

200734015A

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19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 19 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 19 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…………… 9

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 "

松本 裕子 横浜市衛生研究所

(II) 食品・ヒト由来食中毒細菌の薬剤耐性の疫学的研究…………… 16

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 "

上野 裕之 さいたま市健康科学研究センター

(III) ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の疫学的研究…………… 24

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 "

金子 誠二 "

小西 典子 "

(IV) 食中毒菌の薬剤耐性獲得のリスクマネジメントに関する研究…………… 33

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力者 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…………… 45

分担研究者 石川 整 農林水産省動物医薬品検査所

研究協力者 浅井 鉄夫 "

小池 良治 "

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..... 60

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
研究協力者	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..... 69

分担研究者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	勢戸 和子	〃
	河原 隆二	〃
	山崎 涉	〃
	坂田 淳子	〃
	井上 清	〃
	林 昭宏	関西空港検疫所
	江田 淳二	〃
	柏樹 悦郎	〃

(VIII) イヌ由来大腸菌と腸球菌の薬剤耐性調査..... 82

分担研究者	田村 豊	酪農学園大学獣医学部獣医公衆衛生学教室
-------	------	---------------------

3. 研究発表一覧..... 90

平成19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

「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148株 *S. Typhimurium* のうちフルオロキノロン高度耐性菌が3歳および1歳の患者から2株分離された。両株とも他の10剤に耐性の多剤耐性菌であった。(2) 2006年に収集した健康家畜由来64株と病畜由来111株を調査した結果、フルオロキノロン(ERFX)に対する高度耐性な *Salmonella Typhimurium* (1株) が病畜から認められた。CEZ耐性株は、健康家畜由来株から分離された。(3) 国産鶏肉177検体から分離したサルモネラ90株中で、ESBL産生が3株(3.3%)とAmpC型βラクタマーゼ産生が5株(5.6%)検出された。ESBL産生株は *S. Infantis* 2株(耐性遺伝子 *blaCTX-M-14*) および *S. Manhattan* 1株(*blaCTX-M-2*)であり、AmpC型βラクタマーゼ産生株は5株とも *S. Infantis* (*blaCMY-2*)であった。(4) 180頭の犬の糞便の大腸菌147株中68株(46.3%)が耐性であり、その率はABPCに30.6%、第3代セフェム剤CPDXに14.3%、ERFXに17.7%であった。フルオロキノロン、セファロスポリン系の薬剤に対する耐性が進んでいる現状が明らかにされた。

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)

石川 整(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)

田村 豊(酪農学園大学)

泉谷秀昌(国立感染症研究所)

A. 研究目的

近年、サルモネラ、カンピロバクター等の食中毒菌におけるニューキノロン（フルオロキノロン）系抗菌薬を含む多剤に対する耐性化が問題となっている。それら耐性菌により感染した小児らで治療が困難を呈した例が報告されている。耐性化は、一部では、家畜等への過度の抗菌薬の使用が原因となっていると推測されており、食中毒菌の耐性化による健康人への健康危害の拡大が危惧されている。その被害を科学的に判断するためには、家畜への抗菌薬の使用、家畜における耐性菌の出現、食品の生産・流通段階における汚染菌の耐性状況、および消費された場合の患者における耐性菌の分離状況に関するデータの蓄積が要求される。それを推進するため、本研究においては、家畜飼育現場（農林省関連機関：動物医薬品検査所および動物衛生研究所）、食品取り扱い現場（国立医薬品食品衛生研究所）、医療現場にかかわる機関（国立感染症研究所、地方衛生研究所）、ペット等の愛玩動物の調査（酪農学園大学）の連携による、実態調査に基づく食中毒関連細菌の耐性状況の経時的サーベイランス体制の構築、耐性菌の伝播状況の科学的解析を行う。それにより、家畜等に使用された抗菌薬の結果出現した耐性菌がヒトの健康にどのような影響を及ぼしているのかを推測するデータを蓄積する。

