

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. SE集団事例関連株の薬剤耐性パターンの傾向

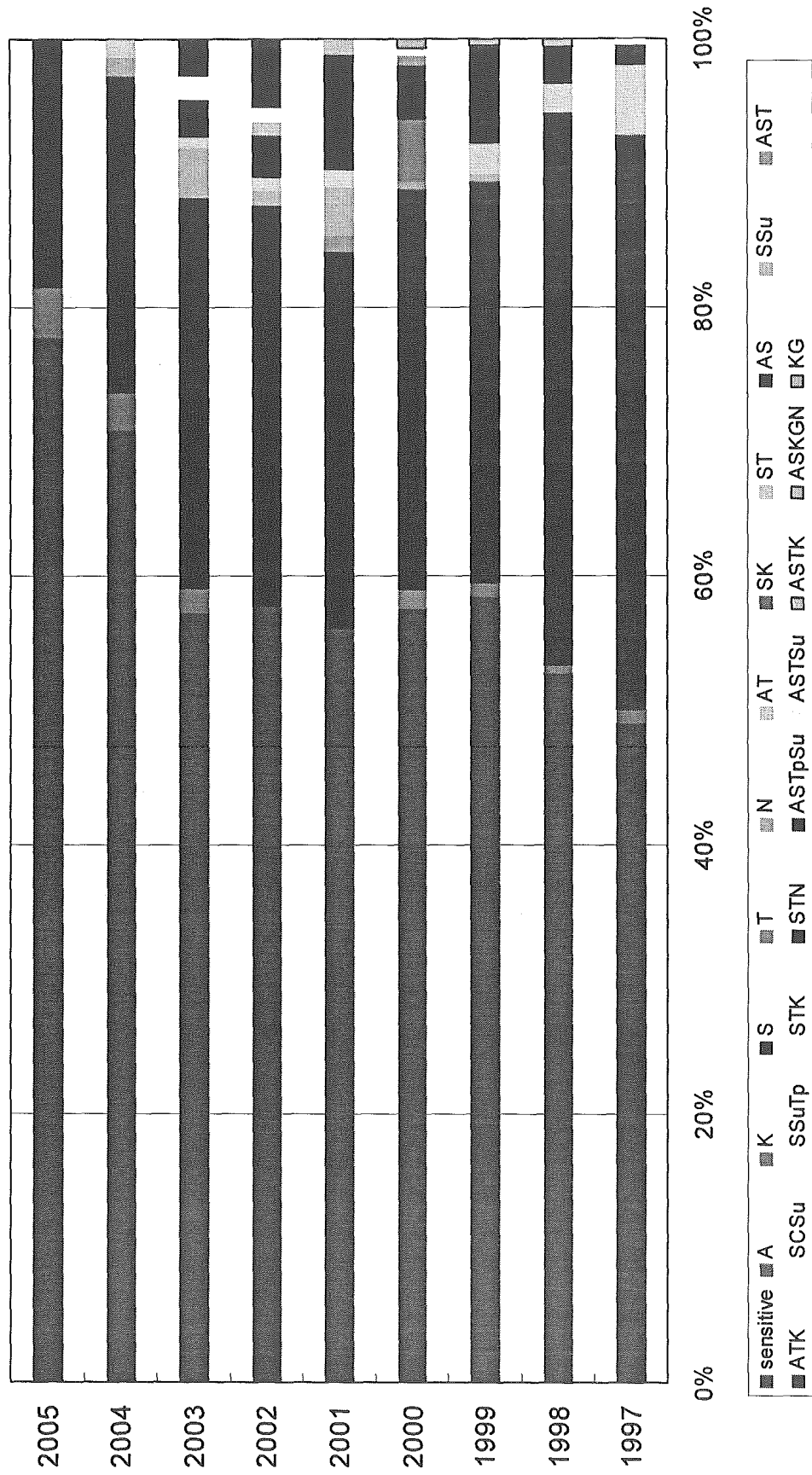


図5. ST DT104株 検出数(ヒト由来株)

