

図1. EHEC薬剤耐性パターンの分布状況(2004年、n=200)

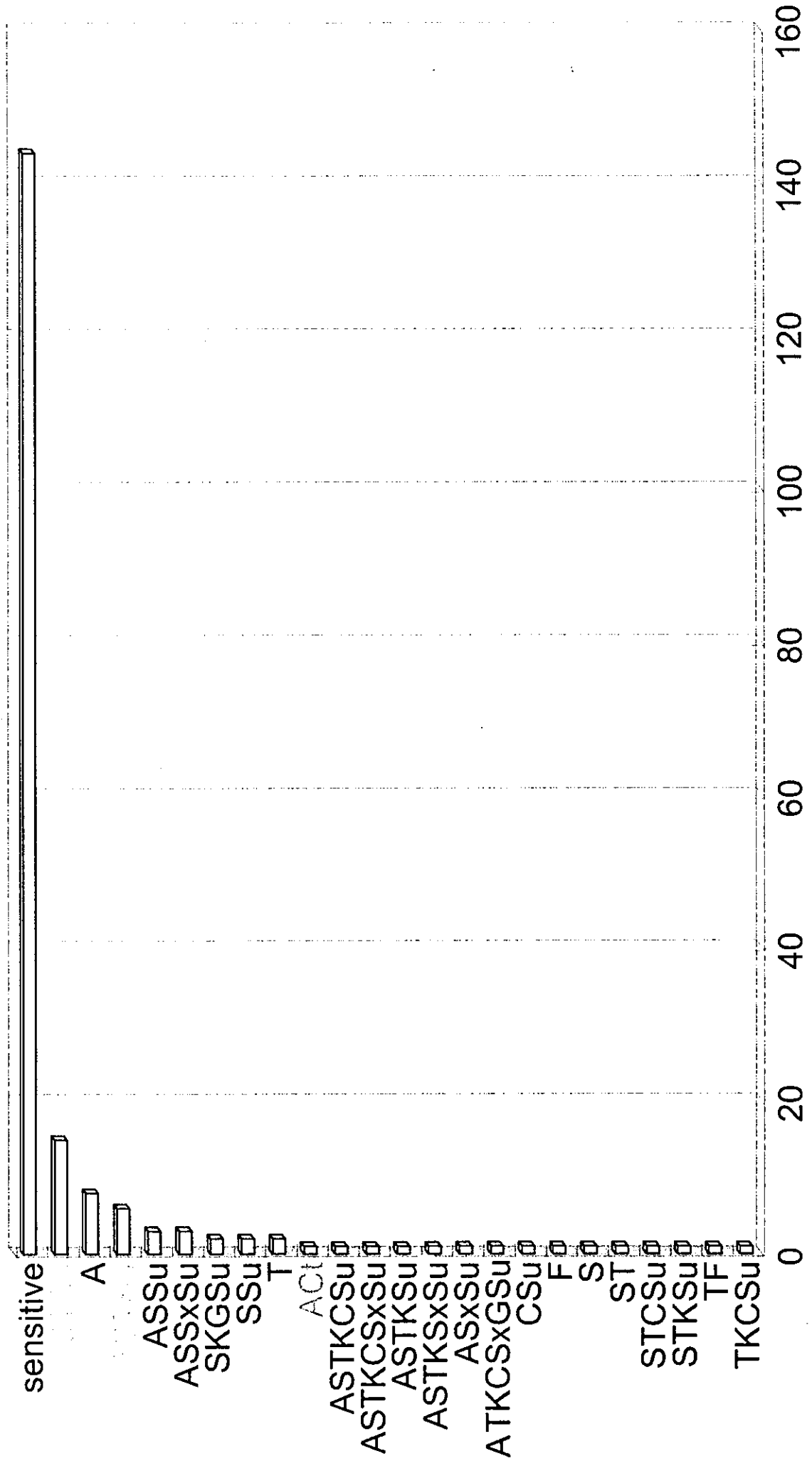


図2. *Salmonella* Enteritidis 集団事例関連株の薬剤耐性パターンの傾向(1997-2004)

