166A) - CTX 間の最短原子間距離が 2.6Å であるのに対し、Toho-1 では 1.8Å と接近しているためと考えられる。また、CTX は -1 の電荷を持っているため、CTX からの距離が大きくなるにつれ絶対値は小さくなるものの、 β -ラクタマーゼ全体に渡って、正電荷を持つリシン、アルギニン残基とは結合的に、負電荷を持つアスパラギン酸、グルタミン酸残基とは反発的に相互作用する傾向が見られた。

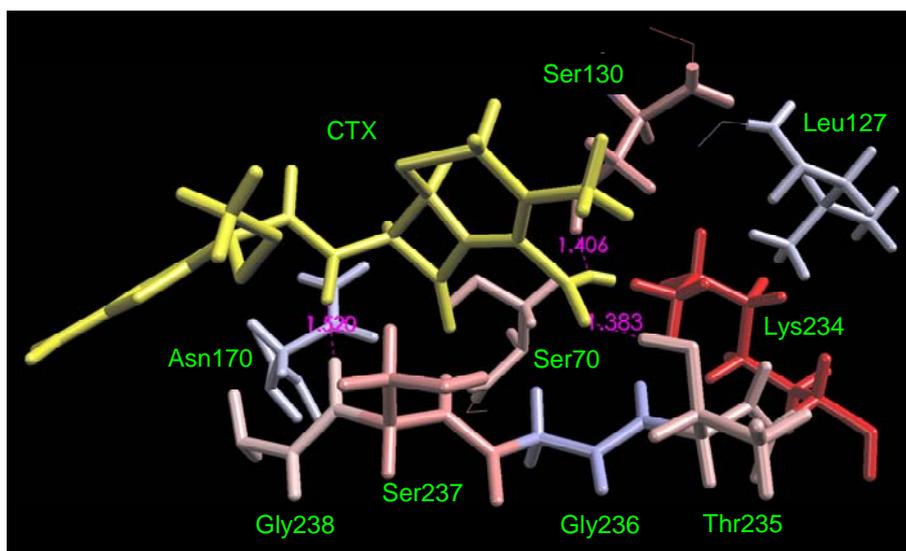


図 9 Toho-1 E166A mutant と CTX の FMO-HF/6-31G 計算による相互作用解析。黄色のスティック表示が CTX 部位で、CTX との相互作用エネルギーの絶対値が 10kcal/mol 以上の中性アミノ酸残基及び Lys234 を、赤(-50kcal/mol)～青(50kcal/mol)で色分けして表示している。

図 9 は Toho-1 E166A mutant について、CTX と比較的強く（絶対値で 10kcal/mol 以上）相互作用している中性アミノ酸残基と Lys234 を示した。CTX と絶対値で 10kcal/mol 以上の相互作用エネルギーがある中性アミノ酸残基 8 個は、全て CTX の近傍に集中していることが分る。また、Ser130 (-23.0kcal/mol) と Thr235 (-15.2kcal/mol) の側鎖、及び Ser237 (-23.4kcal/mol) の主鎖のカルボニル炭素と CTX の間に水素結合が形成され、CTX の β -ラクタマーゼへの結合に寄与していると考えられる。また、Mulliken のポピュレーション解析から、 β -ラクタマーゼから CTX へ電荷が 0.28e 移動していることが示されるが、これは Ser130 (-0.03e)、Lys234 (-0.22e)、Thr235 (-0.03e) の電荷移動量の和 0.28e とほぼ等しいことから、これらの残基から CTX のカルボキシ基へ電荷が移動したと考えられる。図 6 のグラフから、Ser70, Ser130, Lys234, Thr235, Ser237 との相互作用については、Toho-1 でもほぼ同様と考えられる。

まとめ

FMO-HF/6-31G 法を用い、class A ESB� の一つである Toho-1 (CTX-M-44) とセフトキシム(CTX) の相互作用解析を行い、

- (1) CTX の Toho-1 への結合には、Lys73, Lys234 が重要である。
- (2) CTX と Ser130, Thr235, Ser237 の間に水素結合が形成される。
- (3) Ser130, Lys234, Thr235 から CTX へ約 0.3e の電荷移動が起きる。

(4) Ala166 を Glu166 に置換することにより、CTX と Glu166 間で大きな静電的反発が発生するが、CTX と Asn170, Asp240, Arg274 の構造変化により全体では約 10kcal/mol 安定化する。ということが示された。これらの結果は、FMO 法による相互作用解析が、抗菌薬のβ-ラクタマーゼへの結合メカニズムの解明だけでなく、ミュータントによる抗菌薬の結合性の違いの予測にも有用であることを示している。

参考文献

- [1] A. Ibuka, A. Taguchi, M. Ishiguro, S. Fushinobu, Y. Ishii, S. Kamitori, K. Okuyama, K. Yamaguchi, M. Konno and H. Matsuzawa, “Crystal Structure of the E166A Mutant of Extended-spectrum β-Lactamase Toho-1 at 1.8 Å Resolution”, *J. Mol. Biol.* **285**, 2079-2087 (1999).
- [2] T. Shimamura, A. Ibuka, S. Fushinobu, T. Wakagi, M. Ishiguro, Y. Ishii, and H. Matsuzawa, “Acyl-intermediate Structures of the Extended-spectrum Class A β-Lactamase, Toho-1, in Complex with Cefotaxime, Cephalothin, and Benzylpenicillin”, *J. Biol. Chem.* **277**, 46601-46608 (2002).

2.2 キノロン系及びフルオロキノロン系薬剤と DNA ジャイレース A サブユニット(GyrA)の相互作用解析

計算方法

キノロン系及びフルオロキノロン系薬剤の計算

キノロン系薬剤についてはナリジクス酸(Nalidixic Acid; NA) (図 10)、フルオロキノロン系薬剤については、エンロフロキサシン(Enrofloxacin; ERFX) (図 11)、シプロフロキサシン(Ciprofloxacin; CPFX) (図 12)、及びレボフロキサシン(Levofloxacin; LVFX) (図 13) について計算を行った。

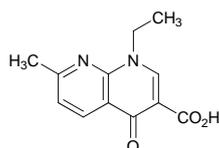


図 10 ナリジクス酸(Nalidixic Acid; NA)

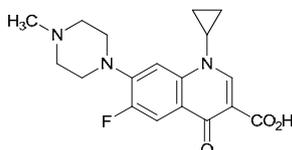


図 11 エンロフロキサシン(Enrofloxacin; ERFX)

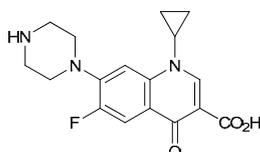


図 12 シプロフロキサシン(Ciprofloxacin; CPFX)

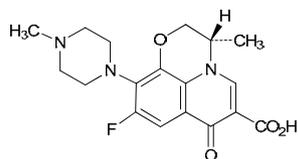


図 13 レボフロキサシン(Levofloxacin; LVFX)

LVFX (*S*体)は、その *R*体と比較して、10~100 倍の活性を持つことから、フルオロキノロン系薬剤と GyrA との相互作用を解析する上で有用と考え計算を行った。また生体内では、これらの薬剤はカルボキシル基とピペラジニル基が解離していると仮定して計算を行った。Gaussian 03W を用いて、HF/6-31G レベルで構造最適化を行った後、得られた最適化構造を用い、ABINIT-MP を使用し、HF/6-31G レベルで、電子密度、静電ポテンシャル、電場の計算を行った。図 14~21 に得られた静電ポテンシャルマップ及び分子の周囲の電場ベクトルを示した。静電ポテンシャル及び電場の可視化には、BioStation Viewer を使用した。

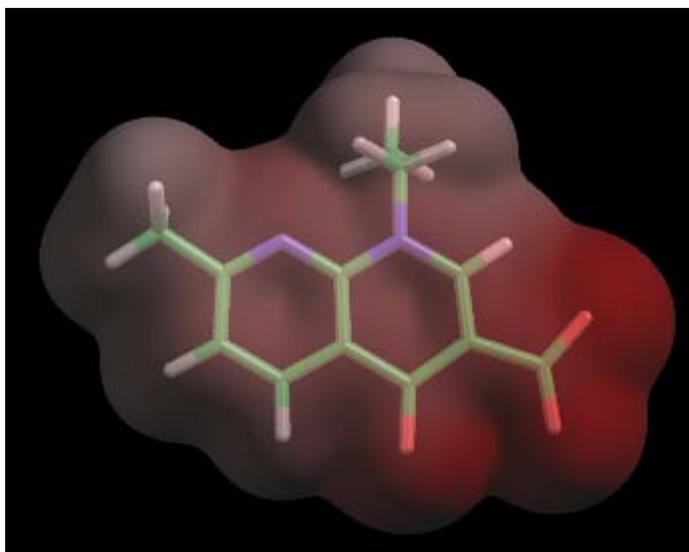


図 14 NA の静電ポテンシャルマップ
静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree
(等電子密度面 0.001e/bohr³)

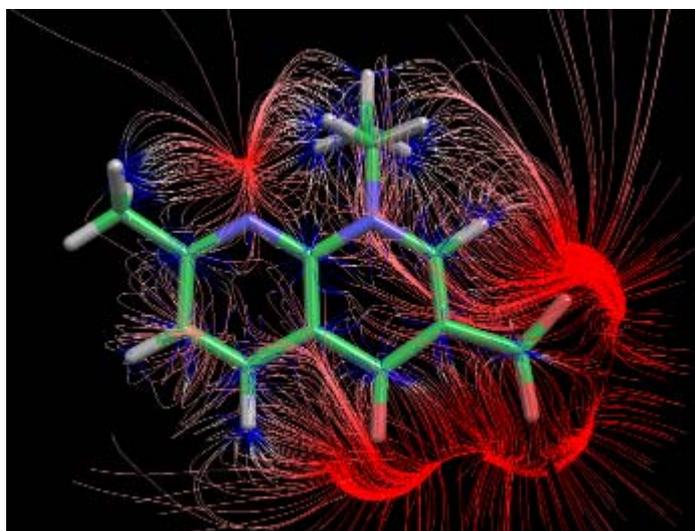


図 15 NA の周囲の電場
静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree

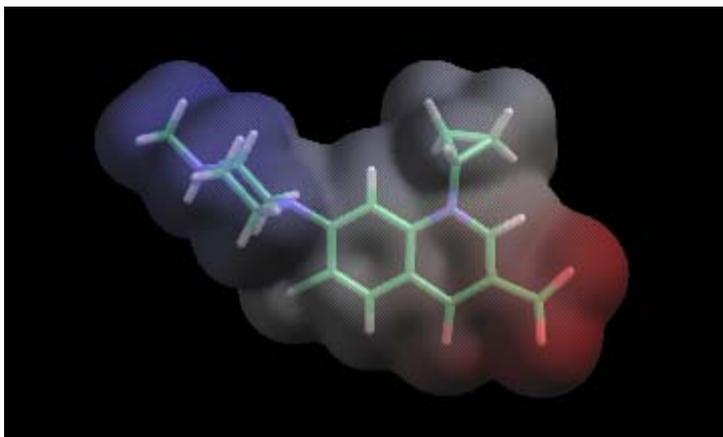


図 16 ERFX の静電ポテンシャルマップ
 静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree
 (等電子密度面 0.001e/bohr³)