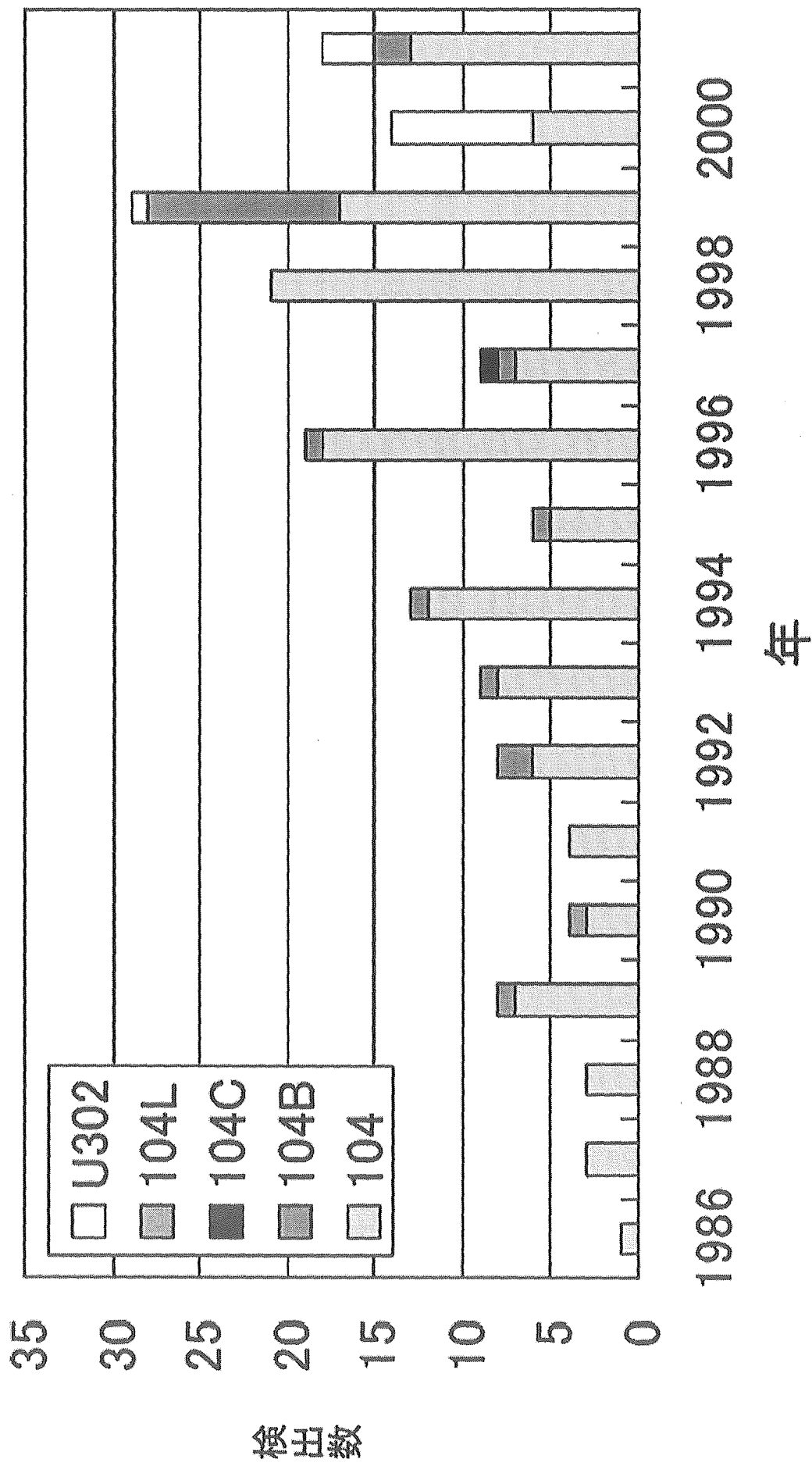


図6. ST DT104株 検出数(非ヒト由来株)