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)、アンピシリン(AMP)、セファゾリン(CFZ)、セフォタキシム(CTX)、セフトリアキソン(CRO)、セフトオフル(CTF)、エンロフロキサシン(EFX)、セファロチン(Cf)、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、OTC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。

6) 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ると同時に、それらがトランスポゾンあるいはインテグロン等の“動く遺伝子”であるのかどうか、および耐性遺伝子の生成過程を解析する。

C. 研究結果

1) ヒト由来株の解析；

a) 2007年において、国内患者由来148株の *Salmonella* Typhimurium を調査した結果、問題となるフルオロキノロン高度耐性菌が3歳および1歳の患者から2株分離された。両株とも他の10剤に耐性の多剤耐性菌であった。また、下痢症状を呈した肝硬変で入院中の患者からフルオロキノロン剤に対して耐性を示す別の血清型のサルモネラ *Salmonella*. Kentucky も分離された。

b) H18年4月～H19年3月の2年間に分離された海外渡航者下痢症由来赤

痢菌 162 株の薬剤感受性試験を行い、NA 耐性は 67 株 (41.4%) あった。その中でフルオロキノロン耐性は 5 株 (いずれも *S. flexneri* 2a) あり、感染国はインドが 4 例、タイが 1 例であった。

c) H19 年 1 月～10 月に大阪府内の患者および健康者から分離された EHEC 0157 186 株の薬剤耐性を調べた結果、AmpC 型 β ラクタマーゼ産生株が 5 株検出された (ABPC・SM 耐性が 1 事例 3 株、ABPC・CP 耐性が 1 事例 1 株、ABPC 耐性が 1 事例 1 株)。耐性遺伝子はいずれも *bla*CMY-2 であった。

2) 鶏肉由来株；

a) H19 年 1 月～6 月に大阪府内で流通している国産鶏肉 177 検体から分離した 90 株 (79 検体由来) の薬剤感受性試験を行った。その中で、ESBL 産生が 3 株 (3.3%) と AmpC 型 β ラクタマーゼ産生が 5 株 (5.6%) 検出された。ESBL 産生株は *S. Infantis* 2 株 (耐性遺伝子 *bla*CTX-M-14) および *S. Manhattan* 1 株 (*bla*CTX-M-2) であり、AmpC 型 β ラクタマーゼ産生株は 5 株とも *S. Infantis* (*bla*CMY-2) であった。

3) 牛由来株；

a) 牛から分離されたセファゾリン耐性 *S. Typhimurium* の性状を解析した。いずれも *bla*_{CMY-2} 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 β ラクタマーゼ産生菌であったが、*bla*_{CMY-2} 遺伝子が染色体上に存在する株と病原性プラスミド上に存在する株が認められた。後者は第 3 世代セフェムにも耐性を示した。

b) 2006 年に収集した健康家畜由来 64 株と病畜由来 111 株を調査した結果、

フルオロキノロン (ERFX) に対する耐性株は、健康家畜由来にはなかったが、病畜由来では牛由来 *Salmonella* Typhimurium (1株) に認められた。CEZ 耐性株は、健康家畜由来株で同一個体から分離された *S. Infantis* (2株)、病畜由来では *S. Typhimurium* (牛由来2株)、*S. Infantis* (ブロイラー由来1株) 及び *S. Newport* (牛由来1株) に認められた。

4) ペット由来菌；

a) 180頭の犬の糞便からの大腸菌では、調べた147株中68株(46.3%)で耐性が認められた。耐性菌の出現率は、ABPC に対して30.6%と高く、第3代セフェム剤であるCPDX に対して14.3%、ERFX に対して17.7%が耐性を示した。

b) 犬、猫、小鳥、エキゾチックアニマルなどの症例のうち、910症例(2005年度581症例、2006年度329症例)が細菌感染症と診断され、このうち58症例(6.4%)で起因菌として大腸菌が分離同定された。分離された大腸菌59株のうち、33株(55.9%)は3剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。第3世代セフェム系薬剤、CTF とフルオロキノロン系薬剤、EFX の耐性率は、それぞれ39.0%及び54.2%であった。

