

2012 12

# 食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

(課題番号 H15-食品-012)

## 平成 15 年度総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業)

主任研究者 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌第一部

## 目 次

### 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業

1	平成 15 年度総括研究報告書			
	食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究			1
	主任研究者	渡辺治雄	国立感染症研究所	細菌第一部
2	平成 15 年度分担研究報告書			
	(I) サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的解析			9
	分担研究者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	
	協力研究者	寺嶋淳	国立感染症研究所	
	(II) ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学			24
	分担研究者	山口正則	埼玉県衛生研究所	
	研究協力者	倉園貴至	埼玉県衛生研究所	
		大塚佳代子	埼玉県衛生研究所	
	(III) 食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究			34
	分担研究者	甲斐明美	東京都健康安全研究センター	
	(IV) 食品由来の食中毒菌による耐性獲得リスクマネジメント手法に関する研究			50
	分担研究者	五十君静信	国立医薬品食品衛生研究所	
	協力研究者	山本茂貴	国立医薬品食品衛生研究所	
		山崎 学	国立医薬品食品衛生研究所	
	(V) 家畜衛生分野における薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究			62
	分担研究者	田村 豊	農林水産省動物医薬品検査所	
	協力研究者	高橋敏雄	農林水産省動物医薬品検査所	
		浅井鉄夫	農林水産省動物医薬品検査所	
		小島明美	農林水産省動物医薬品検査所	
		石原加奈子	農林水産省動物医薬品検査所	
		江崎英剛	農林水産省動物医薬品検査所	
	(VI) 家畜由来 <i>Salmonella</i> Typhimurium の多剤耐性化の誘因及び耐性化機構の解明			75
	分担研究者	中澤宗生	農業・生物系特定産業技術研究機構	
			動物衛生研究所	
	協力研究者	吉井紀代	動物衛生研究所	
		鮫島俊哉	動物衛生研究所	

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業  
総括研究報告書

食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部長

研究要旨 1) *Salmonella* Typhimurium の多剤耐性化が進んでいる。その中でフルオロキノロン耐性菌がヒト及び動物から分離されてきており、そのヒト由来株および動物由来株の間に遺伝的関連性が見いだされた。共通の起源が示唆された。2) *Campylobacter* の耐性パターンは *C. jejuni* あるいは *C. coli* の種間でかなりの差が見られた。菌種が分布している動物が異なるので、その動物に使用されている抗菌薬の差を反映しているものと思われた。フルオロキノロンの耐性率はヘルキー、スペイン等と比べると低いものの、調査する年度によってはかなり高い耐性率を示す時も見られた。3) サルモネラ、キャンピロバクターとも高度耐性化が進んでいる。今後サーベイランスを継続すると共に、抗菌薬の使用状況との関連性を詳細に解析する必要がある。

分担研究者

中澤宗生(独法農技研動物衛生研究所)  
田村豊(農林水産省動物医薬品検査所)  
五十君静信(国立医薬品食品衛生研究所)  
甲斐明美(東京都健康安全研究センター)  
山口正則(埼玉県衛生研究所)  
泉谷秀昌(国立感染症研究所)

A 研究目的

食中毒の中では、サルモネラ、キャンピロバクターを原因菌とするものが大部分を占めている。それらの菌の多剤耐性化が我が国ばかりでなく世界的にも進んてきている。耐性菌のため、抗菌薬による患者の治療が困難を示す例が報告されてきている。「食用動物に対して抗菌薬を使用することかとの程度耐性菌を選択

し、それか食物連鎖を介してヒトに伝播するのに影響を及ぼしているのか。更に ヒトへの細菌感染症の治療を困難にする潜在的危険性を孕んでいるのか。それをどの程度予測できるのか」が国際的大命題になっている。本研究においては、3年間のプロジェクトとして、その大命題に対する科学的評価を行うためのデータを得ることを目的にする。畜産および食中毒から分離される薬剤耐性菌の現状及び動向について全国レベルの調査を行う。また特定農場での個別追跡調査を行い、その成績の集積およびそのデータベース化を行う。食中毒事例について、患者から食品及びその原因物質、汚染場所の特定までの遡り調査を行い、耐性化を起こしている要因の原因を究明する。更に家畜由来株と患者由来株の関連性につ

いて分子遺伝学および疫学的解析を駆使して、耐性遺伝子の伝播を含めたその由来を明らかにする。最終的には動物由来耐性株のヒト医療に及ぼす影響に関するリスク評価を行う。その結果を行政的対策に生かせれば、食中毒菌の耐性化の減少及び食中毒発生時の健康被害の拡大を防ぐことかてきると考えられる。

## B 研究方法

家畜、食品及び患者由来のサルモネラ、キャンピロバクターの分離菌株の血清型、生化学的性状、ファーン型、薬剤耐性型等を解析し、データベースを構築する。薬剤耐性については、ニューキノロン剤、β-ラクタム剤特に第3、4世代のセフェム剤を中心的に調べる（倫理面への配慮）

食中毒事例に関し、ヒトの臨床情報等を扱う場合には、事前に研究倫理委員会の承認を得た上で、個人情報取り扱いに注意し、研究を遂行する。分離した菌株に関しては、匿名化を図り、特定の個人に不利益か生しないように配慮する。

## C 個々の分担者の研究結果概要

### I 人から分離される食中毒菌の耐性に関する研究

#### 1) EHEC 耐性株の分布

感染研で2001年から2003年に集積されたEHEC 550株の耐性パターンは、使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の73%、次いで耐性パターン(R-)S、R-STSu、

(Etest, センデスク法等でスクリーニングを行い、詳細はMIC値を求める)。使用した薬剤はアンピシリン(A)、ストレプトマイシン(S)、テトラサイクリン(T)、シプロフロキサシン(Cip)、カナマイシン(K)、セフトキシム(Ctx)、クロラムフェニコール(C)、ST合剤(Sx)、トリメプリム(Tp)、ケンタマイシン(G)、ナリンクス酸(N)、サルファ剤(Su)、ホスホマイシン(F)等であった。分離菌の遺伝学型をPFGE, RAPD-PCR, ALFP等の分子疫学的方法により解析し上記データベースに加える。家畜由来株および患者由来株の耐性遺伝子について、遺伝学および分子生物学的手法を用い詳細に解析を加え、由来株による差異を検討する。必要なら耐性遺伝子を含む領域の全塩基配列を調べる。