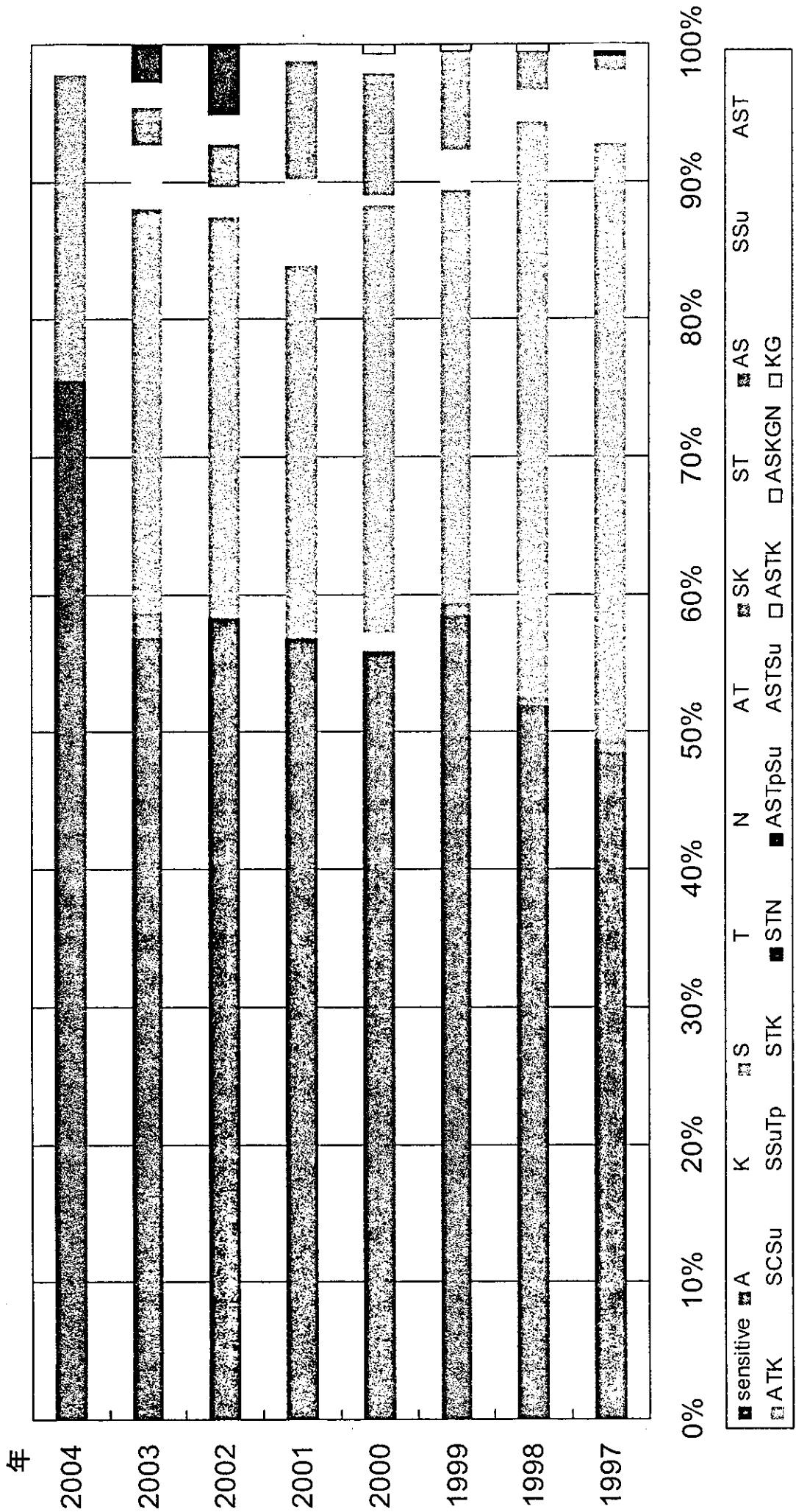


表1. フルオロキノロン高度耐性S. Typhimurium感染例発生状況

年	n	DT	耐性パターン
2000	1	12	ACSSuT+GTpNCp
2001	3	12	ACSSuT+NCp
	1*	12	ACSSuT+GTpNCp
	1	193	ACSSuT+GTpNCp
2002	1	12	ACSSuT+NCp
	4	193	ACSSuT+GTpNCp
2003	3	193	ACSSuT+GTpNCp
2004	3*	193	ACSSuT+GTpNCp
	1*	193	ACSSuT+TpNCp

*: 今年新たに同定された株

表2. フルオロキノロン高度耐性株MIC(mg/L)

