

200501374A・B

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15～17年度総括総合研究報告書

食中毒菌の薬剤耐性に関する疫学的・遺伝学的研究……………79

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15～17年度分担総合研究報告書

(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……………84

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……………111

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……………128

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 "

泉谷 秀昌 国立感染症研究所

渡辺 治雄 "

(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……………149

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……………158

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 俊成 "

浅井 鉄夫 "

小島 明美 "

原田 和記 "
石原加奈子* "
江崎 英剛** "

(* 現農林水産省消費・安全局畜産安全管理課、

** 現(株)日清製粉グループ本社)

(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.....185

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.....197

平成 15～17 年度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
総合研究報告書

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：食品由来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。カンピロバクター、サルモネラおよび EHEC は家畜等の動物をリザーバーとしており、その意味で動物由来感染症の代表的なものとも言える。サルモネラ、カンピロバクター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にある。臨床的に重要なフルオロキノロン (FQ)、セファロスポリン系薬剤への高度耐性株がヒトからもヒト以外の株からも検出されるようになってきており、なおかつその耐性を担う遺伝子にも共通性が観察されることがわかってきた。動物等への抗菌薬の使用状況との関連性を示すデータがある一方、単純にそれだけでは説明できない状況もあり、今後、環境あるいはより広い宿主を対象にサーベイランスを行うことの重要性を示す結果でもあった。

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デ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. 研究結果概要

I. 畜産分野関連の解析

(1) サルモネラ関係

- ① 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、ブロイラーでは 20.1%であった。血清型は、Infantis (SI)と Typhimurium (ST)が中心であった。
- ② 収集された家畜由来株においては、特に DSM 及び OTC 対して高率な耐性株の出現がみられたが、セフェム耐性は全く検出されなかった。フルオロキノロン (ERFX) に対して耐性が、病豚由来の *S. Choleraesuis* (SC) 1 株のみで認められた。
- ③ 病豚由来フルオロキノロン耐性 SC には *gyrA* 2 カ所と *parC* 1 カ所に変異が確認されたが、ほぼ同時期に台湾で分離されたヒト症例由来のそれとはその変異様式や PFGE パターンが異なっていた。
- ④ 1999~2001 年に家畜から分離された ST 株における DT104 占有率は牛で 72% (46/64)、豚で 31% (11/35) であった。それらは 2 つの主要な遺伝子型 (PFGE 型) に分類され、一部はヒト症例株のそれと一致していた。
- ⑤ 市販食肉及び家畜由来 SI の大部分で、耐性率及び薬剤耐性パターンが類似し、薬剤耐性株の保有する薬剤耐性遺伝子は同じであった。しかし、キノロン耐性株の *gyrA* の変異は、食品由来株の方が多様で、主要な変異型が異なっていた。

- ⑥ 薬剤耐性 SI が分離されたブロイラー農場における抗菌性物質の使用状況を調査したところ、23 農場中 3 農場で抗菌剤治療が行われ、9 農場で抗菌性飼料添加物が使用されていた。分離株の薬剤耐性パターンに含まれる薬剤で治療された農場は、3 農場中 1 農場であった。

(2) カンピロバクター関係

- ① 健康家畜糞便の 14.2~49.5% から *Campylobacter* が分離された。牛、レイヤーおよびブ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。
- ② 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% に認められたが、耐性率は由来動物や菌種により異なっていた。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。
- ③ *C. jejuni* 感染鶏を用いてフルオロキノロン剤の投与試験を実験室レベルで実施した結果、投薬直後から鶏体内で耐性株が出現する場合としない場合があることが判った。
- ④ フルオロキノロン耐性株の出現背景を明らかにする目的で、養鶏農家における追跡調査を行った結果、一部の耐性株が持続的に農場を汚染して一定の感染環が成立している可能性が示唆された。
- ⑤ EM 耐性株が分離された農場のうち、交差耐性と関連する薬剤 (タイロシン等の同系統薬剤) を使用していた農場は 11.1% で、分離株の耐性パターンに含まれる薬剤を使用していた農場は 25.3% であった。ERFX 耐性株が分離された農場のうち、交差耐性と関連する薬剤 (キノロン及びフルオロキノロン剤) を使用していた農場は 2.8% で、分離株の耐性パターンに含まれる薬剤を使用してい