R-ASTSu、R-ASSuが全体の36%から50%を占めた。また、治療に際して使用されることの多い、ホスホマイシンに耐性の株が3株(R-F、R-AF、R-ASTKSuFが各1株)、またセフトキシム耐性が2株(R-ASTCtxSu)検出された。

#### 2) *Salmonella* Enteritidis (SE) 耐性株の分布

感染研に送付された2003年に発生した88の集団事例由来の*Salmonella* Enteritidis 88株の感受性試験では、使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の63%であった。次いでR-Sが25%で、残り12%のうち、R-ASおよびR-ASTpSuが検出された。

#### 3) 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium (ST), DT104 およびその他のファーン型

多剤耐性 ST フェーン型 DT104 およびその関連株は 1984 年に英国で検出されて以来、欧米を中心に蔓延しているタイプの株である。わか国におけるヒト由来株からは 1986 年から分離されており、その後も増加傾向にある。それ以外に、近年特徴的なこととして、フェーン型 DT12 もしくは 193 のフルオロキノロン高度耐性株が分離された。ノプロフロキサノン (Cip) に対し 24mg/l 前後の MIC 値を示した。本菌株はフルオロキノロンおよびナリクス酸に加え、R-ACSSuT ならびに R-GTp を加えた耐性パターンを示す、多剤耐性株であった。2003 年までに 13 例の患者から分離された。上記 13 株について、キノロン耐性決定領域の塩基配列を解析したところ、*gyrA* に 2 箇所、*parC* に 1 箇所、点変異が見出された。また、上記の特に耐性の高い 1 株については *gyrA* の変異か他のものと異なる形で 2 箇所、さらに *parE* に 1 箇所 (計 4 箇所) に点変異が見出された。2 株をのぞき全ての株はほぼ同じ PFGE プロファイルを示したことより、同じクローン由来と思われた。

#### 4) 非ヒト由来のフルオロキノロン高度耐性 ST

これまで感染研に送付されている菌株の中で、ヒト以外の由来を持つフルオロキノロン高度耐性株が、5 株あり、イヌ (2 株)、ネコ (1 株)、ウシ (1 株)、不明 (1 株) 由来であった。このうち 2 株は上記ヒト由来株の患者が飼育していたペットである。これらの菌株の耐性パターン、フェーン型 MIC はヒト由来株のそれとほぼ同様であった。また、耐性にかかわる遺伝子の変異、PFGE プロファイル、インテクロン PCR の結果

もヒト由来株のものと一致していた。上記菌株の PFGE プロファイルと類似したプロファイルを示す株が 1997 年にウシから分離された株にみられた。耐性パターンは R-ACSSuTN で、フルオロキノロンに対する MIC は 0.75 から 3mg/l であり、所謂低感受性株であった。この株は、*gyrA*、*parC* に変異が認められ、上記高度耐性株の *gyrA* 変異の 1 箇所が欠けているだけであった。

#### 5) ヒトから分離されたサルモネラ血清型 *S* Infantis

散発下痢症患者から分離された血清型 *S* Infantis の 33 株の薬剤感受性試験結果は、33 株中 25 株 (75.8%) は供試した 9 薬剤のいずれかに対して耐性であり、TC 耐性が最も多く 21 株 (63.6%)、次いで SM が 20 株 (60.6%)、KM が 12 株 (36.4%)、ST が 8 株 (24.2%)、NA が 3 株 (9.1%) であった。FOM および NFLX 耐性株は、認められなかった。また耐性菌の出現状況を年次別にみると、85.7% (2000 年)、57.1% (2001 年)、75.0% (2002 年)、81.8% (2003 年) で、高率であることに変わりない状況であった。

#### 6) カンピロバクターの耐性

1997～2002 年に都内で散発下痢症患者から分離された *C. jejuni* 916 株について薬剤感受性試験を行なった。耐性菌は、445 株 (48.6%) に認められた。その中で、ニューキノロン系薬剤に対する耐性率の年次別推移は、31.1% (1997 年)、28.80% (1998 年)、28.7% (1999 年)、29.2% (2000 年)、39.4% (2001 年)、28.9%

(2002年)であった。NFLX・OFLX・CPFX・NA耐性が18.3%に認められた。一方、治療の第一選択剤であるEMに対する耐性率は、毎年1~2%程度で推移しており、大きな変動はなかった。

## II 動物から分離される食中毒菌の耐性に関する研究

### 1) 健康動物から分離されたサルモネラの薬剤感受性モニタリング

健康家畜の糞便からのサルモネラの分離率は、牛、豚、及び採卵鶏では2.5~3.8%で、フロイラーでは20.1%であった。分離されたサルモネラの血清型は、Infantis(SI)が69株と最も多く、Typhimurium(ST 36株)、Agona(10株)の順で、SI 69株中65株がフロイラー由来で、ST 36株中19株が牛由来、17株が豚由来であった。フルオロキノロン(ERFX及びOFLX)及びセフェム系薬剤(CEZ、CXM及びCTF)に対する耐性株は認められなかったが、他の薬剤の耐性率は、DSM 77.6%と最も高く、OTC 67.8%、KM 35.5%、TMP 25.1%、ABPC 20.2%、CP 17.5%、BCM 3.8%、NA 9.3%、OA 9.3%及びCL 0.5%の順であった。STの35株(97.2%)とSIの67株(97.1%)がいずれかの薬剤に耐性で、4剤以上に耐性を示したものはそれぞれ26株と32株であった。4剤以上に耐性を示したSTの内、12株がDT104であった。NA及びOAに耐性を示した17株はInfantis(7株)、Dublin(4株)、O群型別不能(r 1、5、2株)、Haifa(2株)、Istanbul(2株)で、そのうちDublinとIstanbulでは、*gyrA*の87位でのAsp→Tyr

