

—学位論文—

神奈川県近隣で分離される
広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の分子疫学解析

2018年度

桐蔭横浜大学大学院 工学研究科

蓮沼裕也

目 次

第 1 章 序論	1
1. 抗菌薬の発見から現在に至るまで	1
2. 薬剤耐性菌の歴史	2
3. β -lactam 系抗菌薬と β -lactamase	4
4. その他の抗菌薬と耐性メカニズム	11
5. 現代における薬剤耐性菌の懸念と日本の監視耐性	13
6. 本実験の目的と構成	15
第 2 章 広域セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科の疫学調査	17
第 1 節 臨床検体由来 ESBL 産生 <i>Escherichia coli</i> の疫学調査	17
1. 緒言	17
2. 実験方法	19
1) 対象菌株の保存と薬剤耐性菌分離法・培養法	19
2) 薬剤感受性試験	19
3) DNA 抽出および CTX-M 型 ESBL 遺伝子の決定	20
4) ダイレクトシーケンスによる β -lactamase 遺伝子およびその他耐性遺伝子塩基配列同定法	20
5) <i>Escherichia coli</i> ST131 clade の分類	24
6) <i>qnr</i> 遺伝子の検出	24
3. 結果	25
1) 収集菌株の基本情報	25
2) 薬剤感受性試験	25
3) ESBL 遺伝子型別および CTX-M β -lactamase 遺伝子型別	25
4) <i>Escherichia coli</i> ST131 clade の分類	30
5) フルオロキノロン系薬に対する耐性機序	30
4. 考察	36
5. 結言	40
第 2 節 市販鶏肉における広域セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科の疫学調査	41
1. 緒言	41

2.	実験方法	45
1)	材料からの菌株分離・同定と薬剤感受性試験	45
2)	DNA 抽出および β -lactamase 遺伝子の検出	46
3)	<i>Escherichia coli</i> における MLST および Phylogenetic grouping	46
4)	Plasmid incompatibility typing	46
5)	統計解析	46
3.	結果	48
1)	国産および外国産鶏肉の比較と分離株の細菌学的特徴	48
2)	β -lactamase 遺伝子の保有状況と内訳	48
3)	<i>E. coli</i> の MLST および系統発生群別	52
4)	<i>E. coli</i> が保有する β -lactamase と Plasmid incompatibility typing	52
4.	考察	56
5.	結言	62
第 3 節	健常青年における薬剤耐性腸内細菌科の疫学調査	63
1.	緒言	63
2.	実験方法	64
1)	材料からの菌株分離と薬剤感受性	64
2)	DNA 抽出および β -lactamase 遺伝子の検出	64
3)	<i>Escherichia coli</i> ST131 clade 分類および Phylogenetic grouping	64
4)	統計解析	64
3.	結果	65
1)	分離株の細菌学的特徴	65
2)	β -lactamase 遺伝子の保有状況と内訳	65
3)	<i>Escherichia coli</i> ST131 および non ST131 の比較	70
4.	考察	72
5.	結言	76
第 3 章	特定の広域セファロスポリン系薬耐性 <i>Escherichia coli</i> 分離株の分子疫学的特徴	77
第 1 節	CTX-M-55 型 ESBL 産生 <i>Escherichia coli</i> の分子疫学的特徴	77
1.	緒言	77
2.	実験方法	78

1) 供試菌株	78
2) 薬剤感受性試験	78
3) 次世代シーケンス解析	78
3. 結果	80
1) 薬剤感受性試験	80
2) 次世代シーケンス解析	80
3) 比較ゲノム解析	80
4. 考察	86
5. 結言	89
第2節 <i>qnr</i> 保有 ESBL 産生 <i>Escherichia coli</i> の分子疫学的特徴	90
1. 緒言	90
2. 実験方法	92
1) 供試菌株	92
2) 薬剤感受性試験	92
3) 次世代シーケンス解析	92
3. 結果	93
1) 薬剤感受性試験	93
2) 次世代シーケンス解析	93
4. 考察	96
5. 結言	98
第3節 CMY-2 型 β -lactamase 産生 <i>Escherichia coli</i> と IncK plasmid の関連性	99
1. 緒言	99
2. 実験方法	101
1) 供試菌株	101
2) 接合伝達試験	101
3) 薬剤感受性試験	102
4) β -lactamase および Plasmid incompatibility type の決定	102
5) 次世代シーケンス解析	102
3. 結果	103
1) 接合伝達試験	103
2) 次世代シーケンス解析	103
4. 考察	108
5. 結言	110

第4章 総括	111
謝辞	116
参考文献	117
研究業績	133
主論文	133
副論文	133
学会発表（海外）	134
学会発表（国内）	136
表彰	140

第 1 章 序 論

1. 抗菌薬の発見から現在に至るまで

抗菌薬とは細菌に対して殺菌的あるいは静菌的に働く薬剤のことである。抗菌薬には、ある種の微生物が産生している物質を発見して精製することで得られたいわゆる抗生物質と、化学合成によって開発された合成抗菌薬がある。

抗菌薬の歴史は、合成抗菌薬であるサルバルサンから始まったとされている。サルバルサンは 1910 年、エールリヒと秦佐八郎によって合成され、当時は梅毒の治療薬として用いられた。一方で、抗生物質の最初の発見は、1928 年 Alexander Fleming によってなされ、この発見は科学におけるセレンディピティの代表の一つであると言っても過言ではない。即ち、黄色ブドウ球菌を培養していた際にコンタミネーションとして発育した *Penicillium chrysogenum* の周辺には黄色ブドウ球菌が発育しない現象から、A. Fleming は細菌に対して発育阻止効果がある物質を産生する微生物が存在することを報告した[1]。さらに 1940 年、E.B. Chain と H.W. Florey はこのペニシリンの単離抽出、精製に成功し[2]、精製されたペニシリン G は 1945 年から一般に用いられるようになった。この 3 名は、ペニシリン発見から精製による一連の感染症治療への貢献によってノーベル医学生理学賞を 1945 年に受賞している。その後、1950～1960 年代の 20 年間は抗生物質の Golden Age と呼ばれるほど、抗生物質が発見された[3]。そのうち、現在でも最も一般的に用いられている抗生物質は β -lactam 系抗菌薬である。 β -lactam 系抗菌薬は細菌の細胞壁合成阻害を作用機序とする抗菌薬であり、細胞壁をもたない真核生物であるヒトを始めとする動物には副作用が他の抗菌薬に比べて少ないとされている。さらに、 β -lactam 系薬以外にも蛋白質合成阻害や DNA 合成阻害による細菌細胞の生命活動を阻害することで抗菌効果を発揮する抗菌薬が現在まで多く発見され、製品化されてきた。

しかしながら現在では、 β -lactam 系薬をはじめとする抗菌薬に対して耐性を示す細菌がこれまで多く発見されており、抗菌薬の開発と耐性菌の出現は

時代とともに繰り返されている。その結果、近年の新規抗菌薬開発や発売は世界的に減少傾向にあり、大きな問題となっている[4]。

2. 薬剤耐性菌の歴史

薬剤耐性菌出現の原因は、ヒトが抗菌薬を使用し始めたことに起因するわけではない。抗菌薬に対する最初の耐性菌発見は、1940年に EP.Abraham と E.Chain によってなされ、ペニシリンを分解する酵素を産生する細菌が検出されたことが Nature に報告された[5]。ペニシリンが一般に発売されて用いられるようになったのは1945年であることから、ヒトが抗菌薬を使用する前から薬剤耐性菌は自然界に存在していたことがこの報告から窺える。さらには、2011年に D'Costa VM によって、3万年前の永久凍土から薬剤耐性遺伝子が同定されたことから、抗菌薬耐性の出現は自然現象の1つであることが強く裏付けられた[6]。ペニシリンを産生する *P. chrysogenome* が土壌などの環境中に存在することからも、抗菌性物質を産生する微生物の付近で細菌が共存するために薬剤耐性遺伝子を従来から保有していたであろうことは驚くべきことではない。

臨床的に問題となっている薬剤耐性菌の発見時期と抗菌薬の開発の歴史について、Fig.1に示す。特に、グラム陰性菌に対する抗菌薬とそれに対する薬剤耐性菌の出現は避けられず、抗菌薬の開発と耐性菌の発見を繰り返していることが窺える。グラム陰性菌の感染症に対しては、 β -lactam系、ニューキノロン系、アミノグリコシド系抗菌薬が主に用いられている。一方で、臨床現場では多剤耐性緑膿菌をはじめとする多剤耐性グラム陰性菌はこれら3系統以上の抗菌薬に耐性を示し、*in vitro*で感受性を示す抗菌薬がない株も散見される。これらの多剤耐性株はインテグロン構造という可動性遺伝子カセットなどに薬剤耐性遺伝子を組み込んで、消毒薬をも含む複数系統の薬剤に同時に耐性を示すメカニズムも報告されている[7]。そのため、抗菌薬耐性菌の疫学的特徴を調査するためには、単一系統薬剤のみの薬剤耐性遺伝子だけでなく、複数の薬剤系統耐性遺伝子に着目する必要がある。

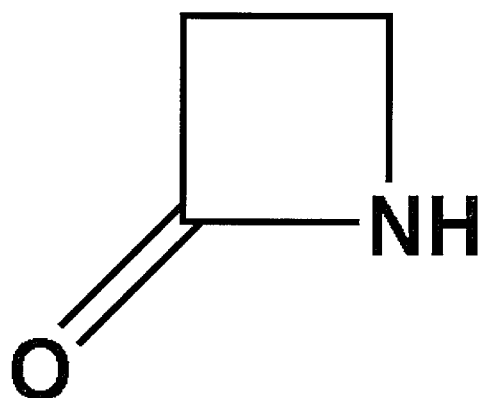
	Year	
1940 Penicillin-R <i>E. coli</i>	1940	
1944 Penicillin-R <i>S. aureus</i>		1943 Penicillin
	1950	1950 Tetracyclin
		1953 Erythromycin
1959 Tetracyclin-R <i>Shigella</i>		
	1960	1960 Methicillin
1962 Methicillin-R <i>S. aureus</i>		
1965 Penicillin-R <i>S. pneumoniae</i>		1967 Gentamicin
1968 Erythromycin-R <i>S. aureus</i>		
	1970	1972 Vancomycin
1979 Gentamicin-R <i>Enterococcus</i>		
1981 ESBL-producing <i>Enterobacteriaceae</i>	1980	
1987 Ceftazidime-R <i>Enterobacteriaceae</i>		1985 Imipenem Ceftazidime
1988 Imipenem-R <i>P. aeruginosa</i>		
	1990	
1988 Vancomycin-R <i>Enterococcus</i>		
1996 Vancomycin low-susceptible <i>S. aureus</i>		
Levofloxacin-R <i>S. pneumoniae</i>		1996 Levofloxacin
1998 Imipenem-R <i>Enterobacteriaceae</i>		
2000 Pan-drug-R <i>M. tuberculosis</i>	2000	2000 Linezolid
2001 Linezolid-R <i>S. aureus</i>		
2002 Vancomycin-R <i>S. aureus</i>		2003 Daptomycin
2004 Multidrug-R <i>P. aeruginosa/Acinetobacter</i>		
2011 Pan-drug-R <i>Enterobacteriaceae</i>	2010	2010 Ceftaroline
2011 Ceftaroline-R <i>Staphylococcus</i>		

Fig. 1 History for development of antimicrobial agents and emergence of their resistance

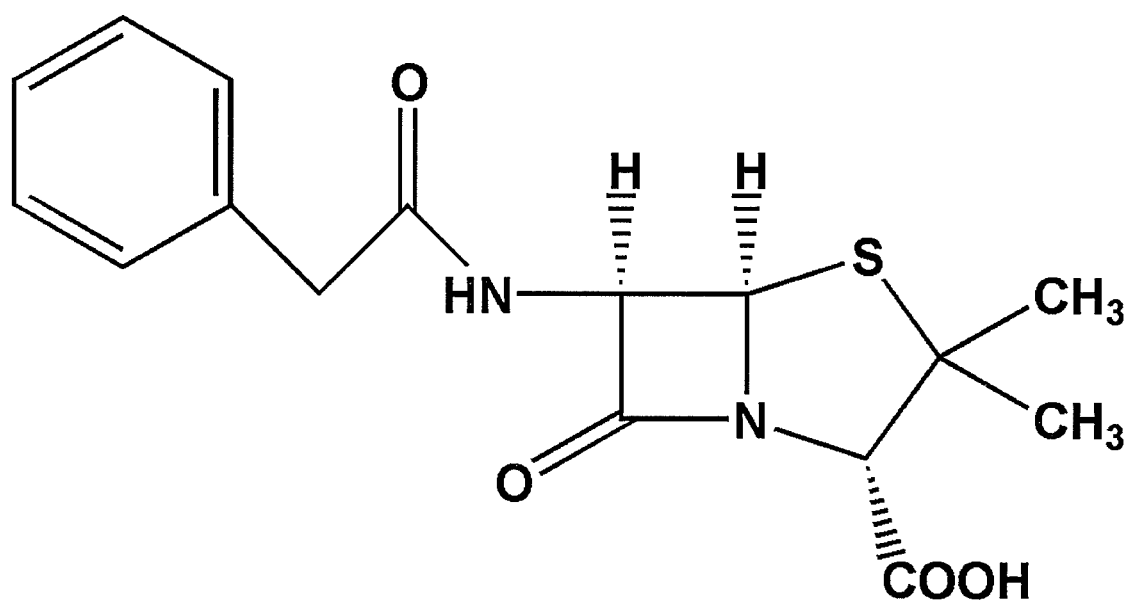
3. β -lactam 系抗菌薬と β -lactamase

抗生物質として最初に発見されたペニシリンは β -lactam 系抗菌薬に分類される。 β -lactam 系抗菌薬の代表であるペニシリンの基本骨格はアミノ酸のバリンとシステインからなり、この2つから形成される四員環を β -lactam 環とよぶ。ペニシリン系抗菌薬の基本骨格を Fig.2 に示す。 β -lactam 系抗菌薬は、細菌の細胞壁合成におけるトランスペプチダーゼ活性を有する Penicillin Binding Protein (PBP)を阻害することで殺菌効果を示すことが知られている [8][9]。細菌の細胞壁は細胞の固有形態を保持するために細胞膜の外側に存在し、ペプチドグリカンという特殊な構造を有している。ペプチドグリカン構造は横に *N*-acetylglucosamine と *N*-acetylmuramic acid が β 1-4 結合で続き、*N*-acetylmuramic acid に結合するペプチド構造が細胞壁の厚みをもたせている (Fig. 3) [10]。この構造を形成するためにはムレインモノマーがグリコシド結合し、ペプチド同士で結合する必要があるが、この末端の D-Ala-D-Ala 構造が β -lactam 系抗菌薬と類似する (Fig. 4) ためトランスペプチダーゼ活性を有する PBP は β -lactam 系抗菌薬と競合的に結合してしまい細胞壁合成が阻害される [11]。細菌の細胞壁合成阻害が起こると、菌体内の浸透圧変化や細胞膜を隔てた電気生理的状态に障害が起こることによって自己融解により細胞死へ繋がっていくと考えられている [12]。

β -lactam 系抗菌薬の開発は、ペニシリンを加水分解する酵素に耐性を有するメチシリンなどのように側鎖構造を置換することから始まり、 β -lactam 環とそれに付随する基本骨格が異なるセファロスポリン系薬、モノバクタム系薬、カルバペネム系薬などが開発されてきた。セファロスポリン系抗菌薬は β -lactam 環にヘテロ六員環が結合した構造をとり、開発された時代と抗菌スペクトルから第 1~5 世代に分類される。特に本研究において関連が深い、第 3~4 世代セファロスポリン系抗菌薬はグラム陰性菌である腸内細菌科や非発酵菌に幅広いスペクトルを有し、臨床的にも多く使用される抗菌薬である。また、セファロスポリン系抗菌薬の C7 位にメトキシ基($\text{CH}_3\text{-O=C7}$)を保有するセファマイシン系、セファロスポリン系の S が O に置換し、且つ C7 位にメトキシ基を保有するオキサセフェム系などが亜型として存在する。また、



β -lactam ring



Penicillin

Fig. 2 Chemical structure of basic β -lactam ring and penicillin agent

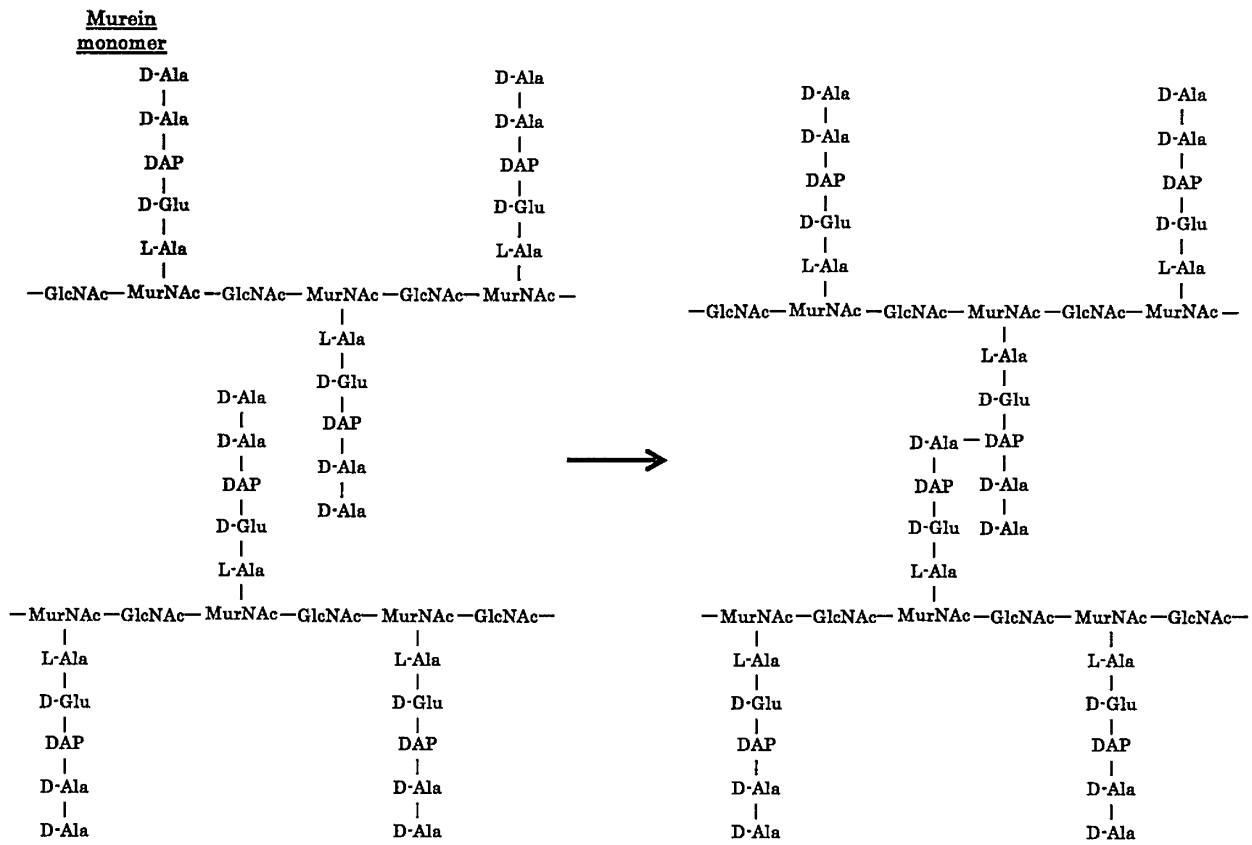


Fig. 3 Peptide-glycan structure of bacterial cell wall

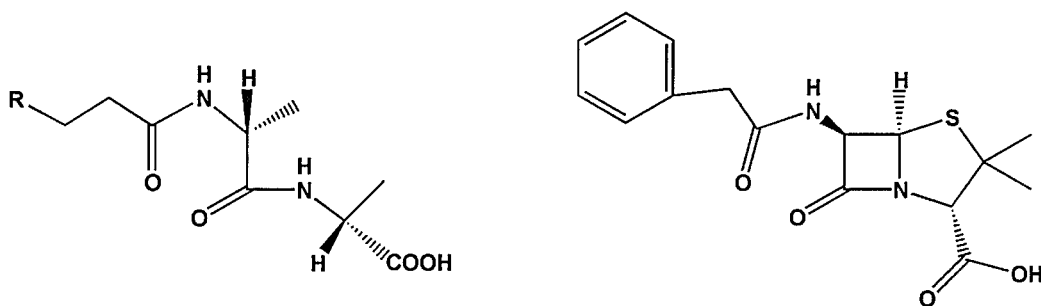


Fig. 4 Comparison of chemical structures between D-Ala constructed peptide-glycan and β -lactam antibiotics

モノバクタム系は β -lactam 環のみを有し、カルバペネム系はペニシリン系の S を C に置換した基本骨格をそれぞれが持つ(Fig.5)。とりわけ、カルバペネム系抗菌薬は、グラム陽性菌および陰性菌に最も広域な抗菌スペクトルであるが、特にグラム陰性菌に対しては、他の β -lactam 系薬が耐性となる菌株による感染症患者にも投与できるいわば「切り札」のような抗菌薬である。

一方、 β -lactamase は β -lactam 環のアミド結合を加水分解する酵素であるため、これを産生する菌株は基質となる β -lactam 系薬の種類に応じて耐性を示す。 β -lactamase はその触媒活性中心から、セリン- β -lactamase とメタロ- β -lactamase に分類され、さらに Amber はアミノ酸配列によって class A、B、C および D に分類した[13]。class A、C、D に分類されるセリン- β -lactamase は、 β -lactam 環に対して、アシル求核置換反応によりアシル-酵素中間体を経て、そこに H_2O が介して脱アシル化することで β -lactam 環を開環し不活化する(Fig.6)。そのため、class A、C および D を通じて β -lactamase におけるアミノ酸一次構造はほとんど相同性を有しないが、活性中心のセリンを始めとする少なくとも 8 カ所はアミノ酸配列が保存されていることが明らかとなっている[14]。さらに興味深いことに、PBP における β -lactam 系薬作用部位もセリンであり、相対するはずの両蛋白質がアミノ酸配列にその相同の保存配列を有することがわかっている。しかしながら、PBP が β -lactam 系薬によって阻害されてしまうのは、結合時のアシル-酵素中間体が安定であるため、 H_2O が介入せず β -lactam 系薬が PBP と離れないことによる不可逆的酵素阻害が起こるためである。 β -lactam 系薬を不活性化する酵素と、逆に β -lactam 系薬により不活性化される酵素が共通の祖先蛋白質をもつと考えられている[15]。

グラム陰性菌に広い抗菌スペクトルを有する第 3~4 世代セファロスポリン系薬を最適基質とする β -lactamase は、これまでに分類されるだけでも非常に多く報告されている。現在、日本で最も拡散している基質拡張型 β -lactamase (Extended-Spectrum β -lactamase; ESBL)は class A β -lactamase に分類されるセリン- β -lactamase で、元来ペニシリナーゼであった TEM 型、SHV 型 β -lactamase をコードする遺伝子の点変異によるものや、環境菌である *Kluyvera* 属が持つ β -lactamase を起源とする CTX-M 型などがある[16]。特に、CTX-M 型 ESBL

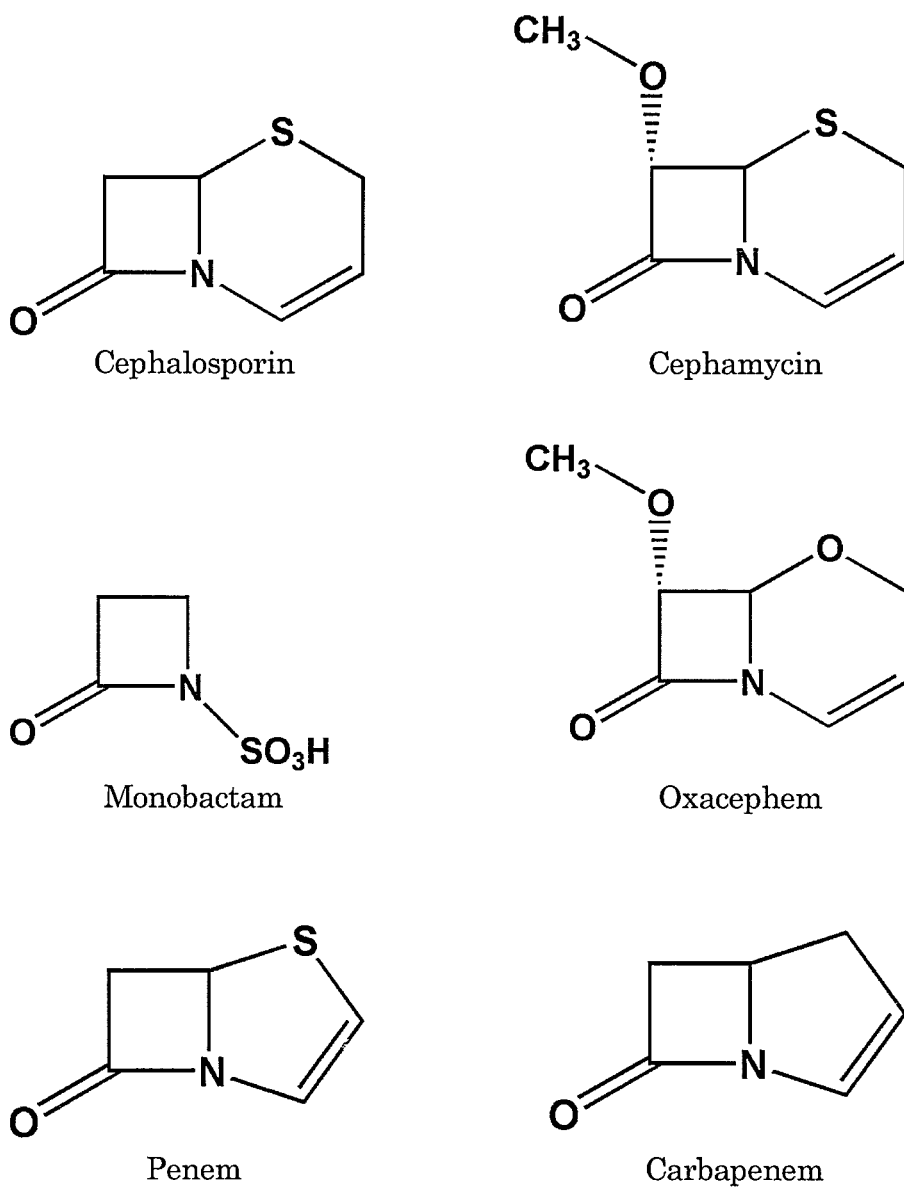


Fig. 5 Basic chemical structures of β -lactam antibiotics

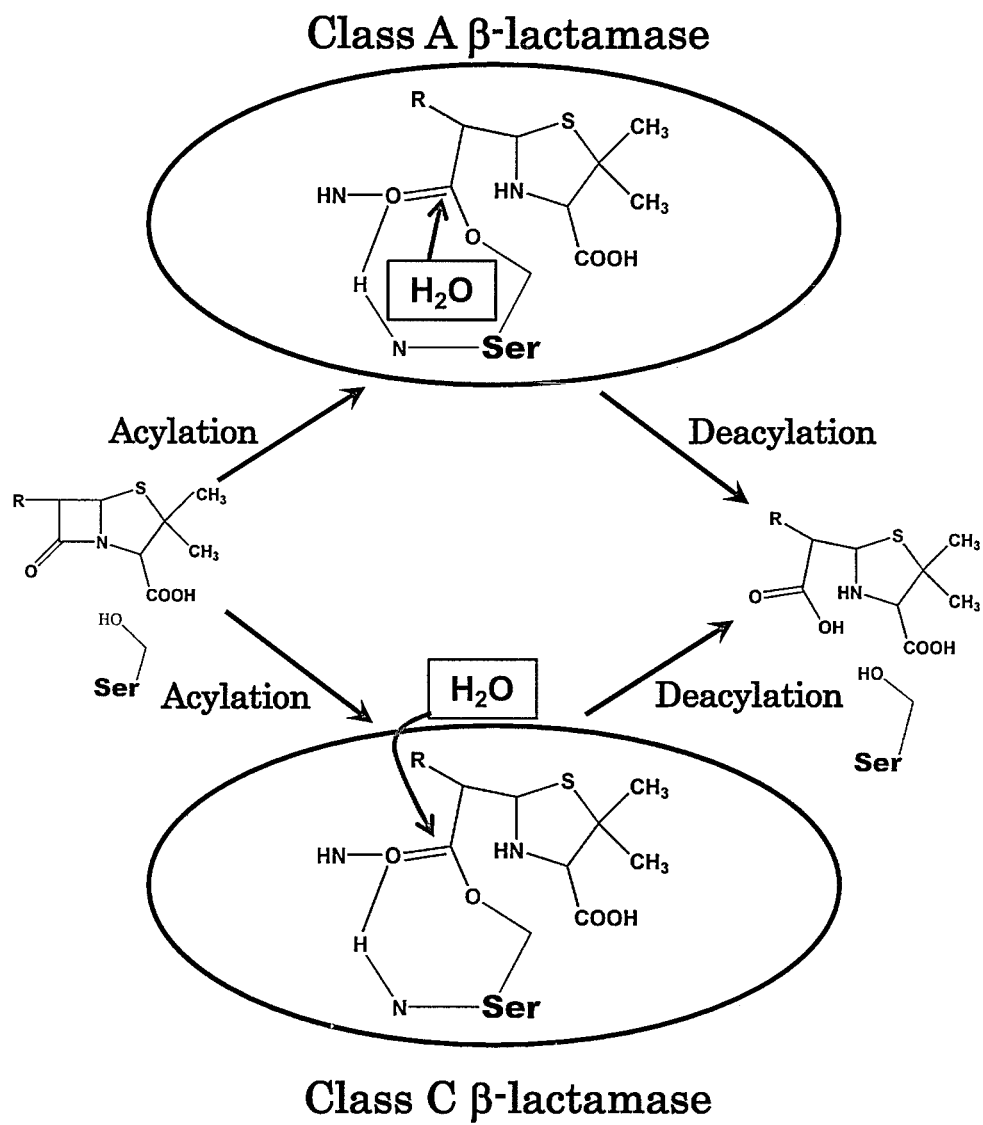


Fig. 6 Chemical reaction of β -lactam inactivated by β -lactamases

は Cefotaxime (CTX) を好適基質とし、第 3～4 世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬を広く分解する β -lactamase である。CTX-M 型酵素は 2018 年までに 221 の variant が報告されており[17]、主に 876bp の塩基配列と 291 のアミノ酸から成るその相同性は 90%以上、さらに 5つの group に分類された際の group 内の相同性は 94%以上である[18]。CTX-M 型酵素は主に Cefotaximase であり、第 2-3 世代セファロスポリン系薬においては CTX、Ceftriaxone (CTRX)、Cefpodoxime (CPDX)を効率に分解するが、アミノ酸変異によって Ceftazidime (CAZ)までも分解する variant も報告されている[19][20]。さらに、AmpC 型 β -lactamase も広域セファロスポリン系薬を分解できる β -lactamase である。AmpC 型 β -lactamase は class C β -lactamase に分類され、第 3 世代セファロスポリン系薬およびモノバクタム系薬を広く分解する β -lactamase である[21]。AmpC 型 β -lactamase は通常、腸内細菌科をはじめとするグラム陰性桿菌の染色体上に存在し、細菌が β -lactam 系薬と接触することで発現が誘導される。しかしながら、本来誘導型である本酵素が常に大量に産生される耐性株も出現しており、これらは脱抑制型もしくは構成型と呼ばれている。さらに近年、AmpC 型 β -lactamase 遺伝子が plasmid 上に存在することで菌種間を水平伝播する plasmid mediated AmpC β -lactamase (pAmpC) の存在が明らかとなっている。ESBL や AmpC 型などの広域 β -lactamase の基質特異性を Table1 に示す[22]。CTX-M 型 β -lactamase はセファマイシン系薬およびオキサセフェム系薬の分解能が弱くとし、一方で AmpC 型 β -lactamase は第 4 世代セファロスポリン系薬の分解能が弱いため、菌株の薬剤感受性パターンから β -lactamase を推定することも可能である。