c) *E. faecalis* では、DSM (62.5%) に対する耐性が最も高く、OTC (42.9%)、GM(35.7%)、CP(33.9%)、LCM(26.5%)、EM(26.8%)、KM(21.4%)が続いた。ERFX に対する耐性は1株(1.8%)であった。VCM と TPN に対する耐性株は認められなかった。

d) *E. faecium* では、DSM(49.5%)に対する耐性が最も高く、OTC(48.6%)、KM(30.8%)、EM(27.1%)、GM(23.4%)、LCM(21.5%)、ABPC(15.9%)、CP(14.4%)が続いた。ERFX に対しては、*E. faecalis* と異なり27.1%が耐性株であった。VCM と TPN に対する耐性株は認められなかった。

e) 過去の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收容されたイヌ227頭、ネコ72頭の便を材料として実施した。イヌでは227頭中3頭(1.4%)から分離されたが、ネコでは72頭のいずれからも分離されなかった。イヌ3例の血清型は、1株は *S. Braenderup* と同定されたが、残りの2株は血清型名を決定できなかった。

5) 食品中のMRSA 汚染を調べた結果、1件(レバ刺し)からMRSA が検出された。今後、より正確に汚染状況を把握すると共に、ヒトへの影響等を考察するためにも、菌株数を増やして調査していく必要がある

D. まとめ：

ペット犬における耐性菌出現率が生産動物に比べて高いことが明らかとなり、医療で重要視される第3代セフェム剤やフルオロキノロン剤に対する耐性菌も多いことが明らかとなった。CPDX は人体用の第3世代セフェム系抗菌剤であり、CPDX 耐性菌が現在

ヒトの医療で問題視されている基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) を産生している可能性がある。今後、耐性菌の性状を詳細に明らかにし、ヒト由来 ESBL 産生菌との関連を調べる必要がある。

患者由来 *Salmonella* Typhimurium のなかに医療上問題となるフルオロキノロン高度耐性菌が毎年のように分離されてきている。病畜由来 *Salmonella* Typhimurium にもフルオロキノロン高度耐性菌が分離されており、因果関係が疑われる。また近年、牛由来株を含めて、継続的にセファロスポリン耐性サルモネラが分離され、家畜間でのセファロスポリン耐性サルモネラの蓄積が示唆される。健康家畜由来大腸菌におけるセファロスポリン耐性が低率ではあるが継続的に認められている。国内で分離されたセファロスポリン耐性大腸菌から遺伝子の伝播が行われた可能性や、特定の起源に由来するセファロスポリン耐性サルモネラの拡散は、家畜衛生及び公衆衛生上重要な問題として捉え、継続的に調査研究を実施していく必要がある。

今回の調査では、サルモネラに関しては、セファロスポリン耐性サルモネラの分布と、農場における当該薬剤、および co-selection 薬剤使用との関連性が明らかにできなかった。それほど簡単な図式ではないと思われるので、今後は環境汚染やネズミ等の野生動物の動きや人の動きによる耐性菌の運搬も含めて検討していく必要が

あろう。

E. 健康危害情報

家畜に分布するサルモネラにおいて、セファロスポリン耐性の蓄積傾向が認められ、また、プロイラーにおける新たな血清型の浸潤拡大傾向が認められた。薬剤耐性サルモネラとカンピロバクターの各種性状を詳細に解析することにより、人—食肉—家畜間での薬剤耐性菌の伝播の低減に向けた取り組みへと繋げていく必要がある。

F. 研究発表

(1) 国内

1) 秋庭正人、岡崎ひづる、石岡幸子、内田郁夫、吉井紀代、中澤宗生. わが国の牛から分離されたセファゾリン耐性 *Salmonella* Typhimurium の性状. 第 144 回日本獣医学会学術集会. 2007 年 9 月 2 日. 札幌, 2007

2) 秋庭正人、中岡祐司、鮫島俊哉、吉井紀代、中澤宗生、内田郁夫、寺門誠致. 2008. 日本の牛群における *Salmonella* Dublin の薬剤感受性. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008

3) 藤尾公輔、清水晃、松村浩介、河野潤一、北川浩、五十君静信. 市販食肉、ヒト、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性. 日本食品微生物学会雑誌 24(2):100-106. 2007.

