

養鶏産業とヒトにおける広域スペクトラムセファロスポリン耐性  
サルモネラの汚染実態および伝播に関する研究

2021年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

重村 洋明

養鶏産業とヒトにおける広域スペクトラムセファロスポリン耐性  
サルモネラの汚染実態および伝播に関する研究

重 村 洋 明

## 目次

緒言 .....	1
表および図.....	9
第一章 市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査および保有プラスミドのゲノム解析 .....	15
序論 .....	16
材料および方法.....	18
1. 使用菌株, 検体情報, 分離方法 .....	18
2. 薬剤感受性試験, <i>bla</i> 遺伝子の探索および <i>bla</i> 遺伝子の型別 .....	20
3. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) によるプロファイリング .....	23
4. ESC 耐性株の保有するプラスミドの解析.....	25
5. 市販鶏肉の ESC 耐性サルモネラ汚染状況.....	27
6. 統計処理.....	27
結果 .....	28
1. 分離株の薬剤感受性および分離株から検出された <i>bla</i> 遺伝子 .....	28
2. ESC 耐性株の PFGE プロファイリング .....	29
3. ESC 耐性株のプラスミド解析 .....	29
4. 市販鶏肉の ESC 耐性サルモネラ汚染状況.....	30
考察 .....	32
表および図 .....	37
第二章 鶏卵, 鶏卵生産環境における ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査および全ゲノム解析による <i>bla</i> 遺伝子の拡散に関する因子の解析 .....	45

序論 .....	46
材料および方法 .....	48
1. 使用菌株, 検体情報, 分離方法 .....	48
2. 血清型別 .....	49
3. 薬剤感受性試験, <i>bla</i> 遺伝子の探索および <i>bla</i> 遺伝子の型別 .....	49
4. <i>bla</i> 遺伝子を保有する ESC 耐性株の疫学情報 .....	51
5. <i>bla</i> 遺伝子を保有する ESC 耐性株の WGS 解析 .....	51
6. 比較ゲノム構造解析 .....	53
7. pSEOhim1593a プラスミドおよび腸内細菌科細菌由来プラスミドの比較 解析 .....	54
結果 .....	55
1. サルモネラ分離株の血清型 .....	55
2. 分離株の薬剤感受性および分離株から検出された <i>bla</i> 遺伝子 .....	55
3. <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> または <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> を保有する ESC 耐性株の疫学情報 .....	56
4. WGS による薬剤耐性遺伝子, プラスミドレプリコンタイプ, IS の同定 .....	56
5. 比較ゲノム構造解析 .....	57
6. pSEOhim1593a プラスミドおよび腸内細菌科細菌由来プラスミドの比較 解析 .....	57
考察 .....	59
表および図 .....	63
第三章 食品従事者における ESC 耐性サルモネラの保菌状況調査および全ゲ ノム解析による <i>bla</i> 遺伝子の拡散に關与する因子の解析 .....	79
序論 .....	80

材料および方法.....	82
1. 使用菌株, 検体情報, 分離方法 .....	82
2. 血清型別.....	83
3. 薬剤感受性試験, <i>bla</i> 遺伝子の探索および <i>bla</i> 遺伝子の型別 .....	84
4. WGS による <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> 保有 ESC 耐性株のゲノム解析 .....	84
5. 同一レプリコンタイプを示すプラスミドとの比較解析 .....	86
6. 比較ゲノム構造解析 .....	86
7. 倫理審査.....	87
結果 .....	88
1. ヒト糞便検体からのサルモネラ分離株の血清型と分離率 .....	88
2. 薬剤感受性試験および <i>bla</i> 遺伝子型別.....	88
3. WGS による薬剤耐性遺伝子, プラスミドのレプリコンタイプ, IS の同定 .....	89
4. <i>S. Senftenberg</i> 由来プラスミドと同一のレプリコンタイプを示す他の血 清型由来プラスミドの比較.....	90
5. プラスミドおよび染色体の構造比較.....	90
考察 .....	92
表および図 .....	97
総括.....	105
謝辞.....	109
引用文献 .....	110

## 略語一覧

ABPC : Aminobenzyl penicillin (Ampicillin), アンピシリン

ABPC-SBT : Aminobenzyl penicillin (Ampicillin) - sulbactam, アンピシリン  
-スルバクタム

ATCC : American type culture collection, アメリカン・タイプ・カルチャー  
・コレクション

AZM : Azithromycin, アジスロマイシン

BA : Boronic acid, ボロン酸

BPW : Buffered pepton water, 緩衝ペプトン水

CAZ : Ceftazidime, セフトアジジム

CFIX : Cefixime, セフィキシム

CFPM : Cefepime, セフェピム

CFX : Cefoxitin, セフォキシチン

CL : Colistin, コリスチン

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute, 米国臨床検査標準協議会

CMZ : Cefmetazole, セフメタゾール

CP : Chloramphenicol, クロラムフェニコール

CPD (CPDX) : Cefpodoxime, セフポドキシム

CPFX : Ciprofloxacin, シプロフロキサシン

CTT : Cefotetan, セフォテタン

CTX : Cefotaxime, セフォタキシム

CVA : Clavulanic acid, クラブラン酸

DHL 寒天培地 : Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose agar, デオキシコレート・ハイドロジェン・サルファイド・ラクトース寒天培地

DDBJ : DNA Data Bank of Japan, 日本 DNA データバンク

DFAST : DDBJ Fast Annotation and Submission Tool, DDBJ・ファスト・アノテーション・アンド・サブミッション・ツール

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸

ESBL : Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, 基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ

ES : EDTA-N-lauroyl sarcosine, EDTA-N-ラウロイルサルコシン

ESC : Extended-spectrum cephalosporin, 広域スペクトラムセファロスポリン

GPC, GP センター : Egg grading and packing center, 卵選別包装施設

HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Point, ハサップ

IPM : Imipenem, イミペネム

IR : Inverted repeat, 逆向き反復配列

IRL : Left inverted repeat, 左側の逆向き反復配列

IRR : Right inverted repeat, 右側の逆向き反復配列

IS : Insertion sequence, 挿入配列

KM : Kanamycin, カナマイシン

LB-EP チェーン : Layer breeding and shell and liquid egg processing chain, 採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン

LIM 培地 : Lysin indole motility medium, リジン・インドール・運動性培地

LMOX : Moxalactam, モクサラクタム

LPP : Large plasmid profile, プラスミドプロファイル

MEPM : Meropenem, メロペネム

MIC : Minimum inhibitory concentration, 最小発育阻止濃度

NA : Nalidixic acid, ナリジクス酸

NCBI : National Center for Biotechnology Information, 米国生物工学情報  
センター

NFLX : Norfloxacin, ノルフロキサシン

PAPM : Panipenem, パニペネム

PCR : Polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応

PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis, パルス・フィールド・ゲル電気泳動

PFP : PFGE profile, PFGE プロファイル

RV ブロス : Rappaport-Vassiliadis broth, ラパポート・バシリアデイス・  
ブロス

SM : Streptomycin, ストレプトマイシン

SMID 寒天培地 : Salmonella detection and identification agar, サルモネラ  
検出同定寒天培地

TC : Tetracycline, テトラサイクリン

tnp : transposase gene, トランスポゼース遺伝子

tIS : transpoter insertion sequence, トランスポーターIS

TSB : Trypticase soy broth, トリプトソイブロス

TSI 培地 : Triple sugar iron medium, 三糖鉄寒天培地

TT ブロス : Tetrathionate broth, テトラチオネートブロス

WGS : Whole genome sequence, 全ゲノムシーケンス

XLT4 寒天培地 : Xylose lysine tergitol 4 agar, キシロース・リジン・タージ  
トール 4 寒天培地



## 緒言

サルモネラは、腸内細菌科に属する周毛性鞭毛を有す、グラム陰性の通性嫌気性桿菌であり、*Salmonella enterica* および *S. bongori* の 2 種に分類される (27)。さらに *S. enterica* は亜種 *enterica* を含む 6 亜種に分類され、これまでに約 2,600 もの血清型に型別されている。これらの血清型には、全身性感染を引き起こすチフス症の原因である *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi のようなヒトにのみ感染する宿主域が限定的な血清型もあるが、多くの血清型は、ヒトや動物に感染し、ヒトにおいて胃腸炎を主徴とするサルモネラ症を引き起こすおそれがある (2, 4, 27, 99)。サルモネラ (以下、本稿では、チフス症の原因となる *S. Typhi* および *S. Paratyphi* を含めない) は主に食品を介してヒトへ感染し、食中毒の原因となる (65)。ヒトのサルモネラ症 (以下、本稿では、チフス症を含めない) は世界で年間 9,380 万件発生し、そのうち、8,030 万件が食品媒介性であると推定されており (65)、公衆衛生上、サルモネラは注視すべき病原体といえる。

サルモネラがヒトに感染すると通常、発熱、下痢、嘔吐等の胃腸炎を呈すことが多いが、重症化し、敗血症のような全身症状に進行し、死に至ることもある (56, 99)。サルモネラ感染は、世界で年間 155,000 人の死亡者を出している と推計されている (65)。多くの場合、サルモネラに感染しても自然治癒するため、抗菌薬による治療を必要としないが、小児、高齢者、免疫不全者、あるいは重症患者は抗菌薬による治療の対象となる (36)。治療には、ニューキノロンや広域スペクトラムセファロスポリン (ESC) が選択されるが、ニューキノロンには、関節軟骨を損傷するおそれがあるため、小児の治療には、ESC が選択

される (36)。したがって、ESC に耐性を示すサルモネラの出現や拡散は、サルモネラ症治療における大きな弊害となるため、公衆衛生上の重要な問題である。

サルモネラは主に畜産物等の食品を介してヒトに感染する。特に、鶏肉や鶏卵のような鶏由来食品はサルモネラ食中毒の主な原因の一つとなっている (22, 70, 78)。これまでに、様々な国で、肉用鶏等の家禽やその肉から ESC 耐性サルモネラが分離されており (17, 21, 43, 59, 62, 67, 89, 134, 135, 137)、日本国内でも肉用鶏や市販鶏肉から ESC 耐性サルモネラが分離されている (11, 66, 77) (表 A)。また、スペイン、インド、エクアドルでは、採卵鶏や養鶏場等から ESC 耐性サルモネラが分離されている (93, 97, 98) (表 B)。日本国内においては、採卵鶏農場や卵選別包装施設 (GP センター) から、アンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、セファロチン等の抗菌薬に耐性を示すサルモネラが分離されているが (41, 112)、ESC 耐性サルモネラに関する知見はない。これまでに国内および国外の市販鶏卵から ESC 耐性サルモネラが分離された報告はないが、採卵鶏およびその生産環境に由来するサルモネラは鶏卵や卵製品等を介しヒトへ伝播するおそれがあるため、採卵鶏およびその生産環境における ESC 耐性サルモネラに関する調査が必要である。

調理従事者・給仕者、食品加工者のように、食品の調理・提供、加工に従事する食品従事者がサルモネラを保菌していた場合、衛生管理が十分でないと、食品を介してサルモネラをヒトへ伝播させるリスクがあるため (32, 68, 82)、食品従事者は、サルモネラの潜在的な感染源と認識されている (82)。また、これまでに世界中で ESC 耐性サルモネラがヒトから分離されていることから (31, 109, 118, 128, 132)、食品従事者のサルモネラの保菌状況を明らかにするとともに、食品従事者から分離されるサルモネラの ESC 耐性を把握することが望まれる。しかし、近年、先進国での食品従事者のサルモネラ保菌状況を示す報告

はほとんどない。最新の報告は日本からのもので、九州地方の食品従事者のサルモネラ保菌率が 0.03% (106 検体 /331,644 検体) であることが示されているが (71), 1999 年から 2000 年に実施されたものと古く、近年の状況とは異なる可能性がある。また、国内の食品従事者から ESC 耐性サルモネラが分離された報告 (96) は一報である。したがって、現在の食品従事者のサルモネラ保菌率およびサルモネラの ESC 耐性の実態は把握できていない。

サルモネラの ESC 耐性化には AmpC  $\beta$ -lactamase や ESBL (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase) のような ESC 分解酵素をコードする  $\beta$ -lactamase 遺伝子 (*bla* 遺伝子) の獲得が関与する (24, 102)。代表的な AmpC  $\beta$ -lactamase 遺伝子には *bla*<sub>CMY</sub>, ESBL 遺伝子には *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> および *bla*<sub>CTX-M</sub> が挙げられる (11, 17, 43, 59, 62, 66, 77, 134, 135, 137)。これらの *bla* 遺伝子は、プラスミドによってサルモネラを含む腸内細菌科細菌間で水平伝播により拡散していく (17, 95, 130) (図 A)。*bla* 遺伝子の型別、プラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子、およびレプリコンタイプ等の特徴を明らかにすることは、*bla* 遺伝子が細菌間でどのように拡散しているかを理解する一助となる。例えば、韓国の家禽肉およびヒト由来 *S. Enteritidis*, また、ヒト由来 *S. Virchow* から *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保持する IncHI2 型プラスミドが見つかっており (47), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> が IncHI2 型プラスミドを介して韓国のサルモネラ間で広がっていると考えられる。

さらに、*bla* 遺伝子は、トランスポゾンにより、細菌の染色体やプラスミドの別の位置に転移し (125), 拡散している (図 A) (24, 84, 102)。細菌の転移因子は、トランスポゾンと呼ばれ、転移に必要な機能以外の機能をコードしているかどうかで、単純トランスポゾンと複合型トランスポゾンに大別される (99, 125)。挿入配列 (insertion sequence, IS) は、単純トランスポゾンに分類され、それのみで単一細胞内の同じ、または異なる DNA 分子に転移することが可能

である (88, 99, 125)。IS は、転移に必要な逆向き反復配列 (inverted repeat, IR) を両末端に有し、その間に IS の移動を触媒するトランスポゼース (transposase) 遺伝子 (*tnp*) を配置する構造をとる (99, 106)。複合型トランスポゾンには、転移機構だけでなく様々な遺伝情報を有するものを指し、転移に IS が関与するものとして、クラス I の複合型トランスポゾンがある。クラス I の複合型トランスポゾンは、両末端に IS を配置し、その間に薬剤耐性遺伝子等を含み、両末端の IS を含む全体が転移する (99)。その他に、クラス I の複合型トランスポゾンの両末端の IS のうち 1 つの IS が欠失したような構造をとるトランスポーター-IS (tIS) と呼ばれるトランスポゾンを形成し、IS の近傍にある薬剤耐性遺伝子を含む様々な遺伝子を移動させるものもある (92, 122)。

IS は transposase の一次配列の類似性や IR の長さ、配列等の特徴をもとに、29 ファミリー、4,500 種以上に分類されている (107, 122)。IS のうち、IS1380 ファミリーの *ISEcp1* や、IS6 ファミリーの *IS26* 等、いくつかの IS は *bla* 遺伝子のような薬剤耐性遺伝子の転移に関与していることが報告されている (24, 102, 136)。例えば、中国の家禽由来の *S. Indica* の染色体から、中国の家禽由来 *Escherichia coli* や *S. Typhimurium* が保有する IncHI2 型プラスミドとほぼ同一の *ISEcp1* と *bla<sub>CTX-M-64</sub>* を含む構造が確認されたことから (136)、*S. Indica* は水平伝播等により IncHI2 型プラスミドを獲得した後、*ISEcp1* により、*bla<sub>CTX-M-64</sub>* がプラスミドから染色体に転移したことが示唆されている。また、日本国内のウシから分離された *S. Typhimurium* の染色体に、IncA/C 型プラスミドの *bla<sub>CMY-2</sub>*、*tet(A)*、*sul2* および *floR* 等の複数の薬剤耐性遺伝子が *IS26* により組込まれたことが示唆されている (102)。したがって、ESC 耐性サルモネラにおいても、*bla* 遺伝子の転移に関与する IS を同定することは、*bla* 遺伝子の拡散機序の解明の一助となり得る。

ESC 耐性サルモネラのレプリコンタイプ、薬剤耐性遺伝子、IS 等のプラスミドの詳細な遺伝情報を得るためには、広範囲にわたるゲノムの塩基配列を取得する必要がある。ゲノムの塩基配列解析は、これまで、サンガーシーケンスを用いた部分的解析が主流であったが、近年、全ゲノムシーケンサーの普及により、細菌の染色体やプラスミドの全ゲノムシーケンス (whole genome sequence, WGS) が可能となった。これにより、ゲノム上に存在する遺伝子を網羅的に検索することができ、ゲノム構造をより詳細に解析できるようになった。例えば、プラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子の探索、プラスミドのレプリコンタイプの同定、異なるプラスミドの比較構造解析等に応用されており、*bla* 遺伝子を含む薬剤耐性遺伝子の網羅的な検出に加え、薬剤耐性遺伝子の転移に関わる IS の特定等により、詳細な知見が得られている (1, 101, 102)。また、IS の分布、多様性、コピー数の全容が明らかとなったのは、WGS による貢献が大きい (106)。ESC 耐性サルモネラについても WGS を用いることで、*bla* 遺伝子を含む薬剤耐性遺伝子の転移やその転移に関わる IS 等の遺伝情報が取得可能となる。

家畜での薬剤耐性菌の出現および拡散は、家畜での抗菌薬の使用と関係があり (21, 28, 48)、薬剤耐性菌は汚染された食肉等の食品を介してヒトへ伝播することが示唆されている (21, 48)。ヨーロッパにおいて、1990 年代に家畜用飼料へのバンコマイシン類似抗菌薬であるアボパルシンの添加を禁止したところ、ヒトから分離される腸球菌に占めるバンコマイシン耐性腸球菌の割合 (28) や健康なヒトから分離されるバンコマイシン耐性腸球菌の割合が減少したことが報告されている (48)。実際に、ドイツにおいて、1996 年 1 月に家畜でのアボパルシンの使用が禁止されたところ、ドイツ Saxony-Anhalt 州における健康なヒトから分離されたバンコマイシン耐性腸球菌の割合が、12.0% (12/100 検体、



1994年)から、6.0% (6/100 検体, 1996年), 3.3% (13/400 検体, 1997年)へとアボパルシン使用禁止後に減少した(48)。また、ESCの1種であるセフトチオフルがカナダの養鶏業界の孵化場で適応外使用されていたが、2005年にセフトチオフルの使用が自粛されたところ(21)、市販鶏肉およびヒト臨床検体由来の*S. Heidelberg*に占めるESC耐性株の割合が減少したことが報告されている(21)(表C)。日本国内の養鶏業界においても、卵内あるいは初生雛へのワクチン接種にセフトチオフルが適応外使用されていたが(34)、農林水産省等の調査により肉用鶏でESC耐性菌が分離されたことを受け、養鶏生産団体がセフトチオフルの適応外使用を自主規制する通知を発出し、2012年3月に使用が自粛された(30, 46)。セフトチオフルの使用自粛後、肉用鶏由来の*E. coli*菌株に占めるESC耐性株の割合が減少したことが明らかになっている(33)(表C)。一方で、日本国内において、鶏肉由来のESC耐性サルモネラについては、セフトチオフル使用自粛後の影響について評価されていない。Nodaら(77)によって、市販鶏肉由来のサルモネラ菌株に占めるESC耐性サルモネラの割合が、2004年に0%(0/13株)であったものが、2005年に8.0%(2/25株)になり、その後、2010年には、27.9%(17/61株)まで増加したことが報告されており(77)、セフトチオフル使用自粛後の動向が注視される。

本研究では、ESC耐性サルモネラの出現・拡散防止の観点から、ESC耐性サルモネラの汚染状況の把握および拡散に関与する因子を解析するため、市販鶏肉、鶏卵・採卵鶏生産環境、飲食店の調理従事者・給仕者や食品工場の製造者等の食品従事者から分離されたサルモネラ菌株について、ESC耐性株を探索し、薬剤耐性遺伝子の網羅的検索、プラスミドのレプリコンタイプ型別、プラスミドおよび染色体の構造解析を試みた(図B)。また、薬剤耐性菌の出現や拡散は抗菌薬の使用と関係があると考えられるため、鶏肉由来のサルモネラ分離株に

占める ESC 耐性株の割合と養鶏業界でのセフトオフィルの適応外使用との関係について調査した。

第一章では、市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2011 年から 2015 年に福岡県内の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株を用いて、薬剤感受性試験により ESC 耐性株を探索した。さらに、サルモネラの ESC 耐性に関与するプラスミドとその遺伝的特徴を明らかにするため、WGS を用いて、ESC 耐性サルモネラが保有するプラスミドのレプリコンタイプ型別や薬剤耐性遺伝子の網羅的解析を実施した。また、養鶏業界におけるセフトオフィルの適応外使用と ESC 耐性株との関係を明らかにするため、2004 年から 2015 年における国内市販鶏肉由来のサルモネラ分離株に占める ESC 耐性株の割合の年次推移について調査した。

第二章では、日本国内の採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン（LB-EP チェーン）における ESC 耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2014 年を除く 2009 年から 2016 年に国内の鶏卵および鶏卵生産環境から分離されたサルモネラ菌株を用いて、薬剤感受性試験を行い、ESC 耐性株を探索した。さらに、サルモネラの ESC 耐性に関与するプラスミドや IS 等の遺伝的特徴を明らかにするため、ESC 耐性サルモネラの全ゲノム配列を決定し、プラスミドのレプリコンタイプ型別や薬剤耐性遺伝子の網羅的解析を実施した。また、*bla* 遺伝子の転移に関与する IS を同定するため、プラスミド間、プラスミドと染色体間の比較構造解析を行った。

第三章では、日本国内の食品従事者のサルモネラの保菌率を明らかにするため、2017 年の日本国内における飲食店の調理従事者・給仕者や食品工場の製造者等約 48,400 人の食品従事者のサルモネラ保菌率を調査した。また、食品従事者の ESC 耐性サルモネラの保菌状況を明らかにするため、サルモネラ分離菌株

の薬剤感受性試験を行い，ESC 耐性株の探索を行った。さらに，サルモネラの ESC 耐性に関与するプラスミドや IS 等の遺伝的特徴を明らかにするため，ESC 耐性サルモネラの全ゲノム配列を決定し，第二章と同様にプラスミドのレプリコンタイプ型別や薬剤耐性遺伝子の網羅的解析を実施するとともに，プラスミドおよび染色体の比較構造解析を行った。



表A. 家禽および家禽肉におけるESC<sup>a)</sup>耐性サルモネラの分離状況

国	血清型	由来	分離年	<i>bla</i> 遺伝子 <sup>b)</sup>	引用文献	
日本	Infantis	肉用鶏	2007~2008	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	(11)	
		肉用鶏	2007~2008	<i>bla</i> <sub>TEM-20</sub>		
		肉用鶏	2007~2008	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>		
		肉用鶏	2007~2008	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-25</sub>		
	Infantis	鶏肉	2005, 2007	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	(66)	
		鶏肉	2006, 2009~2011	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>		
		鶏肉	2007	<i>bla</i> <sub>TEM-20v</sub>		
	Schwarzengrund	鶏肉	2009~2010	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>		
	Manhattan	鶏肉	2009~2012	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>		
	日本	Infantis	鶏肉	2005, 2007~2010	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	(77)
鶏肉			2005	<i>bla</i> <sub>TEM-20</sub>		
鶏肉			2008	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>		
鶏肉			2010	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>		
Manhattan		鶏肉	2008	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>		
		鶏肉	2009~2010	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>		
		鶏肉	2010	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>		
		鶏肉	2010	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15<sup>c)</sup></sub>		
Untypeable: r: 1,5	鶏肉	2008	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>			
中国	Indiana	ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	(135)	
		ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>		
		ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>		
	Typhimurium	ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>		
		ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>		
		ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>		
	Enteritidis	ニワトリ	2014	<i>bla</i> <sub>CTX-M-27</sub>		
	中国	Indiana	鶏肉	2016~2017	<i>bla</i> <sub>CTX-M-123</sub>	(134) <sup>d)</sup>
		Kentucky	鶏肉	2016~2017	<i>bla</i> <sub>TEM-214</sub>	
		Litchfield	鶏肉	2016~2017	<i>bla</i> <sub>CTX-M-123</sub>	
鶏肉			2016~2017	<i>bla</i> <sub>CTX-M-123</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-206</sub>		
韓国	Virchow	鶏肉	2017~2018	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	(43)	
		鶏肉	2017~2018	<i>bla</i> <sub>CTX-M-79</sub>		
	Enteritidis	鶏肉	2017~2018	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>		
	Albany	鶏肉	2017~2018	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>		

表A. 家禽および家禽肉におけるESC<sup>a)</sup>耐性サルモネラの分離状況 (続き)

国	血清型	由来	分離年	<i>bla</i> 遺伝子 <sup>b)</sup>	引用文献
ベルギー	Agona	家禽	2001, 2004	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	(17)
	Derby	家禽	2001	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	
	Infantis	家禽	2001, 2004	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	
	Typhimurium	家禽	2002	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	
	Paratyphi B	家禽	2004	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	
オランダ	Agona	家禽	2006	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	(59)
	Infantis	家禽	2006	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	
		家禽	2006	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	
	Paratyphi B variant	家禽	2006	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	
	Java	家禽肉	2006	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	
	Heidelberg	家禽肉	2009	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	(62)
カナダ	Heidelberg	鶏肉	2003~2008	情報なし	(21)
アメリカ	Heidelberg	肉用鶏屠体	2004~2005	情報なし	(89) <sup>d)</sup>
	Kentucky	肉用鶏屠体	2004~2005	情報なし	
	Mbandaka	肉用鶏屠体	2004~2005	情報なし	
	Schwarzengrund	肉用鶏屠体	2004~2005	情報なし	(137)
	Typhimurium	肉用鶏屠体	2004~2005	情報なし	
	Newport	病鶏	2001~2002	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	
		病七面鳥	2001~2002	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	
ブラジル	Enteritidis	鶏屠体	2004~2006	情報なし	(67)
	Heidelberg	鶏屠体	2004~2006	情報なし	
	Infantis	鶏屠体	2004~2006	情報なし	
	Typhimurium	鶏屠体	2004~2006	情報なし	

a) ESC, 広域スペクトラムセファロスポリン

b) ESC耐性に関与する *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> 保有株を記載した。

c) *bla*<sub>CTX-M-15</sub> のほかペニシリナーゼをコードする *bla*<sub>TEM-1</sub> を保有していた。

d) 引用文献から一部を抜粋して記載した。

表B. 採卵鶏および採卵鶏生産環境におけるESC<sup>a)</sup>耐性サルモネラの分離状況

国	血清型	由来	分離年	<i>bla</i> 遺伝子	引用文献
スペイン	Virchow	採卵鶏	2003	<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1b</sub>	(93)
インド	Gallinarum	採卵鶏	不明	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	(98)
エクアドル	Infantis	採卵鶏農場環境スワブ	2017	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	(97)
		エサ	2017	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	
		バックヤードの糞便	2017	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	

<sup>a)</sup> ESC, 広域スペクトラムセファロスポリン

表C. 養鶏産業でのセフトオフル使用自粛とESC<sup>a)</sup>耐性*Escherichia coli*および*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelbergの分離状況の変化

国	由来	ESC耐性菌	分離株のうち薬剤耐性株の占める割合 (%) (薬剤耐性株/供試株数)										使用自粛に 関する情報	薬剤の使用自粛 時期
			16	17	9	5	分離年	17	9	5	19	18		
日本 <sup>b)</sup>	肉用鶏	<i>E. coli</i>	32/195	(27/161)	(19/206)	(6/131)	2010	2011	2012	2013	2013	養鶏産業での セフトオフル	2012年3月	
			65	62	33	7	19	18	使用自粛	2005年第1 クォーター (2007年の第3 クォーターに 部分的に使用 再開)				
カナダ (ケベック州) <sup>c), d)</sup>	市販鶏肉	<i>S. Heidelberg</i>	13/20	(18/29)	(4/12)	(1/14)	2003	2004	2005	2006	2007	養鶏産業での セフトオフル		
			32	34	25	6	13	18	使用自粛					
	ヒト臨床	<i>E. coli</i>	36/111	(54/158)	(35/142)	(8/135)	2003	2004	2005	2006	2007	使用自粛		
			31	36	35	8	6	12						
		<i>S. Heidelberg</i>	52/167	(42/116)	(37/106)	(8/96)	2003	2004	2005	2006	2007	2008		

<sup>a)</sup> ESC, 広域スペクトラムセフトオフル

<sup>b)</sup> Hiki, M., Kawanishi, M., Abo, H., Kojima, A., Koike, R., Hamamoto, S., Asai, T., 2015. Decreased resistance to broad-spectrum cephalosporin in *Escherichia coli* from healthy broilers at farms in Japan after voluntary withdrawal of ceftiofur. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12, 639–643.を引用して作成した。

<sup>c)</sup> Duttil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L. K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A. M., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A., Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G. B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., Pillai, D. R., 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg. infect. dis.*, 16, 48–54.を引用して作成した。