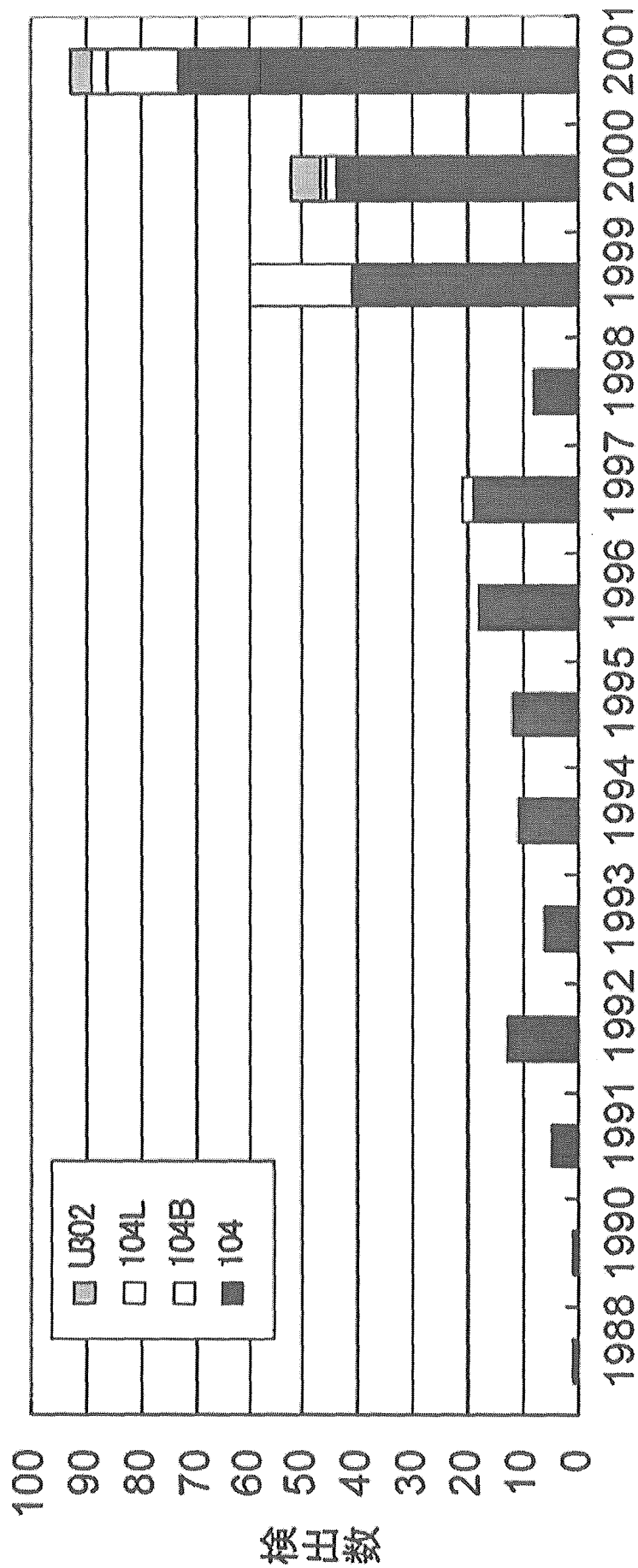


表3. フルオロキノロン高度耐性ST検出状況

年	n	DT	耐性
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
2005	1	193	ACSSuT+GTpNCp