4) 田村 豊: 畜産現場における抗菌剤の使用動向と豚由来耐性菌の現状, 臨床獣医 3月号, 71-76, 2007.

5) 田口真澄、勢戸和子、河原隆二、坂田淳子、井上 清：大阪府における腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向、第12回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、東京、2008.

6) 石和玲子、山崎学、岡田由美子、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信「市販鶏肉から分離されたカンピロバクター

(2) 国外論文発表

1) Kawagoe, K., Mine, H., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K., Harada, K., Ozawa, M., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H., Honda, E., Takahashi, T., Sameshima, T. Changes of multi-drug resistance pattern in *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. J. Vet. Med. Sci. 69: 1211-1213, 2007.

2) Asai T., Ishihara K., Harada K., Kojima A., Tamura Y., Sato S., Takahashi T.: Long-term prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Infantis in the broiler chicken industry in Japan, Microbiol. Immunol., 51(1), 111-115, 2007.

3) Masato Akiba, Yuji Nakaoka, Muneyoshi Kida, Yukiko Ishioka, Toshiya Sameshima, Noriyo Yoshii, Muneo Nakazawa, Ikuo Uchida, Nobuyuki Terakado, Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Salmonella enterica*

株の抗生物質耐性に関する検討」日本食品微生物学会 2007/9/28

7) 藤尾公輔、清水晃、松村浩介、河野潤一、北川浩、五十君静信. 市販食肉、ヒト、豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性。日本食品微生物学会雑誌 24(2):100-106. 2007

serovar Dublin isolated from cattle in Japan from 1976 to 2005, J. Antimicrob. Chemother., 60: 1235-1242, 2007

4) Asai, T., Harada, K., Ishihara, K., Kojima, A., Sameshima, T., Tamura, Y., Takahashi, T. Association of antimicrobial resistance in *Campylobacter* isolated from food-producing animals with antimicrobial use on farms. Jpn. J. Infect. Dis. 60: 290-294, 2007.

5) Matsumoto, Y., H. Kitazume, M. Yamada, Y. Ishiguro, T. Muto, H. Izumiya, and H. Watanabe: CTX-M-14 type β -lactamase producing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from imported chicken meat. Jpn. J. Infect. Dis. 60 (4), 236-8, 2007.

6) Wataru Yamazaki-Matsune, Masumi Taguchi, Kazuko Seto, Ryuji Kawahara, Kentaro Kawatsu, Yuko Kumeda, Miyoshi Kitazato, Masafumi Nukina, Naoaki Misawa and Teizo Tsukamoto: Development of a multiplex PCR assay for

identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*,

Campylobacter jejuni, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* (in press).

概略図

目的：

ヒト、家畜、食品、ペット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、ペット由来菌
(農林水産省動薬検、独法動物研究所)

国内、渡航者下痢症患者由来菌
(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多剤耐性化の傾向増加
- 2) ヒトからフルオロキノロン耐性サルモネラが毎年のように分離される
Salmonella Typhimurium, *Salmonella* .Kentucky において
- 3) 病畜由来サルモネラからフルオロキノロン耐性株が分離される

・セファロスポリン耐性サルモネラ

- 1) 鶏肉から ESBL 産生株が *S. Infantis* (耐性遺伝子 *bla*CTX-M-14) および *S. Manhattan* (*bla*CTX-M-2) で、AmpC 型 βラクタマーゼ産生株が *S. Infantis* (*bla*CMY-2) で分離された。
- 2) 牛からセファゾリン耐性 *S. Typhimurium*; *bla*CMY-2 遺伝子の存在に基づく AmpC 型 βラクタマーゼ産生菌が分離された