た農場は16.2%であった。

以上3年間の研究により、動物由来薬剤耐性菌による人に対する潜在的危険性を評価・予測する上で重要な基礎データの蓄積することができた。

II. ヒト由来株の解析

(1) サルモネラ関係

- ① *S. Enteritidis* 集団事例関連株に関してはアンピシリン+ストレプトマイシン2剤耐性株の増加が1997-2003年にかけて見られ、次いでアンピシリン+ストレプトマイシン+トリメトプリム+サルファ剤4剤耐性株の増加が2002-2004年に見られるなどの変化が観察された。前者は同様の性質を有すプラスミドの伝播によること、後者ではクラスIインテグロンの介在などが明らかにされた。また、散発事例において拡張性基質特異性β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生性 *S. Enteritidis* が国内で初めて同定され、本菌がプラスミド性の *bla*CTX-M-14 遺伝子を保有していることを明らかにした。
- ② *S. Typhimurium* に関しては、これまで散発例や小規模の集団事例でのみ確認されていたが、多剤耐性DT104による大規模集団事例が2004年に発生した。
- ③ 2000年以降、少なくとも13の疫学的関連性が見られない散発事例で分離されてきたフルオロキノロン高度耐性 *S. Typhimurium* 株について、キノロン耐性に関与する遺伝子変異およびその他の耐性遺伝子に関する解析を行い、互いの近縁性を明らかにした。由来が同一である可能性が高い。家畜からは、研究班で調べている限りフルオロキノロンSTは分離されていない。
- ④ 我が国においてもAmpC型β-ラクタマーゼ産生性 *S. Newport* および *S. Typhimurium* が散発事例において分

離された。

(2) カンピロバクター関係

- ① 1999年~2003年に下痢症患者から分離された *C. jejuni* の薬剤別耐性菌出現率の年次変化をみると、EM(治療の第一選択薬)耐性率は2%以下であるが、TC, NA, CFFX に対する耐性率は20~40%で横ばい状態であった。また、*C. jejuni* のフルオロキノロン系薬剤に対する耐性率は26~40%であった。
 - ② 人症例及び動物由来 *C. jejuni* の薬剤感受性、血清型及び遺伝型を比較したところ、ABPC耐性率は、人由来株で5.6%と低率であったが、レイヤーおよびブロイラー由来株では33%および20%と高く、牛由来株では認められなかった。少し違いがある。血清型BおよびD群は、全ての由来(人、牛、ブロイラー及びレイヤー)株で共通に認められ、0及びR群は、人及び牛由来で認められた。人、牛及びブロイラー由来株は、鞭毛蛋白遺伝子型 (*flaA*-type) により大きく5つのクラスターに分類されるが、クラスターIは人及び牛由来株で、Ⅲ~Ⅴは人、牛及びブロイラー由来株で構成されていた。ヒトおよび動物から分離される株の間には一部共通性及び差異が見られる。
- ### (3) EHEC関係
- ① EHECに関してはアンピシリン、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高いことを明らかにし、アンピシリン耐性株は主としてTEM型の *bla* 遺伝子を有していること、またテトラサイクリン耐性株は主として *tetA*(A) および *tetA*(B) 遺伝子を保有していることを明らかにした。また、2003年および2004年にセフォタキシム耐性株が分離されたことから、その耐性遺伝子の解析を行い、これらがTEM型の *bla* 遺伝子に加えてCTX-M-3およびCTX-M-14型の *bla* 遺伝子を保有し

ていることを明らかにした。

C. 結論

- 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類似性が見いだされた。共通の起源が示唆された。*Campylobacter* の耐性パターンは *jejuni* あるいは *coli* の種間でかなりの差が見られた。
- 2) 耐性菌が分離される農場においては、その抗菌薬あるいは類似のものが使用されている場合があったが、中には使用歴の見られない農場もあった。その因果関係は今後の課題である。
- 3) サルモネラ、カ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。