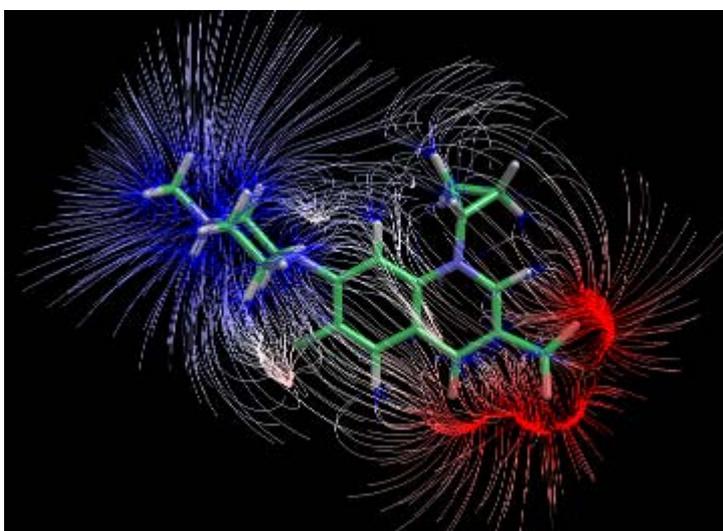


図 17 ERFX の周囲の電場
 静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree

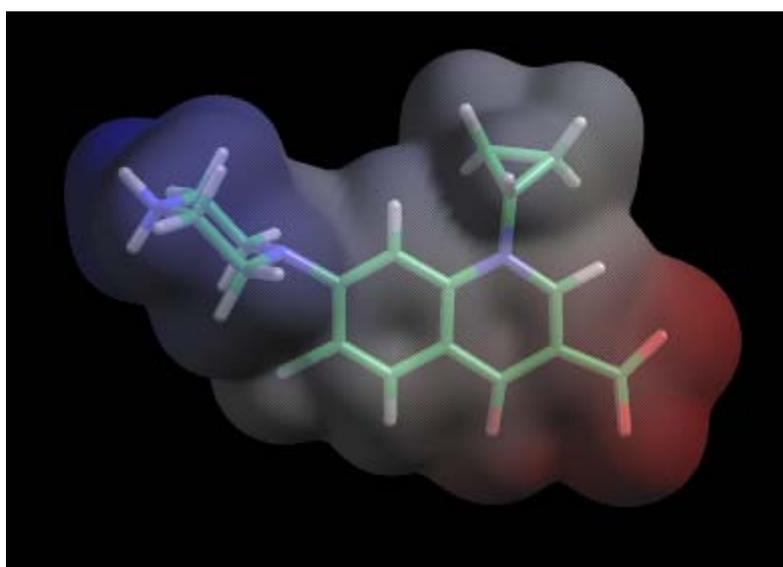


図 18 CPFX 静電ポテンシャルマップ
 静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree
 (等電子密度面 0.001e/bohr³)

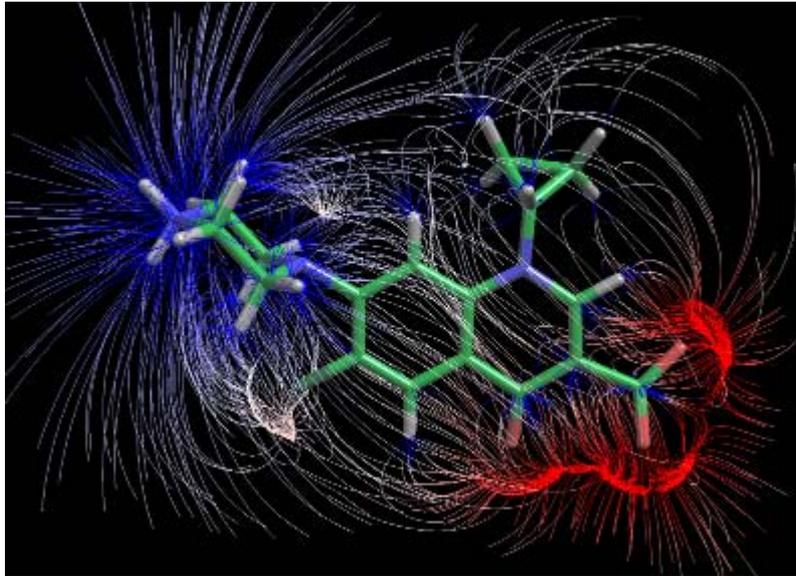


図 19 CPFX 周囲の電場
静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree

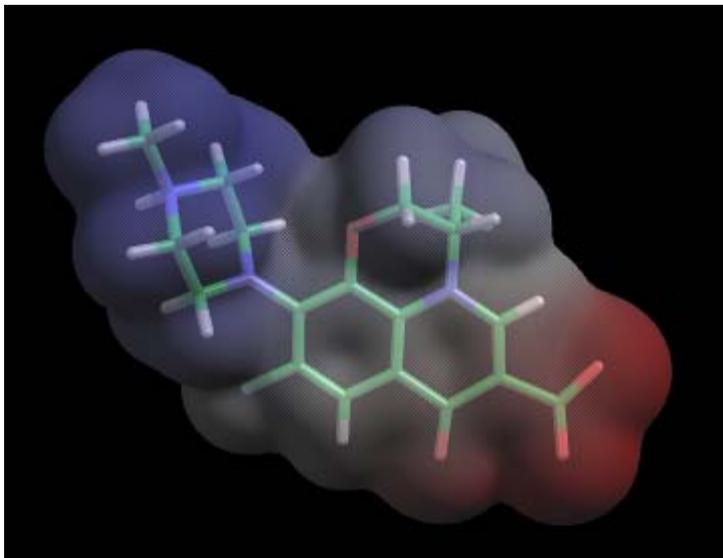


図 20 LVFX の静電ポテンシャルマップ
静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree
(等電子密度面 $0.001e/\text{bohr}^3$)

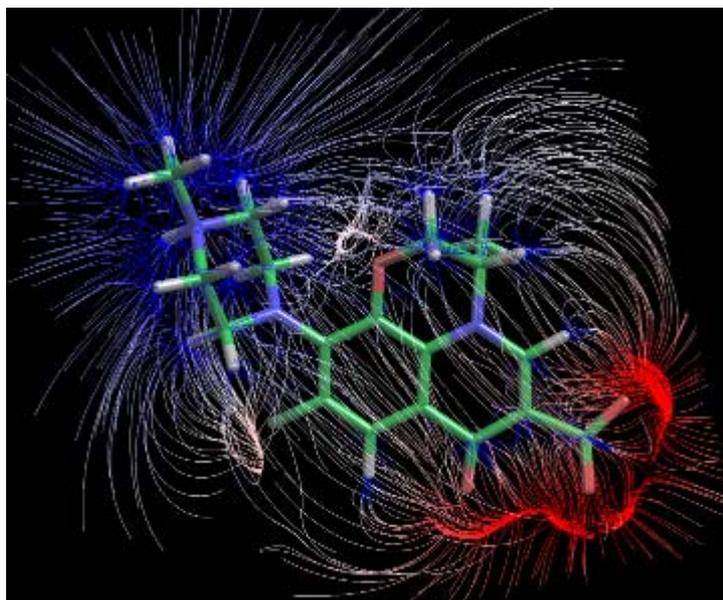


図 21 LVFX の周囲の電場
静電ポテンシャル -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree

図 14~21 から、キノロン系及びフルオロキノロン系薬剤については、3 位のカルボキシル基と 4 位のカルボニル基の酸素原子の周囲に赤で表示される強い負のポテンシャル(正電荷と強く引き合う)領域が存在することが示された。3 位のカルボキシル基と 4 位のカルボニル基は、抗菌力を発揮するために必須の置換基であることから、この部分が GyrA との結合に関与していると考えられる。また、7 位のピペラジン環の 4 位の窒素原子がプロトン化していることから、ERFX, CPFX, LVFX はピペラジニル基の周囲に青で表示される強い正のポテンシャル (負電荷と強く引き合う) 領域が存在する。また、フルオロキノロン系薬剤については、6 位のフッ素原子の周囲に、特徴的な赤で表示される強い負の静電ポテンシャルがあることが示された (図 22)。

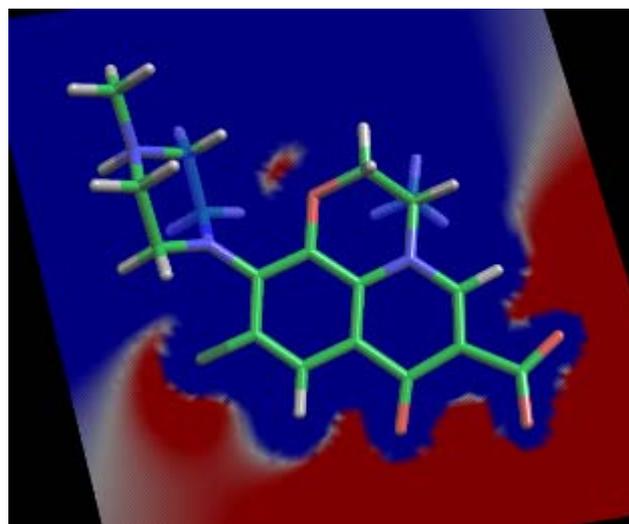


図 22 LVFX の分子平面上の静電ポテンシャル。
-0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree

GyrA の計算

LT2 株の GyrA (Accession No. P37411) の立体構造は報告されていないが、これと非常に相同性の高い *Escherichia coli* の GyrA (Accession No. P0AES4) の構造が Protein Data Bank で公開されてい

る(PDB ID: 1AB4)。この二つの GyrA は、キノロン系薬剤への耐性に重要と考えられる CAP-like domain を含む、1-199 番目の残基は完全に一致しており、CAP-like domain の構造はほぼ同じであると考えられる(図 23)。そこで、解析は GyrA (P0AES4)の 30-186 番目の残基を切り出した構造と、それに Ser83 及び Asp87 に残基置換を導入した構造を用いて行った。図 24 に GyrA (P0AES4)二量体を、図 25 に解析を行った領域の構造を示した。

```

P37411      MSDLAREITPVNIEEELKSSYL DYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWN 60
P0AES4      MSDLAREITPVNIEEELKSSYL DYAMSVIVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWN 60
*****
P37411      KAYKKSARVVDVIGKYHPHGDSAVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM 120
P0AES4      KAYKKSARVVDVIGKYHPHGDSAVYDTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM 120
*****
P37411      RYTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTTEKIPDVMPKIPNLLVNGSSGIAVGMAT 180
P0AES4      RYTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTTEKIPDVMPKIPNLLVNGSSGIAVGMAT 180
*****
P37411      NIPPHNLTEVINGCLAYIDNEDISIEGLMEHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKV 240
P0AES4      NIPPHNLTEVINGCLAYIDDEDISIEGLMEHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKV 240
*****
P37411      YIRARAEVEADAKTGRETIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKDKRVEGISALRDESDDKG 300
P0AES4      YIRARAEVEADAKTGRETIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKVEGISALRDESDDKG 300
*****
P37411      MRIVIEVKRDVAVGEVVLNLYSQTQLQVSFGINMVALHHGQPKIMNLKDIISAFVRRHRE 360
P0AES4      MRIVIEVKRDVAVGEVVLNLYSQTQLQVSFGINMVALHHGQPKIMNLKDIISAFVRRHRE 360
*****
P37411      VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAIALANIDPIIELIRRAPTPAEAKAALISRPWDLGNV 420
P0AES4      VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAVLANIDPIIELIRHAPTPAEAKTALVANPWQLGNV 420
*****
P37411      AAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVVDGQYYL TEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKE 480
P0AES4      AAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVVDGLYYL TEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKE 480
*****
P37411      LLEQIAELLHILGSADRLMEVIREEMELIRDQFGDERRTEITANSADINIEDLISQEDVV 540
P0AES4      LLDQIAELLRILGSADRLMEVIREELVREQFGDKRREITANSADINLEDLITQEDVV 540
*****
P37411      VTLSHQGYVYQPLTDYEAQRGGKGSAAIRIKEEDFIDRLLVANTHDTILCFSSRGRLY 600
P0AES4      VTLSHQGYVYQPLSEYEAQRGGKGSAAIRIKEEDFIDRLLVANTHDTILCFSSRGRVY 600
*****
P37411      WMKVYQLPEASRGARGRPIVNLLPLEANERITAILPVREYEEGVNFMATASGTVKKTAL 660
P0AES4      SMKVVYQLPEATRARGRPIVNLLPLEQDERITAILPVTEFEEGVKVFMTANGTVKKTAL 660
*****
P37411      TEFSRPRSAGIIAVNLDGDELIGVDL TSGSDEVMLFSAAGKVVRFKEDAVRAMGRTATG 720
P0AES4      TEFNRLRTAGKVAIKLVGDDELIGVDL TSGEDEVMLFSAEGKVVRFKESSVRAMGCNTTG 720
*****
P37411      VRGIKLAGDDKVVSLIIPRGEIILVTQNGYGKRTAADEYPTKSRATQGVVISIKVTERN 780
P0AES4      VRGIRLGEQDKVVSLIVPRGDGAILTATQNGYGKRTAAVEYPTKSRATKGVVISIKVTERN 780
*****
P37411      GSVVGAVQVDDCDQIMMIDTAGTLVRTRVSEISVVGRTQGVILIRTAEDENVVGLQRVA 840
P0AES4      GLVVGAVQVDDCDQIMMIDTAGTLVRTRVSEISIVGRNTQGVILIRTAEDENVVGLQRVA 840
*****
P37411      EPVDDEELDAIDGSVAEGDEDI APEAESDDVADDADE 878
P0AES4      EPVDEEDLTDIGSAAEGDEI APEVDVDEPEEE--- 875
*****