II. EHEC関係

- 1) EHEC 0157 の薬剤耐性を調べた結果、AmpC 型 βラクタマーゼ産生株が検出され、耐性遺伝子はいずれも *bla*CMY-2 であった。

III. 赤痢菌

- 1) 海外渡航者下痢症由来赤痢菌からフルオロキノロン耐性株 (いずれも *S. flexneri* 2a) が分離され、感染国はインド、タイであった。

IV. ペットの解析

- 1) ペット犬の糞便大腸菌の調査では、耐性菌の出現率は、ABPC に対して 30.6% と高く、第3代セフェム剤である CPDX に対して 14.3%、フルオロキノロン (ERFX) に対して 17.7% が耐性を示した。

V. まとめ

フルオロキノロン高度耐性菌が患者および病畜より分離された。また、ペットから分離される耐性菌の比率がかなり高いことが判明した。それらの因果関係の更なる調査が必要である。

平成 19 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
研究協力者	松本裕子	横浜市衛生研究所

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

2006 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 9,372 名であった。このうち、22%にあたる 2,028 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、2005 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 社のセンシディスクを用いて、CLSI 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)、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12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。

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 2007 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-ASSu、R-ASTSu が全体の約 3-7% 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 4 株 (R-F) 検出された。その内訳は血清群 O157、O26、O119 および OUT 各 1 株であった。上記 O119 株はナリジクス酸に対しても耐性であった (R-NF)。

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 2007 年に発生した集団事例 22 件について、その関連株の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約 68% であった。次いで R-S および R-N がそれぞれ約 9% 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2のように増加傾向にあることが窺えた。

散发例ながらホスホマイシン耐性 SE が 2 株同定された。本菌株の PFGE パターンは典型的なものとは異なるものであった。

3. 鶏肉由来 *S. Infantis* (SI) に関する薬剤耐性について

横浜市との協力で鶏肉由来の SI 株 (n=171) について、薬剤耐性の動向 (2002 から 2007 年) を調べた。サルファ剤、テトラサイクリンに関しては耐性率が常に高い状態にあった。ストレプトマイシンについては耐性率が減少傾向にあることが見て取れた。他の薬剤に関しては、比較的耐性率が低く大きな変化は見られなかった。その中でも、セフェム系抗菌薬に耐性を示す株が 2003 年以後、少数ながら見られるようになった。今回の調査では計 7 株同定され、各耐性遺伝子の検索を行ったところ、*bla*CMY-2 保有株が 4 株、*bla*CTX-M-2 保有株が 1 株、*bla*TEM-52 保有株が 2 株であった (表 1)。*bla*TEM-52 を保有する SI の報告は、これまでのところ、2007 年にベルギー、フランスから発表された同じくトリ由来株のみである。これらセフェム系抗菌薬耐性

SI の PFGE パターンを見てみると、互いに似ているが少しずつ違いが観察された。また同じ PFGE パターンを示しながらも保有する耐性遺伝子が異なるものもあり、これらは保有するプラスミドの違いから来ると考えられる(図 3)。

4. ST 耐性株

本年調べた ST 株の中に、フルオロキノロン高度耐性を示した株が 3 株見つかった。分離年は 2004 年が 2 株、2006 年が 1 株で、いずれも散発由来株であった。これまで報告してきた株と同様に、GyrA に 2 箇所(S83F+D87N)、ParC に 1 箇所(S80R)の点変異が検出された。ファージ型は 2004 年の株が DT12、2006 年のものが DT193 であった。

同じく、セフェム系抗菌薬に耐性を示した ST が 4 株あった。ヒト由来株では 2004 年に DT193 が 1 株で、残り 3 株はウシ由来株(ファージ型別では UT)であった。これらはいずれも *bla*CMY-2 を保有していた。

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る状況が続いて

いた。EHEC ではホスホマイシン耐性株も 2%含まれていた。

SE では全体の報告数、食中毒事例数等は減少傾向にあるなか、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、ホスホマイシン耐性株が初めて検出された。

鶏肉由来 SI においてはセフェム系抗菌薬耐性株が少しずつではあるが見られるようになってきている現状が明らかになった。その耐性遺伝子の大半は *bla*CMY-2 であったが、CTM-M 型および TEM 型のものも検出され、特に *bla*TEM-52 保有 SI 株は国内初同定であると思われる。