D. 知的財産権の出願・登録状況

なし

E. 健康危険情報

食品由来感染症において代表的な存在であるサルモネラ、カンピロバクターおよび EHEC の耐性化が懸念される。ことにフルオロキノロン、第 3 世代セフェム系抗菌薬に対する耐性獲得に注意を払うべきであろう。小児におけるサルモネラ感染においてフルオロキノロン耐性菌の場合に治療に抵抗する症例が見られている。

F. 研究発表

別紙に掲載

研究概要が分かる図表

目的：

ヒト、家畜、食品から分離されるサルモネラ、カンピロバクテータ等の薬剤耐性状況の調査
耐性菌の遺伝学的、分子疫学的解析

家畜由来菌
(農林水産省動薬検、独法動物研究所)

下痢症患者由来菌
(厚労省感染研、地研)

食品由来細菌
(地研、厚労省医食品研)

解析法：

耐性検査 (E-test, MIC の測定)
耐性機構の分子的解析 (DNA gyrase, *gyrA*, *parC* の塩基配列の決定、 β -ラクタマーゼ)
菌株の相同性の検討 (PFGE による解析)

解析結果

I. サルモネラ

・フルオロキノロン耐性サルモネラ：

- 1) ヒトから分離されるサルモネラの薬剤耐性率は約 34% で、多剤耐性化の傾向
- 2) ヒトからフルオロキノロン耐性サルモネラが分離されており、すべて *S. Typhimurium*
- 3) 輸入鶏肉からフルオロキノロン耐性株が分離され、その血清型は *S. Saintpaul*
- 4) 健康家畜由来サルモネラ 183 株中フルオロキノロン耐性株は認めらず
- 5) 病豚由来の 1 株にフルオロキノロン耐性サルモネラ *S. Choleraesuis*

・*S. Typhimurium* DT104

- 1) 牛と豚から分離された *S. Typhimurium* (ST) の 50% に多剤耐性を示す DT104
- 2) 家畜間でも *S. Typhimurium* DT104 の分離は高い、広く汚染が浸潤
- 3) DT104 による大規模食中毒の発生がおこる

・*S. Enteritidis*

- 1) 拡張型基質特異性 β -ラクタマーゼ (ESBL) *bla*CTX-M-14 ; わが国で初の分離
遺伝子領域の解析：大腸菌、肺炎桿菌由来 DNA のハイブリッド

・*S. Newport*

- 1) AmpC 型 β -ラクタマーゼ産生性 *S. Newport* が我が国で初めて分離される

II. カンピロバクター

- 1) 牛、レイヤーおよびブ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。
- 2) 下痢症患者から分離された *C. jejuni* の薬剤別耐性菌出現率：EM (治療の第一選択薬) 耐性率は 2% 以下であるが、TC, NA に対する耐性率は 20~40%
フルオロキノロン系薬剤に対する耐性率は 26~40%

III. EHEC関係

- 1) アンピシリン、テトラサイクリンに対する耐性頻度が高い。アンピシリン耐性株：主として TEM 型の *bla* 遺伝子、テトラサイクリン耐性株：*tetA*(A) および *tetA*(B) 遺伝子。
- 2) 2003 年および 2004 年にセフトキシム耐性株の分離：TEM 型の *bla* 遺伝子に加えて CTX-M-3 および CTX-M-14 型の *bla* 遺伝子を保有。

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	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。
サルモネラは食中毒起因菌の代表的な存在であり、厚生労働省食中毒統計による細菌性食中毒の患者総数の 3 割以上を常に占めている。サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれるが、中でも <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis (<i>S. Enteritidis</i> 、以下 SE) による患者数は	同じく <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (<i>S. Typhimurium</i> 、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。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いる。本菌による年間の患者数は 3-4 千名にのぼる。