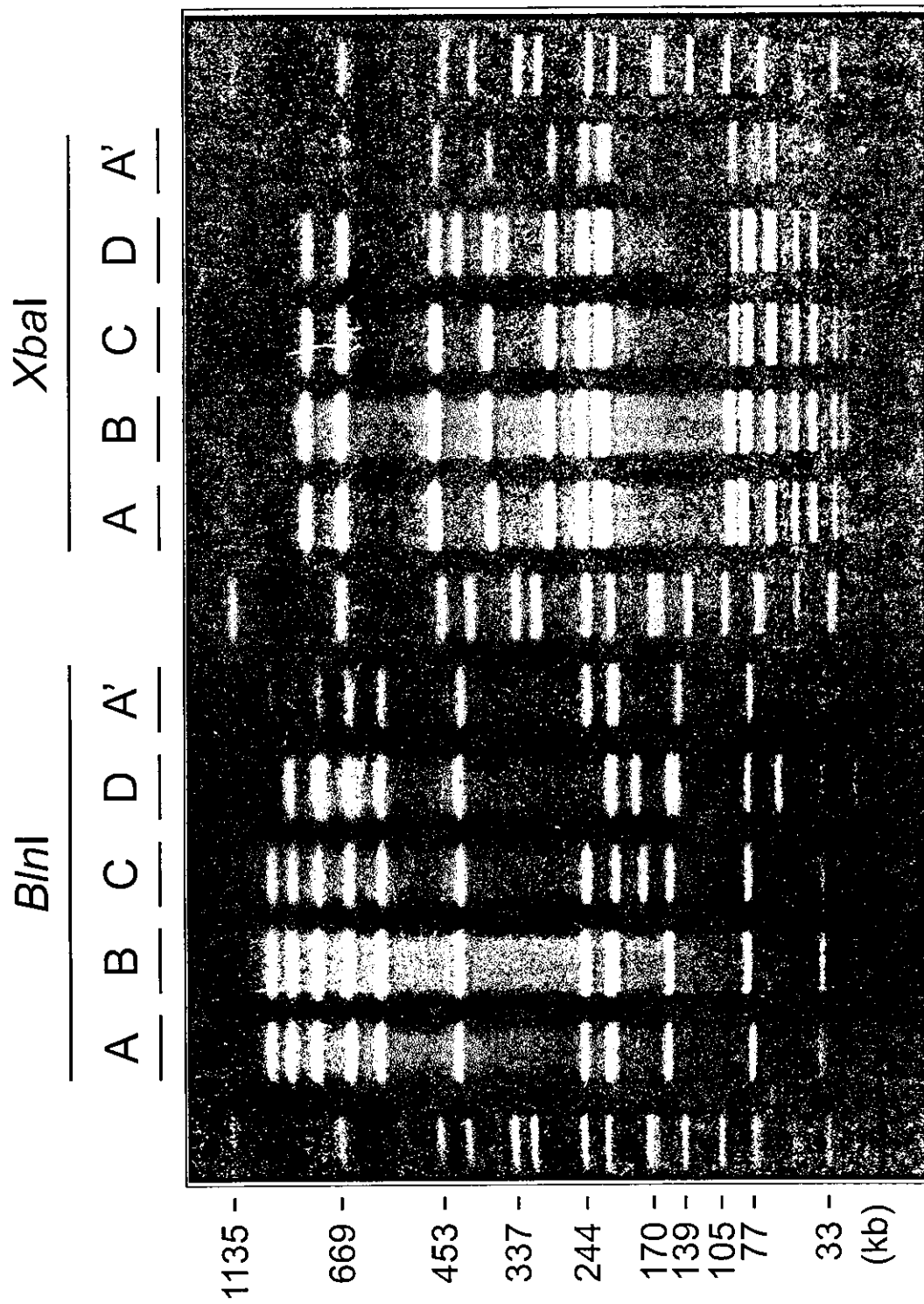
	NA	CI	SO	OF	NX
14	>256	24	nt	nt	24
15	>256	24	nt	nt	24
16	>256	16	nt	nt	24
17	>256	24	nt	nt	24
18	>256	>32	>32	>32	128

NA, ナリジククス酸; CI, シプロフロキサシン; SO, スパロフロキサシン; OF, オフロキサシン; NX, ノルフロキサシン
 nt, 試験せず
 (2004年に新たに同定された株の結果のみを示す)

表3. フルオロキノロン高度耐性株の各遺伝子のキノロン耐性決定領域における変異

	GyrA	GyrB	ParC	ParE
14	S83F+D87N (TCC/TTC)(GAC/AAC)	-	S80R (AGC/CGC)	-
15	S83F+D87N	-	S80R	-
16	S83F+D87N	-	S80R	-
17	S83F+D87N	-	S80R	-
18	S83F+D87N	-	S80R	-

図3. フルオロキノロン耐性*S. Typhimurium*株のPFGEパターン(代表例)



