

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08794

研究課題名(和文) 急増する第3、第4世代セファロスポリン耐性サルモネラの食品汚染抑制の為の基礎研究

研究課題名(英文) Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella*

研究代表者

村上 光一 (Murakami, Koichi)

国立感染症研究所・感染症疫学センター・室長

研究者番号：70446839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2005年から第3世代セファロスポリンに耐性を示す鶏肉由来サルモネラが、有意に増加し、次いで減少した。これは養鶏産業のセフトフル使用および使用自粛の影響と考えられた。サルモネラ血清型 Typhimurium と Infantis を同時に初生雛に摂取し、未接種のグループと同居させた。その結果、両血清型の基本再生産率には相違が認められなかった。血清型 Infantis (205 株)、Enteritidis (177 株) および Corvallis (90 株) の遺伝子型のシンプソン・インデックスは低値を示し、当該菌株が産業鶏の遺伝的多様性の低さに適応して進化したことを示唆していた。

研究成果の概要(英文)：Decreasing was detected in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. Extended-spectrum cephalosporin (ESC)-resistant *Salmonella* in chicken meat is a significant food safety concern. The prevalence of ESC-resistant *Salmonella* in chicken meat products increased in Japan between 2005 and 2010. The prevalence of ESC-resistant *Salmonella*, mainly consisting of AmpC β -lactamase CMY-2-producing isolates, in chicken meat products had increased to 45.5% (10/22) by 2011. However, following the voluntary cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry in 2012, the prevalence of ESC-resistant *Salmonella* steadily decreased each year, to 29.2% (7/24), 18.2% (4/22), 10.5% (2/19), and 10.5% (2/19) in 2012, 2013, 2014, and 2015, respectively. Furthermore, no AmpC β -lactamase CMY-2-producing isolates were identified in 2014 and 2015.

研究分野：獣医公衆衛生

キーワード：サルモネラ 薬剤耐性 鶏肉 Infantis 血清型 基本再生産

1. 研究開始当初の背景

私たちは、サルモネラの第 3、第 4 世代セファロスポリン耐性株が 2005 年以降、日本の鶏肉由来株で急増していること、この耐性株は、サルモネラ血清型インファンティスおよび血清型マンハッタンで占められていること、鶏肉のサルモネラ汚染率は 45.7% と高率であること、および同耐性株がヒトから分離されることを既に明らかにしていた。

特に第 3、第 4 世代セファロスポリン系薬剤は、小児のサルモネラ症重篤例等の治療薬として重要で、本薬剤に対する耐性株が、欧米および日本で、ヒトから分離されている。本菌の媒介食品として重要なものは鶏肉だが、鶏肉の耐性株汚染に関して、日本では実態把握がなされていない。急増したサルモネラの第 3、第 4 世代セファロスポリン耐性の因子は、大部分 (75%) を、プラスミド性 Amp-C ラクタマーゼの一種、CMY-2 が占めていた。CMY-2 の遺伝子は、血清型インファンティスおよびマンハッタンでは、270-280 kbp の巨大プラスミド上にインサーションシーケンス *ISEcp1* に伴われて存在していた。このようにサルモネラは公衆衛生上、非常に問題となる食中毒原因・人獣共通感染症原因菌である。この耐性菌の分布、耐性獲得の要因を明らかにすることは特に重要である。

2. 研究の目的

第 3、第 4 世代セファロスポリン耐性サルモネラの増加趨勢のモニター、血清型インファンティスの特定の系統が、鶏 (プロイラー) という宿主に対して特に適応していることの証明 (動物実験、遺伝子型多様性確認実験) を目的とする。

3. 研究の方法

H 27 年以降も、第 3、第 4 世代セファロスポリン耐性サルモネラが鶏肉を汚染し続けるかモニターした。市販鶏肉を 100 検体程度入手し、サルモネラを分離し、分離株の第 3、第 4 世代セファロスポリン耐性をディスク拡散法にて調査した。SPF 鶏雛 (日本生物科学研究所) を用意し、鶏雛群のうち数羽に菌株 (血清型インファンティスおよびネズミチフス菌) を組み合わせ、同一菌数、経口投与した。それぞれの菌で、どちらの菌がより、多くの非投与鶏に二次感染するか (基本再生産数が高いか) 確認し、菌株間の適応度の違いを確認した。パルスフィールドゲル電気泳動法による型別を行い、シンプソン係数から宿主への適応度合いを調査した。

4. 研究成果

鶏肉由来のサルモネラの薬剤耐性について検討した。2005 年位から第 3 世代

セファロスポリンに耐性を示す鶏肉由来サルモネラが、それ以前に比較し有意に増加した。しかし、2011 年をピークとして減少に転じ、2015 年現在では 2011 年に比較し、統計的に有意に減少した。セファロスポリン耐性の主体は AmpC 型のラクタマーゼ CMY-2 であり、その他に基質特異性拡張型ラクタマーゼ産生株の増加・減少も認められた。CMY-2 の遺伝子である *bla_{CMY-2}* は約 280 kbp のプラスミドに含まれており、*ISEcp1* の近傍に存在していた。2015 年現在、*bla_{CMY-2}* を保有した鶏肉由来サルモネラは、非常に減少した一方で、*bla_{TEM-52}* を保有する IncX1 型のプラスミドを保有する鶏肉由来サルモネラは依然分離され続けており問題である。2005 年からの当該耐性株の急増、そして 2012 年からの減少は、養鶏現場におけるワクチン接種時の第三世代セファロスポリン (セフチオフル) 使用および使用自粛の時期と呼応しており、当該薬剤使用の影響と考えられた。

