

薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究

(課題番号：H18-食品-一般-003)

平成18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 18 年度総括研究報告書

薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究……………1

主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所

2. 平成 18 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……………8

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 "

(II) 食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究…………… 25

分担研究者 山口 正則 埼玉県衛生研究所

協力研究者 倉園 貴至 "

大塚佳代子 "

(III) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究…………… 39

分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

協力研究者 横山 敬子 "

小西 典子 "

山田 澄夫 "

(IV) 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネージメントに関する研究…………… 51

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 "

朝倉 宏 "

山崎 学 "

石和 玲子 "

(V) 家畜由来腸内細菌の疫学的研究…………… 62

分担研究者 鮫島 俊哉 農林水産省動物医薬品検査所

協力研究者 浅井 鉄夫 "

小澤真名緒 "

(VI) 家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析..... 73

分担研究者	秋庭 正人	農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所
協力研究者	吉井 紀代	〃
	中澤 宗生	〃
	片岡 康	日本獣医生命科学大学獣医微生物学教室

(VII) 食品汚染腸内細菌の薬剤耐性疫学..... 81

分担研究者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	勢戸 和子	〃
	河原 隆二	〃
	山崎 涉	〃
	塚本 定三	〃
	林 昭宏	関西空港検疫所
	江田 淳二	〃
	井村 俊郎	〃
	柏樹 悦郎	〃

3. 研究発表一覧..... 96

「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」

主任研究者： 渡辺治雄 国立感染症研究所副所長

研究要旨：

食中毒細菌の中でフルオロキノロン剤、セファロスポリン剤に対する耐性菌の増加が懸念されている。本研究班で実態調査を行い以下の点を明らかにした。

(1) 散発下痢症患者から分離された *S. Typhimurium* の耐性率は56.0%で、そのうち8株がフルオロキノロン剤に耐性を示した。そのうち2株は第3世代セフェム系薬剤であるCTXにも耐性を示した。(2) 2005年に血便を呈し死亡した牛からフルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が分離された。(3) また、ネコからもフルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が分離された。それらの株はファージ型、遺伝型が類似しており、同じクローンであることが示唆された。フルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が広域に浸潤してきている現状が把握できた。(4) 患者由来 *C. jejuni* のニューキノロン剤耐性率は毎年30%前後であった。治療の第一選択薬であるEMに対する耐性率は、*C. jejuni* では毎年1~2%程度であった。*C. coli* では20%~41.7% (2006年) と、近年増加傾向が認められた。

分担研究者：

秋庭正人：(農業・食品産業技術総合
研究機構動物衛生研究所)

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)

田口真澄：(大阪府立公衆衛生研究所)

泉谷秀昌：(国立感染症研究所)

研究目的：

食中毒の主たる原因菌であるサルモネラ、カンピロバクター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。食品媒介性病原細菌等の抗菌剤感受性を調べ、その現状を把握することにより、抗菌剤の慎重使用を喚起してその有効性を確保すると共に、畜産界での抗菌剤使用の公衆衛生分野に及ぼすリスク分析の基礎資料に資する目的で、食品媒介性病原細菌としてサルモネラとカンピロバクター、腸管出血性大腸菌をそれぞれ調査対象として実施する。中でも公衆衛生上重要性の高いサルモネラとカンピロバクターに注目して、1) 薬剤耐性の現状と薬剤耐性因子の分布状況の確認及び、2)

分離された薬剤耐性菌についての分子遺伝学的手法による疫学解析を実施した。特に治療薬として臨床的に重要なフルオロキノロン系薬、第3, 4世代セファロスポリン系薬に対する耐性状況に注目しての調査を行う。厚生、農林関係の組織の共同で行うことを特徴としており、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) 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。使用した薬剤はゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ST合剤(SXT)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、オフロキサシン(OFLX)、ホスホマイシン(FOM)、ノルフロキサシン(NFLX)、スルフィソキサゾール(Su)を供試した(場合によってセファロチン(Cf)も使用)。カンピロバクターにはNA, NFLX, OFLX, CPFX, エリスロマイシン(EM)であった。最小発育阻止濃度MICはEtestあるいはマイクロタイタープレート(MP)を用いて決定した。家畜由来株にはDSM, KM, OTC, TMP, ABPC, KM, CEZ及びERFXが用いられた。

2) ファージ型別：英国HPA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。

3) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)：米国疾病管理センター(CDC)により推奨されているパルスネットプロトコールに準じて実施した。

4) 薬剤耐性遺伝子の解析：薬剤耐性パターンから推測された遺伝子に関して、既報の類似耐性遺伝子の配列からプライマーを設計し、PCRによるDNAの増幅を行った。定法のアガロースゲル電気泳動によってDNA増幅を確認した後、Dye-terminator法によって塩基配列の決定を行った。得られた配列に対してBlast等を用いて相同性検索を行った。

5) キノロン系薬剤耐性化機構の解析：トポイソメラーゼ遺伝子(*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*)のQuinolone Resistance Determining Region(QRDR)をPCR増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。これによりナリジクス酸耐性を引き起こしたトポイソメラーゼのアミノ酸置換部位を特定した。

C. 研究結果

1. サルモネラ

(1) ヒト散発事例由来サルモネラ：フルオロキノロン耐性 *S. Typhimurium* 埼玉県内で2006年に、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176株は40血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Enteritidis*が43株、次いで *S. Typhimurium*が25株、*S. Saintpaul*が10株の順であった。この176株のうち59株(33.5%)が12薬剤のいずれかに耐性を示し、*S. Enteritidis*では43株のうち22株(51.2%)が耐性を示し、SM単剤耐性が18株と最も多かった。*S. Typhimurium*では25株のうち14株(56.0%)が耐性を示した。2003年から2005年まで連続して検出されているCPFXやNFLXなどフルオロキノロン剤に耐性を示す株が9例から分離された。血清型は *S. Typhimurium*が8株、