A', ウシ由来のFQ低感受性株のPFGEパターン

図4. フルオロキノロン耐性*S. Typhimurium*株とDT104株とのPFGEパターンの比較

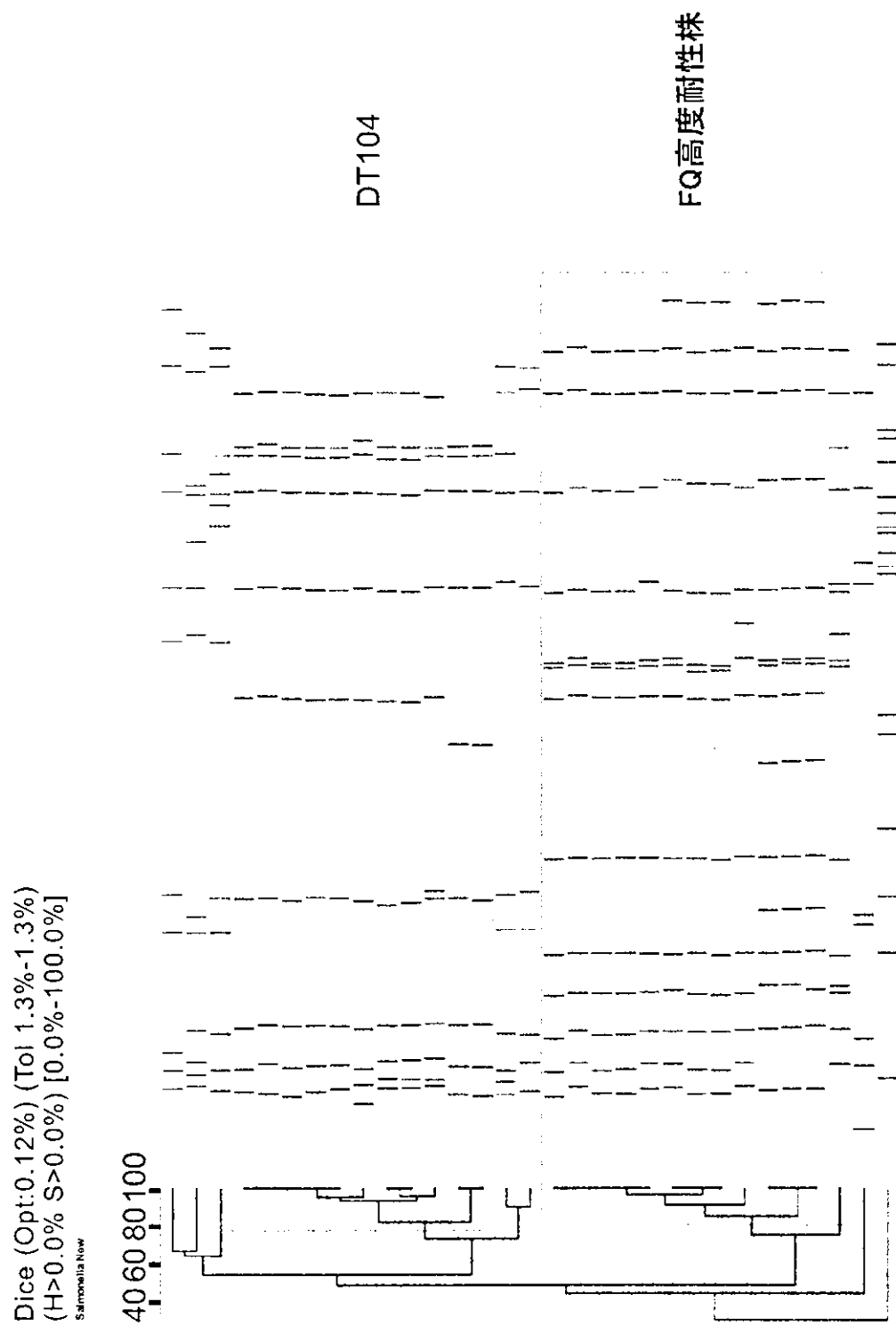


図5.FQ高度耐性*S. Typhimurium*株において同定されたインテグロンの構造(一部)



既知のデータベース上ではAY224185(4572bp)と一致。

表4.FQ高度耐性*S. Typhimurium*株の耐性遺伝子に関するPCR検索の結果

耐性パターン	DT	n	aac3	dhfrXII- aadA2	oxa30- aadA1	catA	tetRA
ヒト由来							
ACSSuT+GTpNCp	12/193	13	+	+	+	+	+
ACSSuT+NCp	12	4	-	-	+	+	+
ACSSuT+TpNCp	193	1	-	+	+	+	+
ACSSuT+N	104	1	-	-	-	-	-
非ヒト由来							
ACSSuT+GTpNCp	12/193	3	+	+	+	+	+
ACSSuT+NCp	12	2	-	-	+	+	+
ACSSuT+N	193	1	-	-	+	+	+

