

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：87107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19428

研究課題名(和文) ヒト治療薬耐性サルモネラが鶏肉に残存するのはなぜか？原因解明と汚染低減の為の研究

研究課題名(英文) Why were retail chicken meat still contaminated with cephalosporin-resistant Salmonella? Research to elucidate the cause and to reduce the contamination

研究代表者

重村 洋明 (Shigemura, Hiroaki)

福岡県保健環境研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：50761540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：養鶏業界でのセフトフル使用自粛後もセファロスポリン(ESC)耐性サルモネラによる鶏肉汚染が続いた。その要因がサルモネラのプラスミド上の遺伝子にあると考えたが、要因を明確するに至らず、他要因の検討も必要と考えられた。また、安定同位体比分析を利用しESC耐性サルモネラ汚染鶏肉の生産地域推定が可能かを検討したところ、プロット位置に特徴を認めた地域については、生産地域推定に同分析を利用できる可能性が考えられた。さらに、ヒトでの感染状況調査を行い、ESC耐性サルモネラの感染が一部のヒトで確認された。ESC耐性株には、鶏肉で分離される血清型も含まれ、鶏肉からヒトへの伝播の可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

市販鶏肉を汚染したESC耐性サルモネラのblaTEM保持プラスミドにセフトフル使用自粛前後で大きな違いがないことを本研究で明らかにした。さらに、無症状のヒトのサルモネラ保菌状況およびサルモネラのESC耐性状況を明らかにすることができた。これらはESC耐性サルモネラの拡散制御のための基礎的な知見となり、今後の研究への発展および公衆衛生上の対策等に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Retail chicken meat were still contaminated with extended-spectrum cephalosporin (ESC)-resistant Salmonella, despite the voluntary withdrawal of ceftiofur in Japanese poultry industry. It was expected that the cause of the contamination might be in relation with the specific genes on Salmonella plasmid. However, it could not be clarified. Also, it was examined whether stable isotope ratio analysis could be used as a method to estimate the producing area of chicken meat contaminated with ESC-resistant Salmonella. The method might be available for chicken meat samples showing characteristic distributions in two dimensional plot of principal component analysis. In addition, this study revealed that some humans without clinical symptoms were infected with ESC-resistant Salmonella. Several serovars of the human ESC-resistant Salmonella were the same serovars isolated from chicken meat, suggesting the possibility of transmission from chicken meat to human.

研究分野：公衆衛生、細菌

キーワード：サルモネラ 安定同位体比 薬剤耐性 鶏肉 保有率

1. 研究開始当初の背景

ヒト(特に小児)がサルモネラに感染し、重篤化すると死に至ることもあることから、治療薬である第3、第4世代セファロスポリン薬剤といった広域スペクトル・セファロスポリン(ESC)への耐性を当該菌が獲得することは公衆衛生上の脅威である。過去に福岡県の市販鶏肉を汚染するESC耐性サルモネラが急増したが、その原因は養鶏産業におけるセフトオフル(ESCの1種)使用と関連があることが示唆されている。2012年のセフトオフル使用自粛により、ESC耐性サルモネラは減少したが、2014年以降も残存し続けている(2017年時点)。これまでのところ、ESC耐性サルモネラが残存する理由、それらに汚染された鶏肉がどこで生産されているのか、ヒトへの感染状況は不明である。

2. 研究の目的

以下の3つのことを目的に研究を実施した。

- セフトオフル使用自粛後もESC耐性サルモネラが鶏肉に残存し続けている理由の解明
- ESC耐性サルモネラが分離される鶏肉の生産地域の推定法の検討
- ESC耐性サルモネラの鶏肉を介したヒトへの感染状況の解明

3. 研究の方法

ESC耐性サルモネラの保有するプラスミドの解析による残存理由の検討

2011年~2016年に鶏肉より分離されたESC耐性サルモネラ(血清型Manhattan)が保有するプラスミドを対象に検討を行った。5株について、DNA抽出を行い、illumina MiSeq及びNanopore sequencer MinIONにより bla_{TEM} 保有プラスミドの塩基配列を決定した。得られたプラスミドの塩基配列情報についてDDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST、DNA Data Bank of Japan)を用いてアノテーションを行い、遺伝子の検索を行った。さらに、アノテーションされた遺伝子についてBLAST検索を行い、遺伝子の確認および機能を調査し、それぞれのプラスミドと比較した。