4. その他の抗菌薬と耐性メカニズム

临床上、院内感染などの大きな問題となるグラム陰性菌に対する抗菌薬は、 β -lactam 系薬の他にニューキノロン系抗菌薬やアミノグリコシド系抗菌薬がある。キノロン系抗菌薬は、オールドキノロンおよびニューキノロンに分けられ、ニューキノロンは別名フルオロキノロンとも呼ばれ、構造中にフッ素を有する。その抗菌メカニズムは DNA 複製阻害であり、ニューキノロン系薬は DNA 複

Table 1 Antimicrobial susceptibility phenotype of *Enterobacteriaceae* producing β -lactamase

β -lactamase	ABPC	A/C	P/T	CEZ	CPDX	CMZ	CTX	CAZ	CFPM	AZT	FOX	IPM
Penicillinase	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cephalosporinase												
CTX-M type ESBL	R	S	S	R	R	S	R	S-R	S-R	R	S	S
TEM & SHV type ESBL	R	S	S	R	R	S	R	R	S-R	R	S	S
Chromosomal AmpC	R	R	S-R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
Plasmid mediated AmpC	R	R	S-R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
Carbapenemase	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

製に関与する DNA gyrase や TopoisomeraseIV と結合することで、DNA 複製時の DNA とそれらの酵素の結合を阻害する (Fig.7) [23]。一方、ニューキノロン系薬耐性メカニズムは DNA gyrase や TopoisomeraseIV におけるキノロン結合部位のアミノ酸変異が主な要因であり、グラム陰性菌では DNA gyrase をコードする *gyrA* における変異が、キノロン耐性に寄与する変異として最も高頻度であり MIC 上昇に対する関与も大きい[24]。さらには、キノロン系薬に対する耐性メカニズムには他に、その遺伝子が菌体内で染色体とは別に自己複製する plasmid 上に存在する plasmid mediated quinolone resistance; PMQR なども存在する[25]。

アミノグリコシド系抗菌薬は、30S リボソームに結合することで細菌の蛋白質合成を阻害する抗菌薬である。グラム陰性菌による感染症治療に対しては、Gentamicin (GM)、Amikacin (AMK)、Tobramycin (TOB)などが主に用いられる[26]。一方で、アミノグリコシド系薬耐性メカニズムとして標的リボソームの変異、16S リボソームメチル化酵素およびアミノグリコシド系薬修飾酵素による抗菌薬の不活化、薬剤排出ポンプなどの存在が報告されている[27]。

5. 現代における薬剤耐性菌の懸念と日本の監視耐性

現在の薬剤耐性菌に対する懸念は国際的にも医療分野にのみではなく、世界的な問題として取り上げられている。世界保健機構(WHO)は「One World, One Health」という考え方のもと、世界的に解決すべき感染症に関する問題として薬剤耐性菌、人畜共通感染症および高病原性鳥インフルエンザを挙げている。さらに、日本においてはいくつかの薬剤耐性菌(Antimicrobial resistance; AMR)に対して、その耐性率や分離率、および保有率を下げる具体的な目標として AMR アクションプラン 2020 が提案されている。そのなかでも、臨床分野においては分離株に対するフルオロキノロン耐性 *E. coli* の割合を 20%以下にすることや、家畜分野において家畜から分離される第3世代セファロスポリンおよびフルオロキノロン耐性 *E. coli* の分離率を G7 並みで現状維持することが目標とされている[28]。

日本における薬剤耐性菌サーベイランスは、医療分野において厚生労働省・

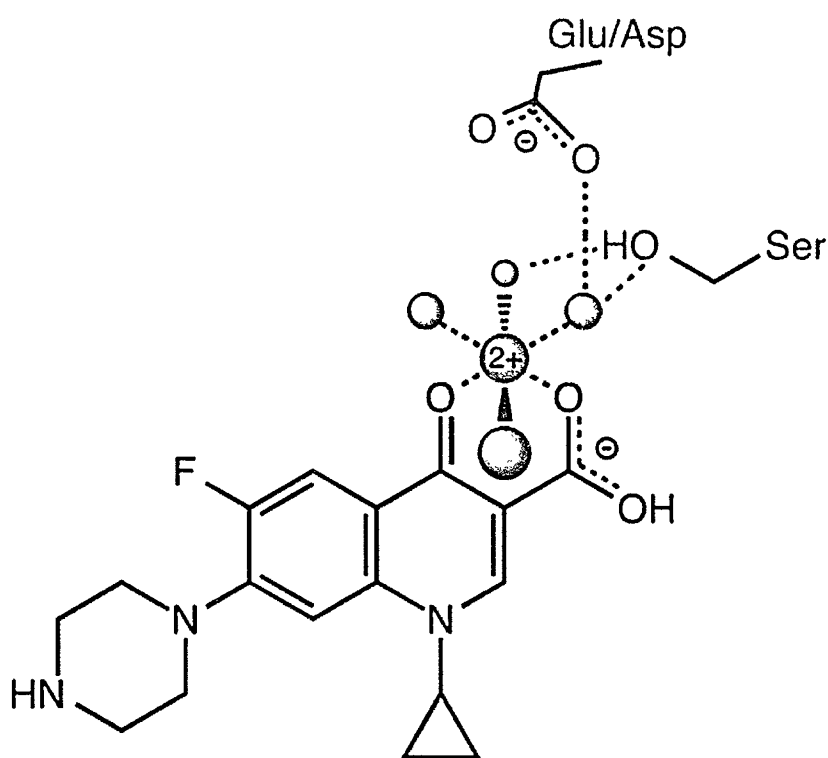
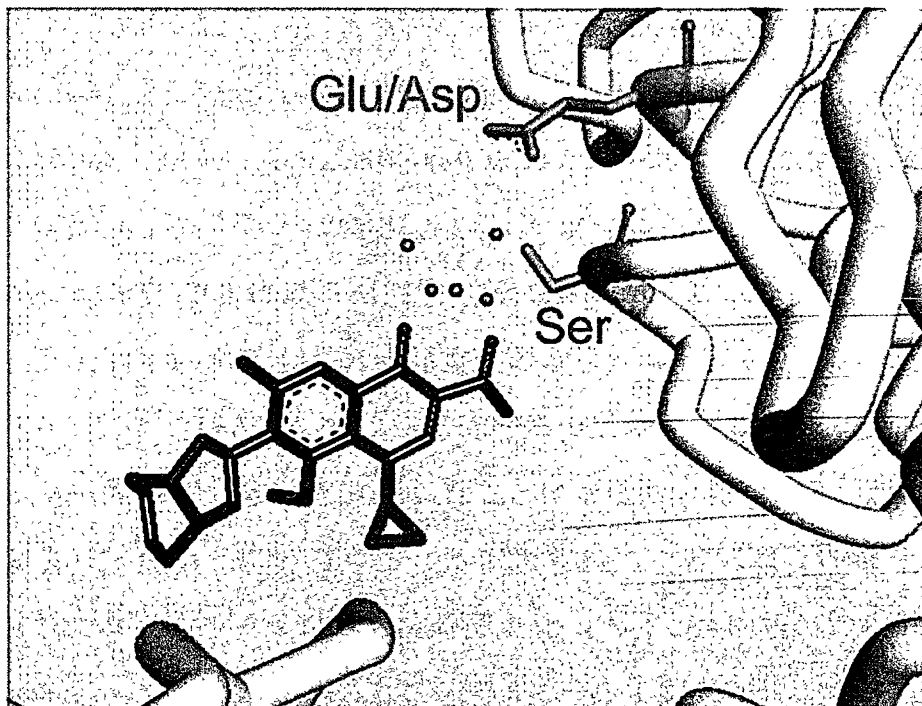


Fig. 7 Chemical structure of quinolone and antimicrobial molecular mechanism ²³

国立感染症研究所による院内感染対策サーベイランス事業（Japan Nosocomial Infections Surveillance; JANIS）と、家畜分野において農林水産省・動物医薬品検査所による動物由来薬剤耐性菌モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring; JVARM）がある。JANIS においては 2015 年時点で参加施設数は 8400 を超えており、500-899 床および 900 床以上の医療施設は日本全国にある医療施設のうちの 78% および 87% が参加している。一方、参加施設数の約 70% は病床数 200 床以下の医療施設であるが、日本全国の病床数 200 床以下の医療施設数に対する JANIS 参加施設の割合は 4% と著しく低いという問題点がある[29]。また、JVARM では各都道府県の動物衛生検査所がランダムに家畜糞便中の薬剤耐性菌分離率を調査することになっている[30]。しかしながら、ヒト環境とより接触が多いと考えられる市販食肉については JVARM の範囲ではない。いずれのサーベイランスも諸外国と比較して、全国規模の優れたサーベイランスシステムであると認められているが、一方で薬剤耐性遺伝子の拡散や市中に密接に関連した薬剤耐性菌の現状を詳細に把握することは現時点で困難なシステムであると考えられる。

6. 本論文の目的と構成

本論文の目的は、日本国内のヒト、動物、環境に拡散する最も一般的な広域セファロスポリン系抗菌薬耐性 *E. coli* をはじめとする腸内細菌科の分子疫学調査による現状把握から、将来の薬剤耐性菌制御の一助となる提言を論ずることである。

本論文は 4 章から構成され、実験項は 2 章および 3 章となっている。第 1 章序論では抗菌薬と薬剤耐性菌の歴史と現状、本論文にて着目している抗菌薬とその耐性機序について概して論じた。さらに、現在、日本国内で行われている薬剤耐性菌監視体制について概説し、その利点と欠点を論じることで、本論文の目的を明確にした。

研究内容は 2 つの章から成り、第 2 章は臨床検体、食肉、および健常人から菌株の収集と分子疫学調査を行い、その結果を他の論文と比較し考察した。第 3 章は第 2 章の実験で得られた菌株から、特に詳細な研究が必要と思われた株に

ついて分子生物学的手法を用いて、その特徴を明らかにした。

第 4 章においては総括として、本論の実験から得られた知見を基に、神奈川県および日本国内における薬剤耐性菌として広域セファロスポリン系薬および多剤耐性腸内細菌科、特に *Escherichia coli* の分子疫学的特徴についてまとめた。

第2章 広域セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科の疫学調査

第1節 神奈川県内で臨床分離された ESBL 産生 *Escherichia coli* の疫学調査

1. 背景

医療施設における薬剤耐性菌の拡散は、患者の平均在院日数の増加や治療難渋の原因となるだけでなく、医療経済を圧迫する要因の一つとなる。さらに、医療施設の機能分化が進み、施設間で患者の診療レベルが棲み分けられることにより、紹介や転院による患者の往来が活発になることは、地域内での耐性菌拡散の潜在的リスクとなる。薬剤耐性菌の拡散の抑制は時代の要請であり、そのための地域を包括した感染制御が求められている[31]。しかし、中枢病院のように高度医療を行わず、近隣市中の患者を多く受け入れている中小規模病院には細菌検査室がない施設も多く、そのような施設の多くは臨床検査センターにおいて細菌検査を実施している[32]。平成 27 年度の横浜における 300 床未満の病院の施設数は全体 78%を占め[33]、その多くが臨床検査センターに細菌検査を依頼していることが予想される。細菌検査室を持たない中小規模病院の薬剤耐性菌サーベイランスを臨床検査センターと連携して行うことは、地域に拡散する薬剤耐性菌の現状を直接的に把握することが可能で、地域の感染制御に有益な情報を与え、耐性菌蔓延防止および抗菌薬適正使用の手助けになると考えられる。

現在、広域 β -lactam 系抗菌薬耐性グラム陰性桿菌で世界的な問題となっているのは、ESBL 産生菌や pAmpC 産生菌、CRE が知られている[34]。これらの多くはプラスミド上にその遺伝子を有することから、遺伝子を多くの菌種間に拡散・伝播することができ、院内感染のみならず市中感染症の起因菌としても重要視されつつある。実際、本邦においても、ESBL 産生菌は院内感染症からの分離にとどまらず、市中への拡散も報告されており[35]、地域の感染制御を充実させる上で中小規模病院の広域 β -lactamase 産生菌の検出状況を把握することは重要である。

また、厚生労働省院内感染サーベイランス事業（JANIS）の調査によると、第3世代セファロスポリン耐性 *E. coli* は、2012～2016年の5年間でわずかで

はあるが増加傾向にあり、*E. coli*における広域 β -lactam 系薬耐性化の進行が示唆されている[36]。さらに、ESBL 産生菌の増加はカルバペネム系抗菌薬の使用量の増加に繋がり、CRE を選択する可能性があるため、ESBL 産生菌の薬剤感受性および分子疫学情報は治療に適切な抗菌薬を選定する上で重要な指標となる。グラム陰性菌に対して広域スペクトルを保有しているフルオロキノロン系薬は、臨床においても入院・外来診療で多く用いられている。広域セファロスポリン系薬に比べ、フルオロキノロン系薬に対して耐性を有する *E. coli* は、JANIS において *E. coli* 総分離株の約 30%を占めるとともに、保菌率も年々上昇している[36]。

そこで本研究では、神奈川県内の病床数 300 床以下の中小規模病院を対象に、ESBL 産生 *E. coli* の疫学情報を横断的かつ地域限定的に収集することを目的とした。さらに、臨床検査センターとの協力した薬剤耐性菌サーベイランス体制がもたらす有用性について考察した。

2. 実験方法

1) 対象菌株の保存と薬剤耐性菌分離・培養法

供試菌株として、2016年2月～10月に神奈川県内の300床以下の医療施設から臨床検査センターを経て分離されたESBL産生*E. coli* 207株を用いた。菌株に付随する基本情報は、検査材料、地域、分離された施設の病床数、診療科および入院／外来患者別とした。単一施設における同一患者から分離された菌株の重複は予め省いているが、患者転院により分離施設が異なる場合、同一患者から分離された菌株を含む可能性がある。

本論文でこれ以降に示す実験において用いる菌株は、カジトン培地（栄研化学）にて4℃保存、またはスキムミルク（日本BD）もしくは10%グリセロール（WAKO）にて-80℃保存した。保存された菌株は2μg/mL CTX（Sigma Aldrich）加ドリガルスキー寒天培地（栄研化学）にて分離し、単一コロニーを被検菌株として用いた。被検菌株を寒天培地上で純培養する際は、2μg/mL CTX 加ドリガルスキー寒天培地を用いた。また、被検菌株を液体培地にて増菌する際は、2μg/mL CTX 加LB培地（ナカライテスク）を用いた。培養温度はいずれも37℃とし、18～20時間培養した。

2) 薬剤感受性試験

供試菌株は、1 mL 滅菌生理食塩水にてMcFarland No.0.5の濁度に調製後、ミュラーヒントンス寒天培地に滅菌綿棒を用いて3方向から均一に塗布した。その後、0.016-256μg/mLのAmoxicillin/Clavulanic acid (AMPC/CVA)、0.016-256μg/mLのCefepime (CFPM)、0.002-32 μg/mLのImipenem (IPM)の計3種類の抗菌薬含有Etestストリップ（シスメックス・ビオメリュー）をMHAに配置した。Cefmetazole (CMZ、Sigma)、Ceftazidime (CAZ、Sigma)、Ciprofloxacin (CPF、Wako)、Gentamicin (GM、Wako)の薬剤感受性試験はClinical Laboratory Standard Institute (CLSI) に則って[37]、培地にはミュラーヒントンス寒天培地（栄研化学）を用いて、寒天平板希釈法にて行った。薬剤感受性の判定はCLSIの基準を用いた。また、Quality Control株として*Escherichia coli* ATCC 25922を用いた。なお、本論文でこれ以降に示す薬剤感受性試験において、寒天平板

希釈法による操作は上記の通り行った。

3) DNA 抽出および CTX-M 型 ESBL 遺伝子の決定

DNA 抽出する被検菌株は、平板培地にて分離された単一コロニーを、2 μ g/mL CTX 加 LB 培地(ナカライテスク)に接種して増菌したものを用いた。DNA 抽出は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用い、添付文書に従い行った。PCR の反応試薬は、TaKaRa *Ex Taq* (5units/ μ L)、10 \times Ex Taq Buffer (20mM Mg²⁺)、dNTP Mixture (2.5mM each)を使用し、サーマルサイクラーは 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)を用いた。本研究に用いたプライマーおよび PCR 反応条件は Table2 および 3 に示す[38][39][40][41][42]。PCR 反応終了後、Agarose gel (Lonza)電気泳動と臭化エチジウム (ニッポンジーン)染色にて遺伝子増幅産物を、トランスイルミネーター (ATTO) にて UV 検出した。なお、本論文でこれ以降に示す *bla*_{CTX-M} 検出のための PCR は上記の通り行った。

4) ダイレクトシーケンスによる β -lactamase 遺伝子およびその他耐性遺伝子塩基配列決定法

PCR にて増幅が認められた遺伝子の一部はダイレクトシーケンスによる塩基配列決定を行った。PCR 産物の精製には *illustra ExoProStar* (GE ヘルスケア)、または *Sephadex G-75* (GE ヘルスケア) を用いた。シーケンス反応は *BigDye Terminator v3.1* (Thermo Fisher Scientific) を用いた。シーケンス反応液組成および反応条件は Table2 および 4 に示す。さらに、シーケンス反応液の精製は、*Sephadex G-75* を用いた。シーケンス反応の蛍光検出は *Genetic Analyzer 3130xl* (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られたデータの *Electropherogram* は *Chromas Lite* にて確認し、Alignment 解析は *BioEdit* の *ClustalW* にて行った。なお、本論文でこれ以降に示す薬剤耐性遺伝子塩基配列決定のためのダイレクトシーケンスは上記の通り行った。

Table 2 Primers used in this study

Target	Primer name	Sequence (5' - 3' direction)	Amplicon size (bp)	Annealing temp (°C)	Ref
ESBL genotype					
<i>bla_{SHV}</i>	bla-SHV.SE	ATG CGT TAT CGC CTG TG	747	60	32)
	bla-SHV.AS	TGC TTT GTT ATT CGG AA			
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-164.SE	TCG CCG CAT ACA CTA TTC TCA GAA TGA	445	60	32)
	TEM-165.AS	ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT			
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M-U1	ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC	593	60	32)
	CTX-M-U2	TGG GTR ART TSA CCA GAA YCA GCG G			
CTX-M typing					
CTX-M-1 group	CTX-M-1 F	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC	415	52	33)
	CTX-M-1 R	AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT			
CTX-M-2 group	CTX-M-2 F	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	552	52	33)
	CTX-M-2 R	CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG			
CTX-M-8 group	CTX-M-8 F	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC	666	52	33)
	CTX-M-8 R	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C			
CTX-M-9 group	CTX-M-9 F	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	205	52	33)
	CTX-M-9 R	ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC			
CTX-M-25 group	CTX-M-25 F	GCA CGA TGA CAT TCG GG	327	52	33)
	CTX-M-25 R	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C			
DNA sequencing					
CTX-M-1 group	CTX-M-1 F	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC	415	52	33)
	CTX-M-1 R	AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT			
	CTXM1-F3	GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC			
	CTXM1-R2	AGC CGC CGA CGC TAA TAC A			
CTX-M-9 group	CTX-M-9 F	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	205	52	33)
	CTX-M-9 R	ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC			
	CTXM914F	GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG			
	CTXM914R	GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG			
	MultiCTXMGp9_for	TCA AGC CTG CCG ATC TGG T	561	60	35)
	MultiCTXMGp9_rev	TGA TTC TCG CCG CTG AAG			
Plasmid mediated AmpC					
FOX-1 to FOX-5b	FOX M F	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G	190	60	36)
	FOX M R	CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG			
MIR-1T ACT-1	EBCM F	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	302	60	36)
	EBCM R	CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT			
ACC	ACCM F	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	346	60	36)
	ACCM R	TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC			
DHA-1, DHA-2	DHAM F	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T	405	60	36)
	DHAM R	CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC			
LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1	CITM F	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA	462	60	36)
	CITM R	TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC			
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11	MOXM F	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	60	36)
	MOXM R	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C			

K: G or T, R: A or G, S: C or G, Y: C or T

Table 3 PCR conditions in this study

<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}					
10 × Ex Taq Buffer	1.5				
dNTP	1.2		First denature	94°C	2 min
Primer (F)	0.3	× 3	Denature	94°C	30s
Primer (R)	0.3	× 3	Annealing	56°C	30s 30cycle
Ex taq	0.12		Extension	72°C	2 min
Temp DNA	1.0		Final extension	72°C	2 min
DW	Up to 15 µL				
Total vol.	15 µL				
CTX-M grouping					
10 × Ex Taq Buffer	1.5				
dNTP	1.2		First denature	94°C	5 min
Primer (F)	0.2	× 5	Denature	94°C	25 s
Primer (R)	0.2	× 4	Annealing	60°C	30 s 30cycle
Ex taq	0.12		Extension	72°C	50 s
Temp DNA	1.0		Final extension	72°C	6 min
DW	Up to 15 µL				
Total vol.	15 µL				
pAmpC					
10 × Ex Taq Buffer	1.5				
dNTP	1.2		First denature	94°C	5 min
Primer (F)	0.3	× 6	Denature	94°C	1 min
Primer (R)	0.3	× 6	Annealing	60°C	30 s 30cycle
Ex taq	0.12		Extension	72°C	1 min
Temp DNA	0.3		Final extension	72°C	5 min
DW	Up to 15 µL				
Total vol.	15 µL				

Table 4 Direct sequencing condition in this study

Buffer (in house)	1.0	First denature	96°C	1 min
BigDye terminator	2.0	Denature	94°C	10 s
Primer (F)	0.36	Annealing	50°C	5 s 25cycle
PCR product	1.0	Extension	60°C	4 min
DW	Up to 10 μ L			
Total vol.	10 μL			

5) *Escherichia coli* ST131 clade の分類

E. coli における Sequence type の決定は、Matsumura らの方法を用いた[43]。菌株から抽出した DNA は TaKaRa *Ex Taq* (5units/ μ L)、10×*Ex Taq* Buffer (20mM Mg^{2+})、dNTP Mixture (2.5mM each) を使用し、サーマルサイクラーは 2720 Thermal Cycler にて増幅した。PCR 反応条件は 98°C 1 分の後、98°C 10 秒、57°C 20 秒、72°C 40 秒を 30 サイクル行い、最終伸長 72°C 1 分とした。PCR 反応終了後、2.0% Agarose gel 電気泳動と臭化エチジウム染色にて遺伝子増幅産物を、トランスイルミネーターにて UV 検出した。

6) *qnr* 遺伝子の検出

qnr 遺伝子の検出は Cattoir らの方法に従い、multiplex PCR により行った[44]。菌株から抽出した DNA は TaKaRa *Ex Taq* (5units/ μ L)、10×*Ex Taq* Buffer (20mM Mg^{2+})、dNTP Mixture (2.5mM each) を使用し、サーマルサイクラーは 2720 Thermal Cycler にて増幅した。PCR 反応条件は 95°C 5 分のあと、95°C 15 秒、60°C 20 秒、72°C 1 分を 30 サイクル行い、最終伸長 72°C 5 分とした。PCR にて増幅が認められた *qnr* 遺伝子は、検出と同様のプライマーを用いてダイレクトシーケンスによる塩基配列決定を行った。PCR 産物の精製には *illustra ExoProStar* を用いた。シーケンス反応は *BigDye Terminator v3.1* を用いた。シーケンス反応液組成および反応条件は Table4 に示す。さらに、シーケンス反応液の精製は、*Sephadex G-75* を用いた。シーケンス反応の蛍光検出は *Genetic Analyzer 3130xl* を用いた。得られたデータの Electropherogram は *Chromas Lite* にて確認し、Alignment 解析は *BioEdit* の *ClustalW* にて行った。

3. 結果

1) 収集菌株の基本情報

供試菌株 207 菌株が分離された医療施設の内訳は、横浜地区では 117 株 (57%)、川崎地区では 29 株 (14%)、鎌倉地区 (鎌倉市および逗子市) では 27 株 (13%)、湘南地区 (茅ヶ崎市、平塚市および藤沢市) では 22 株 (11%) および相模原地区 (厚木市、海老名市、相模原市および大和市) では 12 株 (6%) であった。検査材料は、泌尿器系が 64%、呼吸器系が 32%、皮膚軟部組織が 4% であった。分離株の由来医療施設の病床数は、100 床未満が 20%、101~200 床が 63%、201~300 床が 16% であった。入院/外来患者別の内訳は、入院患者が 81%、外来患者が 14% あり、不明が 5% であった (Table 5)。

2) 薬剤感受性試験

供試菌株 207 株における薬剤感受性試験と MIC パラメータの結果を Table 6 に示す。CAZ および CFPM の耐性率はそれぞれ 50% および 31% であったのに対し、CMZ の耐性率は 5% であった。また、CPFX は 93% でほとんど耐性を示した。一方、全ての株は IPM に感性を示した。神奈川県内および地域別の感受性結果を Fig. 8 に示す。地域別では、CAZ に対する耐性率は湘南地区が最も高く、68% であった。次いで、鎌倉地区で 63%、横浜地区で 50% を示した。さらに、湘南地区では CMZ に対する耐性率も高く、23% であった。一方、川崎地区および相模原地区は、他の地域に比べ、CPFX または GM を除く抗菌薬に対する耐性率が低い傾向となった。CTX-M group 別の耐性率を Table 7 に示す。その結果、CAZ は CTX-M-1 group において顕著に高い耐性率を示した。

3) ESBL 遺伝子型別および CTX-M β -lactamase 遺伝子型別

ESBL 型別は 207 株のうち、203 株で CTX-M 型が陽性となった。さらに、その内訳は CTX-M-1 group が 64 株 (31%)、CTX-M-2 group が 6 株 (3%)、CTX-M-9 group が 128 株 (62%) であった。また、複数の CTX-M 型遺伝子が陽性となった株が 5 株あった。

Table 5 Distribution of basic data in clinical isolates

Specimens	Number of strain	Regions	Number of strain
Urinary tracts	132	Yokohama	117
Urine	(96)	Kawasaki	29
Catheterized urine	(36)	Kamakura	27
Respiratory	66	Kamakura	(24)
Sputum	(29)	Zushi	(3)
Aspirated sputum	(35)	Shonan	22
Pharyngeal swab	(2)	Chigasaki	(11)
Skin and soft tissue	8	Fujisawa	(7)
Pressure wound	(6)	Hiratsuka	(4)
Purulent fluid	(2)	Sagamihara	12
Blood	1	Sagamihara	(6)
		Ebina	(3)
		Atsugi	(2)
		Yamato	(1)
Beds	Number of strain	In/out	Number of strain
<=100	42	Inpatient	167
101-200	131	Outpatient	29
201-300	34	Unknown	11

Table 6 Resistance rate and MIC parameter

Antimicrobial agents	Resistance rate (%)	MIC Range($\mu\text{g/mL}$)		MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		Min	Max		
AMPC/CVA	25	1	>256	8	16
CMZ	5	≤ 0.5	>32	2	8
CAZ	50	0.094	>256	4	32
CFPM	31	0.016	>256	4	64
IPM	0	0.064	0.38	0.13	0.25
CPFX	93	0.38	>32	>32	>32
GM	26	≤ 0.5	>16	1	>16

AMPC/CVA: Amoxicillin/Clavulanic acid, CMZ: Cefmetazole, CAZ: Ceftazidime, CFPM: Cefepime, IPM: Imipenem, CPFX: Ciprofloxacin, and GM: Gentamicin

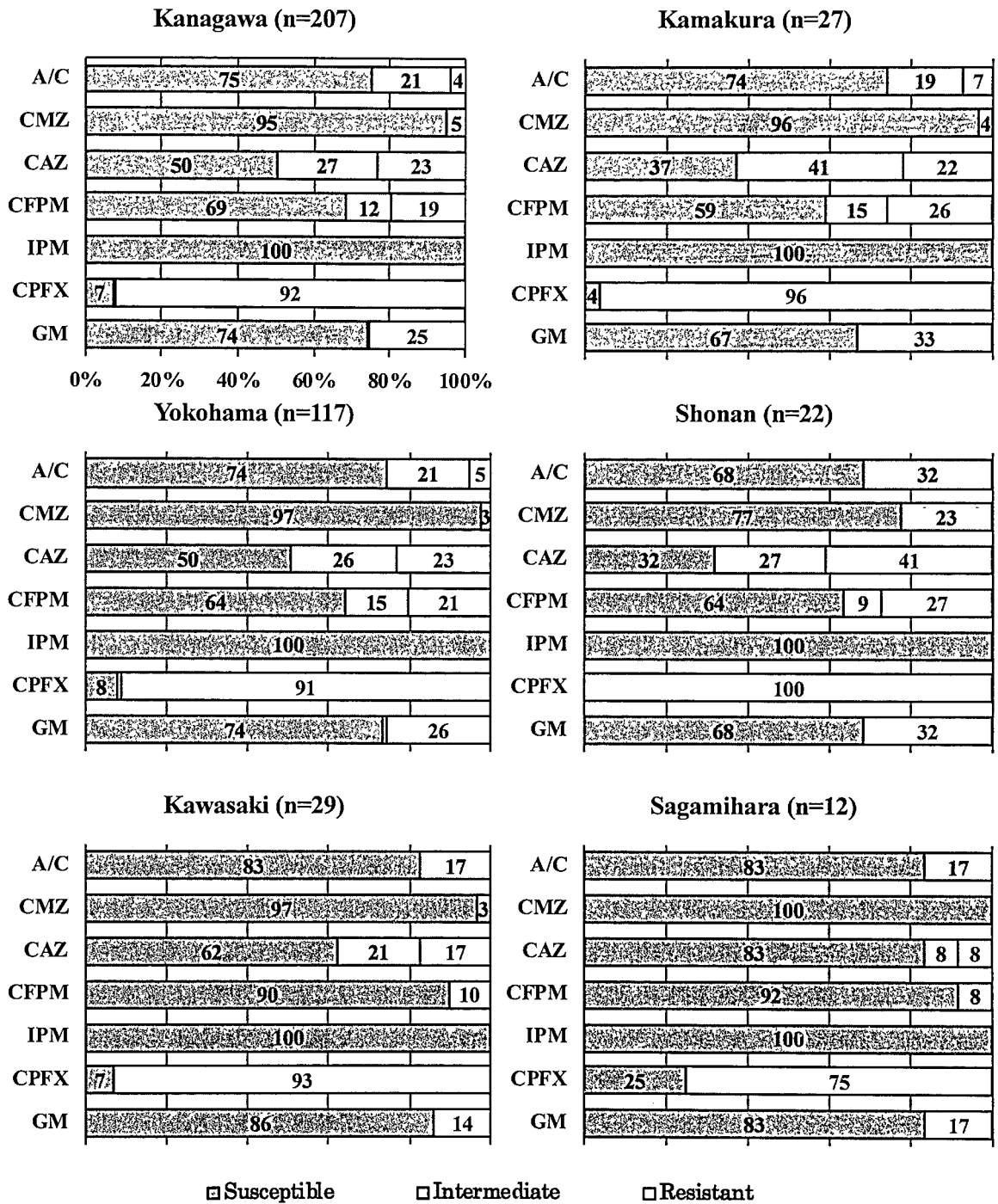


Fig. 8 Antimicrobial susceptibility rate (%) in Kanagawa prefecture and each region

Table 7 Comparison of resistance rate among CTX-M group of ESBL

Antimicrobial agents	Resistance rate (%)		
	CTX-M-1 (n=64)	CTX-M-2 (n=6)	CTX-M-9 (n=128)
AMPC/CVA	41	33	16
CMZ	13	0	1
CAZ	95	17	29
CFPM	66	50	14
IPM	0	0	0
CPFX	98	83	92
GM	44	17	17