表5.ESBL産生性*S. Enteritidis*分離株の各種薬剤に対するMIC(mg/L)

		Cephalosporins						ESBL test			
		AM	CE	XM	CT	TX	CP	CT	NX	OF	
R	>256	>256	>256	>256	256	>256	>256	>16	1	0.125	
S	1	3	3	0.06	0.06	0.05		nt	nt		
		Cephamycins						Fluoroquinolones			
		AT	TZ	FX	CN	NA	CI	SO	NX	OF	
R	2	1.5	3	0.09	>256	0.19	0.25	0.032	0.094	0.19	
S	0.032	0.25	1.5	0.06	3	0.023	0.032	0.032	0.094	0.19	

2003年7月分離、R, 当該耐性株; S, 感受性対照株

AM, ampicillin; CE, cephalothin; XM, cefuroxime; CT, cefotaxime; TX, ceftriaxone; CP, cefoperazone; AT, aztreonam;

TZ, ceftazidime; FX, ceftazidime; CN, cefotetan; CTL, cefotaxime+clavulanic acid;

NA, nalidixic acid; CI, ciprofloxacin; SO, sparfloxacin; NX, norfloxacin; OF, ofloxacin

nt, not tested

表6. AmpC型β-ラクタマーゼ産生性サルモネラのMIC (mg/L)

Salmonella Typhimurium (ACSSuT+Tp+Ct)

AM	CE	XM	FX	CN	CT	AT	IP	CT	CTL
>256	>256	128	192	12	32	6	0.5	>16	>1.0

2003年2月分離

Salmonella Newport (ACSSuT+Ct)

AM	CE	XM	FX	CN	CT	AT	IP	CT	CTL
>256	>256	48	64	12	16	4	0.38	>16	>1.0

2003年9月分離

平成 16 年度厚生労働省食品の安全性高度化研究事業 分担研究報告書

課題名:食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究

分担課題:食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究

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
研究協力者	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所

研究要旨

近年、抗生剤の使用過多が原因と考えられる病原細菌の治療薬剤に対する耐性化の進行が問題となっている。そこで、耐性化の動向を把握するため、食品・ヒト由来サルモネラ及び腸管出血性大腸菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行った。

供試したヒト(散発下痢症例及び健康保菌者)由来サルモネラは 152 株で 31 血清型に型別された。薬剤耐性では 53 株(34.9%)が供試した 12 薬剤のいずれかに対して耐性を示した。治療現場で使用頻度の高いフルオロキノロン剤に対して耐性を示すサルモネラが 4 例分離された。また、市販鶏肉の汚染実態調査では、国産鶏肉 106 検体中 39 検体(36.8%)、外国産鶏肉 29 検体中 3 検体(10.3%)からサルモネラが分離され、そのすべてが 12 薬剤のいずれかに耐性を示した。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 78 株が分離され、血清型 O157:H7 が 57 株(73.1%)と最も多く分離された。薬剤感受性試験では 78 株中 18 株(23.1%)が供試した 12 薬剤のいずれかに耐性を示したが、第 3 世代セフェム系薬剤であるセフトキシム(CTX)やフルオロキノロン剤に耐性を示す株は分離されなかった。

A. 研究目的

近年、抗生剤の使用過多が原因と考えられる病原細菌の治療薬剤に対する耐性化の進行が問題となっている。代表的な食中毒細菌であるサルモネラの血清型 Typhimurium ファージ型 DT104 などの多剤耐性化、腸管出血性大腸菌 O26:H11 の第 3 世代セフェム系薬剤であるセフトキシム耐性菌の出現などは直接ヒトの治療に大きく影響するため、その耐性化の動向を監視することが急務である。

そこで、耐性化の動向を把握するため、食品・ヒト由来サルモネラ及び腸管出血性大腸菌を対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行う。

また集団事例が発生した際は、患者及び食品など原因物質の遡り調査を行い、汚染源を究明するとともに散発事例との関連を調査する。

B. 研究方法

埼玉県内で分離された散発下痢症例、集団食中毒事例及び健康保菌者由来のサルモネラを医療機関等の協力を得て広く収集した。市販鶏肉からのサルモネラ分離については、買い取りによる検体収集を行い、調査に供した。収集した菌株は血清型別、薬剤感受性試験を行い、必要に応じ PFGE 法による遺伝子型別も合わせて行った。特にヒトの下痢症治療において使用頻度の高いフルオロキノロン剤、第3、4世代セフェム剤に対する感受性を重点的に調査した。腸管出血性大腸菌においても同様に実施した。