<sup>d)</sup> カナダのケベック州, オンタリオ州, サスカチュワン州, ブリティッシュコロンビア州のうち, カナダのケベック州のデータを抜粋して示した。

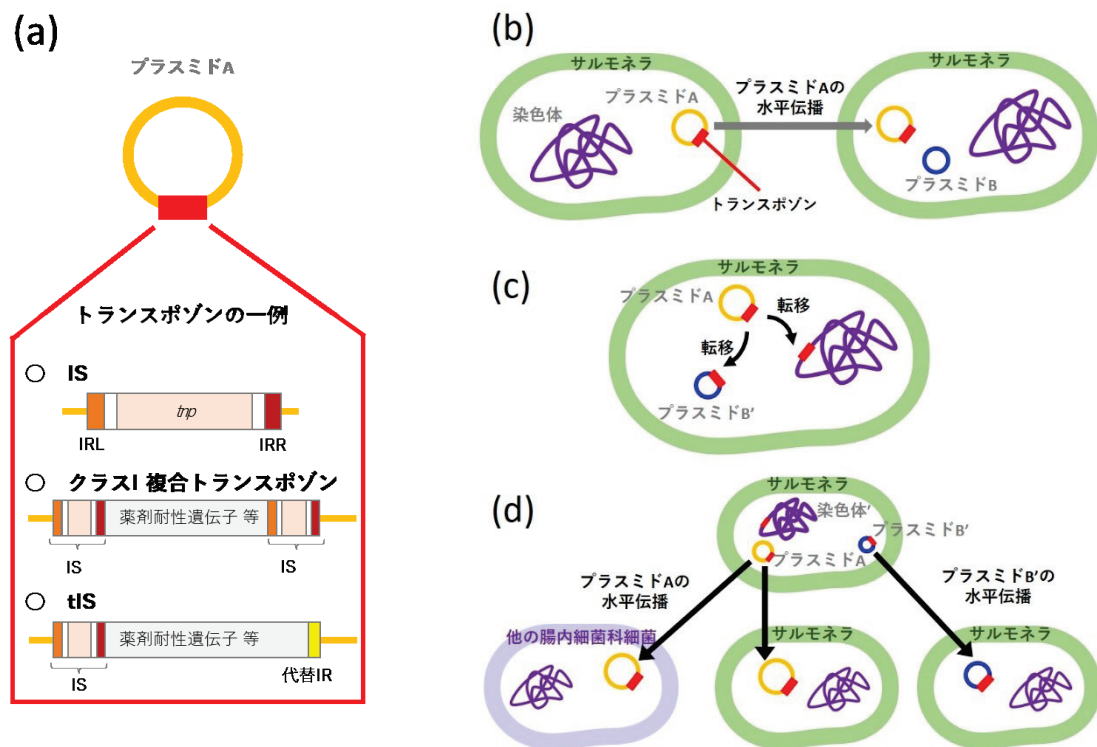


図 A. 細菌間でのプラスミドの水平伝播と IS に関連したトランスポゾンによる薬剤耐性遺伝子のプラスミド間，プラスミドと染色体間の転移の概念図

(a)はトランスポゾンが存在するプラスミド(プラスミド A)と IS が関連するトランスポゾンの構造。(b)サルモネラからサルモネラへのプラスミド(プラスミド A)の水平伝播。(c)サルモネラ細胞内でのトランスポゾンの転移。(d)サルモネラからサルモネラおよびその他の腸内細菌科細菌へのプラスミド(プラスミド A およびプラスミド B')の水平伝播。

IR, 逆向き反復配列

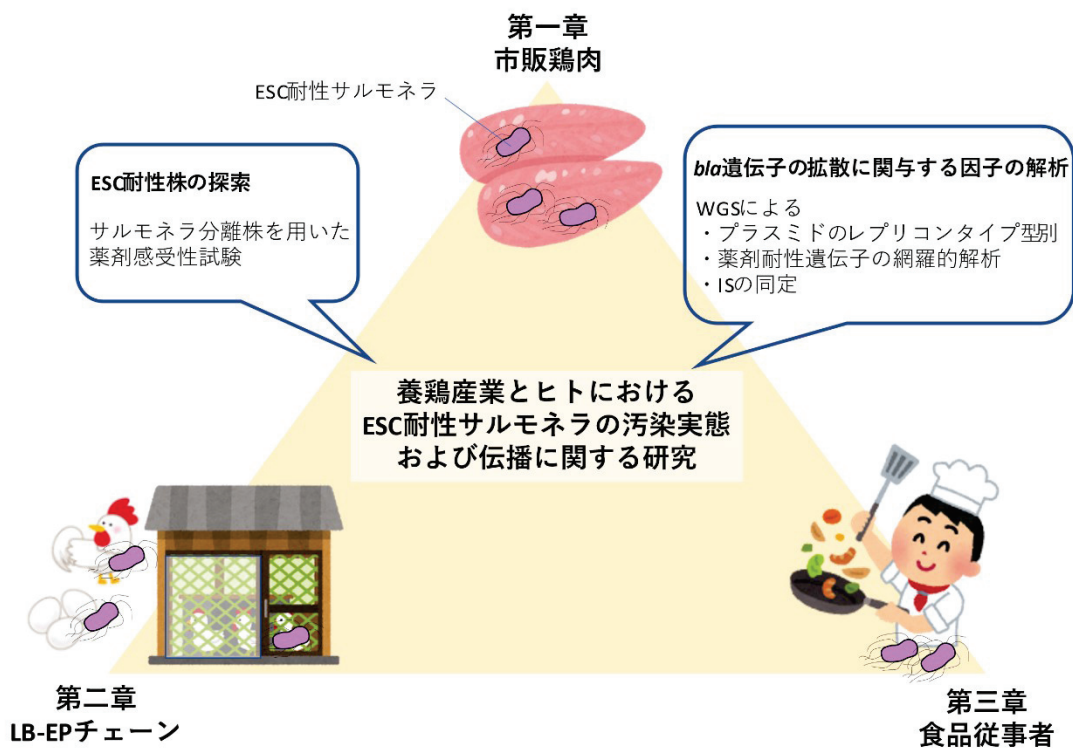
IRL, 左側の逆向き反復配列

IRR, 右側の逆向き反復配列

IS, 挿入配列

tIS, トランスポーター IS

*tnp*, トランスポゼース遺伝子



## 図 B. 本研究の目的

市販鶏肉， LB-EP チェーンおよび食品従事者における ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査および *bla* 遺伝子の拡散に関する因子の解析。

*bla* 遺伝子，  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子

ESC， 広域スペクトラムセファロスポリン

IS， 挿入配列

LB-EP チェーン， 採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン

WGS， 全ゲノムシーケンス

## 第一章

### 市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査および 保有プラスミドのゲノム解析

本章は Elsevier の許可を得て、次の論文から一部転載しています。

タイトル：Decrease in the prevalence of extended-spectrum  
cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur  
use by the Japanese poultry industry

著者：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.

雑誌：International Journal of Food Microbiology

出版年・巻・頁：2018・274・45-51

DOI：10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.011.

## 序論

サルモネラ症の重要な治療薬である ESC に耐性を示すサルモネラがヒトへ感染することは、サルモネラ症治療における大きな弊害となるため、公衆衛生上の問題である。鶏肉はサルモネラ食中毒の主要原因食品の一つであるため (22, 78), 市販鶏肉の ESC 耐性サルモネラの汚染状況を把握することは重要である。サルモネラの ESC 耐性化は、AmpC  $\beta$ -lactamase や ESBL をコードする *bla* 遺伝子を有したプラスミドの水平伝播により (17, 95, 130), サルモネラが *bla* 遺伝子を獲得することで起こる。サルモネラを含めた腸内細菌課細菌間におけるプラスミドによる *bla* 遺伝子の拡散状況を理解するためには、プラスミドのサイズ、レプリコンタイプおよびプラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子を明らかにすることが重要である。

家畜での薬剤耐性菌の出現および拡散は、家畜の治療や発育促進における抗菌薬の使用と関係があり、薬剤耐性菌は汚染された食肉等の食品を介してヒトへ伝播することが示唆されている (21, 48)。日本国内の養鶏業界においても、セフトオフルが適応外使用されていたが (34), 農林水産省等の調査で、肉用鶏からの ESC 耐性菌の分離頻度が増加したことを受け、2012 年 3 月に養鶏生産団体がセフトオフルの使用を自粛した (30, 46)。これにより、肉用鶏由来の *E. coli* 菌株に占める ESC 耐性株の割合が、2011 年に 16.8% (27/161 株) であったものが、セフトオフル使用自粛後の 2012 年に 9.2% (19/206 株), 2013 年に 4.6% (6/131 株) に減少したことが明らかとなっている (33)。一方で、市販鶏肉由来のサルモネラに占める ESC 耐性株の割合については、



2010年まで報告されているが(77), それ以降の報告はなく, セフトロフル使用自粛後のESC耐性サルモネラの動向が注視されている。

本章では, 2011年以降の市販鶏肉におけるESC耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため, 2011年から2015年までに福岡県内の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株を用いて, 薬剤感受性試験によりESC耐性株を探索した。さらに, サルモネラのESC耐性に関与するプラスミドを明らかにするため, WGSを用いて, ESC耐性サルモネラが保有するプラスミドのレプリコンタイプ型別や薬剤耐性遺伝子の網羅的解析を実施した。また, 抗菌薬の使用と薬剤耐性菌の出現, 拡大の関係を明らかにするために, 2004年から2015年までの国内市販鶏肉におけるESC耐性サルモネラの汚染状況と, 養鶏業界におけるセフトロフルの使用との関係について調査した。

## 材料および方法

### 1. 使用菌株，検体情報，分離方法

#### (1) 使用菌株

2011年から2015年に福岡県または厚生労働省で実施された食品の食中毒細菌汚染実態調査に基づき，福岡県保健環境研究所で分離されたサルモネラ107株を本研究に使用した。なお，分離株は菌体を10%スキムミルク溶液に懸濁し（232100，Becton Dickinson and Co.，Franklin Lakes，NJ，USA），試験に供するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### (2) 菌株が分離された検体の情報

菌株の分離に使用された検体は，2011年から2015年に福岡県内に流通していた市販鶏肉で，合計181検体であった。年毎の検体数の内訳は，2011年，2012年，2013年，2014年および2015年にそれぞれ38，41，32，35および35検体であった（表1-1）。また，検体種別の内訳は，加熱用鶏肉163検体，生食を目的とした鶏肉（生食用鶏肉）の鶏刺3検体および鶏タタキ15検体であった。全検体のうち，165検体は国産品であり，16検体は輸入品（ブラジル産8検体，原産国不明8検体）であった。国産品の産地については情報を得られていないため，不明である。検体は，福岡県のスーパーマーケットや精肉店を含む福岡県の126の小売業者から食品衛生監視員により収集された。

#### (3) サルモネラ分離方法

上記の使用菌株は，福岡県保健環境研究所で下記の方法で分離され

た。

福岡県が実施した食品の食中毒細菌汚染実態調査で収集した計 153 検体について、下記 A の方法を用いた。厚生労働省が実施した食品の食中毒細菌汚染実態調査で収集した計 28 検体については、下記 B の方法を用いた。

#### A. 福岡県で実施した食品の食中毒細菌汚染実態調査におけるサルモネラの分離

細切した検体 25 g を 225 ml の BPW (Buffered pepton water, CM0509, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) に加え、Stomacher 400 Circulator (0400/000/AJ, Seward Ltd. West Sussex, UK) を用い、検体を 1 分間粉碎し、その後、35°C で 18 時間培養した。培養後、0.1 ml の BPW を 10 ml の RV ブロス (Rappaport-Vassiliadis broth, CM0669, Oxoid Ltd.) に接種するとともに、1 ml の BPW を 10 ml の TT ブロス (Tetrathionate broth, CM0671, Oxoid Ltd.) にも接種し、その後、それらブросを 42°C で 18 時間培養した。続いて、培養後の各ブросを、XLT4 寒天培地 (Xylose Lysine Tergitol 4 agar, 223420, XLT4 Agar Supplement, 235310, Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) および SMID 寒天培地 (*Salmonella* Detection and Identification agar, 43621, bioMérieux, Lyon, France) に接種し、35°C で 18~48 時間培養した。その後、寒天培地に発育したサルモネラと推定される 1~4 コロニーを釣菌し、TSI 培地 (Triple sugar iron medium, E-MA62, 栄研化学, 東京), LIM 培地 (Lysin indole motility medium, E-MA75, 栄研化学), リジン脱炭酸塩培地 (E-MA39, 栄研化学), シモンズクエ

ン酸ナトリウム培地 (E-MA34, 栄研化学) およびマロン酸塩培地 (E-MA37, 栄研化学) を用い, 生化学性状試験を実施した。サルモネラとして同定された分離株の血清型別は, Kauffman-White の抗原構造に基づく分類 (26) に従い, 菌体抗原 (O 抗原) および鞭毛抗原 (H 抗原) 用抗血清 (200112, 200129, 200136, 200143, 200150, 200167, デンカ生研, 東京) を用いて実施した。

## B. 厚生労働省で実施した食品の食中毒細菌汚染実態調査におけるサルモネラの分離

サルモネラ属菌標準試験法 NIHSJ-01-ST4 (50) に従ってサルモネラを分離した。上記の方法 A と同様に, 細切した検体 25 g を 225 ml の BPW に加え, Stomacher 400 Circulator を用い, 検体を 1 分間粉碎し, その後, 37°C で 18 時間培養した。培養後, 0.1 ml の BPW を 10 ml の RV ブロスに接種するとともに, 1 ml の BPW を 10 ml の TT ブロスに接種した。その後, それらブросを 42°C で 18 時間培養した。培養後の各ブrossを DHL 寒天培地 (Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose agar, E-MA85, 栄研化学) および CHROMagar *Salmonella* (SA132, CHROMagar, Paris, France) に接種後, 37°C で 18~48 時間培養した。その後, 上述した方法 A と同様に, サルモネラと推定されるコロニー (1 検体あたり 1~4 コロニー) を釣菌し, 上記のとおり生化学性状試験によりサルモネラを同定し, 血清型別を行った。

## 2. 薬剤感受性試験, *bla* 遺伝子の探索および *bla* 遺伝子の型別

### (1) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に基づきディスク拡散法 (12) により実施した。精度管理菌株として、*E. coli* American type culture collection (ATCC) 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 および *E. coli* ATCC 35218 を使用した。いずれも、ATCC (Manassas, Virginia, USA) から購入した。供試薬剤はセフポドキシム (CPD, 10  $\mu$  g/disk, 291260), セフォタキシム (CTX, 30  $\mu$  g/disk, 296948), セフトジジム (CAZ, 30  $\mu$  g/disk, 291085), セフィキシム (CFIX, 5  $\mu$  g/disk, 291169), セフェピム (CFPM, 30  $\mu$  g/disk, 291055), セフォキシチン (CFX, 30  $\mu$  g/disk, 296947), セフメタゾール (CMZ, 30  $\mu$  g/disk, 296785), セフォテタン (CTT, 30  $\mu$  g/disk, 291086), モクサラクタム (LMOX, 30  $\mu$  g/disk, 291008), イミペネム (IPM, 10  $\mu$  g/disk, 291148), メロペネム (MEPM, 10  $\mu$  g/disk, 291054) およびパニペネム (PAPM, 10  $\mu$  g/disk, 291440) の 12 薬剤 (いずれも Becton Dickinson and Co.) を用いた。また、後述する *bla* 遺伝子が検出された分離株については、さらにセフトオフル (CEF, 30  $\mu$  g/disk, ゴエティス株式会社から恵与された) に対する感受性を調査した。ブレイクポイントは CLSI (13, 14) に基づき設定し、PAPM のブレイクポイントについては、Noda らの報告 (77) に準じて <22 mm に設定した。いずれかの薬剤に対し阻止円の大きさがブレイクポイント以下となった分離菌株については、ESBL の産生と AmpC  $\beta$ -lactamase の産生を後述する方法により確認した。

## (2) ESBL 産生および AmpC $\beta$ -lactamase 産生確認試験

ESBL 産生の確認は CLSI (14) に準拠し、クラブラン酸 (CVA) 非

添加薬剤含有ディスクと CVA 添加薬剤含有ディスクを用いて、阻止円径の比較により行った。判定は CVA 非添加薬剤含有ディスクと CVA 添加薬剤含有ディスクで認められる阻止円径の差が 5 mm 以上のものを、ESBL 産生株とした。なお、CVA 非添加薬剤含有ディスクには CTX, CAZ, CPDX を使用し、CVA 添加薬剤含有ディスクには CTX (30  $\mu$ g/disk) -CVA (10  $\mu$ g/disk) (231751, Becton Dickinson and Co.), CAZ (30  $\mu$ g/disk) -CVA (10  $\mu$ g/disk) (231753, Becton Dickinson and Co.), CPDX (10  $\mu$ g/disk) -CVA (10  $\mu$ g/disk) (E-BC10, 栄研化学) の合剤ディスクを用いた。

AmpC  $\beta$ -lactamase 産生の確認は Coudron ら (20) の報告を参考に、ボロン酸 (BA) 非添加薬剤含有ディスクと BA 添加薬剤含有ディスクを用いて行った。BA 非添加薬剤含有ディスクと BA 添加薬剤含有ディスクで認められる阻止円径の差が 5 mm 以上のものを、AmpC  $\beta$ -lactamase 産生株とした。BA 非添加薬剤含有ディスクには CPDX および CFX を使用した。BA 添加薬剤含有ディスクは、CPDX および CFX に 20  $\mu$ g/ $\mu$ l の BA (A1281, 東京化成, 東京) を 20  $\mu$ l 添加したディスクを作製し、試験に用いた。

### (3) *bla* 遺伝子の探索

上記の薬剤感受性試験で、いずれかの薬剤に対し耐性を示した分離株について、Noda ら (77) の方法に従い、polymerase chain reaction (PCR) を用いて、*bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> の検索を行った (表 1-2)。

#### (4) *bla* 遺伝子型別

PCRによって検出された *bla* 遺伝子の塩基配列は、Nodaら (77) の方法に従い、サンガーシーケンスにより塩基配列を決定した(表 1-2)。PCR産物を、illustra ExoProStar enzymatic PCR and Sequencing Clean-Up kit (29010216, Global Life Sciences Solutions USA LLC., Marlborough, MA, USA)により精製した。さらに、BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction v.3.1 kit (4337455, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて、サイクルシーケンスを行い、その後、3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)により解析した。得られた DNA 配列は、 $\beta$ -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV, and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes (42)を参照にして、各 *bla* 遺伝子型を決定した。

### 3. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) によるプロファイリング

#### (1) サンプルプラグの調製と制限酵素処理

本研究で分離された *bla* 遺伝子を保有する ESC 耐性株 25 株と、ESC 感性株 6 株を供試した。供試菌株を TSB (Trypticase soy broth, E-MC64, 栄研化学) に接種し 35°C, 18 時間で培養した。培養液 0.9 ml をマイクロチューブにとり、16,200 × g で 10 分間遠心分離し、沈査を 0.3 ml の滅菌蒸留水に浮遊させた。浮遊液を 63°C で 10 分間保持した後、63°C の 1.0% アガロースゲル (Molecular Biology certified agarose, 1613101, BIO-RAD, Hercules, CA, USA) を 0.3 ml 添加し、1 ~ 2 回混ぜ合わせた。この混合液をプラグモールド (CHEF Mapper XA system 50-well, 1703713, BIO-RAD) に 90~100  $\mu$ l 添加し、氷上で固化させ、寒天に



各菌株を包埋したサンプルプラグを作製した。

次に、Lysis buffer に溶解した 1 mg/ml の Lysozyme 溶液 1.5 ml にサンプルプラグを浸漬し、37°C で 3 時間、穏やかに振盪した。Lysis buffer は 1 M Tris-HCl (pH8.0) (314-90065, ニッポンジーン, 東京) 10 ml, NaCl 58.44 g (195-01663, 富士フィルム和光純薬, 大阪), 0.5 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (pH8.0) (311-90075, ニッポンジーン) 200 ml, 超純水 790 ml を混合して調製した溶液を、121°C, 15 分間滅菌し、室温に戻した後、N-lauroyl sarcosinate (L-5777, Sigma-Aldrich, MO, US) 5.0 g, Deoxycholate (192-08312, 富士フィルム和光純薬) 2.0 g, Polyoxyethylene (20) cetyl ether (Brij 58 相当) (169-21063, 富士フィルム和光純薬) を追加で添加して、調製した。続いて、サンプルプラグの浸漬液を Lysis buffer に溶解した 1 mg/ml の Protinase K 溶液 2 ml に交換し、50°C で 18~24 時間、穏やかに振盪した。さらに、EDTA N-lauroyl sarcosine (ES) buffer に溶解した 1 mg/ml の Protinase K 溶液 2 ml に交換し、50°C で 18~24 時間、穏やかに振盪した。ES buffer は 0.5 M EDTA (pH8.0) 1,000 ml および N-lauroyl sarcosinate 10 g を混合し、調製した。これらにより、プラグ内の菌株のゲノム DNA を露出させた。Protinase K の失活は、サンプルプラグを泳動用に適切な大きさに整形した後、Murakami ら (72) の方法に準じて実施した。その後、サンプルプラグ内のゲノム DNA を制限酵素 *BlnI* (1022A, タカラバイオ, 草津) で切断した。制限酵素反応は、*BlnI* 30 U で 37°C, 16~20 時間で処理した。

## (2) PFGE



制限酵素処理後のサンプルプラグを 1.0% Seakem Gold Agarose gel (50150, Lonza, Basel, Switzerland) に包埋し, CHEF DR III System (BIO-RAD) を用いて電気泳動した。泳動条件は, 角度 120°, 電界強度 6.0 V/cm, パルスタイム 2 - 43.2 秒, 泳動槽温度 14°C, 泳動時間 19 時間とした。泳動用緩衝液は 0.5×Tris-borate EDTA Buffer (318-90041, ニッポン・ジーン) を用い, DNA サイズマーカーは CHEF DNA Size Standard-Lambda Ladder (1703635, BIO-RAD) を用いた。泳動後ゲルをエチジウムブロマイドで染色後, GelDoc (BIO-RAD) により, UV 照射下で DNA バンドの検出を行った。DNA バンドパターンは BioNumerics v.6.6 (bioMérieux) を用いて解析した。解析は, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (111) により行った。

#### 4. ESC 耐性株の保有するプラスミドの解析

##### (1) S1-PFGE によるプラスミドのプロファイリング

ESC 耐性株 25 株について上記のとおり, サンプルプラグを作製し, サンプルプラグ内のゲノム DNA を S1-nuclease (EN0321, Thermo Fisher Scientific) で切断した。制限酵素反応は, S1-nuclease 2 U で 37°C, 45 分で処理した。その後, 上記方法に従い, PFGE を実施し, BioNumerics v6.6 によりプロファイリングした。

##### (2) WGS によるプラスミド解析

WGS による解析は, 国立感染症研究所 (新宿, 東京) に依頼し, 下記の方法で実施した。また, 解析に使用した菌株は, AmpC  $\beta$ -lactamase 産生株の 1 株 (*bla*<sub>CMY-2</sub> 保有 *S. Infantis* 1 株) および ESBL 産生株 8 株

(*bla*<sub>TEM-52</sub> 保有 *S. Manhattan* 6 株, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保有 *S. Manhattan* 1 株, *bla*<sub>SHV-12</sub> 保有 *S. Manhattan* 1 株) の計 9 株 (表 1-3) であった。

DNA サイズマーカーに MidRange PFG Marker (N0342, NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, MA, USA) を使用し, S1-PFGE 実施後, Akiba ら (1) の方法にしたがって, S1-PFGE により分離されたプラスミド DNA を抽出し, Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) により, WGS を実施した。short-read sequence data は, A5-miseq (18) を用いて塩基配列のアッセンブルを行い, contig 配列を得られた。各 contig 配列の平均 read 深度は, bwa-mem プログラム (61) を用いたマッピング解析により算出された。また, 染色体や非標的プラスミドの配列を除外するために最長 contig 配列の read 深度が 40% 以下となった read 深度の浅い contig 配列は, データから破棄した。最長の contig 配列が染色体に由来する配列であった場合には, 染色体に由来する配列を破棄するため, read 深度の閾値を手動で変更した。

得られた contig 配列は, 完全長プラスミド配列を用いて構築されたプラスミドデータベースに対して, BLASTN 相同性検索を用いて妥当性を評価した。このプラスミドデータベースは National Center for Biotechnology Information (NCBI) の nucleotide データベース (74) および whole genome shotgun データベース (73) から得られたデータを使用した。得られた contig 配列のプラスミドレプリコンタイプについて, PlasmidFinder (6) による BLASTN 相同性検索を用いて推定した。また, 薬剤耐性遺伝子について, ResFinder (49) による BLASTN 相同性検索を用いて推定した。

## 5. 市販鶏肉の ESC 耐性サルモネラ汚染状況

2012年3月の国内養鶏業界におけるセフトオフル使用自粛後の市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの動向を明らかにするため、市販鶏肉由来のサルモネラ分離株に占める ESC 耐性株の割合の 2004 年から 2015 年の年次推移を調査した。2004 年から 2010 年のデータは、先行研究の調査結果（77）を引用し、2011 年から 2015 年のデータは本研究の調査結果を使用した。先行研究は、1996 年から 2010 年の市販鶏肉や鶏内臓由来のサルモネラ菌株から ESC 耐性株を探索しており、検体収集地域は、779 検体のうち 777 検体が福岡県内で、2 検体が長崎県内であった。なお、1996 年から 2004 年まで ESC 耐性株が確認されなかったため、1996 年から 2003 年までのデータは使用しなかった。

## 6. 統計処理

2004 年から 2015 年の市販鶏肉由来のサルモネラ菌株に占める ESC 耐性株の割合の変化について、統計処理を行った。統計処理は、九州大学へ依頼し、加重最小二乗法（131）により行った。

## 結果

### 1. 分離株の薬剤感受性および分離株から検出された *bla* 遺伝子

市販鶏肉から分離されたサルモネラ分離菌株 107 株のうち、1 株は保存状態が悪く復帰できなかつたため、106 株を薬剤感受性試験に供試した。薬剤感受性試験では、106 株中 81 株が感性であった。残り 25 株は複数の抗菌薬に耐性を示し、合計 8 種類の薬剤耐性パターンが得られた (表 1-4)。この 25 株はすべて ESC 耐性株であった。ESC 耐性株 25 株は 25 検体から分離され、25 検体のうち 23 検体が国産品で、残りの 2 検体が輸入品 (ブラジル産) であった。25 株のうち、12 株が CTX (48.0%), 17 株が CFX (68.0%), 19 株が CFIX (76.0%), 25 株が CPD (100%), 5 株が CAZ (20.0%) および 22 株 (88.0%) がセフトオフルに耐性を示した。また、*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する 17 株のうち 14 株 (82.4%) がセフトオフルに耐性を示し、残りの 3 株は中間を示した。*bla*<sub>CTX-M-2</sub>、*bla*<sub>SHV-12</sub> あるいは *bla*<sub>TEM-52</sub> を保有する ESBL 産生株 8 株の全てがセフトオフルに耐性を示した。106 株全てが CEFM, CMZ, CTT, LMOX, IPM, MEPM, および PAPM に感性を示した。

ESC 耐性株 25 株のうち、17 株 (*S. Infantis* (n = 15), *S. Heidelberg* (n = 1), O-untypable: r: 1,5 (n = 1)) が AmpC  $\beta$ -lactamase を産生し、*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有していた。残りの 8 株は、いずれも ESBL を産生する *S. Manhattan* で、1 株が *bla*<sub>CTX-M-2</sub>、1 株が *bla*<sub>SHV-12</sub>、また、6 株が *bla*<sub>TEM-52</sub> を保有していた。2011 年、2012 年、2013 年、2014 年、および 2015 年には、それぞれ 10, 7, 4, 2, および 2 株の ESC 耐性株が確認された (表 1-5)。2013 年までは *bla*<sub>CMY-2</sub> 保有株が確認されたものの、

2014 年と 2015 年にはこの耐性遺伝子を保有する分離株は確認されなかった。

## 2. ESC 耐性株の PFGE プロファイリング

耐性株と感性株からそれぞれ 17 種類と 5 種類の PFGE profile (PFP) が得られた (図 1-1)。それぞれの血清型は固有のクラスターを示した。感性株 (*S. Infantis* (PFP T および U) と *S. Manhattan* (PFP B および C)) は、同血清型の耐性株と区別されたが、大きな差は認められなかった。PFP J は、全ての供試株の中で最も多いプロファイルであった。

## 3. ESC 耐性株のプラスミド解析

### (1) S1-PFGE によるプラスミドプロファイリング

S1-PFGE により、25 株の耐性株から、8 つの Large plasmid profile (LPP) が得られた (図 1-2A)。*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する *S. Infantis* (n = 15) および O-untypable: r: 1, 5 (n = 1) から 4 つの LPP (LPP4~7) が得られ、*S. Heidelberg* (n = 1) から LPP8 が得られた。また、ESBL 遺伝子 (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> あるいは *bla*<sub>TEM-52</sub>) を保有する *S. Manhattan* (n = 8) から、3 つの LPP (LPP1~3) が得られた。LPP1~8 の中で、LPP5 が最も多かった。