AMPC/CVA: Amoxicillin/Clavulanic acid, CMZ: Cefmetazole, CAZ: Ceftazidime, CFPM: Cefepime, IPM: Imipenem, CPFX: Ciprofloxacin, and GM: Gentamicin

TEM 型陽性株は 75 株で、SHV 型陽性株は 1 株であった。さらに、CTX-M 型が陰性であった 4 株のうち、TEM 型および SHV 型が陽性となった株が 1 株ずつあった。TEM 型陽性株において、CTX-M-1 group は 26 株、CTX-M-2 group は 2 株および CTX-M-9 group は 47 株が陽性であった。

CTX-M group の地域別疫学データを Fig. 9 に示す。神奈川県内全体としては CTX-M-9 group が最も多く、62%を占めた。地域別では、湘南地区は CTX-M-1 group、相模原地区は CTX-M-2 group、川崎地区は CTX-M-9 group が最も優位であった。

CTX-M β -lactamase 遺伝子型別の結果を Table 8 に示す。シーケンス解析の結果、CTX-M-1 group 陽性 64 株のうち CTX-M-15 保有株が 51 株で最も優位であった。また、CTX-M-9 group 陽性 128 株のうち CTX-M-14 保有株が 58 株、CTX-M-27 保有株が 64 株と多くを占めた。地域別に最も優位であった CTX-M 型は、横浜地区では CTX-M-14、川崎、鎌倉および相模原地区では CTX-M-27、湘南地区では CTX-M-15 であった。

4) *Escherichia coli* ST131 clade の分類

E. coli ST131 の Clade 分類の結果を Table 9 に示す。*E. coli* ST131 は 207 株中 175 株 (87%) で決定された。さらに、*E. coli* ST131 のうち、97%の株はフルオロキノロンに耐性を示すとされる CladeC に分類された。

CladeC Subclade の内訳は、*bla*_{CTX-M-27} および *bla*_{CTX-M-15} 保有菌株がそれぞれ CladeC1-M27 および CladeC2 の大部分を占めた。入院および外来患者の内訳は、いずれの Clade も入院患者が優性であったが、*E. coli* ST131 CladeC SubcladeC1-M27 および non ST131 において、やや外来患者由来の比率が高かった (Table 10)。

5) フルオロキノロン系薬に対する耐性機序

qnrS 遺伝子は 207 株中 4 株 (1.9%) から検出された。さらにダイレクトシーケンス解析により、*qnrS1* が 3 株、*qnrS2* が 1 株決定された。また、*E. coli* ST131 CladeC における CPF_X 耐性率は 100%だったが、CladeA において

Table 8 Geographical distribution of CTX-M type genes in Kanagawa prefecture

Region	CTX-M-1 group (n=64)				CTX-M-2 group	CTX-M-9 group (n=128)				Others	Total
	M-3	M-15	M-55	ND		M-14	M-27	M-65	M-134		
Yokohama	2	31	5	0	4	38	28	2	0	4	114
Kawasaki	0	5	0	0	0	7	14	0	3	0	29
Kamakura	0	5	2	0	1	8	11	0	0	1	28
Shonan	2	8	1	1	0	3	6	0	0	0	21
Sagamihara	0	2	0	0	1	2	5	1	0	0	11
Total*	4 (6%)	51 (80%)	8 (13%)	1 (2%)	6	58 (45%)	64 (50%)	3 (2%)	3 (2%)	5	203

Others: CTX-M-2 group or multiple CTX-M type or negative

Table 9 Sequence type of *E. coli* and its distribution of clade type in *E. coli* ST131

ST/Clade	CTX-M type								Total
	M-3	M-15	M-55	M-2	M-14	M-27	M-65	M-134	
ST131									175
A					4	1			5
B									0
C1	2		3	1	34	12	1		54
C1-M27		1			2	51		3	57
C2	2	48		3	4		1		58
other C					1				1
non ST131		2	5	2	13		1		23

CPF_X 耐性株は認めなかった (Table 10)。

Table 10 Clade type of *E. coli* ST131 and distribution of basic data

ST/Clade	In/Out			CPFX category			Total
	Outpatient	Inpatient	unknown	S	I	R	
ST131							
A	0 (0)	5 (100)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	5
C1	5 (9)	45 (82)	4 (7)	0 (0)	0 (0)	54 (100)	54
C1-M27	12 (21)	41 (73)	4 (7)	0 (0)	0 (0)	57 (100)	57
C2	5 (8)	55 (87)	3 (5)	0 (0)	0 (0)	63 (100)	63
other C	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1
.....							
non ST131	6 (22)	21 (78)	0 (0)	10	1	16	27

4. 考察

本研究は、神奈川県内の病床数 300 床以下の中小規模病院を対象に、ESBL 産生 *E. coli* の疫学情報を横断的かつ地域限定的に収集した。近年の類似調査では、単一施設における報告[45]や総 *E. coli* 分離株から算出される ESBL 保有率についての報告が中心であり[46]、短期間で収集された 200 株以上の ESBL 菌株に関する調査報告はない。さらに、本研究では臨床検査センターにて分離された菌株を対象としているため、院内に細菌検査室を保有しない医療施設を含めた神奈川県内および隣接地域への ESBL 産生 *E. coli* の疫学情報を捉えられた。

収集された菌株 207 株のうち、泌尿器系や呼吸器系検査材料から分離された菌株が多かったことから、ESBL 産生 *E. coli* は尿路感染症や呼吸器感染症の原因菌として重要であることが推察される。このことは、これまでの報告[47][48]と一致する。さらに、分離株の 14%が外来患者由来であったことから、院内感染のみならず市中感染症の起原菌としての可能性も推察された。Yong Chong[35]らは 2003 年～2011 年における外来患者の ESBL 検出率が年々増加し、2011 年には外来患者から分離した *E. coli* の 14%が ESBL 産生菌であったと報告している。

ESBL 産生菌に対する第一選択薬はカルバペネム系薬であるが[49]、本研究で IPM 耐性率が 0%であったことは中小規模病院でのカルバペネム系薬耐性菌が発生していないことを明らかにした。一方、ESBL 産生腸内細菌科細菌に対してセファマイシン系薬である CMZ の有効性が示されており[50]、本研究においても CMZ に対する耐性率は 5%と低かった。また、カルバペネム系薬使用による CRE 選択のリスクを避けるため、CMZ、faropenem[51]等による治療効果について既に報告がなされており、地域毎の薬剤感受性データと合わせて CRE の選択を防ぐための抗菌薬適正使用に有用となる可能性がある。CAZ に対する耐性率は横浜地区、鎌倉地区および湘南地区で高かった。これらの地域では CAZ に耐性を示す *bla*_{CTX-M} 型を保有している株数が多かったことがこの要因であると考えられる (Table 4)。一方、相模原地区は、他の地区と比較して、GM を除く抗菌薬に対する耐性率が低かったことから、神奈川県内におい

ても他の地域との医療機関間での患者の行き来が少なく、同一菌株の拡散が起こり難いことが推測できる。

このように、本論文の一つの示唆は、同一県内においても地域によって、薬剤感受性が大きく異なることを示したことである。一方、本研究の課題は、個々の医療施設や地域の AUD (Antimicrobial use density) / DDD (Defined daily dose) と薬剤感受性データとを比較できなかつたことである。橋本らは、地域感染制御連携の一環として、地域の AUD とカルバペネム耐性 *Pseudomonas aeruginosa* の検出率とを比較している [52]。より質の高い地域の耐性菌サーベイランスを実現するためには、各地域における中小規模病院の AUD モニタリングが必要とされる。

本邦で分離される ESBL 産生菌の 90%以上が CTX-M 型遺伝子を保有している。さらに、2000 年頃から CTX-M-9 group が主流となったことが Suzuki らにより報告されている [53]。本研究では、神奈川県内中小規模施設由来 ESBL 産生 *E. coli* の CTX-M 型の割合は、CTX-M-9 group が 62%と大部分を占め、Suzuki らの報告と同様な傾向を示した。しかし、CAZ を分解できるアミノ酸置換 (D240G) を保有する CTX-M 型 (CTX-M-15、-55 および-27) ESBL も 59%検出された。世界的な流行株となっている *E. coli* O25b-B2-ST131 株は CTX-M-15 [54]、CTX-M-14 および CTX-M-27 を産生する [45]。さらに近年では、*E. coli* における病原因子遺伝子の 1 つである *fimH* の allele に基づいて *E. coli* ST131 の Clade 分類が提案され、Mastumura らによると CladeC はニューキノロン系薬に対しても耐性を示すことが知られている [43]。神奈川県内中小規模病院から分離される ESBL 産生 *E. coli* における CPFX の耐性率は 93%であった。この理由として、本研究で対象とした *E. coli* における ST131 の割合が全体の 87%を占め、さらにそのうち CladeC が 98%を占めたためであることが明らかとなった。これは、*bla*_{CTX-M-15} を保有した *E. coli* O25b-B2-ST131 をはじめとする pandemic clone の拡散が急性期病院のみならず、中小規模病院にも及んでいることを示唆する。今後、中小規模病院において、*E. coli* O25b-B2-ST131 や他の pandemic clone である ST405 [54]がどのように拡散していくかを明らかにすることは、地域における感染制御を充実させていく上で重要である。さらに、

主に家畜から分離されていた CTX-M-55 型 ESBL 産生 *E. coli* [55]が、近年、院内感染[56]や糞便保菌[57]など、ヒトから分離されたという報告も増えている。本研究においても CTX-M-55 型は CTX-M-1 group のうち 13%を占めており、今後、その拡散が懸念される。一方で、PMQR の 1 つである *qnr* 遺伝子の保有率は 1.9%と高くはなかった。*qnr* 遺伝子の一部は環境や畜産分野からの拡散が疑われており、欧州では市販鶏肉から分離される腸内細菌科が効率的に保有していることが報告されている [58]。近年、懸念されているインテグロン中に *bla*_{CTX-M} 遺伝子とともにニューキノロン系やアミノグリコシド系耐性遺伝子を載せて多剤耐性を示す ESBL 産生菌の存在[59]については今後、より詳細に調査を行っていく必要がある。Fig. 1 に示すように CPFX や GM に対して耐性を示す菌株が収集された結果からもその傾向が認められる。

これまでの、本邦における類似のサーベイランスにおいて *qnrS2* 保有 *E. coli* および CTX-M-134 型 ESBL 産生 *E. coli* の検出は本研究が最初の報告であろう。CTX-M-134 に関しては、Castanheira らが外科手術後の *E. coli* ST131 株 1 株について、感受性プロファイルおよび接合伝達試験を報告している [60]。結果を示してはいないが、本研究において、*bla*_{CTX-M-134} 陽性株に対する CAZ の MIC は 1.5-2 µg/mL であった。一方、Castanheira らが報告した株に対しては、分離株および接合伝達株の CAZ に対する MIC は、それぞれ 4 および 8 µg/mL であった。CTX-M-134 は D240S を有しているが、CTX-M 型 ESBL の CAZ に対する MIC の上昇に関わる 240 番目アミノ酸残基がセリン由来のヒドロキシル基であるため、CTX-M-15 (CAZ の MIC 32->256µg/mL) 20) ほど CAZ の MIC の上昇が認められないと考える。*qnrS2* は環境中から分離される *Aeromonas* 属菌などに保有されていることが報告されている [61][62]。しかしながら、*qnrS2* を保有した *E. coli* の存在は未だ報告されていない。本研究において得られた *qnrS2* 保有 *E. coli* は全ゲノム解析などにより *qnrS2* 周辺遺伝子や保有 *E. coli* 株の遺伝的背景を明らかにすることでその由来を推定する必要がある。

このように、中小規模医療施設から分離される薬剤耐性菌のサーベイランスは、地域の中核病院などによる単独施設のサーベイランスに比較して、施設による偏りが少なく、保有率が低い薬剤耐性遺伝子や環境由来遺伝子の発見に有

用であることが示唆された。

5. 結言

本研究は、単一県内において中小規模医療施設から分離された ESBL 産生 *E. coli* の地域特性を明らかにした横断的研究である。単一県内であっても、地域によって薬剤感受性疫学データは異なることが示された。神奈川県内の中小規模病院から分離された ESBL 産生 *E. coli* は pandemic clone である CTX-M-15 保有株およびこれまで国内で優位であった CTX-M-14 保有株で多くを占めていた。さらに、保有頻度の低い *qnrS* 遺伝子や CTX-M-134 型 ESBL 保有株の検出を認めたことから、中小規模病院を対象とする臨床検査センターと連携した耐性菌サーベイランスは地域での新たな耐性菌の出現や拡散をいち早く察知できる可能性が示された。

一方で、神奈川県内の病床数 300 床以下の中小規模病院にて分離される ESBL 産生菌が保有する β -lactamase 遺伝子の内訳や *qnrS* 保有率は明らかとなったものの、家畜や農場から分離されることも多い *bla*_{CTX-M-55} 保有株や *qnrS* 保有株の分子疫学的特徴も薬剤耐性菌の拡散経路を考える上で明らかとすべき点である。

第2節 市販鶏肉における薬剤腸内細菌科菌の疫学調査

1. 緒言

グラム陰性桿菌の耐性菌である広域セファロスポリン耐性腸内細菌科は最も高頻度に拡散しており、その分布はヒトのみならず、愛玩動物、家畜および環境にまで広がっている[63]。その理由は、抗菌薬が世界的に獣医学や農学などの分野で動物用医薬品、食品添加物、農薬として使用されているため[64]、特に、畜産業では家畜個体の体重増加に繋げるため、抗菌薬を成長促進剤としての目的で使用する機会が多い[65]。また、エンロフロキサシンなどのフルオロキノロン類やセフトオフルやセフキノムなどのセファロスポリン類の獣医学的使用は、病原菌に感染した家畜の治療目的でのみ承認されている。家畜への抗菌薬使用は世界的にも増加傾向にあり、TP. Van Boeckel らは世界的な家畜への抗菌薬使用量が2010年から2030年までに $63,151 \pm 1,560$ トンから $105,596 \pm 3,605$ トンにまで増加すると予測している[66]。このような抗菌剤の使用は、セファロスポリンなどの耐性の原因となる遺伝子を保有する細菌株を選択することによって、家畜飼育環境における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の出現および普及に大きく寄与する可能性がある。さらに家畜や農場にて薬剤耐性菌が選択されることは、市販食肉の薬剤耐性菌汚染の増加をもたらすと考えられている[67]。ESBL を産生する *Enterobacteriaceae* による市販鶏肉の汚染は、いくつかの国で報告されており[68][69][70][71]、ヒトにおけるこれらの細菌の感染発生率の増加に寄与する可能性が高い[71][72]。ヒト臨床サンプルおよび動物由来の *E. coli* 分離株の分子特性および分子特性を記載した文献には多くの報告があり、いくつかの研究ではどちらかの病原性分離株間の分子類似性の程度が示されている[73][74]。

グラム陰性菌における広域セファロスポリン耐性は主にESBLやpAmpCなどプラスミド上に存在するβ-ラクタマーゼによって授与される。日本では最初に Shiraki らにより、ウシからCTX-M-2型ESBL産生菌が分離されたことを報告している[75]。さらに、ブロイラ

一などの糞便などの検体から ESBL 産生 *E. coli* が高い確率で分離されるいくつかの調査が行われており[76][77]、日本では、1999 年以降、家禽において、ESBL および AmpC β -ラクタマーゼ産生大腸菌の出現が確認された[78][79]。しかしながら、日本国内においては市販の国産および外国産鶏肉に付着する広域セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科を比較した疫学調査は少ない。Kawamura らは 2010 年に愛知県における国産および外国産鶏肉から分離される ESBL 産生 *E. coli* について調査を行っており、高頻度に広域セファロスポリン耐性腸内細菌科に汚染されていることを明らかにしているが、一方で国産および外国産由来株の比較については詳細に述べられていない[80]。日本では鶏卵に対するセフトオフルの予防接種自主規制が 2011 年に行われ、プロイラー糞便中の CEZ 耐性 *E. coli* 陽性率が減少していることも明らかとなっているが[81]、その後、市販国産鶏肉における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の汚染率がその自主規制の影響により変化があったかなどは明らかとなっていない。同時に、日本の輸入鶏肉はブラジル産やアメリカ産、中国産などが多くを占めている(Fig. 10)。家畜の生産方法は、各国によって抗生物質の使用が異なり、小売食肉の抗生物質耐性菌の特徴に影響を及ぼすため[82]、国内と諸外国の養鶏が保有する広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の疫学的特徴は大きく異なっている。また、腸内細菌科における広域スペクトル β -lactamase の保持と拡散には、保有クローンや plasmid inc type などの要因が多く関与してくる。それにも関わらず、日本において市販国産および外国産鶏肉の広域スペクトル β -lactamase 保有株の汚染率や保有 β -lactamase の内訳、sequence type や plasmid inc type などについては明らかとなっていない。

汚染された小売食肉が食品媒介疾患の主要な原因の 1 つであることを考慮すると、公衆衛生を守るためには、これらの病原体および抗生物質耐性の定期的監視が必要である。さらに、臨床現場における ESBL 産生 *E. coli* のなかには一定の割合で CTX-M-55 保有株などのような家畜や農場から多く分離される菌株が含まれている[56]。そこで本研究では、日

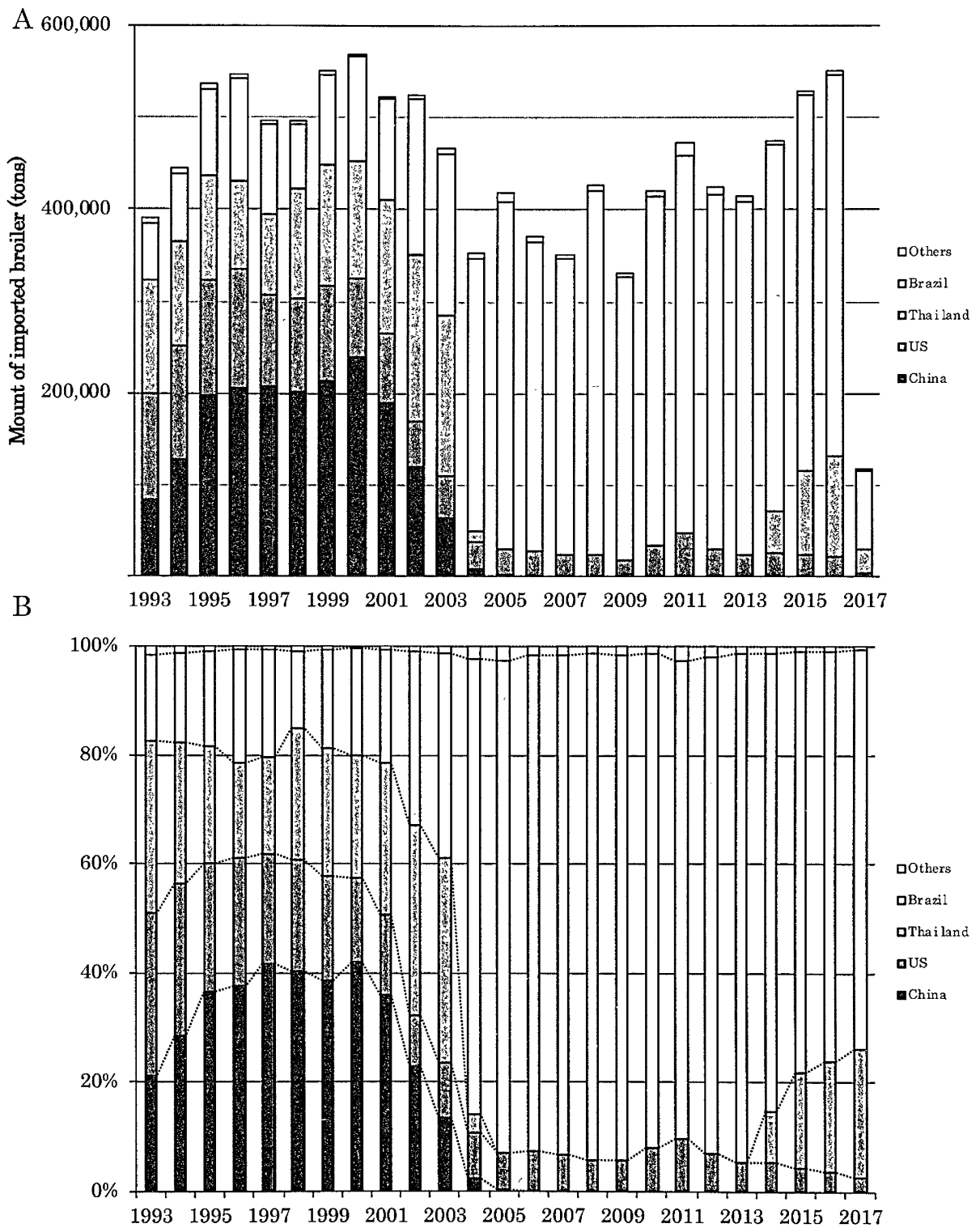


Fig.10 Proportion status of imported broiler

A) indicates mount (tons) from foreign countries.

B) indicates proportion from foreign countries.

本で市販されている国産および外国産鶏肉を汚染する広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の分離率と、分離株の分子疫学特徴として、菌株が保有する β -lactamase 遺伝子、MLST、系統発生群別および plasmid inc type について調査した。

2. 実験方法

1) 材料からの菌株分離・同定と薬剤感受性試験

東京都および神奈川県内で購入した市販国産鶏肉 53 件および外国産鶏肉 39 件を用いた。市販食肉は解剖ハサミを用いて無菌的に 10 g 秤量し、細かく断裁して、CTX 2 µg/mL 含有 Brain Heart Infusion ブイヨン（日本 BD）と Total volume 50 mL になるよう三角コルペンで調製後、37°C 18-24 時間培養で増菌した。増菌したブイヨン原液は 0.5 mL を 4.5mL の滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し、同様にして 1000 倍まで倍々希釈した。さらに、増菌ブイヨン原液および希釈系列を各 100µL ずつ CTX 2 µg/mL 含有マッコンキー寒天培地（栄研化学）にて塗抹分離した[83]。37°C 18-24 時間培養後、腸内細菌科が疑われるコロニーを 4~6 個選定した。被検菌株は、オキシダーゼ試験紙（ニッスイ）、TSI 培地（栄研化学）、シモンズのクエン酸培地（栄研化学）、および LIM 培地（栄研化学）を用い、従来の判定法に従って同定した。これらの同定試験で同定ができなかった際には、Api 20E（Biomérieux）を用いた。薬剤感受性試験は本論上述に従い、寒天平板希釈法にて行った。さらに、中等度耐性（I ; Intermediate）以上を耐性と判定し、耐性率を算出した。寒天平板希釈法に使用した薬剤は Ampicilin (ABPC,WAKO)、CMZ、Cefotaxime (CTX, Sigma)、CAZ、CFPM、CPFX、GM、Amikacin (AMK,WAKO)の 8 つを用いた。薬剤濃度は ABPC と AMK は 4~128 µg/mL とし、それ以外の薬剤は全て 0.5~16 µg/mL とした。薬剤感受性試験の結果から ESBL 産生が疑われた菌株は、ディスク拡散法による ESBL スクリーニングテストを行った。薬剤ディスクはセンシディスク CTX (栄研化学) および ESBL 確認ディスク クラブラン酸 (CVA) 含有 CTX (CTX/CVA, 日本 BD)、センシディスク CAZ (栄研化学) および ESBL 確認ディスク CVA 含有 CAZ (CAZ/CVA, 日本 BD) を使用した。判定は薬剤単独の阻止円と CVA 含有ディスクの阻止円の差が 5mm 以上となった場合を ESBL スクリーニングテスト陽性とした。

2) DNA 抽出および β -lactamase 遺伝子の検出

第 2 章 1 節 2.3-4)に従った。

3) *E. coli* 株の Multi-locus sequence typing (MLST) および系統発生群別の決定

MLST は Achtman の方法に従い[84]、7つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA* および *recA*) を用いて、分離された株のうち、任意の 49 株の *E. coli* について行った。Sequence type (ST)は得られた配列から warwick のウェブサイト (https://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search) を用いて、allele を決定し、さらに ST を決定した。この研究で見出された新規の ST のうち、すでに登録されている ST と 1 つの遺伝子だけ allele が異なる株は、ST complex に属するものとみなした。

系統発生群別は既報に従い[85]、*chuA*、*yjaA* および *tspE4.C2* の triplex PCR を用いて *E. coli* 分離株の 4 つの主要な系統発生群 (A、B1、B2 および D) を決定した。

4) Plasmid incompatibility typing

菌株が保有する Plasmid の Incompatibility (Inc) type の決定は Carattoli らの方法を用いた [86]。菌株から抽出した DNA は TaKaRa *Ex Taq* (5units/ μ L)、10×*Ex Taq* Buffer (20mM Mg^{2+})、dNTP Mixture (2.5mM each) を使用し、サーマルサイクラーは 2720 Thermal Cycler にて増幅した。PCR 反応条件は 94°C 5 分熱変性のあと、94°C 1 分、60°C 30 秒、72°C 1 分を 30 サイクル行い、最終伸長 72°C 5 分とした。PCR 反応終了後、Agarose gel 電気泳動と臭化エチジウム染色にて遺伝子増幅産物を、トランスイルミネーターにて UV 検出した。

5) 統計解析

鶏肉からの分離率および薬剤耐性率について、国産、外国産鶏肉の比較は χ^2 検定および

Fisher の正確確率検定にて行い、p 値が 0.05 未満の場合を有意とした。統計解析には R および R Studio を用いた。

3. 結果

1) 国産および外国産鶏肉の比較と分離株の細菌学的特徴

国産および外国産鶏肉からの CTX 耐性腸内細菌科分離率はそれぞれ 60.4% (32/53) および 87.2%(34/39)で、両群に有意な差を認めた ($p=0.00968$)。分離された株数はそれぞれ 41 株および 61 株で、1 検体あたりの分離株数は 1.28 株および 1.88 株となり、外国産鶏肉からは国産鶏肉に比べて 1 検体あたりに複数の CTX 耐性腸内細菌科が分離された。分離された菌種は国産、外国産ともに *Escherichia coli* が最も多かった (Table 11)。ESBL スクリーニング試験陽性菌株はそれぞれ 14 株、22 株であった。薬剤感受性試験を行った ABPC、CMZ、CTX、CAZ、CFPM、CPFX、GM および AMK の各耐性率 (国産 vs.外国産) は、100% vs.100%、35.6%vs.35.9%($p=1$)、100%vs.100%、61.0%vs.45.3%($p=0.1299$)、8.8%vs.11.9%($p=1$)、29.3vs.31.3%($p=1$)、19.5%vs.54.7%($p=0.0012$)および 0%vs.0%であった (Fig. 11)。国産分離株は外国産に比べて、CAZ に対する耐性率が高かったが有意差は認めなかった。一方、外国産分離株では国産に比べて、GM に対する耐性率が高く、有意差を認めた。

2) β -lactamase 遺伝子の保有状況と内訳

β -lactamase 遺伝子の検出株数を Table 12A に示す。国産と外国産ともに約 50%の分離株が CTX-M 型 ESBL を保有し、TEM 型、SHV 型 β -lactamase はそれぞれ 40 株、1 株検出された。CTX-M 型別では CTX-M-1 group ESBL 型は国産分離株から有意に検出され ($p=0.0005$)、その頻度は 32% (13/41) だった。pAmpC 遺伝子は、CITM 型のみ陽性となり、国産、外国産分離株中それぞれ 34%、33%であった。2 つ以上の β -lactamase を同時保有していた株の内訳を Table 12B に示す。CTX-M 型 ESBL と CITM 型 pAmpC の同時保有株は外国産鶏肉からのみ検出され、保有していた菌種は *E. coli*、*Proteus mirabilis* であった。

Table 11 Percentages and distribution of sample contaminating CTX resistant *Enterobacteriaceae*

	Domestic	Imported	<i>p</i> -value
Number of samples	53	39	
CTX resistance in contaminated samples	32	34	
Rate of Contamination (%)	60.4	87.2	0.009676
Number of isolates	41	64	
Average of isolates per contaminated sample	1.28	1.88	0.01345
Distribution for identified isolates			
<i>Escherichia coli</i>	37	55	
<i>Escherichia fergusonii</i>	--	1	
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	--	
<i>Enterobacter intermedium</i>	--	2	
<i>Citrobacter freundii</i>	--	1	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	--	
<i>Proteus mirabilis</i>	--	4	
<i>Salmonella</i> sp.	1	1	
<i>Serratia liquifaciens</i>	1	--	
Number of ESBL screening test isolates	24	41	

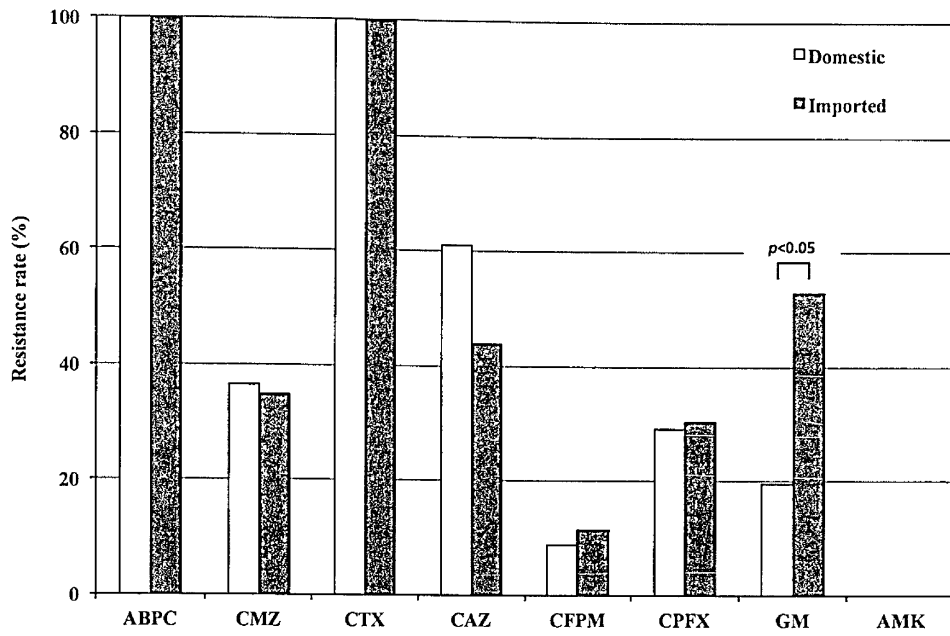


Fig. 11 Antimicrobial resistant rate of isolates from retail chicken meats

Table 12 Number of β -lactamase detected from each strain

A

β -lactamases	Domestic ^a	Imported ^a
ESBL		
CTX-M-1 group	13 (32)	3 (5)
CTX-M-2 group	4 (10)	28 (44)
CTX-M-8 group	0 (0)	1 (3)
CTX-M-9 group	7 (17)	0 (0)
TEM ^b	20 (49)	20 (31)
SHV ^b	0 (0)	1 (2)

pAmpC		
CITM	14 (34)	21 (33)

B

β -lactamases	Domestic	Imported
ESBL		
CTX-M-1 + TEM ^b	10	3
CTX-M-2 + TEM ^b	1	9
CTX-M-9 + TEM ^b	4	0

ESBL + pAmpC		
CTX-M-2 + CITM	0	2 ^c
TEM ^b + CITM	5	4 ^c

^a; Number & (%) of genes detected, ^b; TEM and SHV were included in non-ESBL.,
^c; One isolate was CTX-M-2 + TEM + CITM.