ST についても SI 同様セフェム系抗菌薬耐性株が同定され、これまでのフルオロキノロン耐性株に加え、今後、こうした耐性菌の動向に注意が必要である。

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。

F. 健康危険情報

セフェム系抗菌薬もしくはフルオロキノロン系抗菌薬耐性サルモネラが、食材（鶏肉）、ヒト、家畜において同定されており、こうした菌株の発生動向ならびにさらなる耐性の獲得状況に関する注意が必要である。

G. 研究発表等

- (1) Y. Matsumoto, H. Kitazume, M. Yamada, Y. Ishiguro, T. Muto, H. Izumiya, and H. Watanabe: CTX-M-14 type β -lactamase producing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from imported chicken meat. Jpn. J. Infect. Dis. 60 (4), 236-8, 2007.

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。

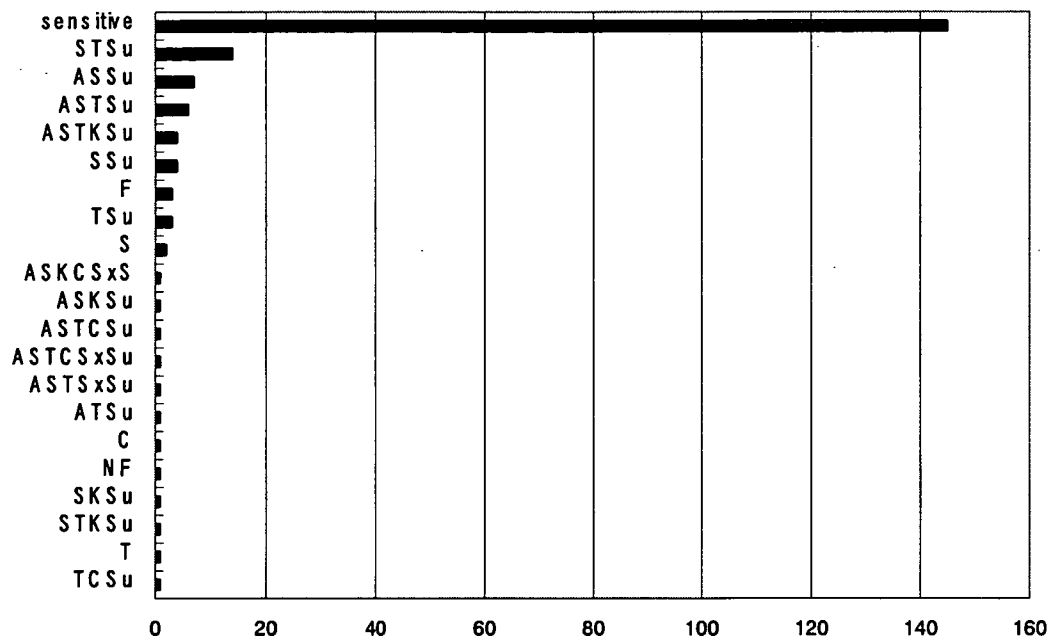


図 1. EHEC 分離株における薬剤耐性パターンの分布(2007 年)