*bla*<sub>CMY-2</sub> 保有株のプラスミドプロファイリングにおいて、*S. Heidelberg* 株 (LPP8) を除く、全株で約 270~280 kb のプラスミドが確認された (LPP4~7)。また、ESBL をコードする *bla* 遺伝子 (ESBL 遺伝子) を保有した 8 株の *S. Manhattan* は約 40~45 kb および約 270~280 kb のプラスミドが確認された (LPP1~3) (図 1-2)。

## (2) WGS によるプラスミド解析

*bla*<sub>CMY-2</sub> 保有株のうち、LPP5 を示す *S. Infantis* (no. 2967 株) を LPP4 ~7 の代表株として選び、WGS を行った。このプラスミドには *bla*<sub>CMY-2</sub>, *aadA*, *sul1*, *tet(A)* が含まれていたが、そのレプリコンタイプは特定できなかった (表 1-3)。

8 株の ESBL 遺伝子保有 *S. Manhattan* について、プラスミドの WGS を行ったところ、8 株の ESBL 遺伝子は約 45 kb (36.7~50.7 kb) のプラスミドに存在していた (表 1-3 および図 1-2B)。*bla*<sub>SHV-12</sub> は IncX3 型プラスミド上に存在し、*bla*<sub>TEM-52</sub> は IncX1 型プラスミド上に存在しており、その他の薬剤耐性遺伝子は存在しなかった。一方、*bla*<sub>CTX-M-2</sub> は *aadA*, *sul1*, *tet(A)* とともに IncN 型プラスミド上に存在していた (表 1-3)。

## 4. 市販鶏肉の ESC 耐性サルモネラ汚染状況

2011 年から 2015 年に収集された *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する 17 分離株のうち、*S. Heidelberg* の 1 株と O-untypable: r: 1, 5 の 1 株を除いて、全て *S. Infantis* であった (表 1-5)。2014 年および 2015 年には、*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有するサルモネラが分離されず、ESBL 遺伝子は *S. Manhattan* 分離株にのみ認められた (n = 8)。サルモネラ分離株に占める ESC 耐性株の割合は、2004 年の 0% (0 株/13 株) から 2011 年の 45.5% (10/22 株) まで有意に増加したが (P for trend = 0.001), 2012 年, 2013 年, 2014 年, および 2015 年には、それぞれ、29.2% (7/24 株), 18.2% (4/22 株), 10.5% (2/19 株), および 10.5% (2/19 株) と徐々に減少した (P for trend = 0.010) (表 1-5 および図 1-3)。*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する

サルモネラ分離株についても同様の傾向が認められ、*bla*<sub>CMY-2</sub> 保有 ESC 耐性株の占める割合は 2004 年の 0% (0/13 株) から 2011 年には 36.4% (8/22 株) まで増加したが、2012 年、2013 年、2014 年、および 2015 年には、それぞれ、25.0% (6 株/24 株)、13.6% (3 株/22 株)、0% (0 株/19 株)、および 0% (0/19 株) まで減少した。しかし、ESBL 遺伝子を保有するサルモネラの分離株の割合は、2004 年の 0% (0/13 株) から 2015 年の 10.5% (2/19 株) へと増加していた (図 1-3)。

## 考察

本研究で使用したサルモネラ菌株の由来については、加熱用鶏肉 163 検体から分離されたのは 97 検体 (59.5%) であったのに対し、生食用鶏肉 18 検体 (鶏タタキ 15 検体, 鶏刺し 3 検体) から分離されたのは鶏タタキ 1 検体 (5.6%) だけであった。宮崎県や鹿児島県は、それぞれ、「生食用食鳥肉の衛生対策」, 「生食用食鳥肉の衛生基準」(54) により、成分規格目標を定めており、生食用食鳥肉として販売するものはサルモネラが陰性である必要がある。本研究では、生食用鶏肉の産地や処理施設に関する検体の情報は得られていないが、このような成分規格目標やそれに準じて処理された鶏肉であったため、加熱用鶏肉に比べ、サルモネラの分離率が低かった可能性がある。しかしながら、今回は ESC 耐性株ではないものの、生食用鶏肉からサルモネラが分離されていた。生食用鶏肉は喫食までに加熱の工程がなくサルモネラに汚染されていた場合、ヒトへの感染の可能性が加熱用鶏肉と比較して高くなることが懸念されるため注意が必要である。

本研究において、WGS によるプラスミド解析の結果、ESBL 産生株が保有する主要なプラスミドは、*bla*<sub>TEM-52</sub> を保持する IncX1 型のプラスミドであることが明らかとなった (表 1-3)。先行研究において、*bla*<sub>TEM-52</sub> を保有するサルモネラは、ベルギー、フランス、オランダ等の様々な国において、ヒト、肉用鶏のような家禽や鶏肉のような家禽肉から分離されている (11, 17, 59, 66, 128)。また、日本国内において、鶏肉由来のサルモネラから *bla*<sub>TEM-52</sub> を保持する IncX1 型の pYM4 と名付けられたプラスミドが分離されており (66)、その塩基配列は、デン



マークの鶏肉由来の *E. coli* から同定された *bla*<sub>TEM-52</sub> 保持プラスミド pDKX1 (44) の塩基配列と同一であったことが報告されている。今回、ESBL 産生 *S. Manhattan* から見つかったプラスミドも、pYM4 と同じレプリコンタイプであったことから、同一のプラスミドである可能性が考えられる。本研究で見つかった IncX1 型プラスミドは日本国内のサルモネラで拡散している可能性があるため、今後、日本国内の複数地域で分離された *bla*<sub>TEM-52</sub> を保有するサルモネラについて、保有プラスミドの配列を比較し、拡散状況を確認する必要がある。

本研究において、福岡県の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株の占める ESC 耐性株の割合は、2005 年から 2011 年までは増加傾向にあり、2011 年は 45.5% (10/22 株) であったが、2012 年以降は減少し、2015 年には 10.5% (2/19 株) となった (図 1-3)。Kataoka ら (45) が行った先行研究においても、2015 年に 21 都道府県から収集した市販鶏肉 288 検体から分離されたサルモネラに占める ESC 耐性株の割合は 2.7% (2/74 株) と低かったことが示されており (45)、本研究の結果と一致していた。分離された菌株のうち ESC 耐性株の占める割合の増減は、主に、セフトオフルに耐性または中間を示す AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 産生株の占める割合の増減と連動するものであった。AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 産生株の占める割合が増加した後、減少に転じたのは、国内の養鶏業界における 2012 年 3 月のセフトオフル使用自粛の結果によるものと考えられる。国内の肉用鶏由来 ESC 耐性 *E. coli* について調査した Hiki らの報告 (33) や、カナダの鶏肉由来 ESC 耐性 *E. coli* およびサルモネラについて調査した Dutil らの報告 (21) でも、セフトオフルの使用自粛後に分離された菌株に占める ESC 耐性株の割

合が減少したことが明らかとなっており，本研究の結果と一致していた。また，本研究では，AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 産生株が保有する *bla*<sub>CMY-2</sub> を含む複数の薬剤耐性遺伝子保持プラスミド（表 1-3）を保有するサルモネラが 2014 年以降に認められなくなった（表 1-5 および図 1-3）。抗菌薬による選択圧がかかった環境下では，薬剤耐性プラスミドの保有により生存するが，プラスミドの保有自体が宿主の生育遅延を起こすため，選択圧がない環境ではプラスミド非保有株に比べ淘汰されやすくなることが報告されている（79）。したがって，セフトオフルの使用自粛により，セフトオフルによる選択圧が消失することで，ESC 耐性に関連するプラスミドを保有することはサルモネラの生存に有利ではなくなり，市販鶏肉から分離されたサルモネラの AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 産生株の割合は，セフトオフルの使用自粛後に減少したものと考えられる。

一方で，本研究において，*bla*<sub>TEM-52</sub> を保持した IncX1 型プラスミドを保有する *S. Manhattan* が 2015 年まで分離され続けていた。Hiki らの報告（33）によると，2010 年から 2013 年までの国内の肉用鶏から分離された ESC 耐性 *E. coli* の調査で，2012 年までは *bla*<sub>CTX-M-1</sub>，*bla*<sub>CTX-M-2</sub>，*bla*<sub>TEM-135</sub> 等の ESBL 遺伝子を保有した菌株が分離されたが，2013 年には ESBL 遺伝子保有株は分離されなかった。また，Hiki ら（33）の調査期間中において *bla*<sub>TEM-52</sub> 保有株は分離されなかった。本研究において，セフトオフル使用自粛後による選択圧消失後も *bla*<sub>TEM-52</sub> を保有する *S. Manhattan* が分離され続けていた理由として，*S. Manhattan* と *bla*<sub>TEM-52</sub> を保持した IncX1 型プラスミドの親和性が高かった可能性が考えられる。そのため，肉用鶏の生産において，*S. Manhattan* に感染

していないことを確認した鶏群を導入する等の対応が必要かもしれない。今後、*bla*<sub>TEM-52</sub>を保有する *S. Manhattan* が残存し続けた理由を明らかにするため、*S. Manhattan* とプラスミドとの親和性を確認するとともに、農場等での薬剤の使用状況等の詳細な情報を入手したうえで調査することが重要であると考えられる。

本研究では、福岡県内で流通している市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株を用いて、市販鶏肉の ESC 耐性株の汚染状況について調査したが、福岡県内の養鶏産業の実態を反映しているかについては不明である。一般的に、鶏肉は販売網により日本国内に広く流通しており、生産地域と販売地域が必ずしも一致しない。例えば、東京の大手鶏肉専門小売店への訪問調査によると、東北産および南九州産の鶏生鮮解体品が流通していることが明らかとなっている (52)。また、2019 年に兵庫県のある食鳥処理場では、兵庫県を含む関西地方、三重県等の中部地方、岡山県、徳島県等の中国、四国地方の肉用鶏を屠殺・解体などの食鳥処理をしている (40)。日本国内全体で、セフトオフル使用自粛により市販鶏肉由来サルモネラに占める ESC 耐性株の割合が減少したかを評価するためには、福岡県以外で分離されたサルモネラ菌株についても収集し、同様の調査を行う必要がある。また、本研究では、異なる分離方法で分離した菌株を用いたが、より正確に評価するためには、同じ方法で分離した菌株を用いる等、菌株の分離方法についても検討が必要である。

以上より本研究では、福岡県の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株に占める *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する株の割合は国内の養鶏業界におけるセフトオフルの使用自粛後に減少したことを明らかにし、また、ESC 耐

性株の割合が低下したことは養鶏業界におけるセフトオフィルの使用自粛と関連がある可能性を示唆した。一方で、分離株に占める *bla*<sub>TEM-52</sub> 保持 IncX1 型プラスミドを保有する *S. Manhattan* の割合は変わらず、レプリコンタイプや薬剤耐性遺伝子の分布から、*S. Manhattan* は *bla*<sub>TEM-52</sub> を有する IncX1 型プラスミドと親和性が高く、残存しやすい可能性が考えられた。今後も、鶏肉の ESC 耐性サルモネラの汚染状況について継続的なモニタリングが必要であり、その際には、農場等における薬剤の使用状況等の情報を入手することが重要である。

表1-1. 福岡県の市販鶏肉におけるサルモネラの分離状況

分離年	2011	2012	2013	2014	2015	合計
検体数	38	41	32	35	35	181
陽性検体数 (検体数における 割合, %)	20 (52.6)	21 (51.2)	21 (65.6)	19 (54.3)	17 (48.6)	98 (54.1)
複数の血清型が 分離された検体数	2	4	1	0	2	9
分離株数	22	25	22	19	19	107
血清型 <sup>a), b)</sup> (分離株数)	Corvallis <sup>c)</sup> (n = 1) Infantis (n = 11) Manhattan (n = 5) Schwarzengrund (n = 4) Untypeable with O6,O8: d: untypeable (n = 1)	Infantis (n = 12) Manhattan (n = 3) O-untypeable: r: 1,5 (n = 1) Schwarzengrund (n = 8) Untypeable with O4 (n = 1)	Albany (n = 1) Heidelberg (n = 1) Infantis (n = 6) Manhattan (n = 5) Schwarzengrund (n = 9)	Infantis (n = 8) Manhattan (n = 2) Schwarzengrund (n = 9)	Infantis (n = 4) Manhattan (n = 3) Schwarzengrund (n = 12)	Albany (n = 1) Corvallis (n = 1) Heidelberg (n = 1) Infantis (n = 41) Manhattan (n = 18) O-untypeable: r: 1,5 (n = 1) Schwarzengrund (n = 42) Untypeable with O4 (n = 1) Untypeable with O6,O8: d: untypeable (n = 1)

<sup>a)</sup> 2012年の*S. Manhattan* 1株, 2013年の*S. Heidelberg* 1株, 2014年の*S. Infantis* 1株は, ブラジル産鶏肉に由来した。

<sup>b)</sup> 2013年の*S. Albany*は鶏タタキから分離されたが, その他はすべて加熱用鶏肉から分離された。

<sup>c)</sup> *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Corvallis

(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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 45–51.を許可を得て引用し一部改変)

表1-2. *bla* 遺伝子のPCRによる検出およびシーケンスに使用したプライマー

<i>bla</i> 遺伝子	目的	プライマー名	ヌクレオチド配列 5'-3'	引用文献
<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	PCR, シーケンス	cmy-F	GACAGCCTCTTTCTCCACA	(137)
		cmy-R	TGGAACGAAGGCTACGTA	(137)
	シーケンス	CMY2-outF	GTTACAATGTGTGAGAAGCAGTC	(77)
		CMY2-outR	ATGGGATTTTCCTTGCTGTA	(77)
		CMY2-R0	CAGTATTTTCGTGACCGGA	(77)
	CMY2-F3	CTGGATTACGGTTCGCA	(77)	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	PCR, シーケンス	CTX-MU1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	(85)
		CTX-MU2	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	(85)
	シーケンス	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , forward	CTTCCAGAATAAGGAATCCC	(63)
		<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , reverse	CGTCTAAGGCGATAAACAAA	(63)
		CTX-outF2	GCCAAGGGATAATACTAATAGAGG	(77)
		CTX-outR	GCGGAATGATAGAAAGAGATGAG	(77)
		CTX-F2	ACAATACTGCCATGAATAAGCTG	(77)
	CTX-R0	CAATCAGCTTATTCATGGCA	(77)	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	PCR, シーケンス	MAb/F	GGGGAGCTCATAAAATTCTGAAGAC	(90)
		MAb/R	GGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA	(90)
	シーケンス	MAb-F2	AGCCCTCCCGTATCGTAGTT	(77)
		MAb-F1	GAGGACCGAAGGAGCTAACC	(77)
	MAb-outR	AACTACGATACGGGAGGGCT	(77)	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	PCR, シーケンス	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTG	(19)
		SHV-R	ATTTGCTGATTTTCGCTCG	(19)
	シーケンス	SHV-forw	CAAAACGCCGGTTATTC	(58)
		SHV-rev	TTAGCGTTGCCAGTGCT	(58)
		SHVseq-forw	GGATTGACTGCCTTTTTGC	(58)
	SHVseq-rev	GCAAAAAGGCAGTCAATCC	(58)	

Noda, T., Murakami, K., Etoh, Y., Okamoto, F., Yatsuyanagi, J., Sera, N., Furuta, M., Onozuka, D., Oda, T., Asai, T., Fujimoto, S., 2015. Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. PLoS One 10, e0116927. をクリエイティブ・コモンズライセンス(CC-BY)に基づいて引用し一部改変

表1-3. 基質拡張型  $\beta$ -lactamase産生 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Manhattan*およびAmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2産生 *S. Infantis*から分離されたプラスミド

血清型	分離株数	LPP <sup>a)</sup>	レプリコン タイプ	バンドサイズ (kb) <sup>b)</sup>	算出サイズ (kb) <sup>c)</sup>	薬剤耐性遺伝子	菌株番号
<i>S. Manhattan</i>	1	LPP1	IncN	45 <sup>d)</sup>	50.7	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> , <i>aadA</i> , <i>sulI</i> , <i>tet(A)</i>	3377
			Not evaluated	271 <sup>d)</sup>	Not evaluated	Not evaluated	
<i>S. Manhattan</i>	1	LPP2	IncX3	31 <sup>d)</sup>	36.7	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	2943
			Not evaluated	274 <sup>d)</sup>	Not evaluated	Not evaluated	
<i>S. Manhattan</i>	6	LPP3	IncX1	31-36 <sup>d)</sup>	38.9-42.1	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	2849, 2941, 3172,
			Untypeable	269-273 <sup>d)</sup> e)	283.8-359.3	<i>aadA</i> , <i>sulI</i> , <i>tet(A)</i>	3369, 3539, 3548
<i>S. Infantis</i>	1	LPP5	Untypeable	286	288.9	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> , <i>aadA</i> , <i>sulI</i> , <i>tet(A)</i>	2967

a) LPP, large plasmid profile

b) S1-pulsed field gel electrophoresisによって検出されたプラスミドのバンドサイズ

c) 全ゲノムシークエンスにより算出されたプラスミドサイズ

d) 1つの分離株につき2つのプラスミドが検出された。

e) 1つのプラスミドは解析ができなかった。

(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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 45-51. を許可を得て引用し一部改変)

表1-4. ESC<sup>a)</sup>耐性サルモネラの薬剤耐性パターンおよび*bla*遺伝子

血清型	<i>bla</i> 遺伝子	薬剤耐性パターン <sup>b)</sup>	分離株数	菌株番号			
Heidelberg <sup>c)</sup> (n = 1)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	CTX-CAZ-CPD-CFIX-CFX-CEF	1	3205 <sup>d)</sup>			
			2	2834, 2855			
			1	3182			
			2	2936, 2965			
			CPD-CFIX-CFX-CEF		1	2945	
			1	2847			
			1	2967			
			1	3198			
			CPD-CFIX-CFX		1	2826	
			1	2934			
Infantis (n = 15)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	CPD-CFIX-CFX	1	2987			
			1	2974			
			CTX-CAZ-CPD-CFIX-CFX-CEF		1	2974	
			CTX-CPD-CFIX-CFX-CEF		1	2843	
			1	2978			
			<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>		1	3377	
			<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>		1	2943	
			Manhattan (n = 8)	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	CTX-CAZ-CPD-CEF	1	3369
						1	2941
						2	3539, 3548
1	2849 <sup>d)</sup>						
1	3172						
O-untypable: r: 1, 5		<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>				CPD-CFIX-CFX-CEF	1
(n = 1)							

a) ESC, 広域スペクトラムセファロスポリン

b) CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CPD, cefpodoxime; CFIX, cefixime; CFX, ceftiofur

c) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Heidelberg

d) ブラジル産鶏肉から分離された。

(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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. Int. J. Food Microbiol., 274, 45–51.を許可を得て引用し一部改変)



表1-5. 福岡県の市販鶏肉から分離されたESC<sup>a)</sup>耐性サルモネラの*bla*遺伝子保有状況

	2011	2012	2013	2014	2015	合計
供試株数	22	24 <sup>b)</sup>	22	19	19	106
ESC耐性株数 (供試株数における割合, %)	10 (45.5)	7 (29.2)	4 (18.2)	2 (10.5)	2 (10.5)	25 (23.6)
耐性株から検出された <i>bla</i> 遺伝子 <sup>c)</sup> (血清型, 分離株数)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (Infantis <sup>d)</sup> , n = 8) <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (Manhattan, n = 1) <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> (Manhattan, n = 1)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (Infantis, n = 5) <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (O-untypable: r: 1, 5, n = 1) <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> (Manhattan, n = 1)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (Heidelberg, n = 1) <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (Infantis, n = 2) <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> (Manhattan, n = 1)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> (Manhattan, n = 1) <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> (Manhattan, n = 1)	<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> (Manhattan, n = 2)	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (Heidelberg, n = 1) <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (Infantis, n = 15) <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> (O-untypable: r: 1, 5, n = 1) <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> (Manhattan, n = 1) <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (Manhattan, n = 1) <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> (Manhattan, n = 6)

a) ESC, 広域スペクトラムセフトロキサリン

b) 分離株25株のうち, 1株は保存状態から復帰しなかった。

c) 2012年の*bla*<sub>TEM-52</sub>保有*S. Manhattan* 1株および2013年の*bla*<sub>CMY-2</sub>保有*S. Heidelberg* 1株はブラジル産鶏肉に由来した。

d) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis

(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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 45-51.を許可を得て引用し一部改変)

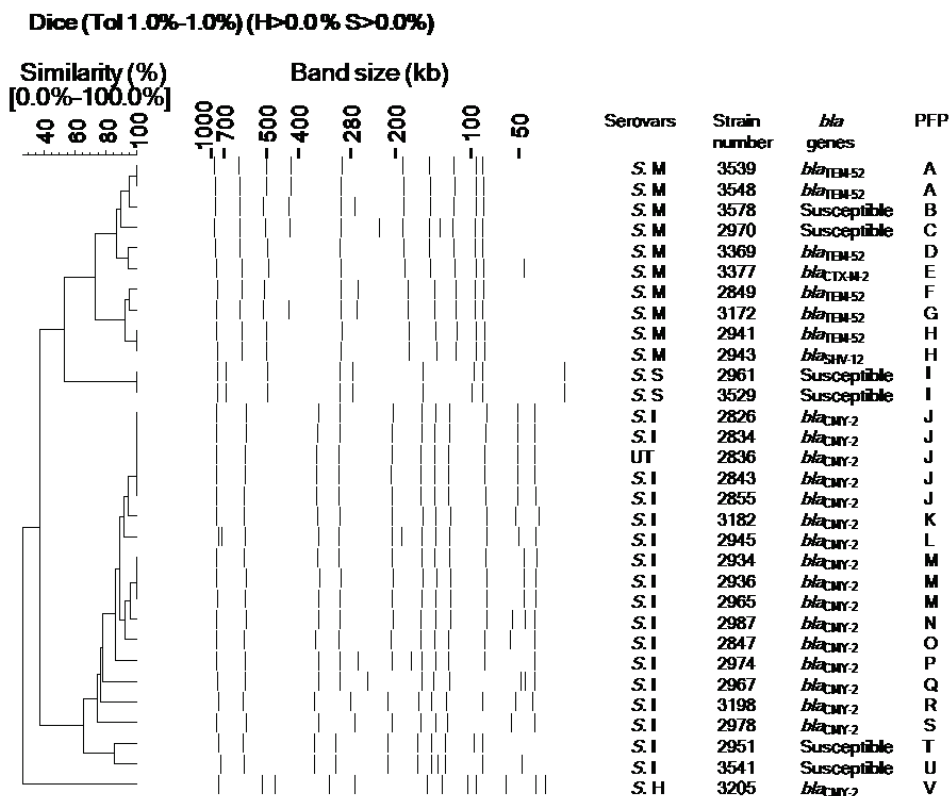


図 1-1. 市販鶏肉から分離された薬剤耐性サルモネラ分離株の PFGE によるプロファイリング

31 株のサルモネラから 22 種類の PFGE プロファイル (PFP) が得られた。供試菌株の内訳は、広域スペクトラムセファロスポリン耐性株 25 株 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis* が 15 株, *S. Heidelberg* が 1 株, *S. Manhattan* が 8 株, O-untypable r: 1: 5 が 1 株) と感性株 6 株 (*S. Infantis* が 2 株, *S. Schwarzengrund* が 2 株, *S. Manhattan* が 2 株) であった。

PFGE, pulsed-field gel electrophoresis

S. I: *S. Infantis*, S. S: *S. Schwarzengrund*, S. M: *S. Manhattan*, S. H: *S. Heidelberg*, UT: O-untypable r: 1: 5

(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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 45–51.を許可を得て引用し一部改変)

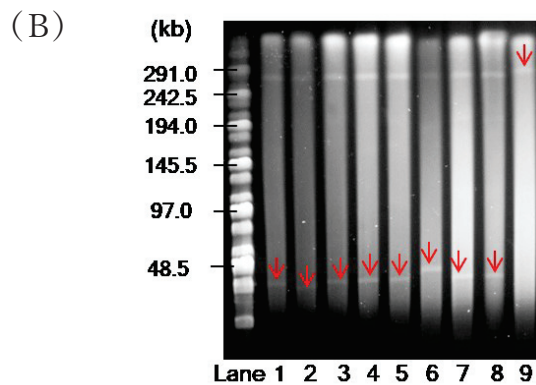
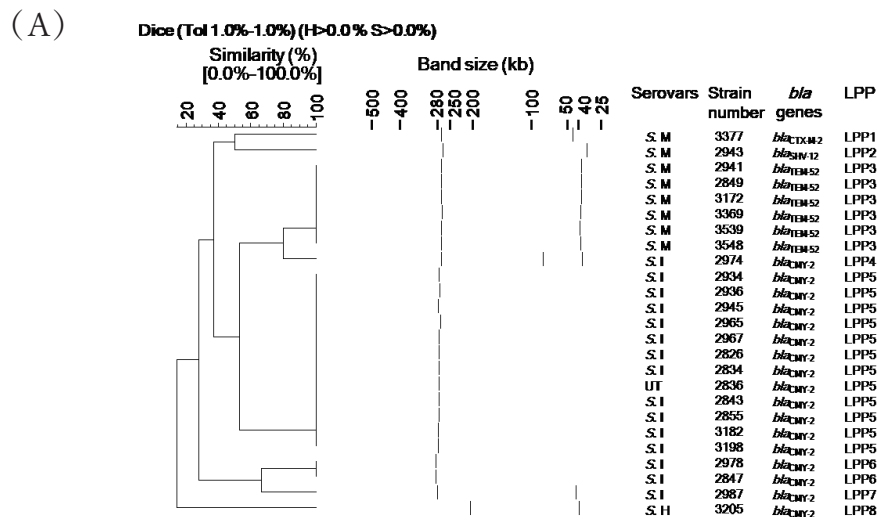


図 1-2. 市販鶏肉から分離された ESC 耐性サルモネラの保有するプラスミドのプロファイリング

(A) *bla* 遺伝子を保有する ESC 耐性サルモネラ 25 株から 8 つの LPP を得た。

ESC, 広域スペクトラムセファロスポリン

LPP, large plasmid profile

S. I : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis, S. S : *S. Schwarzengrund*,

S. M : *S. Manhattan*, S. H : *S. Heidelberg*, UT : O-untypable r: 1: 5

(B) 矢印 (赤) は *bla* 遺伝子を保有するプラスミドに由来するバンドを示す。

Lane 1 は no. 2941 株, Lane 3 は no. 2849 株, Lane 4 は no. 3172 株, Lane 5 は no. 3369 株, Lane 7 は no. 3539 株, Lane 8 は no. 3548 株で, いずれも *S. Manhattan* 由来する *bla*<sub>TEM-52</sub> 保持プラスミド。Lane 2 は *S. Manhattan* no. 2943 株の *bla*<sub>SHV-12</sub> 保持プラスミド。Lane 6 は *S. Manhattan* no. 3377 株の *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保持プラスミド。Lane 9 は *S. Infantis* no. 2967 株の *bla*<sub>CMY-2</sub> 保持プラスミド。

(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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 274, 45–51.を許可を得て引用し一部改変)

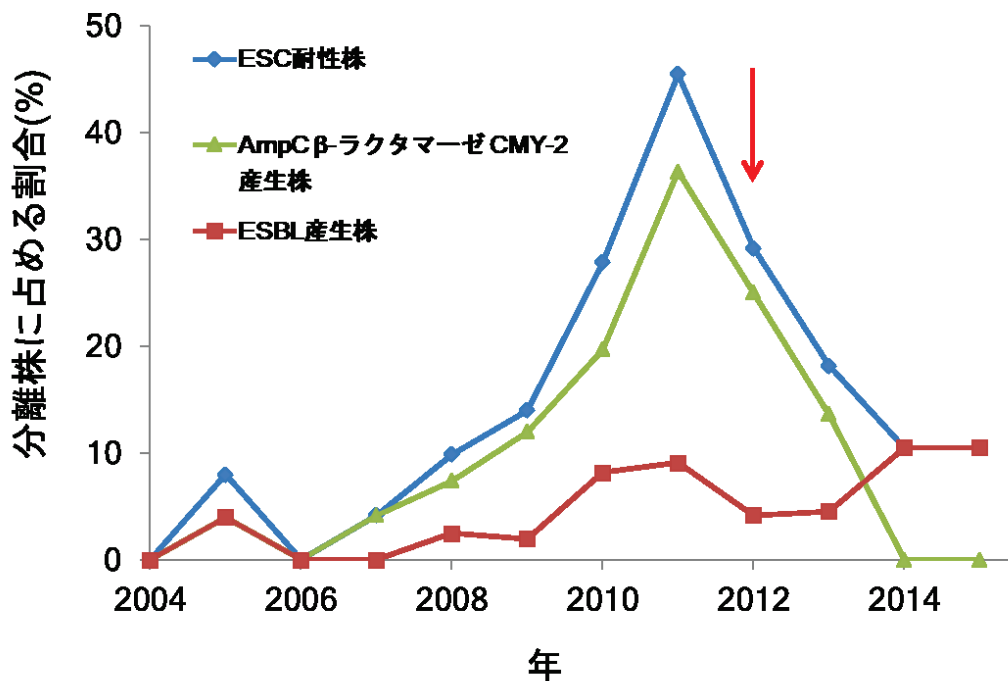


図 1-3. 市販鶏肉由来のサルモネラ菌株に占める ESC 耐性株の割合の年次推移

市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株に占める，ESC 耐性サルモネラ菌株（青線），AmpC β-ラクタマーゼ CMY-2 産生サルモネラ菌株（緑線）および ESBL 産生（赤茶線）サルモネラ菌株の割合。矢印は，国等の調査で，日本国内の肉用鶏から ESC 耐性菌が分離されたことを受け，養鶏生産団体がセフトオフルの使用を自粛した時期（2012 年 3 月）を示している。

ESC，広域スペクトラムセファロスポリン

ESBL，基質拡張型 β-ラクタマーゼ

（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., 2018. Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry. Int. J. Food Microbiol., 274, 45–51.を許可を得て引用し一部改変）

## 第二章

鶏卵，鶏卵生産環境における ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査  
および全ゲノム解析による *bla* 遺伝子の拡散に関する因子の解析

本章は次の論文から一部転載しています。

タイトル：Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS*Ecp1* or IS26 in layer breeding chains in Japan

著者：Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y.,  
Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T.,  
Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. Murakami, K.

