

平成 26 年度 厚生労働省 食品の安心確保推進研究事業
「食品由来細菌の薬剤耐性サーベイランスの強化と国際対応に関する研究」

「ヒト由来腸内細菌の薬剤耐性の遺伝学的研究」

分担研究報告書

研究分担者 泉谷秀昌

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、主として薬剤耐性菌に着目し、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。そのための基礎研究として上記耐性菌を含め、さまざまな菌の解析手法を開発しサーベイランスシステムに組み込むことで上記情報整備の拡充、高度化を図る。本分担研究においては、特に、サルモネラ等の腸管系細菌をはじめ、食品汚染を介した細菌感染症に着目して上記目的のための新規要素の検討を行う。

A. 研究目的

薬剤耐性の問題がグローバル化の中で、サーベイランスにおけるギャップを把握し、埋めていくことは、よりよいサーベイランス体制構築に欠かせない。本研究ではシガ毒素産生性大腸菌（STEC）の薬剤耐性について、経年変化を追った。また、WHO - GFN が実施している外部精度管理試験において使用されているブレイクポイントの変遷と、結果に与える影響を調べた。

（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. 薬剤感受性試験：BD 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判定を行った。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）、セフォタキシム（Ct）、クロラムフェニコール（C）、ST 合剤（Sx）、スルフィソキサゾール（Su）、ゲンタマイシン（G）、ナリジクス酸（N）、セファロチン（Cf）、ホスホマイシン（F）、セフォキシチン（CFX）、セフォタン（CTT）、アミカシン（AMK）、イミペネム（IPM）およびメロペネム（MEPM）の 18 剤であった。

2. 一濃度スクリーニング：アジスロマイシン、シプロフロキサシン、セフォタキシム、およびホスホマイシンを、それぞれ 50、0.1、1 および 50 mg/L 含む LB 寒天培地を調製した。上記 4 種の培地に試験菌株を植菌し、明らかに生息してきたものを R、わずかに生えてき

たものを r とした。

C. 研究結果および考察

1. シガ毒素産生性大腸菌 (STEC) 薬剤耐性の傾向

1998 年から 2013 年までの分離株から各年 150-500 株程度選択し、ディスク法による感受性試験を行った。

結果を表 1 に示す。各カラムには約 30% を最大の網掛けとした帯グラフを賦してある。

耐性が多くみられる薬剤は、スルフィソキサゾール、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、アンピシリンであり、15 年間の平均はそれぞれ、20.5、20.1、14.6、13.6% であった。

これらに次いで、セファロチン、ST 合剤、カナマイシン、クロラムフェニコールに対して 2-5% 程度の耐性を示した。

年ごとに若干の変動はあるものの、その耐性率に顕著な減少もしくは増加を示す薬剤は見られなかった。

STEC および他の腸管系細菌において特に注視すべき薬剤ホスホマイシン、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 3 剤については 1% 以下であり、これらについても大きな変動は見られなかった。また、セフォテタン、アミカシン、イミペネム、メロペネムについては中間および耐性は見られなかった。

2. STEC2013 年株のスクリーニング

上で述べたように、ホスホマイシン、セフォタキシム、シプロフロキサシンの 3 剤の耐性率は非常に低かった。本 3 剤と昨年度赤痢菌について試験したアジスロマイシンは今後、その耐性出現が懸念される。そこで、この 4

剤について STEC2013 年株について一濃度スクリーニング法を試行した。

結果を表 2 に示す。最も R が多かったのがアジスロマイシンで 1.9%、ついでセフォタキシムが 1.5%、ホスホマイシンが 1.1% であった。シプロフロキサシンが 0.5% と最も低かった。

これら R 株について 0 血清群の分布を見たところ、シプロフロキサシンを除いた 3 剤については 026 の割合が最も大きかった(図 1)。これは、耐性獲得要因の主たる経路がシプロフロキサシンに関しては染色体性なのに対し、他がプラスミド性であることが関連していると推測される。

3. WHO - GFN における外部精度管理について

WHO - Global Foodborne Infections Network (GFN) では、毎年サルモネラ、赤痢菌等について薬剤感受性試験の外部精度管理試験 (EQA) を実施している。