```

図 23 GyrA (P37411)と GyrA (P0AES4)の ClustalW を用いたアライメント



図 24 GyrA (P0AES4)二量体の構造



図 25 解析を行った GyrA (P0AES4)二量体の CAP-like domain

GyrA (PDB ID: 1AB4)の 30-186 番目の残基を切り出した構造 (図 25) について、CCG 社の MOE を用い、水素原子を付加した後、水素原子の座標を Amber99 で最適化した。この構造を元に、1) Asp87→Asn、2) Ser83→Tyr、3) Ser83→Phe、4) Ser83→Tyr, Asp87→Asn、5) Ser83→Phe, Asp87→Asn の 5 種類のミュータントをモデリングで作成し、置換した残基の側鎖から 4.5Å にある残基の側鎖、及び置換した残基側鎖を Amber99 で最適化した。ワイルドタイプ(WT)及びミュータントの CAP-like domain の構造を図 26~31 に示した。これら合計 6 個の構造について、ABINIT-MP を用い、FMO-HF/6-31G レベルの計算を行った。フラグメント分割は 1 残基単位で行った。

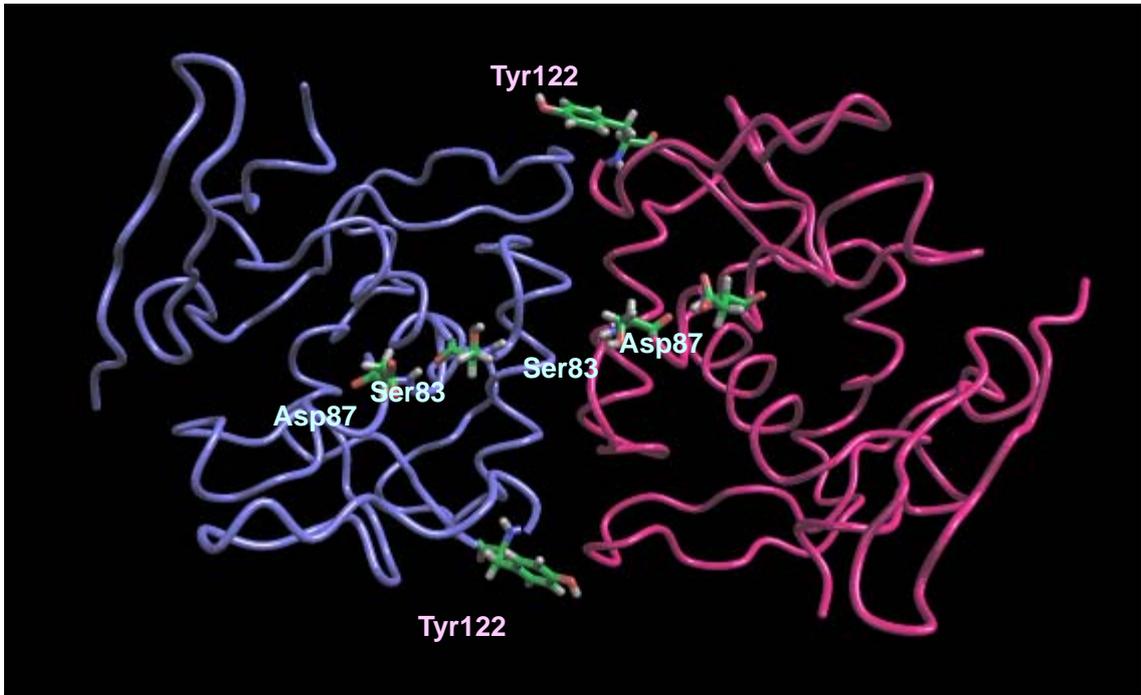


図 26 ワイルドタイプの CAP-like domain 構造

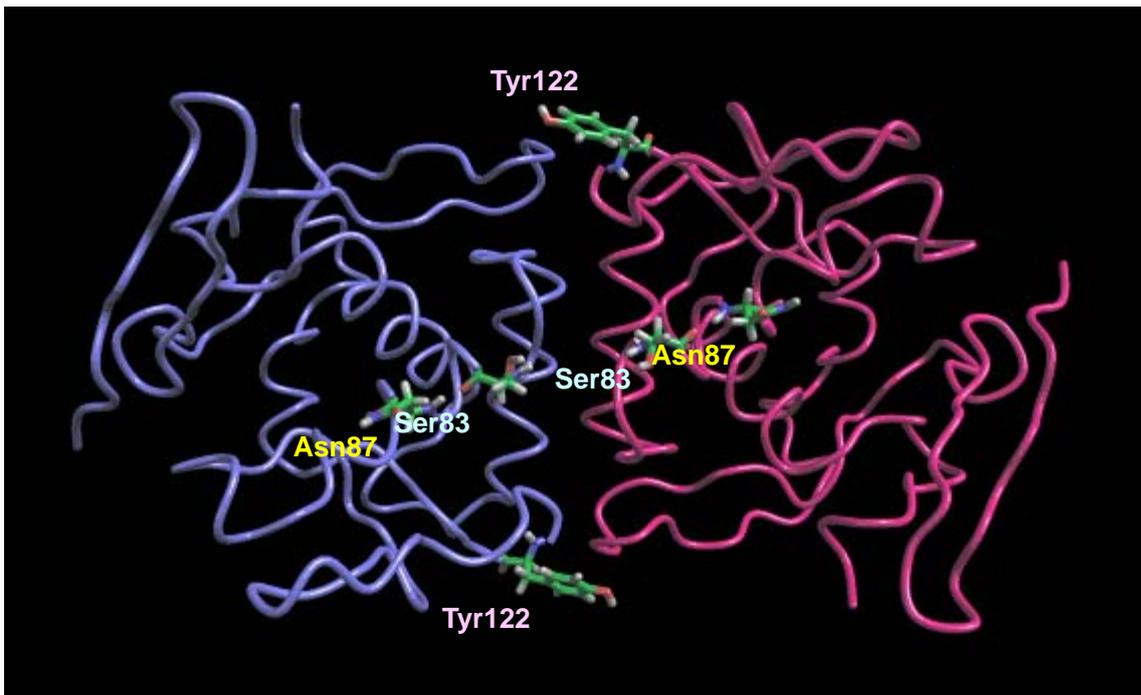


図 27 Asp87→Asn の CAP-like domain 構造

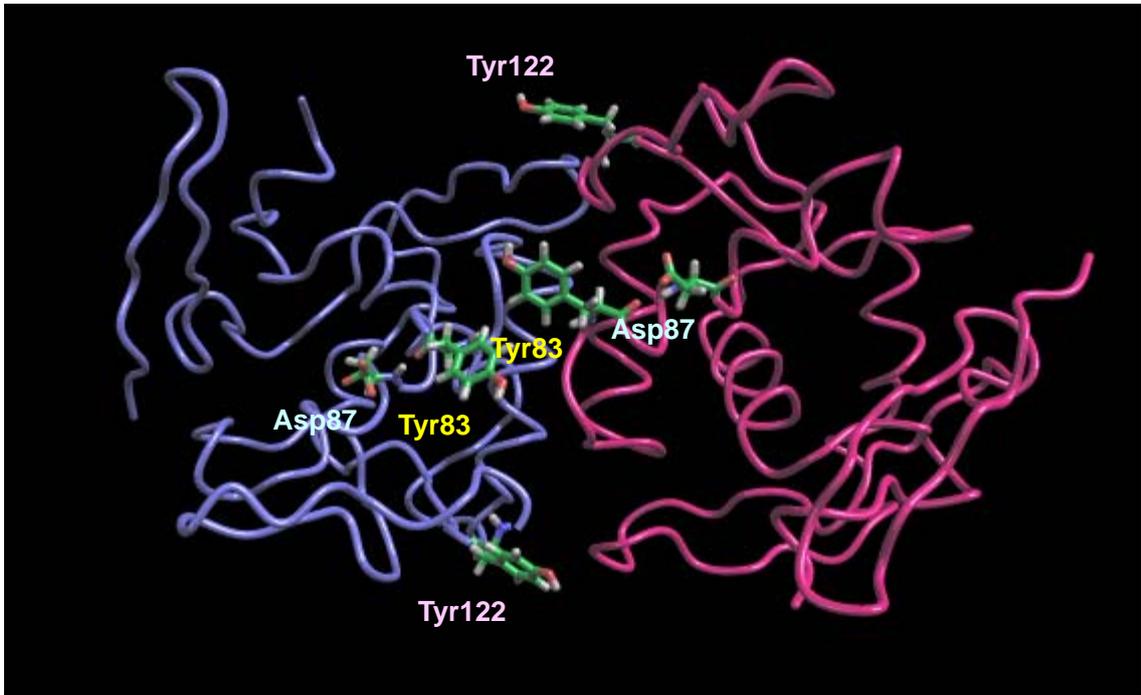