3) *E. coli* の MLST および系統発生群別

国産および外国産由来 *E. coli* 株の MLST 内訳を Fig. 12A に示す。国産由来株の sequence type (ST) は単一 ST の収束はなく、15 種類と多岐にわたっていた。一方で、外国産由来株の ST は ST38、57、117 および 770 が複数株認められ、また、それらの ST は国産由来株においても決定された。Fig. 12B は ST と保有 β -lactamase の関係性を示す。国産由来株に多く保有されていた CTX-M-1 group ESBL および国産、外国産由来株に保有されていた CITM 型 pAmpC は広く ST に分布していた。ST38 が保有していたのは、全ての株で CITM 型 pAmpC であった。ST38 を除く全ての ST で、系統発生群別は 1 つのみで決定された。

分離された *E. coli* の系統発生群別は国産、外国産ともに D 群が最も優位で、次いで A 群であった。内訳は国産由来株で 50%以上が D 群を示したのに対し、外国産由来株では D 群と A 群とはほぼ同じ割合だった (Fig. 13)。

4) *E. coli* が保有する β -lactamase と Plasmid incompatibility typing

E. coli が保有する Plasmid inc type の内訳を Table 13 に示す。*E. coli* が保有する plasmid の inc type は、決定された β -lactamase 保有株の全てで IncFIB が最も優位であった。国産鶏肉由来株でのみ認められたのは IncHI1, N, Y, P, A/C で、一方で外国産鶏肉由来株でのみ認められた inc type はなかった。 β -lactamase の種類ごとの内訳では、Inc type の多様性は CTX-M 型 ESBL に比べて CITM 型 pAmpC 保有株で高かった。CTX-M 型 ESBL でのみ認められたのは IncN で、陽性株は CTX-M-1 group を保有している株であった。CITM 型 pAmpC 保有株で陽性が多かったのは、IncFIB に次いで IncK であった。CITM 型および IncK 陽性株は国産および外国産由来株のいずれからも検出された。

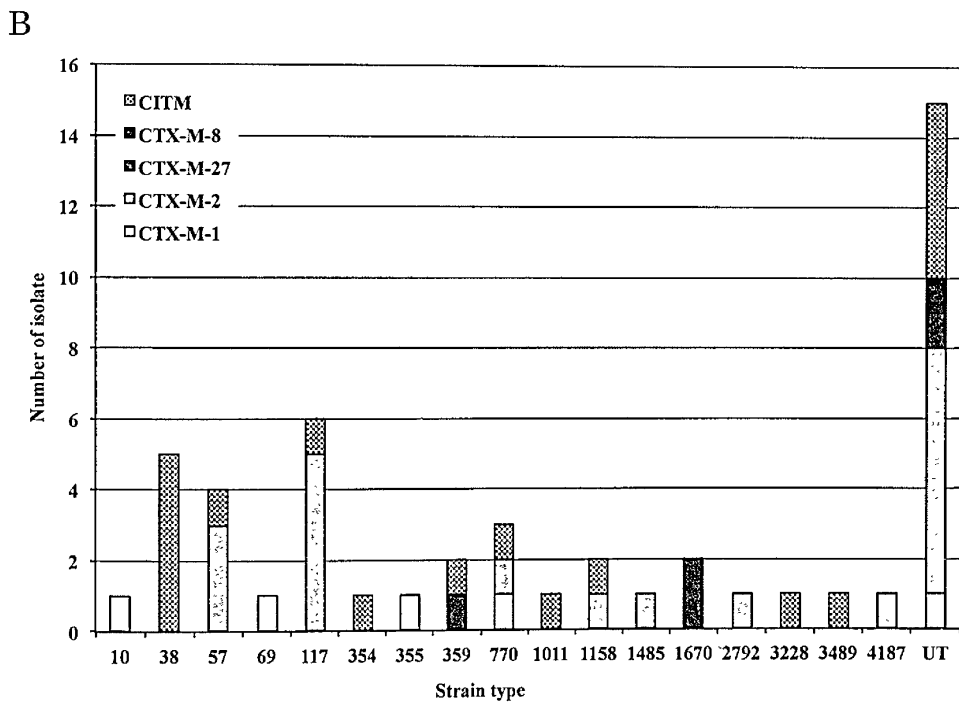
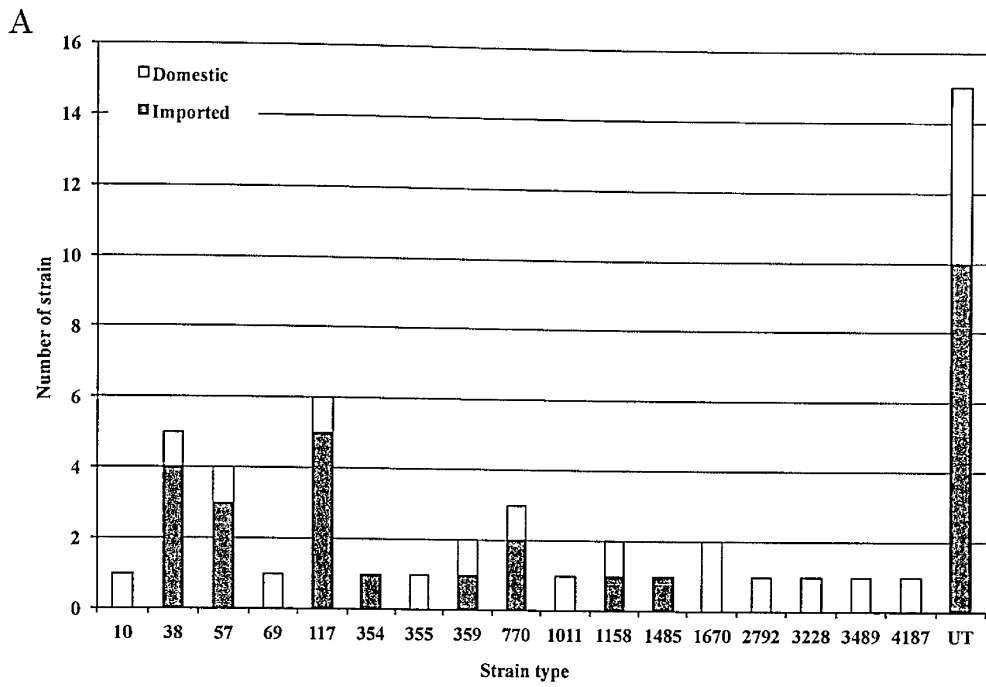
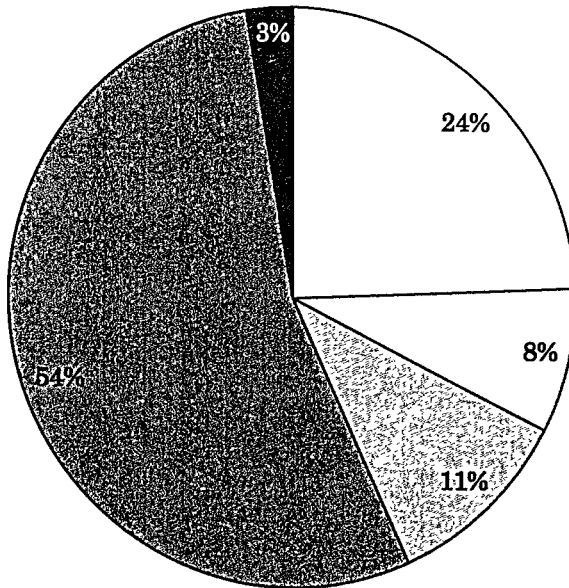


Fig.12 Distribution of sample source between, β -lactamases and strain type

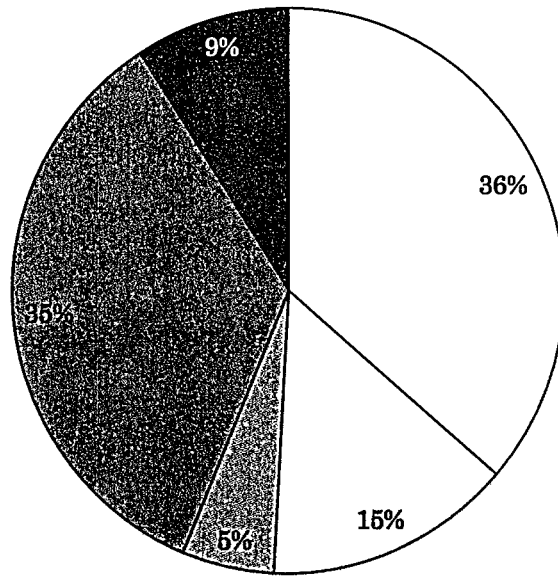
A

Domestic



B

Imported



□ A □ B1 □ B2 □ D ■ ND

Fig. 13 Comparison the phylogenetic group of *E. coli* between domestic and imported samples

Table 13 Plasmid incompatibility type of isolates

β -lactamase	Number of positive isolate (from domestic samples)																	
	HI1	HI2	II-Iy	X	L/M	N	FIA	FIB	W	Y	P	FIC	A/C	T	FIIAs	Frep	K	B/O
CTX-M-1 group	4					3	1	11			1					13	1	4
	(4)					(3)	(1)	(9)			(1)					(11)	(1)	(4)
CTX-M-2 group	2						1	25								25		3
	(2)						(1)	(2)								(4)		(0)
CTX-M-8 group	1							1								1		
	(0)							(0)								(0)		
CTX-M-9 group							2	7				1				6		1
							(2)	(7)				(1)				(6)		(1)
CITM	1	8					4	26		2	1	1	3			21	19	10
	(1)	(5)					(2)	(10)		(2)	(1)	(0)	(3)			(10)	(9)	(5)

4. 考察

本研究では日本の市販鶏肉における第三世代セファロスポリン系抗菌薬耐性腸内細菌科の分離率とその疫学的特徴を明らかにした。国産および外国産鶏肉の CTX 耐性腸内細菌科分離率は 60~90%であり、市販鶏肉は高頻度に CTX 耐性腸内細菌科に汚染されていた。この分離率は Kawamura らの報告[80]よりも高率であった。Hiki らは、2012 年からの養鶏業界によるセフトフル使用自主規制によりブロイラー由来セファロスポリン耐性 *E. coli* の CTX 耐性率が減少していることを報告している[81]。Kawamura の報告と本研究での結果は、ブロイラーが保有する *E. coli* のセファロスポリン耐性率の減少が市販食肉の広域セファロスポリン耐性菌汚染率の低下にまだ影響を与えていないことを示唆している。外国産鶏肉は国産鶏肉に比べ、有意に分離率が高かったことは、日本とのブロイラーに対する抗菌薬使用量および使用方法の違いが推察される。しかしながら、家畜に対する成長促進剤や抗菌薬の予防・治療投与方法の諸外国との違いは明らかでないことが多い。抗菌薬の使用量についてはヨーロッパからの報告があるが、オランダとフランスは他の欧州諸国に比べて極めて使用量が多いことから、抗菌薬使用量については各国の違いが顕著であることが推察される[87]。また、JC Stuart らの研究では、オランダにおいて通常の飼育環境で飼育された鶏肉はブランド鶏肉に比べて ESBL 産生菌汚染率が優位に高かったことを報告している[88]。本研究では購入した鶏肉の種類は限定していないものの、ほぼ全ては非ブランドで通常どおりに飼育されて出荷された市販鶏肉（データ未提示）であると思われるため、この報告と一致する。これらを踏まえると、日本において市販鶏肉からの CTX 耐性腸内細菌科分離率は養鶏農場での抗菌薬使用や屠畜から精肉処理までの汚染環境に依存すると考えられる。今後も、市販鶏肉における CTX 耐性腸内細菌科汚染率の推移も継続的に調査していくことが必要と考えられる。

市販鶏肉から分離される CTX 耐性腸内細菌科は国産・外国産いずれも CTX-M 型 ESBL

産生 *E. coli* が主で、pAmpC 保有 *E. coli* も約 35%を占めた。これらの割合は国産と外国産の間で大きな差はなく、日本の市販鶏肉を汚染している広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の耐性メカニズムは同様の傾向にあることが推定できる。一方で、CTX-M group には国産と外国産で大きな違いが認められた。外国産由来株においては CTX-M-2 group 保有株が優位で、CTX-M-1 group 保有株は国産ほど高頻度に検出されなかった。また、外国産由来株からは CTX-M-8 group β -lactamase が検出され、これらのデータは既報と一致した[80]。Kameyama らの報告では、日本の複数の農場から広域セファロスポリン耐性 *E. coli* を分離しているが、CTX-M 型 ESBL においては CTX-M-1 group である CTX-M-1 もしくは-55 が優位であった[55]。さらに、ヨーロッパを含め、農場では世界的クローンである CTX-M-15 型 ESBL 遺伝子の拡散や、中国を中心として CTX-M-55 型 ESBL 産生株も報告されている[89][90]。よって、本研究で分離された国産由来株が保有する ESBL においても CTX-M-1 group の遺伝子型は M-1, -15, -55 などが考えられる。これらの ESBL 遺伝子型保有株の分離頻度の増加はヒトから家畜、もしくは家畜からヒトへと水平伝播していることを示唆する。特に、CTX-M-55 型 ESBL は東南アジアにおいて家畜や農場、食肉からの報告が多く 220, [91][92]、中国においては市中病院で CTX-M-15 型 ESBL 保有株よりも優位であることが報告されている[93]。これらの報告は、ヒト、市販食肉および家畜から分離される CTX-M-55 型 ESBL 産生株の分子疫学的関連性を明らかにする必要性を示唆する。

また広域セファロスポリン耐性腸内細菌科のうち、約 35%の株が CITM 型 pAmpC を保有していた。家畜における pAmpC の拡散は CITM 型に属する CMY-2 である報告が多数なされており、*E. coli* のみならず *Salmonella* sp.からも多く検出されている。Kameyama らは国内の農場で、CMY-2 型とともに CTX-M 型 ESBL を保有する株を報告しているが[55]、本研究では国産鶏肉からそのような株は分離されなかった。

一方、外国産由来株では CTX-M 型 ESBL と pAmpC の同時保有株が 2 株検出された。さ

らに 1 サンプルから複数の株が分離される頻度は国産に比べて高かった。また、外国産由来株の耐性率が高かった薬剤は、 β -lactams 系薬を除くと、GM および CPFY であり、特に GM の耐性率は有意に異なった。GM に対する耐性率が国産に比べて外国産由来株で高い結果は、Kawamura らの報告と一致する[80]。一般的に、CTX-M 型 ESBL 遺伝子の多くはプラスミド上でインテグロン構造により複数の耐性遺伝子とともに保持され、アミノグリコシド系薬やニューキノロン系薬に耐性を示し、特にブラジルにおいては CTX-M-2 group および CTX-M-8 型 ESBL 遺伝子を保有する株が拡散している報告がある[94]。本実験においても、外国産由来株の GM や CPFY 耐性率が高かったのはこれに起因すると考えられる。これらの結果から、外国産鶏肉ではブロイラー 1 個体において複数の薬剤耐性株が定着していることが推察され、外国産鶏肉由来株間では抗菌薬選択圧などにより多様な薬剤耐性遺伝子が混在しすることで、プラスミド接合などによる耐性遺伝子の交換をして複数の耐性遺伝子を 1 つの株に保有していたと推察できる。

E. coli の ST は外国産由来株において、ST38, 57 および 117 が複数分離された。これらの株は CTX-M-2 group ESBL も同時に保有しており、海外の養鶏場における CTX-M-2 group 保有株の定着を示唆する。一方で、国産由来株の ST はばらつき、このうち ST38 は臨床患者からの分離報告があり、そのなかには *bla*_{OXA-48} 保有株などのカルバペネマーゼ遺伝子の媒介株としてヒトにもかなり広がっている。一方で本研究において、ヒトで世界的に拡散している *E. coli* ST131-O25b-B2 株は検出されなかったことは、ヒトの臨床から分離される ESBL 産生 *E. coli* と養鶏に定着する ST は大きく異なるという報告と一致する[95]。しかし、市販食肉の摂取がヒト腸管への定着に直接的に影響を与えうる可能性は、臨床患者よりも健常人であると予想できる点にも着目する必要がある。*E. coli* ST117 の分離報告例はほとんどが鶏肉からであるが、健常なヒトの保菌報告もある[95]。さらに本研究において、外国産鶏肉からのみ CTX-M-8 型 ESBL 産生株が分離されており、日本では健常人からも

CTX-M-8 型 ESBL 産生 *E. coli* が分離されている[96]。健康人から分離される *bla*_{CTX-M-8} 保有 *E. coli* において、その周辺構造が食肉からの分離株と類似していたことを Norizuki らは報告している[96]。これは食肉から健康人へ摂食を介して薬剤耐性遺伝子が移行していることを強く示唆する研究である。実際に、健康人における糞便中の ESBL 産生菌保菌率は上昇傾向にあり、健康人の ESBL 保有 *E. coli* は年間で約 5.3% ずつ上昇していることがメタアナリシスにより推定されている[97]。健康人が保菌する広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の継続的なサーベイランスにより、食肉からの耐性遺伝子の移行の可能性をより詳細に探索する必要性が見出された。

食肉を通じて定着した *E. coli* が病原性を示す株かどうかは、この研究では不明である。Asai らは日本のブロイラー由来 *E. coli* の系統発生群別を明らかにしており、分離株は A および D が優位であった[98]。これらの結果は、本研究とではブロイラー由来糞便と市販食肉という違いがあるものの一致した。さらに、Yan Yan Hu らは中国で臨床患者や健康人由来の系統発生群別を明らかにしている[99]。今回の研究で得られた株の約半数が系統発生群別 D であったことは、ヒトから得られた *E. coli* の系統発生群別の割合と一致し、さらにはこれらが病原性を示すことは否定できない。Manges らは食品由来 *E. coli* のいくつかの種類が腸管外性病原性を示すことをレビューしている[100]。本来、ヒトの腸管内で共生を示すはずの系統株であっても、*E. coli* A-ST10 は多くの臨床患者からの報告がある[101][102]。*E. coli* A-ST10 におけるヒト-家禽間両方での病原性範囲は Bortolaia らによって証明されており、この現象には IncN もしくは IncII plasmid の水平伝播が関わっていると考えられている[103]。

本研究では、市販食肉付着広域セファロスポリン耐性 *E. coli* が保有する β -lactamase と plasmid inc type の関係性も明らかにした。最優位であった CTX-M 型 β -lactamase 陽性株が保有する plasmid inc タイプは既報のとおり IncFIB が主であった。国産由来株にのみ優位だ

ったのは Inc Ir-Iy、N および FIA で、Nakamura らが報告した日本の臨床患者から得られた CTX-M 型 β -lactamase が載っているタイプと一致した[104]。一方、外国産由来 CTX-M 陽性株の inc type は FIB が多く、国産および外国産由来 CTX-M 陽性株の inc type の違いを踏まえると、*bla*_{CTX-M} は国内ブローラーでは多くの inc type に散在しており、外国ブローラーでは IncFIB に収束していると考えられる。これらの結果は ST の多様性の違いとも一致する。さらに、国産および外国産由来 pAmpC 陽性株においては、IncFIB が優位ではあったものの、多くの inc type に分散していた。また、IncK 保有株は pAmpC 陽性であることがほとんどで、これは国産および外国産由来株共通の特徴であった。pAmpC 陽性 IncK 保有 *E. coli* の存在は日本のブローラーサーベイランスにおいて、Hiki らによって報告されているものの[105]、検出された株が少ないため多くは言及されていない。近年、ヨーロッパなどを中心に *bla*_{CMY-2} を載せた IncK plasmid の拡散や全ゲノム配列決定の報告がなされているが、日本において市販鶏肉から分離された *bla*_{CTX-M} 陽性 IncK 保有 *E. coli* の収束的な検出はこの報告が初めてである[106][107][108]。Hiki らの報告では、*bla*_{CMY-2} を運ぶ plasmid は 13/31(41.9%)の株が接合伝達したことを明らかにしており[105]、これらの株は高い接合伝達能があることが推察できる。さらには、国産由来 pAmpC 陽性株においては、IncA/C、Ir-Iy が検出されている点も、Hiki らの報告と一致する[105]。このことから、pAmpC 保有株の市販食肉への付着は、食肉の精肉過程における汚染ではなくブローラーがそれらを保菌している便からの汚染であることが推察できる。

本研究では日本における、養鶏の 2011 年のセフトオフル自主規制後の市販鶏肉における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科細菌の汚染率と分離されたそれらの株の分子疫学的特徴について明らかにした。本研究における限界はサンプルを収集した小売店が地域的に限られることや鶏肉の産地や種類について分類していないことである。しかしながら、本研究と同様、一般に消費者が購入できる市販鶏肉に高頻度に ESBL 産生 *E. coli* をはじめと

する広域セファロスポリン耐性腸内細菌科が付着していることは、薬剤耐性菌による公衆衛生上の問題を考えるうえで、継続的な監視の必要性を示唆する。

5. 結言

本研究は日本国内の市販鶏肉における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の汚染率を明らかにした。ブロイラーに対するセフトリフル接種自主規制から5年以上が経っているにも関わらず、市販鶏肉における汚染率は高いままであった。さらに鶏肉の耐性菌汚染はESBL産生菌が主と考えられてきたが、国産外国産ともにpAmpC保有株検出率は約35%であった。しかしながら、臨床検体からの広域セファロスポリン耐性菌株がpAmpCを保有している頻度は低く、その割合には解離がある。市販鶏肉汚染菌がヒト環境に対して影響を与えるとすれば、臨床患者よりも日常生活においてそれらを食している健常人に対してのほうが、可能性が高いと考えられ、健常人における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の保菌状況を調査する必要がある。

国産鶏肉からはCTX-M-1 groupの検出が特徴であった。一方、外国産鶏肉からは1検体から複数の薬剤耐性パターンを示す株の検出や、ESBLとpAmpCのハイブリット保有株を認めたことから、外国産由来株間でplasmidや耐性遺伝子カセットなどの交換により1つの株に多くの耐性遺伝子を保有する可能性が示唆された。そのなかでも特に、国産および外国産市販鶏肉でのpAmpCを保有する株では、IncKが検出されることが多かったことは、この研究の新たな知見の1つである。pAmpCおよびIncK plasmidの拡散リスクを図るためには、今後これらの遺伝子の水平伝播能について調査する必要がある。

第3節 健康青年における薬剤耐性腸内細菌科菌の疫学調査

1. 緒言

薬剤耐性菌は一般的には、入院患者、環境および医療スタッフなどの病院内から分離される。しかしながら、ESBL 産生腸内細菌科および市中型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Community-acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*; CA-MRSA) などの薬剤耐性菌の蔓延が、健康なヒトにまで及んでいることが知られている[109]。その発端となったのは、1969年に発表された Swann Report において、薬剤耐性菌が家畜との接触や食肉などの摂食を介して動物からヒトへと広がる可能性について言及したためである。家畜とヒト環境の薬剤耐性菌の関係性に注目が集まったのは、成長促進剤である Avoparcin を含んだ飼料を給餌されたウシにおいて、バンコマイシン耐性腸球菌が選択され、農夫からヒト環境へ拡散したことが、きっかけである[110]。さらに近年、ESBL 産生株は市販鶏肉およびブロイラーから多く分離され、その中には腸管外感染症を引き起こす株 (Extraintestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC)も存在する[100][111]。また、Yong Chong ら[35]は2003～2011年における中国での外来患者のESBL 検出率が年々増加し、2011年には外来患者から分離した *E. coli* の14%がESBL 産生菌であったと報告している。

そこで本実験の目的は、健康青年から分離されたCTX 耐性腸内細菌科の特徴と分子疫学的特徴を明らかにすることである。

2. 実験方法

1) 材料からの菌株分離と薬剤感受性

サンプルは5年間にわたり、健康人ボランティアから非侵襲的に得られた糞便スワブ 243 件を用いた。収集された糞便スワブを直接 CTX 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 LB ブイヨンに接種後、37°C 18~24 時間培養で増菌した。増菌したブイヨン原液は 0.5 mL を 4.5mL の滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し、同様にして 1000 倍まで倍々希釈した。さらに、増菌ブイヨン原液および希釈系列を 100 μL ずつ CTX 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有マッコンキー寒天培地にて塗抹分離した[83]。37°C 18~24 時間培養後、腸内細菌科が疑われるコロニーを 4~6 個選定した。その後、菌株の同定および薬剤感受性試験は本論上述に従い行った。さらに、中等度耐性 (I ; Intermediate) 以上を耐性と判定し、耐性率を算出した。寒天平板希釈法に使用した薬剤は ABPC、CMZ、CTX、CAZ、CFPM、CPFX、GM および AMK の 8 つを用いた。薬剤濃度は ABPC と AMK は 4~128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、それ以外の薬剤は全て 0.5~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

2) DNA 抽出および β -lactamase 遺伝子の検出

本論上述に従った。対象菌株は *E. coli* と同定された菌株とした。

3) *Escherichia coli* ST131 clade 分類および Phylogenetic grouping

方法は第 2 章 1 節 2.3) および 2 節 2.3) に従った。

4) 統計解析

E. coli ST131 と non ST131 において、 β -lactamase 保有率、系統発生群別、および CPFX 耐性率の比較は χ^2 検定および Fisher の正確確率検定にて行い、p 値が 0.05 未満の場合を有意とした。統計解析には R および R Studio を用いた。

3. 結果

1) 分離株の細菌学的特徴

5年間を通じた CTX 耐性腸内細菌科の保菌率は 27.2%(66/243 件)だった。さらに、ESBL 産生菌保菌率および pAmpC 産生菌保有率はそれぞれ 14.8%(36/243 件)および 2.1%(5/243 件)だった。5年間の CTX 耐性腸内細菌科保有率の推移を Fig. 14 に示す。ESBL 産生菌保菌率は 2013 年から 2017 年まで増加傾向を認めた。pAmpC 産生菌保有率は 0~6.3%の間を推移した。

CTX-耐性腸内細菌科分離 75 株の菌種内訳を Fig. 15 に示す。*E. coli* は 47 株(62%)を占め、最も多く検出された。次いで、*Enterobacter cloacae* および *Citrobacter freundii* がそれぞれ 5 株ずつ同定された。

分離菌株の薬剤耐性率を Fig. 16 に示す。CMZ および CAZ に対する耐性率は *E. coli* 単独に比べ、全菌種において高かった。対照的に、CPFX および GM に対する耐性率は *E. coli* 単独において高かった。

2) β -lactamase 遺伝子の保有状況と内訳

E. coli と同定された分離株 47 株のうち、40 株(85%)が CTX-M 型 ESBL 遺伝子を保有していた。そのうち、CTX-M-9 group 遺伝子保有株が最も優位 (31/40 株、79%) で、次いで CTX-M-1 group 遺伝子保有株が優位だった。SHV 型 ESBL および pAmpC 遺伝子を保有していた株はそれぞれ 1 株および 3 株だった。CTX-M-8 group 保有株は 2017 年度において初めて検出された(Table 14)。

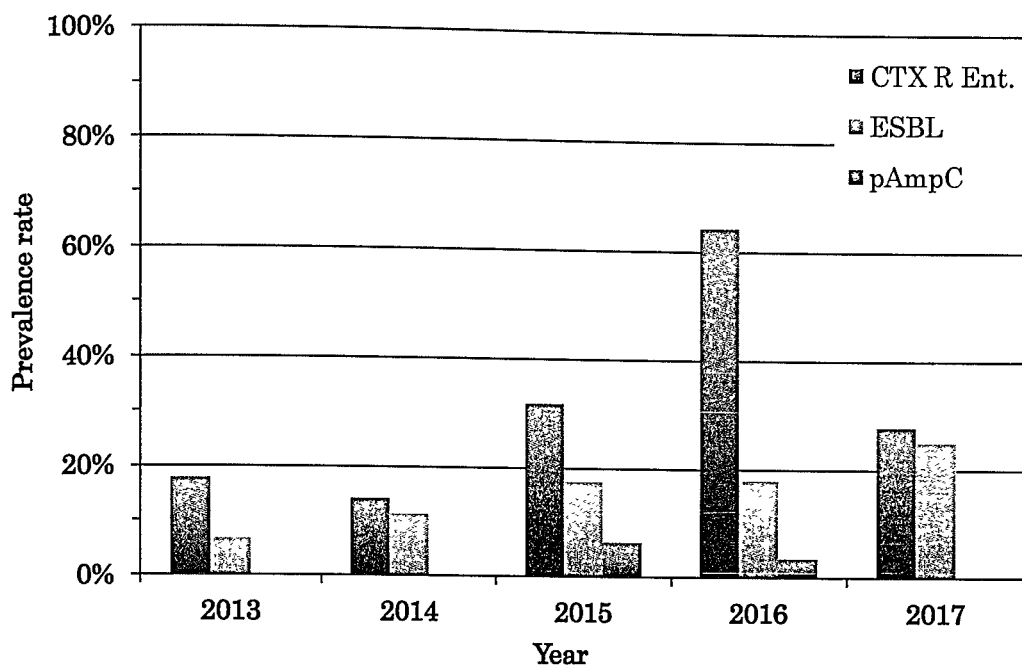
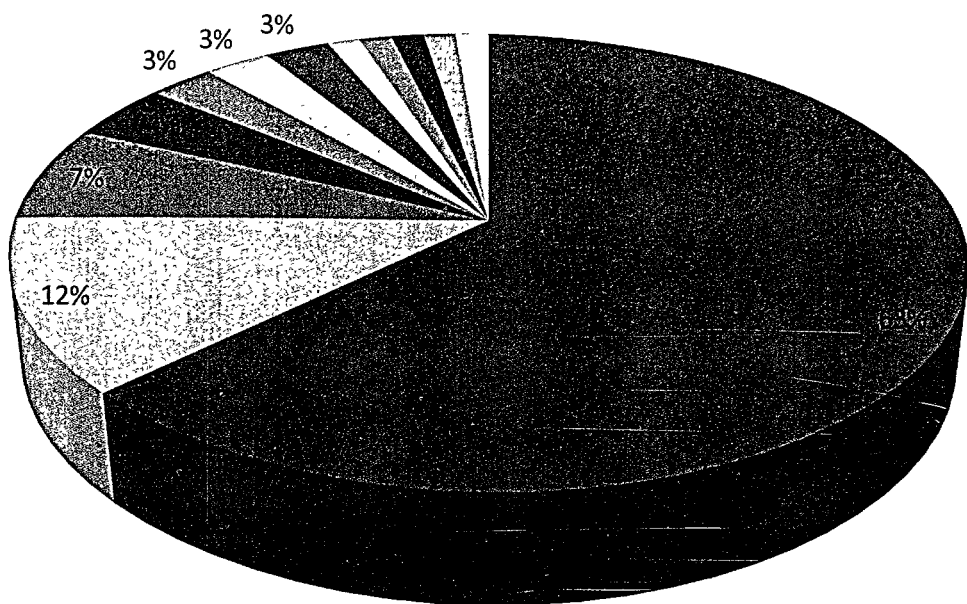


Fig. 14 Prevalence rate and trend of CTX resistant *Enterobacteriaceae*



- | | | |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| ■ <i>E. coli</i> | ■ <i>E. cloacae</i> | ■ <i>C. freundii</i> |
| ■ <i>K. oxytoca</i> | ■ <i>C. braakii</i> | ■ <i>C. koseri</i> |
| ■ <i>H. alvei</i> | ■ <i>E. aerogenes</i> | ■ <i>K. ornithinolytica</i> |
| ■ <i>P. mirabilis</i> | ■ <i>P. vulgaris</i> | ■ <i>S. liquifaciens</i> |

Fig.15 Distribution of species isolated

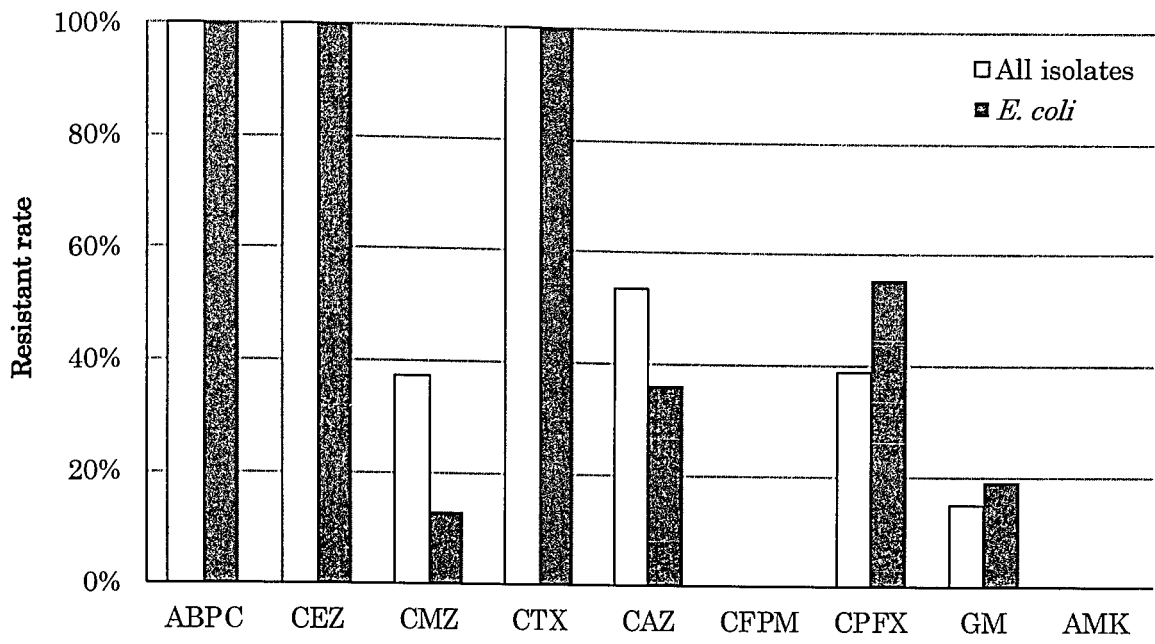


Fig.16 Antimicrobial resistant rates of isolates from healthy adults

Table 14 Trends of β -lactamase genes in *E. coli* isolates

Year	Class A					SHV	Class C	ND
	CTX-M grouping						pAmpC CITM	
	M-1	M-2	M-8	M-9	ND			
2013	0	0	0	3	0	0	0	0
2014	2	0	0	7	0	0	0	0
2015	4	0	0	6	0	1	3	0
2016	0	0	0	7	0	0	0	1
2017	0	0	2	8	1	0	0	0
Total	6	0	2	31	1	1	3	1

3) *Escherichia coli* ST131 および non ST131 の比較

E. coli における ST131 および non ST131 の比較を Table 15 に示す。*E. coli* ST131 は 12 株 (25.5%) で決定された。それぞれが保有する CTX-M 型 ESBL の内訳および CFPX 耐性率には有意差を認めなかった。一方で、系統発生群別では、*E. coli* ST131 が B2 に決定される割合が有意に高かった。

Table 15 Comparison of the characteristics in *E. coli* isolates between ST131 and non ST131

	Number of isolate (%)		Statistic analysis*	
	ST131 n=12	non ST131 n=35	χ^2	Fisher's
β -lactamase genes				
CTX-M-1	1 (8.3)	5 (14.3)	n.s.	n.s.
CTX-M-2	0 (0)	0 (0)	n.s.	n.s.
CTX-M-8	0 (0)	2 (5.7)	n.s.	n.s.
CTX-M-9	10 (83)	21 (60)	n.s.	n.s.
CITM	1 (8.3)	2 (5.7)	n.s.	n.s.
.....				
Phylogenetic group				
A	2 (16.7)	14 (40)	n.s.	n.s.
B1	0 (0)	3 (8.6)	n.s.	n.s.
B2	10 (83)	3 (8.6)	<i>p</i> <0.05	<i>p</i> <0.05
D	0 (0)	15 (43)	n.s.	n.s.
.....				
CPFX susceptibility				
Susceptible	3 (25)	18 (51.4)	n.s.	n.s.
Intermediate	0(0)	0(0)	n.s.	n.s.
Resistant	9 (75)	17 (48.6)	n.s.	n.s.