サルモネラ血清型 ネズミチフス菌とインファンティス各 3 株を同時に初生雛 (SPF) 8 羽 (グループ A) に経口摂取した。その後グループ A をサルモネラ未接種のグループ B (4 羽) と同居させ、その後グループ B を、サルモネラ陰性のグループ C (4 羽) と同居させ、更にグループ C をサルモネラ未接種グループ D (2 羽) と同居させた。そのほかに、対象グループを作った。その結果、すべてのグループの鶏が、両血清型に感染 (腸管および肝臓) した。プロイラー養鶏場で非常に優勢を誇る血清型インファンティスであるが、本実験では血清型 ネズミチフス菌と比較してインファンティスの基本再生産率は相違が認められなかった。

血清型インファンティス (205 株)、エンテリティディス (177 株) およびコーバリス (90 株) の遺伝子型をパルスフィールドゲル電気泳動法で確認した。このときシンプソン・インデックスは 0.79、0.70 および 0.78 であり、チフス菌のそれよりも低かった。このことは、これらの菌株が宿主である産卵鶏および肉用鶏の遺伝的多様性の低さに対応して進化したことを示唆していると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

Shigemura H, Matsui M, Sekizuka T, Onozuka D, Noda T, Yamashita A, Kuroda M, Suzuki S, Kimura H, Fujimoto S, Oishi K, Sera N, Inoshima Y, Murakami K: **Decrease in**

the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int J Food Microbiol* 2018.

Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N *et al*: Genetic analysis of human norovirus strains in Japan in 2016-17. *Frontiers in Microbiology* 2018, 9:1. doi: 10.3389/fmicb.2018.00001.

Takahashi M, Nagasawa K, Saito K, Maisawa S, Fujita K, Murakami K, Kuroda M, Ryog A, Kimura H: Detailed genetic analyses of the *HN* gene in human respirovirus 3 detected in children with acute respiratory illness in the Iwate Prefecture, Japan. *Infect Genet Evol* 2018, 59:155-162.

Nagasawa K, Matsushima Y, Motoya T, Mizukoshi F, Ueki Y, Sakon N, Murakami K, Shimizu T, Okabe N, Nagata N *et al*: Phylogeny and Immunoreactivity of Norovirus GII.P16-GII.2, Japan, Winter 2016-17. *Emerging Infectious Diseases* 2018, 24:144-148.

Murakami K, Noda T, Onozuka D, Kimura H, Fujimoto S: Pulsed-field profile diversities of *Salmonella* Enteritidis, *S. Infantis*, and *S. Corvallis* in Japan. *Italian Journal of Food Safety* 2017, 6(6808):138-144.

Murakami K, Maeda-Mitani E, Onozuka D, Noda T, Sera N, Kimura H, Fujimoto S, Murakami S: Simultaneous oral administration of *Salmonella* Infantis and *S. Typhimurium* in chicks. *Ir Vet J* 2017, 70:27.

Kataoka Y, Murakami K, Torii Y, Kimura H, Maeda-Mitani E, Shigemura H, Fujimoto S, Murakami S: Reduction of the prevalence of AmpC -lactamase CMY-2 in *Salmonella* from chicken meat following cessation of the use of ceftiofur in Japan. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017, 10:10-11.

Mizukoshi F, Nagasawa K, Doan YH, Haga K, Yoshizumi S, Ueki Y, Shinohara M, Ishikawa M, Sakon N, Shigemoto N, Okamoto-Nakagawa R, Ochi A, Murakami K, Ryo A, Suzuki Y, Katayama K, Kimura H.: Molecular Evolution of the RNA-Dependent RNA Polymerase and Capsid Genes of Human Norovirus Genotype GII.2 in Japan during 2004-2015. *Front Microbiol* 2017, 25(April 2017).

村上光一: 鶏肉とサルモネラ. *食品微生物学雑誌* 2017, 34:181-188.

Maeda-Mitani E, Murakami K, Oishi A, Etoh Y, Sera N, Fujimoto S: Typing method for the QUB11a locus of *Mycobacterium tuberculosis*: IS6110 insertions and tandem repeat analysis. *BiolMed Research International* 2016, 2016:5216530.

大石明, 前田詠里子, 村上光一, 西田雅博, 世良暢之: 結核菌反復多型 (VNTR) 分析法を用いた福岡県における結核菌の遺伝子型別. *結核* 2016, 91:569-577.

Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, Furuta M, Onozuka D, Oda T, Asai T *et al*: Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS One* 2015, 10(2):e0116927.

〔学会発表〕(計 1件)

村上光一: 食品、環境への耐性菌の広がり(サルモネラおよび *Escherichia albertii* を例に) 第89回日本細菌学会総会 シンポジウム「薬剤耐性菌は制御できるか?」, 大阪市、2016年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等: なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
村上 光一 (MURAKAMI, Koichi)
国立感染症研究所・室長
研究者番号: 70446839

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

重村 洋明 (SHIGEMURA Hiroaki)

福岡県保健環境研究所

研究者番号：(50761540)