

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17年度総括・分担研究報告書

及び

平成15～17年度総括・総合研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業)

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の安心・安全確保推進研究事業

1. 平成 17 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 17 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研究……………7

分担研究者 泉谷 秀昌 国立感染症研究所

研究協力者 寺嶋 淳 "

田口 真澄 大阪府立公衆衛生研究所

(II) 食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究……………19

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 "

大塚佳代子 "

(III) 食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究……………33

分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

研究協力者 横山 敬子 "

小西 典子 "

矢野 一好 "

諸角 聖 "

(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……………43

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 "

岡田由美子 "

山崎 学 "

石和 玲子 "

(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……………51

分担研究者 高橋 敏雄 農林水産省動物医薬品検査所

協力研究者 鮫島 俊哉 "

浅井 鉄夫 "

小島 明美 "

原田 和紀 "

(VI) 家畜由来 *Salmonella* Typhimurium の多剤耐性化の誘因及び耐性化機構の解明……66

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 秋庭 正人 "
鮫島 俊哉 農林水産省 動物医薬品検査所
吉井 紀代 農業・生物系特定産業技術研究機構
動物衛生研究所

3. 研究発表一覧……………76

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金食品の安全・安全確保推進研究事業
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 国立感染症研究所副所長

研究要旨：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。*Salmonella* Typhimuriumの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類似性が見いだされた。共通の起源が示唆された。カンピロバクターでは、フルオロキノロンの耐性率はかなり高い耐性率を示した。動物への薬剤の不使用に関わらず、フルオロキノロン耐性株が出現する場合が認められた。環境汚染等のことも考慮する必要がある。人、家畜、および食由来のサルモネラとカンピロバクターの各種性状を詳細に比較解析することにより、断片的ではあるが、人—食肉—家畜との間の関連が明らかとなった。今後、food-chainにおける耐性株の低減に向けた取り組みへと繋げていく必要がある。

分担研究者：

中澤宗生：独法農技研動物衛生研究所
高橋敏雄、鮫島俊哉：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

サルモネラ、カンピロバクターは食中毒の原因菌の主たるものである。それらの菌の多剤耐性化が世界的に拡大してきている。耐性菌による感染症を治療するに当たり、患者の治療に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がどの程度耐性菌を選択し、かつ食物連鎖を介してヒトに耐性菌がどれほど伝播しているのか。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。その大命題に対する科学的評価を行うための疫学的および遺伝学的データを得ることが本研究班の大きな目的である。家畜等、食肉、および食中毒に罹患した患者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。また特定農場での薬剤の使用状況、家畜から分離される菌の耐性化状況について個別追跡調査を行う。更に家畜由来株と患者由来株に関して分子遺伝学的手法を用い詳細に解析し、その耐性遺伝子および耐性菌の関連性を解明する。動物由来耐性株がヒト医療に及ぼす影響に関するリスク評価を行うために必要なデータを蓄積する。その結果を行政的対策に生かすことにより、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に資するようにする。当研究班の特色は、農場から食卓およびヒトへの感染の過程における耐性菌の出現状況を、省庁の壁を越えて連携し

ータを集めることにある。そのために、農林水産省関連研究組織から、農林水産省動物医薬品検査所、(独法)農技研動物衛生研究所、厚生労働省関係からは国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所および地方衛生研究所が参加している。

B. 研究方法

1) H16年度と同様に、家畜、食品及び患者由来のサルモネラ、カンピロバクターの分離菌株の血清型、生化学的性状、ファージ型、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(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, or ABPC)、ストレプトマイシン系(S, or SM, DSM)、テトラサイクリン系(T, or TC, OTC)、シプロフロキサシン(Cip, or CFX)、カナマイシン(K, or KM)、セフトキシム(Ctx, or CTX)、クロラムフェニコール(C, or CM)、ST合剤(Sx, or SXT)、トリメトプリム(Tp, or TMP)、ゲンタマイシン(G, or GM)、ナリジクス酸(N, or NA)、サルファ剤(Su)、ホスホマイシン(F, or FOM)等であった。分離菌の遺伝学型をPFGE等の分子疫学的方法を用いて解析し、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、遺伝学的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。耐性遺伝子を含む領域の全塩基配列を調べ比較検討する。

2) 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

準じて実施した。泳動条件は6V, 14℃, ランプ時間2.2-63.8秒で約19時間泳動した。

3) 薬剤耐性遺伝子のクローニング: 耐性株のゲノムDNAを調製し、これをEcoRI, PstI等の制限酵素で切断した。同酵素で切断したベクター(pUC, pSTVなど)を用いてライゲーションを行い、該当する薬剤を含むLBプレート上にて選択した。得られたプラスミドに対して、ベクター上の配列をもつプライマーを用いて塩基配列の決定を行い、相同性検索を行った。