雑誌：The Journal of Veterinary Medical Science

出版年・巻号・頁：2021・85(9)・1345-1355

DOI：https://doi.org/10.1292/jvms.21-0085

## 序論

第一章で福岡県の市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの汚染実態を明らかにした。サルモネラ食中毒の主な原因食品には鶏肉のほかに鶏卵が挙げられる (22, 70)。これまでに国内および国外の市販鶏卵から ESC 耐性サルモネラが分離された報告はないが、いくつかの国では、採卵鶏やその生産環境から ESC 耐性サルモネラが分離されている (93, 97, 98)。採卵鶏生産の一連の流れである採卵鶏生産チェーンは、上流部 (種鶏場, 孵化場, 育雛場) と下流部 (採卵鶏農場) で構成され (23, 119) (図 2-1), さらに, 採卵鶏農場で採卵された鶏卵の大部分は卵選別包装施設 (GP センター) で選別された後, 加工場で液卵に加工される (鶏卵・液卵加工チェーン) (83, 115, 117)。本研究では, 採卵鶏生産から液卵加工までの一連のチェーンを採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン (LB-EP チェーン) と定義する (図 2-1)。これまでに日本国内の LB-EP チェーンにおける薬剤耐性サルモネラに関する研究は 2 件しか行われていない (41, 112)。これらの研究では, 採卵鶏農場や GP センターの環境から, ABPC, SM, セファロチン等の抗菌薬に耐性を示すサルモネラが分離されたことが報告されているが (41, 112), ESC 耐性サルモネラに関する知見はない。採卵鶏およびその生産環境に由来するサルモネラは鶏卵および錦糸卵, 卵サンドウィッチのような鶏卵加工食品 (35) を介しヒトへ伝播するおそれがあり, 採卵鶏およびその生産環境における ESC 耐性サルモネラに関する調査が必要である。

プラスミド上に存在する *bla* 遺伝子は, IS を介して, 別のプラスミド

や染色体へ転移することで拡散する (24, 84, 102)。これら IS のうち、いくつかの IS は *bla* 遺伝子等の薬剤耐性遺伝子の転移に関与していることが報告されている (24, 102, 136)。例えば、中国の家禽由来 *S. Indica* において、ISEcp1 により IncHI2 型プラスミド上の *bla*<sub>CTX-M-64</sub> が *S. Indica* の染色体へ転移したことが示唆されている (136)。また、IS26 により、日本のウシから分離された *S. Typhimurium* の染色体に、IncA/C 型プラスミドの *bla*<sub>CMY-2</sub>, *tet(A)*, *sul2* および *floR* 等の複数の薬剤耐性遺伝子が組み込まれたことが示唆されている (102)。したがって、ESC 耐性サルモネラにおいても、*bla* 遺伝子の転移に関与する IS を同定することは、*bla* 遺伝子の拡散機序を解明する一助となる。

本章では、日本国内の LB-EP チェーンにおける ESC 耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするため、2014 年を除く 2009 年から 2016 年に国内の鶏卵および鶏卵生産環境から分離されたサルモネラ菌株を用いて、薬剤感受性試験を行い、ESC 耐性株を探索した。さらに、サルモネラの ESC 耐性に関与するプラスミドや IS 等の遺伝子的特徴を明らかにするため、ESC 耐性サルモネラの全ゲノム配列を決定し、プラスミドおよび染色体の薬剤耐性遺伝子の網羅的解析、レプリコンタイプ型別を行った。また、プラスミド間、プラスミドと染色体間の比較構造解析を行い、*bla* 遺伝子の転移に関与する IS を同定した。

## 材料および方法

### 1. 使用菌株，検体情報，分離方法

#### (1) 使用菌株

民間の検査機関 1 施設で 2014 年を除く 2009 年から 2016 年に A~G 県の計 7 県（A~F 県は西日本，G 県は東日本）の LB-EP チェーンで分離されたサルモネラ 224 株を受領し，本研究に使用した（表 2-1）。分離株は培養した菌体を 10%スキムミルク溶液に懸濁し，試験に供するまで -80℃で保存した。

#### (2) 菌株が分離された検体情報

サルモネラ 224 株の分離年の内訳は，2009 年，2010 年，2011 年，2012 年，2013 年，2015 年および 2016 年にそれぞれ 51，43，41，43，40，3 および 3 株であった（表 2-1）。サルモネラ 224 株が分離された検体の内訳は，採卵鶏生産環境検体 135 株（スワブ 77 株，塵埃 50 株，糞便 5 株，由来不明 3 株）および卵殻検体 89 株であった（表 2-2）。採卵鶏生産環境検体は以下のように採取された。スワブ検体は，swabbing sheet（717800-2，関東化学，東京）およびふきふきチェック（PF2002，栄研化学）を使用し，施設の床を拭いたものを検体とした。塵埃検体は育雛場および採卵鶏農場に取り付けられた換気装置から採取され，糞便は種鶏場または孵化場から採取された。GP センターについては，床に加え，鶏卵用コンテナを拭いたものを検体とした。卵殻検体については，卵殻が採取された施設については，情報が得られなかったため，鶏卵が由来する採卵鶏農場を由来施設とした。各卵殻検体は液卵採取後の卵殻 100~150 個まとめたものを検体とした。サルモネラ 224 株の由



来施設の内訳は、種鶏場 1 施設で 4 株、孵化場 2 施設で 2 株、育雛場 5 施設で 20 株、採卵鶏農場 39 施設で 194 株、GP センター 2 施設で 4 株であった（表 2-2 および表 2-3）。

### (3) サルモネラ分離方法

上記の使用菌株は、民間の検査機関で下記の方法により分離された。

検体を 225 ml の BPW と混合した後、1 分間手振りした。混合した BPW を 37°C、20±2 時間で培養した。ただし、卵殻検体については、約 500 g～750 g の卵殻と 1,500～2,000 ml の BPW を使用した。培養後の BPW 0.1 ml を RV ブロスに加え、42°C、20±2 時間で培養した。培養した RV を Mannitol, lysine, crystal violet and brilliant green 寒天培地（CM0783, Oxoid Ltd.）および Rimler-Shotts-Maeda 寒天培地（717586-1, 関東化学）に画線塗抹し、37°C、18～48 時間培養した。サルモネラと推測される 4 コロニーを釣菌し、第一章と同様に、生化学性状試験によりサルモネラの同定を行った。血清型別については、未実施であった。

## 2. 血清型別

民間の検査機関から受領したサルモネラ 224 株の血清型別は、Kauffman-White の抗原構造に基づく分類に従い、第一章と同様に O 抗原および H 抗原用抗血清（デンカ生研）を用いて実施した。

## 3. 薬剤感受性試験、*bla* 遺伝子の探索および *bla* 遺伝子の型別

### (1) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、第一章と同様に実施した。抗菌薬は ABPC（10 µg/disk, 296636）、CPDX（10 µg/disk）、クロラムフェニコール（CP、

30 µg/disk, 296637), シプロフロキサシン (CPFX, 5 µg/disk, 291070), ナリジクス酸 (NA, 30 µg/disk, 296647), カナマイシン (KM, 30 µg/disk, 296640), SM (10 µg/disk, 296955), アジスロマイシン (AZM, 15 µg/disk, 252016), テトラサイクリン (TC, 30 µg/disk, 296638), MEPM (10 µg/disk) の 10 薬剤 (いずれも Becton Dickinson and Co.) を用いた。薬剤感受性試験の結果は, CLSI の耐性ブレイクポイントの基準 (16) に基づいて判定した。

## (2) ESBL 産生および AmpC $\beta$ -lactamase 産生確認試験

ABPC に耐性を示した株については, 第一章と同様に, ESBL および AmpC  $\beta$ -lactamase の産生を確認した。

## (3) Etest による最小発育阻止濃度 (MIC) の測定

WGS 解析に供試した *S. Ohio* 3 株 (SEOhIM1593 株, 1960 株, 2008 株) および *S. Cerro* 1 株 (SECerM2017 株) の 6 薬剤に対する MIC を決定するため, Etest (bioMérieux) を用いた。MIC の決定は, 製造者の指示にしたがって実施した。抗菌薬は, ABPC (412253), アンピシリン-スルバクタム (ABPC-SBT, 412251), CAZ (412293), CPDX (412289), CTX (412279, 412281), セフトリアキソン (CTRX, 412301, 412303) を用いた。

## (4) *bla* 遺伝子の探索

ABPC に耐性を示した株について, 第一章と同様に PCR により *bla* 遺伝子の探索を行った。ただし, 表 2-4 に示すプライマーを用いた。

#### (5) *bla* 遺伝子型別

検出された *bla* 遺伝子の塩基配列を，第一章と同様に決定した。ただし，プライマーは表 2-4 を使用した。また，得られた DNA 配列を，NCBI の nucleotide データベース (74) に登録されている参照配列と比較し，*bla* 遺伝子型を決定した。

#### 4. *bla* 遺伝子を保有する ESC 耐性株の疫学情報

ESC 耐性株が分離された検体の由来，施設種別，分離年月等，菌株に関する詳細な情報を表 2-5 に示した。

#### 5. *bla* 遺伝子を保有する ESC 耐性株の WGS 解析

##### (1) 供試菌株

本研究では，同一の採卵鶏生産チェーン（鶏卵生産企業 A 社）に属する施設から，*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する *S. Ohio* 12 株が分離されており，育雛場スワブ検体由来 11 株から 2 株（SEOhIM1593 株および 2008 株）を無作為に選択し，また，卵殻検体由来 1 株から 1 株（SEOhIM1960 株）を選択し，WGS 解析に使用した。さらに，卵殻検体由来の *S. Cerro*（SECerM2017 株）は，本研究で確認された ESC 耐性サルモネラの中で，唯一 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有していたため，WGS 解析に使用した。

##### (2) WGS 解析

WGS 解析を口腔常在微生物叢解析センター（高松，香川）に外部委託して，下記の方法で，全ゲノムデータを取得した。

MagAttract HMW DNA Kit (67563, Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて各菌株から全ゲノム DNA を抽出した。この抽出 DNA を使用し、Nextra DNA Flex Library Prep Kit (20018704, Illumina) を用いてライブラリーを作製した。MiSeq Reagent Kits v2 (MS-102-2002, MS-102-2003, Illumina) を利用し、Illumina MiSeq で、300 または 500 サイクルで dual-index-paired-end ペアエンドシーケンシングを行い、short-read sequence データを得た。また、抽出 DNA に Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104, Oxford Nanopore, Oxford, UK) により標識配列を付与し、Ligation Sequencing 1D Kit (SQK-LSK108, Oxford Nanopore) を用いてナノポアシーケンサーライブラリーを作製した。このライブラリーを、R9.4.1 フローセルを用い MinION (FLO-MIN106D, Oxford Nanopore) でシーケンスし、long-read sequence データを得た。

染色体およびプラスミドの完全長塩基配列を得るため、short-read sequence データおよび long-read sequence データを用い、Unicycler v.0.4.4 (129) または Flye v.2.4.2 (51) により、De Novo Assembly を行った。配列のエラー修正は Pilon v.1.23 (127) により行った。

### (3) 染色体およびプラスミドの薬剤耐性遺伝子、レプリコンタイプの同定

染色体およびプラスミド塩基配列を PlasmidFinder (6) と ResFinder (49) の BLASTN 相同性検索により解析し、レプリコンタイプと薬剤耐性遺伝子を同定した。

## 6. 比較ゲノム構造解析

### (1) 比較に使用したプラスミドおよび染色体

2種類の *bla*<sub>CMY-2</sub> 保持プラスミド (pSEOhIM1593a および 1960a), 3種類の *S. Ohio* 株 (SEOhIM1593, 1960, 2008) の染色体の比較ゲノム構造解析を行った (図 2-2). SEOhIM1593 株由来の pSEOhIM1593a プラスミドは SEOhIM1960 株由来の pSEOhIM1960a プラスミドと構造比較された (図 2-2A)。また, *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する SEOhIM1960 株の染色体は, *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有しない SEOhIM1593 株の染色体および *bla*<sub>CMY-2</sub> 保持 pSEOhIM1593a プラスミドと構造比較された (図 2-2B)。さらに菌株 SEOhIM2008 株の染色体は, SEOhIM1960 株の染色体と同様に, SEOhIM1593 株の染色体, pSEOhIM1593a プラスミドと構造比較した (図 2-2C)。

さらに, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有する菌株 SECerM2017 株の染色体の比較ゲノム構造解析を行った。SECerM2017 株の染色体は, SEOhIM1593 株の染色体および p14E509-CTXM プラスミド (GenBank accession no. MG764547.1) (133) と構造比較した (図 2-3)。p14E509-CTXM プラスミドは, BLASTN 解析により, SECerM2017 株の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が存在する領域と最も高い塩基配列類似性 (coverage 100%) を示したため, 比較ゲノム構造解析に使用した。

### (2) 染色体およびプラスミドの遺伝子情報の付与とゲノム構造の比較

比較ゲノム構造解析に使用する染色体塩基配列およびプラスミド塩基配列の遺伝子情報の付与は, アノテーションパイプラインである DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST) (75) により

行った。比較ゲノム構造解析は、BLASTN と Artemis Comparison Tool (7) により行った。また、ゲノム上に示された IS の同定は ISfinder (108) を用いた。さらに、比較解析結果の可視化は Easyfig (114) で行った。

## 7. pSEOhim1593a プラスミドおよび腸内細菌科細菌由来プラスミドの比較解析

pSEOhim1593a とサルモネラを含む腸内細菌科細菌由来プラスミドの薬剤耐性遺伝子、レプリコンタイプ、IS 等を比較した (表 2-6)。比較に用いたプラスミドは、BLASTN 相同性検索により、pSEOhim1593a との類似性 (coverage 99%以上) に基づいて選択した。また、選択したプラスミドの塩基配列データは、GenBank から入手し、上記の方法に従い、レプリコンタイプと薬剤耐性遺伝子の同定を行った。また、各プラスミドの IS の同定は ISfinder (108) を用いた。

## 結果

### 1. サルモネラ分離株の血清型

LB-EP チェーンの卵殻検体と採卵鶏生産環境検体から分離された 224 株のサルモネラは、36 血清型に分類された (表 2-7)。

### 2. 分離株の薬剤感受性および分離株から検出された *bla* 遺伝子

薬剤感受性試験の結果、224 株のうち 40 株が少なくとも 1 種類の抗菌薬に対して耐性を示した (表 2-8 および 2-9)。残りの 184 株は供試した 10 種類の抗菌薬全てに対して感性を示した。薬剤耐性サルモネラ 40 株は 11 種類の薬剤耐性パターンを示した。最も多い薬剤耐性パターンは ABPC-CPDX-CP-SM-TC であった (40 株中 13 株)。薬剤別耐性株数は、SM は 30 株、TC は 26 株、ABPC は 20 株、CP は 16 株、CPDX は 15 株、NA は 6 株、CPFX は 4 株、KM は 1 株であり、AZM および MEPM に耐性を示す分離株はなかった (表 2-9)。

ABPC に耐性を示した 20 株のうち、20 株から *bla* 遺伝子が検出され、そのうち、15 株が ESC 耐性株であった (表 2-8)。ESC 耐性株 15 株のうち、14 株は *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する AmpC  $\beta$ -lactamase 産生株であり、その内訳は *S. Ohio* が 12 株、*S. Braenderup* が 1 株、O7:b:- が 1 株であった。また、15 株のうち 1 株は *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有する ESBL 産生 *S. Cerro* だった (表 2-8)。残る 20 株中 5 株は *bla*<sub>TEM-1</sub> を保有し、ペニシリナーゼを産生する非 ESC 耐性株であり、*S. Kentucky* が 4 株、*S. Infantis* が 1 株であった。

WGS に使用したサルモネラ 4 株 (SEOhIM1593 株, 1960 株, 2008

株および SECerM2017 株) の ESC に対する MIC を表 2-10 に示した。2 つの *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する SEOhiM1960 株と, 単一の *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する SEOhiM1593 および 2008 と比較したところ, ESC に対する MIC に有意な差は認められなかった。

### 3. *bla*<sub>CMY-2</sub> または *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有する ESC 耐性株の疫学情報

*bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する ESC 耐性サルモネラ 14 株のうち, *S. Ohio* 12 株および血清型不明 (O7: b: -) 1 株は, A 県の鶏卵生産企業 A 社に属する育雛場 2~3 施設のスワブ検体および採卵鶏農場 1 施設の卵殻検体に由来した (表 2-5)。残り 1 株は *S. Braenderup* であり, B 県の鶏卵生産企業 B 社に属する採卵鶏農場 1 施設のスワブ検体に由来した。*bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有する ESC 耐性 *S. Cerro* 1 株は, C 県の鶏卵生産企業 Q 社に属する採卵鶏農場 1 施設の卵殻検体に由来した。

### 4. WGS による薬剤耐性遺伝子, プラスミドレプリコンタイプ, IS の同定

*S. Ohio* の 3 株 (SEOhiM1593 株, 1960 株, 2008 株) と *S. Cerro* の 1 株 (SECerM2017 株) の染色体およびプラスミドから検出された薬剤耐性遺伝子, レプリコンタイプ, IS について, 表 2-11 に示した。

SEOhiM1593 株が保有するプラスミド (pSEOhiM1593a プラスミド), SEOhiM1960 株が保有するプラスミド (pSEOhiM1960a プラスミド) および IncA/C<sub>2</sub> プラスミドに分類された SEOhiM2008 株の染色体領域からは, アミノグリコシド (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*), フロルフェニコール/クロラムフェニコール (*floR*), スルホンアミド (*sul2*), テトラサイ



クリン (*tet(A)*) および ESC (*bla<sub>CMY-2</sub>*) に対する薬剤耐性遺伝子が見つかった。SEOhim1960 株については、pSEOhim1960a プラスミドに加え、染色体からも *bla<sub>CMY-2</sub>* が検出された (表 2-11)。また、SECerM2017 株の染色体から *bla<sub>CTX-M-14</sub>* が検出された。

## 5. 比較ゲノム構造解析

IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドである pSEOhim1593a プラスミドおよび 1960a プラスミドは、高い相同性を示した (図 2-2A)。さらに、SEOhim2008 の染色体から pSEOhim1593a および 1960a と高い相同性を示した領域が見つかった (図 2-2C)。この SEOhim2008 の染色体領域 (ヌクレオチド位置 1,090,811~1,183,061) の両端には IS26 が認められた。

また、SEOhim1960 株の *bla<sub>CMY-2</sub>* が存在する染色体領域 (ヌクレオチド位置 2,412,761~2,415,912) は、pSEOhim1593a プラスミドの *ISEcp1* とともに *bla<sub>CMY-2</sub>* が存在する領域 (ヌクレオチド位置 57,825~60,976) と一致した (図 2-2B)。

SECerM2017 株の染色体から *ISEcp1* とともに *bla<sub>CTX-M-14</sub>* が存在する領域 (3,006 bp, ヌクレオチド位置 1,581,874~1,584,879) が見つかった。この領域は、p14E509-CTXM プラスミドの領域 (ヌクレオチド位置 20,608~23,613) と同一であった (図 2-3)。

## 6. pSEOhim1593a プラスミドおよび腸内細菌科細菌由来プラスミドの比較解析

pSEOhim1593a プラスミドの薬剤耐性遺伝子等の遺伝的特徴を、ヒ

トあるいは動物に由来する腸内細菌科細菌のプラスミドと比較した（表 2-6）。pKP-Gr642 を除く，全てのプラスミドから共通する 6 つの薬剤耐性遺伝子（*bla*<sub>CMY-2</sub>, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *floR*, *sul2*, *tet*(A)）が確認された。pKP-Gr642 は *bla*<sub>CMY-2</sub> に代わり *bla*<sub>CMY-4</sub> とした 6 つの薬剤耐性遺伝子が保有していた。また，比較された全てのプラスミドには，複数の IS26 が認められた。

## 考察

本研究により，国内の LB-EP チェーンの育雛場および採卵鶏農場の環境が ESC 耐性サルモネラに汚染されていることが明らかとなった（表 2-5 および表 2-8）。また，採卵鶏生産チェーンの上流部および下流部で分離された *S. Ohio* (SEOhIM1593 株, 1960 株, および 2008 株) から，pSEOhIM1593a プラスミド，pSEOhIM1960a プラスミド，および SEOhIM2008 株の染色体上に組込まれた pSEOhIM1593a 類似構造が見つかっており，採卵鶏生産チェーンのサルモネラ間で IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドを介して *bla* 遺伝子を含む複数の薬剤耐性遺伝子の拡散が起こっていることが明らかとなった。LB-EP チェーンの上流部から下流部へ ESC 耐性サルモネラを伝播させないためには，ESC 耐性サルモネラに感染している雛を育雛場へ導入させないことが対策の一つである。そのためには，孵化後の雛がサルモネラに感染しないよう，種卵の消毒や孵化場での器具の殺菌・消毒のような衛生管理を徹底する（80）ことや，雛が ESC 耐性サルモネラを保菌していないことを確認することが重要である。

さらに，卵殻も ESC 耐性サルモネラに汚染されていることが明らかとなった（表 2-5 および表 2-8）。採卵鶏農場で生産された鶏卵の大部分は GP センターに搬入され，洗卵殺菌されるため（115），サルモネラの卵殻表面の汚染は除去されると考えられる。ただし，GP センターを経由した場合でも，洗卵時の水温管理が不適切になった場合等では，汚染除去が不十分となることがある（104, 115）。本研究で用いたサルモネラ菌株の卵殻検体は，GP センターに搬入されたものか，

GP センターを經由せず直接割卵工場へ搬入されたものかは不明であったが、卵殻検体から ESC 耐性サルモネラが分離された。このことから、割卵後に液卵が ESC 耐性サルモネラに汚染される可能性や、割卵工場等の環境が汚染され、ESC 耐性サルモネラの汚染を広げることが懸念される。従って、割卵前の卵殻表面の洗卵・殺菌において、水温管理に注意して汚染除去を十分行う等（104, 115）の衛生管理の徹底が重要と考えられる。

共耐性は複数の異なる系統の抗菌薬に耐性を示すことであり、共耐性の場合、薬剤耐性菌が異なる系統の薬剤の使用によっても選択される（29, 81）。日本国内の採卵鶏への抗菌薬使用状況については、農林水産省による 2018 年の調査で、ペニシリン系薬剤、アミノグリコシド系薬剤、スルホンアミド系薬剤、テトラサイクリン系薬剤が採卵鶏に使用されていることが示されており、ESC は使用されていない（76）。本研究において、*S. Ohio* が保有していた IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドの pSEOhim1593a プラスミドおよび pSEOhim1960a プラスミドには、共通の薬剤耐性遺伝子セット (*bla*<sub>CMY</sub>, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id, *floR*, *sul2*, *tet*(A)) が存在しており（表 2-11）、抗菌薬（ペニシリン系薬剤、アミノグリコシド系薬剤、クロラムフェニコール系薬剤、スルホンアミド系薬剤、テトラサイクリン系薬剤）の選択圧下でも生存可能であると考えられる。そのため、*bla*<sub>CMY-2</sub> を含む上記薬剤耐性遺伝子セットを保持するプラスミドを保有した *S. Ohio* は、共耐性により、ESC 以外の上記系統抗菌薬の使用に関連して選択され、国内の一部の採卵鶏生産チェーンで生存していた可能性が考えられる。

また、本研究におけるプラスミド比較解析の結果、上記薬剤耐性遺伝

子セットを有する IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドが世界的に分布していることが明らかとなった（表 2-6）。例えば，米国のブタ由来 *S. Newport* やウシ由来 *E. coli* から，薬剤耐性遺伝子セットを保持する IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドの pCVM21550 プラスミドや pAR060302 プラスミドが見ついている（表 2-6）。2018 年の米国食品医薬品局の調査によると，ブタの感染症にはアミノグリコシド系薬剤，サルファ系薬剤，テトラサイクリン系薬剤が使用され，ウシの感染症にはセファロスポリン系薬剤，ペニシリン系薬剤，アミノグリコシド系薬剤，サルファ系薬剤，テトラサイクリン系薬剤が使用されており（120），前述のような薬剤耐性遺伝子セットを保持する IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドを保有する細菌は，抗菌薬の使用下でも生残していたことが予想される。本研究では，抗菌薬の使用と IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドを保有した細菌の生存に関連があるかは不明であった。これを明らかにするためには，農場や施設等における抗菌薬使用に関する情報を入手し，調査を続ける必要がある。

本研究における比較ゲノム構造解析の結果，*ISEcp1* によって，*bla*<sub>CMY-2</sub> または *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を含むプラスミドの一部が，*S. Ohio* または *S. Cerro* の染色体へそれぞれ組込まれており，*ISEcp1* が部分的なプラスミド領域の組込みを介した *bla* 遺伝子の拡散に関与していることを確認した。また，*S. Ohio* が IS26 により pSEOhim1593a 類似プラスミドを染色体へ組込むことで，*bla*<sub>CMY-2</sub> を含む複数の薬剤耐性遺伝子セットを獲得していたことが明らかとなり，IS26 がプラスミドの広範な領域あるいは全体の組込みを介した *bla* 遺伝子を含む複数の薬剤耐性遺伝子セットの拡散に関与していることを確認した。したがって，*bla* 遺伝子を含む薬剤耐性遺伝子は，IS を介したプラスミドの組込みにより，

採卵鶏生産チェーンのサルモネラに拡散したと考えられた。また、細菌はよく似た複製系をもつプラスミドは同一宿主に共存できず、プラスミドを脱落させることがあり(69, 95, 99)、プラスミドではなく染色体上に *bla* 遺伝子を保有した ESC 耐性サルモネラが採卵鶏生産チェーンに残存していく可能性が考えられた。

本研究により、サルモネラは、*ISEcp1* と *IS26* を有する IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドを介して、*bla* 遺伝子を含む複数の薬剤耐性遺伝子を獲得していたことが明らかとなった(図 2-4)。また、このような薬剤耐性遺伝子を獲得した ESC 耐性サルモネラが日本国内の一部の育雛場や卵殻を汚染していたことが明らかとなった。複数の薬剤耐性遺伝子を保有する ESC 耐性サルモネラは、耐性型に含まれる抗菌薬の使用によっても選択され、残存していくおそれがあることから、採卵鶏生産チェーンにおいては、耐性型に含まれる抗菌薬の使用にも注意を払う必要があると考えられた。