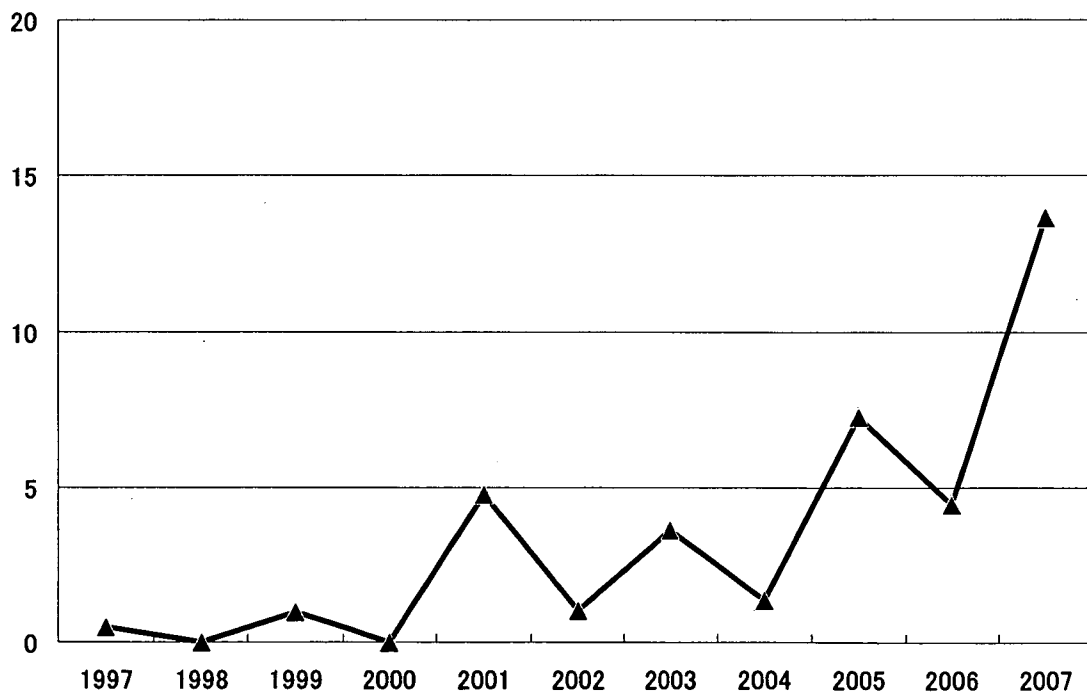


図 2. *Salmonella* Enteritidis 集団事例関連株のナリジクス酸耐性率(%)(2007 年 12 月 末現在)

(年)	2002	2003	2004	2005	2006	2007	計
n=	0/16	1/24	0/28	1/35	4/39	1/28	7/171
<i>bla</i>							
CMY-2		1			3		4
CTX-M-2					1		1
TEM-52				1		1	2

表 1. 鶏肉由来 *Salmonella* Infantis におけるセフェム系抗菌薬耐性株の検出数およびその耐性遺伝子。n, 分母は試験した菌株数、分子は検出数を表す。