C. 各分担者の研究結果概要

1. カンピロバクターの疫学、解析

1) 輸入鶏肉からのカンピロバクターの分離状況

ブラジル、タイ、中華人民共和国、米国およびマレーシアから輸入された鶏肉からカンピロバクター、*C. jejuni* または *C. coli* のいずれか一方、あるいはその両方が検出されたのは、ブラジル産 56.7%、タイ産 61.5%、中華人民共和国産 16.7%、米国产 20.0%であった。

2) 輸入鶏肉由来カンピロバクターの薬剤耐性

輸入鶏肉から分離された *C. jejuni* 17株の薬剤感受性試験は、いずれかの薬剤耐性であったのは13株(76.5%)、フルオロキノロン系薬剤耐性株は8株(47%)であった。原産国別耐性率は、中華人民共和国および米国 各 100%、ブラジル産 72.7%、タイ産 66.7%であった。フルオロキノロン系薬剤耐性株は中華人民共和国産 2株(100%)、タイ産 2株(66.7%)、ブラジル産 4株(36.4%)であった。*C. coli* は供試した10株(ブラジル産 5株、タイ産 4株、中華人民共和国産 1株)全てが薬剤耐性菌で、いずれもフルオロキノロン系

薬剤に耐性であった。

3) 国産鶏肉由来カンピロバクターの薬剤耐性

国産鶏肉から分離された *C. jejuni* 235 株のうち、いずれかの薬剤に耐性であったものは 137 株 (58.3%) であり、フルオロキノロン系薬剤耐性株は 74 株 (31.5%) であった。一方 *C. coli* 29 株中、耐性株は 24 株 (82.8%) であり、*C. jejuni* と比較して耐性は高かった。フルオロキノロン系薬剤に対する耐性率も 41.4% と高かった。

4) ヒト由来株の薬剤感受性

1997 年～2004 年に東京都内で散発下痢症患者から分離された *C. jejuni* 1314 株についての薬剤感受性試験; 年次別耐性菌出現率は 34% (1997 年), 31.1% (1998 年), 50.4% (1999 年), 54.6% (2000 年), 63.5% (2001 年), 49% (2002 年), 43.5% (2003 年), 51.8% (2004 年) であり、毎年 30～60% で推移していた。フルオロキノロン系薬剤に対する耐性率は、毎年 30% 前後であり、2001 年および 2004 年が 39.4% と最も高かった。治療の第一選択薬である 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。

5) EM 耐性株の遺伝子変異と交差耐性

人のカンピロバクター症の第一選択薬である EM についての感受性を調べたところ、年次を問わず豚由来の *C. coli* が 50% 前後の高い耐性率を示したが、他の畜種から分離された *C. jejuni* には全く耐性株はみられなかった。PCR-RFLP 法により解析した結果、すべての EM 耐性 *C. coli* 株は 23SrRNA 遺伝子上に同一の点変異 (2075A→G) を有していた。一方、EM 感受性株には変異は認められなかった。さらに EM 耐性株は感受性株と比較して、他のマクロライド系薬剤に対

して高い MIC 値を示したことから、交差耐性を示すことが明らかになった。

2. サルモネラの疫学、解析

1) サルモネラの由来畜種別薬剤感受性状況 (1999-2004)

1999-2004 年に分離されたサルモネラについて各薬剤に対する感受性状況を由来畜種別に比較した結果、牛由来株に耐性株が多く見られた。薬剤別では、DSM 及び OTC に対しては、牛、ブロイラー由来株がいずれも 70% 以上の高い耐性率を示しており、豚由来株にも 50% 以上の耐性が見られた。その他に牛由来株では ABPC 及び CP 耐性が、ブロイラー由来株では KM 及び TMP 耐性が高いことが特徴的であった。

2) *S. Enteritidis* (SE) のフェージタイプの年次別分布状況

SE のフェージタイプは年次を追うごとに変化し、多岐にわたる傾向が見られた。畜種別では牛由来株に PT8 が 7/16 株と比較的多くみられたが、鶏由来株では全く検出されなかった。分離株の大半を占める鶏由来株では 1989-1999 年に分離された 17 株において 3 種類のフェージ型が決定され、PT1 が 7 株、PT4 が 4 株と優勢であった。しかし、2000-2004 年に分離された 21 株については 9 種類のフェージ型が決定され、鶏に分布する SE のフェージタイプの多様化が認められた。

3) SE の薬剤耐性状況

SE の薬剤感受性状況を由来畜種別に比較すると、鶏由来株で DSM 耐性株が 55% と高いものの、牛由来株でより多くの薬剤に対する耐性株がみられた。CEZ 及び ERFX に対する耐性株は認められなかった。さらに薬剤耐性パターンと分離年次の相関について検討したところ、3 剤耐性以上の多剤耐性株はすべて 1976-1982 年分離の牛由来株であり、その他の畜種も含めて年次