Typhi が1株であった。ファージ型は、*S. Typhimurium* ではDT193が4株、DT12が4株であり、TyphiはUVS4であった。Typhiの感染者はタイ、インドを50日間旅行後、発熱を主訴とする患者であった。治療は感受性を示したCTXで治療を試みたが、効果が見られず、ミノサイクリンとフォスホマイシンの投与により、解熱、回復した。*Typhimurium*の事例1は高頻度に嘔吐・下痢を繰り返し、急性胃腸炎にて1週間の入院治療を余儀なくされた60歳代の男性であった。下痢発症の一週間前から飼い犬に嘔吐と下痢が見られていたことから、ペットからの感染が疑われた。事例2は下痢、発熱の症状を呈した1歳の幼児から分離された。下痢発症数日前に飼い猫の下痢が見られ動物病院を受診していた。分離された*Typhimurium*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、*gyrA*で2つのコドン(83位のセリン、87位のアラニン)、*parC*で1つのコドン(80位のセリン)の変異が確認された。さらに、この2株はフルオロキノロン剤だけではなく、第3世代セフェム系薬剤であるCTXに対しても耐性であり、遺伝子検索の結果CTX-M-2の遺伝子を保持していた。

(2) 海外渡航者由来菌株：

2004年から2005年に海外渡航歴のある患者から分離された108株は38の血清型に型別され *S. Enteritidis* が最も多い血清型で、次に *S. Weltevreden*、*S. Stanley*、*S. Corvallis* が多く分離された。薬剤感受性試験結果は42株(38.9%)が耐性菌であった。*S. Enteritidis* では2株(11.1%)のみが耐性菌であったが、*S.*

Corvallis、*S. Rissen*、*S. Typhimurium* は全て耐性菌であった。2004年9月にフィリピンから帰国した患者からSM, TC, CP, ST, NA, CPLX, OFLX 耐性の *S. Singapore* が分離された。また、2005年1月にタイから帰国した患者からABPC, SM, TC, CTX, CP, GM 耐性の *S. Rissen* が分離された。NA耐性菌は108株中18株(16.7%)あり、国内発生より高い割合であった。

(3) 食肉由来サルモネラ：

422検体中99検体(23.5%)からサルモネラが分離された。国産鶏肉は249検体検査し96検体(38.6%)からサルモネラが分離された。国産鶏肉由来の101株は、OUTを含めて8つの血清型に型別され、*S. Infantis* が75株(74.3%)と最も多かった。薬剤感受性試験結果は *S. Agona* 2株と *S. Montevideo* 1株が感受性であったが、それら以外のほとんど(97.1%)が耐性菌であった。国産鶏肉由来 *S. Infantis* の中でCTX耐性菌が2株あり、NA耐性菌は *S. Infantis* で8株、*S. (1)OUT:r:1,5* で1株の合計9株で、全体の8.9%であった。CTX耐性菌では、*S. Infantis* は2株とも基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)産生菌であり、*blaCTX-M-14*、*blaCTX-M-3* 遺伝子を保有していた。

鶏肉由来 *S. Enteritidis* 株の中にセフトキシム耐性株が(R-ACtNCf)1株同定され、*blaCTX-M-14* 遺伝子を保有することが明らかとなった。ESBL産生性SEについては2003年に発生した散発事例において国内で初めて報告されたが、その株と上記鶏肉由来株の比較を行った。ファージ型は両者とも6aであり、PFGEパターンも *XbaI* および *BlnI* いずれの制限酵素を用いた場合も非常に類似していた。しかし

ながら、ナリジクス酸耐性と関係のある *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域における変異が、2003年散発例由来株では GAC→AAC (D87N) であったのに対し、2004年鶏肉由来株では GAC→GGC (D87G) と異なっていた。

(4) 家畜由来サルモネラ薬剤感受性：ERFX 耐性 *S. Typhimurium* DT12 の分離

健康家畜由来サルモネラ株の血清型は、7種類認められ、そのうち *S. Infantis* が21株(ブロイラー由来19株、採卵鶏由来2株)で、約半数を占めていた。一方、病畜由来株の血清型は、21種類認められ、そのうち *S. Typhimurium* が67株(牛由来42株、肥育豚由来21株、鶏由来4株)で、約半数を占めていた。

健康家畜由来株では、DSM、KM、OTC 及び TMP に対する耐性率は50%以上を示し、その他の薬剤に対する耐性率は20%未満であった。一方、病畜由来株では、DSM 及び OTC に対する耐性率は60%以上、ABPC 及び KM に対する耐性率は30%以上を示した。病畜由来株において、CEZ 及び ERFX に対する耐性株がそれぞれ2株と1株で認められた。ERFX 耐性の1株は、2005年に血便を呈し死亡した牛から分離された *S. Typhimurium* (ERFX の MIC: 16 µg/ml) で、*blaOXA-30* を保有し、ABPC-CP-DSM-GM-OTC-NA-TMP-ERFX に耐性を示す多剤耐性 DT12 であった。CEZ に耐性を示した株は、2005年に健康なブロイラーから分離された *S. Infantis* と O 型別不能 (H: r/1, 5) 各1株であった。

(5) 家畜由来多剤耐性 *S. Typhimurium* DT104 の動向調査

牛由来 *S. Typhimurium* 104 株のう

ち、DT104 は28株、DT104B 及び U302 はそれぞれ2株で、DT104 関連ファージ型株は、全体の31%であった。その他、DT104 は、豚由来48株中2株(4%)、鶏由来8株中1株(13%)で認められた。