C. 研究結果及び考察

(1) 散発事例由来サルモネラ

埼玉県内で 2004 年に散発下痢症患者及び食品従事者の検便検査などにおいて健康者から分離されたサルモネラの血清型別分離状況を表 1 に示した。分離された 152 株は 31 血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Enteritidis*(以下 SE)で次いで *S. Typhimurium*(以下 ST)、*S. Saintpaul* の順であった。鶏肉からの分離頻度が高い *S. Infantis* は 2 株しか分離されなかった。

この 152 株について薬剤感受性試験を米国臨床検査標準委員会 (NCCLS) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスク (センシディスク:BBL) を用いて行った。供試薬剤は、クロラムフェニコール(CP;30

μg)、ストレプトマイシン(SM;10 μg)、テトラサイクリン(TC;30 μg)、カナマイシン(KM;30 μg)、アミノペンジルペニシリン (ABPC;10 μg)、ナリジクス酸(NA;30 μg)、セフトキシム(CTX;30 μg)、シプロフロキサシン(CPFX;5 μg)、ゲンタマイシン(GM;10 μg)、ホスホマイシン(FOM;50 μg)、ノルフロキサシン(NFLX;5 μg)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(ST;25 μg)の 12 薬剤である。

供試した 152 株のうち 53 株 (34.9%) が 12 薬剤のいずれかに耐性を示した。最も多く分離された SE では 47 株のうち 26 株 (55.3%) が耐性を示し、SM 単剤耐性が 21 株と最も多く、ST では 19 株のうち 9 株 (47.4%) が耐性を示した。分離株の区分別耐性パターンを表 2 に示す。最も多かったのは SM 単剤耐性で 21 株が該当し、次いで NA 単剤耐性の 4 株であった。また 4 剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性株が 13 株分離された。特に CPFX や NFLX などフルオロキノロン剤に耐性を示す株が 4 例から分離された。その概要を表 3 に示した。血清型はすべて ST で、いずれも 6 薬剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。4 例中 3 例は治療後も再排菌しており、フルオロキノロン耐性菌に対する治療の難しさを改めて痛感させられた。この 4 例は、制限酵素 *BlnI* 処理後の PFGE 法による DNA 切断パターンの比較で同一あるいは非常に類似したパター

ンを示し(図1)、国立感染症研究所細菌部で実施したファージ型別でも全てDT193となったため、担当医師を通じて聞き取り調査を行った。その結果、共通する食品の存在は確認できなかったが、事例No.2および事例No.4の2例についてはペットが関与した可能性が示唆された。いずれの患者も発症する前にペットが下痢を発症していた。特に事例4については、出生直後の乳児であり、退院して帰宅するまで何ら異常を認めていなかった。しかし、この乳児が帰宅する1週間前から室内で飼育していた2頭のマルチーズのうち1頭が水様性の下痢をしていた。帰宅して4日後にこの乳児は不明熱で再入院となり、入院時の検便からフルオロキノロン耐性STが分離された。乳児の入院後に母親の検便を行ったが、当該菌は分離されなかった。また、2頭のマルチーズの検査は、その関与が不明であったため、50日後に行われたが、当該菌を分離することはできなかった。しかし、この検便で2頭のいずれからもフルオロキノロン剤を含む多剤耐性大腸菌O153:HUTおよびO78:H18が分離され、その飼育環境に耐性化を進行させる何らかの要因があることが示唆された。

(2) 鶏肉由来サルモネラ

2004年に実施した市販鶏肉(国産)の汚染実態調査では106検体中39検体(36.8%)からサルモネラが分離された。血清型は全てInfantisで

あった。分離された39株の薬剤感受性試験の結果を表4に示す。39株全てが供試した12薬剤のいずれかに耐性を示した。多く認められた耐性パターンはSM・TC・SXTが17株(43.6%)、SM・TCが9株(23.1%)、SM・TC・KM・SXTが8株(20.5%)などであった。ヒト由来血清型Infantisは2株分離されているが、1株がSM・TC・KMという鶏肉由来株に似た耐性パターンを示し、その関連性が示唆された。