図 28 Ser83→Tyr の CAP-like domain 構造

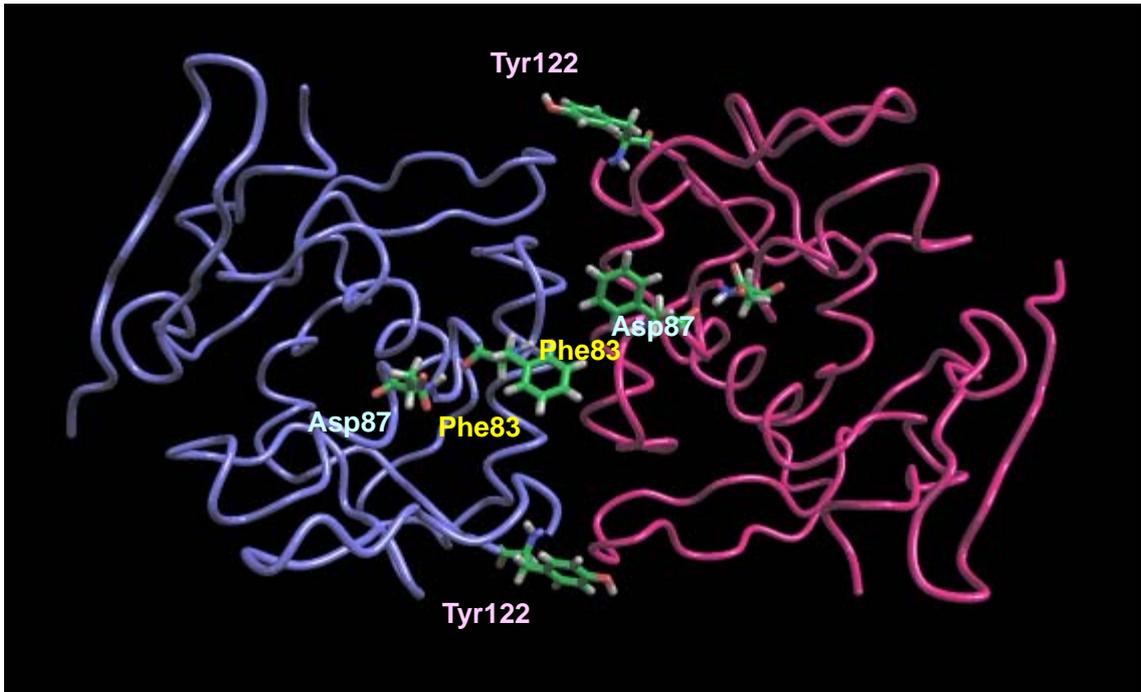


図 29 Ser83→Phe の CAP-like domain 構造

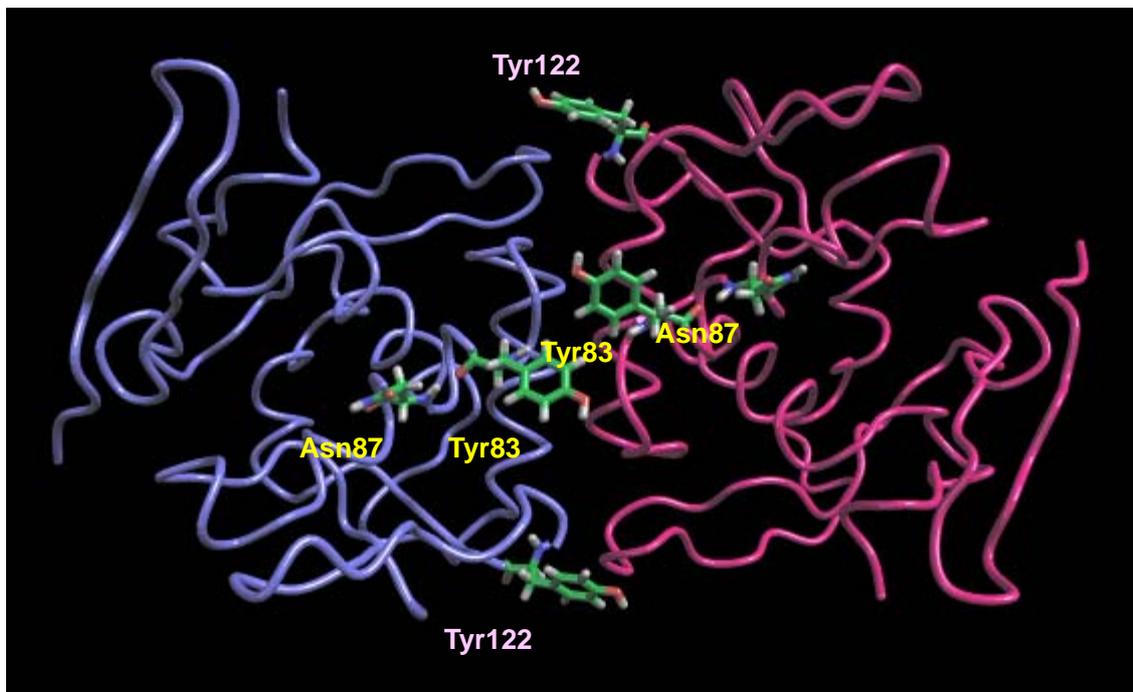


図 30 Ser83→Tyr, Asp87→Asn の CAP-like domain 構造

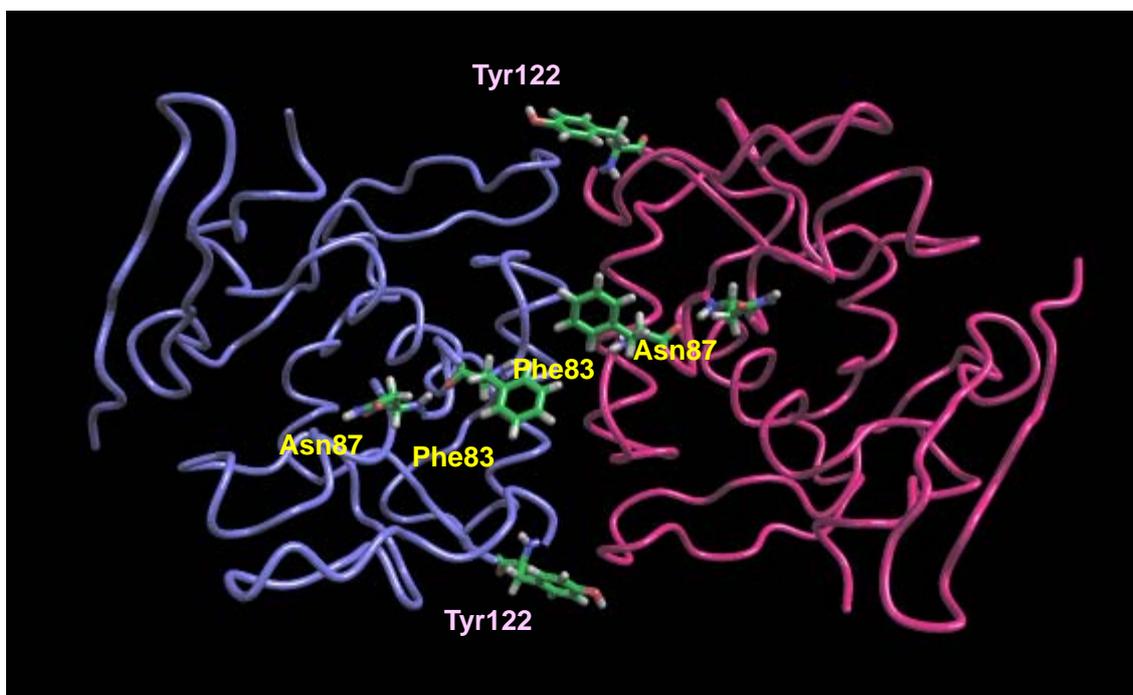


図 31 Ser83→Phe, Asp87→Asn の CAP-like domain 構造

次に、FMO-HF/6-31G 計算から得られた電子密度を用いて作成した、ワイルドタイプの静電ポテンシャルマップを図 32 に示す。

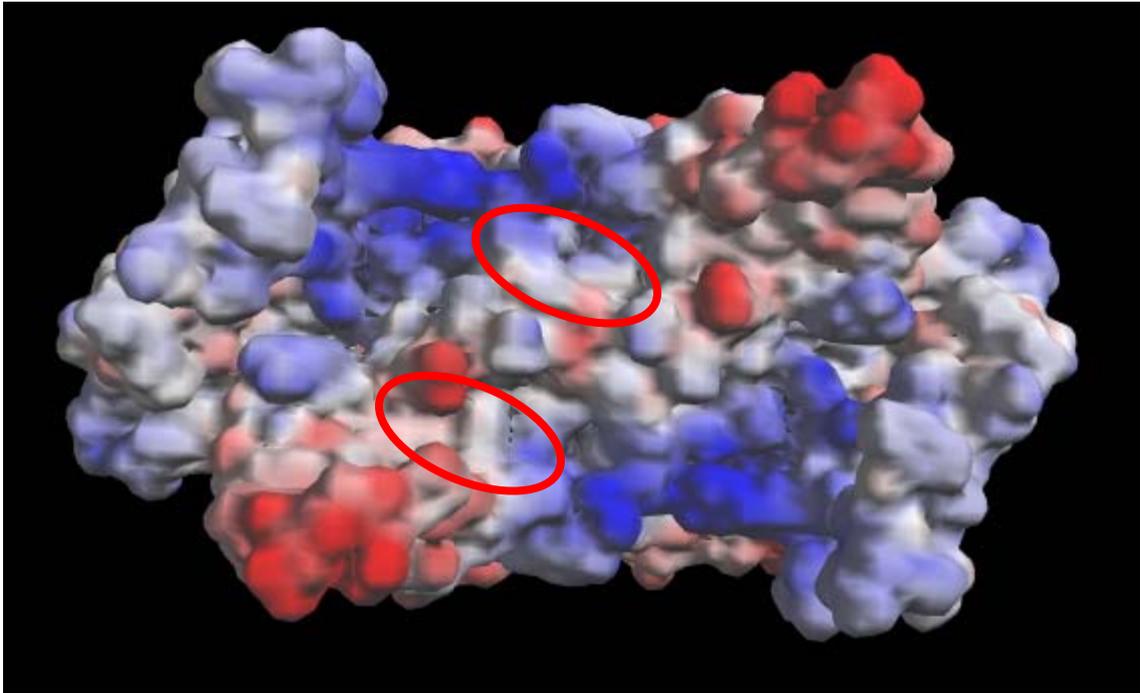


図 32 ワイルドタイプの静電ポテンシャルマップ。
 -0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree (等電子密度面 0.001e/bohr³)
 赤線で示した領域が推定された結合ポケット。

図 23 から CAP-like domain には、NA, ERFX, CPFX, LVFX と形状的及び静電的に相補的なポケットが 2 ヲ存在することが分かる。

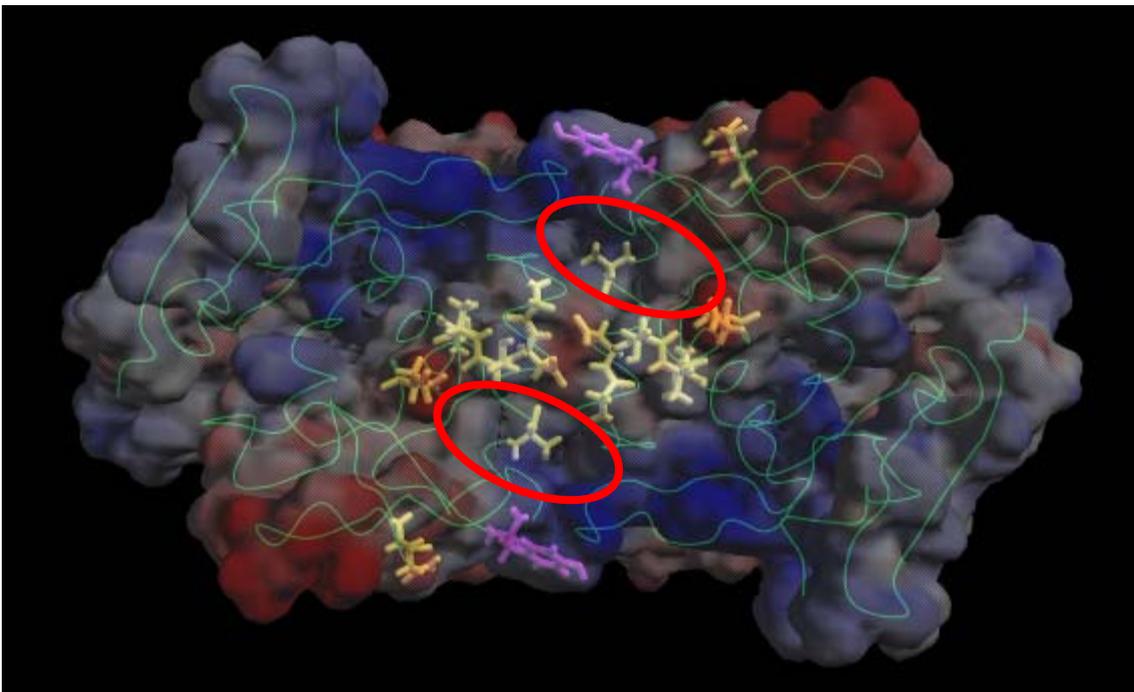


図 33 Quinolone-resistance determining region (QRDR)とワイルドタイプの静電ポテンシャルマップの重ね合わせ。キノロン耐性に関する残基を黄色で、Tyr122 をピンクで示した。