置換(GAC→TAC)が認められ、*parC*での変異は認められなかった。

### 2) 健康家畜から分離されたカンピロバクターの薬剤感受性モニタリング

健康家畜糞便の14.2~49.5%からカンピロバクターが分離され、牛、採卵鶏およびフロイラーからは主に*C. jejuni*が、豚からは主に*C. coli*が分離された。*C. jejuni*及び*C. coli*の耐性率を比較するといずれの薬剤についても*C. coli*の耐性率が高かった。マクロライド系薬剤については、*C. jejuni*の全株が感受性であったが、*C. coli*では39-48%と高い耐性率を示した。フルオロキノロン耐性株は*C. jejuni*の10.2~16.3%および*C. coli*の24.2~24.8%に認められた。

### 3) フルオロキノロン耐性カンピロバクターが分離された養鶏場における追跡調査

調査した2鶏群とも入雛直後は分離陰性で、A農家では3週齢以降、B農家では6週齢以降で80-100%の鶏糞便から*C. jejuni*が分離された。環境材料はいずれも分離陰性、飲水からはA農家の6週齢時に*C. jejuni*が分離された。薬剤感受性試験では、A農家分離株の30%がキノロン(NAおよびERFX)及びOTC耐性、B農家分離株の64%がOTC耐性であった。また、農場で給与されていた飼料に含まれる抗菌性飼料添加物(CL)に対しては感受性に差は見られなかった。A農家由来キノロン耐性株の耐性パターン及び遺伝子型*fla A* typeは、平成13年度の調査で分離された耐性株と一

致していた。

#### 4) DT104 の多剤耐性に関するインテクロンの解析

DT104 の多剤耐性には染色体上のインテクロンが関与していることから、1973年から1999年にかけて分離された家畜由来 ST について Int-PCR によるインテクロンの分布状況を調べた。その結果、Int+/Flo+の性状を示す DT104 は 1990 年代以降国内で分離されているのに対して、Int+/Flo-の性状を示す菌株が 1980 年代初頭には存在していた。このことは、DT104 の侵襲以前に既にウシ由来 ST にインテクロンを介した薬剤耐性が存在していたことを示した。

### III 鶏肉から分離されたサルモネラに関する研究

#### 1) 市販鶏肉から分離されたサルモネラ

2002 年 4 月～2003 年 2 月に実施した市販鶏肉(国産品)のサルモネラ汚染実態調査では、210 検体中 134 検体(63.8%)からサルモネラが分離された。最も高率に分離された血清型は Infantis で、111 検体(64.2%)から分離された。続いて Hadar が 3 検体(1.7%)、Typhimurium が 2 検体(1.2%)から分離された。血清型 Infantis の 111 株中 109 株(98.2%)が薬剤耐性株であり、耐性を示した薬剤は、TC(97.3%)、SM(92.8%)、KM(61.3%)、ST(47.7%)、NA(9.9%)、ABPC(0.9%)であったが、FOM や NFLX に耐性の株は認められなかった。血清型 Typhimurium の 2 株は、いずれも CP・TC SM・KM・ABPC の 5 剤耐性

菌であった。血清型 Hadar の 3 株では、TC SM の 2 剤耐性が 2 株、TC 単剤耐性が 1 株

#### 2) 輸入鶏肉から分離されたサルモネラ

2003 年 11 月～12 月に実施した輸入鶏肉を対象とした調査では、47 検体中 11 検体(23.4%)からサルモネラが分離され、血清型は Enteritidis が 8 検体(72.7%)、Virchow, Mbandaka, Braenderup, Hadar, Newport がそれぞれ 1 検体から分離された。それらのうち、NA 単剤耐性株が 8 株(61.5%)で最も多く認められた。また、血清型 Enteritidis では、NA 単剤耐性株が 4 株で最も多く、その他 NA・SM が 2 株、NA・SM・TC・ST・ABPC、および NA・SM・TC・CP・ABPC が各 1 株認められた。

### IV 食品からのカンピロバクター分離手法の標準化

海外の主要なプロトコールを、調べ PHLS 法、FDA-CFSAN(BAM)法、ISO 法を比較検討し、文献等の情報から、標準的なプロトコール原案を作成した。この案につき、日常的に検査を行っている衛生研究所に意見をもとめ、個々の問題点を明らかにすると共に、プロトコールを完成させる上で、実験によるデータの確認が必要と思われる部分を議論し明らかにした。これらの重要な部分については、カンピロバクター分離に実績のある 9 の地方衛生研究所と共同で、手法の検討を開始した。

#### V サルモネラ集団事例解析

2003 年 11 月 4 日に埼玉県北部で家庭内

食中毒事例が発生した。喫食調査により、鶏卵による食中毒が疑われたため、家庭内に残されていた鶏卵の検査を実施した。また鶏卵購入先である地元スーパーからの遡り調査により、G 県にある養鶏場及び選別包装場が浮かび上がった。細菌検査の結果、患者3名の糞便及び3個の鶏卵からSE が検出された。鶏卵の汚染菌数は  $8.8 \times 10^4$  個/gであった。G 県に昭会したところほぼ同じ時期に G 県でも同じ選別包装場を経由した鶏卵によると考えられた食中毒事例が発生していた。両県の菌株は、薬剤感受性試験、ファーン型、PFGE 法による DNA 切断パターン等の性状解析で全て同一の性状を示した。G 県農政部に養鶏場の調査及び生産者の指導を依頼し、鶏舎内の汚染実態調査を12月2日に実施したところ、糞便 5/36(13.9%)、塵芥 29/47(51.7%)、床スワブ 29/40(72.5%)から O9 群を検出した。そこで対策として、SE 陽性鶏群の淘汰、強制換羽の中止、サルモネラワクチン接種済み鶏の導入、選別包装場での洗卵消毒薬をサルモネラに対する殺菌効果が高いものに変更等を実施した。2004年1月16日に当該養鶏場の鶏卵450個の検査を実施したが、すべてサルモネラ陰性であった。今回の集団事例はSEに汚染された鶏卵による diffuse outbreak の1事象であったことが示唆された。残念ながら散発事例発生時に、細菌学的性状解析により、diffuse outbreak の可能性が強く疑われたものの、結局その時点で汚染源を究明するまでには至らず、diffuse outbreak への対応の難しさが指摘された。