* χ^2 : chi-square test, Fisher's: Fisher's probably tests, n.s.: no significant difference

4. 考察

この調査では、健康な大学生の第3世代セファロスポリン抵抗性腸内細菌症の保菌率について5年間の推移を調査し、分離された株の分子疫学的特徴を明らかにした。5年間を通じてESBL産生菌保菌率は14.8%で、以前、Luvsansharav UOによって報告された日本の調査よりもはるかに高かった[112]。さらに、2017年の保菌率は25%で、ESBL産生菌の保菌率は5年間に渡り増加傾向にあったことは、健常人のESBL保菌率をまとめたメタアナリシス研究に一致する[98]。さらに、pAmpC産生菌は0~6.3%で推移していた。いずれの産生株も*E. coli*が主な菌種で、健常人から分離される広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の主要な原因菌であることが示唆される。一方で、本研究はpAmpCを保有する*E. coli*以外の腸内細菌科が、現在健康な成人に保菌されていないことを示唆した。Pattarachaiはタイの大学病院における高齢者患者で、*Escherichia*属および*Klebsiella*属を除く腸内細菌科分離株の約17%がpAmpC遺伝子を保有しており、さらにそのほぼ全ての株がESBL遺伝子も一緒に保有することを報告した[113]。健常人におけるESBL産生菌保菌率は発展途上国と先進国で大きく異なっていることが、この結果を支持すると考えられる。

本研究では広域セファロスポリン耐性*E. coli*における β -lactam系薬耐性率は第2章1節で示した臨床分離*E. coli*株のそれとは大きく異なった。CMZおよびCAZはAmpC型 β -lactamaseが基質とする薬剤であるが、CFPMは基質としない[114]。収集した菌株のうち、この2薬剤に耐性を示した菌種の多くは、*Enterobacter*、*Serratia*および*Hafnia*属である。CMZおよびCAZに対する耐性率が*E. coli*分離株より全菌種において高かった理由は、*E. coli*に次ぐ分離菌株の多くが染色体性AmpCを保有している菌種であることに由来すると考えられる。これらの結果からも、*E. coli*においてpAmpC保有株が拡散していないことを確認できた。しかしながら、Davidは、*H. alvei*の染色体性 bla_{ACC} がプラスミドに移行し、さらに*K. pneumoniae*へとプラスミドの水平伝播が病院内で起こったことを報告した[115]。

一方で、ESBL は CFPM に対して耐性を示すか否かは ESBL の遺伝子型および酵素の産生量に依存する[114]。さらに、SH Choi は、セフェピムは ESBL 産生株に感受性があり、依然としてその感染症を治療できることを報告した[116]。本研究で集められた *E. coli* は ESBL 産生株がほとんどを占めることから、健康人から得られた株が CFPM に対する耐性株を認めなかった結果は、臨床菌株における ESBL 産生菌と比較してこれらの違いを推定させる。これらの事実は、ESBL 遺伝子保有菌および AmpC 過剰産生菌を定着している宿主の菌叢に対して、抗菌薬投与による選択圧は AmpC 遺伝子の水平伝播や治療のために用いる抗菌薬の選択肢を狭める危険因子であると考えられる。

健康人から分離された株が保有する最も一般的な ESBL 遺伝子は、CTX-M-9 group で、次いで CTX-M-1 group であった。この内訳は、第 2 章 1 節で示した臨床分離 *E. coli* 株のそれと同様の傾向を示し、第 2 章 2 節の結果とは異なった。日本の臨床分離株におけるサーベイランスにおいても、CTX-M-9 group および CTX-M-1 group は現在最も優勢である 217, [117]。このことは、健康人から分離される ESBL 産生 *E. coli* の多くは臨床現場に由来することを強く推察させる。対照的に、CTX-M-8 group ESBL 産生菌が本研究で分離されたことは、家畜との接触または食肉の摂食による菌株の拡散を示唆する。

現在の研究では、CTX-M-15 産生 *E. coli* B2-O25:H4-ST131 の pandemic が問題視されている[118][119]。本研究でも 25.5% (12/47 株)で *E. coli* ST131 が決定された。*E. coli* ST131 および non-ST131 を比較すると、系統発生群別 B2 において有意差を認め、pandemic clone の系統発生群別と一致した。さらに、CPFEX に対する耐性率に有意差はなかったものの、大きく異なった。*E. coli* ST131 のうち、CPFEX に耐性を示す株は CladeC であることがわかっており、本研究においても CPFEX に耐性を示した株は *E. coli* ST131 CladeC と決定されている。本研究で分離された全ての分離株の CPFEX に対する耐性率より、*E. coli* の CPFEX 耐性率が高かったことは、健康人から分離される広域セファロsporin耐性腸内細菌科において *E.*

coli のみでフルオロキノロン耐性が進んでいることを推察させる。また、JANIS [29], [36] は医療施設で分離される *E. coli* においてフルオロキノロン耐性率の急激な増加と、フルオロキノロン耐性 *E. coli* の保菌率を報告している(Fig. 17)。これらのことは、健常人におけるフルオロキノロン耐性 *E. coli* の一部は *E. coli* ST131 CladeC を主とする臨床分離株に由来していることを示唆する。

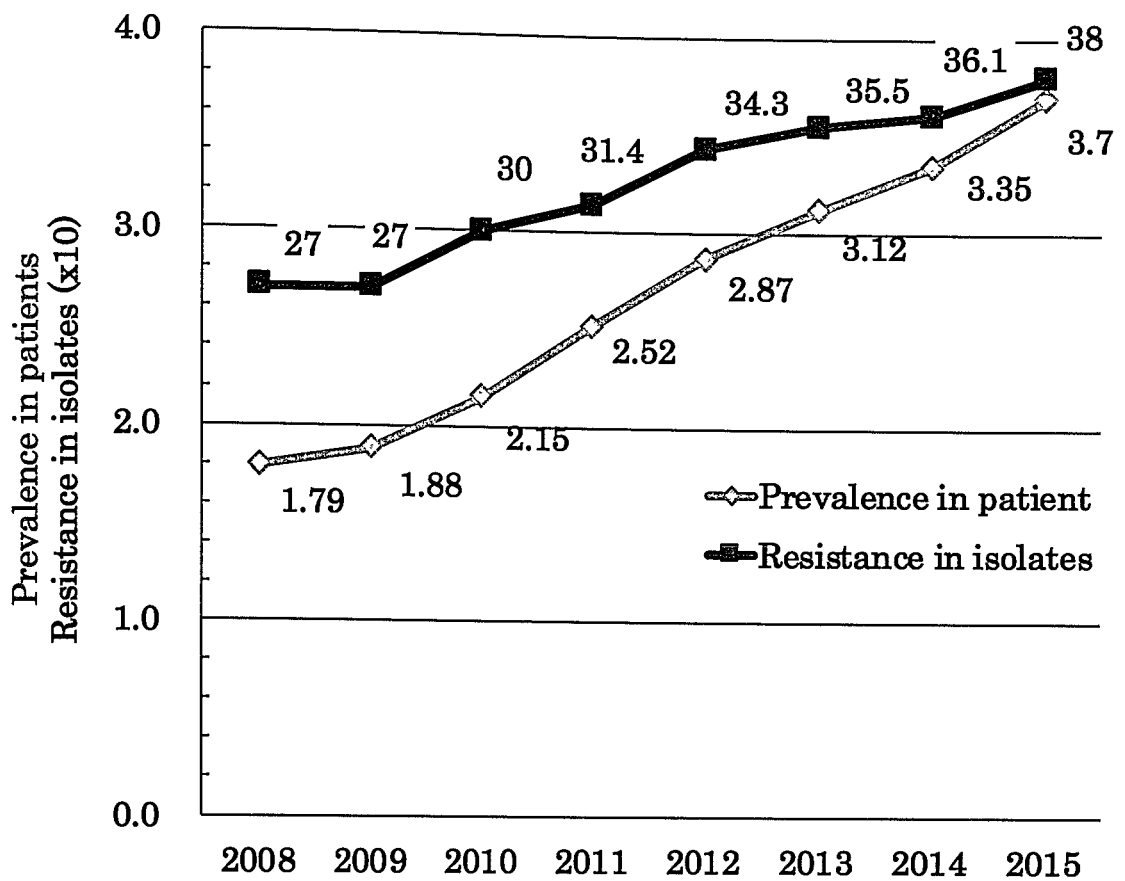


Fig. 17 Trends of proportion in isolates and prevalence rate with fluoroquinolone resistant *E. coli*

5. 結言

本調査では健常人における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の保菌率を明らかにした。ESBL 産生菌はこれまでの報告と同様、増加傾向にあった。さらにその中の一部の株は、CPFX にも耐性を示し、その背景として *E. coli* ST131 CladeC が臨床から拡散していることが疑われた。pAmpC 保有菌株も散在的に保有が認められ、その拡散経路について明らかにする必要があると考えられた。

第3章 特定の広域セファロスポリン系薬耐性 *Escherichia coli* 分離株の分子疫学的特徴

第1節 CTX-M-55型 ESBL 産生 *Escherichia coli* の分子疫学的特徴

1. 背景

近年、pandemic clone である *E. coli* ST131-B2-O25b および CAZ に耐性を示す CTX-M-15 型 ESBL およびそれを高頻度に保有す遺伝子の世界的な拡散が問題となっているが [118][119]、ESBL において CAZ に耐性を授与する D240G のアミノ酸が変異したタイプは他にも CTX-M-16, M-27, M-55 などが報告されている [56][120][121][122]。特に、CTX-M-55 型 ESBL は CTX-M-1 group に分類され、CTX-M-15 type から A77V のアミノ酸置換を有している [56]。本酵素を産生する腸内細菌科は家畜から主に分離されており、食肉を介して ESBL 産生菌が拡散していることが懸念される。一般に、食肉を通じた薬剤耐性菌の拡散は ESBL においても疑われている報告がいくつかあり [123][124]、実際には近年、臨床および健常人からの分離報告も増加している [125]。しかしながら CTX-M-55 型 ESBL 産生 *E. coli* の臨床患者由来菌株の特徴や食肉から分離される株との関わりは明らかとなっていない。

そこで、この実験では神奈川県内の 300 床以下の医療施設および市販鶏肉から分離された CTX-M-55 型 ESBL 産生 *E. coli* について、次世代シーケンサーを用いて他の保有耐性遺伝子および菌株の遺伝的背景から拡散の起源について考察した。

2. 実験方法

1) 供試菌株

被検菌株は第2章1節および2節にて *bla*_{CTX-M-55} 保有 *E. coli* と決定された10株のうち9株を用いた。

2) 薬剤感受性試験

被検菌株は単一コロニーからプロンプト法 (Beckman Coulter) にて菌液調製した。調製した菌液は、MIC パネル Neg MIC 1J (Beckman Coulter) に接種した。37°C16-20 時間好気培養後、CLSI 標準法に則って MIC を決定した³¹⁾。

3) 次世代シーケンス解析

被検菌株は PureLink Genome DNA Kit (Thermo Fisher Scientific) にて、添付文書に従い DNA 抽出した。抽出した DNA は Qubit3.0 (Thermo Fisher Scientific) にて濃度を測定後、100ng を解析に持ち込んだ。ライブラリ作製は Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) の試薬を用いて次のとおり行った。まず Ion Shear Plus Reagent を用いて、酵素 (反応時間 4.5 分) により DNA を裁断した。反応終了後の精製には Agecourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いた。得られた裁断 DNA は Nuclease Free Water にて 5 倍希釈し、2100 バイオアナライザ (Agilent) にて Quality Check を実施した。その後、添付文書に従い、残余した裁断 DNA は全てアダプターおよびバーコード付加反応のため、Ion Plus Fragment Library Adapters Kit および Ion Xpress Barcode Adapters Kit 1-16 を用いて行った。反応終了後の精製には Agecourt AMPure XP を用いた。サイズセレクトは E-Gel SizeSelect Agarose Gel (Thermo Fisher Scientific) および iBase unit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、21.5 分の電気泳動後、480bp 付近の DNA フラグメントを回収した。回収したフラグメント DNA

は Platinum PCR SuperMix High Fidelity kit (Thermo Fisher Scientific) および Library Amplification Primer Mix にて添付文書に従い、PCR 増幅した。反応終了後の精製には Agecourt AMPure XP を用いた。得られたライブラリ DNA は 2100 バイオアナライザ (Agilent) にて QC を実施し、さらに Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) および Light Cycler 480 (Roche) にて quantitative PCR を行って得られた DNA モル濃度から、100pM となるように Nuclease Free Water にて調製した。次世代シーケンサーは Ion Chef および Ion S5 system (Thermo Fisher Scientific) を用い、シーケンスのための半導体チップには Ion 530 Chip (Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られたシーケンス断片配列は FASTQ ファイルにてサンプルごとに取り出し、Center for Genome Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) にて *de novo* assembly を行った[126]。assembled contigs は Bacterial Analysis Pipeline にて薬剤耐性遺伝子、Plasmid inc type および ST を決定した。また得られた contigs は PATRIC RAST にて annotation および比較ゲノム解析を行った。

3. 結果

1) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果を Table 16 に示す。全ての株が CAZ に耐性を示したが、Imipenem に対しては全ての株が感受性を示した。CPFX に耐性を示した株は 7 株 (78%) で、 β -lactam 系薬を除く抗菌薬の中では最も高い耐性率だった。また、臨床菌株のみ 4 株が fosfomycin に耐性を示した。一方で、ST 合剤に対しては食肉由来株 2 株がいずれも耐性を示した。

2) 次世代シーケンス解析

次世代シーケンシング解析により検出された薬剤耐性遺伝子および決定された sequence type と inc type を Table 17 に示す。被検菌株を通じて、耐性遺伝子は *bla*_{TEM-1B} および *tetA* はそれぞれ 7 株および 6 株から検出された。さらに、いずれかの aminoglycoside 修飾酵素遺伝子は 6 株から検出された。全ての菌株は IncF を保有し、他には IncN および IncI1 をそれぞれ 3 株および 2 株が保有していた。臨床菌株において *E. coli* ST131 は 3 株で決定され、ST70、ST1193、ST1771 および ST2003 は 1 株ずつだった。一方、市販鶏肉由来株では ST10 および ST354 が 1 株ずつだった。今回解析した 9 株の中では、唯一、hkk-061 株は IncF、IncX および IncI1 の 3 種類の plasmid inc type を保有し、また tripehoprim、florphenicol および tetracyclin 耐性遺伝子として、それぞれ *mphA*、*floR* および *tetB* が検出された。さらに市販食肉由来株のうち 25RW005-1 においても *floR* が検出された。26NH023-4 からは *bla*_{CTX-M-55} および *bla*_{CMY-2} が同時に検出された。hkk-129 と hkk-130 は ST、耐性遺伝子および保有 plasmid が全て一致した。

3) 比較ゲノム解析

*bla*_{CTX-M-55}、*floR* および *fosA* 周辺遺伝子の比較ゲノム解析結果を Fig. 18、19 に示す。

Table 16 Antimicrobial susceptibility of CTX-M-55 producing *E. coli* isolates

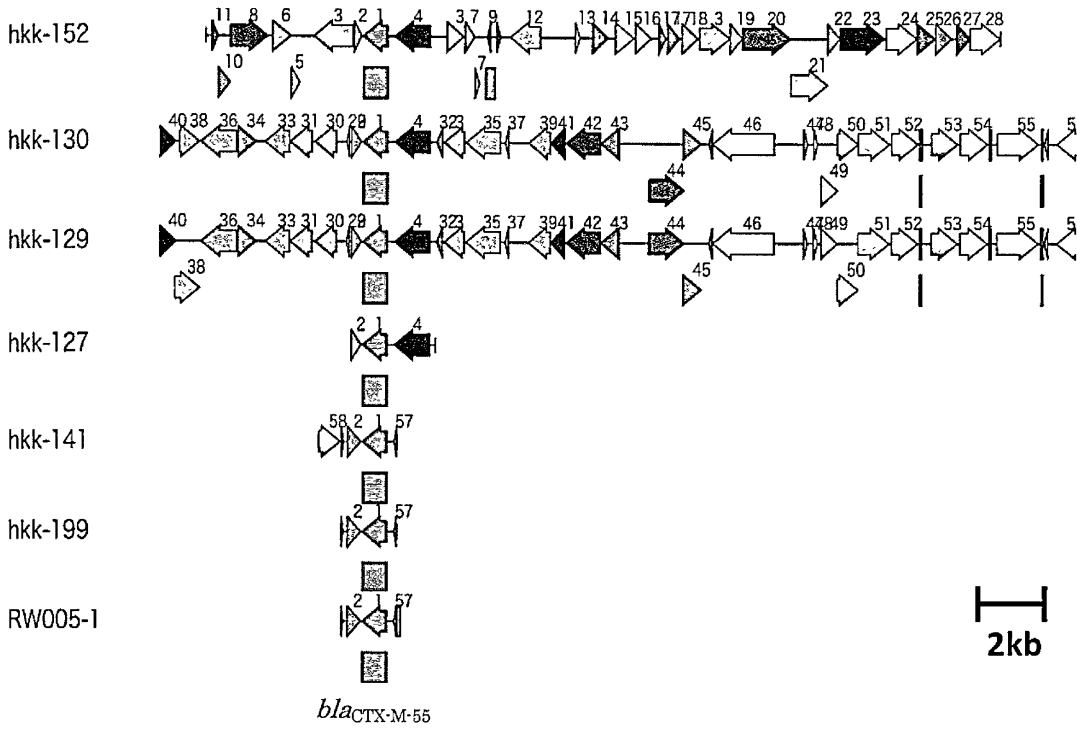
Strain	Source	MIC ($\mu\text{g/mL}$)														
		A/C	P/T	CMZ	CAZ	CPR	C/S	FMOX	IPM	CPFX	LVFX	GM	AMK	FOM	ST	MINO
hkk-061	Clinical patient	16/8	≤ 8	≤ 4	>8	>16	16/8	≤ 2	≤ 0.5	>2	>4	>8	≤ 4	≤ 4	>2/38	4
hkk-127	Clinical patient	8/4	≤ 8	≤ 4	>8	>16	16/8	≤ 2	1	2	1	≤ 1	≤ 4	>16	$\leq 2/38$	8
hkk-129	Clinical patient	8/4	≤ 8	≤ 4	8	>16	8/4	≤ 2	≤ 0.5	>2	>4	>8	≤ 4	≤ 4	$\leq 2/38$	≤ 1
hkk-130	Clinical patient	8/4	≤ 8	≤ 4	>8	>16	$\leq 4/2$	≤ 2	≤ 0.5	>2	>4	>8	≤ 4	≤ 4	$\leq 2/38$	≤ 1
hkk-141	Clinical patient	8/4	≤ 8	≤ 4	>8	>16	$\leq 4/2$	≤ 2	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.5	≤ 1	≤ 4	>16	$\leq 2/38$	≤ 1
hkk-152	Clinical patient	8/4	≤ 8	≤ 4	>8	>16	16/8	≤ 2	≤ 0.5	>2	>4	>8	≤ 4	16	$\leq 2/38$	≤ 1
hkk-199	Clinical patient	>16/8	>64	≤ 4	>8	>16	>32/16	≤ 2	1	>2	>4	2	8	>16	$\leq 2/38$	8
25RW005-1	Chicken meat (domestic)	8/4	≤ 8	≤ 4	>8	>16	16/8	≤ 2	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 0.5	≤ 1	≤ 4	≤ 4	>2/38	4
26NH023-4	Chicken meat (Imported)	>16/8	≤ 8	16	8	≤ 8	8/4	32	≤ 0.5	>2	4	>8	≤ 4	≤ 4	>2/38	≤ 1

Table 17 Detected resistant genes using whole genome sequencing of CTX-M-55 producing *E. coli* isolates

Strain	Source	Location	No. of beds	In/Out	Dep.	MLST	Resistant Genes										Plasmids	
							β-lactam	Aminoglycoside	Tetracycline	Trimethoprim	Subphosamide	Phenicol	Marcoside	Fosfomycin	JoF	Others		
BkK-061	Clinical patient	Yokohama	64	Inpatient	-	ST-2003	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3)-IIa, <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>tet</i> (A)	<i>dhfr</i> -A14, <i>dhfr</i> -A17	<i>sul</i> I, <i>sul</i> II	<i>fosR</i>	<i>mph</i> (A)	F31:A-B6	InclI ST-18 IncXI			
BkK-127	Clinical patient	Yokohama	190	Inpatient	-	ST-1771	<i>bla</i> _{CTX-M-55}		<i>tet</i> (B)				Unknown ST					
BkK-129	Clinical patient	Yokohama	41	Inpatient	-	ST-131	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>tet</i> (A)	<i>dhfr</i> -A17	<i>sul</i> II		F1:A2:B20					
BkK-130	Clinical patient	Yokohama	41	Inpatient	-	ST-131	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>tet</i> (A)	<i>dhfr</i> -A17	<i>sul</i> II		F1:A2:B20					
BkK-141	Clinical patient	Kamikura	198	Outpatient	InclMed	ST-70	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}		<i>tet</i> (A)			<i>fosA</i>	F33:A-B-	IncN ST-5				
BkK-152	Clinical patient	Yokohama	52	Inpatient	Kid.	ST-1193	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}	<i>aac</i> (3)-IIa					F-A1-B-	IncII Unknown ST				
BkK-199	Clinical patient	Chigasaki	100	-	InclMed	ST-131	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}		<i>tet</i> (A)			<i>fosA</i>	F39:A-B10	IncN ST-8				
ZSRW95-J	Chicken meat (homestic)	Kanagawa	-	-	-	ST-10	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-18}	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>aph</i> (3)-IIa, <i>strA</i> , <i>strB</i>	<i>tet</i> (A)	<i>dhfr</i> -A1	<i>sul</i> I, <i>sul</i> II	<i>fosR</i>	F33:A2:B29*	IncIII IncN				
Z6N1023-4	Chicken meat (imported)	Kanagawa	-	-	-	ST-354	<i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{CTX-M-35} , <i>bla</i> _{TEM-18}			<i>dhfr</i> -A17	<i>sul</i> II		F43:A1:B1					

*bla*_{CTX-M-55} 周辺構造は、hkk-129 および hkk-130 株間で一致していた。これらと hkk-61 株を除く、他の株では *bla*_{CTX-M-55} を含む assembled contig 長が短いために、比較が困難であった (Fig. 18A)。hkk-61 株の周辺構造は *bla*_{CTX-M-55} の下流に存在する遺伝子群がデータベースに存在した *E. coli* O104:H4 str.2011C-3493 が保有する *bla*_{CTX-M-55} 上流遺伝子と類似していた。*floR* および *fosA* の周辺構造はデータベースに登録されている株といずれも類似性が高かった (Fig. 19)。

A. Among isolates in this study



B. Between hkk-152 strain and registered strain

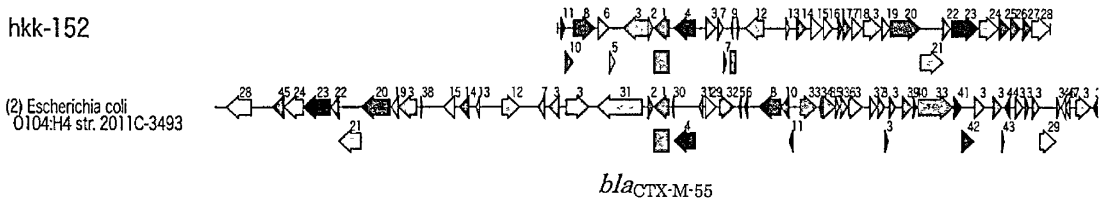


Fig. 18 Comparison of gene construction surrounding *bla*_{CTX-M-55}

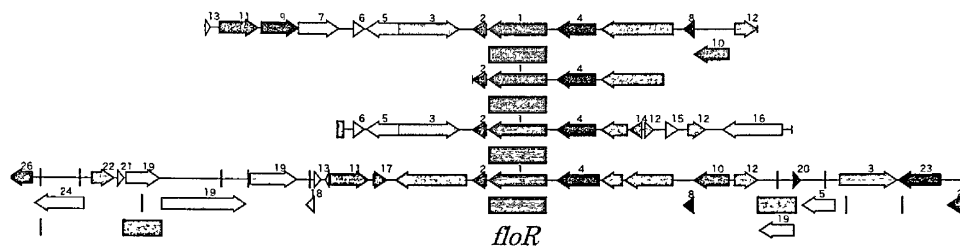
A. Surrounding *floR* gene

hkk-61

25RW005-1

(2) *Escherichia coli*
strain SCEC88

(3) *Klebsiella pneumoniae*
strain AR_0152



B. Surrounding *fosA* gene

hkk-141

hkk-199

(2) *Klebsiella pneumoniae*
strain JXR1 (4 strain not appl)

(3) *Escherichia coli*
strain 3512

(4) *Xanthomonas citri*
pv. *anacardii* strain IBSBF257

(5) *Escherichia coli*
O26:H11 strain KS181

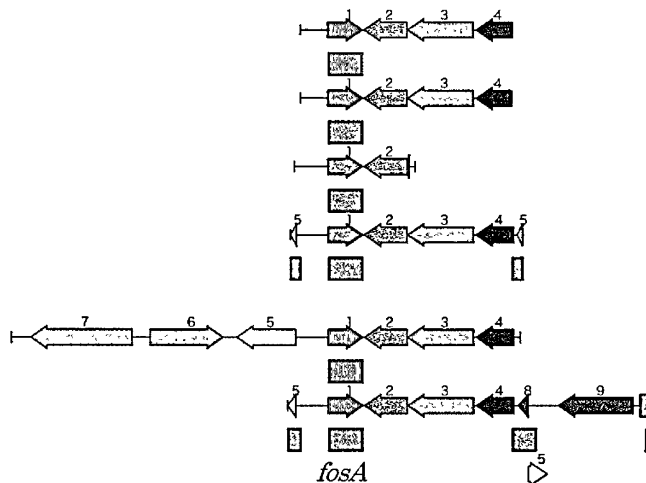


Fig. 19 Comparison of gene construction surrounding *floR* and *fosA*

4. 考察

本実験では日本国内の中小規模病院および市販食肉から分離される *bla*_{CTX-M-55} 保有 *E. coli* の分子疫学的特徴を明らかにした。特に、CTX-M-55 型 ESBL を産生する腸内細菌科菌、もしくは *bla*_{CTX-M-55} を運ぶプラスミドは中国をはじめとする東南アジアや極東において家畜から非常に多く検出されている[127][128]。そのため、ヒト環境における CTX-M-55 産生 *E. coli* の保菌率上昇は、汚染食肉からヒトへの耐性菌の拡散を強く示唆する。Kameyama らは日本の養鶏農場において CTX-M 型 ESBL で 2 番目に CTX-M-55 型が多いことを報告している[55]。さらに Shu らの報告では、中国の市中および院内感染においては CTM-M-55 は CTX-M-15 よりも優勢である[129]。日本においても、大規模病院でのサーベイランスで CTX-M-55 産生 *E. coli* が検出された報告は多数あるが、本実験は、中小規模病院から分離された株であるため、より市中において拡散している株の分子疫学的特徴を反映するような報告であると言える。

臨床菌株において *bla*_{CTX-M-55} を保有する *E. coli* の ST にはばらつきがみられ、7 株中 3 株で決定された *E. coli* ST131 が最優位であった。*E. coli* ST131 は世界的に *bla*_{CTX-M-15} を保有して拡散しているが、1 項 I の結果や他の報告から、日本国内では *bla*_{CTX-M-27} を保有して拡散している株が最も優位である[45]。*E. coli* ST131 の拡散に対する潜在能力を考慮すると、*bla*_{CTX-M-55} を保有した *E. coli* ST131 株もまた拡散することは CAZ に耐性を示す ESBL 産生菌株の拡散リスクに繋がるため、今後の動向を注視する必要がある。実際、本研究では hkk-129 と hkk-130 は分離された医療施設は同一であることが疑われ、Fig.5-1 の比較ゲノム解析からも同一菌株の施設内拡散が疑われた。*E. coli* ST131 は医療施設内での水平感染リスクが高いため、それぞれの施設内においても *bla*_{CTX-M-55} 保有株を含めた *E. coli* ST131 の監視を継続的に行うことは必須である。他の ST に目を向けてみると、中国においては、*bla*_{CTX-M-55} 保有 *E. coli* は ST1193 が優位であったこと[94]は本研究の結果とは異なるものの、