これらのポケットは、キノロン耐性に重要な残基が集中している、いわゆる **quinolone-resistance determining region (QRDR)**と接しており、GyrA とキノロン系薬剤が、この領域で直接的な相互作用をしていることが示唆される (図 33)。また、これらのポケットは GyrA の活性中心である Tyr122 に隣接しており、ポケットにキノロン系薬剤が結合することで、DNA と GyrA の結合を阻害するというメカニズムが考えられる。このメカニズムであれば、LVFX (*S*体) が、その *R*体と比較して、

10～100 倍の活性を持つという高い選択性を説明できる可能性がある。

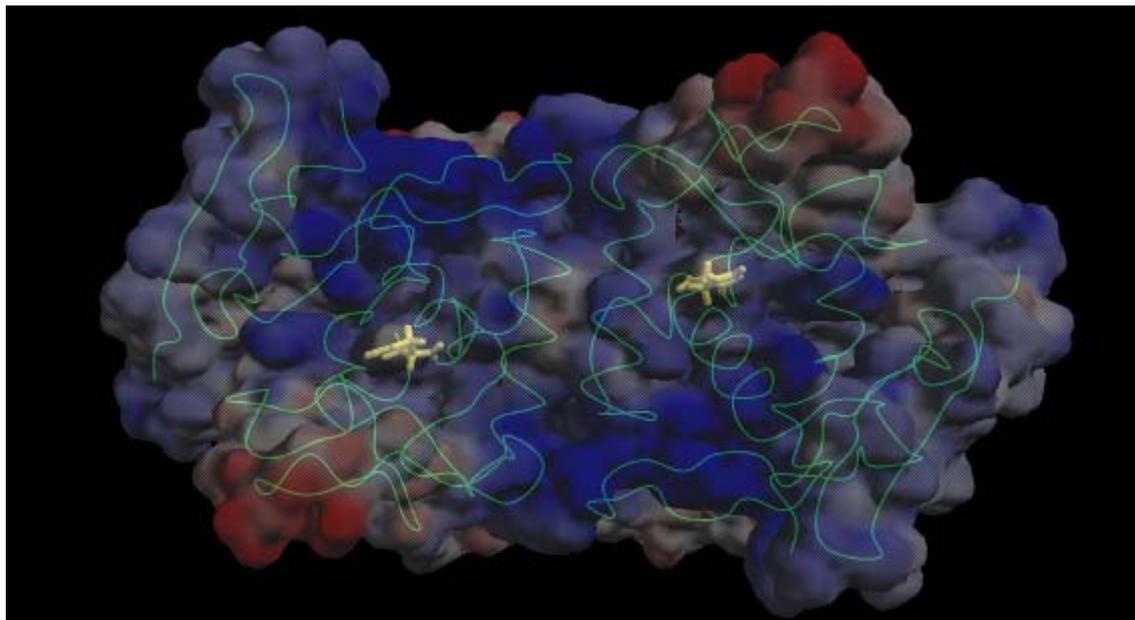


図 34 Asp87→Asn の静電ポテンシャルマップ。-0.2 (赤)～0.2 (青) hartree (等電子密度面 0.001e/bohr³) Asn87 を黄色で示した。

Asp87→Asn では、アミノ酸残基の電荷が-1(Asp)から 0(Asn)へ変化することから、キノロン系薬剤との静電的な相互作用の減少が結合性の低下につながっていると予想される (図 34)。

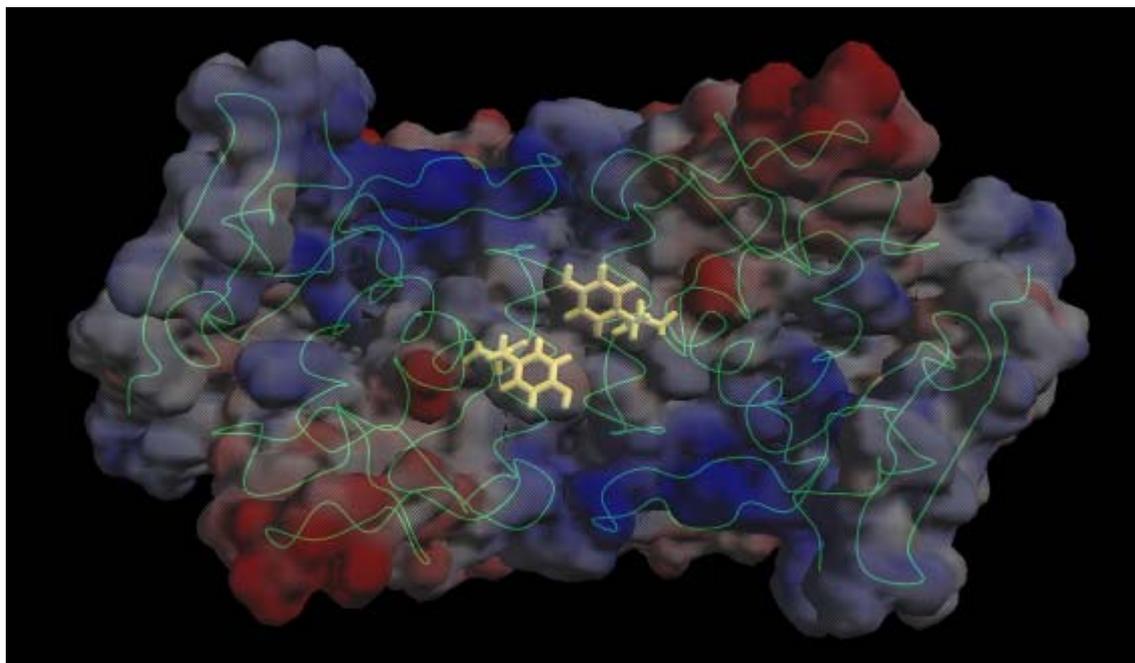


図 35 Ser83→Tyr の静電ポテンシャルマップ。-0.2 (赤)～0.2 (青) hartree (等電子密度面 0.001e/bohr³) Tyr83 を黄色で示した。

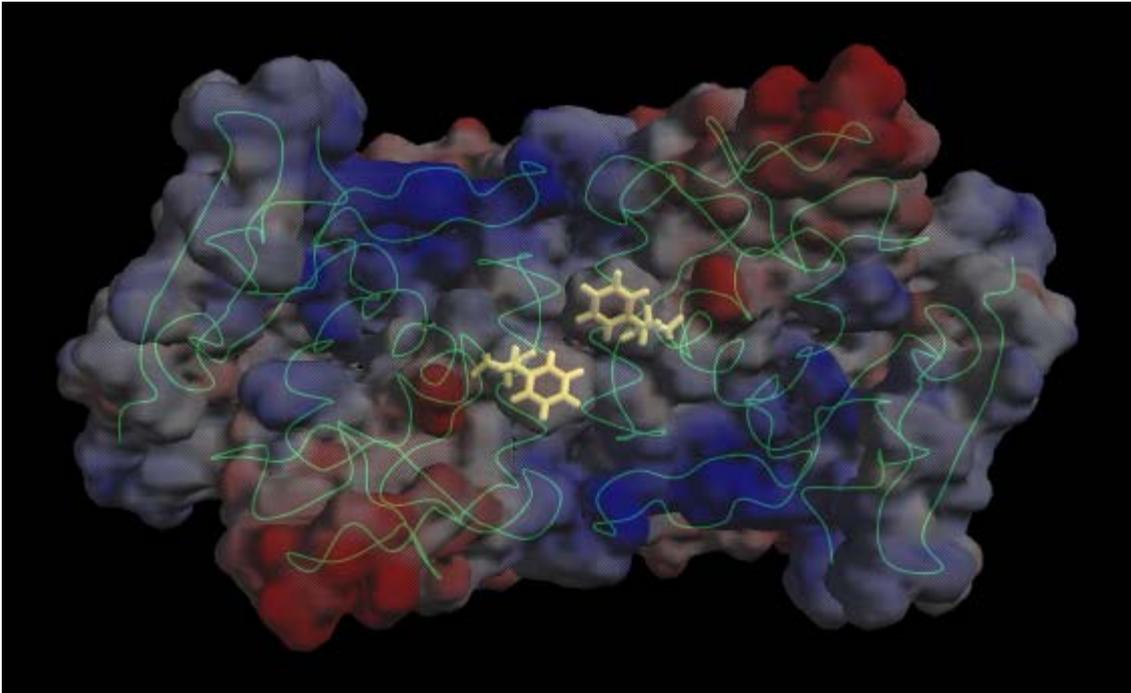


図 36 Ser83→Phe の静電ポテンシャルマップ。-0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree (等電子密度面 0.001e/bohr³) Phe83 を黄色で示した。

Ser83→Tyr 及び Ser83→Phe については、想定される結合ポケットの入口を塞ぐことで、立体障害によりキノロン系薬剤の結合性が低下していると考えられる (図 35, 36)。

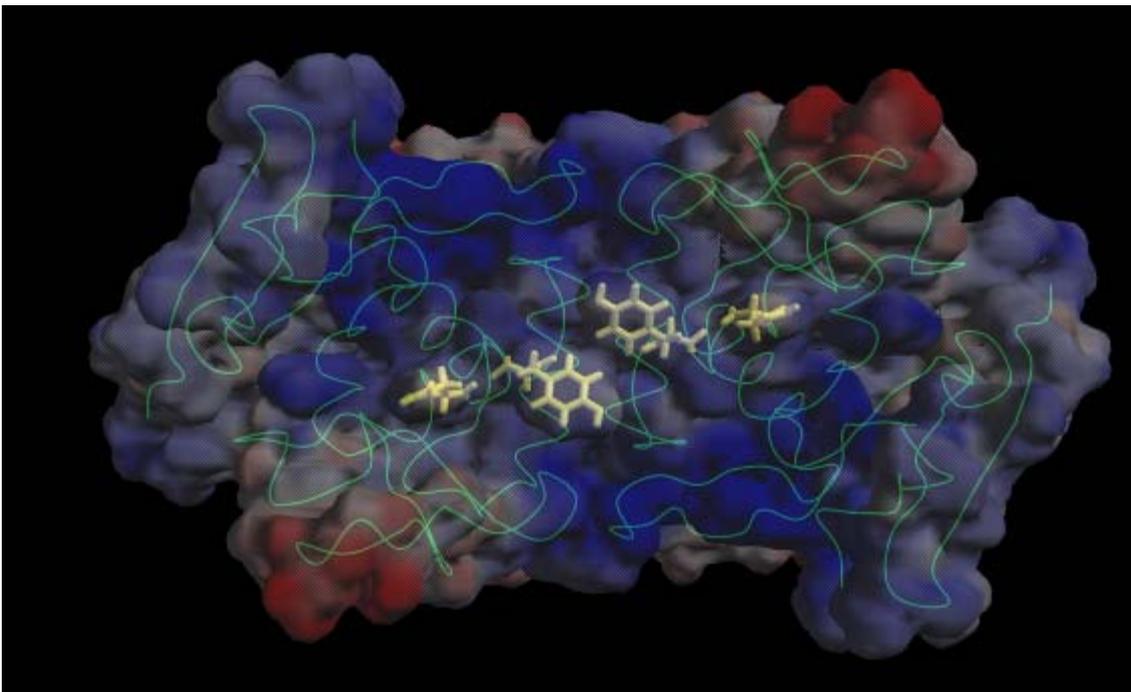


図 37 Ser83→Tyr, Asp87→Asn の静電ポテンシャルマップ。-0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree (等電子密度面 0.001e/bohr³) Tyr83, Asn87 を黄色で示した。