これらの主要な食品由来感染症の起因菌における抗菌薬へ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。しかしながら、散発事例では SE および EHEC においても治療上問題となりうる耐性が検出されるなど、将来の耐性化が懸念される状況は菌種によらない問題であると考えられる。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遺伝子レベルも含めて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 分離株を使用した。
2. 薬剤感受性試験: BBL 社のセンシティブディスクを用いて、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 (Cp)、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)、トリメトプリム (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 (L.R. Ward, et al., *Epidemiol. Infect.* 99, 291-4, 1987)。
4. パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE): PulseNet US のプロトコールに準じて実施した (S.B. Hunter, et al., *J. Clin. Microbiol.* 43, 1045-50, 2005; E.M. Ribot, et al., *Emerg. Infect. Dis.* 8,

387-91, 2002)。

5. 遺伝子解析: 薬剤耐性遺伝子のクローニング、PCR、シーケンス等の遺伝子解析は基本的に Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 3 版) に記載の方法に準じて行った。

C. 研究結果および考察

1. EHEC 耐性株の分布

当部に送付された EHEC 菌株から、2001 年から 2005 年までの分離株計 970 株を抽出し薬剤感受性試験を行った。このうち、ヒト由来株は 918、ウシ、食品、環境等を含めたヒト以外(非ヒト)の由来株は 52 株であった。試験した薬剤のいずれかに耐性を示した株の比率を、これらのグループ間で比較をした結果、耐性率および耐性パターンに大きな差異はないと思われた(図 1 および 2)。また、ヒト由来株に関して 2001 年から 2005 年までの間の耐性率の推移を見ると、20-40%の間を推移しており、若干 2003 年以降のほうが高いようにも見受けられるが(図 3)、これに関しては今後さらに推移を監視していく必要があるだろう。

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 2)。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)。

2003年に2株(家族内集団事例由来株)、2004年に1株のCTX耐性株が検出された。後述のサルモネラにおける解析と同様に*bla* 遺伝子の検索を行ったところ、2003年の株には*bla*_{CTX-M-14} 遺伝子が、2004年の株には*bla*_{CTX-M-3} 遺伝子が検出された。これらはいずれもO26であった。

3. SE耐性株の分布

当部に送付されたSE菌株のうち集団事例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、1997年から2003年ごろまでは5割程度であったが、2004年、2005年と増加傾向にあり、全体の8割を占めていた。次に多く検出され

るR-S(ストレプトマイシン単剤耐性)は、全体の2割を占める状況が続いている。1997年から2003年にかけて比較的良好に検出されたR-AS、および2002-2003年に検出されたR-ASTpSuは2004年および2005年の集団事例関連株では検出されなかった。これには流行株の変化、SE集団事例総数の減少などの要因が関係していると思われる。

4. 多剤耐性ST DT104

多剤耐性STフェージ型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5および図6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。

5. 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 ST 株はシプロフロキサシン(Cp)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ジクス酸に加え、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、2005 年までに 19 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が、フェージ型はすべて DT12 もしくは 193 であった(表 3)。

これらの菌株のフルオロキノロン各種に対する MIC 値は 2 株を除き 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(ノル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 4)。

キノロンに対する耐性は、DNA ジ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 19 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* の変異が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 5)。

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 7 に示す。また、PFGE 泳動パターンを解析ソフト Finger Printing II を用いて DT104 株との比較を行った結果、FQ 高度耐性株は、DT104 株とは明らかに異なるクラスターを形成し、また、FQ 高度耐性株同士は比較的近縁度が高いことが示された(図 8)。

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 付近にバンドが検出された。この増幅された DNA 断片の塩基配列解析の結果、本インテグロンには *bla_{oxa-30}* + *aadA1* が含まれることが明らかになり、さらに R-Tp を有する株では *dhfrXII* + *aadA2* の存在も明らかになった。他の薬剤耐性(R-C,T,G)についても、遺伝子解析を行った結果、それぞれ *catA*, *tetRA*(クラス B), *aac3* 遺伝子が検出された(図 9)。これまでの FQ 高度耐性 ST 株について上記耐性遺伝子の分布を検索した結果、全ての株において、その耐性パターンに依存して同様の耐性遺伝子が検出された(表 6)。このことは、FQ 以外の耐性に関してもこれらの株に共通性があることを