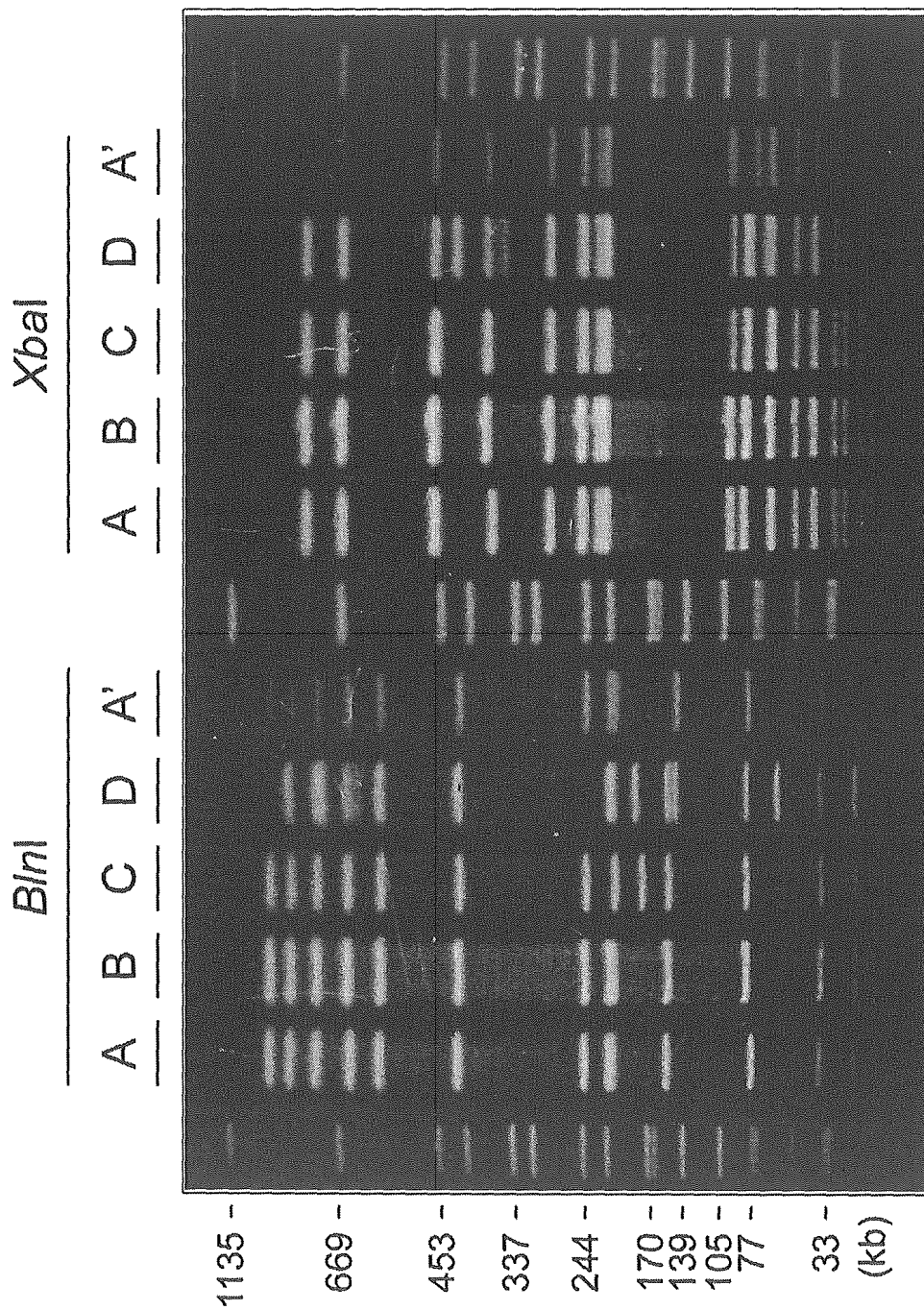
表4. フルオロキノロン高度耐性ST株のMIC (E test)

	NA	CI	NX
N=17	>256	16-32	24-48
N=1	>256	>32	128
N=1	>256	>32	>256

表5. FQ高度耐性株におけるDNAトポイソメラーゼ変異

	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
N=18	S83F+D87N (TCC/TTC)(GAC/AAC)	-	S80R (AGC/CGC)	-
N=1	S83F+D87G (TCC/TTC)(GAC/GGC)	-	S80R	S458P (TCG/CCG)

図7. FQ高度耐性ST株のPFGEプロファイル(代表例)