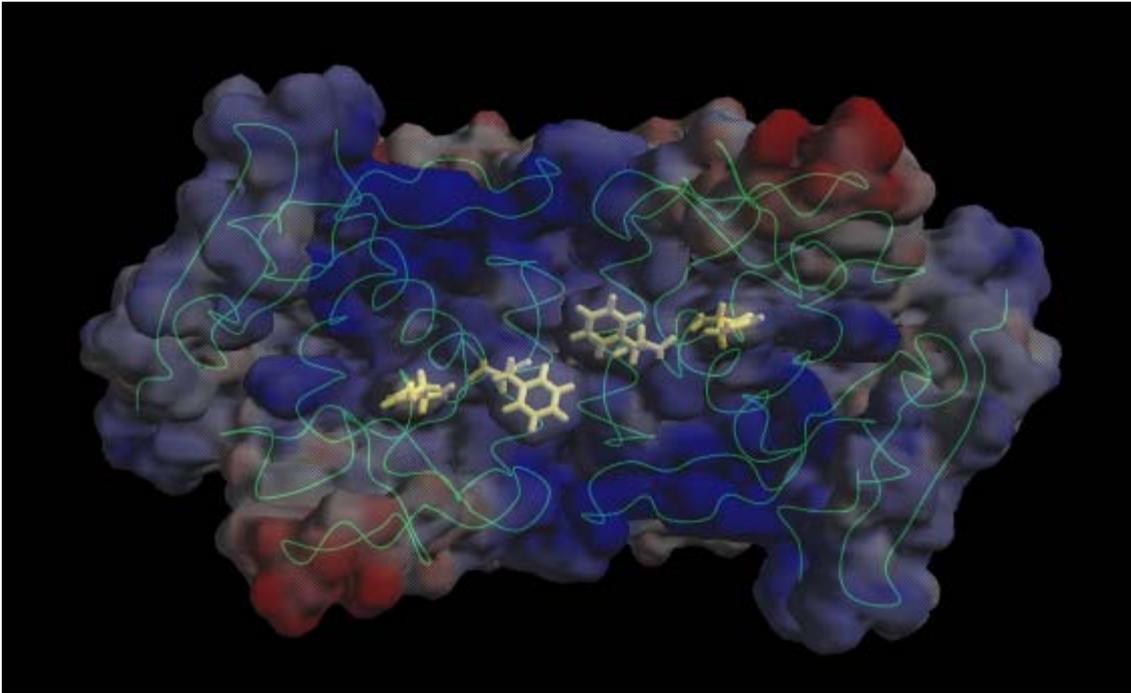


図 38 Ser83→Phe, Asp87→Asn の静電ポテンシャルマップ。-0.2 (赤) ~0.2 (青) hartree (等電子密度面 0.001e/bohr³) Phe83, Asn87 を黄色で示した。

Ser83→Tyr, Asp87→Asn 及び Ser83→Phe, Asp87→Asn については、二か所の変異による相乗効果によりキノロン系薬剤の結合性が低下していると予想される(図 37, 38)。

また、実験的には、GyrA とキノロン系薬剤は直接結合していないという指摘もあるが、GyrA がモノマーに解離してしまうと、キノロン系薬剤の活性に最も重要な、3 位のカルボキシル基と 4 位のカルボニル基が結合する部位がポケットから失われてしまうため(図 39)、GyrA モノマーにはキノロン系薬剤は結合できないと予想される。したがって GyrA とキノロン系薬剤の結合性の解析は、GyrA が活性なダイマーが維持される条件下で行うことが必須と考えられる。

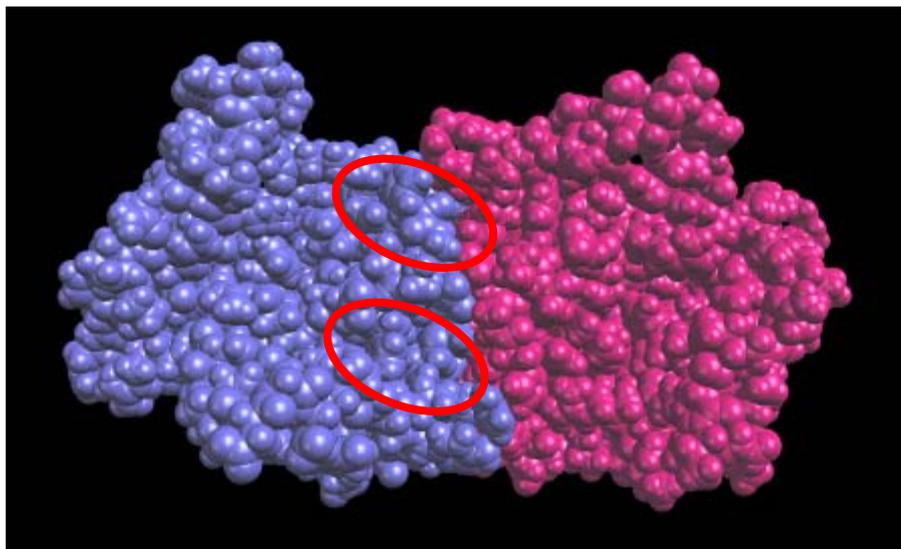


図 39 GyrA ダイマーと予想された結合ポケットの位置。

まとめ

キノロン系薬剤の標的タンパク質である GyrA について、FMO-HF/6-31G 計算を行い、得られた静電ポテンシャルマップの解析から、キノロン系薬剤の結合部位の推定を行い、キノロン耐性の発現との関係について検討を行った。

⑤耐性菌に関する情報収集及び解析

帯広畜産大学 門平陸代

薬剤耐性菌について知っていますか？

薬剤耐性菌とは、抗生物質（合成の抗菌剤を含む）に耐性を持つ細菌のこと。90年代以降、世界の医療現場で抗生物質が効かない薬剤耐性菌による院内感染が大きな問題になっている。免疫機能が低下した患者に起こる耐性菌による感染症の治療は最先端の医療をもってしても困難で、死に至ることもある。

細菌が耐性を獲得するのは、言わば生き物としての生き残り戦略だ。猛スピードで世代交代を続ける細菌は、自らを攻撃する抗生物質に対して耐性を持つ子孫を増殖させていく。世界中で使用される抗生物質の種類や量が増えるにしたがって、細菌の中で耐性菌が標準化していくということだ。

ヒトの医療で、抗生物質を効かなくさせる耐性菌の多くは、以前の治療などで使用された抗生物質が原因だが、どうもそれだけではないことが分かっている。近年、抗生物質が大量に使用されている他の現場、つまり畜産や養殖、農作物栽培など私たちの「食」の生産現場で使われる大量の抗生物質が、ヒトの医療に影響する耐性菌の増加に関わっている可能性が、専門家の間で危惧されている。では、こうした生産のあり方がどの程度、ヒト医療に影響する耐性菌と関わっているのか、また食品を食べることによって、どの程度ヒトに耐性が伝わり、感染が起こりうるのか、対策の根拠となるリスクをどのように測るのかなどを明らかにすべく、研究が進められている。スウェーデンでは科学的根拠が出揃うのを待たず、既に80年代から家畜への抗生物質使用を禁止され、デンマークがこれに続き、2006年にはEUが、成長促進目的で抗生物質を飼料に添加することを禁止する方向性を示した。

こうした流れや消費者の声の高まりを受けて、2003年、農水省は家畜の抗生物質使用について食品安全委員会に安全性の評価を求め、平成16年9月、家畜に抗生物質等を使用することで生じる耐性菌の食品と健康への影響を国際基準に沿ったかたちで評価する指針が発表された。しかし、指針を策定した食品安全委員会自らが、指針の中で「様々な要因が複雑に絡み合っている問題で（中略）情報や知見の集積がなされているとは言い難い」としていることからわかるように、具体的な評価に必要な、詳細な情報が必ずしも十分に揃っているわけではない。

また、食糧生産の現場で使用される抗菌剤は、耐性菌を生み出すきっかけとなる一方で、家畜の健康に被害をもたらす細菌感染症の治療等に使用され、安価で安全な畜産物等の安定供給に貢献している。このような背景から、科学的根拠に基づき、薬剤耐性菌に関するリスク評価を行い、その上で必要なリスク管理措置を講じることが求められる。では、現時点までの研究によってどのようなことがわかっているのか？

研究報告で明らかとされているのは、家畜の体内から耐性菌が分離できること、そうした細菌が多剤耐性菌も分離されること、また、スーパーなどで販売されている肉などの食品中から耐性菌が分離されること、さらに、水や土壌などの環境からも耐性菌が分離されること、等である。家畜などに使用された抗生物質がヒトにどれだけのリスクをもたらすのかを判断するための資料は徐々に集められつつあるが、モニタリングなど調査も始まったばかりで不明点も多く、具体的な評価や対策を提案するには至っていない。

1. 薬剤耐性菌の広がり

1) 薬剤耐性菌って何？

薬剤耐性菌は、抗生物質などの薬剤に耐性を持つ細菌などの総称で、環境や家畜、ヒトの体内に存在する。免疫が低下した患者に対して感染症を引き起こし、抗生物質が使用できないため、治療は困難を極める。近年、日本でも抗生物質が多用される病院や老人ホームなどでの院内感染で死者が

出たMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）などがある。

2) 農場で使われた抗生物質への耐性菌がヒトに影響する？

ヒトの治療に使われる抗生物質のほかに、ヒトの医療分野以外で使われる抗生物質により出現した耐性菌などがヒトの医療に影響する可能性が危惧されている。先進国、途上国を問わず、家畜から薬剤耐性菌が分離されている。EU諸国やアメリカなど先進国でも家畜に使用される抗生物質と耐性菌のモニタリングを実施、日本でも国際的な基準に基づいた調査や情報収集が始まっている。

こうした中で、平成17年度に国内の研究者が、食中毒の原因となるサルモネラ・カンピロバクター菌の薬剤耐性についての調査を行った。テーマに掲げられたのは、家畜への抗生物質使用が耐性菌の発生にどの程度関わっているのか、「食」を通じて耐性がどの程度ヒトに伝わるのか、ヒトの感染症治療が困難となる潜在的な危険性はどのくらいなのか、の3点。具体的には、家畜と、食肉、食中毒患者から見つかる薬剤耐性菌の動向を全国調査すること、個別の農場での薬剤の使用と家畜から見つかる菌が耐性を示す状況を追跡調査すること、家畜と患者から見つかった耐性菌の耐性遺伝子を調べて関連性を解明する——などが含まれた。こうした研究で危険性を見極める材料を集め、対策につなげようというわけだ。

3) 研究からこれまでに分かったこと

市販の食肉の調査では、輸入・国産を問わず、鶏肉のカンピロバクター菌にフルオロキノロン耐性が高率で見つかったとの報告もある。1997年から2004年の都内の下痢患者から見つかった菌の耐性率も30-60%で推移していた。また、健康な家畜の便からも耐性菌が分離されることもある。耐性を示す薬剤は、動物用の医薬品や飼料添加物として広く使用されていて、関連をさらに調べる必要があるとされた。

ヒトから動物（ペット）由来の可能性のあるフルオロキノロン剤耐性菌の分離が報告された。感染者は生後11ヶ月乳児で、下痢発熱で入院した。生ものは摂取しておらず、家庭内でほかに下痢をした人はいなかった。この乳児の父親が自宅で動物病院を開業しており、輸血犬として室内でポインターを飼育していたが、この犬の下痢便から患者と同じ耐性を示す菌が分離されたため、詳細は不明だが犬から子供への感染の可能性が考えられた。

結論として、サルモネラやカンピロバクターにおいて、動物から食品を介して、もしくは直接ヒトへ耐性菌が広がる可能性が危惧されている。

2. 農場で何が起きている？（サルモネラ菌を例として）

1) サルモネラ菌とは

研究結果からは家畜の体内で耐性菌が増えていることがわかっている。では、どのような展開があって、農場の家畜が耐性菌を増やしたのだろうか。

サルモネラ菌は、自然界に広く分布する細菌で、家畜、家禽にとっては下痢、敗血症の原因となる。ヒトにとって、サルモネラは食中毒の主たる原因菌のひとつ。細菌性食中毒患者12475人のうち30%を占める（2004年、厚生労働省統計）。感染源としては、食肉、卵などの畜産品、それらを使用した加工食品（マヨネーズ、アイスクリーム）、未殺菌乳と加工品（生乳から製造したバター・チーズ）などが考えられる。