(6) イヌおよびネコ由来サルモネラフルオロキノロン耐性サルモネラが分離されたヒトの事例で、ペットとの関連が強く疑われたため、イヌおよびネコのサルモネラ保菌状況調査を行った。動物指導センターに収容されたイヌでは148頭中4頭(2.7%)、ネコでは188頭中6頭(3.2%)から分離された。血清型はイヌでは Nagoya と Corvallis、ネコでは Nagoya と Typhimurium が分離された。ネコから分離された Typhimurium でフルオロキノロン耐性が確認された。QRDR におけるアミノ酸変異を調べた結果、*gyrA* で2つのコドン(83位のセリン、87位のアラニン)、*parC* (80位のセリン) および *parE* (458位のセリン) の変異が確認された。これは2003年に分離されたヒト由来 Typhimurium と同じ遺伝子変異を示した。

2. 腸管出血性大腸菌

2006年に送付された EHEC 菌株から200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73%であった。次いで耐性パターン (R-) STSu、R-ASTSu が全体の約4-6%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5株 (R-F) 検出された。その内訳は血清群 O26 が4株、O157 が1株であった。

3. 赤痢菌

海外渡航者由来赤痢菌 798 株 (内訳

は *S. sonnei* 613 株、*S. flexneri* 129 株、*S. boydii* 35 株、*S. dysenteriae* 21 株) のうち 739 株 (92.6%) が耐性でそのうち 226 株 (30.6%) が NA 耐性株であった。NA 耐性菌 226 株のうち CPF_X で MIC 4 μ g/mL 以上を示す耐性菌は *S. flexneri* 2 株のみであった。143 株 (63.3%) は MIC 0.125 μ g/ml 以上のニューキノロン低感受性菌であった。これらのニューキノロン低感受性菌は、インド、ネパール、中国が感染国と推定された菌株に多く、2004 年度分離株では各 85.2%、57.1%、80% を占めていた。

4. カンピロバクター

(1) 患者由来カンピロバクターの薬剤耐性

2000 年～2006 年に東京都内で分離された散発下痢症患者由来の *C. jejuni* 1,320 株のニューキノロン耐性率は 26% (2000 年), 38.2% (2001 年), 28.4% (2002 年), 26.8% (2003 年), 38.6% (2004 年), 27.4% (2005 年), 35.2% (2006 年) と毎年 30% 前後で推移していた。*C. coli* 60 株の耐性率は年によって異なっており、2001 年では分離菌株の 100%, 2003 年は 90%, 2006 年では 75% が耐性であったが、その他の年は 40% 前後の耐性率であった。治療の第一選択薬である EM に対する耐性率は、*C. jejuni* では毎年 1～2% 程度であった。*C. coli* では 20% (2003 年), 11.1% (2004 年), 14.3% (2005 年), 41.7% (2006 年) と、近年増加傾向が認められた。

(2) 家畜由来カンピロバクター

Campylobacter jejuni 90 株及び *C. coli* 68 株 (*C. jejuni* は主に肥育牛、採卵鶏及びブロイラー、*C. coli* は肥育豚由来) の耐性率は、EM では *C.*

jejuni 0% 及び *C. coli* 35.3% であった。ERFX では *C. jejuni* 17.8% 及び *C. coli* 25.0% であった。

D. 考察

本研究により、家畜、食肉、ヒトから分離された食中毒関係細菌サルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌の薬剤耐性率の全体像が把握できるようになった。

家畜由来サルモネラの薬剤耐性に関して、健康家畜由来株ではプロイラー由来 *S. Infantis* (DSM・OTC・KM・TMP 耐性) が、また、病畜由来株では牛由来 *S. Typhimurium* (ABPC・DSM・KM・OTC 耐性) が優勢であるといった由来動物及び血清型の違いが見られた。

我が国の家畜におけるフルオロキノロン (FQ) 耐性サルモネラは、2001 年に病豚から分離された *S. Choleraesuis* (Ezaki ら、2003) 及び 2001 年に牛から分離された *S. Typhimurium* が報告されているのみである。今回の調査で分離された FQ 耐性 *S. Typhimurium* は、*bla*OXA-30 を保有し、ABPC-CP-DSM-GM-OTC-NA-TMP に耐性を示す多剤耐性 DT12 であった。これらの性状は、2001 年に牛からの分離された株と極めて類似していた。この FQ 耐性 *S. Typhimurium* は、ヒトから分離されている菌株とファージ型、遺伝型においてもきわめて類似している。また、ネコから分離された FQ 耐性 *S. Typhimurium* とも類似していた。これらの耐性菌の相互の関連性に関する疫学的情報は得られていないが、遺伝学的性状からは同一クローンに由来するものと考えられる。特に、FQ 耐性 *S. Typhimurium* が小児、幼児から分離されていることおよびその家庭で飼育していたイヌ、ネコ等のペ

ットが先に下痢症状を呈していたことを考えると、それらペット等に与えているペットフード等との関連性を調べる必要があるのかもしれない。今後の更なる調査により関連性を明らかにすることが重要である。

多剤耐性 *S. Typhimurium* については、1990年代に流行した成牛のサルモネラ症に罹患した病牛から、ファージ型 104 (DT104) が分離され、DT104 は、1990年代初期に国内の牛に侵入していたことが明らかにされている。また、我々は、1999～2001年の調査では、牛から分離された 71.9%と豚から分離された 31.4%の *S. Typhimurium* は、DT104 または 104B であったことを報告している (Esaki ら、2004)。2002～2005年の4年間の病畜から分離された *S. Typhimurium* の薬剤感受性試験の成績を集計したところ、牛由来株では CP 耐性率の低下と KM 耐性率の上昇が見られ、豚由来株では ABPC 耐性率及び CP 耐性率の低下が認められた。また、ファージ型別の結果、2002年以降の分離株における DT104 及びその関連ファージ型の割合は、1999～2001年の成績に比べ、有意に低下していた (χ^2 乗検定、 $P < 0.01$)。このことから、DT104 及びその関連ファージ型の動向が、それぞれの動物種における耐性率に影響していると考えられた。