を追うごとに多剤耐性株は減少傾向にあると考えられた。

4) セフトキシム耐性 *S. Infantis*

昨年の報告書にも記したように、近年、AmpC 型 β -ラクタマーゼを産生し、セフトキシムに耐性（もしくは中間）を示すサルモネラの報告が主として米国等で相次いでいる。2004 年～2005 年にかけて大阪府内で入手した鶏肉 83 検体中 29 検体からサルモネラを分離した。このうち *S. Infantis* が 21 あり、薬剤感受性試験の結果、2 株が CTX 耐性を示した。本菌株の耐性はクラブラン酸によって阻害されないことから AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生が疑われ、実際同型の一種である CMY-2 型 β -ラクタマーゼ遺伝子が同定された。

5) フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* の事例

2003 年、2004 年に引き続き CPFX や NFLX などフルオロキノロン剤に耐性を示す株が 1 例から分離された。血清型は *S. Typhimurium* で、供試した 12 薬剤中 9 薬剤に対して以耐性を示した。この *S. Typhimurium* が分離された患者は生後 11 ヶ月の乳児で、下痢・発熱を主訴として入院していた。聞き取り調査を行った結果、生もの、生卵などの摂取歴はなく、同居家族内での下痢・発熱もなかった。しかし、父親が自宅で動物病院を開業し、輸血犬として、室内で犬（種類：ポインター）を飼育していたこと、犬と子供の生活の場は区切っていたが、生後 10 ヶ月頃から子供が犬に触れる機会が増えていたこと、患者が発症する前に一度犬が下痢をしていたことが判明した。そこで、家族の検便とともに飼育している犬の検便を行った。その結果、患者と同じ薬剤耐性パターンを示す *S. Typhimurium* が分離され、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 1 本のバンドの相違しか認められない非常に類似したパターンを示し、国立感染症研究所細菌部で実施したファージ型別でも患者株と同じ DT193 となった。発症時期から犬から子供に感染した可能性が高かった。犬の感染原因は不明であったが、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。

3. 腸管出血性大腸菌の疫学、解析

1) EHEC 耐性株の分布

2005 年に送付された EHEC 菌株から 220 株を抽出し薬剤感受性試験を行った。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 64%であった。次いで耐性パターン (R-) A、R-ASSu、R-STSu、が全体の 6%から 8%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 2 株 (R-F、R-SSuF が各 1 株) 検出された。これまでの感受性試験の結果を併せ、ヒトおよびヒト以外 (非ヒト) の由来で比較をした結果、耐性率および耐性パターンに大きな差異は観察されなかった。

2) EHEC 耐性株における耐性遺伝子の分布

これまでの EHEC 耐性株の耐性パターンの分布状況から R-STSu を含む耐性パターンが大勢を占める状況がうかがえた。R-STSu を含む耐性パターンを示した 65 株について耐性遺伝子の分布状況を調べた。クラス 1 インテグロンの存在状況を調べた。その結果、65 株中陽性株は 2 つのみであった。検出されたインテグロンの構造をシーケンズにより解析したところ、[*dfrA17* + *aadA5*] および [*dhfr12* + *orfF* + *aadA2*] という構造を有しており、これらは共にトリメトプリ

ム+ストレプトマイシン耐性を担っていることが判明した。上記65株中、39株はアンピシリンに対しても耐性を有し、TEM型β-ラクタマーゼ遺伝子であった。一方、テトラサイクリン耐性に関しては *tetA* 遺伝子のクラス A, B, D, E, G に対してPCRで検索したところ、クラスAおよびBがほぼ半数ずつ検出され、この2クラスで97% (63/65) を占めた。この2クラスは0157および026ではほぼ均等に検出された。また、*tetG* および *tetAv* も091 および074において1株ずつ検出された。

D. 考察

統一した検査法を用い、市販鶏肉分離株の耐性状況を明らかにし、市販鶏肉の冷蔵品では、72%、冷凍品では37%が、カンピロバクターに汚染されている。この汚染率は国内の市販鶏肉の一般的な値と見なすことが出来る。冷凍品からの分離率が低いのは、カンピロバクターが凍結に弱い菌であり、凍結融解により多くの菌が死滅したことによると思われる。むしろ、凍結鶏肉から4割近い割合でカンピロバクターが分離されたのは予想以上の汚染率であった。

市販鶏肉では、調べた7薬剤の内4剤以上の耐性株が約38%みられ、この傾向は、散发性下痢症分離株の耐性獲得状況とほぼ同じであった。ニューキノロン系の薬剤を中心として、カンピロバクターの耐性率が高いことが確認された。臨床分離株と、市販鶏肉分離株でほぼ同様な割合で、耐性株が認められたことは、鶏肉を汚染しているカンピロバクターの耐性獲得は、急性のカンピロバクター胃腸炎の原因となるカンピロバクター耐性に直接的に影響を与えていると言える。ただ、多剤耐性のパターンが、市販鶏肉由来