本研究においても1株はST1193が決定された。*E. coli* ST2003もまた臨床分離されている報告があり[130]、この研究では、これらの2つの株はCPFXに対して耐性であった。特に、これまでの報告において、CPFXに対する耐性を有する*E. coli* ST1193が記述されている[131]。Table5-2から分かるように、これらの株から*qnr*や*aac(6)-Ib-cr*などのPMQRはいずれも検出されなかった。したがって、*E. coli* ST1193およびST2003におけるCPFXの耐性はQRDRの染色体突然変異によると思われる[130]。一方、他のST、*E. coli* ST70およびST1771は家畜および小売食肉から散発的に分離され[132][133]、これらの株はCPFXに対して感受性である。PMQR遺伝子が家畜分野からの水平伝播によってこれらの菌株に獲得されてしまうと、その拡散は腎盂腎炎などの種々の感染症に対するフルオロキノロン剤を用いた治療失敗に対する懸念へと繋がる。

*bla*_{CTX-M-55}保有*E. coli*が同時に保有する他の薬剤耐性遺伝子は、*bla*_{TEM-1B}と*tet(A)*で、これらを同時に保有する報告は多数ある[56][134][135]。さらに、*bla*_{CTX-M-55}保有*E. coli*から検出されるのは多くの報告でplasmid IncFとNとIIであることから[133][134][135]、*bla*_{CTX-M-55}はこれらのplasmid上で拡散と推測される。hkk-61および25RW005-1株からは家畜に使用されるフロルフェニコール系薬に対する耐性遺伝子*floR*が検出された。家畜におけるβ-lactamase産生菌の拡散にはフロルフェニコールの使用が関与している可能性がMeunierら[136]によって示されていることから、*bla*_{CTX-M-55}の拡散にも関与するかもしれない。しかしながら、この研究では、contigsが完全に組み立てられたわけではないため、各耐性遺伝子が載るプラスミドinc typeは不明である。さらに、1株につき1つまたは2つ以上のプラスミドを有するかどうかについても不明である。

さらに、*fosA*が検出された株であるhkk-141とhkk-199株は、IncN plasmidを保有していた。アメリカでIncFプラスミドに*bla*_{CTX-M-55}とともに*mcr-1*が載っていた株が検出されたMacGannらの報告(516)では、その株が同時に保有していたIncN plasmidに*fosA*を載せてい

た。CTX-M-55 産生 *E. coli* における *fosA* の拡散は、 β -lactam 系抗菌薬に効果がない尿路感染症患者の治療の選択肢を狭めるだろう。それは、市中における *E. coli* による尿路感染症のホスホマイシン耐性率は 0%の報告があり[137]、これまで治療薬として有効であると考
えられているからである。

5. 結言

本実験は日本の神奈川県内の300床以下の医療施設と市販食肉からCTX-M-55産生*E. coli*を収集し、その特徴づけSTおよびplasmid inc type、さらに菌株が保有する他の薬剤耐性遺伝子を決定した最初の報告である。中枢医療機関でない医療施設から分離された*E. coli*が保有する $bla_{CTX-M-55}$ は、ST131を含む異なるクローンが保有しており、その一部は家畜や市販鶏肉からしか検出されない株だった。極東および東南アジアで臨床患者や家畜、食肉から検出される株が保有する $bla_{CTX-M-55}$ は日本において、市中で $bla_{CTX-M-15}$ の拡散に匹敵するような、より一般的になる拡散リスクを含んでいる。一方で、plasmidは家畜およびヒトから分離される株より検出されるinc typeが一致している。そのため、これらが保有する $bla_{CTX-M-55}$ は、菌株が直接摂食を通じてヒトに侵入したのか、遺伝子の水平伝播によって拡がったのかは不明である。しかしながら、臨床菌株および市販鶏肉由来株の両方から $floR$ が検出されたことは、 $bla_{CTX-M-55}$ の拡散に家畜が関わっていることを強く示唆する。また、 $bla_{CTX-M-55}$ 保有株において、広域セファロスポリン系薬耐性のみではなく、*E. coli* ST131やST1193の拡散によるフルオロキノロン系薬耐性や $fosA$ 保有によるホスホマイシン耐性は、市中の尿路感染症など種々の感染症の治療選択肢を狭める影響を与える可能性がある。

第2節 *qnr* 保有 ESBL 産生 *Escherichia coli* の分子疫学的特徴

1. 背景

フルオロキノロン系薬はグラム陽性・陰性菌に抗菌効果を持つ広域スペクトル抗菌薬で、尿路感染症や呼吸器感染症に高頻度で用いられ、さらに家畜に対しても多用されている。一方で、臨床分離(Fig. 17)や家畜から分離される *E. coli* におけるフルオロキノロン系薬の耐性率は年々上昇しており、さらなる拡散が危惧されている[29][30][36]。AMR アクションプランでは、日本において臨床および家畜分野においていずれも、フルオロキノロン系薬耐性 *E. coli* の耐性率減少を 2020 年までの目標としている[28]。

フルオロキノロン系薬耐性メカニズムの 1 つには plasmid 上に載ることが多い PMQR の 1 つである *qnr* がある。*qnr* により発現する Qnr 蛋白はペントペプチドリピートのアミノ酸配列を有し、 β 型 DNA を模倣する構造であることが証明されている[138]。この構造は、フルオロキノロン系薬の作用機序である DNA gyrase 阻害から酵素反応を保護する[139]。*qnr* はこれまで *qnrA*、*B*、*C*、*D* および *S* が報告されており、*E. coli*、*K. pneumoniae*、*Enterobacter sp.* および *Salomonella sp.* などが保有していることが報告されている[140][141]。このうち日本では、特に *qnrS* の保有率が最も高い[142]。さらに、プラスミド性に存在する耐性遺伝子は、細菌株間で接合伝達することによって耐性を付与し、菌種を超えて拡散することができるため問題視されている。

第2章1節では臨床分離される ESBL 産生 *E. coli* の CPF_X 耐性率は 92%だったが、*qnrS* 保有率は 1.9%であった。また、Qnr 蛋白は、それ単独ではフルオロキノロン系薬の MIC 上昇に与える影響は大きくないとされている[143]が、本研究で分離されている株のフルオロキノロン系薬耐性に与える影響について未だ明らかにしていない。さらに *qnr* は家畜や環境中から多く分離されることが報告されていることから[144][145][146]、臨床現場で分離される *E. coli* がどのような分子疫学的背景を有しているかを明らかにすることは、*qnr* の拡散リスクを推

察する上で重要である。

そこで本実験は、臨床患者および市販鶏肉から分離された *qnr* 保有 ESBL 産生 *E. coli* について、次世代シーケンサーを用いて分子疫学的特徴とフルオロキノロン系薬耐性に与える影響について考察した。

2. 実験方法

1) 供試菌株

被検菌株は第2章1節および2節にて *qnrS* 保有 *E. coli* と決定された5株(臨床分離株4株、市販食肉由来株1株)を用いた。第2章1節および2節にて決定された *qnrS* は *qnrS1* が4株(臨床分離株3株、市販食肉由来株1株) および *qnrS2* (臨床分離株1株) である。

2) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は第2章1節2.2)に従って行った。

3) 次世代シーケンス解析

方法は第3章1節2.3)に従った。

3. 結果

1) 薬剤感受性試験

臨床菌株 4 株のうち、*qnrS1* 陽性 1 株 hkk-93 および *qnrS2* 陽性 1 株 hkk-2 の CPFY に対する MIC は $>16\mu\text{g/mL}$ だった。一方で、市販鶏肉由来 *qnrS1* 陽性 1 株 25RW005-1 の CPFY に対する MIC は $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ だった。臨床菌株のうち、残りの *qnrS1* 陽性 2 株 hkk-186 および hkk-193 の CPFY に対する MIC は $1\mu\text{g/mL}$ だった。

2) 次世代シーケンス解析

次世代シーケンシング解析により検出された薬剤耐性遺伝子および決定された sequence type と inc type を Table 18 に示す。CPFY に耐性を示した 2 株の ST は ST2179 および ST131 だった。さらにその 2 株から *aac(6')-Ib-cr* が検出された。*qnrS2* を保有する hkk-2 株は、他に *bla_{CTX-M-65}*、*floR*、および *ARR-3* を保有していた。CPFY に感性を示した 2 株の ST は ST34 および ST131 だった。*qnrS1* 保有食肉由来株 25RW009-4 は ST3489 で、*bla_{CMY-2}* を保有していた。

qnrS1 周辺遺伝子の比較ゲノムを Fig. 20 に示す。*qnrS1* の上流および下流配列は登録されているデータベース上の株も含めて高度に保存されていた。

Table 18 Detected resistant genes using whole genome sequencing of *qnrS* positive *E. coli* isolates

Strain	MLST	plasmids	IncN	IncF
hkk-2	ST-2179	IncFIC(FII), IncFIB(AP001918)		F18:A::B1
hkk-93	ST-131	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncN, Col156	ST-6	F31:A4:B1
hkk-186	ST-34	IncFII, IncFIB(K), ColRNAI		K9:A::B-
hkk-193	ST-131	IncFII(pRSB107), IncFII(29), IncFIB(AP001918), IncN, Col156	ST-7	F29:A::B10

Strain	Quinol.	Trim.	β -lactam	TCs	Sulph.	AGs	Phen.	Rifam.
hkk-2	<i>oqxA</i> <i>oqxB</i> <i>QnrS2</i>		<i>bla</i> _{CTX-M-65} <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>tet(A)</i>		<i>aac(6)Ib-cr</i>	<i>catB3-like</i> <i>floR-like</i>	<i>ARR-3</i>
hkk-93	<i>QnrS1</i>	<i>dfrA14-like</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1}			<i>aac(6)Ib-cr</i> <i>aac(3)-IIa-like</i>	<i>catB3-like</i>	
hkk-186	<i>QnrS1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>tet(A)</i> <i>tet(D)</i>	<i>sul1</i>			
hkk-193	<i>QnrS1</i>	<i>dfrA14-like</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14}					

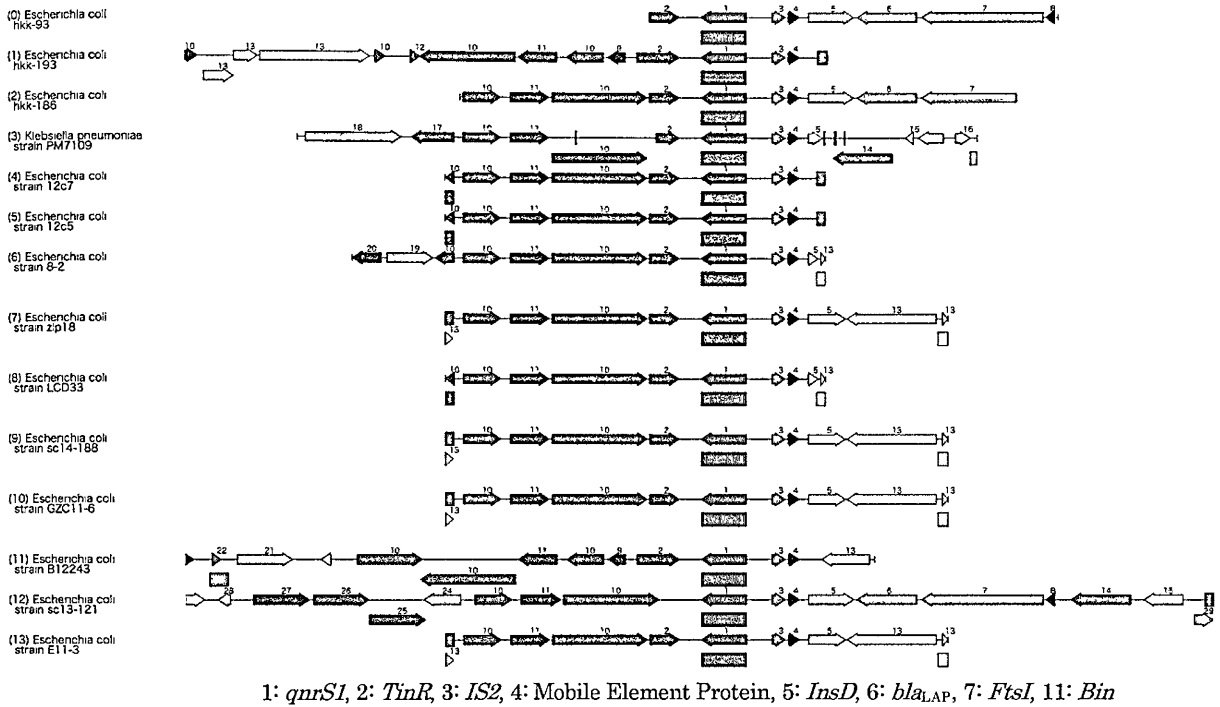


Fig.19 Comparison of gene construction surrounding *qnrS1*

4. 考察

本実験では、*qnrS* が保有菌株のフルオロキノロン系薬耐性に与える影響と分子疫学的特徴について明らかにした。フルオロキノロン系薬は細菌感染症に対して広域スペクトルを有することから、その耐性は臨床上大きなインパクトとなる。本研究で用いた臨床菌株に対する CPFX の MIC は、4 株のうち 2 株が感受性領域 ($\leq 1\mu\text{g/mL}$) だった。*qnrS* が CPFX の MIC 上昇に与える影響は低いことが知られている[143]が、菌株が *qnr* を保有する利点は、保有菌株に CPFX 低感受性を与えることで、フルオロキノロン系薬に耐性を示す株を選択することにあると言われている[147][148][149])。市販鶏肉由来株においても同様に、*qnrS1* 保有株に対しては CPFX の MIC が感受性領域だった。家畜から分離される *E. coli* に対する CPFX の MIC 分布は約 85%が $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ 以下を占めていることが報告されており[150]、臨床から分離される株に比べて、CPFX の MIC は低値傾向にあることが示唆される。しかしながら、これらの結果は、CPFX の MIC が感受性領域にある臨床および環境中の菌株において潜在的に *qnr* が拡散している可能性を示唆する。一方、本実験の限界は臨床菌株および食肉由来株ともに広域セファロスポリン耐性 *E. coli* のみを対象としていることから、広域セファロスポリン感受性菌や他の菌種における拡散の程度は推定できない点である。タイの外来患者および救急患者におけるサーベイランスでは、CPFX 低感受性 *E. coli* の増加を示唆している[151]。本邦でも、AMR アクションプランにおいてフルオロキノロン系薬耐性 *E. coli* の耐性率低下を課題の一つとするのであれば、*qnr* 保有による低感受性株に対するサーベイランスを実施していくことが求められる。

qnrS を保有する菌種は、日本のサーベイランスにおいては *Enterobacter sp.* が多いと報告されている[141]。一方で、本研究のように *E. coli* における *qnr* 保有率を明らかにした国内のサーベイランス報告は少なく[151]、多施設で保菌率を明らかにした横断的研究でも[152]、臨床分離される *E. coli* での *qnr* 保有報告は少ない[152][153]。実際、日本の臨床分離 *E. coli* にお

いて *qnrS* の保有率を明らかにしたのは本調査が初めてである。また、*qnrS2* を保有した *E. coli* が臨床分離されたのは本調査が初めてで、ST2179 はこれまで、家畜や食肉、さらに野生動物や環境から検出されている[146][154][155]。同様に、*bla_{CTX-M-65}* および *floR* の存在も、本菌株が家畜などに由来することを強く推察させることから、*qnrS2* は家畜や環境中に由来する遺伝子であり、臨床菌株への遺伝子の水平伝播により拡散したことを強く示唆する。*qnr* 保有株は、多く環境中から分離されている報告がある。Zhang は中国において、水環境と臨床患者から *qnr* 保有 *C. freundii* を多数分離し、*qnr* が載っている plasmid に共通性を見出している[156]。これは、環境から臨床分離株へと *qnrS2* を載せた plasmid が水平伝播した可能性を示唆する。本研究においても同様の伝播経路の可能性があることから、全ゲノムシーケンスなどによる plasmid の比較ゲノムにより明らかにすることが可能となる。

qnrS1 の周辺構造が分離された菌株で保存されていたことは、*qnrS1* の拡散に挿入配列 (Insertion sequence; IS) の存在を強く疑う。Fig. 20 において、*qnrS1* の上流と下流にある遺伝子 3 および 2 はそれぞれ IS2 および Resolvase/Integrase で、臨床菌株と食肉由来株の 4 株にも共通していた。これまでの多くの報告でも、*qnrS1* の上流および下流には IS2 および *res* を保有する株が分離されている[157][158]。これらの事実は、*qnrS1* がこれらの挿入配列および遺伝子によって、分離される環境によらず高度に保存されていることを示唆する。

本研究および 1 項 I. の研究を踏まえると、臨床検査センターから菌株を収集したサーベイランスは、その収集株数に応じて単一施設によるバイアスを抑えて低頻度保有耐性遺伝子の保有率を明らかにすることができ、そのうち、他の環境から拡散した株の存在をも明らかにすることが可能であると考えられる。

5. 結言

本実験では *qnrS* 保有 *E. coli* 株の分子疫学的特徴として、*qnr* 単独保有菌株では CPFX の MIC が感受性領域にあるため、潜在的な保有株が存在することを示唆した。さらに、保有菌株のなかに pandemic clone である ST131 が認められたことは、今後の *qnrS* 拡散リスクと考えられる。*qnrS1* の周辺遺伝子構造は高度に保存されており、IS2 が拡散に関与していた。さらに、臨床分離された *E. coli* が *qnrS2* を保有しているのは初めての報告である。

第3節 CMY-2型 β -lactamase 産生 *Escherichia coli* と IncK plasmid の接合伝達能

1. 背景

AmpC型 β -lactamase はクラス C β -lactamase に分類され 13)、通常はペニシリン系薬を好適基質するが、過剰産生されると広域セファロスポリン系薬をも分解できる活性を持つ[22]、[114]。通常、AmpC型 β -lactamase を発現する遺伝子は *Enterobacter* sp.、*Citrobacter* sp.、*Serratia* sp. など腸内細菌科の染色体上に存在し、ペニシリンなどの β -lactam 系薬と接触することで、 β -lactam 系薬による細胞壁合成阻害に対抗して細胞壁合成を進めるためのシグナル蛋白としての働きも有する[159]。よって、ペニシリン系薬は上記の3菌属においては通常、自然耐性を示すことが多く、さらに広域セファロスポリン系薬などの選択圧下においては、広域 β -lactam 系薬に対して耐性を示すこともある。このような常時大量の AmpC 遺伝子を発現する酵素産生様式は、構成型と言われている[159]。

一方で、*Escherichia* sp. や *Klebsiella* sp. においては染色体上に存在する AmpC 遺伝子を常時発現しないことから、誘導型と言われ、一般に構成型を示す菌属に比べて広域セファロスポリン系薬に対する耐性は低くなる[159]。しかしながら、*Escherichia* sp. や *Klebsiella* sp. において、AmpC型 β -lactamase を発現する遺伝子が存在する plasmid を獲得した場合、それらの株は広域セファロスポリン系薬に対して常時耐性を示すようになる[160][161]。さらに、plasmid が菌種および菌株間を水平伝搬する能力を有する場合には、pAmpC 遺伝子はより拡散することになる。実際、*bla*_{ACT-1} を保有する *K. pneumoniae* が外膜蛋白の変異による透過性の低下を伴って、カルバペネム系薬にまで耐性になった報告もある[162]。

E. coli における pAmpC 保有率は臨床菌株では高くなく、日本のサーベイランスでは2010年の Yamasaki らの報告より 0.13%であり[162]、2012年の Matsumura らの報告により 1.7%である[163]ことが報告されている。また、本調査でも1項IのESBL産生 *E. coli* 207株において、pAmpC 遺伝子を同時保有する株は見出されなかった。一方、第2章2節および3節

の調査でそれぞれ、国産および外国産市販鶏肉由来株では 35%の株が *bla*_{CTM} を保有し、また健常人では年度によって保有者を 10%以下の割合で認めた。家畜分野では *bla*_{CMY-2} の拡散も他に多く報告されており [55][69][80][81]、他の研究では分離される *bla*_{CMY-2} を載せた plasmid は接合伝達能を有することが報告されている [81]。

接合伝達は細菌遺伝子の水平伝播能の 1 つである。細菌における遺伝子の水平伝播は環境適応、各種耐性、毒素産生など細菌の生存戦略に不可欠である [164][165]。細菌が外来遺伝子を獲得する方法は多く存在するが、そのうち、接合伝達は細菌の線毛を介して plasmid を他の菌株に水平伝播する現象である [166]。また、細菌は plasmid に対する不和合性を持つことから、plasmid の保有や接合伝達には plasmid inc type が深く関与する [167][168]。

そこで本実験では市販鶏肉から分離された *bla*_{CTM} 陽性 IncK 保有 *E. coli* の接合伝達能を評価し、ヒト環境への拡散の可能性とリスクについて考察することを目的とした。

2. 実験方法

1) 供試菌株

供試菌株は市販食肉より分離された CTX 耐性 *E. coli* 37 株 (*bla*_{CTX-M} 保有株 15 株、*bla*_{CTX-M} 保有株 21 株、共保有株 1 株) をドナー株とした。さらに接合伝達実験のためのレシピエント株として *E. coli* DH5 α (乳糖非分解) にリファンピシン(RFP, Wako)耐性を付与した株を用いた。

2) 接合伝達試験

分離されたドナー株は単独コロニーを 2 μ g/mL CTX 加 LB ブイヨンにて 37°C 18-20 時間、200rpm で振盪培養した。レシピエント株は抗菌薬を含まない LB ブイヨンにて同様に振盪培養した。増菌された供試菌株は 100mL を 3mL LB ブイヨンにて継代培養し、OD₆₆₀ の値が 0.5~0.9 になるまで約 2 時間、200rpm 振盪培養し、対数増殖期の細胞を得た。振盪培養後、レシピエント株およびドナー株をそれぞれ 400mL および 100 μ L 分取して 1.5mL マイクロチューブで混合し、10,000rpm で 1 分遠心沈殿した。対照には、レシピエント株および LB ブイヨンをそれぞれ 400mL および 100 μ L 分取して 1.5mL マイクロチューブで混合し、10,000rpm で 1 分遠心沈殿した。いずれも、菌体を沈殿させた状態で、37°C 正確に 20 時間静置インキュベートした。その後、チューブ内の菌液を再懸濁し、希釈操作と培地への塗抹を行った。ドナー株と混合したブ罗斯は 10~10⁵ 倍まで滅菌生食で希釈し、各希釈倍率につき 3 枚の RFP 50 μ g/mL および CTX 2 μ g/mL の薬剤を含む BTB 乳糖寒天培地に 100 μ L 滴下し、塗抹した。同様にして、対照は 10~10⁸ 倍まで滅菌生食で希釈し、10⁵~10⁸ 倍までの各希釈倍率につき 3 枚の抗菌薬を含まない BTB 乳糖寒天培地塗抹した。塗抹後の培地は、37°C 好気条件下にて 48 時間培養した。発育してきたコロニーのうち、乳糖非分解コロニーを接合伝達体としてカウントし、実験に供した。接合伝達率 (Frequency) は接合伝達体と

して発育したコロニー数について、平均をとり、各サンプルについて接合伝達体のコロニー数を対照のコロニー数で除して求めた。

3) 薬剤感受性試験

得られた接合伝達体に対して、薬剤感受性試験は第2章1節2.2)に従って行った。寒天平板希釈法に使用した薬剤はCMZ、CAZ、CPFX およびGMの4つを用いた。薬剤濃度は全て0.5~16 µg/mLとした。

4) β -lactamase および Plasmid incompatibility type の決定

得られた接合伝達体からの β -lactamase 遺伝子の検出は第2章1節2.3-4)に従った。Plasmid inc type の決定は、第2章2節2.4)に従った。

5) 次世代シーケンス解析

対象は市販鶏肉から分離された *bla*_{CTM} 保有 IncK 陽性 plasmid を含んだ *E. coli* 13 株を試菌株とした。方法は第3章1節2.3)に従った。

3. 結果

1) 接合伝達試験

接合伝達体を得られた株は、国産および外国産市販食肉由来 *bla*_{CITM} 保有株それぞれ 6/6 株(100%)および 9/10 株(90%)、国産および外国産市販食肉由来 *bla*_{CTX-M} 保有株それぞれ 4/9 株(44%)および 1/13 株(8%)だった。それぞれの株の接合伝達効率を Fig. 21 に示す。接合伝達効率は 10^{-2} ~ 10^{-8} に分布し、群間比較で違いはなかった。

接合伝達体の薬剤感受性、検出された *bla* 遺伝子および Plasmid inc type を Table 19 に示す。接合伝達体の CMZ および CAZ に対する感受性は保有する β -lactamase の基質特異性に概ね一致した。一方で、GM および CPFY に対しては全て感性を示した。全ての接合伝達体においてドナー株と同様の *bla* 遺伝子を検出した。plasmid inc type は、ドナー株が *bla*_{CITM} 保有株の場合には全ての接合伝達体から IncK を検出し、*bla*_{CTX-M} 保有株では全ての接合伝達体から IncI1-Iy を検出した。ドナー株で陽性となった Inc type 別の接合伝達体を得られた割合を Fig.22 に示す。IncK および IncI1-Iy を保有していた株からは、80%以上確率で接合伝達体を得られた。しかしながら、IncF を保有していた株からは、約 50%程度の株からしか接合伝達体を得られなかった。

2) 次世代シーケンス解析

検出された耐性遺伝子の一覧を Table 20 に示す。全ての菌株で、*bla*_{CMY-2} および IncK/B/O/Z を決定した。さらに、*tet(B)* および *sul2* はそれぞれ 7 株および 10 株で保有が確認された。いずれかのアミノグリコシド修飾酵素遺伝子を保有していた株は 8/13 株 (62%) だった。9/13 株 (69%) はフルオロキノロン系薬の原因となる QRDR 変異を有していた。

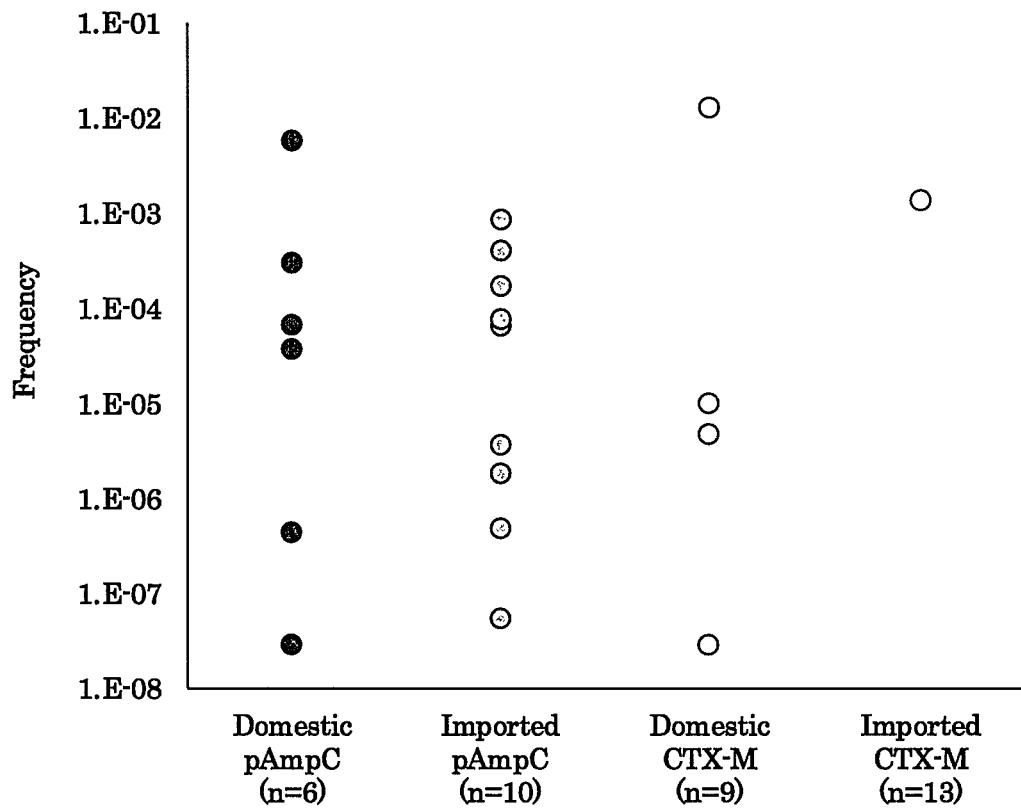


Fig. 20 Frequency of tranconjugation in each isolates

Table 19 Comparison of phenotype and genotype between donor and transconjugants

Strain	AST category (Donor/Tc)				β -lactamase		Inc type		
	CMZ	CAZ	CPFX	GM	Donor	Tc	Donor		Tc
25RW009-1	I/R	R/R	S/S	S/S	CIT TEM	CIT	I1-I γ FIA FIB F		I1-I γ K
25RW009-4	I/S	R/R	S/S	S/S	CIT	CIT	I1-I γ FIB Y K		I1-I γ FIB Y K
25RW010-1	S/R	R/R	S/S	S/S	CIT TEM	CIT	I1-I γ FIA FIB F K		K
25RW011-1	R/R	R/R	S/S	S/S	CIT TEM	CIT	HI1 FIB F K		K
25RW012-1	I/R	R/R	R/S	S/S	CIT TEM	CIT TEM	FIB Y F K		K
26NH002-1	I/R	R/R	S/S	R/S	CIT TEM	CIT	FIB A/C F K		K
26NH011-4	I/S	I/R	S/S	R/S	CIT	CIT	FIB F K		K
26NH012-2	R/R	R/R	R/S	R/S	CIT TEM	CIT	I1-I γ FIB F K		K
26NH013-2	S/R	I/R	R/S	S/S	CIT	CIT	I1-I γ FIB K		K
26NH018-1	I/R	R/R	R/S	R/S	CIT	CIT	ND		K B/O
26NH019-1	I/R	R/R	R/S	S/S	CIT	CIT	FIB F K		K
26NH021-5	S/R	R/R	S/S	I/S	CIT	CIT	K B/O		K B/O
26NH022-4	I/R	I/R	S/S	S/S	CIT	CIT	K		K
26NH022-5	I/S	I/R	S/S	S/S	CIT	CIT	FIB K		K
26NH023-2	I/S	I/R	S/S	S/S	CIT	CIT	FIB K		K
24OK026-2	S/S	S/S	S/S	S/S	CTX-M-1	CTX-M	I1-I γ F K		I1-I γ F
24OK029-1	S/S	S/I	I/S	S/S	CTX-M-2	CTX-M	I1-I γ FIB P F		I1-I γ
25RW005-1	I/S	R/S	R/S	S/S	CTX-M-55	CTX-M	FIA FIB F		I1-I γ FIB F
25RW011-4	S/S	S/S	S/S	S/S	CTX-M-1 TEM	CTX-M	I1-I γ FIB F		I1-I γ
26NH012-1	S/R	S/S	S/S	R/S	CTX-M-8	CTX-M	I1-I γ FIB F		I1-I γ