#### D 考察

サルモネラとカンピロバクターは、食中毒の主要な原因菌で、家畜に広く分布している。両菌種のモニタリングで、動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されているテトラサイクリン、ストレプトマイシンに対する耐性か、高率に認められた。その結果は、テトラサイクリン系抗菌剤及びアミノグリコシド系薬剤か、家畜で最も使用量が多いことを反映しているのかもしれない。

牛と豚由来株では ST、フロイラー由来株ではSIか、主要な血清型であった。これら血清型の大部分の株は、何れかの薬剤に耐性で、STの70%あるいはSIの45%が4剤以上に耐性であった。SIはTMP及びKMに耐性率が高く、STはABPC及びCPに高い耐性率を示し、畜種ごとの薬剤耐性率が異なっていた。畜種ごとのサルモネラを軽減させるための衛生対策、および使用薬剤削減対策が必要であろう。

今回の健康家畜由来サルモネラ調査ではフルオロキノロン耐性株は見いだされなかったが、*S. Typhimurium* 感染患者からはフルオロキノロン高度耐性菌(シプロキサノンに対して24mg/l以上のMICを示す)が2003年までに13株分離された。それらは *gyrA* に2ヶ所、*parC* に1ヶ所の点変異が見られ、ファーン型はDT12もしくはDT193であった。また、フルオロキノロン高度耐性 ST かヒト以外(イヌ、2株、ネコ、1株、ウシ、1株)から5株分離され、それら耐性型、ファーン型、PFGE パターンはヒト由来とほとんど同じであった。1997年にウシから分離された菌株が同じ PFGE パターンを示し



ており、かつフルオロキノロンに低感受性(MIC 2mg/l前後)であった。この種の株かフルオロキノロン高度耐性菌のオリシンかもしれない。今後、広範囲のさらなる調査をすることにより、フルオロキノロン高度耐性 ST の実態を明らかにし、その制御に向けた方策を施す必要がある。

また、カンピロバクターのフルオロキノロン耐性率は、ヘルギー、スペインなどと比較すると低い値ではあるものの、調査年度によっては高い耐性率を示した。フルオロキノロン剤は、1991年に初めて国内で動物用医薬品として認可され、現在では製剤数も増えており、キノロン耐性についてのモニタリングは、公衆衛生上、重要な意義があると考えられる。

カンピロバクター腸炎の第一次選択薬であるエリスロマイシンに対し、*C. coli* (主に豚から分離される)は50%近く耐性を示したか、*C. jejuni* (主にフロイラー、牛から分離される)は全株感受性であった。フロイラーにおけるマクロライドの使用量は、豚に比へ極めて低く、マクロライド耐性が出現しにくいと考えられる。今後は、マクロライドに対する感受性をモニタリングするとともに、*C. jejuni*が分布する牛とフロイラーでの使用量にも注意を払っていく必要がある。

キノロン剤の投与歴が無いのに、フルオロキノロン耐性 *C. jejuni* の単一クローンは1年半にわたり養鶏農家から分離されたケースがあった。鶏群に使用されていた飼料添加物を含む抗菌性物質の感受性に差もなく、また農場内およびその周辺で捕獲されたネズミや野鳥の糞便などを含めた環境材料からもカンピロバク

ターは分離されず、結局は汚染源を特定することはできなかった。今後、そのような原因かどこにあるのかを農場の環境全体を含めさらにきめ細かく調査をし、耐性獲得の機序を調査し、対策に結びつけていく必要がある。

サルモネラの多剤耐性は既に1980年代から問題視されており、これまでにRプラスミドを介した多剤耐性の獲得、伝播に関する研究が数多く報告されてきた。それに加えて1990年前後から世界各国と時期を同じくしてSTファーン型DT104が国内に浸潤していることが明らかになってきたことにより、インテグロンによる多剤耐性の概念が新たに加わった。そこで本研究ではPCR法を用いてインテグラーゼ遺伝子の一部を検出することにより、家畜由来株におけるインテグロンの浸潤状況を調査した。その結果、国内のSTはDT104の侵入以前の1980年代に既にインテグロン構造を保有しており、インテグロンもまたサルモネラの多剤耐性を論じる上で重要な要因であると考えられた。

## E 結論

サルモネラとカンピロバクターのモニタリングで、動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く使用されているテトラサイクリン、ストレプトマイシンに対する耐性が、高率に認められた。牛と豚由来株ではST、フロイラー由来株ではSIか、主要な血清型であった。STの70%あるいはSIの45%が4剤以上に耐性を示しており、多剤耐性化が進んでいる状況が明らかになった。その中にはDT104も含まれていた。また、

最近分離されるようになってきているフルオロキノロン高度耐性株についてもヒト由来株および非ヒト由来株の間で、互いの類似性が示唆される結果が得られており、ヒトへのサルモネラ感染の制御には、より広い宿主に対してサーベイランスを行うことが重要であることが示唆された。

カンピロバクターでは、治療に使われるエリスロマイシンに対し、*C. coli* は50%近く耐性を示したか、*C. jejuni* は全株感受性であった。フルオロキノロンに対してはかなり高い耐性率を示していた。キノロン未使用の農場であるにもかかわらず、単一のフルオロキノロン耐性株が継続的に分離される事例が存在した。その原因は不明であったか、土壌や齧歯類の汚染等

を含め環境全般の汚染を調査対象に含めていく必要がある。

F 知的財産権の出願・登録状況  
なし

#### G 健康危害情報

本調査において、サルモネラ及びカンピロバクターにおいて、薬剤耐性菌がかなり存在していることが明らかになった。カンピロバクターでは、薬剤の使用に関わらず、フルオロキノロン耐性株が出現する場合が認められた。環境汚染(土壌、齧歯類等)との関係が示唆される。