また、興味深いことに鶏に承認されていないセファロスポリン耐性サルモネラの分離が確認された。これまで、家畜においてセファロスポリン耐性大腸菌が、牛 (CTX-M-2) 及びブロイラー鶏 (CTX-M-2、CTX-M-18 及び CMY-2) から分離され、また、多剤耐性 *S. Newport* (CMY-2) が牛から分離されている。ブロイラー鶏由来 *S. Infantis* で CMY-2 及び CTX-M-2、同由来型別不能株で CMY-2 が認められた。これらの

株と市販鶏肉に由来するセファロスポリン耐性 *S. Infantis* 2 株 (Asai ら、2006) と比較したところ、全ての株で異なる PFGE 型を示したことから、異なる由来と推察された。また、CMY-2 型 4 株は、ブロイラー鶏由来 2 株と GF113 株と同様のプラスミドプロファイルを示したことから、共通の耐性因子による耐性機構と推察された。抗菌性物質の使用との関係については、薬剤耐性 *S. Infantis* 分離農場における使用状況と関係していないことは、先の研究班報告書の中で示したが、薬剤耐性 *S. Infantis* が長期にわたり国内のブロイラー鶏飼育農場から分離されていること、また、承認されていない薬剤に対する耐性サルモネラが分離されたことについて、さらに検討していく必要がある。

下痢症患者由来 *C. jejuni* のニューキノロン剤耐性率は毎年 30%前後で推移しており、2001年の 38.2%が最も高かった。TC 耐性は 20～40%の耐性率での増加は認められなかった。治療の第一選択薬である EM では耐性菌はほとんど出現しておらず、大きな変動はなかった。*C. coli* は *C. jejuni* に比べて分離数が少ないため、年によって耐性率に差が認められた。しかしいずれの薬剤でも *C. jejuni* より耐性率が高い傾向であった。特に EM では近年耐性率が増加しており 2006年では分離株の 41.7%が耐性を示したことから、今後は更に菌株を増やして検討していく必要がある。

E. 結論

(1) 埼玉県内で 2006年に、散発下痢症患者から分離された *S. Typhimurium* では 56.0%が耐性を示し、フルオロキノロン剤に耐性を示す株が 8 株分離された。ファージ型は、

DT193 が 4 株、DT12 が 4 株であり、今まで分離されていて株と類似の遺伝型を示した。そのうち 2 株は第 3 世代セフェム系薬剤である CTX にも耐性を示した。幸いミノサイクリンと fosfomicin の投与により患者は治癒したが、今後このような株が乳幼児に感染した場合に治療に困難を呈する可能性が考慮されるので注意を要する。

(2) 2005 年に血便を呈し死亡した牛からフルオロキノロン耐性で DT12 の *S. Typhimurium* が分離されておりヒトから分離されるものと類似していた。

(3) また、ネコからもフルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が分離されており、遺伝学的性状がヒト分離株と類似していた。フルオロキノロン耐性の *S. Typhimurium* が広域に浸潤してきている現状が把握できた。

(4) 鶏肉由来 *S. Enteritidis* 株の中にセフトキシム耐性株が出現してきている。

(5) 患者由来 *C. jejuni* のニューキノロン耐性率は毎年 30% 前後であった。

治療の第一選択薬である EM に対する耐性率は、*C. jejuni* では毎年 1~2% 程度であった。*C. coli* では 20%~41.7% (2006 年) と、近年増加傾向が認められた。

F. 研究発表
別紙参照

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 健康危機情報
フルオロキノロン耐性のみならず、CTX 耐性のサルモネラが分離された。幸い fosfomicin で治療できたが、今後の更なる耐性状況の監視が必要である。

平成 18 年度 厚生労働省 食品の安心・安全確保推進研究事業
「薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究」

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

研究要旨:本研究班では、ヒトの健康への脅威となる食品由来細菌感染症に関して、主として薬剤耐性に着目し、薬剤耐性食中毒菌による健康被害の発生動向を把握するための監視体制に関して、ヒト、食品、環境および家畜といった多方面からの情報整備をすることを目的とする。本分担研究においては、特に、細菌性食中毒の原因物質の第 1 に挙げられるサルモネラをはじめ、食品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。

A. 研究目的

2005 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 16,678 名であった。このうち、27%にあたる 3,700 名が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 3,589 名にのぼる。

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(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(場合によってセファロチン(Cf)も使用)。最小発育阻止濃度 MIC は Etest を用いて決定した。

3. フェージ型別: 英国 HPA より分与された型別用フェージを使用して標準法に従って型別を行った。

4. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE): 米国疾病管理センター(CDC)により推奨されているパルスネットプロトコールに準じて実施した。

5. 薬剤耐性遺伝子の解析: 薬剤耐性パターンから推測された遺伝子に関して、既報の類似耐性遺伝子の配列からプライマーを設計し、PCRによるDNAの増幅を行った。定法のアガロースゲル電気泳動によって DNA 増幅を確認した後、Dye-terminator 法によって塩基配列の決定を行った。得られた配列に対して Blast 等を用いて相同性検索を行った。

C. 研究結果

1. EHEC 分離株における耐性パターン

の分布

当部に2006年に送付されたEHEC菌株から200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-)STSu、R-ASTSuが全体の約4-6%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5株(R-F)検出された。その内訳は血清群O26が4株、O157が1株であった。O26には集団事例関連株3株も含まれていた。

2. SE 集団事例関連株における薬剤耐性の分布

当部に送付されたSE菌株のうち2006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約85%であった。次いでR-SおよびR-Nがそれぞれ約7%を占めた。