表2-1. 各年におけるサルモネラ分離菌株数および由来施設に関する情報

分離年	県	分離菌株数						小計	年別計
		卵殻	環境						
			種鶏場	孵化場	育雛場	採卵鶏農場	GPC <sup>a)</sup>		
2009	A	1	—	—	3	3	—	7	51
	B	14	—	—	—	—	—	14	
	C	4	—	1	3	14	—	22	
	D	3	—	—	—	1	—	4	
	E	3	—	—	—	1	—	4	
2010	A	—	—	—	4	3	—	7	43
	B	13	—	1	—	1	—	15	
	C	5	—	—	1	14	—	20	
	E	1	—	—	—	—	—	1	
2011	A	2	—	—	3	4	—	9	41
	B	4	1	—	—	5	—	10	
	C	5	—	—	1	10	—	16	
	D	—	—	—	—	1	—	1	
	E	3	—	—	—	—	—	3	
	F	—	—	—	—	2	—	2	
2012	A	2	—	—	4	3	—	9	43
	B	4	1	—	—	4	—	9	
	C	5	—	—	—	17	—	22	
	D	1	—	—	—	—	—	1	
	G	2	—	—	—	—	—	2	
2013	A	3	—	—	—	2	3	8	40
	B	5	2	—	—	5	—	12	
	C	4	—	—	—	7	—	11	
	D	1	—	—	—	1	—	2	
	F	1	—	—	—	1	1	3	
	G	2	—	—	—	2	—	4	
2015	C	1	—	—	—	2	—	3	3
2016	A	—	—	—	—	1	—	1	3
	B	—	—	—	1	1	—	2	
計		89	4	2	20	105	4		224

a) GPC, 卵選別包装施設

表2-2. 採卵鶏生産チェーンの上流部<sup>a)</sup>および下流部<sup>b)</sup>ならびにGPC<sup>c)</sup>から分離されたサルモネラの検体情報

菌株由来 施設の種別	施設数	分離株数	サルモネラが分離された検体の種別				
			卵殻 <sup>d)</sup>		環境		
			スワブ	塵埃	糞便	不明	
種鶏場	1	4	-	-	4	-	
孵化場	2	2	1	-	1	-	
育雛場	5	20	14	5	-	1	
採卵鶏農場	39	194	58	45	-	2	
GPC	2	4	4	-	-	-	
合計	49	224	77	50	5	3	

a) 上流部は種鶏場、孵化場および育雛場で構成される。

b) 下流部は採卵鶏農場で構成される。

c) GPC, 卵選別包装施設

d) 卵殻検体については、鶏卵が由来する採卵鶏農場を由来施設とした。

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub> carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS<sub>Ecp1</sub> or IS<sub>26</sub> in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345-1355. を引用し一部改変)



表2-3. サルモネラ分離菌株の由来施設数に関する情報

県名	種鶏場	孵化場	育雛場	採卵鶏農場 <sup>a)</sup>	GPC <sup>b)</sup>
A	—	—	3	6	1
B	1	1	1	14	—
C	—	1	1	10	—
D	—	—	—	4	—
E	—	—	—	2	—
F	—	—	—	2	1
G	—	—	—	1	—
施設数計	1	2	5	39	2

<sup>a)</sup> 卵殻の由来施設は採卵鶏農場として計上した。

<sup>b)</sup> GPC, 卵選別包装施設

表2-4. *bla*遺伝子のPCRによる検出およびシーケンスに使用したプライマー

<i>bla</i> 遺伝子	目的	プライマー名	ヌクレオチド配列 5'-3'	引用文献
<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	PCR, シーケンス	cmy-F	GACAGCCTCTTTCTCCACA	(137)
		cmy-R	TGGAACGAAGGCTACGTA	(137)
	シーケンス	CMY2-outF	GTTACAATGTGTGAGAAGCAGTC	(77)
		CMY2-outR	ATGGGATTTTCCTTGCTGTA	(77)
		CMY2-R0	CAGTATTTCTGTGACCGGA	(77)
		CMY2-F3	CTGGATTACGGTTCCGCA	(77)
	PCR, シーケンス	CTX-MU1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	(85)
CTX-MU2		TGGGTRAARTARGTSACCAGA	(85)	
シーケンス	CTXM14 upstream F1	AGCAGTCTAAATTCTTCGTG	本研究	
	CTXM14 upstream R3	GCTGGGCAATCAATTTGTTC	本研究	
	CTX-outF2	GCCAAGGGATAATACTAATAGAGG	(77)	
	CTX-outR	GCGGAATGATAGAAAGAGATGAG	(77)	
	CTX-M-14 F653	ACGTGGCTCAAAGGCAATAC	本研究	
	CTX-M-14 R1070	CGTGAAGAAGGTGTTGCTGA	本研究	
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	PCR	MAb/F	GGGGAGCTCATAAAAATTCTTGAAGAC	(90)
		MAb/R	GGGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA	(90)
シーケンス	TEM-1R ant	TGATTTGCTGGTTACGGTGA	本研究	
	TEM-1R upstream	GGTTAGCTCCTTCGGTCCCTC	本研究	
	TEM1F downstream	GGATGGAGGCGGATAAAGTT	本研究	
	TEM-1F Tn3 rec	ACGAAAGGGCCTCGTGATA	本研究	
	TEM-1 seq OutF	ATGGTTTCTTAGACGTCAGG	本研究	
	TEM-1 seq OutR	CATAAAACAAAGCGTCTTGAAC	本研究	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	PCR	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTTTG	(19)
		SHV-R	ATTTGCTGATTTGCTCG	(19)

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by *ISEcp1* or *IS26* in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355. を引用し一部改変)

表 2-5. 本研究で分離された *bla* 遺伝子を保有するサルモネラの疫学情報

血清型	<i>bla</i> 遺伝子	検体採取地	施設種別	施設名 <sup>a)</sup>	企業名	検体の由来	分離年月	菌株名
Ohio <sup>b)</sup>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	A県	採卵鶏農場 <sup>c)</sup>	a5	企業A	卵殻	2012年1月	SEOhIM1960 <sup>d)</sup>
			育雛場	不明 A <sup>e)</sup>	企業A	スワブ	2009年7月	SEOhIM1505
			育雛場	a7	企業A	スワブ	2009年11月	SEOhIM1579
			育雛場	a1	企業A	スワブ	2010年1月	SEOhIM1593 <sup>d)</sup>
							2010年5月	SEOhIM1615
							2010年10月	SEOhIM1668-2
							2010年11月	SEOhIM1782
							2011年4月	SEOhIM1798
							2011年5月	SEOhIM1802
							2011年7月	SEOhIM1822
				2012年3月	SEOhIM1984			
				2012年6月	SEOhIM2008 <sup>d)</sup>			
Untypeable with O7:b:-	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	A県	育雛場	a1	企業A	スワブ	2012年2月	SEOhIM1977
Braenderup	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	B県	採卵鶏農場	不明 B <sup>f)</sup>	企業B	スワブ	2011年10月	SEBraM1898
Cerro	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	C県	採卵鶏農場 <sup>c)</sup>	q1	企業Q	卵殻	2012年8月	SECerM2017 <sup>d)</sup>

a) それぞれの施設は企業 A, B または Q に属する。

b) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Ohio

c) 卵殻の施設種別は、鶏卵が由来する採卵鶏農場として示した。

d) 全ゲノムシーケンスを実施

e) 不明 A は企業 A の a1, a6 または a7 のいずれかの施設

f) 不明 B は企業 B の12施設のいずれかの施設

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by *ISEcp1* or *IS26* in layer breeding chains in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 85, 1345–1355. を引用し一部改変)

表2-6. *Salmonella enterica* から検出した *bla*<sub>CMV-2</sub> 保持 *IncA/C<sub>2</sub>* 型プラスミドと腸内細菌科細菌由来の *IncA/C<sub>2</sub>* 型プラスミドの比較<sup>a)</sup>

プラスミド名	<i>bla</i> <sub>CMV-2</sub>		IS26の数	<i>bla</i> 遺伝子近傍のIS <i>EcpI</i> の数 <sup>b)</sup>	サイズ (bp)	分離年	国	分離元	アクセッション番号	細菌種	引用文献
	共通の薬剤耐性遺伝子	他の薬剤耐性遺伝子									
pSEOhiM1593a	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	ND <sup>c)</sup>	3	1	92,251	2010	日本	育雛場スラブ	AF024348	<i>Salmonella enterica</i> serovar Ohio	本研究
pSEOhiM1960a	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	ND	3	1	92,095	2012	日本	卵殻	AF024350	<i>Salmonella enterica</i> serovar Ohio	本研究
pCVN21550	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	ND	3	1	120,340	不明	アメリカ合衆国	ブタ	CP009564	<i>Salmonella enterica</i> serovar Newport	(5)
p2016K-0796	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>aph(3'')-Ia</i> , <i>sulI</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(O)</i>	5	1	179,850	不明 (2015–2017)	アメリカ合衆国	ヒト	MH760469	<i>Salmonella enterica</i> serovar Heidelberg	(116)
pAR060302	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>aac(3)-I/IIa</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>sulI</i>	3	1	166,530	2002	アメリカ合衆国	ウシ	HQ023864	<i>Escherichia coli</i>	(25)
pYDC637	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>aadA5</i> , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ia</i> , <i>dfrA17</i> , <i>rmfE</i> , <i>sulI</i>	3	1	199,469	2013	アメリカ合衆国	ヒト	KF056256	<i>Escherichia coli</i>	(57)
pKF-Gr642	Not detected but <i>bla</i> <sub>CMV-4</sub>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	2	1	162,787	2011	ギリシャ	ヒト	KI659888	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(86)
p205880-C1/2	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>aac(6)-I</i> , <i>sulI</i>	3	1	153,373	2012	中国	ヒト	MF344573	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(10)
pSN254b	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	<i>aadA7</i> , <i>sulI</i>	2	1	152,216	不明	カナダ	不明	KJ909290	<i>Aeromonas salmonicida</i>	(124)

<sup>a)</sup> BLASTN で pSEOhiM1593a の塩基配列に対して 99%以上の query coverage を持つプラスミド

<sup>b)</sup> *bla* 遺伝子の 上流および下流 5,000 bp 以内の IS*EcpI* の数

<sup>c)</sup> ND, 検出せず

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMV-2</sub>-carrying *IncA/C<sub>2</sub>* plasmid chromosomally integrated by IS*EcpI* or IS26 in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355. を引用し一部改変)

表2-7. 卵殻および採卵鶏生産環境から分離されたサルモネラの血清型

O群	血清型	分離株数
O:4 (B)	Agona <sup>a)</sup>	9
	Typhimurium	3
O:7 (C <sub>1</sub> )	Braenderup <sup>b)</sup>	36
	Infantis	22
	Ohio <sup>b)</sup>	22
	Mbandaka	10
	Thompson	8
	Montevideo	6
	Livingston	4
	Singapore	4
	Othmarschen	3
	Bareilly	2
	Tennessee	2
	Untypeable with O7: b: - <sup>b)</sup>	1
O:8 (C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> )	Corvallis	15
	Newport	5
	Kentucky	4
	Manhattan	2
O:9 (D <sub>1</sub> )	Enteritidis	5
O:3,10 (E <sub>1</sub> )	Orion	3
O:13 (G)	Untypeable with O13: y: -	2
O:18 (K)	Cerro <sup>c)</sup>	20
O:35 (O)	Alachua	21
O:40 (R)	Johannesburg	3
	その他 <sup>d)</sup>	12
	合計	224

<sup>a)</sup> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona

<sup>b)</sup> AmpC  $\beta$ -lactamase 産生株を含む。

<sup>c)</sup> Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase産生株を含む。

<sup>d)</sup> Chincol, Gaminara, Havana, Idikan, Oranienburg, Potsdam, Putten, Rissen, Schwarzengrund, Senftenberg, Virchow, and O16: l, v: - を含む。

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS *Ecp1* or IS *26* in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355.を引用し一部改変)

表2-8. サルモネラ分離株の薬剤耐性パターンと *bla* 遺伝子の検出

血清型	薬剤耐性パターン <sup>a)</sup>	<i>bla</i> 遺伝子	形質確認 試験	検体由来別の分離株数						分離株数
				卵殻	環境					
					GPC <sup>b)</sup>	採卵鶏 農場	育雛場	孵化場	種鶏場	
Braenderup (n = 36)	ABPC-CPDX	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	AmpC <sup>c)</sup>	—	—	1	—	—	—	1
	SM	—	—	1	—	—	—	—	—	1
	耐性なし	—	—	23	3	8	—	—	—	34
Ohio (n=22)	ABPC-CPDX-CP-SM-TC	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	AmpC	—	—	1	11	—	—	12
	SM-CP-TC	—	—	—	—	1	—	—	—	1
	耐性なし	—	—	—	—	9	—	—	—	9
O7: b: - (n=1)	ABPC-CPDX-CP-SM-TC	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	AmpC	—	—	—	1	—	—	1
Cerro (n=20)	ABPC-CPDX	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	ESBL <sup>d)</sup>	1	—	—	—	—	—	1
	SM	—	—	3	—	—	—	—	—	3
	耐性なし	—	—	6	—	7	—	1	2	16
Infantis (n=22)	ABPC-KM-NA-SM-TC	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	NP <sup>e)</sup>	—	—	—	—	1	—	1
	SM-CP	—	—	1	—	—	—	—	—	1
	SM	—	—	1	—	—	—	—	—	1
	耐性なし	—	—	14	—	5	—	—	—	19
Kentucky (n=4)	ABPC-CPFX-NA-SM-TC	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	NP	—	—	2	—	—	—	2
	ABPC-CPFX-NA	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	NP	—	—	2	—	—	—	2
Agona (n=9)	TC	—	—	—	—	6	—	—	—	6
	耐性なし	—	—	—	—	3	—	—	—	3
Alachua (n=21)	SM	—	—	—	—	1	1	—	—	2
	耐性なし	—	—	5	—	14	—	—	—	19
Livingstone (n=4)	SM-CP	—	—	—	—	1	—	—	—	1
	耐性なし	—	—	1	—	2	—	—	—	3
Manhattan (n=2)	SM-TC	—	—	—	—	1	1	—	—	2
Schwarzengrund (n=1)	SM-NA-TC	—	—	1	—	—	—	—	—	1
Tennessee (n=2)	SM	—	—	—	—	1	—	—	—	1
	耐性なし	—	—	1	—	—	—	—	—	1
その他 (n=80)	耐性なし	—	—	30	1	41	6	—	2	80

<sup>a)</sup> ABPC, ampicillin; CP, chloramphenicol; CPFX, ciprofloxacin; CPDX, cefpodoxime; KM, kanamycin; NA, nalidixic acid; SM, streptomycin; TC, tetracycline

<sup>b)</sup> GPC, 卵選別包装施設

<sup>c)</sup> AmpC, AmpC  $\beta$ -lactamase

<sup>d)</sup> ESBL, Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase

<sup>e)</sup> ESBL および AmpC  $\beta$ -lactamaseのいずれも産生なし。

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS*Ecp1* or IS*26* in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355.を引用し一部改変)

表2-9. 国内の採卵鶏生産チェーンおよび液卵加工チェーンから分離されたサルモネラの薬剤耐性率<sup>a)</sup>

抗菌薬	224株中の 薬剤耐性株の数	耐性率 <sup>b)</sup> (%)
Streptomycin	30	13.4
Tetracycline	26	11.6
Ampicillin	20	8.9
Chloramphenicol	16	7.1
Cefpodoxime	15	6.7
Nalidixic acid	6	2.7
Ciprofloxacin	4	1.8
Kanamycin	1	0.4
Azithromycin	0	0
Meropenem	0	0

<sup>a)</sup> 224株のサルモネラのうち、40株が少なくとも1種類の抗菌薬に耐性を示した。

<sup>b)</sup> 各抗菌薬の耐性率は、本研究で分離された224株中の耐性株の割合として算出した。

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS*Ecp1* or IS*26* in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355.を引用し一部改変)

表2-10. Etest を用いた *Salmonella enterica* のMIC<sup>a)</sup> の決定

菌株名	血清型	<i>bla</i> 遺伝子の存在場所	<i>bla</i> genes	各抗菌薬 <sup>b)</sup> のMIC (μg/ml)					
				CTR	CAZ	CTX	CPDX	ABPC / SBT	ABPC
SEOhim1593	S. Ohio <sup>c)</sup>	プラスミド	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	96	48	>32	>256	24	>256
SEOhim1960	S. Ohio	染色体およびプラスミド	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	96	48	>32	>256	48	>256
SEOhim2008	S. Ohio	染色体	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	16	12	12	>256	16	>256
SECerM2017	S. Cerro	染色体	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	16	1	12	64	6	>256

a) MIC, 最小発育濃度

b) ABPC, ampicillin; ABPC / SBT, ampicillin-sulbactam; CAZ, ceftazidime; CPDX, cefpodoxime; CTRX, ceftriaxone; CTX, cefotaxime

c) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Ohio

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Eroh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS*Ecp1* or IS26 in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355. を引用し一部改変)



表2-11. 全ゲノムシーケンスによる *bla*<sub>CMV-2</sub> あるいは *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 保有 *Salmonella enterica* の染色体およびプラスミド解析

菌株名	血清型	DNAタイプ	プラスミド名	<i>bla</i> 遺伝子	その他の薬剤耐性遺伝子	IS <sub>26</sub> の数	<i>bla</i> 遺伝子近傍の IS <sub>EcpI</sub> の数 <sup>a)</sup>	レプリコンタイプ	サイズ (bp)	菌株の由来			
										施設種別	検体種別	施設名	分離年月
SEOhiM1593	<i>S.</i> Ohio <sup>b)</sup>	染色体	-	ND <sup>c)</sup>	<i>aac(6)-Iaa</i>	0	0	-	4,867,732	首羅場	スラブ	a1	2010年1月
		プラスミド	pSEOhiM1593a	<i>bla</i> <sub>CMV-2</sub>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	3	1	IncA/C <sub>2</sub>	92,251				
SEOhiM2008	<i>S.</i> Ohio	染色体	-	<i>bla</i> <sub>CMV-2</sub>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	4	1	IncA/C <sub>2</sub> <sup>d)</sup>	4,902,159	首羅場	スラブ	a1	2012年6月
		プラスミド	pSEOhiM2008a	ND	ND	0	0	ColH401	2,264				
SEOhiM1960	<i>S.</i> Ohio	染色体	-	<i>bla</i> <sub>CMV-2</sub>	<i>aac(6)-Iaa</i>	0	1	-	4,872,199	採卵鶏農場	卵殻	a5	2012年1月
		プラスミド	pSEOhiM1960a	<i>bla</i> <sub>CMV-2</sub>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>	3	1	IncA/C <sub>2</sub>	92,095				
		プラスミド	pSEOhiM1960b	ND	ND	0	0	ColH401	2,264				
SECerM2017	<i>S.</i> Cerro	染色体	-	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	ND	0	1	-	4,479,959	採卵鶏農場	卵殻	q1	2012年8月
		プラスミド	pSECerM2017a	ND	ND	0	0	Untypeable	2,105				

<sup>a)</sup> *bla* 遺伝子の upstream 5,000 bp 以内の IS<sub>EcpI</sub> の数

<sup>b)</sup> *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Ohio

<sup>c)</sup> ND, 検出せず

<sup>d)</sup> SEOhiM2008株の組み込み領域は、SEOhiM1593株やSEOhiM1960株が保有するIncA/C<sub>2</sub>型プラスミドとほぼ同じ構造が認められた。

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y., Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMV-2</sub> carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by IS<sub>EcpI</sub> or IS<sub>26</sub> in layer breeding chains in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 85, 1345–1355. を引用し一部改変)

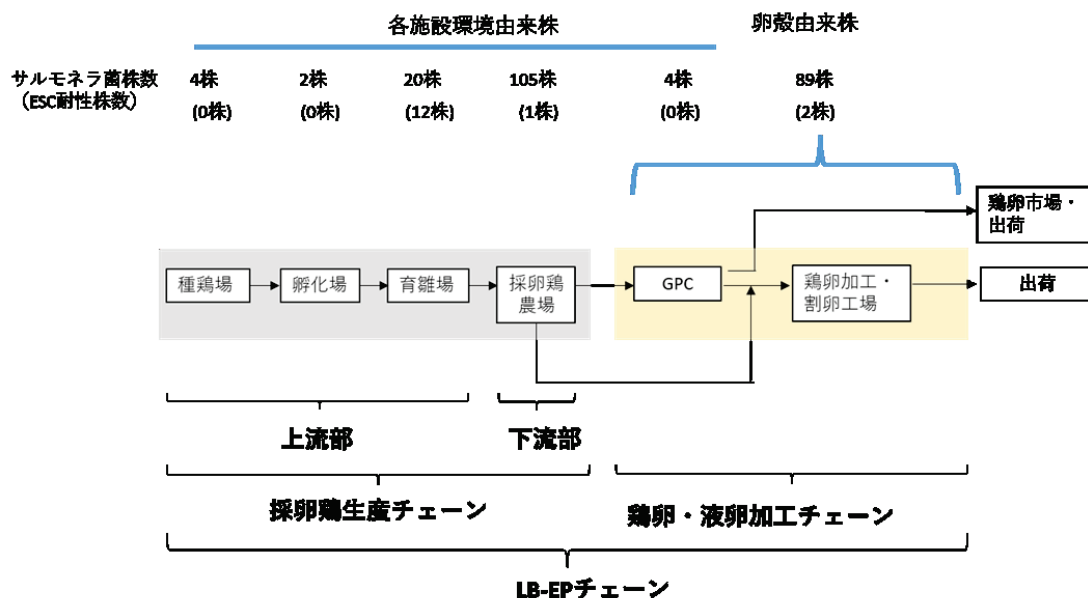


図 2-1. 採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン

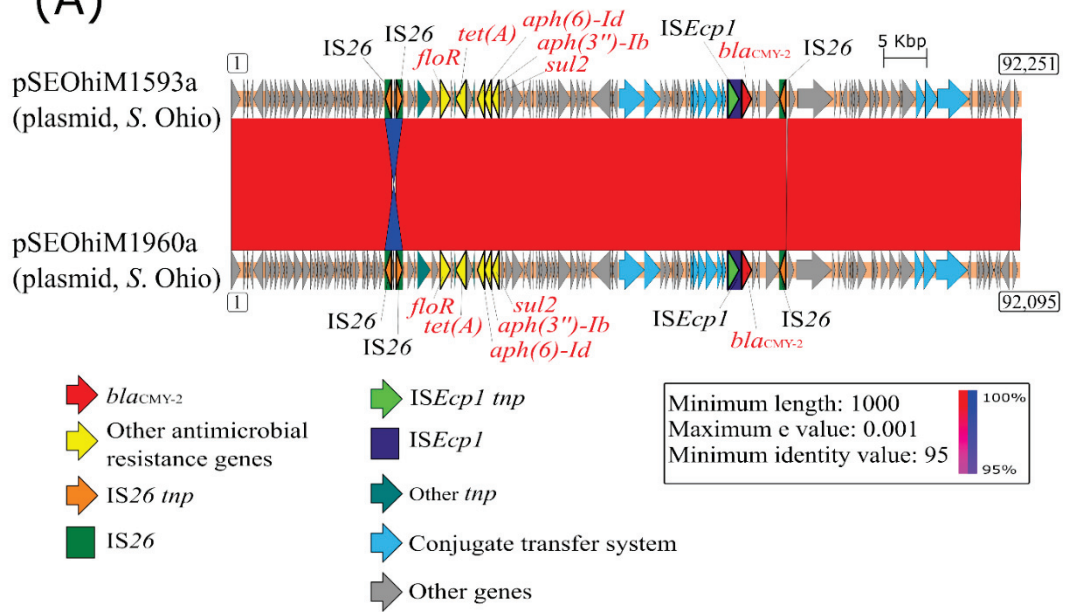
採卵鶏生産チェーンは、種鶏場、孵化場、育雛場、採卵鶏農場から構成される。また、鶏卵・液卵加工チェーンは GPC および鶏卵の割卵や液卵加工場を含む。GPC により、液卵加工を実施する施設もある。また、各施設環境および卵殻に由来するサルモネラ分離株数と ESC 耐性株数を示した。卵殻は由来採卵鶏農場の情報は得られたが卵殻が収集された施設の情報は得られなかった。

ESC, 広域スペクトラムセファロスポリン

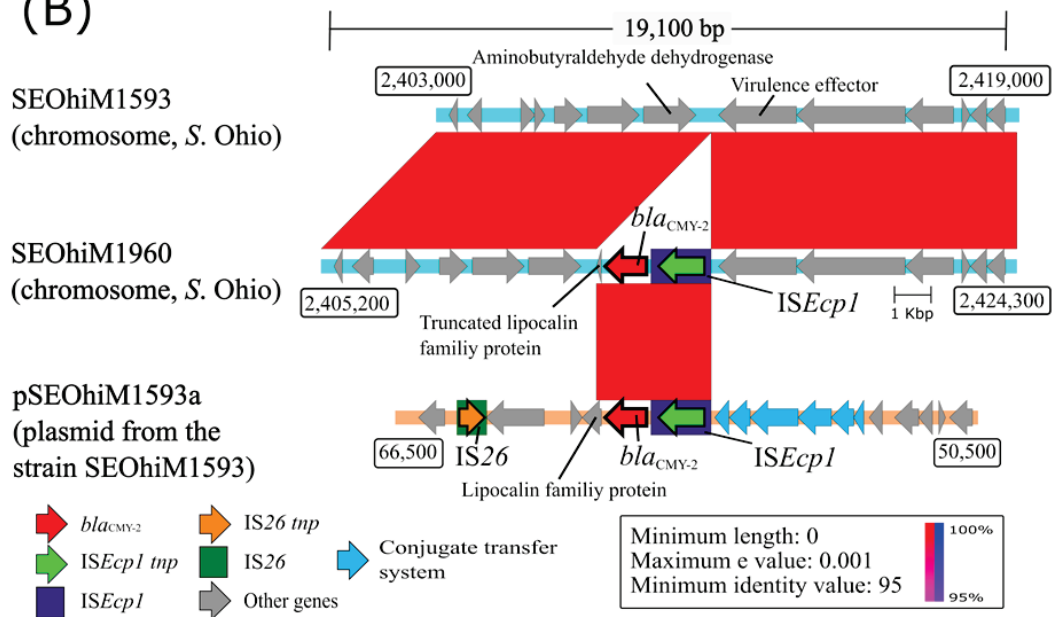
GPC, 卵選別包装施設

LB-EP チェーン, 採卵鶏生産および鶏卵・液卵加工チェーン

(A)



(B)



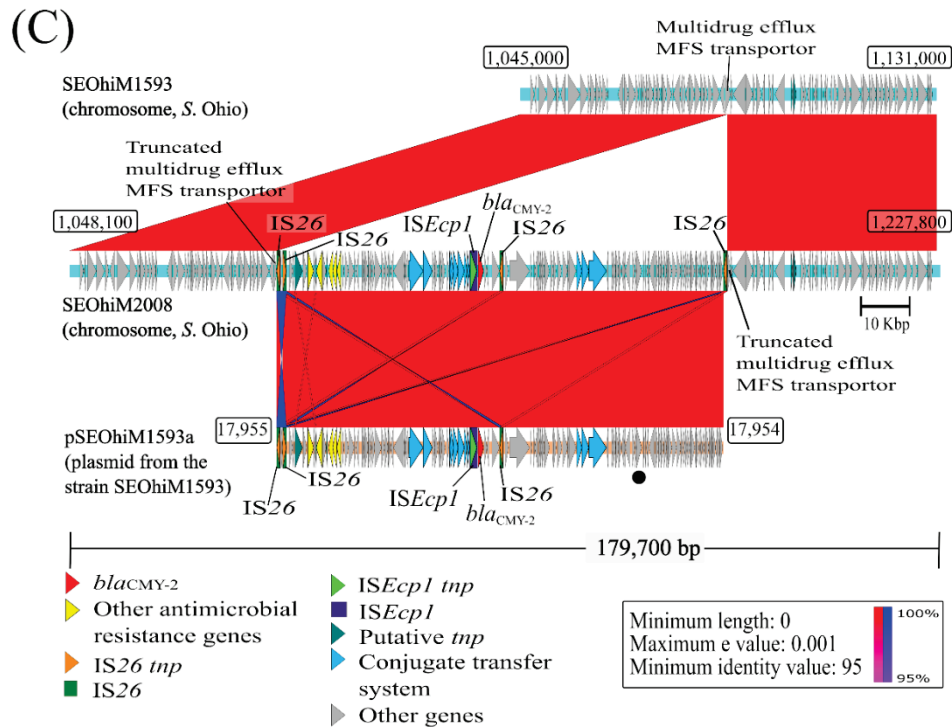


図 2-2. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Ohio の比較ゲノム構造解析

各図の四角で囲まれた数字はスクレオチドの位置を示した。

(A) pSEOhiM1593a プラスミドおよび pSEOhiM1960a プラスミドの構造比較。pSEOhiM1593a プラスミドおよび pSEOhiM1960a プラスミドは高い類似性を示した。また、これらプラスミドは、異なる年に、同一企業の採卵鶏生産チェーンに由来する *S. Ohio* から見つかった。これらのプラスミドには、6つの薬剤耐性遺伝子(赤字)と1つの *ISEcp1*、3つの *IS26* が存在している。

(B) 染色体上に *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有する SEOhiM1960 株の染色体構造の比較。*bla*<sub>CMY-2</sub> および *ISEcp1* が存在する染色体領域は、pSEOhiM1593a プラスミドの一部領域と完全に一致した。