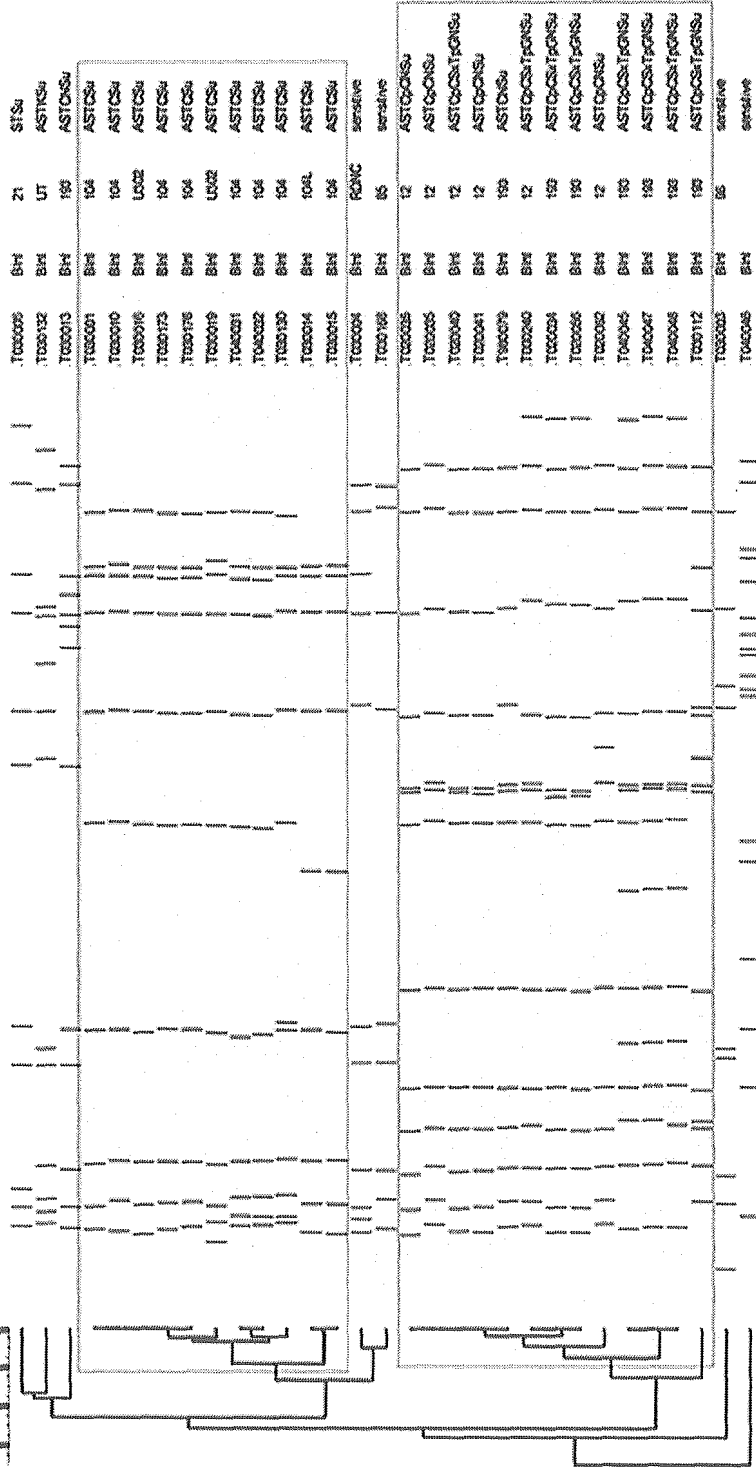


A', ウシ由来のFQ低感受性株のPFGEパターン

図8. FQ高度耐性ST株のPFGEプロファイル

Dice (Opt:0.12%) (Tol 1.3%-1.3%)
 (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
Reference: Nara

40 60 80 100



DT104

FQR

図9. FQ高度耐性ST株
-その他の耐性遺伝子について

- *aac3*
 - ゲンタマイシン
- *dhfrXII-aadA2*
 - トリメプリム
 - ストレプトマイシン
- *oxa30-aadA1*
 - アンピシリン
 - ストレプトマイシン
- *catA*
 - クロラムフェニコール
- *tetRA*
 - テトラサイクリン