近年ST等でナリジクス酸耐性が問題になっているが、上記集団事例関連株について、ナリジクス酸に対する耐性率の推移をまとめてみると図3のように増加

傾向にあることが窺えた。

3. 鶏肉由来SEに関するナリジクス酸耐性について

当部に送付されたSE分離株のうち、主として横浜市から送付された鶏肉由来株について、ナリジクス酸耐性率に関してまとめたところ、図4のように増加傾向が見て取れた。国内産および外国産別で見ると、国内産ではほとんどすべてが感受性株であるのに対し、外国産のものはナリジクス酸耐性が見られ、しかも増加傾向が観察された(図5)。ナリジクス酸以外の薬剤に関しては、国内産ではストレプトマイシン耐性あるいはR-STSuなどがあったが、外国産では4剤耐性株も認められた(図6)。上記菌株を耐性パターンとフェージ型の関連で見ると、ナリジクス酸耐性株ではPT1およびPT4が比較的多く、感受性株ではPT4が比較的多かった(表1)。

4. ESBL 産生性SE

上記鶏肉由来SE株の中にセフトキシム耐性株が(R-ActNcf)1株同定された。本菌株は2004年中国産鶏肉から分離されたもので、ナリジクス酸に対しても耐性を示した。主要な薬剤に対するMIC

は表 2 に示すとおりで、セフトキシム耐性がクラバン酸によって抑制されることからクラス A の基質拡張性 β -ラクタマーゼ (ESBL) 産生性であることが推測された。ESBL に対応する CTX-M クラスの PCR 試験において陽性の結果を得て、その塩基配列決定の結果から *bla*CTX-M-14 遺伝子を保有することが明らかとなった。

ESBL 産生性 SE については 2003 年に発生した散発事例において国内で初めて報告されたが、その株と上記鶏肉由来株の比較を行った。フェージ型は両者とも 6a であり、PFGE パターンも XbaI および BlnI いずれの制限酵素を用いた場合も非常に類似していた(図 7)。しかしながら、ナリジクス酸耐性と関係のある *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性決定領域における変異が、2003 年散発例由来株では GAC→AAC (D87N) であったのに対し、2004 年鶏肉由来株では GAC→GGC (D87G) と異なっていた。

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。例

年ホスホマイシン耐性株は 1% 程度検出されるが、本年の調査結果では約 3% であり、今後の動向に注意を要する。

SE では全体の報告数、食中毒事例数等は減少傾向にあるが、ナリジクス酸耐性株の占める割合が相対的に上昇傾向にあることが窺えた。また、輸入鶏肉においても同様の傾向が観察された。さらに、輸入鶏肉から ESBL 産生株が同定され、以前散発事例から分離された ESBL 産生性 SE と遺伝子型、フェージ型等に関して非常によく似た特徴を有していることが明らかにされた。但し染色体性の *gyrA* 遺伝子において相違が見られたことから、全く同じ菌株ではないと考えられる。しかしながら、このことは 1) 複数の系統のナリジクス酸耐性株が CTX-M-14 型の ESBL を獲得したか、2) ナリジクス酸感受性で同型の ESBL 産生株が別々にナリジクス酸耐性を獲得したことを示唆しており、いずれにしてもこれら治療に関わる抗菌薬への耐性獲得が起こりやすい環境があることを推測させるものである。

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

感染症および EHEC 感染症は家畜等の動物およびそこから派生する食品から由来する感染症の代表的なものである。両者の耐性菌の出現状況ならびにその遺伝学的背景の知見についてより広い材料を対象にサーベイランスを行うことの重要性が改めて示唆された。

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。

F. 健康危険情報

ナリジクス酸耐性 SE および、主要な食材である鶏肉に由来するサルモネラに対しても耐性獲得状況に関する注意が必要である。

G. 研究発表等

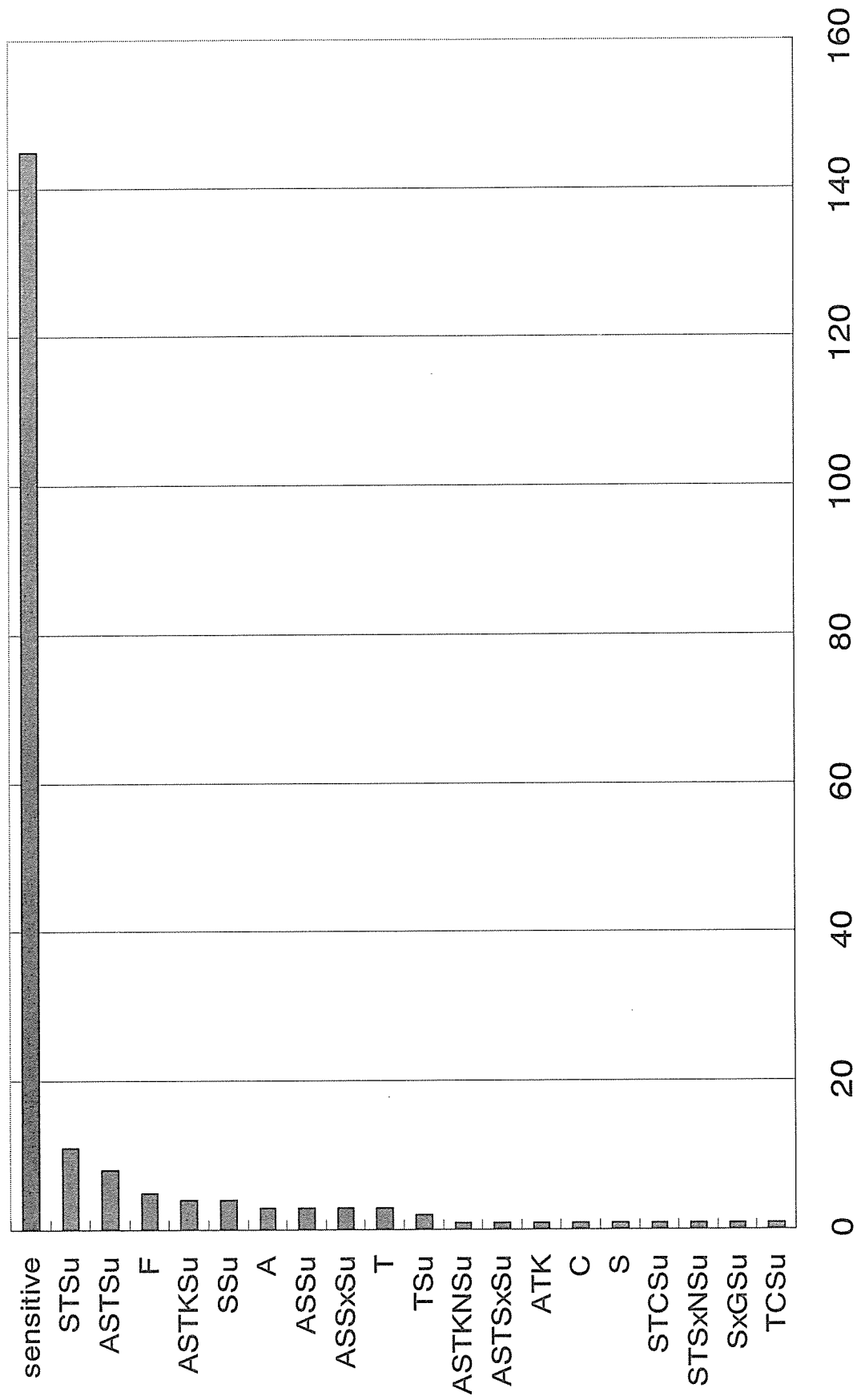
- (1) M. Taguchi, K. Seto, W. Yamazaki, T. Tsukamoto, H. Izumiya and H. Watanabe: CMY-2 β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from poultry in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 59 (2), 135-137, 2006.