サルモネラ・ティフィムリウムは、家畜の腸管内に含まれ、と殺の際、また食肉処理場の床、壁、水を介して食肉へ付着する。輸送技術が発達して、サルモネラ汚染の可能性を持つ生鮮食材の輸出入が増加していることも、感染のリスクを高めている。

2) 牛のサルモネラ症と耐性菌

国内で、成牛や搾乳牛のサルモネラ・ティフィムリウム感染症が広がったのは90年代のこと。81年に十勝で搾乳牛の感染が見つかり、91年以降、毎年十数件発生している。外部から導入した牛から牛舎内で感染が広がる可能性もあり、経済的被害が大きい。牛サルモネラ症の治療には、まずABPCなどが投与されるが、効果がない場合はフルオロキノロン系を使用することもあり、フルオロキノロンやセフェム系薬剤はヒトの医療に重要な抗生物質であり、耐性菌による感染を阻止する観点から慎重を期すべきだとの指摘もある。ある報告で、下痢をした搾乳牛から、多剤耐性サルモネラ菌 (*S. Newport*) が見つかった。この分離菌はヒト医療で多用されるセファロスポリン系耐性があり、菌が家畜やヒトを介して蔓延する可能性が危惧されている。

97年の家畜伝染病予防法改正で牛・豚・鶏のサルモネラ症が届出伝染病に指定された。その届出によると、サルモネラ症の発生は毎年確認されており、その耐性化の可能性も考えられる。

3) サルモネラ症増加の背景・牛の飼い方の変化

牛のサルモネラ症が増加した背景には、飼料の変化があることが指摘されている。粗飼料（干草）を餌に使用している場合は、サルモネラ菌がルーメン（第一胃）内で殺菌され、発症をまぬがれる。濃厚飼料（小麦など）やバイパス蛋白を多く給餌することでルーメン機能が低下していることと関係があると考えられている。保菌している牛が暑さや分娩、高泌乳、長距離輸送のストレスにより免疫機能低下した際に発症する。また、成長促進などの目的で使用される抗生物質により、サルモネラ菌の耐性化が進む可能性が危惧されている。

牛のサルモネラ症対策として、専門家がすすめているのは、生産性向上でなく、草食動物としての生理機能に適合した飼育管理だ。「新たな対策として第一胃内環境改善を目指して飼料を変更し、良質な粗飼料を確保する。生菌薬剤投与なども有効」という。そのほかに、定期的に、牛群や畜舎など環境をモニタリングすること、ヒトを介した感染を防ぐため牛舎への立ち入り制限・消毒、野鳥やネズミ対策も挙げられている。

4) どれだけの抗生物質が使われているのか

成長促進や病気の治療・予防のため、家畜に抗菌剤を投与することが耐性菌出現の原因の一つであると考えられている。では、国内ではどれくらい抗生物質が使用されているのか。

財団法人畜産生物化学安全研究所は平成17年に、耐性菌発生と抗生物質使用の関連を探る情報収集の一環として、ヒトの医療、家畜や水産動物・ペットなどの獣医療、飼料や農薬として使われる農畜産物の3分野について、抗生物質等の使用量を調査した。動物の医療に使われた抗生物質は純末換算量で、1969、70年は200トン台、76年度には400トン台、86年度には900トンでピークに達した後次第に減少し、2002年に700トンだったという。動物別に使用された内訳を見ると、豚(52%)、鶏(22%)、魚(15%)、牛(5%)。セフェム系では牛が82%を占めた。合成の抗菌剤は2002年に純末換算で215トン使用されたが、フルオロキノロン製剤は92年度の1.2トンから2002年には6.5トンに増加し、6割が鶏に使用されたが、近年犬、猫治療で使われる量が増えた。

販売量をもとに推計した家畜1頭あたりの抗菌性医薬品使用量は、2002年の数字で、豚28.8グラム、牛8.4グラム、鶏0.2グラムだった。抗生物質のみでは、牛6.4グラム、豚21.7グラム、鶏0.2グラムだった。同年のデンマークのデータでは、牛1.4グラム、豚3グラム、課金0.003グラムという。算出方法が異なることを考えても、EU諸国などで使用制限やモニタリングがすすめられているが、耐性菌が蔓延することが懸念される。

配合飼料に添加される抗生物質は2002年度には160トン。家畜に使用される抗生物質の総量は、ピークの80年代半ばには1300トンに及んだが、現在は900トンとされた。現在は、抗生物質等を与えない肉や食品を求める消費者が増えたため、ワクチンによる予防にシフトしつつあることなどが報告された。ただし、専門家からは、調査農作物に使われる農薬の使用量やヒト医療に使用される抗生物

質の純末換算量がないなどのデータ不足が数多く指摘され、各国と歩調を合わせたモニタリングが必要との意見が出された。

3. 家畜からヒトへの食を介した耐性菌感染の実態解明はこれから

1) 多剤耐性サルモネラ・ティフィムリウム DT104

中でも、多くの薬剤に耐性を示すサルモネラ・ティフィムリウム DT104 による感染が各地で発生し、懸念が高まっている。ヨーロッパでは 1989 年頃から、牛の感染が広がり、92 年頃から家禽、豚、羊からも分離されるようになった。

この多剤耐性菌による食中毒は、英国、デンマーク、チェコ、イタリア、米国、カナダなど多くの国で確認されている。ドイツでは 2000 年以降、アラブ系住民を中心に感染が広がり、トルコのゴマ菓子ヘルバが原因と言われた。日本も例外ではなく、東京都内だけで DT104 による集団食中毒が 9 件 (1997 ~ 2002) 報告された。そのうち、3 件は飲食店などでの牛レバ刺しが原因と特定されたほか、保育所の給食による例もあった。

サルモネラ・ティフィムリウムのフルオロキノロン耐性菌がヒトと動物から検出されているが、遺伝型が似ている例もある。デンマークでは、1998 年にサルモネラ・ティフィムリウムに感染して入院した 11 人の患者のうち、シプロフロキサシン薬剤治療が無効だったために 2 人が死亡した。

2) 農場・ペットからの感染

親子から分離された薬剤耐性サルモネラ菌が飼育していた牛から分離されたサルモネラと性状が近いことから、牛の耐性サルモネラがヒトに伝播した可能性が報告されている。前に述べたペットからの感染事例もある。このように、動物からヒトへ耐性菌が伝播する可能性は考えられるが、こうした直接感染が、公衆衛生上どの程度重要かについては今後の検討事項である。

3) 今後の食品中の薬剤耐性菌のヒトへの健康被害の研究

英国食品基準庁 (UKFSA) の報告書 (2007 年 5 月) でも、「農場の動物における抗生物質耐性菌の発生と、フードチェーン (食物連鎖) を介してヒトの抗生物質耐性菌の発生に関連性があるかについては、現時点では定量的な測定は困難、リスク管理・対策にはさらなる研究が必要」とされた。家畜、食品、ヒトから耐性菌が見つかり、今や耐性菌は農場のみならず、どこにでも存在するのは間違いないが、耐性菌に汚染された食べ物を食べたことによる感染については明らかになっていない。

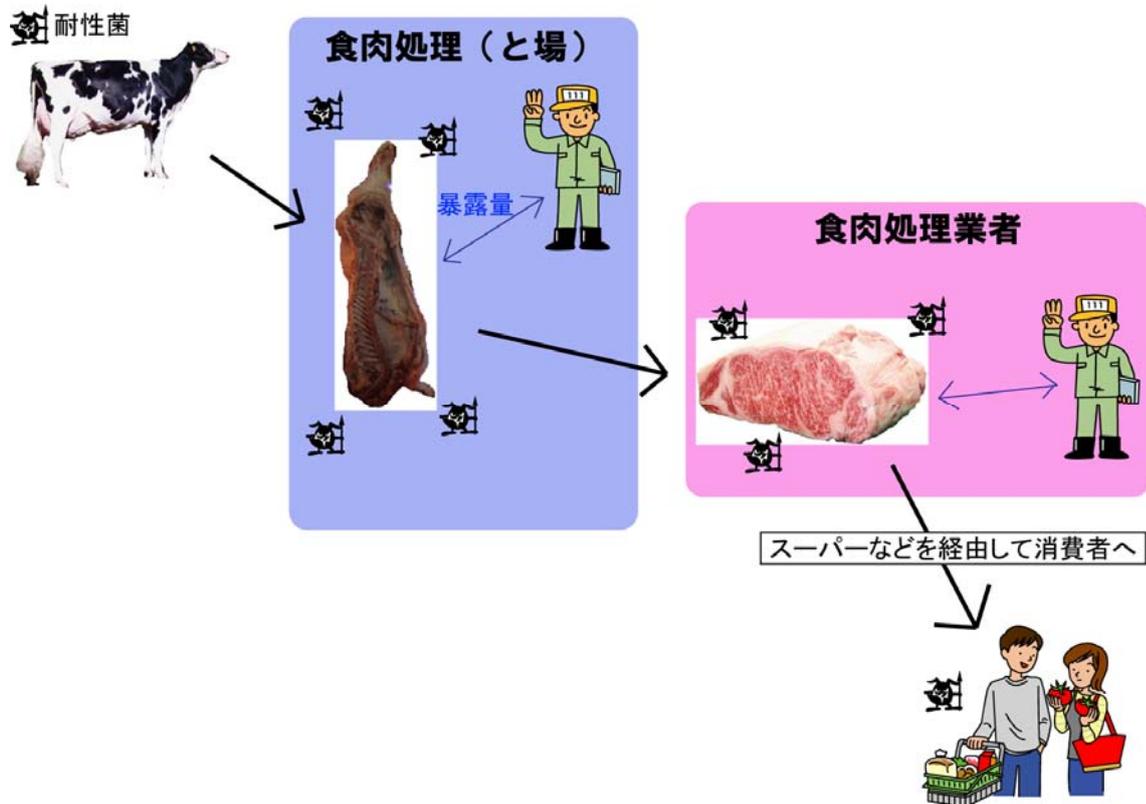
米国での事例研究では、フルオロキノロン耐性カンピロバクター患者は、外食で鶏肉またはターキーを食べたことがある人が多く見られたという (2004 年 Kassenborg 論文) が、どのように耐性菌が伝播したかの詳細は不明であり、家畜由来の耐性菌が食品を汚染するかどうかについての研究はこれから、という。屠場で処理後、どのように肉が汚染されるか、例えば食品加工の現場で感染が起これば、熱処理後の段階で汚染が起これるか、また家庭での感染のリスクはどの程度か、などの研究も待たれる。

4. まとめ——リスク評価のための研究・情報収集は始まったばかり

耐性菌は、「食」と「医療」、「環境」というヒトが生きる上で避けては通れない分野にまたがる、まさに現在進行形も問題だ。国や地域を問わず、この問題に無縁な人はいないと言える。だが、現実に行われている対策や規制、問題意識は、地域によって差が大きく、日本でも対策を講じるための調査・研究が端緒についたばかりと言える。研究者らは、ヒト、家畜、食品から検出されたサルモネラやカンピロバクターを比較分析し、関連性を明らかにすることで、食品の生産・流通・消費で耐性菌リスク低減を目指す、としていて、農場から食卓、人体への感染の過程における耐性菌出現状況のデータ収集が急がれている。しかし、耐性菌出現の原因とされる抗生物質が国内でどれだけ使用されている

かの実態把握さえ十分にはなされていない。対策の根拠となるリスクを評価するための情報が不足するなか、手探りで情報収集をすすめている段階と言える。

国内外の農業生産の現場では抗生物質が継続的に使用され、その結果耐性菌が選択的に増加する可能性が指摘されている。国境を越えて食べ物が流通する中、国際的な枠組みで研究がすすめられ、成果が共有されることが、全体の利益につながるのは間違いない。また、消費者も、耐性菌について理解を深め、生産現場やプロセスに関心を持つことも重要になるだろう。