外国産鶏肉では29検体中3検体(10.3%)からサルモネラが分離され、その血清型は*S. Infantis*が1株、*S. Saintpaul*が2株であった。薬剤感受性試験の結果、3株とも3剤以上の薬剤に耐性を示し、キノロン剤であるNAに耐性を示した(表5)。一般的にNA耐性菌はフルオロキノロン剤に対して高度耐性を獲得する可能性が高く、今回も1株がシプロフロキサシンに対して低感受性を示していたことから、今後ともその動向に注意する必要があると考えられた。

(3) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で2003年に散発下痢症患者及び食品従事者の検便検査などにおいて健康者から分離された腸管出血性大腸菌の血清型別分離状況を表6に示した。分離された78株で最も多く分離された血清型は、O157:H7(VT1&2産生)が36株、次いでO157:H7(VT2産生)の21株であった。分離78株の薬剤感受性試験の結果、供試した12薬剤のいずれかに耐

性であったのは 18 株 (23.1%)であった (表 7)。NA 耐性の O157:H7 はフルオロキノロン剤である CFX と NFLX に低感受性であった

E. 結論

ヒト由来サルモネラでは、前年に 3 例のフルオロキノロン耐性 ST が分離されたが、今回も 4 例の ST が分離され、患者の治療後における再排菌率も高かった。その感染経路は特定できなかったが、ペットの関与が強く疑われた事例が 2 例あり、ヒトへのサルモネラ感染の制御には、食品の汚染状況とともにより広い宿主

に対してもサーベイランスを行うことが重要だと考えられた。

F. 研究発表

著者：近 真理奈、倉園貴至、大島 まり子、山口正則、森田耕司、渡辺 登、金森政人、松下 秀

題名：2005. 下痢症患者から分離された cefotaxime 耐性志賀毒素産生性 O26:H11 について」

発表誌名：感染症誌 Vol.79, No.3, 161-168.

G. 知的財産権の出願・登録状況なし

表 1 ヒトから分離されたサルモネラの血清型(2004)

O血清型	血清型名	国内		海外	計
		有症者	無症者		
O2	<i>S. Paratyphi A</i>			5(3)	5(3)
	<i>S. Paratyphi B</i>	1	2		3
	<i>S. Stanley</i>	4			4
	<i>S. Schwarzengrund</i>	4(3)	1		5(3)
O4	<i>S. Saintpaul</i>	8	5(1)		13(1)
	<i>S. Agona</i>	6	1		7
	<i>S. Typhimurium</i>	18(9)	1		19(9)
	<i>S. Heidelberg</i>	1			1
	O4UT	1	2		3
	<i>S. Braenderup</i>	3(3)			3(3)
	<i>S. Rissen</i>			1(1)	1(1)
	<i>S. Montevideo</i>	2	1(1)		3(1)
O7	<i>S. Oranienburg</i>	1			1
	<i>S. Thompson</i>	3	2(1)		5(1)
	<i>S. Virchow</i>	1	2(1)		3(1)
	<i>S. Infantis</i>		2(1)		2(1)
	<i>S. Bareilly</i>	2			2
	O7UT		1		1
	<i>S. Nagoya</i>	4	1		5
O8	<i>S. Manhattan</i>	1(1)			1(1)
	<i>S. Newport</i>	2(1)			2(1)
	<i>S. Corvallis</i>		2(1)		2(1)
O9	<i>S. Typhi</i>			3	3
	<i>S. Enteritidis</i>	40(20)	7(6)		47(26)
	<i>S. Anatum</i>	2	1		3
O3, 10	<i>S. London</i>		2		2
	<i>S. Weltevreden</i>		1		1
O1, 3, 19	<i>S. Senftenberg</i>		1		1
O16	<i>S. Hvitvingfoss</i>		1		1
O40	O40 UT	1			1
O UT	UT	2			2
計		107(37)	36(12)	9(4)	152(53)