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

図1. EHEC分離株の耐性パターン分布(2006)



(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

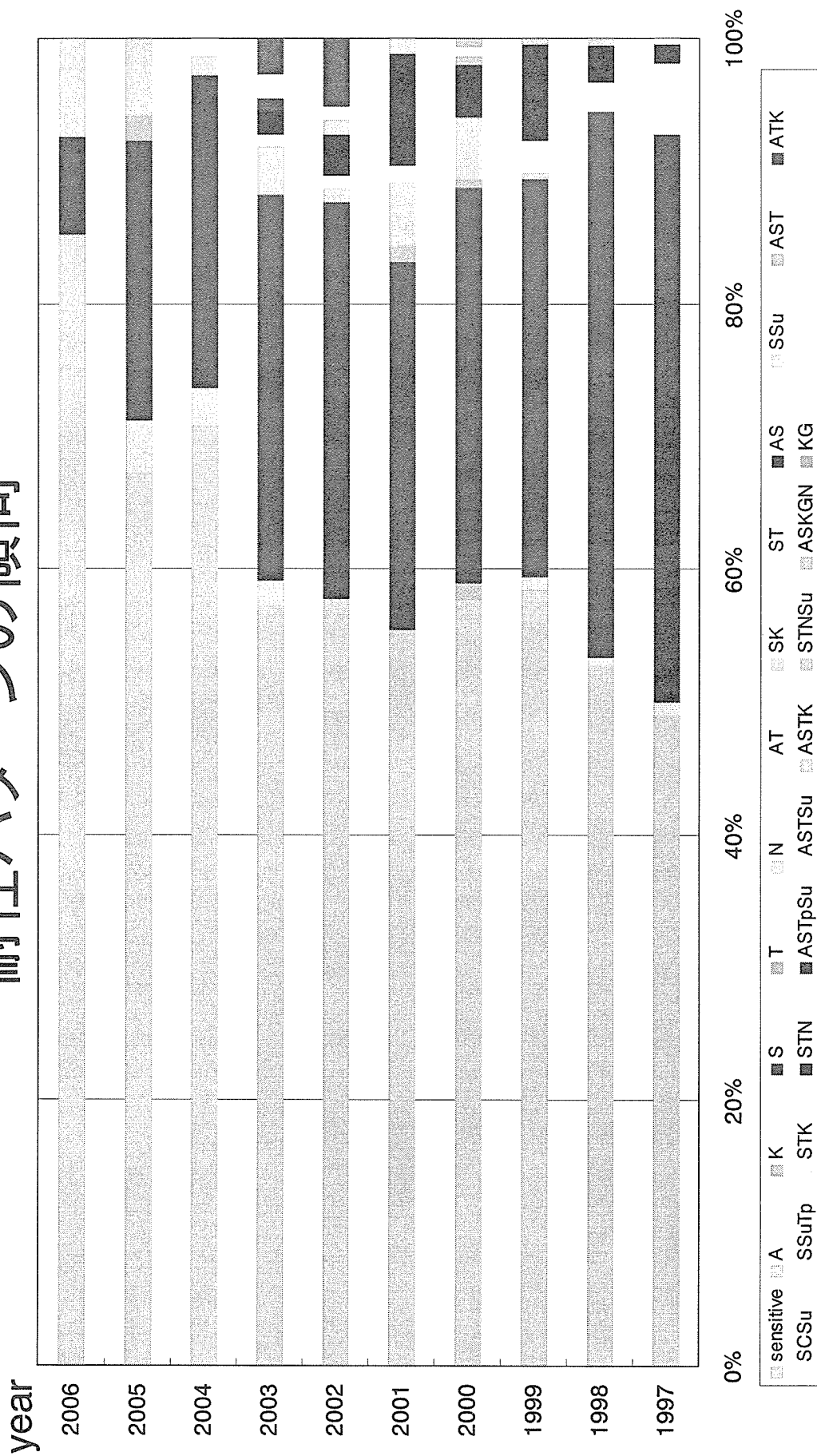


図3. *Salmonella* Enteritidis 集団事例関連菌株の薬剤耐性 (ナリジクス酸耐性率)