## 平成 15 年度 厚生労働省食品安全確保研究事業分担研究報告書

分担課題名 サルモネラをはじめとした食中毒菌の薬剤耐性に関する遺伝学的解析

分担研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部主任研究官

協力研究者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌第一部第一室長

研究要旨 本研究班では、ヒトの健康への脅威となる動物由来感染症に関して、その発生動向を把握するための監視体制を整備することを目的とする。本分担研究においては、特に、動物の汚染を介した細菌感染症に着目して発生動向の解析を行う。とりわけサルモネラは代表的な食中毒起因菌であるか、同時に人獣共通感染症の起因菌としても重要な位置を占めている。そこで本研究では多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium を中心に、ヒトおよび非ヒト由来株を解析した。

### A 研究目的

2002 年厚生労働省食中毒統計における細菌性食中毒の患者総数は 17,533 名であった。このうち、33%にあたる 5,833 名はサルモネラによるものであり、本菌の公衆衛生上の重要性を示している。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるか、中でも *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S* Enteritidis、以下 SE) による患者数は 1990 年代に急増し、現在もなお血清型別での検出頻度で第一位を占めている。同しく *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S* Typhimurium、以下 ST) は *S* Enteritidis

が台頭してくる以前は血清型別で最も多く検出されていた。現在でもなお、血清型別検出頻度の上位を占めている。

一方、腸管出血性大腸菌 (EHEC) は所謂感染症新法で 3 類感染症に挙げられており、2003 年の患者数は 2,635 名にのぼる (2003 年 1 月現在)。

これらの主要な食中毒細菌における菌株の耐性化の傾向は異なっており、SE および EHEC における耐性株の報告は少ないものの、ST においては多剤耐性化が顕著であると言われている。本研究では、これらの耐性化の動向を調査するとともに、耐性因子等について遺伝学的

解析を行うことで、耐性機構の解明および耐性化の広がり状況を明らかにすることを旨とする。

#### (倫理面への配慮)

食中毒事例に関し、ヒトの臨床情報等を扱う場合には、事前に研究倫理委員会の承認を得た上で、個人情報の取り扱いに注意し、研究を遂行する。分離した菌株に関しては、匿名化を図り、特定の個人に不利益が生しないように配慮する。

## B 研究方法

1 供試菌株 全国の地方衛生研究所等および動物衛生研究所等の協力により得られた EHEC、SE および多剤耐性 ST を使用した。

2 薬剤感受性試験 BBL 社のセンシテディスクを用いて、NCCLS に準拠した方法により試験し耐性を決定した。使用した薬剤はアンピシリン(A)、ストレプトマイシン(S)、テトラサイクリン(T)、シプロフロキサシン(Cip)、カナマイシン(K)、セフトキシム(Ctx)、クロラムフェニコール(C)、ST 合剤(Sx)、トリメトプリム(Tp)、ケンタマイシン(G)、ナリシクス酸(N)、サルファ剤(Su)、ホスホマイシン(F)の 13

剤であった。最小発育阻止濃度 MIC は Etest を用いて決定した。

3 ファーシ型別 英国 PHLS より分与された型別用ファーシを使用して標準法に従って型別を行った。

4 クラス 1 インテクロン PCR クラス 1 インテクロンに共通の配列をプライマー

int1-F

5'-GGCATCCAAGCAGCAAGC-3'

int1-R

5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3'

として使用した。鋳型として滅菌水に懸濁した菌液を煮沸処理したものを使用した。反応サイクルは 95°C3 分の変性工程の後、93°C20 秒、55°C20 秒、72°C1 分を 35 回行った。

5 パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) Izumiya らの方法 (J Clin Microbiol 35, 1675-1680, 1997) にしたがって実施した。泳動条件は 6V, 4°C, ランプ時間 5-50 秒で 21-22 時間泳動した。

## C 研究結果

### 1 EHEC 耐性株の分布

当部に 2001 年から 2003 年に送付された EHEC 菌株から 550 株を抽出し薬剤感受性試験を行った。その結果を図 1 に

示す。使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の 73%であった。次いで耐性パターン(R-)S、R-STSu、R-ASTSu、R-ASSu が全体の 36%から 50%を占めた。また、治療に際して使用されることの多い、ホスホマイシンに耐性の株が3株(R-F、R-AF、R-ASTKSuFが各1株)、またセフトキシム耐性が2株(R-ASTCtxSu)検出された。

## 2 SE 耐性株の分布

当部に送付された SE 菌株のうち 2003 年に発生した集団事例 88 件について、その関連株の感受性試験を行った。図 2 には過去のデータを併せてグラフにしたものを表す。使用したすべての薬剤に対して感受性であった株は全体の 63%であった。次いで R-S が 25%を占めた。残り 12%のうち、R-AS がここ数年、R-ASTpSu が昨年から継続して検出されている。

## 3 多剤耐性 ST DT104

多剤耐性 ST フェーシ型 DT104 およびその関連株は 1984 年に英国で検出されて以来、欧米を中心に蔓延しているタイプの株である。わが国における同タイプの菌株分離状況を図 3 および図 4 に示す。ヒト由来株からは 1986 年から分離

されており、その後も増加傾向にある。

一方、ヒト以外からの株について、ST DT104 およびその関連株の分離状況を図 4 に示す。これによると 1989 年を除き、1988 年から同菌が分離されており、特に 1999 年以後は全国的なサーベイランスの開始もあって分離菌株数が増加している。

## 4 フルオロキノロン高度耐性 ST

2000 年にある国内散发事例より分離されたフルオロキノロン高度耐性株はシプロフロキサシン(Cip)に 24mg/l 前後の MIC 値を示す。本菌株はフルオロキノロンおよびナリシクス酸に加え、R-ACSSuT ならびに R-GTp を加えた耐性パターンを示す、多剤耐性株であった。その後、2003 年までに 13 例の患者から分離されており、R-GTp に対する耐性が無いものもあるか、ファーシ型はすべて DT12 もしくは 193 であった(表 1)。