示している。なお、多剤耐性 ST DT104 では、上記のいずれの遺伝子も検出されなかった。

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6)。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、フェージ型、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6)。

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 500 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 (#106) が1つ見出された(図 7 A')。本菌株は 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(表 6 下段)。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 7)。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 箇所が欠けているだけであった。PFGE、薬剤耐性パターン、耐性遺伝子の保有状況ならびに変異の態様から、本株は上記ヒト由来 FQ 高度耐性 ST 株と何らかの関係があるのではないかと考えられた。

6. セフトキシム耐性サルモネラ

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。また、大腸菌等ではいわゆる ESBL と呼ばれるβ-ラクタマーゼを産生するサルモネラの報告も欧州等で見受けられる。

わが国でも 2003 年 SE で ESBL 産生性株が、ST および *S. Newport* で AmpC 型β-ラクタマーゼ産生性株が、それぞれ散发事例から 1 株ずつ分離された(表 8 お

よび 9)。これらは、*bla*_{CTX-M-14} および *bla*_{CMY-2} 遺伝子をそれぞれ保有していることが明らかとなった。なお、*bla*_{CTX-M-14} は EHEC においても検出されており、この点は興味深い。

また、2005 年には鶏肉由来の *S. Infantis* 株において CTX 耐性株が 2 つ検出された。これらはいずれも AmpC 型 β-ラクタマーゼ産生性であり、*bla*_{CMY-2} 遺伝子を保有していることが明らかにされた(表 10)。

D. 結論

食品由来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 感染症は家畜等の動物をリザーバーとしており、その意味で動物由来感染症の代表的なものとも言える。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 FQ 高度耐性株や CTX 耐性株などがヒトからもヒト以外の株からも検出されるようになってきており、なおかつその耐性を担う遺伝子にも共通性が観察されることがわかってきた。この結果は、より広い宿主を対象にサーベイラ

ンスを行うことの重要性を改めて示すものであると考えられる。

E. 健康危険情報

食品由来感染症において代表的な存在であるサルモネラおよび EHEC の耐性化が懸念される。ことにフルオロキノロン、第 3 世代セフェム系抗菌薬に対する耐性獲得に注意を払うべきであろう。また、さまざまな宿主を対象に耐性獲得の傾向に注意を払う必要もあるだろう。

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) T. Matsui, S. Suzuki, H.

- Takahashi, T. Ohyama, J. Kobayashi, H. Izumiya, H. Watanabe, F. Kasuga, H. Kijima, K. Shibata, and N. Okabe: *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. *Epidemiol. Infect.* 132, 873-879, 2004.
- (4) M. Taguchi, K. Seto, M. Kanki, T. Tsukamoto, H. Izumiya and H. Watanabe: Outbreak of food poisoning caused by lunch boxes prepared by a company contaminated with multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58 (1), 55-56, 2005.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) 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。
- (8) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、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。
- (9) 板垣道代、白木豊、山田万希子、所光男、泉谷秀昌、渡辺治雄: 2000 年 4 月から 2003 年 3 月に岐阜県において検出された *Salmonella* Enteritidis 株の PFGE 型とファージ型の組み合わせによる疫学解析。感染症学雑誌、第 78 巻、690-698、2004。
- (10) 石畝史、布施田哲也、重屋志啓盛、京田芳人、望月典郎、泉谷秀昌、渡辺治雄: 多剤耐性 *Salmonella* Newport の国内初報告例。感染症学雑誌、第 78 巻、989-990、2004。
- (11) 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。

(12) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：*Salmonella* Enteritidis 関するファージ型別および薬剤耐性の傾向。第 76 回日本細菌学会総会。

(13) 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。

(14) H. Izumiya and H. Watanabe: Topics of *Salmonella* in Japan - characterization of drug resistant *Salmonella* isolates. 2004 annual Enter-net workshop, Berlin, Germany.