(): 薬剤耐性株数

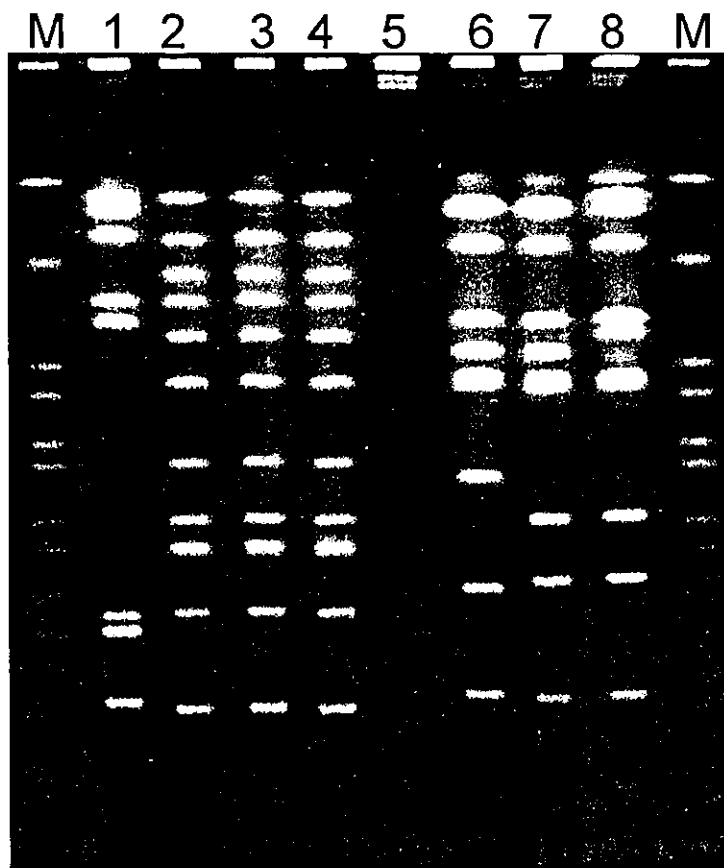
表2 ヒトから分離されたサルモネラの薬剤耐性パターン(2004)

	国内		海外有症者	計
	有症者	無症者		
供試菌株数	107	36	9	152
耐性株数	37	12	4	53
(%)	34.6%	33.3%	44.4%	34.9%
薬剤耐性パターン				
SM	17	4		21
TC	1			1
ABPC		1		1
NA	2	2		4
FOM			1	1
SM・TC	2	1		3
TC・KM	3			3
ABPC・NA		1		1
NA・FOM			2	2
CP・SM・TC		1		1
SM・TC・KM		1		1
SM・ABPC・NA	1			1
CP・SM・TC・ABPC	2			2
SM・TC・ABPC・NA	1			1
SM・TC・ABPC・ST			1	1
CP・SM・TC・KM・ST		1		1
SM・KM・ABPC・NA・GM・ST	2			2
SM・TC・KM・ABPC・NA・GM・ST	2			2
CP・SM・TC・ABPC・NA・CPFX・NFLX・ST	1			1
CP・SM・TC・ABPC・NA・CPFX・GM・NFLX・ST	3			3
計	37	12	4	53

CP:クロラムフェニコール, SM:ストレプトマイシン, TC:テトラサイクリン, KM:カナマイシン
 ABPC:アンピシリン, NA:ナリジクス酸, CTX:セフトキシム, CPFX:シプロフロキサシン
 GM:ゲンタマイシン, FOM:ホスホマイシン, NFLX:ノルフロキサシン, ST:ST合剤

表 3 埼玉県内のフルオロキノロン耐性 *Salmonella* 分離例(2004)

No.	血清型名	性別	年齢	菌分離日	耐性パターン	ファージ型	備考
1	Typhimurium	女	68	5/14他	CP・SM・TC・ABPC・NA・ CPFX・GM・NFLX・SXT	DT193	
2	Typhimurium	男	48	6/18	CP・SM・TC・ABPC・NA・ CPFX・GM・NFLX・SXT	DT193	
3	Typhimurium	女	2	6/30他	CP・SM・TC・ABPC・NA・ CPFX・GM・NFLX・SXT	DT193	
4	Typhimurium	女	0	10/26他	CP・SM・TC・ABPC・NA・ CPFX・NFLX・SXT	DT193	



Bln I 処理

図 1 フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* のPFGEパターン

M: *S. Braenderup* H9812株

1: Sa04014(フルオロキノロン剤感受性)

2: Sa04048(フルオロキノロン剤耐性)

3: Sa04069(フルオロキノロン剤耐性)

4: Sa04087(フルオロキノロン剤耐性)

5: Sa04088(フルオロキノロン剤感受性)

6: Sa04096(フルオロキノロン剤感受性)

7: Sa04173(フルオロキノロン剤感受性)

8: Sa04206(フルオロキノロン剤感受性)

表4 国内産鶏肉由来サルモネラの血清型と薬剤耐性パターン

血清型(株数)	薬剤耐性パターン	菌株数
S. Infantis(39)	TC	3
	SM・TC	9
	SM・SXT	1
	SM・TC・SXT	17
	SM・TC・KM・SXT	8
	SM・TC・KM・NA・SXT	1

国産鶏肉106検体 / 39検体(36.8%)サルモネラ陽性