(C) 染色体上に複数の薬剤耐性遺伝子を保有する SEOhiM2008 株の染色体と pSEOhiM1593a プラスミドの構造比較。pSEOhiM1593a プラスミドは環状構造をとっているため、比較しやすいようにスクレオチド位置 17,955 番目を開始位置とするように描画した。黒丸は、スクレオチド位置 1 番目を示している。SEOhiM2008 株の染色体上には、2つの *IS26* に挟まれた領域が反転している以外は pSEOhiM1593a プラスミドと同一である領域が見つかった。pSEOhiM1593a プラスミドに類似した領域の両端には *IS26* が存在した。

IS, 挿入配列

*tnp*, トランスポゼース遺伝子

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by *ISEcp1* or *IS26* in layer breeding chains in Japan. J. Vet. Med. Sci. 85, 1345–1355.を引用し一部改変)

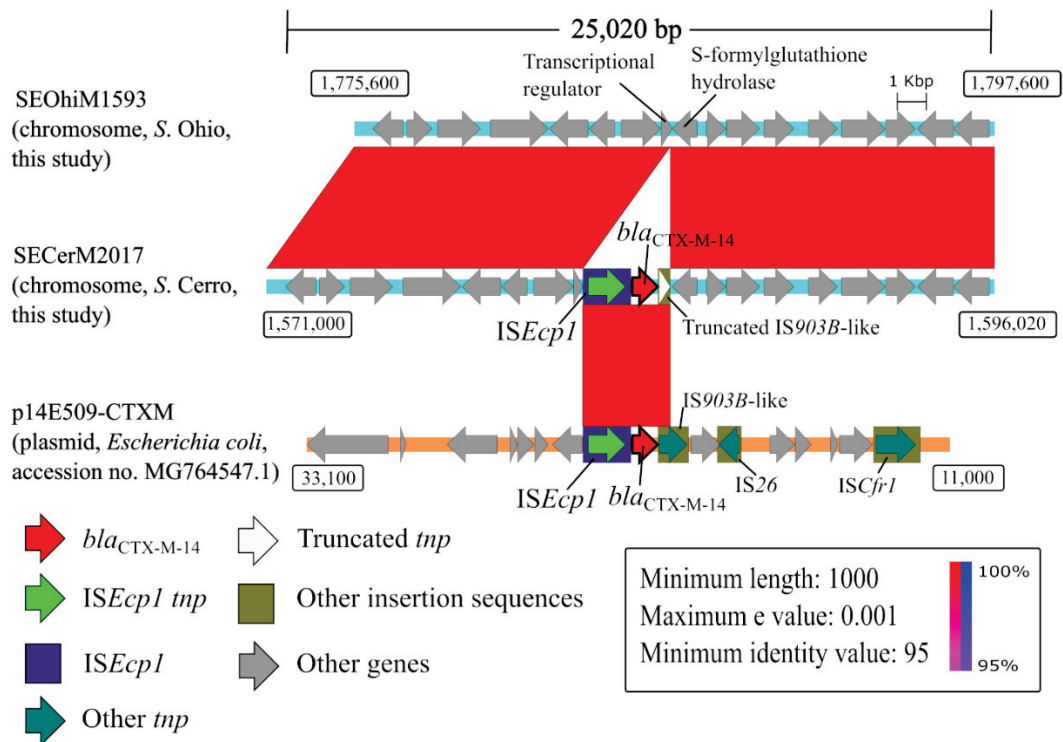


図 2-3. 染色体上に *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有する *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Cerro SECerM2017 株の染色体と *S. Ohio* SEOhim1593 株の染色体の構造比較

染色体上の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> と *ISEcp1* が存在する領域は、ヒト由来 *Escherichia coli* の p14E509-CTXM プラスミド上の *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 存在領域 (GenBank Accession no. MG764547.1) と同一だった。長方形で囲まれる数字はヌクレオチドの位置を示している。

### IS, 挿入配列

*tnp*, トランスポゼース遺伝子

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying IncA/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by *ISEcp1* or *IS26* in layer breeding chains in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 85, 1345–1355.を引用し一部改変)

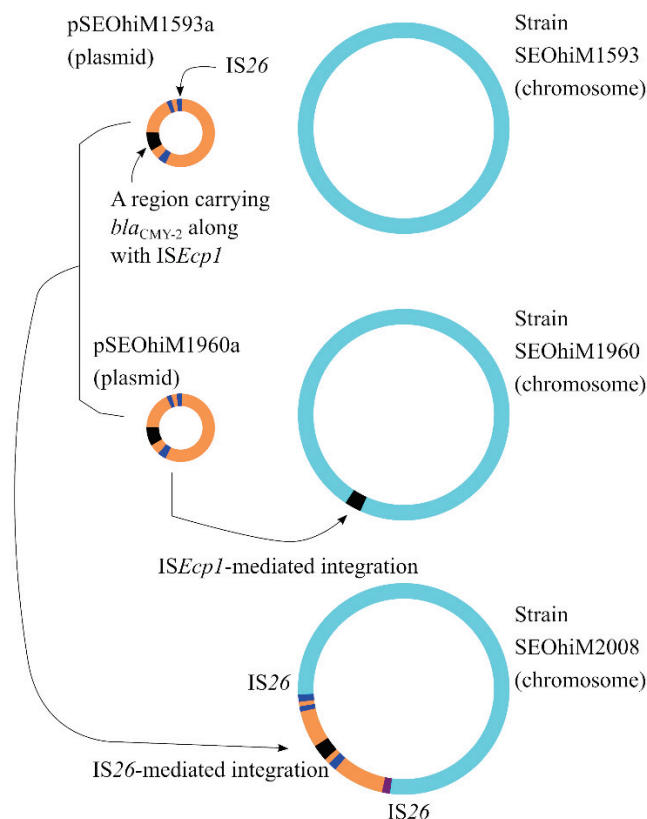


図 2-4. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Ohio 間での pSEOhiM1593a 類似プラスミドの水平伝播と、*ISEcp1* または *IS26* を介したプラスミドの染色体への組込み

pSEOhiM1593a または類似プラスミドは、同一企業に属する採卵鶏生産チェーンにおいて、上流部（育雛場）から下流部（採卵鶏農場）へと水平伝播した。また、*S. Ohio* はプラスミドの一部構造あるいは全体構造を、それぞれ *ISEcp1* または *IS26* によって染色体に組み込んでいる。

#### IS, 挿入配列

(Shigemura, H., Maeda, T., Nakayama, S., Ohishi, A., Carle, Y., Ookuma, E., Etoh, Y., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sera, N., Inoshima, Y. Murakami, K., 2021. Transmission of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* harboring a *bla*<sub>CMY-2</sub>-carrying Inca/C<sub>2</sub> plasmid chromosomally integrated by *ISEcp1* or *IS26* in layer breeding chains in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 85, 1345–1355.を引用し一部改変)

### 第三章

#### 食品従事者における ESC 耐性サルモネラの保菌状況調査および 全ゲノム解析による *bla* 遺伝子の拡散に關与する因子の解析

本章は American Society for Microbiology の許可を得て、次の論文から一部転載しています。

タイトル：Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan.

著者：Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K.

雑誌：Applied and Environmental Microbiology

出版年・巻号・頁：2020・86(13)・e00072-20

DOI：10.1128/AEM.00072-20.

## 序論

第一章で福岡県の市販鶏肉における ESC 耐性サルモネラの汚染実態を明らかにした。また、第二章で日本国内の LB-EP チェーンにおける ESC 耐性サルモネラの汚染実態を明らかにした。しかし、ヒトにおける ESC 耐性サルモネラの保菌状況は不明である。

飲食店の調理従事者・給仕者や食品工場の製造者等の食品従事者がサルモネラを保菌していた場合、衛生管理が十分でないと、食品を介してサルモネラをヒトへ伝播させるリスクがある (32, 68, 82)。また、これまでに世界中で ESC 耐性サルモネラがヒトから分離されている (31, 109, 118, 128, 132)。食品従事者は、サルモネラの潜在的な感染源となるため (68, 82)、食品従事者のサルモネラ保菌状況を明らかにするとともに、食品従事者から分離されるサルモネラの ESC 耐性を把握することが望まれる。しかし、近年、先進国における食品従事者のサルモネラ保菌状況を示す報告はほとんどない。比較的新しい報告でも、すでに 20 年以上経過しており、1999 年から 2000 年に実施された九州地方の食品従事者のサルモネラ保菌率が 0.03% (106 / 331,644 検体) であった (71) ことが示されているが、近年の状況を反映していない可能性がある。また、Saito ら (96) が国内の食品従事者から分離されたサルモネラが ESC 耐性株であったことを報告しているものの、食品従事者から分離された ESC 耐性サルモネラの詳細なゲノム解析は実施されていない。したがって、日本国内における現在の食品従事者を対象としたサルモネラ保菌状況調査を行うとともに、食品従事者から分離される ESC 耐性サルモネラについて WGS による詳細なゲノム解析を行う必



要がある。

本章では、現在の食品従事者のサルモネラの保菌率を明らかにするため、2017年に実施された国内47都道府県における食品従事者のサルモネラ保菌調査のデータを用いて、日本国内を8地方に分け、食品従事者のサルモネラ保菌率を算出した。また、食品従事者のESC耐性サルモネラ保有状況を明らかにするため、食品従事者から分離されたサルモネラの薬剤感受性試験を行い、ESC耐性を確認した。さらに、サルモネラのESC耐性に関与するプラスミドやIS等を明らかにするため、ESC耐性サルモネラの全ゲノム配列を決定し、第二章と同様にプラスミドおよび染色体の特徴を調べるとともに比較ゲノム構造解析を行った。

## 材料および方法

### 1. 使用菌株，検体情報，分離方法

#### (1) 使用菌株

2017年に民間の検査機関1施設で実施された国内47都道府県における飲食店の調理従事者・給仕者や食品工場の製造者等の食品従事者のサルモネラ保菌検査で分離されたサルモネラ164株を受理し、158株を本研究に使用した。164株のうち6株については菌株を保存していたカジトン培地から蘇生できなかった。

#### (2) 菌株が分離された検体の情報

菌株は、47都道府県の食品従事者から採取された糞便、計145,220検体から分離された。地域別検体数の内訳は北海道1,619検体、東北8,045検体、関東69,488検体、中部23,057検体、関西25,989検体、中国5,612検体、四国3,391検体、九州（沖縄含む）8,019検体であった（図3-1）。これらの検体は、2017年1月から10月にかけて約48,400人から提供されたものであり、提供者のほぼ全員から収集期間中に3回検体が提供された。ただし、検体提供時にサルモネラが分離された食品従事者からは、以後、検体は提供されなかった。検体を提供した食品従事者の年齢は18歳から65歳で、飲食店の調理者、給仕者および食品工場の従業員が含まれていた。また、いずれの検体提供者からもサルモネラ症を示す申告はなかった。検体を提供した正確な人数および検体採取に関与した施設数については、情報を得ることができなかった。また、個人を認識、識別できる情報は得ていない。

### (3) サルモネラの分離方法

上記の使用菌株は、民間の検査機関で下記の方法により分離された。

供試検体からサルモネラを探索するため、腸管系病原細菌遺伝子検出キット（RR177A，タカラバイオ）を用い、付属のマニュアルにしたがって、プール DNA 抽出液からサルモネラ特異的遺伝子 *invA* を標的とした PCR を行った。糞便由来 DNA 抽出液を 50 検体分混合して得られたものをプール DNA 抽出液とした。各検体の DNA 抽出液は以下のように得た。検体 0.5 g を 1 ml の滅菌蒸留水に懸濁し、95°C で 10 分間加熱した。その後、加熱した懸濁液を 21,500×g で 5 分間遠心分離し、得られた上清を DNA 抽出液とした。PCR で *invA* が陽性となった場合は、プール DNA 抽出液を構成した 50 検体をそれぞれ、改良サルモネラ-シゲラ寒天培地（E-MA56，栄研化学）に接種し、37°C で 24 時間培養した。改良サルモネラ-シゲラ寒天培地に発育したサルモネラを疑うコロニーは、第一章と同様に生化学性状試験によるサルモネラの同定を行った。血清型別については、未実施であった。

## 2. 血清型別

民間の検査機関で分離されたサルモネラ 158 株を用い、Kauffman-White の抗原構造に基づく分類に従って、血清型別を実施した。血清型別は O 抗原および H 抗原用抗血清（デンカ生研）を用いて第一章と同様に実施した。

### 3. 薬剤感受性試験, *bla* 遺伝子の探索および *bla* 遺伝子の型別

薬剤感受性試験は, 第一章と同様に, ディスク拡散法を用いて実施した。試験には, CTX (30  $\mu$  g/disk), CAZ (30  $\mu$  g/disk), CPDX (10  $\mu$  g/disk), CFIX (5  $\mu$  g/disk), CFX (30  $\mu$  g/disk), TC (30  $\mu$  g/disk), SM (10  $\mu$  g/disk), KM (30  $\mu$  g/disk), NA (30  $\mu$  g/disk), ノルフロキサシン (NFLX, 10  $\mu$  g/disk, 291022), MEPM (10  $\mu$  g/disk), コリスチン (CL, 296644, 10  $\mu$  g/disk) の 12 種類の抗菌薬ディスク (いずれも Becton Dickinson and Co.) を用いた。ブレイクポイントは CLSI (15) に基づき設定した。ESBL 産生および AmpC  $\beta$ -lactamase 産生確認試験は, 第一章と同様に行った。

ESC に耐性を示した菌株について, 第一章と同様に, *bla* 遺伝子の探索を PCR により行った。検出された *bla* 遺伝子の塩基配列を, 第一章と同様に決定した。ただし, プライマーは表 3-1 を使用した。また, 得られた DNA 配列を, NCBI の nucleotide データベース (74) に登録されている参照配列と比較し, *bla* 遺伝子型を決定した。

### 4. WGS による *bla*<sub>CTX-M</sub> 保有 ESC 耐性株のゲノム解析

#### (1) 供試菌株

*bla*<sub>CTX-M</sub> を保有する菌株のうち, *S. Senftenberg* (SESen3709 株) および *S. Haardt* (SEHaa3795 株) の計 2 株について, WGS を行った。*bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する 3 株の *S. Haardt* うち, 1 株を無作為に選び, SEHaa3795 株を代表株とした。

#### (2) WGS 解析

WGSによる解析は、国立感染症研究所（東京）に依頼し、下記の方法で実施した。Sekizukaら（101）の方法に従い、菌株のゲノム DNA を得た。供試菌株を 5 ml の TSB に接種し、37°C で一晩培養後、遠心分離により得られた沈査を用い、DNA の抽出を行った。沈査を 500  $\mu$  l のフェノール・クロロホルムを添加した 500  $\mu$  l の TE 10（10 mM Tris pH 8.0 および 10 mM EDTA）に再懸濁し、続き、Vortex Adapter（13000-V1-24, Qiagen, Hilden, Germany）に装着した ZR BashingBead lysis tube（S6003-50, Zymo Research, Irvine, CA, USA）を使用し、10 分間ビーズ破碎（Vortex Genie 2, SI-0236, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA）により細胞を破碎させた。その後、9,560  $\times$  g で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を Qiagen DNA purification kit（28104, Qiagen）を用いて精製し、抽出ゲノム DNA を得た。

Short-read シーケンスのため、抽出 DNA を使用し、QIAseq FX DNA Library Kit（180475, Qiagen）を用いて、ライブラリーを調製した。ライブラリーの WGS は、300 サイクルの MiSeq Reagent Kits v2（Illumina）を用いて、Illumina MiSeq（Illumina）で行った。

また、long-read シーケンスのため、抽出 DNA を使用し、添付のマニュアルにしたがって、SMRTbell template prep kit 1.0（100-259-100, Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA）とバーコーディングアダプターを用いて SMRTbell ライブラリーを調製した。ライブラリーは PacBio Sequel シーケンサー（Pacific Biosciences）を用い、long-read sequence データを得た。

また、short-read sequence データおよび long-read sequence データを用い、Canu v.1.4（53）、minimap v.0.2-r124（60）、racon v.1.1.0（123）、

Circlator v.1.5.3 (39) により, De novo assembly を行った。配列のエラー修正は, Pilon v.1.18 (127) により行い, 染色体塩基配列とプラスミド塩基配列を得た。

## 5. 同一レプリコンタイプを示すプラスミドとの比較解析

*S. Senftenberg* (SESen3709 株) が保有する pSESen3709\_1 プラスミドと同一のレプリコンタイプを示すサルモネラ由来プラスミドの比較解析を実施した。比較には, レプリコンタイプが IncH1 型, IncHI1 型, IncH1/IncF 型と報告されている 7 個のプラスミドを使用した (GenBank accession nos. AF250878, AL513383, AM412236, KP899804, KP899805, KP899806, MG874042) (9, 38, 55, 87, 103) (表 3-2)。比較に使用したプラスミドは, BLASTN 検索および "IncHI1, plasmid, Salmonella" のキーワードで PubMed 検索を行って得られた。pSESen3709-1 プラスミドおよび比較に使用した全てのプラスミド塩基配列データについて, 第二章と同様に薬剤耐性遺伝子およびレプリコンタイプの同定を行った。

## 6. 比較ゲノム構造解析

### (1) 比較に使用したプラスミドおよび染色体

SESen3709 株から見つかった *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有する pSESen3709\_1 プラスミドの塩基配列の比較解析を実施した。比較には, *S. Typhimurium* から見つかった pSa4-CIP プラスミド (GenBank accession no. MG874042.1) (9) およびヒト由来 *E. coli* から見つかった p14E509-CTXM プラスミド (GenBank accession no. MG764547.1)

(133) の塩基配列を使用した。pSa4-CIP は、BLASTN 相同性解析において pSESen3709\_1 プラスミドと塩基配列の類似性が最も高かったため比較解析に使用した。また、p14E509-CTXM プラスミドについては、pSESen3709\_1 の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が存在する近傍領域の類似性が高かったため、比較解析に使用した。

さらに、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> 保有する SEHaa3795 株の染色体塩基配列と *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 保有しない SESen3709 株の染色体塩基配列を比較した。また、SEHaa3795 株の染色体上の *bla*<sub>CTX-M-15</sub> の近傍領域を *E. coli* 由来の pEC\_L46 プラスミド (GenBank accession no. GU371929.1) (110) と比較した。pEC\_L46 プラスミドは、BLASTN 相同性解析で SEHaa3795 株の染色体上の *bla*<sub>CTX-M-15</sub> の近傍領域と高い相同性を示したため、比較解析に使用した。

## (2) プラスミドおよび染色体の遺伝子情報の付与と構造比較

比較ゲノム構造解析に使用する染色体塩基配列およびプラスミド塩基配列の遺伝子情報の付与は、アノテーションパイプラインである Prokka(100)により行った。比較ゲノム構造解析は、BLASTN と Artemis Comparison Tool (7) を用いて行った。また、ゲノム上に示された IS の同定は ISfinder (108) を用いて行った。さらに、比較解析結果の可視化は Easyfig (114) により行った。

## 7. 倫理審査

本研究は、福岡県保健環境研究所倫理審査委員会の承認 (H30-4, R1-11) を得て実施した。

## 結果

### 1. ヒト糞便検体からのサルモネラ分離株の血清型と分離率

供試した 158 株について、血清型別を実施したところ、50 種類の血清型に分類された（表 3-3）。その中で最も多かった血清型は *S. Infantis*（12.7%、20 /158 株）で、次に *S. Schwarzengrund*（9.5%、15/158 株）であった。

また、提供された検体情報から分離率を算出したところ、全国では 0.11%（164/145,220 検体）、北海道 0%（0/1,619 検体）、東北地方 0.07%（6/8,045 検体）、関東地方 0.10%（69/69,488 検体）、中部地方 0.12%（27/23,057 検体）、関西地方 0.13%（34/25,989 検体）中国地方 0.23%（13/5,612 検体）、四国地方 0.09%（3/3,391 検体）、九州地方 0.15%（12/8,019 検体）であった（図 3-1）。

### 2. 薬剤感受性試験および *bla* 遺伝子型別

薬剤感受性試験の結果、158 株のサルモネラのうち 73 株（46.2%）が少なくとも 1 種類の抗菌薬に対して耐性を示し、85 株（53.8%）は感性であった。158 株のうち、6 株（3.8%）、6 株（3.8%）、7 株（4.4%）、7 株（4.4%）、3 株（1.9%）、62 株（39.2%）、52 株（32.9%）、30 株（19.0%）および 7 株（4.4%）が、それぞれ CTX、CAZ、CPDX、CFIX、CFX、TC、SM、KM、および NA に耐性を示した。NFLX、MEPM、および CL に耐性を示した株はなかった。158 株のうち、7 株が ESC 耐性株であり、4 株（2.5%）が ESBL 産生株で、3 株（1.9%）が AmpC  $\beta$ -lactamase 産生株だった。



ESBL 産生株のうち、*S. Senftenberg* 1 株は *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を保有し、*S. Haardt* 3 株は *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有していた。また、AmpC  $\beta$ -lactamase 産生株は *S. Agona* 1 株、*S. Infantis* 1 株、型別不明 (O4: -:-) 1 株であり、全て *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有していた。

### 3. WGS による薬剤耐性遺伝子、プラスミドのレプリコンタイプ、IS の同定

ESBL 産生 *S. Senftenberg* (SESen3709 株) は 2 つのプラスミドを保有していた (表 3-4)。2 つのプラスミドのレプリコンタイプは、それぞれ IncFIA(HI1)型、IncHI1A 型および IncHI1B(R27)型の融合型 (IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)型) および Col440II 型に分類された。この IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27) 型プラスミドを pSESen3709\_1 と名付けた。pSESen3709\_1 は *bla*<sub>CTX-M-14</sub> に加え *aac(3)-IId*, *floR*, *qnrS1*, *sul2*, *tet(A)* および *tet(M)* を保持していた。*bla*<sub>CTX-M-14</sub> は *ISEcp1* の下流に位置していた (図 3-2)。この *ISEcp1* は、ヌクレオチド位置 94,135 に点変異 (C→T) があることで、偽遺伝子となっていたが、この点変異を除けば *ISEcp1* と同じ塩基配列が見られた。これを  $\Delta$  *ISEcp1* と定義した。Col440II 型プラスミドについては、薬剤耐性遺伝子が確認されなかった。

*S. Haardt* (SEHaa3795 株) の染色体上では、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> および *ISEcp1* が存在する領域は、S-formylglutathione hydrolase および GTP cyclohydrolase I をコードする遺伝子 (ヌクレオチド位置 1,707,642~1,710,613) の間に位置していた (図 3-3)。また、*bla*<sub>CTX-M-15</sub> の上流には、*ISEcp1* が認められた (図 3-3)。また、SEHaa3795 株は Col440I 型プラ

スミドを保有していたが、このプラスミドから薬剤耐性遺伝子は検出されなかった（表 3-4）。

#### 4. *S. Senftenberg* 由来プラスミドと同一のレプリコンタイプを示す他の血清型由来プラスミドの比較

pSESen3709\_1 プラスミドのレプリコンタイプを、先行研究で検出された *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* および *S. Typhimurium* に由来するプラスミドのレプリコンタイプと比較した（表 3-2）。pSESen3709\_1 プラスミドおよび先行研究で検出されたプラスミドのレプリコンタイプは、いずれも IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)型に分類された。

#### 5. プラスミドおよび染色体の構造比較

pSESen3709\_1 プラスミドを pSa4-CIP プラスミドおよび p14E509-CTXM プラスミドと比較した（図 3-2）。pSESen3709\_1 プラスミドの塩基配列と pSa4-CIP プラスミドの塩基配列を比較すると、図 3-2A に示すように類似していた（coverage 90.6%）。また、pSESen3709\_1 プラスミドと pSa4-CIP プラスミドは同一のレプリコンタイプであった。しかし、pSESen3709\_1 プラスミドの *bla*<sub>CTX-M-14</sub> と  $\Delta$  *ISEcp1* が存在する領域（ヌクレオチド位置 93,526～98,137）は pSa4-CIP プラスミドでは認められなかった（図 3-2B）。その一方で、p14E509-CTXM プラスミドからは、その領域とヌクレオチド配列が 99%以上一致する領域（4,611/4,612 bp）が認められた。

*S. Haardt*（SEHaa3795 株）の染色体に存在する *bla*<sub>CTX-M-15</sub> および *ISEcp1* が存在する領域は、pEC\_L46 プラスミドにおいても認められ、

ヌクレオチド配列が完全に一致していた (2,972/2,972bp) (図 3-3)。

## 考察

本研究の結果より，食品従事者の少なくとも 0.113%（95% CI：0.096%～0.132%）がサルモネラを保菌していると考えられる。この結果に基づけば，国内の食品従事者 3,075,330 人（113）のうち，3,473 人（95% CI: 2,962-4,047）がサルモネラを保菌していると推定される。一般的にサルモネラはヒトに感染後 3～92 日間排出される（91, 121）。食品従事者がサルモネラを保菌していた場合，食品を介してサルモネラをヒトへ伝播させるおそれがあるため（32, 68, 82），食品従事者は，サルモネラの重要なレゼルボアであると考えられる。

また，本研究において，8 地方のうち，北海道を除く 7 地方で食品従事者からサルモネラが分離されており，全国的に一定の割合で食品従事者がサルモネラを保菌していると考えられる（図 3-1）。しかしながら，北海道の食品従事者検体からはサルモネラが分離されなかった。理由の 1 つとして，他の地方に比べて北海道の食品従事者のサルモネラ保菌率が低く，収集検体（1,619 検体）からはサルモネラが分離されなかった可能性が考えられる。

本研究により，日本国内の食品従事者のサルモネラ保菌率は 0.11%（164 /145,220 検体）であることが明らかとなった。先進国における食品従事者のサルモネラ保菌率を示す報告がほとんどないため，比較ができなかったが，日本国内の食品従事者のサルモネラ保菌率は，発展途上国における保菌率に比べ低い結果であった。例えば，パキスタンの調理等に従事する食品従事者の 4.3%から（9/209 名）チフス性サルモネラが分離され，また，4.8%から非チフス性サルモネラ（10/209 名）

が分離された (105)。さらに、2018 年に実施したエチオピアにおける調査では、調理等に従事する食品従事者の 2.1% (5/236 名) から *Salmonella* spp. が分離された (3)。日本と発展途上国における食品従事者のサルモネラ保有率の違いは、調査対象とした集団および調査方法、食習慣、および衛生水準の違い等、様々な要因が関係している可能性が考えられる。

本研究の結果は、2001 年に実施された日本国内の先行研究における食品従事者のサルモネラ保菌率 (0.032%, 106/331,644 検体) と一致しなかった (71) が、この理由はおそらく、それぞれの研究におけるサルモネラの検出方法や対象集団等の条件が異なっていたためと考えられる (表 3-5)。同程度の年齢と性別の食品従事者と非食品従事者との間で、同じ検出方法を用いて、サルモネラの保菌率を比較する調査を継続的に実施できれば、より正確に保菌率の比較や保菌率の変化の把握ができると考える。

本研究では、食品従事者から *bla*<sub>CMY-2</sub> や *bla*<sub>CTX-M</sub> を保有する ESC 耐性サルモネラが確認されており、食品従事者は、ESC 耐性サルモネラの拡散に関与している可能性があると考えられる。また、腸内細菌科細菌の間では、プラスミドの水平伝播により *bla* 遺伝子が伝播するため (17, 95, 130)、食品従事者は、腸管内でサルモネラから *bla* 遺伝子を獲得した他の ESC 耐性細菌の拡散にも関与している可能性がある。本研究において、食品従事者から分離されたサルモネラの主要な血清型は *S. Infantis* および *S. Schwarzengrund* であった。これらの血清型は鶏肉から分離されることが多いことから (45, 77)、鶏肉の取扱いに注意し、感染を防ぐことが重要である。食品従事者は、非食品従事者と比較して、

ESBL 産生サルモネラのような ESC 耐性サルモネラに汚染されている鶏肉 (45, 77) を取り扱う可能性が高いため、ESC 耐性サルモネラに感染する可能性も高く、それらのレゼルポアとなるおそれがある。特に、小児は成人に比べてサルモネラ症の罹患率が高く (8)、治療に ESC を使用するため、小児へ食事を提供する施設である保育園や幼稚園、小学校で働く食品従事者は ESC 耐性株を含めたサルモネラに感染しないよう注意しなければならない。