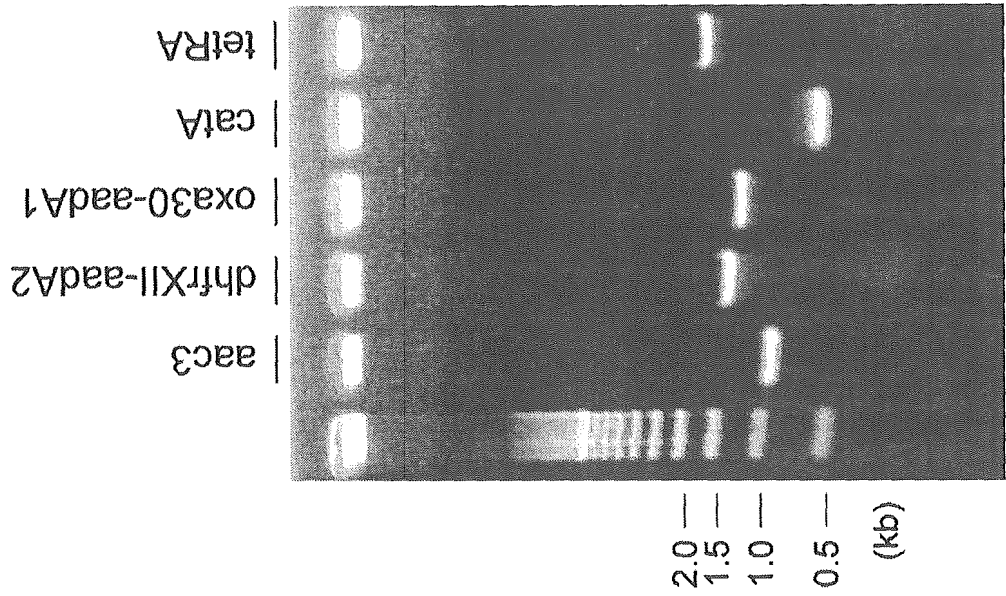


表6.FQ高度耐性ST株の耐性遺伝子に関するPCR検索の結果

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7.FQ低感受性ST株#106のMICおよび耐性遺伝子の変異

	NA	CI	SO	OF	NX
106	>256	0.75	0.75	2	3
DT104 ACSSuTN	>256	0.38	0.5	1.5	1

	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
106	S83F (TCC/TTC)	-	S80R (AGC/CGC)	-
DT104	S83F	-	-	-

表8. CTX耐性SE株のMIC

2003年7月 4歳男児

		Cephalosporins						ESBL test		
		AM	CE	XM	CT	TX	CP	CT	NX	CTL
R	>256	>256	>256	>256	256	>256	>256	>16	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	1	1		
S	0.032	0.25	1.5	0.06	3	0.023	0.032	0.094	0.19		

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

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

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

nt, not tested

表9. AmpC型β-ラクタマーゼ産生性サルモネラ

- *Salmonella* Typhimurium (ACSSuT+Tp+Ct)

– 2003年2月、53歳男性

strain#	AM	CE	XM	FX	CN	CTX	AT	IP	CT	CTL
T040044	>256	>256	128	192	12	32	6	0.5	>16	>1.0

- *Salmonella* Newport (ACSSuT+Ct)

– 2003年9月、7歳男児

strain#	AM	CE	XM	FX	CN	CTX	AT	IP	CT	CTL
S040001	>256	>256	48	64	12	16	4	0.38	>16	>1.0

AmpC型β-ラクタマーゼ
blaCMY-2保有

表10. AmpC型β-ラクタマーゼ産生性サルモネラ

- *Salmonella* Infantis
 - 2005年 鶏肉

strain#	AM	CE	XM	FX	CN	CTX	AT	TZ	CT	CTL
S050014	>256	>256	32	128	8	16	4	48	>16	>1.0
S050015	>256	>256	48	258	24	32	8	64	>16	>1.0

*bla*CMY-2保有

strain#	R-type
S050014	ACSSuT+ Ct
S050015	ASSuTK+ SxTpCt

厚生労働省食品安全確保研究事業
分担研究総合報告書

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
分担課題名: 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470株で50血清型に型別された。薬剤耐性では200株(42.6%)が供試した12薬剤のいずれかに対して耐性を示した。医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は10例から分離され、同じ薬剤耐性パターンを示すサルモネラがペットからも分離された例が1例あった。さらに、同一耐性パターンを示すサルモネラの増加が、その後発生した食中毒事例由来株との細菌学的検討で、汚染された鶏卵によるdiffuse outbreakであることが明らかになり、関係機関との協力で当該農場の環境改善を進め、それ以上の被害拡大を防止した。