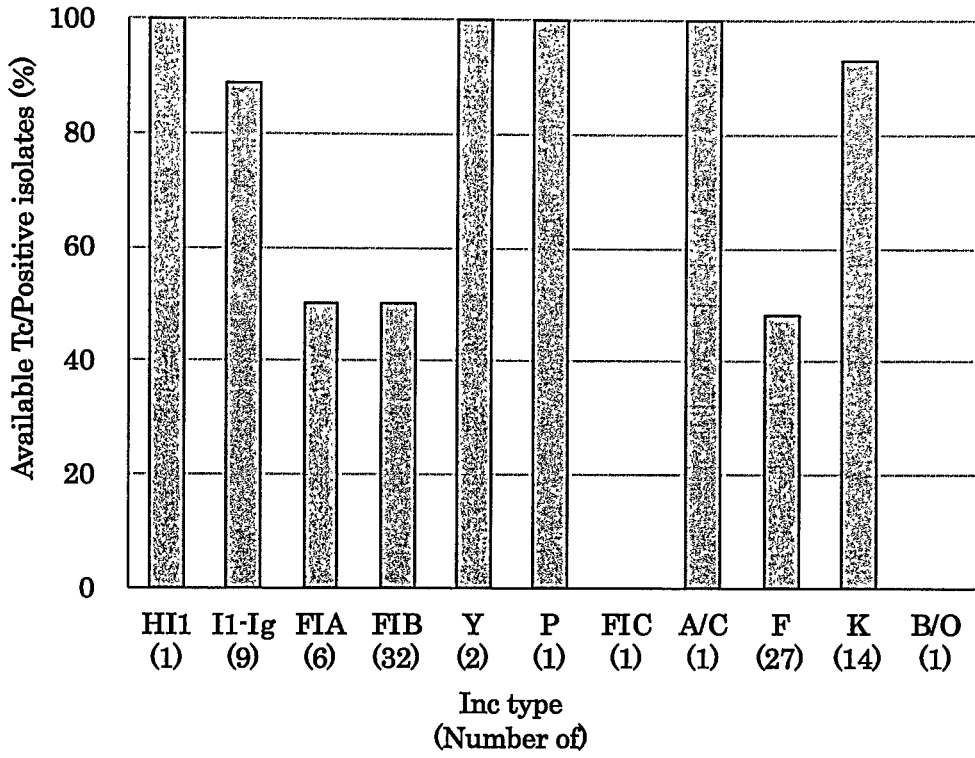


Fig. 21 Transconjugated rates among incompatibility type in isolates

Table 20 Detected resistant genes using whole genome sequencing in *bla*_{CTM} positive IncK including *E. coli* isolates from retail meats

Strain	β-lactamase	AME	MLS				Fluoroquinolone	
			(Macrolide, Lincosamide, Streptogramin)	Phenicol	Sulphonamide	Tetracycline	Trimethoprim	PMQR
25RW009-4	<i>bla</i> _{CMV2}	<i>aadA5, aph(3')-Ia</i>		<i>suI2</i>		<i>dfrA17</i>	<i>QmrS1</i>	
25RW010-1	<i>bla</i> _{CMV2} , <i>bla</i> _{TEN-1B}	<i>aph(3')-Ia, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>		<i>suI2</i>				
25RW011-1	<i>bla</i> _{CMV2} , <i>bla</i> _{TEN-1B}				<i>tet(M)</i>			
25RW012-1	<i>bla</i> _{CMV2}	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>		<i>suI2</i>	<i>tet(B)</i>			<i>eyrA p.S83L, D87N parC p.S80I</i> <i>eyrA p.S83L</i>
26NH002-1	<i>bla</i> _{CMV2} , <i>bla</i> _{TEN-1B}	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>		<i>suI2</i>	<i>tet(B)</i>			
26NH011-4	<i>bla</i> _{CMV2}	<i>aadA1, aph(3')-Ia, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>		<i>suI2</i>	<i>tet(B)</i>			
26NH012-2	<i>bla</i> _{CMV2} , <i>bla</i> _{TEN-1B}	<i>aadA1</i>		<i>suI1, suI2</i>				<i>eyrA p.S83L, D87N parC p.S80I</i>
26NH013-2	<i>bla</i> _{CMV2}	<i>aadA1</i>	<i>Int(F)</i>		<i>tet(B)</i>	<i>dfrA1</i>		<i>eyrA p.S83L, D87N parC p.S80R</i>
26NH019-1	<i>bla</i> _{CMV2} , <i>bla</i> _{OXA-1}	<i>aadA1</i>		<i>catA1</i>	<i>tet(B)</i>	<i>dfrA1</i>		<i>eyrA p.S83L</i> <i>parC p.S80I</i>
26NH022-4	<i>bla</i> _{CMV2}			<i>suI2</i>	<i>tet(B)</i>			<i>eyrA p.S83L</i> <i>parC p.S57T, S80I</i>
26NH022-5	<i>bla</i> _{CMV2}			<i>suI2</i>	<i>tet(B)</i>			<i>eyrA p.S83L</i> <i>parC p.S57T, S80I</i>
26NH023-2	<i>bla</i> _{CMV2}			<i>suI2</i>	<i>tet(B)</i>			<i>eyrA p.S83L</i> <i>parC p.S57T, S80I</i>
26NH023-4	<i>bla</i> _{CMV2} , <i>bla</i> _{CMV55} , <i>bla</i> _{aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, aph(3'')-Ia}			<i>suI2</i>		<i>dfrA17</i>		<i>eyrA p.S83L, D87N parC p.S80I</i>

4. 考察

本研究では pAmpC 陽性 IncK 保有 *E. coli* の接合伝達能と、菌株が保有する薬剤耐性遺伝子について次世代シーケンサーを用いて解析した。まず、市販食肉由来株が保有する pAmpC 遺伝子は *bla*_{CMY-2} であることが決定された。市販鶏肉由来株の接合伝達能に関しては国産、もしくは外国産の由来による違いは認めなかった。さらに、第2章2節の結果より、国産および外国産鶏肉に依存するのは ST の違いであったことから、*E. coli* の菌株による違いは接合伝達能に関与しにくいことが示唆される。一方、保有する *bla*_{CMY-2} を載せた plasmid は、*bla*_{CTX-M} を載せた plasmid よりも接合伝達能が高いことが明らかとなった。*bla* 遺伝子の種類によって接合伝達体を得られる頻度が異なった理由は、*bla*_{CMY-2} が載っている plasmid が高確率で IncK plasmid だったからであると考えられる。一方で、*bla*_{CTX-M} 陽性株のうち、多くの株は IncF を保有しているが、IncF のみを保有して接合伝達体を得られた株は、本研究では認められなかった。しかしながら、*bla*_{CTX-M} 陽性 IncI1-Iy 保有株では高い確率で接合伝達体を得られ、同時に IncF が陽性となっている株が多かった。すなわち、Fig.7-2 に示すように、接合伝達体を得られるか否かは plasmid の Inc type に大きく依存することが明らかとなり、IncF 陽性株で接合伝達体を得られた割合が 50%だったのは、これらの IncK および IncI1-Iy と同時に IncF が保有されているためであると推察できる。実際、Table7-1 より接合伝達体より検出できた Inc type は、全ての株において IncK および IncI1-Iy であることから、市販食肉由来株において接合伝達能を有する plasmid は IncK および IncI1-Iy が主であると考えられる。

接合伝達に関与する遺伝子として *tra* 遺伝子群が報告されている[169]が、本研究で接合伝達体を得られた株の次世代シーケンス解析からも *tra* 遺伝子の存在を確認した (data not shown)。近年では、*bla*_{CMY-2/4} を載せた新たな IncK の subgroup IncK2 が Seiffert らによって報告されている[170]。Seiffert らの報告においても、*tra* 遺伝子群の存在が証明されている。

さらに、IncK および IncI1-Iy は DNA-DNA hybridization において 90%以上の高い相同性が高いことが言われており[171]、本実験の接合伝達能の有無と一致する。

β -lactam 系薬以外の薬剤感受性に目を向けると、接合伝達により水平移動する薬剤耐性遺伝子には、アミノグリコシド系薬およびフルオロキノロン系薬耐性遺伝子は含まれない可能性が高いことも明らかとなった。アミノグリコシド系薬耐性遺伝子の1つであるアミノグリコシド修飾酵素遺伝子は本実験で用いた株のうち、62%の株から検出されたが、接合伝達体において GM 耐性となった株は認められなかったことから、これらの遺伝子は IncK および IncI1-Iy に載っていないことが推測できる。しかしながら、アミノグリコシド修飾酵素はその種類によって基質となるアミノグリコシド系薬が異なる[27]ことから、GM のみの感受性だけでは言い切れない点は、この実験の限界である。また、pAmpC 陽性株のフルオロキノロン系薬耐性のメカニズムとして染色体上に存在する QRDR 変異が約 70%の株に認められたことは、plasmid 性に耐性が水平伝播しない本実験の結果と一致する。PMQR が 13 株中 1 株からのみしか認められなかったことは、市販鶏肉に付着する広域セファロスポリン耐性 *E. coli* の PMQR によるフルオロキノロン系薬耐性の水平伝播リスクは現時点では高くないことが推察できる。

5. 結言

本実験では鶏肉から分離された広域 β -lactamase 産生 *E. coli* に含まれる plasmid の接合伝達能の違いを明らかにした。それらの菌株中の plasmid 接合伝達能は産地依存せず、Inc type に依存していた。特に、*bla*_{CMY-2} を載せた plasmid は産地に依らず、IncK であり、接合伝達能を高い確率で保有していた。同様に、*bla*_{CTX-M} においては、IncI であった。本研究で明らかにした、これらの接合伝達能は plasmid を介した *bla* を主とする薬剤耐性遺伝子の異なるフィールドへの流入リスクとなる。

第4章 総括

薬剤耐性菌の対策は、現在、世界的な懸念の1つである。2050年には、薬剤耐性菌による感染症の死者が年間1000万人、薬剤耐性菌に対する医療費として100兆円以上が必要であるとWHOのAMRグループによって推算されている。世界的な問題として、薬剤耐性菌に対する研究は、医療経済や公衆衛生をより良いものにしていく上で重要なテーマである。

本論文は薬剤耐性菌のうち、グラム陰性桿菌で問題となっている広域セファロスポリン系薬を分解する β -lactamase遺伝子を保有する腸内細菌科の拡散と、同時に耐性となり得る抗菌薬耐性遺伝子の分子疫学的調査を体系的にまとめたものである。

第1章序論では、まず抗菌薬と薬剤耐性菌の発見から、特に β -lactam系薬に焦点を絞って、抗菌薬の構造と作用機序についてまとめた。さらに、 β -lactam系薬を分解する β -lactamaseについて、その分類と化学的な作用メカニズムについても記述した。そして、薬剤耐性菌対策と1つとして国内外で行われている薬剤耐性菌監視体制の利点と欠点を述べることで、本論文の意義と目的を明確にした。

第2章および第3章は実験項として、第2章1節内には、まず本研究において共通して行った操作を冒頭に記述した。本論文で行った実験は、供試菌株を用いる際に薬剤耐性遺伝子を確実に菌体内に留まらせておく目的で、選択圧をかける必要があるため、菌株の培養における共通操作として、その方法を記述した。さらに、本研究で標的にした共通の薬剤耐性遺伝子の検出方法を示した。実験の内容は、第2章と第3章に分かれる。第2章は臨床菌株、市販鶏肉および健常人から広域セファロスポリン耐性腸内細菌科菌株を分離し、横断的にその疫学的特徴を明らかにした。第2章1節では神奈川県内の医療施設から臨床検査センターを経て分離された臨床分離 *E. coli* 株 207 株を用いて、薬剤感受性、*bla*_{CTX-M}

型別、sequence type と Clade 分類およびフルオロキノロン耐性遺伝子 *qnrS* の検出を行った。菌株の薬剤感受性は医療施設がある地域によって大きく異なることが示された。また、地域毎の *bla*_{CTX-M} 型別を明らかにした。さらに、*E. coli* ST131 Clade 分類を行うことにより、*E. coli* ST131 のパンデミックが市中の 300 床以下の病院にまで拡がっていることが明らかとなり、各 Subclade が保有する *bla*_{CTX-M} も傾向を明らかにした。フルオロキノロン系薬に対する高度耐性は、*E. coli* ST131 CladeC の拡散によることを示したが、同時に *qnrS* 保有株の拡散におけるフルオロキノロン耐性化も危惧された。

第 2 章 2 節では市販鶏肉から広域セファロスポリン耐性腸内細菌科を分離し、汚染率を明らかにした。広域セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科で最も優位なのは ESBL 産生 *E. coli* であったが、*bla*_{CTX-M} の内訳は臨床菌株と一致しなかった。一方、市販鶏肉から分離された株の約 35% は pAmpC 遺伝子を保有していたことは、市販鶏肉および家畜環境における独特の特徴であった。さらには、pAmpC 保有株では plasmid IncK を陽性である傾向を認めた。

第 2 章 3 節では健常人から広域セファロスポリン耐性腸内細菌科を分離し、保菌率を明らかにした。広域セファロスポリン系薬耐性腸内細菌科で最も優位なのは ESBL 産生 *E. coli* であり、5 年間で増加傾向を認めた。さらに、*bla*_{CTX-M} の内訳が臨床菌株と一致したことから、臨床から分離される株の一部が健常人へと拡散していることを示唆した。分離された *E. coli* のうち、ST131 が 40% 程度を占め、フルオロキノロン耐性にも寄与していた。この点も臨床菌株と一致した点である。

第 3 章では、第 2 章で得られた分離株について、次の薬剤耐性遺伝子に着目して、次世代シーケンス解析を用い、菌株の分子疫学的特徴を明らかにした。第 3 章 1 節では *bla*_{CTX-M-55} 保有 *E. coli* は臨床菌株および市販鶏肉から分離され、臨床分離株においては *E. coli* ST131 が最優位だった。*E. coli* ST131 を除いて、*bla*_{CTX-M-55} 保有 *E. coli* 株は中国の臨床

分離流行株、家畜や食肉から分離されている株が確認された。さらに、*floR* 保有 *E. coli* 株を認め、*floR* は家畜など異なる環境からの菌株または plasmid の移入を示唆した。

第3章2節では、*qnrS* 保有 *E. coli* の分子疫学的特徴について調べたところ、*qnrS1* 保有株においては CPFX の MIC 上昇が軽微であるため感受性領域に留まることで、拡散を見逃している可能性が危惧された。同時に、*qnrS1* 遺伝子周辺領域は菌株間で類似していたことから、高度に保存される領域に *qnrS1* が存在することが示唆された。さらに、臨床菌株から分離された *qnrS2* 保有 *E. coli* はこれまで分離されることが稀であり、*qnrS2* の環境からの流入が疑われた。

第3章3節では、市販鶏肉から分離された pAmpC 遺伝子陽性 IncK 保有 *E. coli* の plasmid 接合伝達能について、その特徴を明らかにした。市販食肉から分離される菌株が保有する pAmpC 遺伝子は *bla_{CMY-2}* であることが決定され、IncK とともに高確率に接合伝達することが証明された。一方で、その plasmid にはアミノグリコシド系薬やフルオロキノロン系薬耐性遺伝子は載せておらず、接合伝達により β -lactam 系薬以外の系統薬剤に耐性を示さなかった。市販食肉を汚染する *bla_{CMY-2}* 保有 *E. coli* の接合伝達能は、健常人および臨床で分離される菌株への拡散リスクとなることが疑われた。

以上、本研究において、特に臨床分離される ESBL 産生 *E. coli* を中心に、分離された広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の分子疫学的特徴を明らかにすることによって、家畜や食肉、環境からの流入が疑われる薬剤耐性遺伝子の存在が明らかとなった (Fig. 23)。

この研究のもう1つの新たな知見は、臨床検査センターを介して収集された株には、市中で起こっている動物や環境など種々の異なるフィールドからの薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子の伝搬状況を推定することができた点である。地域の中核規模医療施設での単一もしくは近隣医療施設のみでの薬剤耐性菌サーベイランスは単一クローンの水平拡散によるバ

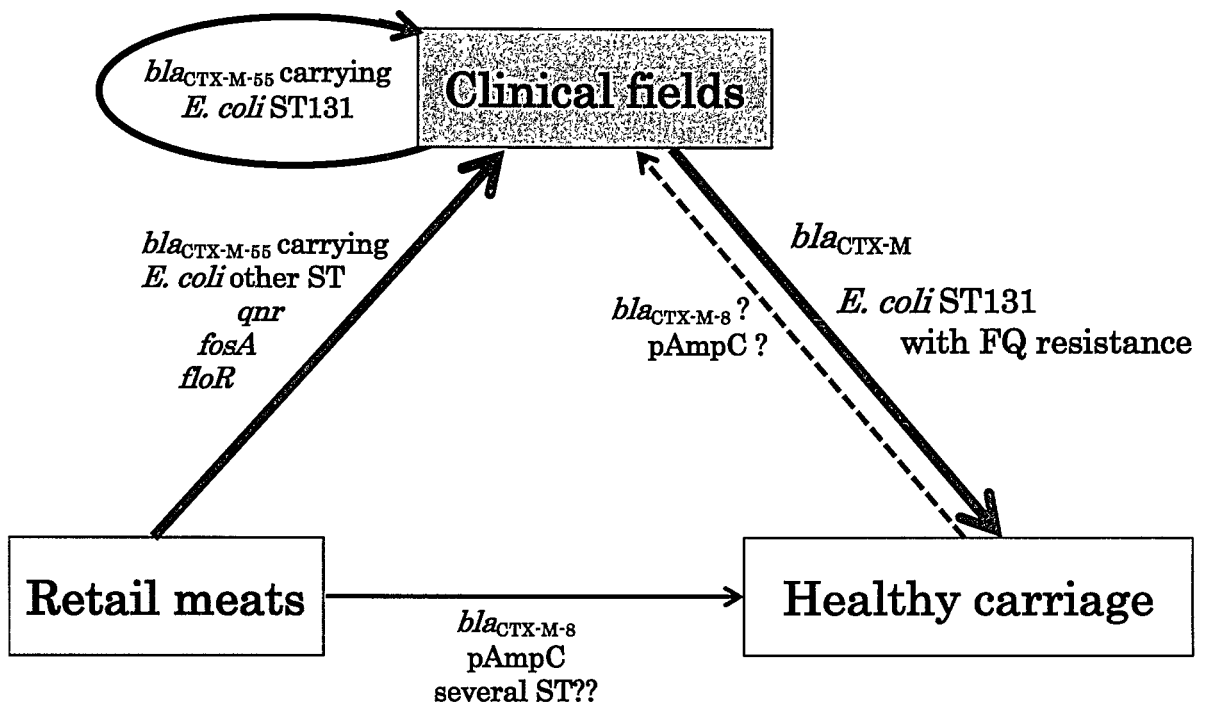


Fig. 22 Estimated relationship of horizontal transfer or clonal spreading among each field

イアスなど大きく受ける。機能分化を重要視する日本の医療制度を考慮すると、中枢医療施設でのサーベイランスで新たな薬剤耐性菌が発見されることは、すでに市中でその薬剤耐性菌（またはその薬剤耐性遺伝子）は拡散していることが推察できる。一方で、臨床検査センターを介して地域医療機関から分離される菌株の薬剤耐性菌サーベイランスを実施することは、市中に拡散する可能性がある異なるフィールドからの薬剤耐性遺伝子の流入を、より早期に検出できる有用性を見出した。

謝 辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました、指導教官である工学研究科徳岡由一教授に深く感謝いたします。特に、研究ミーティング等で研究内容や実験データに対する考え方について、お話しいただいた先生の知見は深く心に刻まれ、今後の私の研究人生の礎となることと存じます。実験データの解釈についても、違った目線からの多くの適切なご指摘、ご助言が論文をまとめるための重要なものとなりました。

本論文作成に当たり、審査委員として多くのご助言を頂きました、工学研究科米坂知昭教授、西村裕之教授ならびに佐野元昭教授に深く感謝いたします。

千葉科学大学大島利夫准教授には前職時代から、微生物・感染症検査学をはじめ多くのことをご教授いただき、公私ともに多くのご指導と刺激をいただきました。私の最も尊敬する臨床検査技師である大島利夫准教授に最大の敬意を表します。

本学医用工学部および工学研究科の先生方には、本研究含め多くの研究において熱心なご指導と適切なご助言を日頃からいただいております。ここに、深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたっては、菌株収集と譲渡のご協力を（株）保健科学研究所様にいただきました。まず、研究の主旨をご理解いただき、共同研究の開始にご尽力いただきました元感染症分析センター長永田明義様、業務が多忙ななかで菌株保存や送付のご協力をいただきました感染症分析センターの技術者の皆様、最後に、研究全体の遂行や論文執筆について多くのご助言をいただきました検査本部角田拓也先生、感染症分析センター石松尚先生に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究データの蓄積と論文の完成は、医用工学部生命医工学科蓮沼研究室および工学研究科徳岡研究室の在学生、卒業生および修了生に多大なる貢献をいただきました。蓮沼研究室通算 7 期に渡る卒業生ならびに在学生、また、徳岡研究室在学生、卒業生ならびに修了生にこの上ない感謝と尊敬の意を表します。未熟な私を支えていただいて、本当に感謝しています。

参考文献

1. Fleming A. On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol.* 1929; 10: 226-36.
2. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 2010; 1: 134-45.
3. Gould K. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Mar;71(3):572-5.
4. Facts on Antibiotic Resistance, IDSA
5. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10(4):677-8.
6. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* 2011 Aug 31;477(7365):457-61.
7. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Aug;4(8):608-20.
8. Konaklieva MI. Molecular Targets of β -Lactam-Based Antimicrobials: Beyond the Usual Suspects. *Antibiotics (Basel).* 2014 Apr 3;3(2):128-42.
9. Fuad N, Frère JM, Ghuysen JM, Duez C, Iwatsubo M. Mode of interaction between β -lactam antibiotics and the exocellular DD-carboxypeptidase- transpeptidase from *Streptomyces R39*. *Biochem J.* 1976 Jun 1;155(3):623-9.
10. Michael TM et al. Cell Walls of Prokaryotes, BROCK Biology of Microorganisms 13th ed. p58-63. Benjamin Cummings. 2012.
11. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1965 Oct;54(4):1133-41.
12. D. Amsterdam. *Antibiotics in Laboratory Medicine* 6th ed, p464-465. Wolters Kluwer. 2015.
13. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321-31.
14. Joris B, Ghuysen JM, Dive G, Renard A, Dideberg O, Charlier P, Frère JM, Kelly JA, Boyington JC, Moews PC, *et al.* The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces R61* DD-peptidase family. *Biochem J.* 1988 Mar 1;250(2):313-24.
15. 澤井哲夫, 額賀路嘉, 春日伸. β -ラクタマーゼとその分子進化. 蛋白質酵素核酸. 1995,

- 40(13): 1887-1899.
16. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jan;29(1):29-57.
 17. Beta-Lactamase Database Structure and Function. URL; <http://bldb.eu/> (閲覧日; 2018/11/14)
 18. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):1-14.
 19. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion-sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Jul 24;201(2):237-41.
 20. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolyzing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(6):1031-4.
 21. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):161-82,
 22. Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clin Proc.* 2015 Mar;90(3):395-403.
 23. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014 Mar 18;53(10):1565-74.
 24. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014 Aug;22(8):438-45.
 25. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat.* 2016 Nov;29:13-29.
 26. D. Amsterdam. *Antibiotics in Laboratory Medicine* 6th ed, p467-468. Wolters Kluwer. 2015.
 27. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Apr;43(4):727-37.
 28. World Health Organization .2004 ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on surveillance. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/> (閲覧日 2018/11/25)
 29. Tsutsui A, Suzuki S. Japan nosocomial infections surveillance (JANIS): a model of sustainable national antimicrobial resistance surveillance based on hospital diagnostic microbiology laboratories. *BMC Health Serv Res.* 2018 Oct 20;18(1):799.
 30. Asai T, Esaki H, Kojima A, Ishihara K, Tamura Y, Takahashi T. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from apparently healthy food-producing animal from 2000 to 2003: the first

- stage of Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring (JVARM). J Vet Med Sci. 2006 Aug;68(8):881-4.
31. 刈谷直子, 朝野和典, 磯 博康. 2016. 感染防止対策加算導入後の院内感染対策における地域医療連携の効果. 環境感染誌 31: 24-31.
 32. 森兼啓太. 2014. 感染対策における地域連携. 日内会誌 103: 2754-2760.
 33. 平成 27 年横浜市の医療施設. 横浜市健康福祉局 (平成 29 年 4 月発行) <http://www.city.yokohama.lg.jp/kenko/iryoku-anzen/iryoku-shisetsu/file/h27/27-ikkatsu.pdf> 2017 年 10 月 6 日現在
 34. 荒川宜親. 2003. 広域 β -ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関. 日臨微誌 13: 150-158.
 35. Yong Chong, Shinji Shimoda, Hiroko Yakushiji, *et al.* 2013. Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* : a long-term study in Japan. J Med Microbiol. 62: 1038–1043.
 36. 厚生労働省院内感染対策事業サーベイランス. 2015. 全体. 院内感染対策サーベイランス検査部門. CLSI 2012 版. (<https://janis.mhlw.go.jp/report/kensa.html>) 2017 年 10 月 6 日現在
 37. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 21st informational supplement. M100-S21. CLSI, Wayne, Pa.
 38. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, *et.al.* 2007. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla*SHV,*bla*TEM and *bla*CTX-M genes in *Enterobacteriaceae*. APMIS. 115: 1400-1408.
 39. Neil Woodford, Elizabeth J. Fagan, Matthew J. Ellington. 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother. 57(1): 154-155.
 40. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. 2004. Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M- β -Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. J Clin Microbiol. 42(12): 5715–5721.
 41. Dallenne D, Da Costa A, Decré D, *et.al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2010. 65(3): 490-495.
 42. Kao CC, Liu MF, Lin CF, Huang YC, Liu PY, Chang CW, Shi ZY. Antimicrobial susceptibility and multiplex PCR screening of AmpC genes from isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. J Microbiol Immunol Infect. 2010 Jun;43(3):180-7.

43. Matsumura Y, Pitout JDD, Peirano G, DeVinney R, Noguchi T, Yamamoto M, Gomi R, Matsuda T, Nakano S, Nagao M, Tanaka M, Ichiyama S. Rapid Identification of Different *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clades. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Jul 25;61(8). pii: e00179-17.
44. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Aug;60(2):394-7.
45. Yano H, Uemura M, Endo S, *et al.* 2013. Molecular Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates from *Escherichia coli* at a Japanese Tertiary Hospital. *PLoS ONE.* 8(5): e64359.
46. Hara T, Sato T, Horiyama T, *et al.* 2015. Prevalence and molecular characterization of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from 2000 to 2010 in Japan. *Jpn J Antibiot.* 68(2): 75-83.
47. 吉川晃司, 森武潤, 鈴木鑑, 他. 2014. 尿路由来基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌の検出状況および薬剤感受性の検討. *日化療会誌* 62(2): 198-203.
48. Cheng WL, Hsueh PR, Lee CC, *et al.* 2016. Bacteremic pneumonia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Appropriateness of empirical treatment matters. *J Microbiol Immunol Infect.* 49: 208-215.
49. Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Romero L, *et al.* 2006. Bacteremia Due to Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the CTX-M Era: A New Clinical Challenge. *Clin Infect Dis.* 43(11): 1407-1414.
50. Fukuchi T, Iwata K, Kobayashi S, *et al.* 2016. Cefmetazole for bacteremia caused by ESBL-producing *Enterobacteriaceae* comparing with carbapenems. *BMC Infect Dis.* 16(1):427.
51. Mushtaq S, Hope R, Warner M, *et al.* 2007. Activity of faropenem against cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 59(5):1025-1030.
52. 橋本 治, 宮崎博章, 山口征啓, 他. 2016. 北九州市東部地域における抗菌薬使用密度と耐性菌検出に関するサーベイランス. *環境感染誌* 31(4): 247-251.
53. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, *et al.* 2009. Change in the prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *J Antimicrob Chemother.* 63(1): 72-79.
54. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, *et al.* 2013. Association of Fluoroquinolone Resistance, Virulence Genes, and IncF Plasmids with Extended-Spectrum- β -Lactamase- Producing

- Escherichia coli* Sequence Type 131 (ST131) and ST405 Clonal Groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 4736-4742.
55. Kameyama M, Chuma T, Yabata J, *et al.* 2013. Prevalence and Epidemiological Relationship of CMY-2 AmpC β -Lactamase and CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Broiler Farms in Japan. *J Vet Med Sci.* 75(8): 1009-1015.
 56. Kiratisin P, Apisarnthanarak A, Saifon P, *et al.* 2007. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum β -lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58(3): 349-55.
 57. 西原弘人, 小林謙一郎, 阪本直也, 他. 2017. 東京都立墨東病院の感染症科外来患者における糞便からの ESBL 産生腸内細菌の検出状況について. *医学検査* 66(2): 141-146.
 58. Ghodousi A, Bonura C, Di Noto AM, Mammina C. Extended-Spectrum β -Lactamase, AmpC-Producing, and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Retail Broiler Chicken Meat, Italy. *Foodborne Pathog Dis.* 2015 Jul;12(7):619-25.
 59. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, *et al.* 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother.* 61(2): 273-281.
 60. Castanheira M, Costello SE, Jones RN. Molecular Characterization of Genes Encoding CTX-M-134, TEM-207 and TEM-212 Detected among Clinical Isolates from USA Hospitals. Abstract of ECCMID 2015.
 61. Bönemann G, Stiens M, Pühler A, Schlüter A. Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, qnrS2, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Sep;50(9):3075-80.
 62. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg Infect Dis.* 2008 Feb;14(2):231-7.
 63. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:657-686.
 64. 平山紀夫, 伊藤文世. 2008. わが国における抗菌性物質の使用量の推移. *動物抗菌会報* 30:10-18

65. Miles RD, Butcher GD, Henry PR, Littell RC. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poult Sci.* 2006 Mar;85(3):476-85.
66. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May 5;112(18):5649-54.
67. Barton MD. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr Res Rev.* 2000 Dec;13(2):279-99.
68. Dhanji H, Murphy NM, Doumith M, Durmus S, Lee SS, Hope R, Woodford N, Livermore DM. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Dec;65(12):2534-7.
69. Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J. Extended-spectrum and CMY-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Jan;16(1):33-8.
70. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ; National ESBL surveillance group. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jun;17(6):873-80.
71. Lavilla S, González-López JJ, Miró E, Domínguez A, Llagostera M, Bartolomé RM, Mirelis B, Navarro F, Prats G. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria: the food-borne outbreak lesson. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jun;61(6):1244-51.
72. Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandembroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011 Jul;17(7):1216-22.
73. Johnson JR, Sannes MR, Croy C, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Bender J, Smith KE, Winokur PL, Belongia EA. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jun;13(6):838-46.

74. Jakobsen L, Kurbasic A, Skjøl-Rasmussen L, Ejrnaes K, Porsbo LJ, Pedersen K, Jensen LB, Emborg HD, Agersø Y, Olsen KE, Aarestrup FM, Frimodt-Møller N, Hammerum AM. *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. *Foodborne Pathog Dis.* 2010 May;7(5):537-47.
75. Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2004 Jan;10(1):69-75.
76. Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol.* 2009 Sep 18;138(3-4):339-44.
77. Li L, Jiang ZG, Xia LN, Shen JZ, Dai L, Wang Y, Huang SY, Wu CM. Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970-2007. *Vet Microbiol.* 2010 Aug 26;144(3-4):505-10.
78. Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3533-7.
79. Kojima A, Asai T, Ishihara K, Morioka A, Akimoto K, Sugimoto Y, Sato T, Tamura Y, Takahashi T. National monitoring for antimicrobial resistance among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan. *J Vet Med Sci.* 2009 Oct;71(10):1301-8.
80. Kawamura K, Goto K, Nakane K, Arakawa Y. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. *Foodborne Pathog Dis.* 2014 Feb;11(2):104-10.
81. Hiki M, Kawanishi M, Abo H, Kojima A, Koike R, Hamamoto S, Asai T. Decreased Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporin in *Escherichia coli* from Healthy Broilers at Farms in Japan After Voluntary Withdrawal of Ceftiofur. *Foodborne Pathog Dis.* 2015 Jul;12(7):639-43.
82. Millman JM, Waits K, Grande H, Marks AR, Marks JC, Price LB, Hungate BA. Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in retail chicken: comparing conventional, organic, kosher, and raised without antibiotics. Version 2. *F1000Res.* 2013 Jul;11:2:155.