本研究で分離された *S. Senftenberg* (SESen3709 株) 由来の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 保持プラスミドである pSESen3709\_1 プラスミドのレプリコンタイプは、他の血清型、特に *S. Typhi* で認められるプラスミドのレプリコンタイプと同一であった (87, 103) (表 3-2)。レプリコンタイプが融合型である IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)型を示すチフス性および非チフス性サルモネラ由来プラスミドを表 3-2 に示した。IncHI1 グループのプラスミドは、*S. Typhi* の多剤耐性の大きな要因であることが明らかとなっている (37)。しかし、上記のような IncFIA 型および IncHI1 型融合プラスミドは、*S. Typhi* だけでなく、他のサルモネラ血清型にも存在する (9, 38, 55, 87, 103, 126)。このことは、IncHI1 グループのプロトタイプとされる R27 プラスミド (103, 126) が様々な薬剤耐性遺伝子を獲得していき、子孫プラスミドがサルモネラ間で拡散、維持されていることを示唆している。さらに、IncHI1 グループプラスミドはサルモネラ間で伝播することができるため (95)、pSESen3709\_1 プラスミドが *S. Senftenberg* から他の血清型へ伝播している可能性が考えられることから、今後もこれらプラスミドの拡散を監視する必要がある。

pSESen3709\_1 プラスミドは、*S. Typhimurium* 由来の pSa4-CIP プラスミドと高い類似性 (coverage 90.6%) を示しており (図 3-2A), さらに、これらプラスミドのレプリコンタイプは同一であった (表 3-2)。しかしながら、pSa4-CIP プラスミドは *bla*<sub>CTX-M-14</sub> の領域が欠落していた。一方で、*E. coli* 由来の p14E509-CTXM プラスミドから、pSESen3709\_1 プラスミド上の *ISEcp1* を含む *bla*<sub>CTX-M-14</sub> の近傍領域と酷似した領域 (4,611/4,612bp) が確認された (図 3-2B)。これらの結果から、サルモネラでは、*ISEcp1* によって特定のプラスミドから pSa4-CIP プラスミドに類似したプラスミドへ *bla*<sub>CTX-M-14</sub> が転移していると考えられた。本研究で見つかった pSESen3709\_1 プラスミドは、上記のような過程で生じたプラスミドの 1 つが、*S. Senftenberg* に獲得され、その後、*ISEcp1* に点変異が生じていたものと考えられた。

また、*S. Haardt* (SEHaa3795 株) の染色体上に位置する *ISEcp1* を含む *bla*<sub>CTX-M-15</sub> の近傍領域は、*E. coli* 由来の pEC\_L46 プラスミドと類似性が高いことが明らかとなった (図 3-3)。*bla* 遺伝子が *ISEcp1* に関連して染色体上に組込まれていることが、*E. coli*(94), *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* (64) 等の腸内細菌科細菌で示唆されており、本研究の結果は、*S. Haardt* の染色体に、*ISEcp1* によって pEC\_L46 プラスミドのようなプラスミドから *bla*<sub>CTX-M-15</sub> が転移したことを示唆すると思われる。以上のことから、サルモネラにおけるプラスミドや染色体への転移による *bla*<sub>CTX-M</sub> の拡散には、*ISEcp1* が重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、日本国内の食品従事者の約 0.1% が、サルモネラを保菌しており、その一部が *bla*<sub>CTX-M-14</sub> および *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する ESC 耐性

サルモネラを保菌していることが確認された。また、*bla*<sub>CTX-M</sub>が *ISEcp1* によって転移し、プラスミドと染色体に存在していたことが明らかとなった。これらのことから、食品従事者はサルモネラを保菌していた場合、衛生管理が十分でないで食品を介してサルモネラをヒトへ伝播させるリスクがあるため、ESC 耐性サルモネラを他のヒトへ伝播させ、さらに、プラスミドを介して、*bla*<sub>CTX-M</sub>を他の細菌に水平伝播する可能性があると考えられる。したがって、食品従事者は薬剤耐性サルモネラおよび薬剤耐性因子のレゼルボアとなり得ることが示唆されたことから、食品従事者はサルモネラ感染の可能性について、一層の注意を払う必要があると考えられた。



表3-1. *bla* 遺伝子のPCRによる検出およびシーケンスに使用したプライマー

<i>bla</i> 遺伝子	目的	プライマー名	ヌクレオチド配列 5'-3'	引用文献
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	PCR, シーケンス	CTX-MU1	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	(85)
		CTX-MU2	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	(85)
	シーケンス	CTX-outF2	GCCAAGGGATAATACTAATAGAGG	(77)
		CTX-outR	GCGGAATGATAGAAAGAGATGAG	(77)
		CTX-M-14 F653	ACGTGGCTCAAAGGCAATAC	本研究
		CTX-M-14 R1070	CGTGAAGAAGGTGTTGCTGA	本研究
		CTX-M-15 outF107	TGTTACAATGTGTGAGAAGCAGTC	本研究
CTX-M-15 R402	AGCTTATTCATCGCCACGTT	本研究		
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	PCR	MAb/F	GGGGAGCTCATAAAATTCTTGAAGAC	(90)
		MAb/R	GGGGGATCCTTACCAATGCTTAATCA	(90)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	PCR	SHV-F	AGGATTGACTGCCTTTTGTG	(19)
		SHV-R	ATTTGCTGATTTTCGCTCG	(19)
<i>bla</i> <sub>CMY</sub>	PCR, シーケンス	cmy-F	GACAGCCTCTTTCTCCACA	(137)
		cmy-R	TGGAACGAAGGCTACGTA	(137)
	シーケンス	CMY2-outF	GTTACAATGTGTGAGAAGCAGTC	(77)
		CMY2-outR	ATGGGATTTTCCTTGCTGTA	(77)
		CMY2-R0	CAGTATTTTCGTGACCGGA	(77)
	CMY2-F3	CTGGATTACGGTTCCGCA	(77)	

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)

表3-2. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Senftenberg 由来の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 保持プラスミドと他の血清型由来の IncHI1 グループプラスミドの比較

血清型	薬剤耐性遺伝子		プラスミド名	プラスミドレプリコン型	分離年	分離地域	サイズ (bp)	アクセッション番号	引用文献
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	その他の薬剤耐性遺伝子							
Senftenberg	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	<i>aac(3)-IId, floR, qnrS1, sul2, tet(A), tet(M)</i>	pSESen3709_1	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	2017	日本	249,939	AF020333	本研究
Typhi	ND <sup>a)</sup>	<i>tet(B)</i>	R27	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	1961	イギリス	180,461	AF250878	(103, 126)
Typhi	ND	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla<sub>TEM-1</sub>, catA1, dfrA14, sul2, tet(B)</i>	pHCM1	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	1993	ベトナム	218,160	AL513383	(87)
Paratyphi A	ND	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla<sub>TEM-1</sub>, catA1, dfrA7, sul1, sul2, tet(B)</i>	pAKU_1	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	2002	パキスタン	212,711	AM412236	(38)
Typhimurium	ND	<i>aac(3)-IId, aadA2, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla<sub>TEM-1</sub>, dfrA12, mph(A), sul1, sul2, tet(B)</i>	pF8475	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	2002	チェコ共和国	210,266	KP899804	(55)
Typhimurium	ND	<i>aph(3'')-Ib, aph(3'')-Ia, aph(6)-Id, bla<sub>TEM-1</sub>, catA1, sul2, tet(B)</i>	p109/9	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	2002	チェコ共和国	207,203	KP899805	(55)
Typhimurium	ND	<i>ant(3'')-Ia, catA1, sul1, tet(B)</i>	pB71	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	2002	チェコ共和国	190,730	KP899806	(55)
Typhimurium	ND	<i>aadA2, bla<sub>TEM-1</sub>, cmIA1, dfrA12, floR, qacL, qnrS1, sul3</i>	pSa4-CIP	IncFIA(HI1)/IncHI1A/IncHI1B(R27)	2014	香港	237,130	MCS74042	(9)

<sup>a)</sup> ND, 不検出

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Eroh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00072-20. を許可を得て引用し一部改変)

表3-3. 国内の食品従事者から採取した164検体の糞便から分離されたサルモネラの血清型および分離株数

血清型 <sup>a)</sup>	分離株数	(%)
Infantis	20	12.7
Schwarzengrund	15	9.5
Thompson	13	8.2
Manhattan	8	5.1
Saintpaul	8	5.1
Untypeable (with O4:i:-)	7	4.4
Litchfield	6	3.8
Newport	6	3.8
Montevideo	5	3.2
Agona	4	2.5
Bareilly	4	2.5
Stanley	4	2.5
Virchow	4	2.5
Haardt	3	1.9
Hadar	3	1.9
Weltevreden	3	1.9
Untypeable (with O4:-:-)	3	1.9
Untypeable (with O4:d:untypeable)	3	1.9
Chester	2	1.3
Muenchen	2	1.3
Typhimurium	2	1.3
Untypeable (with O4:untypeable:1,7)	2	1.3
Untypeable (with O8)	2	1.3
Untypeable (with O9)	2	1.3
Untypeable	2	1.3
Blockley	1	0.6
Corvallis	1	0.6
Enteritidis	1	0.6
Senftenberg	1	0.6
その他 <sup>b)</sup>	21	13.3
Total	158 <sup>c)</sup>	

<sup>a)</sup> *Salmonella enterica* subspecies *enterica*

<sup>b)</sup> Albany, Anatum, Baiboukoum, Derby, Hvittingfoss, Indiana, Mbandaka, Meleagridis, Mikawasima, Miyazaki, Muenster, Onireke, San Diego, Uganda, O untypeable (with l,v,z13:1,5), O untypeable (with r:1,5), O untypeable (with y:1,5), untypeable (with O4:e,h:untypeable), untypeable (with O8,O6:-:-), untypeable (with O9:untypeable:1,5), untypeable (with O13:k:1,5)を含む。

<sup>c)</sup> 164分離株のうち、6株は保存状態から復帰しなかった。

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)

表3-4. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Senftenberg および *S. Haardt* 分離株の染色体およびプラスミド上の薬剤耐性遺伝子

血清型	薬剤耐性遺伝子		DNAタイプ	プラスミド名	プラスミド レプリコンタイプ	サイズ (bp)
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	その他の 薬剤耐性遺伝子				
<i>S. Senftenberg</i>	ND <sup>a)</sup>	ND	染色体	-	-	4,781,872
	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	<i>aac(3)-IId</i> , <i>floR</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(M)</i>	プラスミド	pSESen3709_1	IncFIA(HI1)/IncHI1A/ IncHIIB(R27)	249,939
	ND	ND	プラスミド	pSESen3709_2	Col440II	6,237
<i>S. Haardt</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>catA2</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(A)</i>	染色体	-	-	4,829,518
	ND	ND	プラスミド	pSEHaa3795_1	Col440I	4,593

<sup>a)</sup> ND, 不検出

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)

表3-5. 食品従事者のサルモネラ保菌者について報告した先行研究と本研究との比較

	調査対象時期	糞便検体由来	検体採取した地方	検体数	サルモネラ 検出方法	陽性率 (%)	薬剤耐性に 関する調査
本研究	2017年1月から10月	食品従事者の年齢層は18歳から65歳 飲食店の調理従事者、給仕者および食品工場の従業員	全地方 (北海道, 東北, 関東, 中部, 関西, 中国, 四国, 九州)	145,220	PCRによるスクリーニング後に直接塗抹分離	0.11	実施
先行研究 <sup>a)</sup>	1999年11月から 2000年5月	食品工場, ホテル, 飲食店, スーパーマーケット, またはフードサービスを提供する企業の従業員	九州地方	331,644	増菌培養後, 塗抹分離	0.032	未実施

<sup>a)</sup> Murakami K, Ishihara T, Horikawa K, Oda T. 2007. Features of *Salmonella* serovars among food handlers in Kyushu, Japan. New Microbiol 30:155-159.

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)

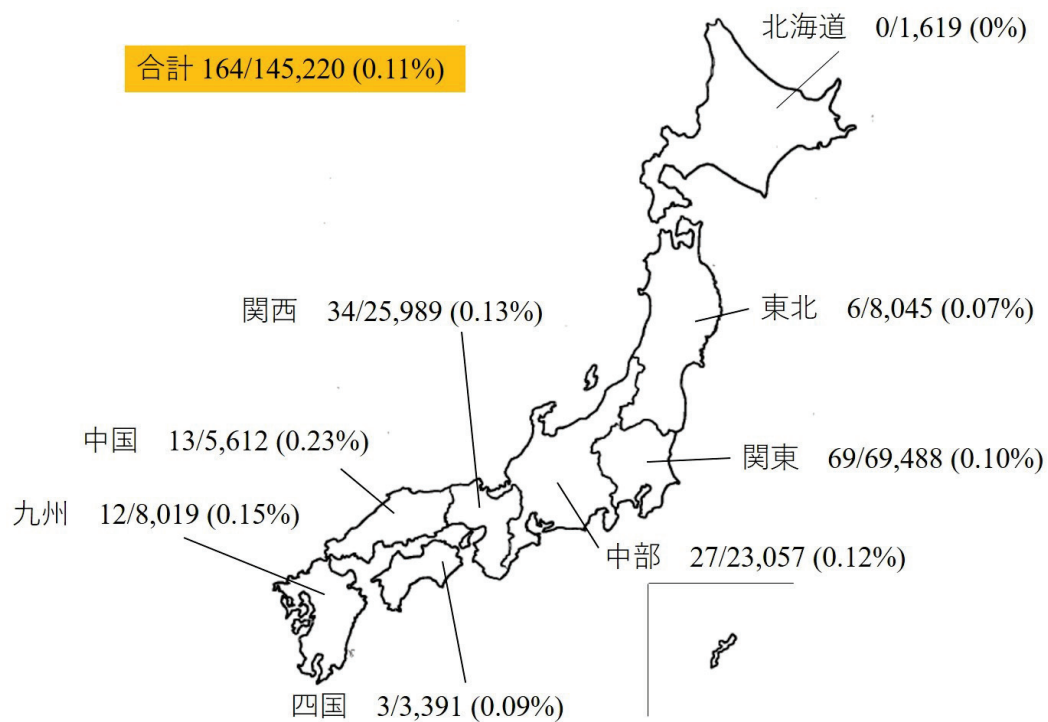


図 3-1 国内の食品従事者から収集したヒト糞便検体とサルモネラ陽性検体数

地方別にサルモネラ陽性検体数，検査検体数，陽性率を示した。

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)

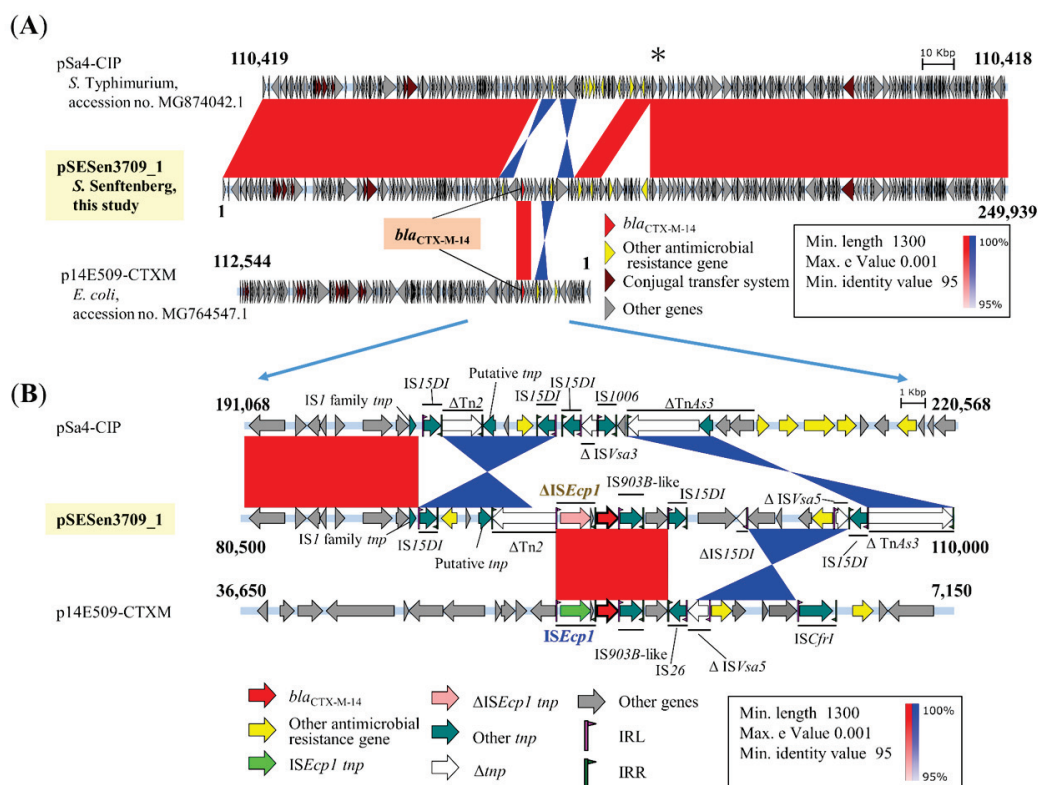


図 3-2. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg 由来の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 保有 pSESen3709\_1 プラスミドの構造解析

pSESen3709\_1 プラスミドの構造を、pSa4-CIP プラスミドおよび p14E509-CTXM プラスミドの構造と比較した。(A) 3つのプラスミドの全体像。*bla*<sub>CTX-M-14</sub> を赤色、その他の薬剤耐性遺伝子を黄色、接合伝達システムを茶色、その他の遺伝子を灰色の三角形で示した。(B) (A) の *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 存在領域の拡大図。 $\Delta$  *ISEcp1 tnp* は、完全な配列が存在するものの、ヌクレオチド 94,135 番目の位置に点変異が認められた。*bla*<sub>CTX-M-14</sub> を赤色、他の薬剤耐性遺伝子を黄色、*ISEcp1 tnp* を薄緑色、 $\Delta$  *ISEcp1 tnp* をピンク色、他の *tnp* を緑色、 $\Delta$  *tnp* を白色、その他の遺伝子を灰色の矢印で示した。IRL はピンク色の旗で示し、IRR は緑色の旗で示した。pSa4-CIP プラスミドは環状構造をとっているため、比較しやすいように開始位置をヌクレオチド位置 110,419 番目からとした。アスタリスクはヌクレオチド位置 1 番目を示している。

IS, 挿入配列

IRL, 左側の逆向き反復配列

IRR, 右側の逆向き反復配列

*tnp*, トランスポゼース遺伝子

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)

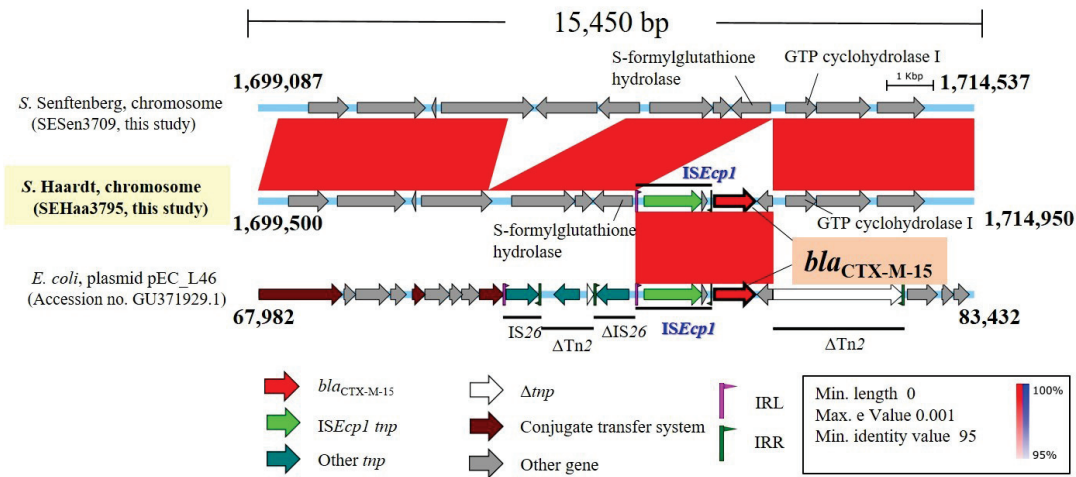


図 3-3 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Haardt の染色体構造解析

*bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する *S. Haardt* (SEHaa3795 株) の染色体を、*S. Senftenberg* (SESen3709 株) の染色体および *Escherichia coli* 由来 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> 保有 pEC\_L46 プラスミドと比較した。*bla*<sub>CTX-M-15</sub> を赤色、*ISEcp1 tnp* を黄緑色、その他の *tnp* を緑色、 $\Delta tnp$  を白色、接合伝達システムを茶色、その他の遺伝子を灰色の矢印で示した。IRL はピンク色の旗で示し、IRR は緑色の旗で示した。

IS, 挿入配列

IRL, 左側の逆向き反復配列

IRR, 右側の逆向き反復配列

*tnp*, トランスポゼース遺伝子

(Shigemura, H., Sakatsume, E., Sekizuka, T., Yokoyama, H., Hamada, K., Etoh, Y., Carle, Y., Mizumoto, S., Hirai, S., Matsui, M., Kimura, H., Suzuki, M., Onozuka, D., Kuroda, M., Inoshima, Y., Murakami, K., 2020. Food workers as a reservoir of extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e00072-20.を許可を得て引用し一部改変)



## 総括

サルモネラは主に鶏肉や鶏卵等の食品を介してヒトに感染し、発熱、下痢等の症状を引き起こす。また、食品従事者がサルモネラを保菌していた場合、食品を汚染させ、汚染食品を介してヒトへ伝播させるおそれがある。サルモネラに感染しても多くの場合、抗菌薬による治療を必要としないが、小児のサルモネラ感染症の治療には ESC が選択されるため、ESC 耐性サルモネラの出現、拡散は公衆衛生上の重要な問題である。サルモネラの ESC 耐性化には *bla* 遺伝子の獲得が関与しており、*bla* 遺伝子はプラスミドや IS を介して細菌内および細菌間で拡散する。ESC 耐性サルモネラの拡散を防止するためには、*bla* 遺伝子の拡散機序を明らかにすることが不可欠である。ESC 耐性サルモネラの汚染状況の把握および *bla* 遺伝子の拡散機序の解明は、ESC 耐性サルモネラの出現、拡散を防止するための重要な情報となり得る。本研究では、鶏肉、採卵鶏生産環境、食品従事者における ESC 耐性サルモネラの汚染状況を明らかにするとともに、ESC 耐性サルモネラ的全ゲノム解析を行い、以下の成果を得た。

第一章では、2011 年から 2015 年に福岡県の市販鶏肉から分離されたサルモネラ菌株について、23.6% (25/106 株) が AmpC  $\beta$ -lactamase または ESBL を産生する ESC 耐性株であり、それらの ESC 耐性株が *bla*<sub>CMY-2</sub> 保持 Untypeable プラスミド、*bla*<sub>TEM-52</sub> 保持 IncX1 型プラスミド、*bla*<sub>SHV-12</sub> 保持 IncX3 型プラスミド、*bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保持 IncN 型プラスミドを保有していることを明らかにした。また、鶏肉由来のサルモネラ菌株に占める ESC 耐性株の割合は、2011 年に 45.5% (10/22 株) まで増

加した後、2012年以降に減少し、2015年には10.5% (2/19株) になった。この割合の低下と養鶏業界におけるセフトオフィルの使用自粛に関連がある可能性が示唆された。さらに、ESC耐性株が保有するプラスミドをゲノム解析し、レプリコンタイプや薬剤耐性遺伝子の分布から、*S. Manhattan* は *bla*<sub>TEM-52</sub> を有する IncX1 型プラスミドと親和性が高く、残存しやすい可能性が示唆された。

第二章では、2014年を除く、2009年から2016年における国内のLB-EPチェーンで分離されたサルモネラ菌株について、6.7% (15/224株) がESC耐性株であり、日本国内の一部のLB-EPチェーンがESC耐性サルモネラに汚染されていることを明らかにした。また、*bla*<sub>CMY-2</sub> を含む複数の薬剤耐性遺伝子、*ISEcp1* および *IS26* を保持する IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドが、同一の採卵鶏生産チェーンの上流部と下流部の *S. Ohio* から見つかり、薬剤耐性遺伝子が IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドを介して上流から下流へ拡散していることが示唆された。さらに、これら IncA/C<sub>2</sub> 型プラスミドの一部、広範あるいは全体を染色体に組込んだ *S. Ohio* に加え、*bla*<sub>CTX-M-14</sub> 保有プラスミドの一部を染色体に組込んだ *S. Cerro* が確認された。これらサルモネラのプラスミドの一部領域組込みによる *bla* 遺伝子の獲得、またはプラスミドの広範な領域あるいは全領域の組込みによる複数の薬剤耐性遺伝子の獲得に、*ISEcp1* または *IS26* がそれぞれ関与し、*bla* 遺伝子を含む薬剤耐性遺伝子の拡散には、プラスミドだけでなく、プラスミド上に存在する *ISEcp1* や *IS26* も関与していることが示された。LB-EPチェーンにおけるESC耐性サルモネラの汚染および拡散を抑制するためには、採卵鶏の雛がサルモネラに感染しないよう種卵の消毒や孵化場での器具の殺菌・消毒のような

衛生管理を徹底するとともに、雛が ESC 耐性サルモネラを保菌していないことを確認し、採卵鶏生産チェーンの上流部である育雛場に ESC 耐性サルモネラを持ち込まない対策が必要である。また、GP センターや割卵工場における割卵前の卵殻表面の洗卵殺菌による汚染除去を十分行う等の衛生管理の徹底が重要である。さらに、ゲノム解析により LB-EP チェーンで見つかった ESC 耐性サルモネラは、複数の薬剤耐性遺伝子を保有していることが明らかとなった。耐性型に含まれる抗菌薬の使用により ESC 耐性サルモネラが選択され、採卵鶏生産チェーンに残存する可能性が示唆された。

第三章では、2017 年の日本国内の食品従事者の約 0.1% (164/145,220 検体) が、サルモネラを保菌しており、食品従事者から分離された菌株のうち、4.4% (7/158 株) が *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub> または *bla*<sub>CTX-M-15</sub> を保有する ESC 耐性株であったことを明らかにした。また、*bla*<sub>CTX-M</sub> がプラスミド間およびプラスミドと染色体間を *ISEcp1* によって転移し、サルモネラの染色体と保有するプラスミド上に *bla*<sub>CTX-M</sub> が存在していたことが明らかとなった。食品従事者は *bla*<sub>CTX-M</sub> を保有するサルモネラを他のヒトへ伝播させ、プラスミドを介して *bla*<sub>CTX-M</sub> を他の細菌に水平伝播する可能性がある。ヒトがサルモネラに感染すると長期間保菌することがあることを踏まえると、食品従事者はサルモネラのレゼルボアとなるだけでなく、薬剤耐性サルモネラおよび薬剤耐性因子のレゼルボアとなることが示唆された。

以上、本研究は、鶏肉、鶏卵生産に関連する採卵鶏生産環境およびヒトにおける ESC 耐性サルモネラの汚染実態を明らかにするとともに、プラスミドや IS が *bla* 遺伝子を保有する ESC 耐性サルモネラの出現、

拡散に関与していることを示唆した。本研究で示された知見は ESC 耐性サルモネラの出現および拡散を防止するための基礎情報として、今後の食品、環境、ヒトにおける ESC 耐性サルモネラの汚染実態調査の比較検討や *bla* 遺伝子の拡散機序の解明のために、公衆衛生分野や家畜衛生分野で活用されることが期待できる。また、本研究により得られた知見を養鶏業界や食品製造・調理等に関わる食品業界、保健所・家畜保健所等の行政機関に還元し、ESC 耐性サルモネラの汚染・拡散防止のための注意喚起を促すことで、ESC 耐性サルモネラの蔓延防止に貢献し得ると考えられる。

## 謝辞

本研究にあたり，終始懇篤なるご指導，御鞭撻を賜りました岐阜大学  
応用生物科学部 共同獣医学科 教授 猪島康雄 博士に深甚なる謝  
意を表します。

本稿作成にあたり，有益な御助言と御高閲を賜りました帯広畜産大  
学 原虫病研究センター 教授 鈴木宏志 博士，岩手大学 農学部  
共同獣医学科 教授 寺嶋淳 博士，東京農工大学 農学部 共同獣  
医学科 教授 古谷哲也 博士，岐阜大学大学院 連合獣医学研究科  
教授 浅井鉄夫 博士に心から感謝致します。

本研究の実施および解析にあたり，貴重な御指導，御助言を賜りまし  
た国立感染症研究所 感染症危機管理研究センター 第六室 室長  
村上光一 博士に謹んで深謝致します。

本研究実施にあたり，御理解と御協力を賜りました，福岡県保健環境  
研究所の皆様に厚くお礼申し上げます。

最後に，研究実施にあたり，深い理解を持って支えてくれた家族に心  
から感謝致します。

## 引用文献

- 1) Akiba, M., Sekizuka, T., Yamashita, A., Kuroda, M., Fujii, Y., Murata, M., Lee, K., Joshua, D.I., Balakrishna, K., Bairy, I., Subramanian, K., Krishnan, P., Munuswamy, N., Sinha, R.K., Iwata, T., Kusumoto, M., Guruge, K.S., 2016. Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants among extended-spectrum-cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolates from rivers and sewage treatment plants in India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2972–2980.
- 2) Andino, A., Hanning, I., 2015. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Sci. World J.* 2015, 520179.
- 3) Awol, N., Nigusse, D., Ali, M., 2019. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella* and *Shigella* among food handlers working in food establishment at Hawassa city, Southern Ethiopia. *BMC Res. Notes* 12, 712.
- 4) Branchu, P., Bawn, M., Kingsley, R.A., 2018. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect. Immun.* 86, e00079-00018.
- 5) Cao, G., Allard, M.W., Hoffmann, M., Monday, S.R., Muruvanda, T., Luo, Y., Payne, J., Rump, L., Meng, K., Zhao, S., McDermott, P.F., Brown, E.W., Meng, J., 2015. Complete

- sequences of six IncA/C plasmids of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Newport. *Genome Announc.* 3, e00027-15.
- 6) Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., Hasman, H., 2014. In *silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903.
  - 7) Carver, T.J., Rutherford, K.M., Berriman, M., Rajandream, M.A., Barrell, B.G., Parkhill, J., 2005. ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics* 21, 3422–3423.
  - 8) Centers for Disease Control and Prevention, 2014. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, U.S.A.  
[https://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012\\_annual\\_report\\_508c.pdf](https://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012_annual_report_508c.pdf) (accessed on September 6th, 2021)
  - 9) Chen, K., Dong, N., Zhao, S., Liu, L., Li, R., Xie, M., Lin, D., Wai-Chi Chan, E., Meng, J., McDermott, P.F., Chen, S., 2018. Identification and characterization of conjugative plasmids that encode ciprofloxacin resistance in *Salmonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e00575-18.
  - 10) Cheng, Q., Jiang, X., Xu, Y., Hu, L., Luo, W., Yin, Z., Gao, H., Yang, W., Yang, H., Zhao, Y., Zhao, X., Zhou, D., Dai, E., 2019.