市販鶏肉の汚染実態調査では、国産鶏肉297検体中94検体(31.6%)、外国産鶏肉114検体中17検体(14.9%)からサルモネラが分離された。国産鶏肉から分離された94株中89株と外国産鶏肉から分離された14株すべてが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275株が分離され、血清型O157:H7が210株(76.4%)と最も多く分離された。薬剤感受性試験では275株中48株(17.5%)が供試した12薬剤のいずれかに耐性を示し、第3世代セフェム系薬剤であるセフォタキシム(CTX)に耐性を示すO26:H11も1株分離された。さらに、フルオロキノロン剤低感受性株がO26:H11で2株分離され、腸管出血性大腸菌の耐性化が進行していることが明らかとなった。

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った。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した。

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

(1) ヒト由来サルモネラ

埼玉県内で 2003 年から 2005 年、散発下痢症患者及び食品従事者の検便などにおいて健康者から分離されたサルモネラ 470 株の血清型別分離状況を表 1 に示した。分離された 470 株は 50 血清型に型別され、最も多く分離されたのは、S. Enteritidis が 152 株、次いで S. Typhimurium が 48 株、S. Saintpaul が 29 株、S. Infantis が 20 株、S. Montevideo が 18 株の順であった。

供試した 470 株のうち 200 株 (42.6%) が 12 薬剤のいずれかに耐

性を示した。分離株の区分別耐性パターンを表 2 に示した。最も多かったのは SM 単剤耐性で 79 株、次いで NA 単剤耐性の 21 株であった。

2003 年 5 月から 7 月にかけて県北部の散発下痢症患者から *S. Enteritidis* の SM 単剤耐性株が多く分離され、そのファージ型は 6a であった。また、2003 年 11 月に県北部で家庭内食中毒事例が発生し、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。さらに、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 *S. Enteritidis* が検出された。患者および鶏卵からの分離株は、薬剤感受性試験 (SM 単剤耐性)、ファージ型 (6a)、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。汚染された鶏卵による食中毒であることが判明したため、G 県に照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。そこで菌株交換により性状解析を行ったところ、薬剤感受性試験、ファージ型、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 (表 3)。

この養鶏場で製造された鶏卵 100 個の検査では陰性であったが、患者宅の鶏卵から SE が検出された。そこで、G 県農政部では、鶏舎内の汚染実態調査を実施したところ、糞便 5/36 (13.9%)、塵芥 29/47 (51.7%)、床スワブ 29/40 (72.5%) から 09 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効果が高いものに変更等を実施した。2004 年 1 月に当該養鶏場の鶏卵 450 個の検査を実施したが、サルモネラ陰性であった。

この食中毒事例由来株と県北部の散発事例株の比較で、薬剤感受性及びファージ型が一致し、PFGE 法による DNA 切断パターンも類似していたため、再度調査を行ったところ当該選別包装場経由の鶏卵が県北部のスーパーに流通しており、患者の一部はそのスーパーを利用していたことが判明した。したがって、2003 年 11 月の集団事例は *S. Enteritidis* に汚染された鶏卵による diffuse outbreak の 1 事例であったことが示唆された。

他の耐性パターンでは 4 剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性株が 39 株分離された。特に CPMX や NFLX などフルオロキノロン剤に耐性を示す株が 10 株分離された。

その血清型は *S.Typhimurium* が 8 株、*S.Schwarzengrund* と *S.Kentucky* がそれぞれ 1 株ずつであった(表 4)。*S.Typhimurium* 8 例は、制限酵素 *Bln I* 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、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、8 例中 3 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おり、特に 1 例では、ペットからも同一ファージ型を示すフルオロキノロン耐性 *S.Typhimurium* が分離されたことから、その関連が示唆された。これら 8 株のキノロン耐性決定領域 (Quinolone resistance determineing region: QRDR) におけるアミノ酸変異を調べた結果、他の腸管系病原菌同様 *gyrA* で 2 つのコドン (83 位のセリン、87 位のアスパラギン酸)、*parC* で 1 つのコドン (80 位のセリン) の変異が確認された。*S.Schwarzengrund* についてはインドネシアからの企業研修生の健康診断検査で分離されたもの、*S.Kentucky* についてはエジプトからの帰国者の海外下痢症検査で分離されたもので、国外からの持ち込みが示唆