(15) 泉谷秀昌、寺嶋淳、田村和満、渡辺治雄：2002 年における *Salmonella* Enteritidis のファージ型別および薬剤耐性の傾向。第 77 回日本細菌学会総会。

(16) 泉谷秀昌：サルモネラの薬剤耐性について。平成 16 年度希少感染症診断技術研修会。

(17) 泉谷秀昌：医療分野における薬剤耐性菌問題での課題と取り組みについて—サルモネラ菌における薬剤

耐性について。平成 17 年度動物用医薬品危機管理対策に関する研修会。

(18) 泉谷秀昌、寺嶋淳、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄：2004 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。衛生微生物技術協議会第 26 回研究会。

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(2001-2005)

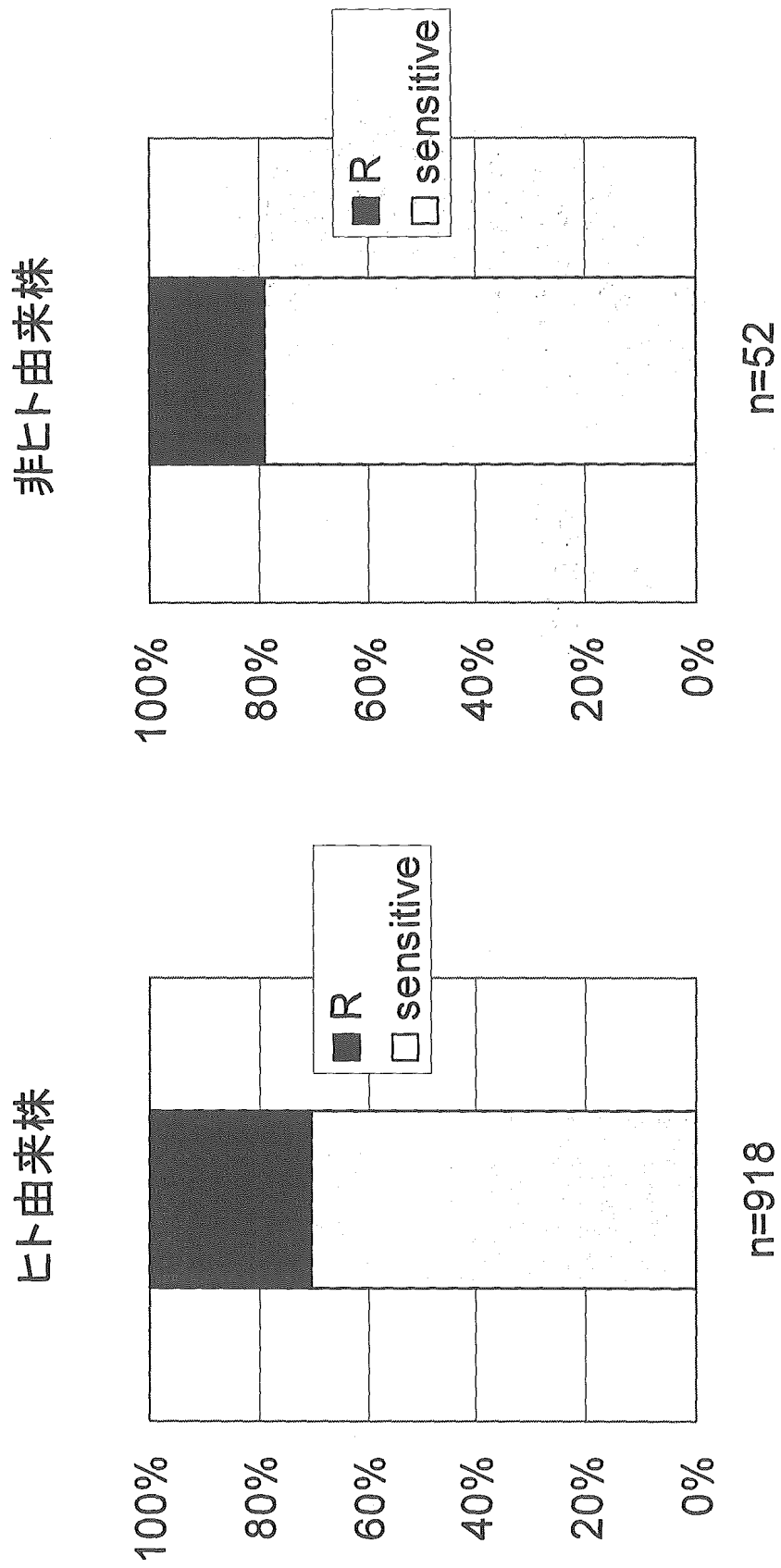
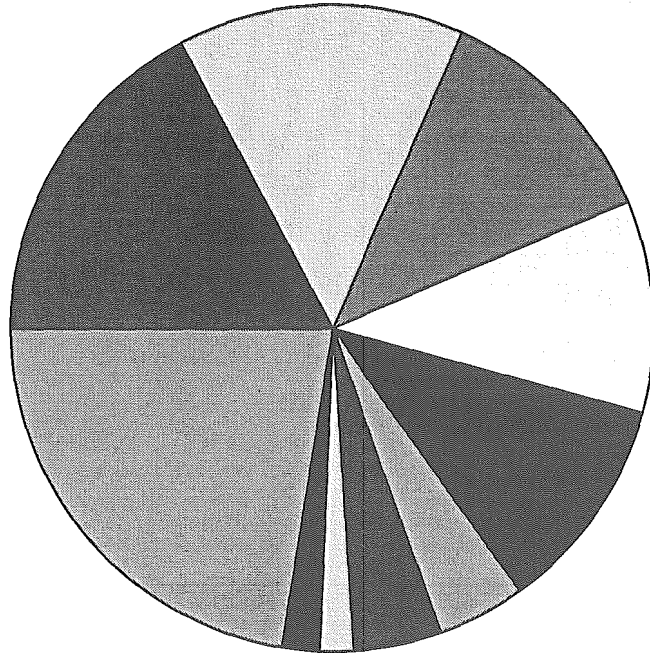