83. S. Polsfuss, G. V. Bloemberg, J. Giger, et al. 2012. Evaluation of a diagnostic flow chart for detection and confirmation of extended spectrum β -lactamases (ESBL) in Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 18: 1194–1204.
84. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol. 2006 Jun;60(5):1136-51.
85. Oliver C., Stephane B. et al. 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. Appl. Environ. Microbiol. 66. 4555-4558.
86. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005 Dec;63(3):219-28.
87. Grave K, Torren-Edo J, Mackay D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. J Antimicrob Chemother. 2010 Sep;65(9):2037-40.
88. Cohen Stuart J, van den Munckhof T, Voets G, Scharringa J, Fluit A, Hall ML. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. Int J Food Microbiol. 2012 Mar 15;154(3):212-4.
89. Mora A, Herrera A, Mamani R, López C, Alonso MP, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, García-Garrote F, Pita JM, Coira A, Bernárdez MI, Blanco J. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9-producing strains, and comparison with clinical human isolates. Appl Environ Microbiol. 2010 Nov;76(21):6991-7.
90. Zurfluh K, Nüesch-Inderbilen M, Morach M, Zihler Berner A, Hächler H, Stephan R. Extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. Appl Environ Microbiol. 2015 May 1;81(9):3115-20.
91. Ali T, Rahman SU, Zhang L, Shahid M, Han D, Gao J, Zhang S, Ruegg PL, Saddique U, Han B. Characteristics and genetic diversity of multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. Oncotarget. 2017 Oct 4;8(52):90144-90163.
92. Yang X, Liu W, Liu Y, Wang J, Lv L, Chen X, He D, Yang T, Hou J, Tan Y, Xing L, Zeng Z, Liu JH. F33: A-: B-, IncHI2/ST3, and IncI1/ST71 plasmids drive the dissemination of *fosA3* and

- bla*CTX-M-55/-14/-65 in *Escherichia coli* from chickens in China. *Front Microbiol.* 2014 Dec 16;5:688.
93. Xia S, Fan X, Huang Z, Xia L, Xiao M, Chen R, Xu Y, Zhuo C. Dominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset and hospital-onset infection in China. *PLoS One.* 2014 Jul 1;9(7):e100707.
 94. Casella T, Rodríguez MM, Takahashi JT, Ghiglione B, Dropa M, Assunção E, Nogueira ML, Lincopan N, Gutkind G, Nogueira MC. Detection of *bla*CTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. *Int J Food Microbiol.* 2015 Mar 16;197:88-91.
 95. Kluytmans JA, Overvest IT, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MF, van der Zwaluw K, Heck M, Rijnsburger M, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH, Johnston BD, Gordon D, Johnson JR. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis.* 2013 Feb;56(4):478-87.
 96. Norizuki C, Wachino JI, Suzuki M, Kawamura K, Nagano N, Kimura K, Arakawa Y. Specific *bla*CTX-M-8/*IncI1* Plasmid Transfer among Genetically Diverse *Escherichia coli* Isolates between Humans and Chickens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 May 24;61(6). pii: e00663-17.
 97. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal Colonization With Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Infect Dis.* 2016 Aug 1;63(3):310-8.
 98. Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T. Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand.* 2011 Oct 12;53:52.
 99. Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, Chen WL, Zhang R, Chen GX. Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Oct;79(19):5988-96.
 100. Manges AR, Johnson JR. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin Infect Dis.* 2012 Sep;55(5):712-9.
 101. Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, Moyá B, Miró E, Coque TM, Oliver A, Cantón R, Navarro F, Campos J; Spanish Network in Infectious Pathology Project

- (REIPI). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Aug;34(2):173-6.
102. Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD. Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region. *J Clin Microbiol*. 2012 Feb;50(2):294-9.
103. Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L. Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from healthy poultry. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Aug 15;77(16):5830-3.
104. Nakamura T, Komatsu M, Yamasaki K, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, Ono T, Nishio H, Sueyoshi N, Kida K, Satoh K, Toda H, Toyokawa M, Nishi I, Sakamoto M, Akagi M, Nakai I, Kofuku T, Orita T, Wada Y, Zikimoto T, Koike C, Kinoshita S, Hirai I, Takahashi H, Matsuura N, Yamamoto Y. Epidemiology of *Escherichia coli*, *Klebsiella* species, and *Proteus mirabilis* strains producing extended-spectrum β -lactamases from clinical samples in the Kinki Region of Japan. *Am J Clin Pathol*. 2012 Apr;137(4):620-6.
105. Hiki M, Usui M, Kojima A, Ozawa M, Ishii Y, Asai T. Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*_{CMY-2} gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis*. 2013 Mar;10(3):243-9.
106. Börjesson S, Jernberg C, Brolund A, Edquist P, Finn M, Landén A, Olsson-Liljequist B, Tegmark Wisell K, Bengtsson B, Englund S. Characterization of plasmid-mediated AmpC-producing *E. coli* from Swedish broilers and association with human clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Jul;19(7):E309-11.
107. Agersø Y, Jensen JD, Hasman H, Pedersen K. Spread of extended spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* clones and plasmids from parent animals to broilers and to broiler meat in a production without use of cephalosporins. *Foodborne Pathog Dis*. 2014 Sep;11(9):740-6.
108. Mo SS, Slettemeås JS, Berg ES, Norström M, Sunde M. Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins in the Norwegian Broiler Production. *PLoS One*. 2016 Apr 25;11(4):e0154019.
109. Paul-Louis W., Charles B. et al. 2013. Trends in Human Fecal Carriage of Extended- Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clin. Microbiol. Rev*. 26.

744-758.

110. Mary D. B. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr. Res. Rev.* 13. 279-299.
111. Ilse O., Ina W. *et al.* 2011. Extended Spectrum β - Lactamase Gene of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, in Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17. 1216-1222.
112. Luvsansharav UO., Hirai I. 2011. Prevalence of fecal carriage of extended- spectrum β - lactamase- producing *Enterobacteriaceae* among healthy adult people in Japan. *J. Infect. Chemother.* 17. 722-725.
113. Pattarachai K., Arunocha H. 2010. Genotypic analysis of plasmid-mediate β -lactamases amongst *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia* spp. and *Klebsiella* spp. that are non-susceptible to a broad-spectrum cephalosporin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 36. 343-347.
114. David M. L., Trevor G. W. *et al.* 2001. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 48. 87-102.
115. David N., Martine R. *et al.* 2000. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing transferable AmpC-type β -lactamase (ACC-1) originating from *Hafnia alvei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 187. 35-40.
116. S.-H. Choi, J.E. Lee *et al.* 2007. Prevalence, microbiology, and clinical characteristics of extended- spectrum β - lactamase- producing *Enterobacter* and *Morganella morganii* in Korea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26. 557-561.
117. Shibata N., Kurokawa H. *et al.* 2006. PCR Classification of CTX-M-Type β -Lactamase Genes Identified in Clinically Isolated Gram-Negative Bacilli in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50. 791-795.
118. Marie-Helene NC., Jorge B. *et al.* 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4 -ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* 61. 273-281.
119. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jan;66(1):1-14.
120. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013 Aug;303(6-7):305-17.
121. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly.

- Antimicrob Agents Chemother. 2001 Aug;45(8):2269-75.
122. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Sirot J. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jul;52(1):29-35.
 123. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Jul;18(7):646-55.
 124. Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):88-95.
 125. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Kamimura T, Shimono N, Akashi K. Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *J Med Microbiol.* 2013 Jul;62(Pt 7):1038-43.
 126. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, et al. (2012) Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.
 127. Zheng H, Zeng Z, Chen S, Liu Y, Yao Q, Deng Y, Chen X, Lv L, Zhuo C, Chen Z, Liu JH. Prevalence and characterization of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Apr;39(4):305-10.
 128. Lv L, Partridge SR, He L, Zeng Z, He D, Ye J, Liu JH. Genetic characterization of IncI2 plasmids carrying blaCTX-M-55 spreading in both pets and food animals in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2824-7.
 129. Zhang J, Zheng B, Zhao L, Wei Z, Ji J, Li L, Xiao Y. Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in *Escherichia coli* isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC Infect Dis.* 2014 Dec 3;14:659.
 130. Wang S, Zhao SY, Xiao SZ, Gu FF, Liu QZ, Tang J, Guo XK, Ni YX, Han LZ. Antimicrobial Resistance and Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Causing Bloodstream Infections in Three Hospitals in Shanghai, China. *PLoS One.* 2016 Jan 29;11(1):e0147740.
 131. Wu J, Lan F, Lu Y, He Q, Li B (2017) Molecular Characteristics of ST1193 Clone among Phylogenetic Group B2 Non-ST131 Fluoroquinolone- Resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 21;8: 2294.
 132. Johnson TJ, Shepard SM, Rivet B, Danzeisen JL, Carattoli A. Comparative genomics and

- phylogeny of the IncI1 plasmids: a common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Plasmid*. 2011 Sep;66(3):144-51
133. YJ Kim, JS Moon, DH Oh, JW Chon, BR Song, JS Lim, EJ Heo, HJ Park, SH Wee, K Sung. Genotypic characterization of ESBL-producing *E. coli* from imported meat in South Korea. *Food Res Intern*. 2017 *in press*.
 134. Sun J, Li XP, Yang RS, Fang LX, Huo W, Li SM, Jiang P, Liao XP, Liu YH. Complete Nucleotide Sequence of an IncI2 Plasmid Coharboring blaCTX-M-55 and mcr-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jul 22;60(8):5014-7.
 135. McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, Hinkle M, Whitman T, Lesho E, Schaecher KE. *Escherichia coli* Harboring mcr-1 and blaCTX-M on a Novel IncF Plasmid: First Report of mcr-1 in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Jun 20;60(7):4420-1.
 136. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Doublet B, Kobisch M, Cloeckaert A, Madec JY. Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the floR and blaCMY-2 genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *J Med Microbiol*. 2010 Apr;59(Pt 4):467-71.
 137. Rodríguez-Baño J, Alcalá JC, Cisneros JM, Grill F, Oliver A, Horcajada JP, Tórtola T, Mirelis B, Navarro G, Cuenca M, Esteve M, Peña C, Llanos AC, Cantón R, Pascual A. Community infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Arch Intern Med*. 2008 Sep 22;168(17):1897-902.
 138. Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, Blanchard JS. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science*. 2005 Jun 3;308(5727):1480-3.
 139. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr;50(4):1178-82.
 140. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*. 2014 Oct;2(5).
 141. Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Hirotani A, Arai K, Endo S, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Aoyagi T, Hatta M, Yamada M, Gu Y, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Kaku M. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamases and qnr determinants in *Enterobacter* species from Japan. *PLoS One*. 2012;7(6):e37967.

142. Yujiro Uchida, Tomoni Mochimaru *et al.* 2010. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35:387-391
143. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998 Mar 14;351(9105):797-9.
144. Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Soto S, Vila J. Quinolone resistance in the food chain. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Apr;31(4):307-15.
145. Ghodousi A, Bonura C, Di Noto AM, Mammina C. Extended-Spectrum β -Lactamase, AmpC-Producing, and Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Retail Broiler Chicken Meat, Italy. *Foodborne Pathog Dis*. 2015 Jul;12(7):619-25.
146. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, Lü D, Huang L, Zhang Y, Liu J, Wang M. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')*-Ib-cr, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Feb;53(2):519-24.
147. Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, García I, Cano ME, Martínez-Martínez L, Pascual A. Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for Enterobacteriaceae expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jun;51(6):2236-9.
148. Kehrenberg C, de Jong A, Friederichs S, Cloeckaert A, Schwarz S. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2007 May;59(5):886-92.
149. Jacoby, G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis*. 41(Suppl. 2):S120–S126.
150. Ström G, Halje M, Karlsson D, Jiwakanon J, Pringle M, Fernström LL, Magnusson U. Antimicrobial use and antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* on small- and medium-scale pig farms in north-eastern Thailand. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2017 Jul 17;6:75.
151. Wang JT, Chang SC, Chang FY, Fung CP, Chuang YC, Chen YS, Shiau YR, Tan MC, Wang HY, Lai JF, Huang IW, Yang Lauderdale TL. Antimicrobial Non-Susceptibility of *Escherichia coli* from Outpatients and Patients Visiting Emergency Rooms in Taiwan. *PLoS One*. 2015 Dec 3;10(12):e0144103.

152. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated qepA gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr;52(4):1564-6.
153. Okade H, Nakagawa S, Sakagami T, Hisada H, Nomura N, Mitsuyama J, Yamagishi Y, Mikamo H. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Tokai, Japan. *J Infect Chemother.* 2014 Dec;20(12):778-83.
154. Picão RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):948-50.
155. Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y, Shimamoto T. Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Oct;73(20):6686-90.
156. Zhang R, Ichijo T, Huang YL, Cai JC, Zhou HW, Yamaguchi N, Nasu M, Chen GX. High prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes Environ.* 2012;27(2):158-63.
157. Hu FP, Xu XG, Zhu DM, Wang MG. Coexistence of qnrB4 and qnrS1 in a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Pharmacol Sin.* 2008 Mar;29(3):320-4.
158. Dolejska M, Villa L, Hasman H, Hansen L, Carattoli A. Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Feb;68(2):333-9.
159. 平松啓一 編. 石井良和 著. β -lactamase 産生菌 (歴史、分類、種類と疫学-日本、外国の状況) , 耐性菌感染症の理論と実践 改訂 2 版. 2002. p18-20.
160. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* 1989 Sep-Oct;17(5):316-21.
161. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Wilhelm R, Chong Y. Comparative characterization of the cephamycinase blaCMY-1 gene and its relationship with other beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Aug;40(8):1926-30.
162. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Oct;50(10):3396-406.
163. Yamasaki K, Komatsu M, Abe N, Fukuda S, Miyamoto Y, Higuchi T, Ono T, Nishio H, Sueyoshi

- N, Kida K, Satoh K, Toyokawa M, Nishi I, Sakamoto M, Akagi M, Nakai I, Kofuku T, Orita T, Wada Y, Jikimoto T, Kinoshita S, Miyamoto K, Hirai I, Yamamoto Y. Laboratory surveillance for prospective plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol*. 2010 Sep;48(9):3267-73.
164. Matsumura Y, Yamamoto M, Higuchi T, Komori T, Tsuboi F, Hayashi A, Sugimoto Y, Hotta G, Matsushima A, Nagao M, Takakura S, Ichiyama S. Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* and spread of the ST131 clone among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Aug;40(2):158-62.
165. Hall JP, Wood AJ, Harrison E, Brockhurst MA. Source-sink plasmid transfer dynamics maintain gene mobility in soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jul 19;113(29):8260-5.
166. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2011;6(7):e22751.
167. Bradley DE. Determination of pili by conjugative bacterial drug resistance plasmids of incompatibility groups B, C, H, J, K, M, V, and X. *J Bacteriol*. 1980 Feb;141(2):828-37.
168. 寺脇良郎. プラスミドの複製機構. 1986. 日本細菌学会雑誌. 41(2).
169. Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Jul 15;224(1):1-15.
170. Seiffert SN, Carattoli A, Schwendener S, Collaud A, Endimiani A, Perreten V. Plasmids Carrying bla(CMY -2/4) in *Escherichia coli* from Poultry, Poultry Meat, and Humans Belong to a Novel IncK Subgroup Designated IncK2. *Front Microbiol*. 2017 Mar 15;8:407.
171. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*. 1988 Sep;52(3):375-95.

研究業績

主論文

(英文)

- 1) Hasunuma, Y. (2016). Characteristic and Molecular Epidemiology of Cefotaxime Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Healthy College Students. *Toin bulletin*; **34**, 71-78. 単著
- 2) Hasunuma, Y et al. (2018). Whole Genome Sequence Analysis of CTX-M-55 producing *Escherichia coli* Isolates from Clinical Patients in Japan. *Int J Clin Med Microbiol*, **3**; 136. 共著
- 3) Hasunuma, Y et al. (2018). Contamination Rate of Broad-Spectrum Cephalosporins Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Domestic and Imported Retail Chicken Meats in Japan. *J Food Safety, Submitted*. 共著

(邦文)

- 1) 除村萌・蓮沼裕也 他. (2018). 神奈川県内中小規模医療施設から分離された CTX-M 型 β -lactamase 産生 *Escherichia coli* の疫学調査, *日本臨床微生物学会雑誌*, **29(1)**, 21-27.

副論文

(英文)

- 1) Ogata, A., Hasunuma, Y., et al. (2017) Accumulation of Porphyrins in *Propionibacterium acnes* by 5-aminolevulinic acid and its esters., *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*; **19**, 167-169. 共著

(邦文)

- 1) 蓮沼裕也・落合晃. (2013) 臨床微生物における色素および呈色反応. *色材協会誌*, **86(6)**, 217-224. 共著・筆頭
- 2) 大橋茉耶・蓮沼裕也 他. (2013) 救命救急センターにおける多剤耐性 *Acinetobacter baumannii* の多発とその感染制御. *熱傷*, **39**, 15-21. 共著
- 3) 檜島莉香・蓮沼裕也 他. (2018) 高速液体クロマトグラフィーを用いた *Klebsiella pneumoniae* が産生する β -ラクタマーゼの検出. *日本臨床微生物迅速診断研究会誌*, **28(1)**, 15-22. 共著

学会発表 (海外)

- 1) OGATA, A · HASUNUMA, Y *et al.* Accumulation of Porphyrin Compounds into The *Propionibacterium acnes* by 5-Aminolevulinic acid and Its Derivative. 第10回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2015年11月, 桐蔭横浜大学 (ポスター)
- 2) Yuya HASUNUMA, Nozomi HIYOSHI, Moe YOKEMURA, Yoshikazu TOKUOKA. Comparison of Cefotaxime Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Domestic and Imported Broilers in Japan. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2016年9月, 神戸国際展示場 (口頭発表)
- 3) HASUNUMA, Y · YOKEMURA, M *et al.* Characteristics and Molecular Epidemiology of Cefotaxime Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Healthy College Students. 第11回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2016年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 4) OGATA, A · HASUNUMA, Y *et al.* Effect of Amino Acids on Accumulation of 5-aminolevulinic Acid-induced Porphyrin Compounds in *Propionibacterium acnes*. 第11回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2016年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 5) KANAZAWA, K · HASUNUMA, Y *et al.* Study of Phototherapy for *Staphylococcus aureus* Using White LED Devices. 第11回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2016年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 6) YOKEMURA, M · HASUNUMA, Y *et al.* Antimicrobial Susceptibility of Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated clinically in Kanagawa Prefecture. 第11回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2016年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 7) NARASHIMA, R · HASUNUMA, Y *et al.* Determination of Degradation of Antibacterial Agents by β -Lactamase-Producing Bacteria Using High Performance Liquid Chromatography. 第11回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2016年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 8) HASUNUMA, Y · ISHIMATSU, T *et al.* Sequence data analysis of CTX-M-55 producing *Escherichia coli* isolates from clinical samples and retail meat using next-generation sequencing. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)

- 9) HIYOSHI, N · HASUNUMA, Y *et al.* Comparison between extended-spectrum cephalosporin resistant *Escherichia coli* isolated from domestic and imported chicken meat in Japan. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 10) KANAZAWA, K · HASUNUMA, Y *et al.* Pulsed light doses for photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using white LED devices. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 11) YOKEMURA, M · HASUNUMA, Y *et al.* Molecular epidemiological survey of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated clinically in Yokohama. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 12) NARASHIMA, R · HASUNUMA, Y *et al.* Determination of degradation of cefotaxime by β -lactamase-producing bacteria using high performance liquid chromatography. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 13) ISHII, K · HASUNUMA, Y *et al.* Effect of epigallocatechin gallate on 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 14) TAKAHASHI, A · HASUNUMA, Y *et al.* Influence of white LED light irradiation on doubling time of *Staphylococcus aureus*. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 15) Chin ZUUCHIN · HASUNUMA, Y *et al.* Genetic Analysis of Quinolone Resistance-Determining Regions of Ciprofloxacin Resistant *Escherichia coli* Isolated from Retail Meats, Healthy Humans, and Clinical Patients 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 16) OSHIRO, M · HASUNUMA, Y *et al.* Research on Correlation between The Carotenoid Pigments Produced by *Staphylococcus aureus* and The Bacterial Photo-inactivation Phenomenon. 第12回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2017年11月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
- 17) Yuya HASUNUMA, Moe YOKEMURA, Takashi ISHIMATSU, Nozomi HIYOSHI, Takuya TSUNODA, Satoshi KUGAWA, Yoshikazu TOKUOKA. Epidemiological study model of the Antimicrobial Resistance for One Prefecture in Japan;

- Extended-Spectrum β -Lactamase producing *Escherichia coli* Isolated from Less than 300 Bed Medical Facilities. The 33rd World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2018年9月, イタリア フィレンツェ (口頭発表)
- 18) Nozomi HIYOSHI, Yuya HASUNUMA, Masaya TANAKA, Yoshikazu TOKUOKA. Epidemiological characterization of CTX resistant *Escherichia coli* isolates from retail chicken meats in Japan. The 33rd World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2018年9月, イタリア フィレンツェ (口頭発表)
 - 19) HASUNUMA, Y · ISHIMATSU, T *et al.* Epidemiological study model of Antimicrobial Resistance for One Prefecture in Japan; Extended-Spectrum β -Lactamase producing *Escherichia coli* Isolated from Less than 300 Bed Medical Facilities. 第13回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2018年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
 - 20) HIYOSHI, N · HASUNUMA, Y *et al.* Studies on Extended-spectrum Cephalosporin Resistant *Escherichia coli* Isolated from Chickens in Japan. 第13回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2018年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
 - 21) TAKAHASHI, A · HASUNUMA, Y *et al.* Influence of White LED Light Irradiation on *Staphylococcus aureus* Cellular Structure. 第13回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2018年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
 - 22) ISHII, K · HASUNUMA, Y *et al.* Effect of epigallocatechin gallate on 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy. 第13回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2018年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)
 - 23) OSHIRO, M · HASUNUMA, Y *et al.* Study on photoinactivation of *Staphylococcus aureus*. 第13回桐蔭医用工学国際シンポジウム. 2018年10月, 桐蔭横浜大学. (ポスター)

学会発表 (国内)

- 1) 緒方亜里紗 · 蓮沼裕也 他. 5-Aminolevulinic acid による *Propionibacterium acnes* へのポルフィリン化合物の集積. 第25回日本PDT学会. 2015年5月. 京王プラザ (シンポジウム・口頭発表)
- 2) 蓮沼裕也 · 金沢浩平 他. *Staphylococcus aureus* に対する白色LEDを用いた光線治療の基礎的検討. 第4回日臨技首都圏支部医学検査学会. 2015年11月, パシ

フィコ横浜（口頭発表）

- 3) 緒方亜里紗・蓮沼裕也 他. 5-アミノレブリン酸を用いた *Propionibacterium acnes* へのポルフィリン化合物の集積に及ぼすアミノ酸の添加効果. 第 26 回日本 PDT 学会. 2016 年 6 月, はまぎんホール（口頭発表）
- 4) 蓮沼裕也・石松尚 他. 神奈川県内中小規模病院から分離された Ceftadizime 高度耐性 ESBL 産生 *Escherichia coli* の薬剤耐性プロファイルと分子疫学調査. 第 28 回日本臨床微生物学会総会. 2017 年 1 月, 長崎ブリックホール（口頭発表）
- 5) 除村萌・蓮沼裕也 他. 神奈川県内で臨床分離された基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* の疫学調査. 第 28 回日本臨床微生物学会総会. 2017 年 1 月, 長崎ブリックホール（口頭発表）
- 6) 金沢浩平・蓮沼裕也 他. *Staphylococcus aureus* に対する白色 LED を用いた発育抑制効果機序の検討. 第 28 回日本臨床微生物学会総会. 2017 年 1 月, 長崎ブリックホール（口頭発表）
- 7) 檜島莉香・蓮沼裕也 他. 高速液体クロマトグラフィーを用いた β -ラクタマーゼ産生菌による抗菌薬分解の検出. 第 28 回日本臨床微生物学会総会. 2017 年 1 月, 長崎ブリックホール（口頭発表）
- 8) 除村萌・蓮沼裕也 他. 横浜市内の複数施設で分離された基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* の分子疫学調査. 第 65 回日本化学療法学会総会. 2017 年 4 月, 京王プラザホテル（口頭発表）
- 9) 檜島莉香・蓮沼裕也 他. 高速液体クロマトグラフィーを用いた β -ラクタマーゼ産生菌の迅速な検出. 第 29 回臨床微生物迅速診断研究会総会. 2017 年 7 月, コラッセふくしま（口頭発表）
- 10) 蓮沼裕也・日吉望美 他. 市販食肉由来の第三世代セファロsporin系薬耐性 *Escherichia coli* の分子疫学解析. 第 66 回日本医学検査学会. 2017 年 6 月, 幕張メッセ（口頭発表）
- 11) 蓮沼裕也・陳子晴 他. 健常人、食肉、臨床患者から分離された CFX 耐性大腸菌のキノロン耐性遺伝子解析. 第 66 回日本医学検査学会. 2017 年 6 月, 幕張メッセ（口頭発表）
- 12) 金沢浩平・蓮沼裕也 他. 白色 LED による *Staphylococcus aureus* の発育抑制効果機序. 第 27 回日本光線力学学会学術集会. 2017 年 7 月, 京都大学医学部芝蘭会館（シンポジウム・口頭発表）

- 13) 石井佳澄・蓮沼裕也 他. 5-アミノレブリン酸によるプロトポルフィリンIXの生成に対する没食子酸エピガロカテキンの添加効果. 第 27 回日本光線力学学会学術集会. 2017 年 7 月, 京都大学医学部芝蘭会館 (口頭発表)
- 14) 石渡遥・蓮沼裕也 他. 酸化チタンを塗布したプラスチック表面における抗菌効果. 第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2017 年 8 月, 埼玉県立大学 (口頭発表)
- 15) 大城真奈・蓮沼裕也 他. *Staphylococcus aureus* が産生するカロテノイド色素と光細菌殺細胞効果現象との関係. 第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017. 2017 年 10 月, タワーホール船堀 (ポスター発表)
- 16) 蓮沼裕也・除村萌 他. 臨床検査センターおよび市販食肉から分離された CTX-M-55 産生 *Escherichia coli* の次世代シーケンス解析. 第 29 回日本臨床微生物学会総会. 2018 年 2 月, 岐阜国際会議場 (口頭発表)
- 17) 除村萌・蓮沼裕也 他. 神奈川県内で臨床分離された Ceftazidime 耐性基質拡張型 β -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* の分子疫学調査. 第 29 回日本臨床微生物学会総会. 2018 年 2 月, 岐阜国際会議場 (口頭発表)
- 18) 金沢浩平・蓮沼裕也 他. 白色 LED 光照射による *Staphylococcus aureus* の発育抑制に対するカロテノイド系化合物の影響. 第 29 回日本臨床微生物学会総会. 2018 年 2 月, 岐阜国際会議場 (口頭発表)
- 19) 檜島莉香・蓮沼裕也 他. HPLC を用いた β -ラクタマーゼによる CAZ および CTX 分解能の二薬同時検出の試み. 第 29 回日本臨床微生物学会総会. 2018 年 2 月, 岐阜国際会議場 (ポスター発表)
- 20) 日吉望美・蓮沼裕也 他. 国産および外国産市販鶏肉における第三世代セファロスポリン系薬耐性 *Escherichia coli* の薬剤耐性プラスミド遺伝子について. 第 29 回日本臨床微生物学会総会. 2018 年 2 月, 岐阜国際会議場 (口頭発表)
- 21) 高橋篤史・蓮沼裕也 他. *Staphylococcus aureus* に対する白色 LED 光照射による発育抑制が分裂時間に与える影響. 第 29 回日本臨床微生物学会総会. 2018 年 2 月, 岐阜国際会議場 (口頭発表)
- 22) 高橋篤史・蓮沼裕也 他. 白色 LED 光照射による *Staphylococcus aureus* の発育誘導期に及ぼす影響. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月, 福岡国際会議場 (ポスター発表)
- 23) 大城真奈・蓮沼裕也 他. *Staphylococcus aureus* の光による発育抑制現象に関する

- る研究. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月, 福岡国際会議場 (ポスター発表)
- 24) 日吉望美・蓮沼裕也 他. 国産・外国産市販鶏肉由来広域セファロスポリン系薬耐性大腸菌保有プラスミドの比較. 第 67 回日本医学検査学会. 2018 年 5 月, 浜松アクトシティ (口頭発表)
 - 25) 蓮沼裕也・除村萌 他. 神奈川県内の臨床分離 ESBL 産生 *Escherichia coli* における PMQR 遺伝子の保有状況. 第 66 回日本化学療法学会総会. 2018 年 6 月, 岡山コンベンションセンター (口頭発表)
 - 26) 日吉望美・蓮沼裕也 他. プラスミド性 AmpC および Plasmid inc type K を検出した批判鶏肉由来 CTX 耐性 *Escherichia coli* の全ゲノム解析. 第 66 回日本化学療法学会総会. 2018 年 6 月, 岡山コンベンションセンター (口頭発表)
 - 27) 佐藤麻美・蓮沼裕也 他. 培地の違いによる *Staphylococcus aureus* のカロテノイド系化合物抽出色素の比較. 第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2018 年 8 月. 北海道大学 学術交流会館 (口頭発表)
 - 28) 細井優輝・蓮沼裕也 他. 院内感染原因菌に対する酸化チタン光触媒反応を用いた PET フィルム抗菌効果の検討. 第 13 回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2018 年 8 月. 北海道大学 学術交流会館 (口頭発表)
 - 29) 東希実・蓮沼裕也 他. 健常人における広域セファロスポリン耐性腸内細菌科の保菌率と分子疫学的特徴. 第 2 回日本ワンヘルスサイエンス学会年次学術集会. 2018 年 9 月. 東京大学農学部 弥生講堂 (口頭発表)
 - 30) 中村匡秀・蓮沼裕也 他. 市販食肉由来広域セファロスポリン耐性腸内細菌科細菌の薬剤耐性伝達能. 第 2 回日本ワンヘルスサイエンス学会年次学術集会. 2018 年 9 月. 東京大学農学部 弥生講堂 (口頭発表)
 - 31) 大城真奈・蓮沼裕也 他. *Staphylococcus aureus* の光発育抑制現象に関する研究. 第 8 回 CSJ 化学フェスタ 2018. 2018 年 10 月, タワーホール船堀 (ポスター発表)
 - 32) 高橋篤史・蓮沼裕也 他. *Staphylococcus aureus* の細胞構造に及ぼす白色 LED 光照射の影響. 第 28 回日本光線力学学会学術集会. 2018 年 11 月, 京王プラザホテル (口頭発表)
 - 33) 石井佳澄・蓮沼裕也 他. 5-アミノレブリン酸によるプロトポルフィリン IX の産生に及ぼすカテキン類の影響. 第 28 回日本光線力学学会学術集会. 2018 年 11 月, 京王プラザホテル (口頭発表)

- 34) 蓮沼裕也・日吉望美 他. プラスミド性キノロン耐性タンパク *qnrS* 保有 ESBL 産生 *Escherichia coli* の分子生物学的特徴. 第 30 回日本臨床微生物学会総会. 2019 年 2 月, グランドニッコー東京台場 (ポスター発表)
- 35) 日吉望美・蓮沼裕也 他. 市販鶏肉由来セフトキシム耐性 *Escherichia coli* の分子疫学的解析. 第 30 回日本臨床微生物学会総会. 2019 年 2 月, グランドニッコー東京台場 (ポスター発表)

表彰

- 1) Young Scientist Award (KAMT 賞), 33rd World Congress of Biomedical Laboratory Science. Epidemiological study model of the Antimicrobial Resistance for One Prefecture in Japan; Extended-Spectrum β -Lactamase producing *Escherichia coli* Isolated from Less than 300 Bed Medical Facilities. The 33rd World Congress of Biomedical Laboratory Science (2018)