された。

セフェム系薬剤では、2005 年に CTX 低感受性菌が嘔吐・高熱を主訴とする 10 歳の患者から分離された。血清型は鶏肉からの分離頻度が高い *S.Infantis* で、ディスク法では SM・TC・ABPC に耐性で、CTX に対して低感受性であった。耐性遺伝子を検査したところ、AmpC 型の β ラクタマーゼをコードする遺伝子を保有しており、シークエンスの結果、*blaCMY-2* 遺伝子と DNA 配列が一致した。その後患者の来院がなかったために、疫学的背景については不明であった。

(2) 鶏肉由来サルモネラ

2004 年から 2005 年、国産および輸入市販鶏肉の汚染実態調査を実施した。国産鶏肉では、297 検体中 94 検体 (31.6%) から、外国産鶏肉では 114 検体中 17 検体 (14.9%) からサルモネラが分離された(表 5)。国産鶏肉で分離株の大半を占めたのは、鶏肉からの分離頻度が高い *S.Infantis* で、85 株分離された。薬剤感受性試験では、85 株中 80 株が供試した 12 薬剤のいずれかに耐性を示した。耐性株の 80 株中 30 株 (37.5%) が 4 剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌で、血清型は *S.Infantis* (27 株) と *S.Typhimurium* (3 株) であった。また、ヒト由来株と同一の耐性パターンを示す *S.Infantis* と *S.Typhimurium* が分離された(表 6)。外国産鶏肉でもっとも多く分離

された血清型は、11 株分離された *S. Enteritidis* であった(表 7)。国産鶏肉分離株の大半を占めた *S. Infantis* は1株しか分離されなかった。薬剤感受性試験の結果、すべて供試した 12 薬剤のいずれかに耐性を示し、*S. Enteritidis* は分離 11 株 がキノロン剤である NA に耐性を示した。

(3) 腸管出血性大腸菌

埼玉県内で 2003 年から 2005 年、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 8 に示した。分離された 275 株で最も多く分離された血清型は、O157:H7 が 210 株であった。分離 275 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 48 株(17.5%)であった(表 9)。NA 耐性の O26:H11 は 2 株ともフルオロキノロン剤である CPFX と NFLX に低感受性であった。これら 2 株のキノロン耐性決定領域におけるアミノ酸変異を調べた結果、*gyrA* で 1 つのコドン(83 位のセリン)、*parC* で 1 つのコドン(80 位のセリン)の変異を確認した。しかし 87 位のアスパラギン酸での変化は見られなかった。また、SM・TC・ABPC 耐性であった O26:H11 が分離された患者の回復後検便で、SM・TC・ABPC だけでなく、第 3 世代セフェム系薬剤であるセフトキシム(CTX)及び KM に対し

て耐性を示す O26:H11 が分離された。プラスミドプロファイルの解析により発症時に分離された菌株と比較して 80~90kb のプラスミドが 1 本付加していることがわかった。その後の解析により、クラス A の β ラクタマーゼ産生菌の CTX-M-3 型遺伝子を保有していた。

E. 考察

本研究の結果から、サルモネラおよび腸管出血性大腸菌において、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や第 3、4 世代セフェム剤の耐性菌の存在が確認された。フルオロキノロン剤では、耐性を示した *S. Typhimurium* 8 株が薬剤耐性パターン、ファージ型、PFGE パターン等で同一または類似していたことから共通の感染源が示唆されたが、すべて散発例であったことや患者の半数を乳幼児が占めていたことなど、今回の疫学調査では共通感染源の解明には至らなかった。今後も、薬剤耐性菌の患者情報など疫学データの蓄積によって感染源の解明を進めていく必要がある。

家庭内食中毒事例を足がかりに、分離株の薬剤耐性パターンやファージ型等の疫学マーカーを利用し、diffuse outbreak を探知した事例では、原因となったサルモネラにより汚染された農場を特定し、環境改善などでそれ以上の