これらの菌株のフルオロキノロン各種に対する MIC 値は 1 株(#9)を除き 24 から 48mg/l であった。1 株については各薬剤に対し測定上限を超えていた(ノフロキサシンに対しては>256mg/l、その他のフルオロキノロンについては>32mg/l)(表 2)。

キノロンに対する耐性は、DNA シャイレースおよびトポイソメラーゼの各サブユニットが関与すると考えられている。上記 13 株について、それらのキノロン耐性決定領域の塩基配列を解析したところ、*gyrA* に 2 箇所、*parC* に 1 箇所、点変異が見出された。また、上記の特に耐性の高い 1 株については *gyrA* の変異か他のものと異なる形で 2 箇所、さらに *parE* に 1 箇所 (計 4 箇所) に点変異が見出された (表 3)。

上記菌株の近縁性を調べるため PFGE を行った。その代表的な結果を図 5 に示す。#9 および別の 1 株 (#6) を除き、全ての株はほぼ同じ PFGE プロファイルを示した。また、これらの菌株がいずれも R-Su を含んでいたことからクラス 1 インテグロンの存在を疑い、それに対する PCR を行った。その結果、いずれの株も約 2kb 付近にハントカ検出された (図 6)。

#### 5 非ヒト由来のフルオロキノロン高度耐性 ST

これまで当部に送付されている菌株の中で、ヒト以外の由来を持つフルオロキノロン高度耐性株は、5 株である (表 4)。由来はイヌ (2 株)、ネコ (1 株)、ウシ (1 株)、不明 (1 株) であり、このうち 2 株は上記ヒ

ト由来株の患者か飼育していたペットである。これらの菌株の耐性パターン、ファーン型、MIC はヒト由来株のそれとほぼ同様であった。また、耐性にかかわる遺伝子の変異、PFGE プロファイル、インテグロン PCR の結果もヒト由来株のものと一致していた (表 4 および 5)。

上記菌株の PFGE プロファイルと類似したプロファイルを示す株かないか、過去に当部に送付された ST 株の PFGE プロファイル約 300 から検索を行った。その結果、非常に類似したプロファイルを示していた株が 1 つ見出された。本菌株 (#106) は 1997 年にウシから分離された株であった。耐性パターンは R-ACSSuTN であった。フルオロキノロンに対する MIC は 0.75 から 3mg/l であり、所謂低感受性株であった。対照として DT104 で R-ACSSuTN の株の MIC を測定したところ、各薬剤に対して 1 から 2 款低い値を示した (表 6)。この 2 株についてキノロン耐性にかかわる遺伝子の変異を調べたところ、DT104 対照株では *gyrA* に 1 箇所の変異しか認められなかったのに対し、#106 ではさらに *parC* の変異も認められ、変異の種類は上記高度耐性株の *gyrA* 変異の 1 箇所か欠けているだけであった。

## D 考察

本研究の結果から、EHEC および SE では感受性株かなお大勢を占める中で、耐性株か一部検出された。それには治療上問題となりうる耐性も含まれていた。また、何年かにわたり継続して検出される耐性パターンも認められた。

多剤耐性 ST DT104 についてはヒトからも分離されているか、家畜を含めたヒト以外からも分離されている状況か明らかとなり、海外たけてなくわか国ても本菌株か侵潤している様子か窺えた。

フルオロキノロン高度耐性 ST については、耐性パターン、ファーシ型、PFGE プロファイル、遺伝子変異の種類、インテグロンなどの点において互いの類似性か示唆された。また、中にはさらに高い耐性を示す株もあり、変異の程度も他の株より進んでいると考えられた。

また、ヒト以外からも同様の特徴を持つ株か分離されている状況か明らかにされるとともに、過去にはフルオロキノロン低感受性でありながらも、ファーシ型、PFGE プロファイル、遺伝子変異において非常に近縁性の高いと思われる株も分離されていたことか明らかとなった。

今後、これらのフルオロキノロン耐性

ST 株をさらに詳細に解析することで、そのクローナリティを明らかにしていく予定である。

また、EHEC や SE の耐性株についての遺伝学的解析も併せて行っていく予定である。

## E 結論

細菌感染症において菌の耐性化は、非常に重要な問題である。サルモネラ感染症は人獣感染症の代表的なものであるか、ヒトおよびヒト以外の由来を持つ株から欧米で蔓延している多剤耐性 ST DT104 が侵入していることか示唆され、また、最近分離されるようになってきたフルオロキノロン高度耐性株についてもヒト由来株および非ヒト由来株を含め、互いの類似性か示唆されるなどの結果か得られ、ヒトへのサルモネラ感染の制御には、より広い宿主に対してサーベイランスを行うことか重要であることか示唆された。

## F 健康危険情報

ST の多剤耐性化は年々進んでいることか明らかとなってきた。今後も、その動向に注意か必要である。

G 研究発表等

- (1) H Nakaya, A Yasuhara, K Yoshimura, Y Oshihoi, H Izumiya, and H Watanabe Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC* Emerg Infect Dis , 9, 255-257, 2003
- (2) H Izumiya, N Nojiri, Y Hashiwata, K Tamura, J Terajima, and H Watanabe *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Japan Emerg Infect Dis , 9 (12), 1650-1651, 2003
- (3) 泉谷秀昌、渡辺治雄 食中毒起因菌における耐性菌の現状と問題点。獣医畜産新報 JVM、第 56 巻第 10 号、828-832、2003。
- (4) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和尙、渡辺治雄 フルオロキノロン耐性 *Salmonella* Typhimurium。IASR 第 24 巻第 8 号、181、2003。
- (5) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和尙、渡辺治雄 *Salmonella* Enteritidis 関するファーシ型別および薬剤耐性の傾向。第 76 回日本細菌学会総会。
- (6) 泉谷秀昌 サルモネラによる食中