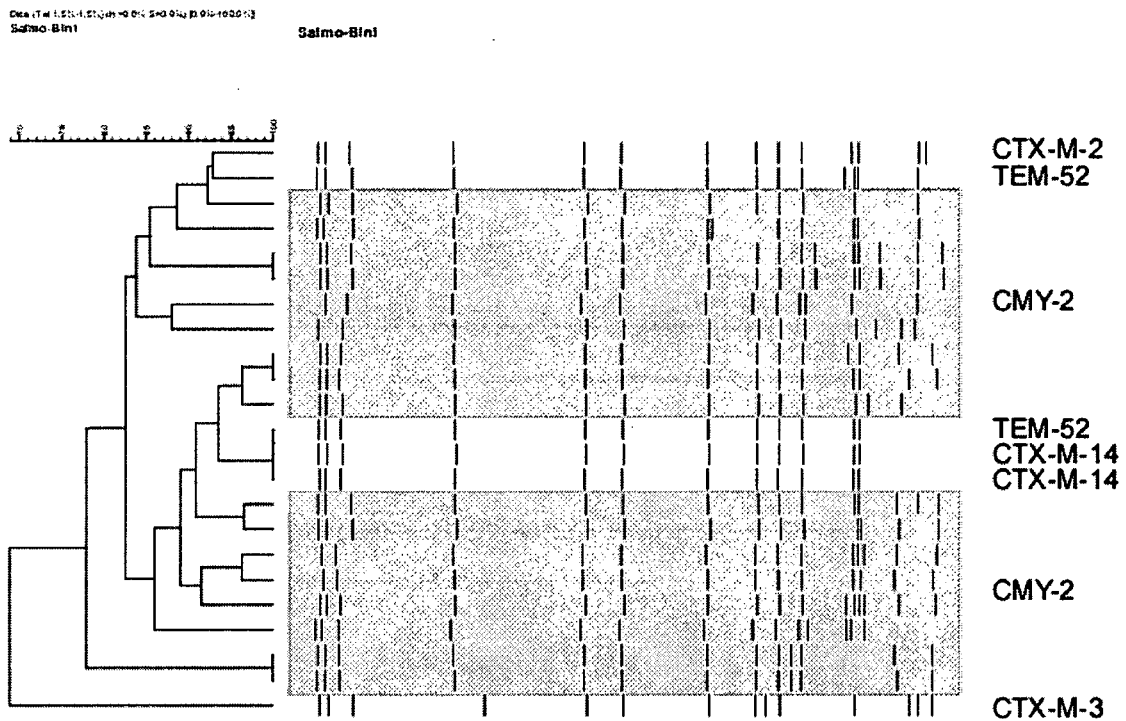


図 3. セフェム系抗菌薬耐性鶏肉由来 *Salmonella* Infantis 株の PFGE プロファイル。検出された耐性遺伝子を右に示す。本図には表 1 に記されたもの以外に、神奈川県以外からの菌株の結果も含まれる。

平成19年度厚生労働省 食品・安全確保研究事業 分担研究報告書

課題名:薬剤耐性食中毒菌サーベイランスに関する研究

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
研究協力者	上野裕之	さいたま市健康科学研究センター

研究要旨

近年、抗生剤の使用過多が原因と考えられる、食中毒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・ヒト由来食中毒細菌、特にサルモネラおよび腸管出血性大腸菌などを対象に、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(散発下痢症例および健康保菌者)由来サルモネラは 143 株で 34 血清型に型別された。薬剤耐性では 53 株(37.6%)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系薬剤に対して耐性を示すサルモネラが 2 例から分離され、その血清型は *S. Kentucky* が 1 株、*S. Schwarzengrund* が 1 株であった。また、環境由来株の検討として、イヌ 227 頭、ネコ 72 頭の検査を行った。その結果、イヌ 3 頭からサルモネラが分離されたが、すべて感受性であった。

ヒト由来腸管出血性大腸菌は 134 株が分離され、血清型 O157:H7 が 112 株(83.6%)と最も多く分離された。薬剤感受性試験では、134 株中 23 株(17.2%)が供試した 12 薬剤のいずれかに耐性を示したが、CTX やフルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株は分離されなかった。

食肉および食肉製品の汚染実態調査では、79 検体中 13 検体(16.5%)からサルモネラ 13 株が、腸管出血性大腸菌は 34 検体中 2 検体(5.9%)から 2 株分離された。薬剤感受性試験では、サルモネラ 13 株中 11 株がいずれかの薬剤に耐性を示したのに対して、腸管出血性大腸菌は 2 株とも感受性であった。

A. 研究目的

近年、抗生剤の使用過多が原因と考えられる、食中毒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 フェージ型 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CTX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・ヒト由来食中毒細菌、特にサルモネラおよび腸管出血性大腸菌などを対象に、血清型別や薬剤感受性試験等の性状解析を行う。また、多剤耐性菌が検出された事例については、患者および食品など原因物質の遡り調査を行い、汚染源の究明を試みるとともに、他の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、集団食中毒事例およ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。食肉および食肉製品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った。薬剤感受性試験はCLSI(旧NCCLS 米国臨床検査標準委員会)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(CPFX;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系薬剤、第3、4世代セフェム系薬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. 研究結果および考察

(1) 散発事例由来サルモネラ

埼玉県内で2007年に、散発下痢症患者およ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の血清型別を表1に示した。分離された143株は34血清型に型別され、最も多く分離されたのは、*S. Enteritidis*が41株、次いで*S. Typhimurium*が15株、*S. Saintpaul*が7株の順であった。

この143株について薬剤感受性試験を実施した結果、供試した143株のうち53株(37.1%)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*S. Enteritidis*では41株のうち26株(63.4%)が耐性を示し、SM単剤耐性が16株と最も多かった。*S. Typhimurium*では15株のうち7株(46.7%)が耐性を示した。分離株の区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22株が該当し、次いでSM・TC耐性が7株分離された。また4剤以上の薬剤に