- Type 1, 2, and 1/2-hybrid IncC plasmids from China. *Front. Microbiol.* 10, 2508.
- 11) Chuma, T., Miyasako, D., Dahshan, H., Takayama, T., Nakamoto, Y., Shahada, F., Akiba, M., Okamoto, K., 2013. Chronological change of resistance to  $\beta$ -lactams in *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from broilers in Japan. *Front. Microbiol.* 4, 113.
  - 12) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—Document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, U.S.A.
  - 13) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; second informational supplement—Document VET01-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, U.S.A.
  - 14) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement—Document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, U.S.A.
  - 15) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing—Document M100, 28th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, U.S.A.



- 16) Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing—Document M100, 30th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, U.S.A.
- 17) Cloeckaert, A., Praud, K., Doublet, B., Bertini, A., Carattoli, A., Butaye, P., Imberechts, H., Bertrand, S., Collard, J.M., Arlet, G., Weill, F.X., 2007. Dissemination of an extended-spectrum- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>TEM-52</sub> gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 1872–1875.
- 18) Coil, D., Jospin, G., Darling, A.E., 2014. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. Bioinformatics 31, 587–589.
- 19) Colom, K., Pérez, J., Alonso, R., Fernández-Aranguiz, A., Lariño, E., Cisterna, R., 2003. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>OXA-1</sub> genes in Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol. Lett. 223, 147–151.
- 20) Coudron, P.E., 2005. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. J. Clin. Microbiol. 43, 4163–4167.
- 21) Dutil, L., Irwin, R., Finley, R., Ng, L.K., Avery, B., Boerlin, P., Bourgault, A.M., Cole, L., Daignault, D., Desruisseau, A.,

- Demczuk, W., Hoang, L., Horsman, G.B., Ismail, J., Jamieson, F., Maki, A., Pacagnella, A., Pillai, D.R., 2010. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 48–54.
- 22) Eng, S., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N., Ser, H., Chan, K., Lee, L., 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* 8, 284–293.
- 23) European Parliament, 2019. The EU poultry meat and egg sector: Main features, challenges and prospects.  
[https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/IDAN/2019/644195/EPRS\\_IDA\(2019\)644195\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/RegData/etudes/IDAN/2019/644195/EPRS_IDA(2019)644195_EN.pdf) (accessed on October 5th, 2020)
- 24) Fabre, L., Delauné, A., Espié, E., Nygard, K., Pardos, M., Polomack, L., Guesnier, F., Galimand, M., Lassen, J., Weill, F.X., 2009. Chromosomal integration of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in *Salmonella enterica* serotype Concord isolates from internationally adopted children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1808–1816.
- 25) Fernández-Alarcón, C., Singer, R.S., Johnson, T.J., 2011. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One* 6, e23415.
- 26) Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007. Antigenic formulae of the

*Salmonella* serovars, 9th revision. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, Paris, France.

[https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf) (accessed on September 8th, 2021)

- 27) Gut, A.M., Vasiljevic, T., Yeager, T., Donkor, O.N., 2018. *Salmonella* infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology* 164, 1327–1344.
- 28) Hammerum, A.M., Heuer, O.E., Emborg, H.-D., Bagger-Skjøt, L., Jensen, V.F., Rogues, A.M., Skov, R.L., Agersø, Y., Brandt, C.T., Seyfarth, A.M., Muller, A., Hovgaard, K., Ajufu, J., Bager, F., Aarestrup, F.M., Frimodt-Møller, N., Wegener, H.C., Monnet, D.L., 2007. Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1632–1639.
- 29) Harada, K., Asai, T., 2010. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 180682.
- 30) 橋本信一郎, 2017. 養鶏現場での薬剤耐性問題への取り組み. 鶏病研究会報 53, 29–34.
- 31) Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F.M., 2005.  $\beta$ -lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry

- products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 115–121.
- 32) Hedican, E., Hooker, C., Jenkins, T., Medus, C., Jawahir, S., Leano, F., Smith, K., 2009. Restaurant *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with an asymptomatic infected food worker. *J. Food Prot.* 72, 2332–2336.
- 33) Hiki, M., Kawanishi, M., Abo, H., Kojima, A., Koike, R., Hamamoto, S., Asai, T., 2015. Decreased resistance to broad-spectrum cephalosporin in *Escherichia coli* from healthy broilers at farms in Japan after voluntary withdrawal of ceftiofur. *Foodborne Pathog. Dis.* 12, 639–643.
- 34) Hiki M., Usui M., Kojima A., Ozawa M., Ishii Y., Asai T., 2013. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*<sub>CMY-2</sub> gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 243–249.
- 35) 樋脇 弘, 椿本 亮, 久保倉宏一, 栗原淑子, 本田己喜子, 小田隆弘, 1995. 鶏卵, 液卵および加工品におけるサルモネラ対策について. *福岡市衛生試験所報* 20, 59–68.
- 36) Hohmann, E.L., 2001. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin. Infect. Dis.* 32, 263–269.
- 37) Holt, K.E., Dolecek, C., Chau, T.T., Duy, P.T., La, T.T., Hoang, N.V., Nga, T.V., Campbell, J.I., Manh, B.H., Vinh Chau, N.V., Hien, T.T., Farrar, J., Dougan, G., Baker, S., 2011. Temporal fluctuation of multidrug resistant *salmonella* typhi haplotypes in

- the mekong river delta region of Vietnam. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e929.
- 38) Holt, K.E., Thomson, N.R., Wain, J., Phan, M.D., Nair, S., Hasan, R., Bhutta, Z.A., Quail, M.A., Norbertczak, H., Walker, D., Dougan, G., Parkhill, J., 2007. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar paratyphi a harbors IncHI1 plasmids similar to those found in serovar typhi. J. Bacteriol. 189, 4257–4264.
- 39) Hunt, M., Silva, N.D., Otto, T.D., Parkhill, J., Keane, J.A., Harris, S.R., 2015. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. Genome Biol. 16, 294.
- 40) 兵庫県食肉衛生検査センター, 2020. 令和 2 年度事業概要(令和元年度実績). 兵庫, 兵庫県食肉衛生検査センター, 30.
- 41) Iwabuchi, E., Maruyama, N., Hara, A., Nishimura, M., Muramatsu, M., Ochiai, T., Hirai, K., 2010. Nationwide survey of *Salmonella* prevalence in environmental dust from layer farms in Japan. J. Food Prot. 73, 1993–2000.
- 42) Jacoby, G.  $\beta$ -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes.  
<http://www.lahey.org/Studies/> (accessed on June 19th, 2017)
- 43) Jeon, H.Y., Seo, K.W., Kim, Y.B., Kim, D.K., Kim, S.W., Lee, Y.J., 2019. Characteristics of third-generation cephalosporin-

- resistant *Salmonella* from retail chicken meat produced by integrated broiler operations. *Poult. Sci.* 98, 1766–1774.
- 44) Johnson, T.J., Bielak, E.M., Fortini, D., Hansen, L.H., Hasman, H., Debroy, C., Nolan, L.K., Carattoli, A., 2012. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid* 68, 43–50.
- 45) Kataoka, Y., Murakami, K., Torii, Y., Kimura, H., Maeda-Mitani, E., Shigemura, H., Fujimoto, S., Murakami, S., 2017. Reduction in the prevalence of AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 in *Salmonella* from chicken meat following cessation of the use of ceftiofur in Japan. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 10, 10–11.
- 46) 川西路子, 2016. JVARM (動物由来薬剤耐性菌モニタリング) の取り組み. *日本豚病研究会報* 68, 12–18.
- 47) Kim, J.S., Yun, Y.S., Kim, S.J., Jeon, S.E., Lee, D.Y., Chung, G.T., Yoo, C.K., Kim, J., 2016. Rapid emergence and clonal dissemination of CTX-M-15-producing *Salmonella enterica* serotype Virchow, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 68–70.
- 48) Klare, I., Badstübner, D., Konstabel, C., Böhme, G., Claus, H., Witte, W., 1999. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. *Microb. Drug Resist.* 5, 45–52.

- 49) Kleinheinz, K.A., Joensen, K.G., Larsen, M.V., 2014. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage* 4, e27943.
- 50) 国立医薬品食品衛生研究所, 2016. サルモネラ属菌標準試験法 NIHSJ-01-ST4 (090218).  
<http://www.nihs.go.jp/fhm/kensa/sal/Salmonells%20ST4-091014F.pdf> (アクセス日 2021 年 9 月 8 日)
- 51) Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., Pevzner, P.A., 2019. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* 37, 540–546.
- 52) 駒井亨, 2007. 鶏肉の生産、処理加工および流通の現状. 独立行政法人農畜産業振興機構 月報「畜産の情報」(国内編) 2007 年 9 月.  
<https://lin.alic.go.jp/alic/month/dome/2007/sep/chousa1.htm>  
(アクセス日 2021 年 9 月 8 日)
- 53) Koren, S., Walenz, B.P., Berlin, K., Miller, J.R., Bergman, N.H., Phillippy, A.M., 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* 27, 722–736.
- 54) 厚生労働省, 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会食肉等の生食に関する調査会資料 平成 26 年 3 月 17 日開催 資料 6.

<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000040840.pdf> (アクセス日 2021 年 9 月 6 日)

- 55) Kubasova, T., Cejkova, D., Matiasovicova, J., Sekelova, Z., Polansky, O., Medvecky, M., Rychlik, I., Juricova, H., 2016. Antibiotic resistance, core-genome and protein expression in IncHI1 plasmids in *Salmonella* Typhimurium. *Genome Biol. Evol.* 8, 1661–1771.
- 56) Langridge, G.C., Wain, J., Nair, S., 2012. Invasive Salmonellosis in Humans. *EcoSal Plus*, 5.  
[https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/ecosalplus.8.6.2.2?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed) (accessed on September 26th, 2021)
- 57) Lee, C.S., Li, J.J., Doi, Y., 2015. Complete sequence of conjugative IncA/C plasmid encoding CMY-2  $\beta$ -lactamase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 4360–4361.
- 58) Leinberger, D.M., Grimm, V., Rubtsova, M., Weile, J., Schröppel, K., Wichelhaus, T.A., Knabbe, C., Schmid, R.D., & Bachmann, T.T., 2010. Integrated detection of extended-spectrum-beta-lactam resistance by DNA microarray-based genotyping of TEM, SHV, and CTX-M genes. *J. Clin. Microbiol.*, 48, 460–471.
- 59) Leverstein-van Hall, M.A., Dierikx, C.M., Cohen Stuart, J.,



- Voets, G.M., van den Munckhof, M.P., van Essen-Zandbergen, A., Platteel, T., Fluit, A.C., van de Sande-Bruinsma, N., Scharinga, J., Bonten, M.J., Mevius, D.J., 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 873–880.
- 60) Li, H., 2016. Minimap and miniasm: fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics* 32, 2103–2110.
- 61) Li, H., Durbin, R., 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589–595.
- 62) Liakopoulos, A., Geurts, Y., Dierikx, C.M., Brouwer, M.S., Kant, A., Wit, B., Heymans, R., van Pelt, W., Mevius, D.J., 2016. Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Strains, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1257–1261.
- 63) Liu, J.H., Wei, S.Y., Ma, J.Y., Zeng, Z.L., Lü, D.H., Yang, G.X., Chen, Z.L., 2007. Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29, 576–581.
- 64) Mahrouki, S., Belhadj, O., Chihi, H., Mohamed, B.M., Celenza, G., Amicosante, G., Perilli, M., 2012. Chromosomal *bla*<sub>CTX-M-15</sub> associated with *ISEcp1* in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* isolated at the military hospital of Tunis, Tunisia. *J.*

- Med. Microbiol. 61, 1286–1289.
- 65) Majowicz, S.E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F.J., Kirk, M., O'Brien, S.J., Jones, T.F., Fazil, A., Hoekstra, R.M., 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin. Infect. Dis. 50, 882–889.
- 66) Matsumoto, Y., Izumiya, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Ohnishi, M., 2014. Characterization of *bla*<sub>TEM-52</sub>-carrying plasmids of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 7545–7547.
- 67) Medeiros, M.A., Oliveira, D.C., Rodrigues Ddos, P., Freitas, D.R., 2011. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. Rev. Panam. Salud Publica. 30, 555–560.
- 68) Medus, C., Smith K.E., Bender, J.B., Leano, F., Hedberg C.W., 2010. *Salmonella* infections in food workers identified through routine Public Health Surveillance in Minnesota: impact on outbreak recognition. J. Food Prot. 73, 2053–2058.
- 69) 見上 彪, 2003. 獣医微生物学 第2版. 東京, 文永堂, 29–32.
- 70) Moffatt, C.R., Musto, J., Pingault, N., Miller, M., Stafford, R., Gregory, J., Polkinghorne, B.G., Kirk, M.D., 2016. *Salmonella* Typhimurium and outbreaks of egg-associated disease in Australia, 2001 to 2011. Foodborne Pathog. Dis 13, 379–385.
- 71) Murakami, K., Ishihara, T., Horikawa, K., Oda, T., 2007.

- Features of *Salmonella* serovars among food handlers in Kyushu, Japan. *New Microbiol.* 30, 155–159.
- 72) Murakami, K., Noda, T., Maeda, E., Sera, N., Fujimoto, S., 2014. Easy washing of lysed cell plugs for bacterial typing by pulsed-field gel electrophoresis using simple equipment. *J. Microbiol. Methods* 101, 67–69.
- 73) National Center for Biotechnology Information.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/wgs/> (accessed on September 24th, 2021)
- 74) National Center for Biotechnology Information.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=> (accessed on September 24th, 2021)
- 75) National Institute of Genetics DNA Data Bank of Japan.  
<https://dfast.ddbj.nig.ac.jp/> (accessed on January 22nd, 2021)
- 76) National Veterinary Assay Laboratory Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries 2018. Sales amounts and sales volumes (active substance) of antibiotics, synthetic antibacterials, anthelmintics and antiprotozoals.  
[https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/h30\\_hanbaidaka.pdf](https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/h30_hanbaidaka.pdf) (accessed on December 6th, 2020).
- 77) Noda, T., Murakami, K., Etoh, Y., Okamoto, F., Yatsuyanagi, J., Sera, N., Furuta, M., Onozuka, D., Oda, T., Asai, T., Fujimoto, S., 2015. Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken

- products in Japan. PLoS One 10, e0116927.
- 78) Noda, T., Murakami, K., Ishiguro, Y., Asai, T., 2010. Chicken meat is an infection source of *Salmonella* serovar Infantis for humans in Japan. Foodborne Pathog. Dis. 7, 727–735.
- 79) 能登 優, 高瀬識之, 高橋裕里香, 松本貴嗣, 吉川博文, 土金恵子, 細山哲, 藤田信之, 岡田憲典, 山根久和, 野尻秀昭, 2012. プラスミド保持に伴う負荷を軽減化する宿主染色体因子. 環境バイオテクノロジー学会誌, 12, 135–139.
- 80) 農林水産省, 2005. 鶏卵のサルモネラ総合対策指針.  
[https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e\\_kanri\\_kizyun/sa1/pdf/kei\\_ran\\_sogo.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e_kanri_kizyun/sa1/pdf/kei_ran_sogo.pdf) (アクセス日 2021 年 12 月 2 日)
- 81) 農林水産省, 2009. 薬剤耐性菌についての Q&A.  
[https://www.maff.go.jp/nval/tyosa\\_kenkyu/taiseiki/pdf/taiseikin\\_q\\_a\\_20100107.pdf](https://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/taiseikin_q_a_20100107.pdf) (アクセス日 2021 年 11 月 26 日)
- 82) Ochoa, J.T., and Santisteban-Ponce, J., 2019. *Salmonella* (non-typhoidal), vol 1. Elsevier, Philadelphia, PA, U.S.A.
- 83) 小栗克之, 三品和也, 杉山道雄, 荒幡克己, 1997. GP センターにおける加工卵製造と今後の展望. 岐阜大学農学部研究報告, 65–73.  
<http://repository.lib.gifu-u.ac.jp/bitstream/20.500.12099/5468/1/KJ00000737337.pdf> (アクセス日 2021 年 9 月 22 日)
- 84) Oliva, M., Monno, R., Addabbo, P., Pesole, G., Scrascia, M., Calia, C., Dionisi, A.M., Chiara, M., Horner, D.S., Manzari, C., Pazzani, C., 2018. IS26 mediated antimicrobial resistance gene

- shuffling from the chromosome to a mosaic conjugative FII plasmid. *Plasmid* 100, 22–30.
- 85) Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M.M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., Rossolini, G.M., 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4264–4269.
- 86) Papagiannitsis, C.C., Dolejska, M., Izdebski, R., Giakkoupi, P., Skalova, A., Chudejova, K., Dobiasova, H., Vatopoulos, A.C., Derde, L.P., Bonten, M.J., Gniadkowski, M., Hrabak, J., 2016. Characterisation of IncA/C<sub>2</sub> plasmids carrying an In416-like integron with the *bla*<sub>VIM-19</sub> gene from *Klebsiella pneumoniae* ST383 of Greek origin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 158–162.
- 87) Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connerton, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413, 848–852.

- 88) Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00088-17.
- 89) Parveen, S., Taabodi, M., Schwarz, J.G., Oscar, T.P., Harter-Dennis, J., White, D.G., 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *J. Food Prot.* 70, 2466–2472.
- 90) Perilli, M., Dell'Amico, E., Segatore, B., de Massis, M.R., Bianchi, C., Luzzaro, F., Rossolini, G.M., Toniolo, A., Nicoletti, G., Amicosante, G., 2002. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 40, 611–614.
- 91) Pether, J.V.S., Scott, R.J.D., 1982. *Salmonella* carriers; are they dangerous? A study to identify finger contamination with *Salmonellae* by convalescent carriers. *J. Infection* 5, 81–88.
- 92) Poirel, L., Decousser, J.W., Nordmann, P., 2003. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*<sub>CTX-M</sub>  $\beta$ -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2938-2945.
- 93) Riaño, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Sáenz, Y., Domínguez, L., Torres, C., 2006. Detection and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 58,

- 844–847.
- 94) Rodríguez, I., Thomas, K., Van Essen, A., Schink, A.K., Day, M., Chattaway, M., Wu, G., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B., 2014. Chromosomal location of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int. J. Antimicrob. Agents* 43, 553–557.
- 95) Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J., Hordijk, J., 2018. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 73, 1121–1137.
- 96) Saito, S., Koori, Y., Ohsaki, Y., Osaka, S., Oana, K., Nagano, Y., Arakawa, Y., Nagano, N., 2017. Third-generation cephalosporin-resistant non-typhoidal *Salmonella* isolated from human feces in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 70, 301–304.
- 97) Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M.E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., Calero-Cáceres, W., 2020. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *J. Appl. Microbiol.* 128, 1347–1354.
- 98) Sannat, C., Patyal, A., Rawat, N., Ghosh, R.C., Jolhe, D.K., Shende, R.K., Hirpurkar, S.D., Shakya, S., 2017. Characterization of *Salmonella* Gallinarum from an outbreak in Raigarh, Chhattisgarh. *Vet. World.* 10, 144–148.
- 99) 笹川千尋, 林哲也, 2008. 医科細菌学 (改訂第4版). 東京, 南江堂, 27–44.

- 100) Seemann, T., 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069.
- 101) Sekizuka, T., Yatsu, K., Inamine, Y., Segawa, T., Nishio, M., Kishi, N., Kuroda, M., 2018. Complete genome sequence of a *bla*<sub>KPC-2</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from the effluent of an urban sewage treatment plant in Japan. *mSphere* 3, e00314-18.
- 102) Shahada, F., Sekizuka, T., Kuroda, M., Kusumoto, M., Ohishi, D., Matsumoto, A., Okazaki, H., Tanaka, K., Uchida, I., Izumiya, H., Watanabe, H., Tamamura, Y., Iwata, T., Akiba, M., 2011. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2  $\beta$ -lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4114–4121.
- 103) Sherburne, C.K., Lawley, T.D., Gilmour, M.W., Blattner, F.R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D.J., Taylor, D.E., 2000. The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* 28, 2177–2786.
- 104) 品川邦汎, 1999. 卵及び卵加工品におけるサルモネラエンテリテイデイスの汚染とその対策. *食品衛生学雑誌* 40, 7–18.
- 105) Siddiqui, T.R., Bibi, S., Mustufa, M.A., Ayaz, S.M., Khan, A., 2015. High prevalence of typhoidal *Salmonella enterica* serovars excreting food handlers in Karachi-Pakistan: a probable factor



- for regional typhoid endemicity. *J. Health Popul. Nutr.* 33, 27.
- 106) Siguier, P., Filée, J., Chandler, M., 2006. Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 526–531.
- 107) Siguier, P., Gourbeyre, E., Chandler, M., 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 865–891.
- 108) Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M., 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32–36.
- 109) Sirichote, P., Hasman, H., Pulsrikarn, C., Schönheyder, H.C., Samulionienė, J., Pornruangmong, S., Bangtrakulnonth, A., Aarestrup, F.M., Hendriksen, R.S., 2010. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 48, 883–888.
- 110) Smet, A., Van Nieuwerburgh, F., Vandekerckhove, T.T., Martel, A., Deforce, D., Butaye, P., Haesebrouck, F., 2010. Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PLoS One* 5, e11202.
- 111) Sokal, R.R., Michener, C.D., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38, 1409–1438.

- 112) Someya, A., Otsuki, K., Murase, T., 2005. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* isolates obtained from layer chicken houses on a commercial egg-producing farm in Japan, 1997 to 2002. J. Food Prot. 68, 2030–2034.
- 113) 総務省統計局, 平成 27 年国勢調査.  
<https://www.stat.go.jp/data/kokusei/2015/kekka.html> (アクセス日 2021 年 9 月 23 日)
- 114) Sullivan, M.J., Petty, N.K., Beatson, S.A., 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. Bioinformatics 27, 1009–1010.
- 115) 食品安全委員会, 2010. 食品健康影響評価のためのリスクプロフィール ～ 鶏卵中のサルモネラ・エンテリティディス ～ (改訂版) .  
[https://www.fsc.go.jp/sonota/risk\\_profile/risk\\_salmonella.pdf](https://www.fsc.go.jp/sonota/risk_profile/risk_salmonella.pdf)  
(アクセス日 2021 年 9 月 21 日)
- 116) Tagg, K.A., Francois Watkins, L., Moore, M.D., Bennett, C., Joung, Y.J., Chen, J.C., Folster, J.P., 2019. Novel trimethoprim resistance gene *dfrA34* identified in *Salmonella* Heidelberg in the USA. J. Antimicrob. Chemother. 74, 38–41.
- 117) 高槻森水, 柳村俊介, 2015. 採卵養鶏業における大規模企業経営と家族経営の展開. 北海道大学農経論叢 70, 53–61.
- 118) Tate, H., Folster, J.P., Hsu, C.H., Chen, J., Hoffmann, M., Li, C., Morales, C., Tyson, G.H., Mukherjee, S., Brown, A.C., Green, A., Wilson, W., Dessai, U., Abbott, J., Joseph, L., Haro, J., Ayers, S., McDermott, P.F., Zhao, S., 2017. Comparative

analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. Antimicrob. Agents Chemother. 61, e00488-17.

- 119) United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. 2013. Foreign Animal Disease Preparedness and Response Plan (FAD PReP)/National Animal Health Emergency Management System (NAHEMS) Guidelines, Poultry Industry Manual.  
[https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/emergency\\_management/downloads/documents\\_manuals/poultry\\_ind\\_manual.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/emergency_management/downloads/documents_manuals/poultry_ind_manual.pdf) (accessed on October 5th, 2020).
- 120) U.S. Food and Drug Administration 2019. 2018 Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.  
<https://www.fda.gov/media/133411/download> (accessed on December 6th, 2020)
- 121) van Schothorst, M., Beckers, H.J., 1978. Persistent excretion of salmonellas. Br. Med. J. 2, 1301.
- 122) Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., Van Houdt, R., 2017. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. Crit. Rev. Microbiol. 43, 709–730.
- 123) Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., Šikić, M., 2017. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads.

Genome Res. 27, 737–746.

- 124) Vincent, A.T., Trudel, M.V., Paquet, V.E., Boyle, B., Tanaka, K.H., Dallaire-Dufresne, S., Daher, R.K., Frenette, M., Derome, N., Charette, S.J., 2014. Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7367–7374.
- 125) 和知野純一, 2020. 薬剤耐性獲得機構～グラム陰性菌を中心に～. *日本臨床微生物学会雑誌* 30, 1–12.
- 126) Wain, J., Diem Nga, L.T., Kidgell, C., James, K., Fortune, S., Song Diep, T., Ali, T., O Gaora, P., Parry, C., Parkhill, J., Farrar, J., White, N.J., Dougan, G., 2003. Molecular analysis of incHI1 antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2732–2739.
- 127) Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., Earl, A.M., 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* 9, e112963.
- 128) Weill, F.X., Demartin, M., Fabre, L., Grimont, P.A., 2004. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. *J.*

- Clin. Microbiol. 42, 3359–3362.
- 129) Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., Holt, K.E., 2017. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput. Biol. 13, e1005595.
- 130) Winokur, P.L., Vonstein, D.L., Hoffman, L.J., Uhlenhopp, E.K., Doern, G.V., 2001. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC  $\beta$ -lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2716–2722.
- 131) 山本 勲, 2015. 実証分析のための計量経済学 正しい手法と結果の読み方. 東京, 中央経済社, 93–103.
- 132) Yu, F., Chen, Q., Yu, X., Li, Q., Ding, B., Yang, L., Chen, C., Qin, Z., Parsons, C., Zhang, X., Huang, J., Luo, Y., Wang, L., Pan, J., 2011. High prevalence of extended-spectrum beta lactamases among *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from pediatric patients with diarrhea in China. PLoS One 6, e16801.
- 133) Zhang, D., Zhao, Y., Feng, J., Hu, L., Jiang, X., Zhan, Z., Yang, H., Yang, W., Gao, B., Wang, J., Li, J., Yin, Z., Zhou, D., 2019. Replicon-based typing of IncI-complex plasmids, and comparative genomics analysis of IncI  $\gamma$  /K1 plasmids. Front. Microbiol. 10, 48.
- 134) Zhang, L., Fu, Y., Xiong, Z., Ma, Y., Wei, Y., Qu, X., Zhang, H., Zhang, J., Liao, M., 2018. Highly prevalent multidrug-resistant

- Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. *Front. Microbiol.* 9, 2104.
- 135) Zhang, W.H., Lin, X.Y., Xu, L., Gu, X.X., Yang, L., Li, W., Ren, S.Q., Liu, Y.H., Zeng, Z.L., Jiang, H.X., 2016. CTX-M-27 Producing *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium and Indiana are prevalent among food-producing animals in China. *Front. Microbiol.* 7, 436.
- 136) Zhao, Q.Y., Chen, P.X., Yang, L., Cai, R.M., Zhu, J.H., Fang, L.X., Webber, M.A., Jiang, H.X., 2020. Transmission of plasmid-borne and chromosomal *bla*<sub>CTX-M-64</sub> among *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food-producing animals via *ISEcp1*-mediated transposition. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 1424–1427.
- 137) Zhao, S., Qaiyumi, S., Friedman, S., Singh, R., Foley, S.L., White, D.G., McDermott, P.F., Donkar, T., Bolin, C., Munro, S., Baron, E.J., Walker, R.D., 2003. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5366–5371.