毒の発生状況とその傾向について。第 5 回感染症フォーラム。

H 知的財産権の出願・登録状況  
なし

※解析に使用した菌株を提供していたいた全国の地方衛生研究所、動物衛生研究所等の諸先生方、ならひに江東微研の東出先生に深謝いたします。



図1. EHEC薬剤耐性パターンの分布状況(2001-2003、n=550)

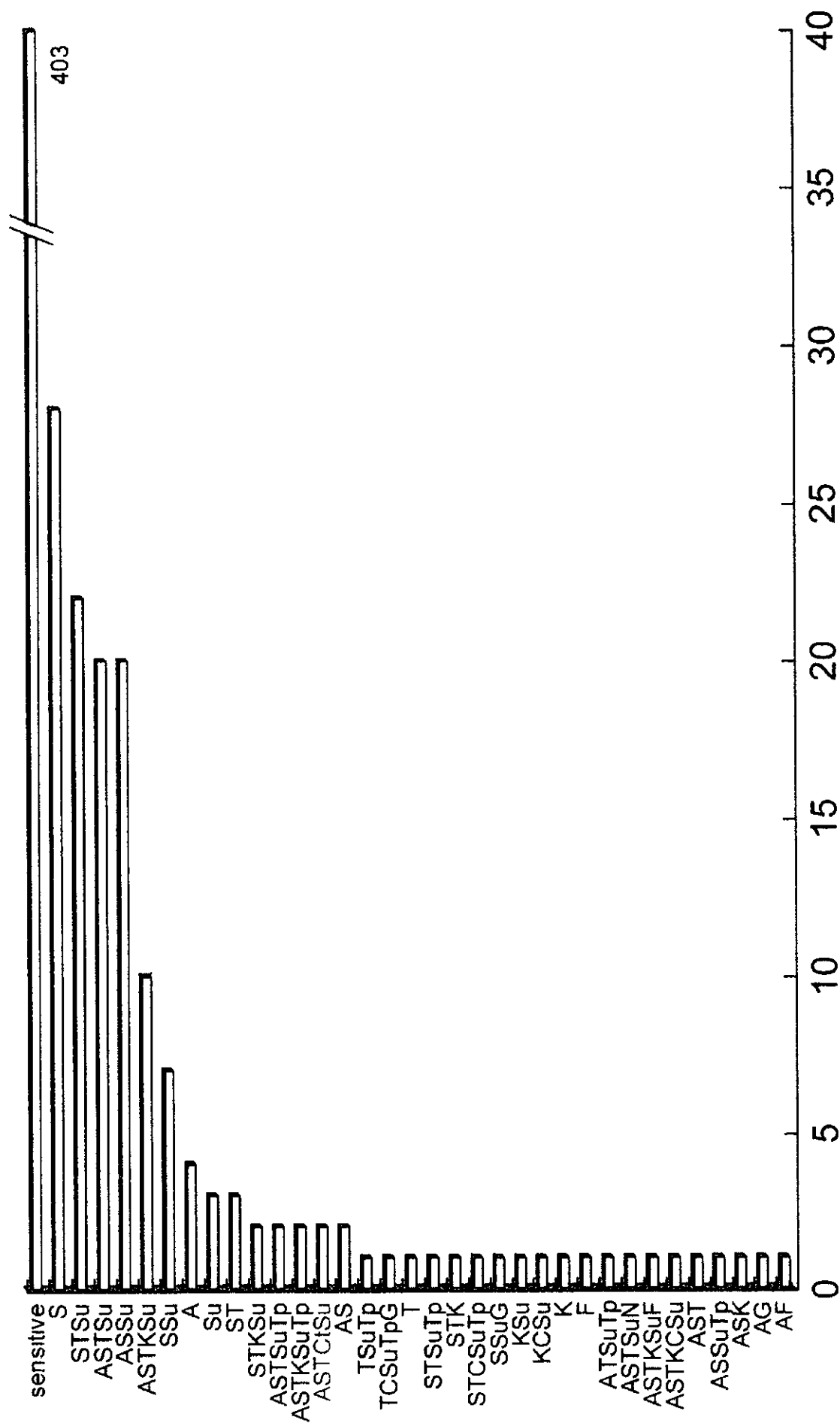


図2 Salmonella Enteritidis 集団事例関連株の薬剤耐性パターンの傾向(1997-2003)