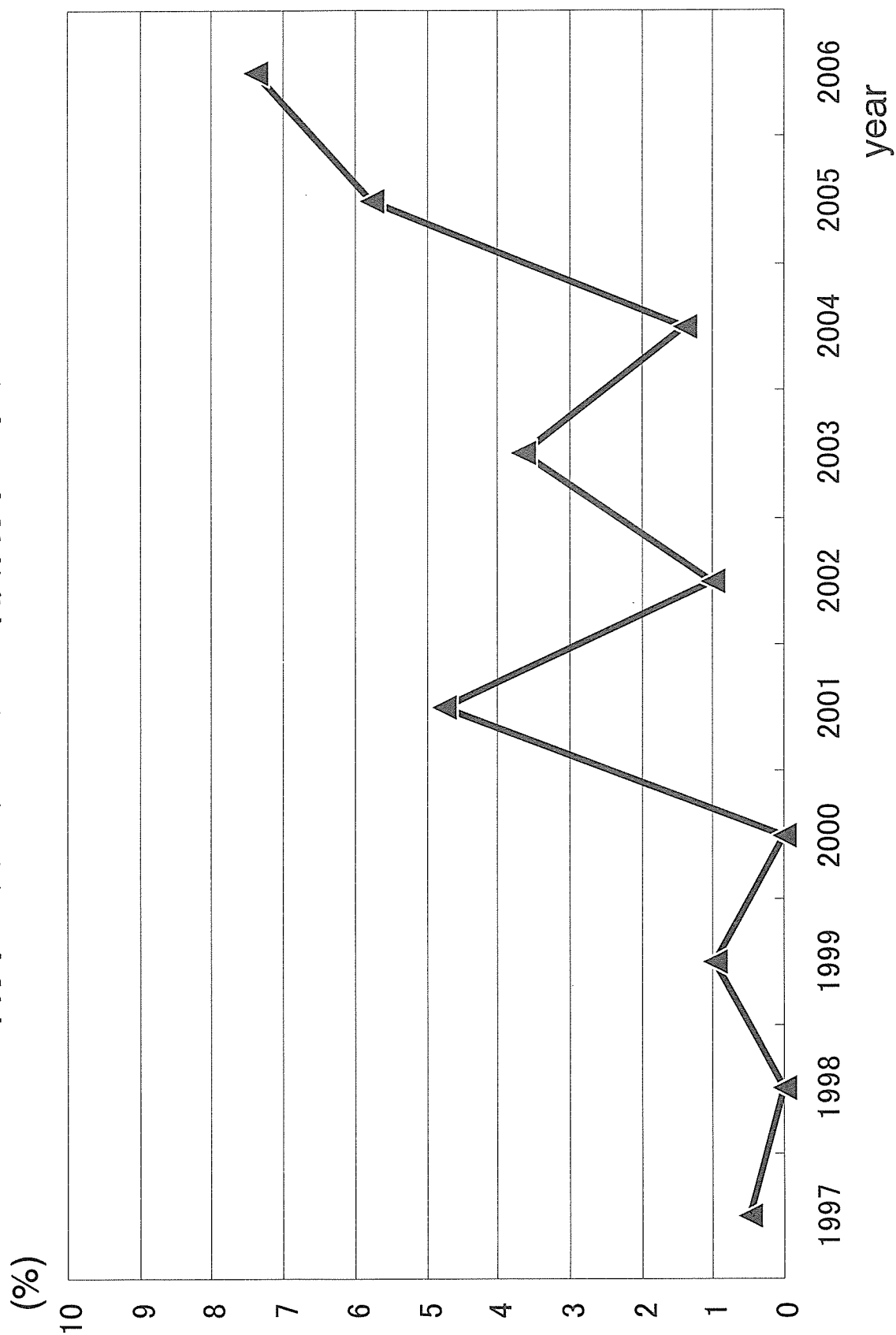
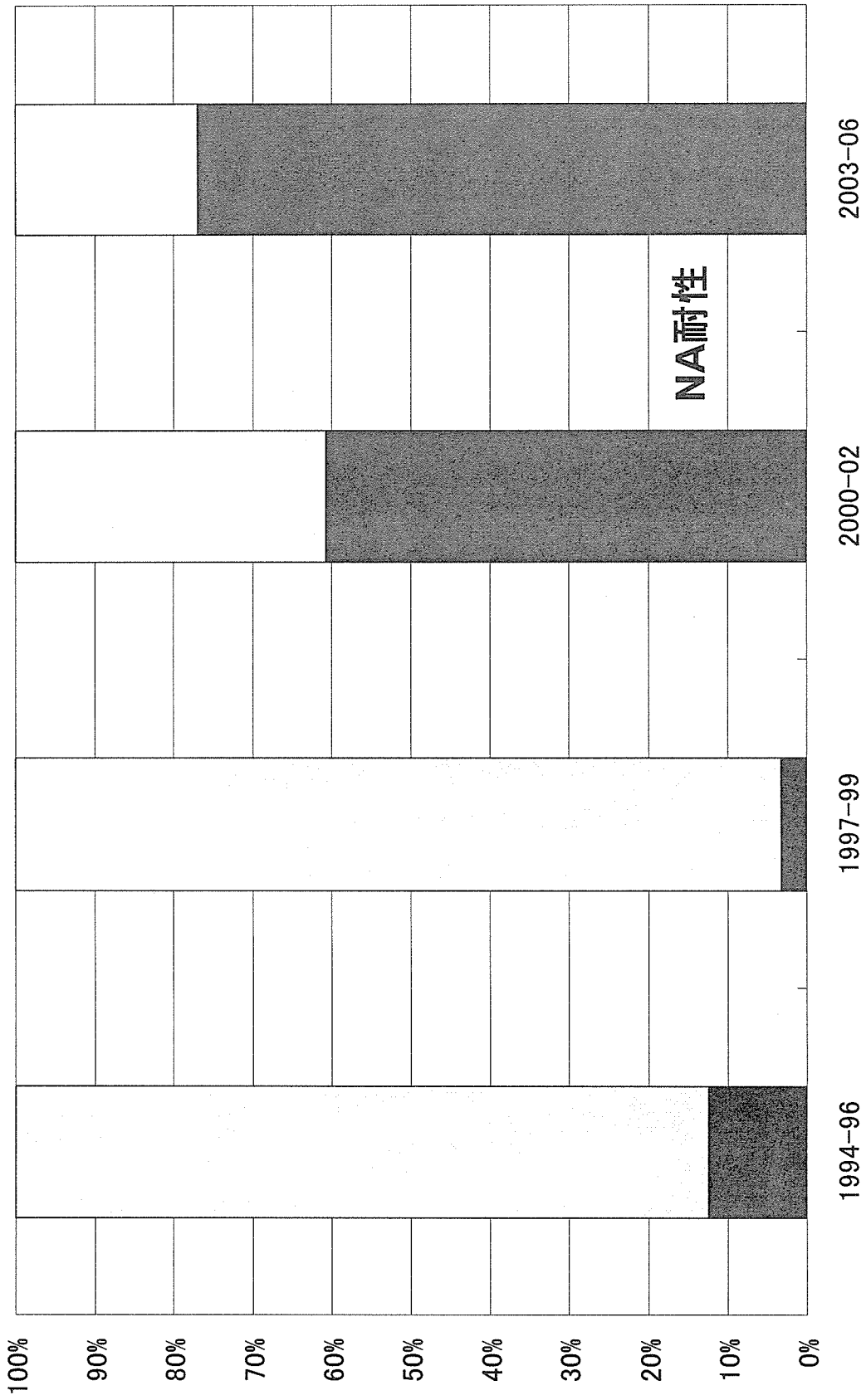