	サルモネラ菌汚染 リスク要因	曝露	場(レベル)	食品の流れ	サルモネラ耐性菌 調査研究			
					(国内)	(外国)		
生	水・土壌・野生動物 ⇒		農場	家畜	豚舎・糞尿・汚水由来サルモネラの耐性(1) 汚水由来株耐性調査(2)	農場廃棄物の微生物による耐性伝達(英)(13) 土壌、水サンプル、ネズミの耐性調査(英)(14)	農場環境の耐性菌汚染	
産				非		耐性菌を含む糞尿から牧草地への汚染(英)(15)		
	飼料(検査あり) ⇒×			加		国内の抗菌剤使用量資料 / 抗菌剤使用との関連モニタリング(3)	家畜への抗菌剤使用・獣医療と耐性菌の関連(WHO)(16) 豚の獣医療での抗菌剤使用と耐性菌増加(英)(17) 抗菌剤使用中止と耐性菌の散変化(英)(18)	
	群れの家畜 ⇒			熱		家畜から分離の耐性菌分析、動向全国調査、食品・ヒト由来との関連(4) 豚・鶏・馬・羊・鶏・鯉・鮎・ニジマス・鮭・ブリ・ハマチの耐性菌(5)	家畜とヒト由来の耐性菌比較(英)(19)	
↓	農場スタッフ・獣医 ⇐							
↑								
流	輸送車両 ⇒		↓	(生体)			輸送車両等の耐性菌	
	解体機材 ⇒		↓					
通	作業従事者 ⇒		と畜場	枝肉			作業員の耐性菌保菌	
	*洗浄消毒によってリスクが断ち切れる?(仮説)			↓				
					帯広と場の300サンプル(6)			
						屠場と市場での肉サンプルの耐性比較(タイ)(20)		
	処理機材 ⇒		食肉処理業者・肉店	ブロック肉・パック肉	輸入鶏肉・国産鶏肉の耐性比較(7) 市販鶏肉の耐性菌・耐性化調査(埼玉)(8)	輸入・国産肉のサルモネラとヒト由来の耐性比較(デンマーク)(21)	従事者の耐性菌保菌	
	処理従事者 ⇒							
↓							耐性菌への意識調査	
↑	*知識普及(教育)によるリスク軽減効果			↓		消費者の意識調査(NZ)(23)		
	加工機材・調理器具 ⇒		(食品加工業者)			豚肉ソーセージから耐性菌(アイルランド)(24)		
消	加工・調理従事者 ⇒		↓		食品従事者由来のサルモネラ耐性菌分析(埼玉)(9)	外食と下痢発生の関連を電話調査(米)(25)	従事者・調理者の耐性菌保菌	
費				生肉・加工食品				
				↓				
↓			飲食店・家庭(食卓)	肉料理		ウィスコンシン州と全米の患者由来耐性菌比較(26)	食品中の耐性菌	
			(加熱不十分ほか)		食中毒患者由来のサルモネラ耐性菌・耐性化動向・遺伝学的解析(10) 散発下痢患者由来耐性サルモネラ分析(埼玉)(11)	下痢の子ども由来の耐性菌分析(タイ)(27)		
			食中毒					
	食を介さない耐性菌感染例							
	ヒト ⇒	ヒト			院内感染・市中感染			
	動物(家畜) ⇒	ヒト				獣医の家族に感染・耐性菌患者の農場訪問・居住との関連(米)(28) 家畜に接する農場スタッフ由来の耐性菌(タイ)(29)	農場スタッフ/獣医の耐性(菌)保菌	
	動物(ペット) ⇒	ヒト			犬から乳児へ伝達特定(12)	抗生物質治療を受けたペットによる耐性菌伝達(豪)(30) ペットの耐性菌(英)(31)		

参考文献

参考文献)

- (1) 財団法人畜産生物科学安全研究所『薬用耐性菌の出現等に関する文献の収集・およびその解析調査報告書』 p 56
- (2) 財団法人畜産生物科学安全研究所『薬用耐性菌の出現等に関する文献の収集・およびその解析調査報告書』 p 31
- (3) 財団法人畜産生物科学安全研究所『薬用耐性菌の出現等に関する文献の収集・およびその解析調査報告書』 p 3
- (4) 渡辺治雄ほか『食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15～17 年度総括・総合研究報告書』食中毒に関する疫学的・遺伝学的研究、 p1
- (5) 財団法人畜産生物科学安全研究所『薬用耐性菌の出現等に関する文献の収集・整理及びその解析調査報告書』 p 29
- (6) 武士ら (代表：牧野「サルモネラ耐性菌に関する研究」)
- (7) 『食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究 平成 15 年度総括・分担研究報告書』、甲斐明美、「食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究」 p 34
- (8) (9) 『食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15～17 年度総括・総合研究報告書』、山口正則、倉園貴至、大塚美代子「食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究」 p 19
- (10) 『食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15～17 年度総括・総合研究報告書』、泉谷秀昌、寺嶋淳、田口真澄「サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的研究」 p 7
- (11) 『食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15～17 年度総括・総合研究報告書』、山口正範、倉園貴至、大塚美代子「食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究」 p 111
- (12) 『食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15～17 年度総括・総合研究報告書』、渡辺治雄「食中毒に関する疫学的・遺伝学的研究」 p 2
- (13) (14) (16) UK publicly funded research on microbial antibiotic resistance in relation to the safety of food Report from the Microbiological Safety of Food Funders Group: p 13
- (15) Angulo, F.J; Nargund, V.N.; Chiller, T.C. : J.Vet.Med. B51,374-379(2004) Evidence of an Association Between Use of Anti-microbial Agents in Food animals,and Anti-microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequence of Such Resistance
- (17) (18) UK publicly funded research on microbial antibiotic resistance in relation to the safety of food Report from the Microbiological Safety of Food Funders Group:p15
- (19) UK publicly funded research on microbial antibiotic resistance in relation to the safety of food Report from the Microbiological Safety of Food Funders Group:p14
- (20) Padungtod,Pawin; Kaneene, John; Hanson,B. Robert: FEMS Immuno Med Microbio 47(2006)217-225
- (21) Skov,Marianne N et al.:Emerging Infectious Diseases vol.13, No4, April2007,638-641 Antimicrobial drug resistance of Salmonella Isolates from Meat and Humans, Denmark
- (22) UK publicly funded research on microbial antibiotic resistance in relation to the safety of food Report from the Microbiological Safety of Food Funders Group:p
- (23) NZFSA(New Zealand Food Safety Authority) (2007)Survey provides insight into consumers' thinking
<http://www.nzfsa.govt.nz/>
<http://www.nzfsa.govt.nz/consumers/food-safety-topics/consumer-surveys/index.htm>
<http://www.nzfsa.govt.nz/publications/media-releases/2007/umr-presser-final-oct-2007.htm>
- (24) Leonard, Boughton C.; Kelly, Egan J.; Markey, O'Mahony O. :Journal Food Prot.67(9),1834-1839(2004)

- (25) Jones, Timothy F.; Angulo Frederick J.:*Clinical Infectious Disease* 43(2006) 1324-1328 Eating in Restaurants:A Risk Factor for Foodborne Disease?
- (26) Karon, Amy E. et al. *Emerg Infect Dis.* 2007 Nov; 1777-1780 Human Multidrug-Resistant *Salmonella* Newport Infections, Wisconsin, 2003–2005
<http://www.cdc.gov/eid/content/13/11/pdfs/06-1138.pdf>
- (27) Padungtod,Pawin; Kaneene,John B: *International Journal of Food Microbiology*, 108 (2006)346-354 Salmonella in food animals and humans in northern Thailand
- (28) Angulo, F.J.; Nargund,V.N.; Chiller, T.C.:*J.Vet.Med.* B51,374-379(2004) Evidence of an Association Between Use of Anti-microbial Agents in Food animals,and Anti-microbial Resistance Among Bacteria Isolated from Humans and the Human Health Consequence of Such Resistance
- (29) Padungtod,Pawin; Kaneene,John B: *International Journal of Food Microbiology*, 108 (2006)346-354 Salmonella in food animals and humans in northern Thailand
- (30) Sidjabat, Hanna E.; Townsend, Kirsty M.; Lorentzen, Michael :*Journal of Medical Microbiology* 55, 1-3 (2006) Emergence and spread of two distinct clonal groups of multidrug-resistant *Escherichia coli* in a veterinary teaching hospital in Australia
- (31) UK publicly funded research on microbial antibiotic resistance in relation to the safety of food Report from the Microbiological Safety of Food Funders Group:p11

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

- 1 Kishima, M., Uchida I, Namimatsu T., Osumi T., Takahashi S., Tanaka K., Aokoi H., Matsuura K., and Yamamoto K. National surveillance of salmonella in the feces of pigs in Japan. *Zoonoses and Public Health* 55:139-144 (2008)
- 2 Saitoh M, Tanaka K, Nishimori K, Makino S, Kanno T, Ishihara R, Hatama S, Kitano R, Kishima M, Sameshima T, Akiba M, Nakazawa M, Yokomizo Y, Uchida I: The artAB genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology*. 151:3089-96. (2005)

その他、研究課題、輸入食品の耐性菌分離調査、耐性出現頻度および耐性因子の体内での伝達に関する研究、交叉耐性出現の解析、耐性菌に関する情報収集及び解析に関連した論文は現在投稿中もしくは準備中である。

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他

なし

3 今後の問題点等

- ① **食中毒及び患者由来菌株の解析**：サルモネラ菌株の収集が北海道内では困難なため、全国の数箇所の衛研に依頼し集めた。17事例中、2事例でアンピシリン耐性サルモネラが食品から患者に直接移行したことが証明された。アンピシリンの使用はヒトで多用されていないので健康被害情報とはいえないが、他のβ-ラクタム系抗菌薬への耐性を調べる必要がある。
- ② **家畜由来菌株の解析**：FQ耐性菌の出現が危惧されているが、牛由来サルモネラ株においてNA耐性でERFX低感受性となる株が分離された。これらが直接ヒトに移行するかどうかは不明なので、明らかな健康被害とはいえないが、今後さらに解析・調査を行う必要がある。また、食肉処理施設で肉用牛の枝肉と糞便からサルモネラの分離頻度は低く、肉から直接ヒトに耐性菌が移る可能性は低いようだ。
- ③ **輸入食品の耐性菌分離調査**：今までの調査で、リパックされていない（市場に出回る前の輸入そのものの状態で）冷凍エビや鶏肉を検査したので、輸出国の現状がそのまま把握できるはずで、サルモネラやカンピロバクター、リステリアが国内との比較で、そう大差なく分離された。同時に、薬剤耐性出現がどの程度なのかが重要であるが、国内外を問わずカンピロバクターのキノロン系の耐性が出現しており、海外の報告等を考えるとリスクとしては高いものと考えられる。しかし、サルモネラに関しては、耐性菌のリスクは、食品からはそう高くないのではと考えられた。
- ④ **交叉耐性出現の解析**：β-ラクタマーゼとセフェム系抗菌薬についてシュミレーション解析を行い抗生物質の作用機序を明らかにする試みは始まったばかりであり、今後薬剤耐性に関連した解析手法が問題である。しかし、変異も考慮に入れた解析が可能であることから、創薬分野への応用にも期待が持てる。
- ⑤ **耐性菌に関する情報収集及び解析**：種々の情報から、(a)宿主：抗生物質を常時使っている病院や老人ホームでの患者に感染が起こりやすい、(b)環境：抗生物質を多量に使用する農場から耐性菌が分離される率が高い傾向にある、(c)病原菌：ヒトや動物で耐性菌が分離されているので、生産現場が耐性菌のヒトへの伝播の汚染源である可能性は考えられるが、大部分の食肉処理施設では無菌的に食肉が処理されており、昨年のもともめからも家畜と人由来の菌が統計学的に同一ではないということが報告されているため、農場からテーブルへの関連が断ち切れる場所であるといえる。今後はレストランも含めた食品加工や家庭段階での調査が必要になるう。