株と、臨床由来株でやや異なっていたことは興味深い。即ち、臨床分離株では、NFLX、OFLX、CPFX、NAの4剤耐性株と、これにTCを加えた5剤耐性株がほぼ同数分離されているが、鶏肉分離株では、同様な5剤耐性株は、4剤耐性株よりかなり少なく、3分の1以下であった。

特に輸入鶏肉由来では、フルオロキノロン系薬剤に対する耐性率が高く47%であった。耐性率は原産国により差が認められたが、供試菌株数が少ないため本成績が必ずしもその国の耐性菌出現傾向を示しているとは限らない。今後は更に供試菌株数を増やして検討していく必要がある。*C. jejuni* および *C. coli* の耐性菌出現率を比較すると、国産および輸入に関わらず *C. coli* は *C. jejuni* に比べて耐性率が高かった。ヒト由来株および食品由来株については汚染実態調査も含め、耐性菌出現状況を的確に把握し、耐性菌出現の要因についても精査する必要がある。

全国健康家畜の糞便から1999年～2004年に分離されたサルモネラについて、その薬剤感受性状況を畜種別に比較したところ、採卵鶏では耐性株は少なかったが、牛、ブロイラーでは多くの薬剤に対して耐性株が確認され、豚においてもやや耐性率は低下するものの同様の傾向であった。なかでも、DSM、OTCに対しては牛、ブロイラー由来株の70%以上が耐性を示しており、これらの薬剤が動物用医薬品あるいは飼料添加物として広く用いられていることを考慮すると、薬剤使用と耐性菌出現の相関について今後さらに検討を進める必要があると考えられた。しかし、一方では牛から高率に分離されるABPC、CP耐性株、ブロイラー由来株に特徴的なKM、TMP耐性株

については、例えば牛では多剤耐性 *S. Typhimurium* DT104 が、ブロイラーでは *S. Infantis* の分離率が高いなどの他の要因の関与もあることから、耐性菌の出現・伝播様式の解明には様々な要因を加味した総合的な解析が必要であると考えられた。

健康家畜由来カンピロバクターの薬剤感受性動向についても、サルモネラと同様に OTC, DSM 耐性株が高率に分離された。しかし、カンピロバクターでは豚由来の *C. coli* が他の畜種由来の *C. jejuni* と比較して、より多剤耐性化傾向にあった。なかでも 70-80% と高率に耐性株が分離されたテトラサイクリンは豚では動物用医薬品及び飼料添加物として多量に使用されており、使用量と耐性菌出現の相関についてさらなる検討が必要であると考えられた。一方、人のカンピロバクター症に対する第一次選択薬である EM については、人のカンピロバクター食中毒の主要起因菌である *C. jejuni* では全ての菌株が感受性を示しており、治療効果が期待できる状況にあることが明らかになった。*C. coli* については食中毒への関与は現時点では低いとされているが、豚由来株では EM 耐性株が比較的高率に分離されることから、23SrRNA 上の遺伝子変異の有無について検討したところ、今回分離された EM 耐性 *C. coli* 44 株全てが 2075 位のアデニンがグアニンに変異しており、EM 耐性株の遺伝学的均一性が窺われた。EM 感受性 *C. coli* 28 株では変異は確認されなかった。今回変異が確認された *C. coli* は他のマクロライド系抗菌剤に対しても交差耐性を示しており、今後の動向に注目して、モニタリングを継続する必要があると考えられた。

E. 結論

1) *Salmonella* Typhimurium の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類似性が見いだされた。共通の起源が示唆された。

2) *Campylobacter* のフルオロキノロンの耐性率はベルギー、スペイン等に比べると低いものの、調査する年度によってははか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ので、さらなる継続的調査により経過を追跡する必要がある。

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、動物への薬剤の不使用に関わらず、フルオロキノロン耐性株が出現する場が認められた。環境汚染等のことも考慮する必要がある。人、家畜、および食由来のサルモネラとカンピロバクターの各種性状を詳細に比較解析することにより、断片的ではあるが、人一食肉一家畜との間の関連が明らかとなった。今後、food-chain における耐性株の低減に向けた取り組みへと繋げていく必要がある。

H. 研究発表

刊行一覧は別紙に掲載。

平成 17 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業

「食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究」

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研究

分担研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所 感染症部細菌課

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が、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。また腸管出血性大腸菌感染症は 3 類感染症に指定されており、これは主としてウシガリザーバーとなっていると考えられている。そこで本研究ではこれらの菌種を扱い、殊に多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium を中心に、ヒトおよび非ヒト由来株を解析する。