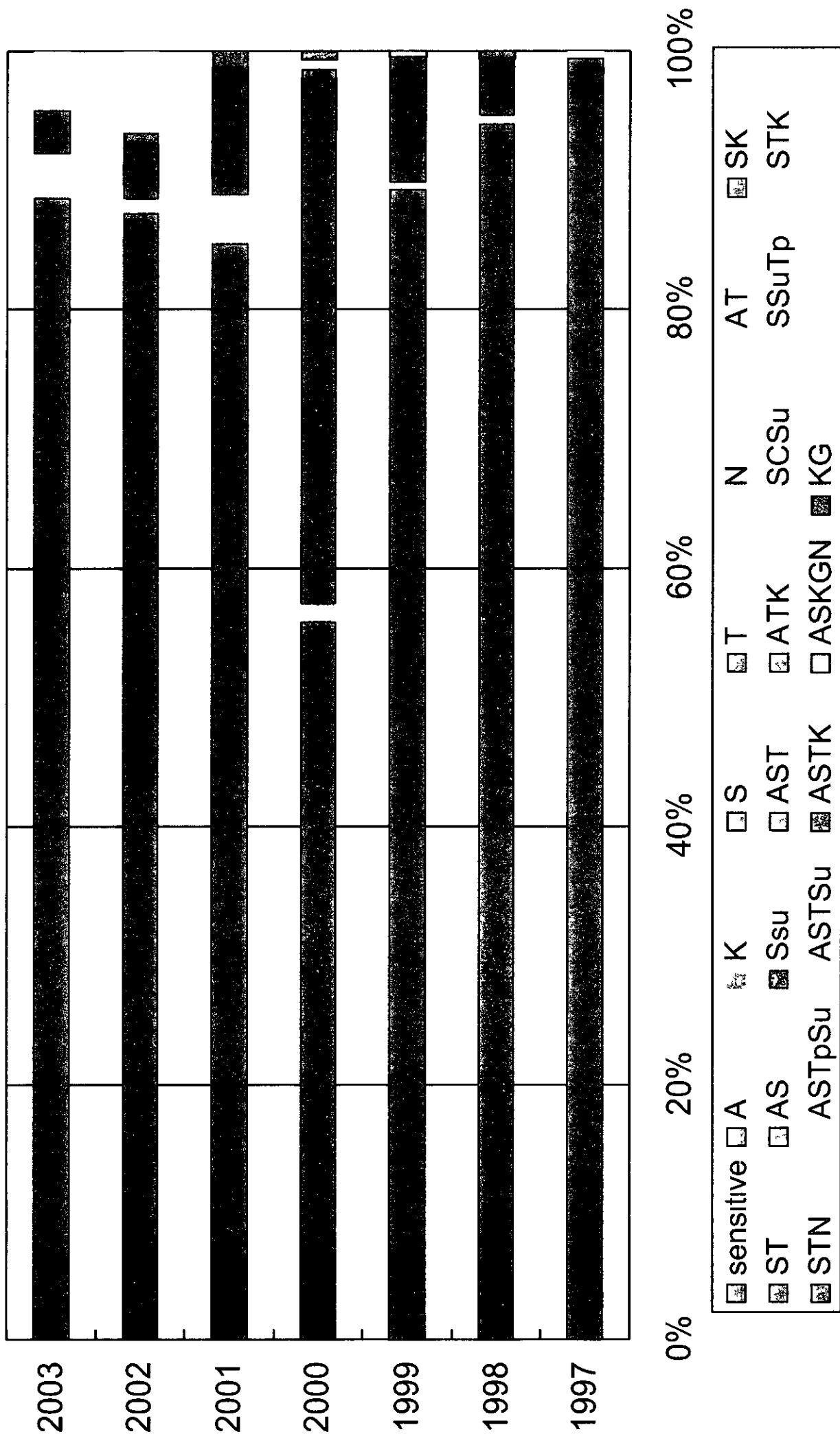


図3 ヒト由来S Typhimurium DT104分離状況

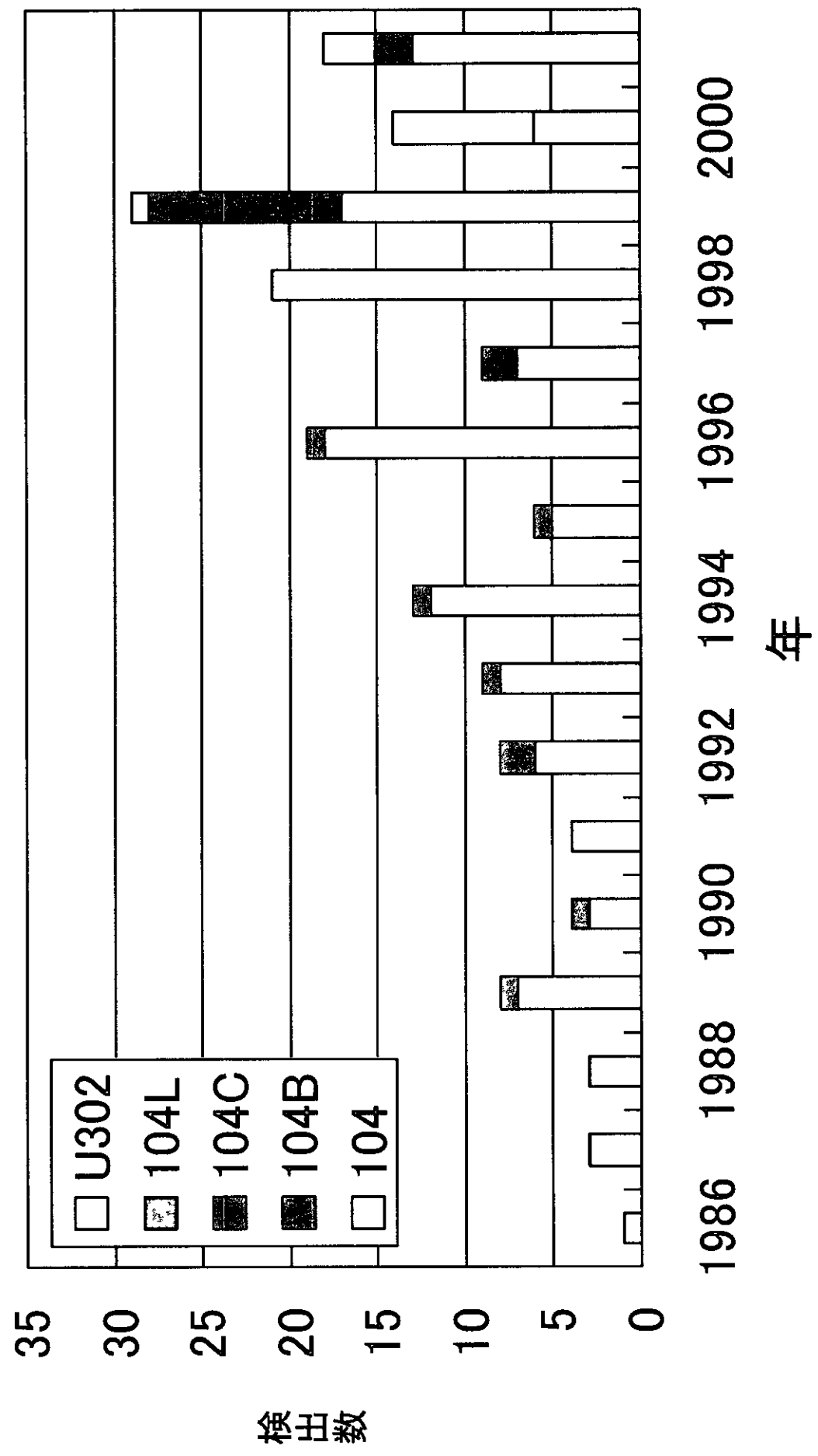


図4. 非ヒト由来S Typhimurium DT104関連株分離状況