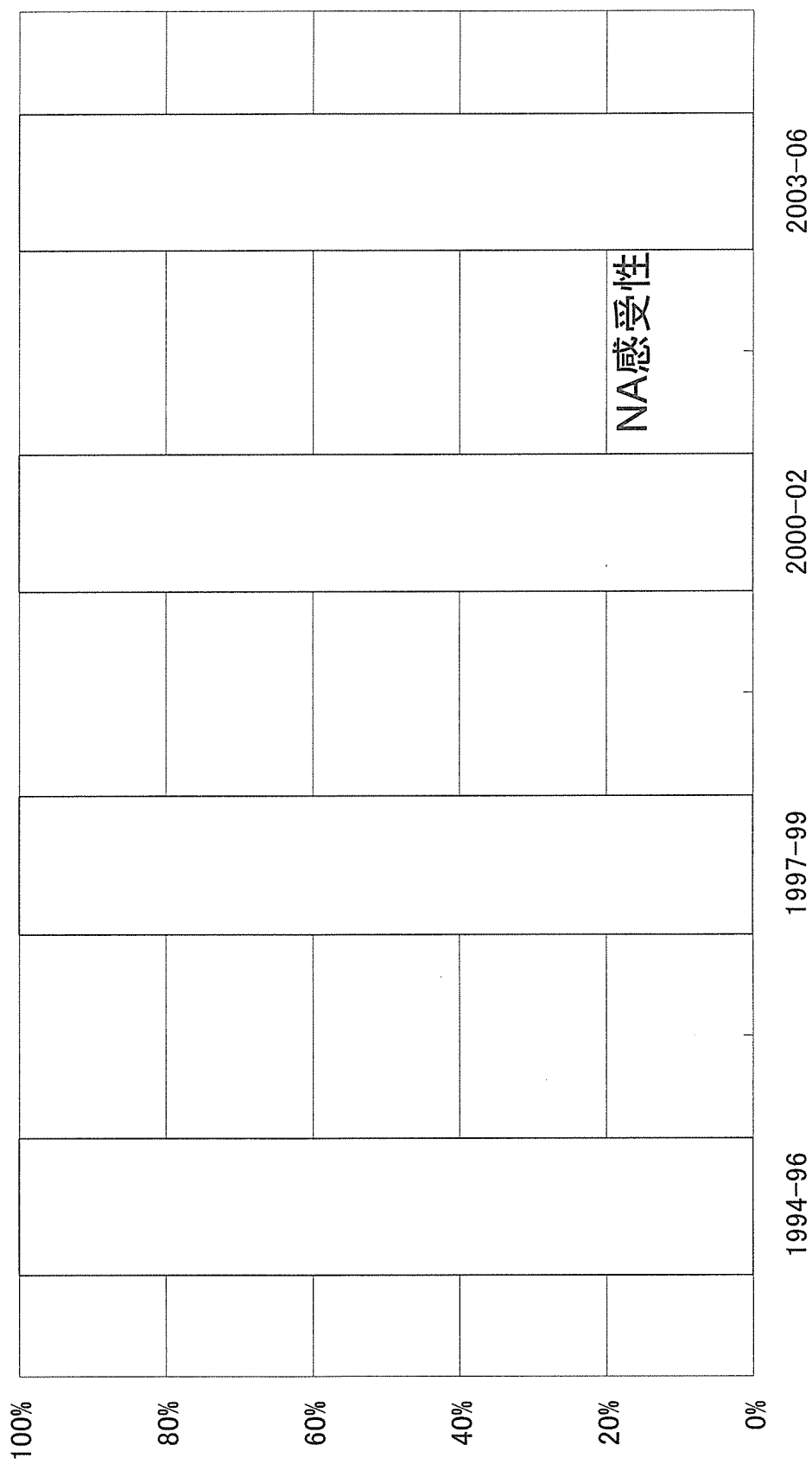
図4. 鶏肉由来Salmonella Enteritidis



(n=80:不明2を含む) (IASR, 27, 193, 2006参照)

図5-1. 鶏肉由来 *Salmonella* Enteritidis

国内産



(n=27)