A. 研究目的

2004 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 12,475 名であった。このうち、30%にあたる 3,695 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が、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。同じく *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*、以下 ST) は、SE 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。ST は現在でもなお、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、2004 年の患者数は 3,643 名にのぼる (2005 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目指す。

(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じ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医薬品検査所等の協力によ

り得られたサルモネラおよび EHEC を使用した。

2. 薬剤感受性試験: BBL 社のセンシディスクを用いて、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 (Ct)、クロラムフェニコール (C)、ST 合剤 (Sx)、トリメプリーム (Tp)、ゲンタマイシン (G)、ナリジクス酸 (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. ファージ型別: 英国 PHLS より分与された型別用ファージを使用して標準法に従って型別を行った。

4. 薬剤耐性遺伝子のクローニング: 耐性株のゲノム DNA を調製し、これを EcoRI, PstI 等の制限酵素で切断した。同酵素で切断したベクター (pUC, pSTV など) を用いてライゲーションを行い、該当する薬剤を含む LB プレート上にて選択した。得られたプラスミドに対して、ベクター上の配列をもつプライマーを用いて塩基配列の決定を行い、相同性検索を行った。

C. 研究結果

1. EHEC 耐性株の分布

当部に 2005 年に送付された EHEC 菌株から 220 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 64%であった。次いで耐性パターン(R-)A、R-ASSu、R-STSu、が全体の 6%から 8%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 2 株(R-F、R-SSuF が各 1 株)検出された。これまでの感受性試験の結果を併せ、ヒトおよびヒト以外(非ヒト)の由来で比較をした結果、耐性率および耐性パターンに大きな差異は観察されないとされた(図 2)。

2. EHEC 耐性株における耐性遺伝子の分布

これまでの EHEC 耐性株の耐性パターンの分布状況から R-STSu を含む耐性パターンが大勢を占める状況がうかがえた(図 3)。このことから、2003 年までの EHEC 株のうち、R-STSu を含む耐性パターンを示した 65 株について耐性遺伝子の分布状況を調べた(表 1)。手法は PCR によるものである。

これらの株はサルファ剤耐性を有して

おり、サルモネラでは多剤耐性 DT104 など示されているようにサルファ剤とクラス 1 インテグロンが関連していることから、クラス 1 インテグロンの存在状況を調べた。その結果、65 株中陽性株は 2 つのみであった。検出されたインテグロンの構造をシーケンスにより解析したところ、[*dhfrA17* + *aadA5*]および[*dhfr12* + *orfF* + *aadA2*]という構造を有しており、これらは共にトリメトプリム+ストレプトマイシン耐性を担っていることが判明した。

上記 65 株中、39 株はアンピシリンに対しても耐性を有していた。そこで、同薬剤に対する耐性遺伝子として最も一般的な TEM 型 β -ラクタマーゼ遺伝子を検出する PCR を実施したところ、全て陽性であった。

一方、テトラサイクリン耐性に関しては *tetA* 遺伝子のクラス A,B,D,E,G に対して PCR で検索したところ、クラス A および B がほぼ半数ずつ検出され、この 2 クラスで 97%(63/65)を占めた。この 2 クラスは O157 および O26 ではほぼ均等に検出された。また、*tetG* および *tetAv* も O91 および O74 において 1 株ずつ検出された(なお、*tetAv* 遺伝子の検出は、クローニングによる塩基配列解析によるものである)(表 2)。

3. SE 耐性株の分布

当部に送付された SE 菌株のうち 2005 年に発生した集団事例 27 件について、その関連株の感受性試験を行った。図 4 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 78%であった。次いで R-S が 19%を占めた。

4. セフトキシム耐性サルモネラ

昨年の報告書にも記したように、近年、AmpC 型β-ラクタマーゼを産生し、セフトキシムに耐性(もしくは中間)を示すサルモネラの報告が主として米国等で相次いでいる。2004 年～2005 年にかけて大阪府内で入手した鶏肉 83 検体中 29 検体からサルモネラを分離した。このうち *S. Infantis* が 21 あり、薬剤感受性試験の結果、2 株が CTX 耐性を示した。これらのセフェム系抗菌薬に対する MIC 等は表 3 に示すとおりである。本菌株の耐性はクラブラン酸によって阻害されないことから AmpC 型 β-ラクタマーゼ産生が疑われ、実際同型の一種である CMY-2 型 β-ラクタマーゼ遺伝子が同定された。

D. 考察

本研究の結果から、EHEC および SE では感受性株がなお大勢を占める中で、耐性株が一部検出された。EHEC ではホスホマイシン耐性株も含まれていた。

EHEC の主要な耐性パターンの一つに R-STSu があり、これは株の由来(ヒト、非ヒト)によらないことが示唆された。このパターンを含む耐性型の株ではテトラサイクリン耐性に関して *tetA* 遺伝子のクラス分けによって、さらにクラス A および B に大別できることが明らかとなった。