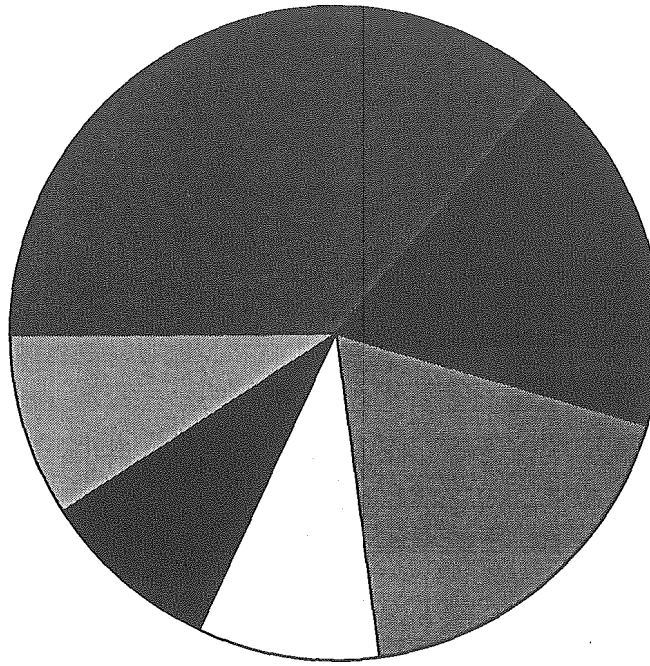
図2. EHEC薬剤耐性(2001-2005)

ヒト由来株



n=271

非ヒト由来株



n=11

図2. ヒト由来EHEC株の耐性率の推移(2001-2005)