安定同位体比を用いたESC耐性サルモネラ汚染鶏肉の生産地域の推定法の検討

国内及び国外で生産された市販鶏肉を収集した。その中で、6地域の産地の鶏肉($n = 3$)を対象とし、安定同位体比分析(^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O)を行った。国内は、産地A(北海道・東北)、産地B(中部)、産地C(九州・沖縄)、産地D(九州・沖縄)の4地域であり、国外は産地a(東南アジア)及び産地b(南米)の2地域で、緯度の異なる地域を対象とした。測定試料には各地域で生産された鶏肉3検体ずつを用い、試料の前処理として凍結乾燥・粉碎後、メタノール/クロロホルム(1:2)溶液による脱脂処理を行った。

^{13}C 及び ^{15}N の安定同位体比測定は元素分析計-安定同位体比質量分析計(EA-IRMS)により行った。また、 ^{18}O の安定同位体比測定は熱分解装置-安定同位体比質量分析計(TCEA-IRMS)により行った。得られた安定同位体比について主成分分析を行い、第一主成分と第二主成分について二次元プロットを作成した。

ESC耐性サルモネラの鶏肉を介したヒトへの感染状況の調査

国内のサルモネラ症を示していないヒトの糞便(14万件以上)から分離されたサルモネラのうち供試可能だった158株を用いた。ヒトに感染しているサルモネラの特徴を把握するためサルモネラ分離株の血清型別を行った。また、ESCに耐性を示す菌株がヒトに感染しているかを把握するため、薬剤感受性試験及び基質拡張型-ラクタマーゼ(ESBL)とAmpC-ラクタマーゼ産生の有無について確認を行った。さらに、ESC耐性株について遺伝学的手法を用いてESC耐性に関連する bla 遺伝子の検出と遺伝子型別を試みた。

4. 研究成果

ESC耐性サルモネラの保有するプラスミドの解析による残存理由の検討

養鶏業界でのセフトオフル使用自粛後もESC耐性サルモネラによる鶏肉汚染が続いていたため、 bla 遺伝子保有プラスミド上に bla 遺伝子の他に鶏生産環境においてサルモネラの生存に有利となる遺伝子が存在している可能性を考えた。セフトオフル使用自粛前後でのプラスミドの大きさや存在する遺伝子の数等の違いを比較したところ大きな違いは認められなかった。また、ESC耐性サルモネラの生存に有利に働く可能性がある遺伝子がプラスミド上に存在していないか探索したが、特定遺伝子がESC耐性サルモネラの生存に関与しているか明らかとならなかった。プラスミドには機能不明遺伝子も存在しており、それら遺伝子がESC耐性サルモネラの生存に関与した可能性が残されるものの、その他の要因についても検討が必要と

考えられた。

安定同位体比を用いた ESC 耐性サルモネラ汚染鶏肉の生産地域の推定法の検討

市販鶏肉の生産地域は「国内産」のように表示されることが多く、ESC 耐性サルモネラに汚染された鶏肉がどの地域で生産されたものか特定が困難である。そこで、安定同位体比分析を利用して鶏肉の生産地域推定が可能か検討を行った。主成分分析により国内由来検体（産地 A、B、C、D）と国外由来検体（産地 a、b）を比較したところ、産地 a、b 検体は国内由来検体とは異なる位置にプロットされた。また、国内由来検体を比較したところ、産地 A は産地 B、C、D 検体とは異なる位置にプロットされた（図）。一方で産地 B、C、D 検体については、一部プロットが重なり、区別が難しかった。本研究においてプロット位置に特徴を認められた地域については、ESC 耐性サルモネラに汚染された鶏肉の生産地域の推定に安定同位体比が利用できる可能性が考えられた。しかし、測定サンプル数が豊富ではないため、サンプル数を増やし生産地域による特徴をより正確に捉える等、さらなる検討が必要と考えられた。