また、鶏肉由来の *S. Infantis* 分離株において、これまで報告のなかった CTX 耐性株が見つかり、CMY-2 型の β-ラクタマーゼ耐性遺伝子を有することが明らかにされた。

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。サルモネラ感染症および EHEC 感染症は動物由来感染症の代表的なものである。EHEC においてヒトおよびヒト以外の由来を持つ株から同程度に耐性菌が検出されている状況や、これまで報告のなかった鶏肉由来 *S. Infantis* 株での CTX 耐性などの結果は、より広い材料を対象にサーベイランスを行うことが重要であることが改めて

示唆された。

F. 健康危険情報

主要な食材である鶏肉に由来するサルモネラ(特に *S. Infantis*)に対しても耐性獲得の傾向に注意が必要である。

G. 研究発表等

(1) H. Izumiya, K. Mori, M. Higashide, K. Tamura, N. Takai, K. Hirose, J. Terajima, and H. Watanabe: Identification of CTX-M-14 β -lactamase in a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolate from Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 49 (6), 2568-2570, 2005.

(2) H. Izumiya, K. Mori, T. Kurazono, M. Yamaguchi, M. Higashide, N. Konishi, A. Kai, K. Morita, J. Terajima, and H. Watanabe: Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in Japan. J. Clin. Microbiol. 43 (10), 5074-5079, 2005.

(3) 石畝史、京田芳人、望月典郎、

布施田哲也、重屋志啓盛、泉谷秀昌、渡辺治雄：多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar Newport における患者由来株と下水由来株との比較検討。感染症学雑誌、第 79 巻、270-275、2005。

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だいた全国の地方衛生研究所、動物医薬品検査所、動物衛生研究所等の諸先生方に深謝いたします。

図1. EHEC薬剤耐性パターンの分布状況(2005, n=220)

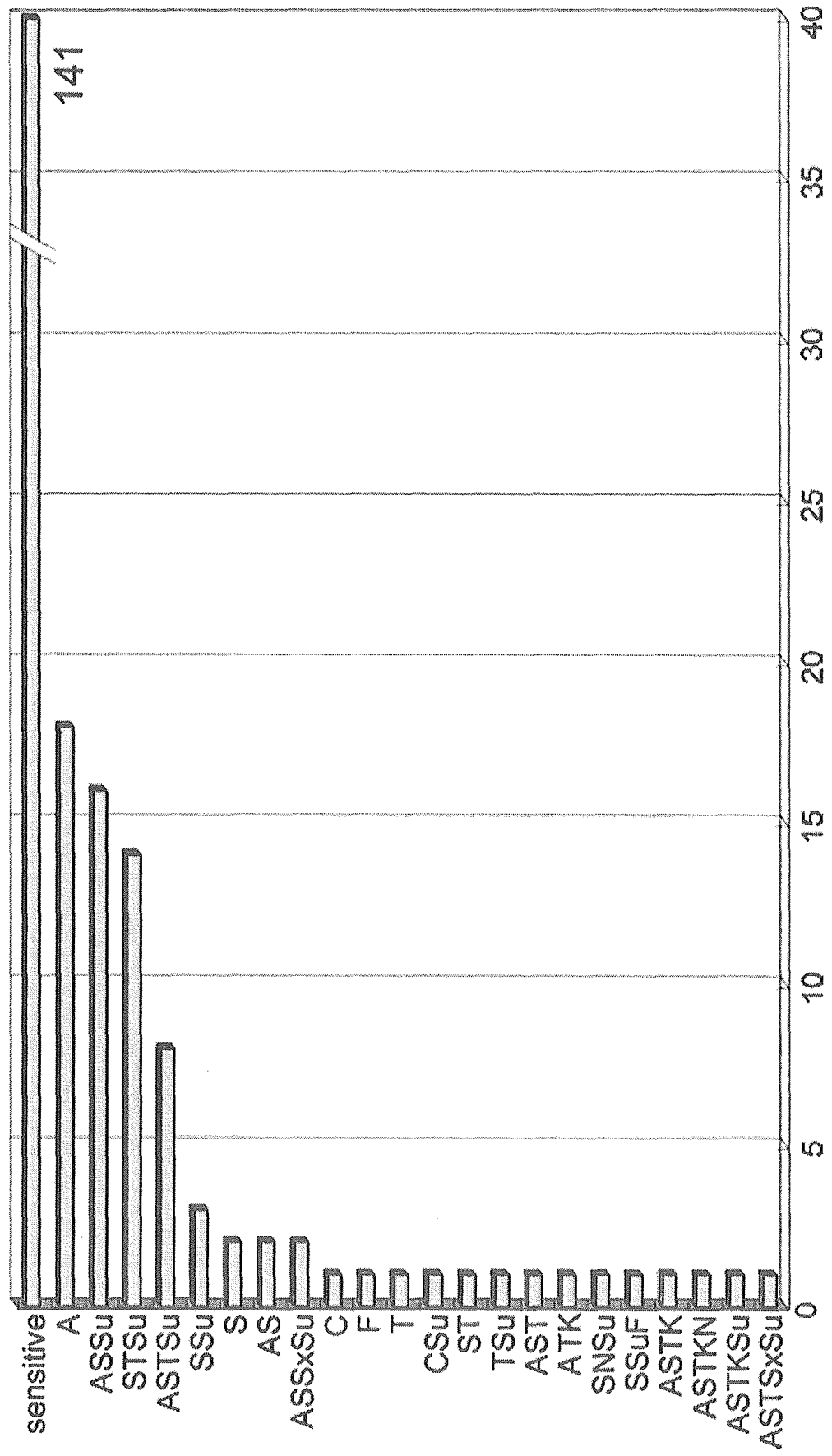


図2. EHEC薬剤耐性(2001-2005)

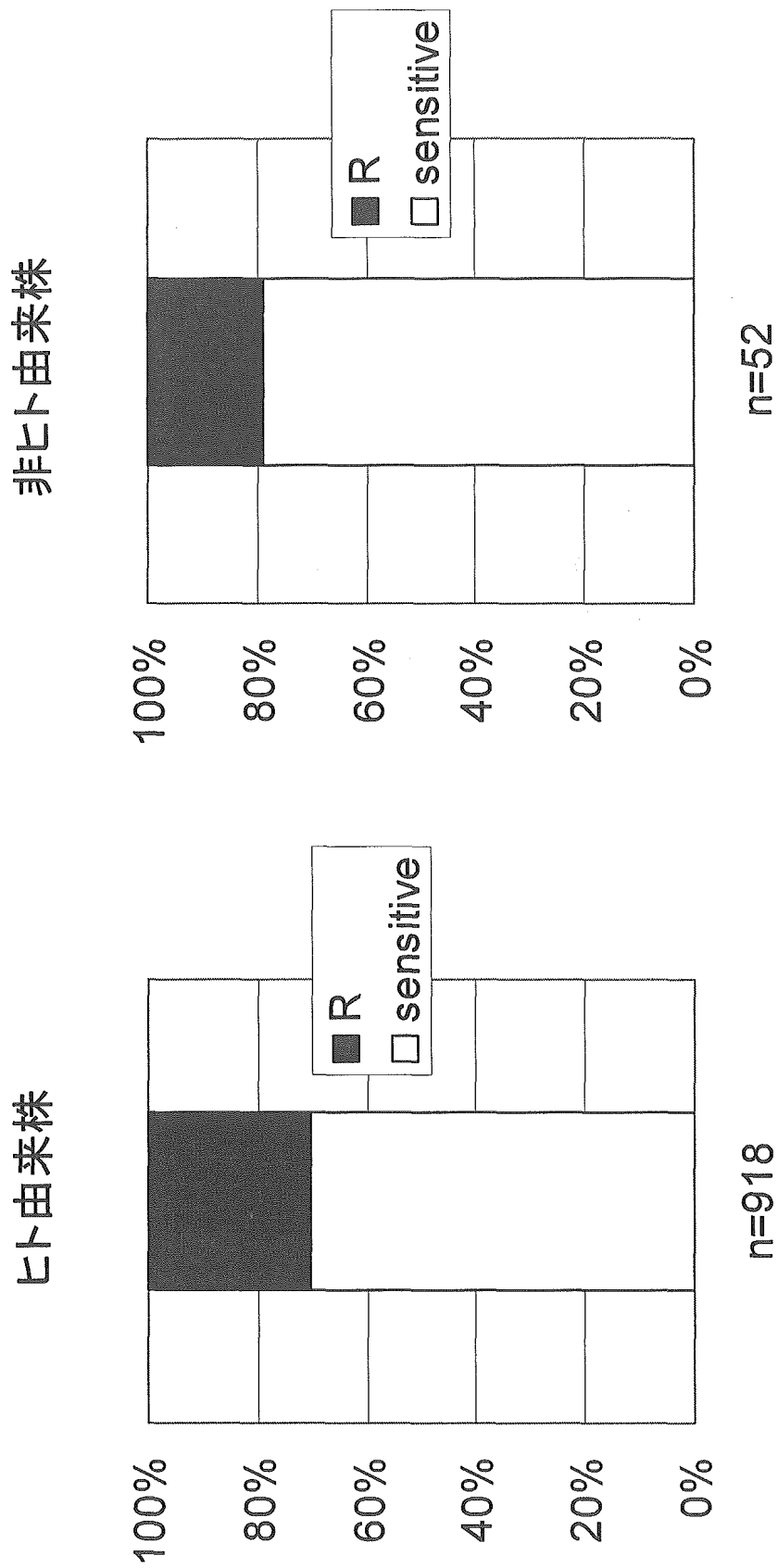
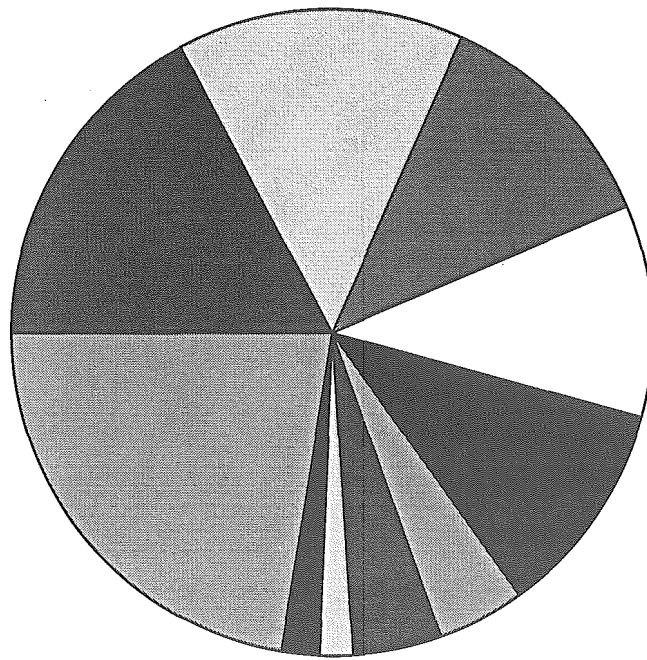