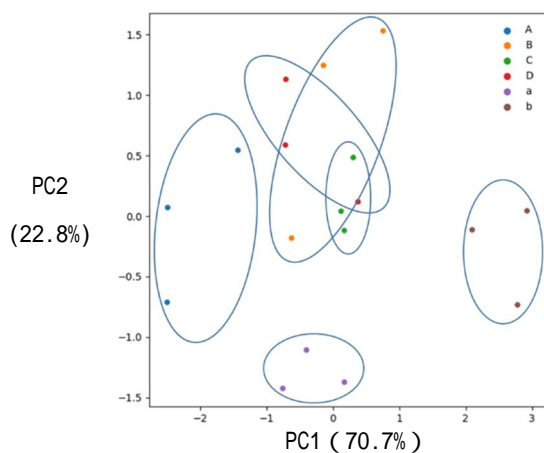


図 主成分分析プロット

ESC 耐性サルモネラの鶏肉を介したヒトへの感染状況の調査

鶏肉からヒトへの ESC 耐性サルモネラ感染リスクを把握するため、ヒトでの ESC 耐性サルモネラの保有状況の調査を行った。ヒトから分離され供試可能だった 158 株のサルモネラについて血清型別を実施したところ、50 種の血清型に分類された。上位 5 血清型は Infantis、Schwarzengrund、Thompson、Manhattan、Saintpaul であり、鶏肉から高頻度に分離される血清型である Infantis や Schwarzengrund 等が含まれていた。このことから、鶏肉を介したヒトへのサルモネラ伝播の可能性が考えられた。さらに、供試菌株のうち 7 株が ESC 耐性株（4 株が *bla*_{CTX-M} 保有 ESBL 産生株、3 株が *bla*_{CMY} 保有 AmpC⁻ラクタマーゼ産生株）であったことから、一部のヒトが ESC 耐性サルモネラに感染していることが明らかとなった。ESC 耐性株の中には Infantis のような鶏肉で見られる血清型も含まれており、鶏肉を介しヒトへ ESC 耐性サルモネラが伝播している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 SHIGEMURA Hiroaki, MAEDA Takashi, NAKAYAMA Shiko, OHISHI Akira, CARLE Yuki, OOKUMA Eiko, ETOH Yoshiki, HIRAI Shinichiro, MATSUI Mari, KIMURA Hirokazu, SEKIZUKA Tsuyoshi, KURODA Makoto, SERA Nobuyuki, INOSHIMA Yasuo, MURAKAMI Koichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant <i>Salmonella</i> harboring a bla _{CMY-2} -carrying IncA/C plasmid chromosomally integrated by IS _{Ecp1} or IS ₂₆ in layer breeding chains in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1345 ~ 1355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigemura Hiroaki, Sakatsume Eri, Sekizuka Tsuyoshi, Yokoyama Hiroshi, Hamada Kunihiro, Etoh Yoshiki, Carle Yuki, Mizumoto Shiro, Hirai Shinichiro, Matsui Mari, Kimura Hirokazu, Suzuki Motoi, Onozuka Daisuke, Kuroda Makoto, Inoshima Yasuo, Murakami Koichi	4. 巻 86
2. 論文標題 Food Workers as a Reservoir of Extended-Spectrum-Cephalosporin-Resistant <i>Salmonella</i> Strains in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00072-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00072-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 重村洋明、前田俊、中山志幸、カール由起、世良暢之、村上光一
2. 発表標題 採卵鶏及び採卵鶏農場から分離されたサルモネラの薬剤耐性保有状況調査
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重村洋明、前田俊、中山志幸、カール由起、大隈英子、世良暢之、村上光一
2. 発表標題 鶏卵生産環境でもESC耐性サルモネラは拡大していたのか
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重村洋明、前田俊、カール由起、大隈英子、世良暢之、村上光一
2. 発表標題 鶏卵生産環境のサルモネラからも鶏肉由来サルモネラに拡大していたESC耐性関連プラスミドは見つかるのか
3. 学会等名 令和元年度獣医学術九州地区学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重村洋明、前田俊、カール由起、大隈英子、世良暢之、村上光一
2. 発表標題 鶏卵生産環境におけるbla _{CMY-2} 保有ESC耐性サルモネラの拡大
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 重村洋明、前田俊、カール由起、大隈英子、世良暢之、村上光一
2. 発表標題 鶏肉由来サルモネラで拡大していたESC耐性関連プラスミドは鶏卵生産環境由来サルモネラからも見つかるのか
3. 学会等名 令和元年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------