図3. EHEC薬剤耐性(2001-2005)

ヒト由来株



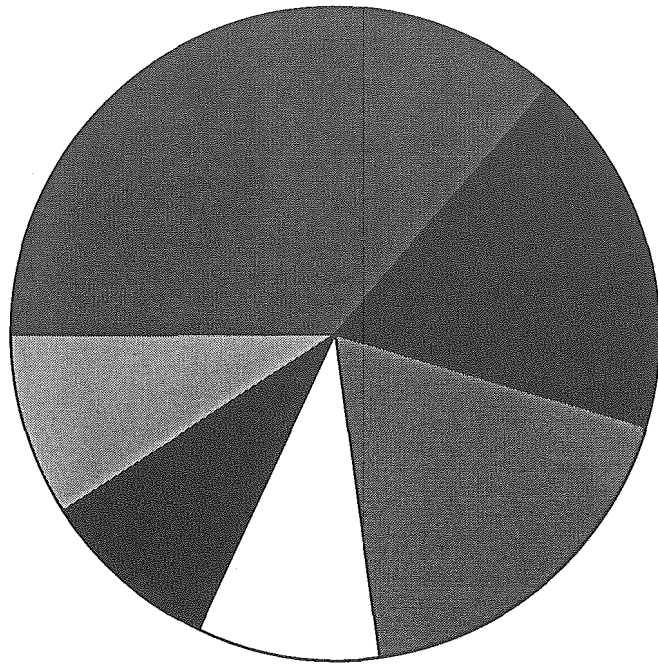
■ STSu
□ A
■ SSu
■ others

□ ASSu
■ S
□ ASSxSu

■ ASTSu
□ ASTKSu
■ ST

n=271

非ヒト由来株



■ STSu
□ A

■ S
■ T

■ ASTSu
□ AS

n=11

表1. R-STSu耐性株(-2003)

	STSu	ASTSu	ASTKSu	STKSu	ASTCt Su	ASTK SuTp	ASTSu Tp	STSu Tp	AST SuN	STC SuTp	ASTK CSu	AST KSu F	total
O157	17	13	1				2			1			34
O26	1	2	6		2	<u>1*</u>		<u>1**</u>				1	14
O111		3	3						1		1		8
others	4	2		2		1							9
total	22	20	10	2	2	2	2	1	1	1	1	1	65

• 太字、下線付き: クラス1インテグロン陽性

– *: *dfrA17* + *aadA5*

– **: *dhfr12* + *orfF* + *aadA2*

• アンピシリン耐性は全て、TEM型β-ラクタマーゼ遺伝子陽性

表2. R-STSu耐性株(-2003)-tetAクラス分け

	A	B	G	Av	総計
O157	13	21			34
O26	8	6			14
O111	7	1			8
その他	3	4	1	1	9
総計	31	32	1	1	65

tetA	STSu	ASTSu	ASTKSu	STK Su	AST CtSu	ASTK SuTp	AST SuTp	STSu Tp	AST SuN	STC SuTp	ASTK CSu	ASTK SuF	総計
A	3	15	10			1		1	1				31
B	18	4		2	2	1	2			1	1	1	32
G		1											1
Av	1												1
総計	22	20	10	2	2	2	2	1	1	1	1	1	65

図4. *Salmonella* Enteritidis 集団事例関連株の薬剤耐性パターンの傾向