GFN-EQA において挙げられている薬剤は、アンピシリン、テトラサイクリン、シプロフロキサシン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、ST 合剤、サルファ剤、ゲンタマイシン、ナリジクス酸、セフォタジジム、セフトリアキゾン、トリメトプリムの 12 薬剤である。後者 3 薬剤が本研究では含まれていない。

また、セフェム系およびニューキノロン系薬剤については GFN-EQA において独自のブレイクポイントを設定している。これは EUCAST の epidemiological cut-off value (ECOFF) に関連していると考えられる。例えば、シプロフロキサシンに関して、CLSI のディスク法の間接判定は 16-20mm (15mm 以下で耐性、21mm 以上で感受性) であるが、GFN-EQA では

21-30mm となっている。これはチフス菌などの腸管外感染サルモネラに適用される基準である。

セフォタキシムに関しては、同じく CLSI における中間判定域が 23-25mm なのに対し、GFN-EQA では 27mm 以下で耐性、27mm より大で感受性（ここでは便宜的に中間 27.5mm とする）。結果 1 の 2012-13 年株について、それぞれの基準で耐性・中間・感受性をまとめたものを表 3 に示す。CLSI 基準（CTX23-25）による R は 0.7%、GFN-EQA（CTX27.5）による基準では R が 2.6%となる。参考までにセファロチンの阻止円がない（CF6）ものは 1.0%であり、CTX27.5 における耐性率よりも低くなる。セファロチンとセフォタキシムの阻止円径の分布を見ると、CTX23-25 における中間もしくは感受性領域（23mm 以上）と、CTX27.5 における耐性領域の重なり部分、すなわち 23-27mm 部分に該当する株は CF6 に該当していないことがわかる（表 4）。これらの株が野生株（感受性株）と異なる表現型を示すのは、ESBL に関連する遺伝子以外の遺伝子もしくは遺伝子変異に起因することが考えられる。今後こうした表現型の遺伝的背景を明らかにし、精度管理における補助的なマーカーを開発していく必要があると思われる。

耐性出現を極力広く探知するため、耐性の基準が年々変化してきている。セフォタキシムは 2010 年以前は中間領域が 15-22mm であったが、現在は 23-25mm である。上記のように GFN ではさらに広げられており、薬剤耐性サーベイランスにおいて精度管理の担保はますます重要性を帯びていると考えられる。

D. 結論

STEC 薬剤耐性の傾向は過去 15 年において目立った変化は起きていないと思われる。一方でアジスロマイシン、セフォタキシム、ホスホマイシン、シプロフロキサシン耐性が一定頻度で見られ、今後も注視していく必要がある。

薬剤耐性サーベイランスにおいて判定基準は重要であり、基準の変化に柔軟に対応していかななくてはならない。そのために精度管理を充実させる必要がある。また、精度管理を安定させる一つの因子として、遺伝学的背景などの情報収集も重要であると考えられる。

E. 研究発表等

Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*_{TEM-52}-carrying plasmids of extended-spectrum-β-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Dec;58(12):7545-7.

F. 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。

年	ABPC	SM	TC	KM	CP	ST合剤	Su	GM	NA	CPFX	FOM	CTX	CF	CFX	株数
1998	14.03%	15.83%	13.43%	2.61%	1.80%			0.20%	0.20%	0.00%	2.20%	1.60%			499
1999	8.12%	19.80%	16.24%	1.02%	0.51%			0.00%	0.51%	0.00%	0.00%	2.03%			197
2000	8.00%	14.33%	8.33%	1.33%	0.33%			0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%			300
2001	10.67%	14.00%	13.33%	6.00%	1.33%		14.67%	0.67%	0.00%	0.00%	0.67%	0.00%			150
2002	14.00%	20.00%	10.50%	2.00%	0.00%		17.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.50%	1.50%			200
2003	13.50%	22.50%	16.50%	4.00%	1.00%		21.50%	0.50%	0.50%	0.00%	0.50%	1.00%			200
2004	13.50%	19.50%	16.00%	4.50%	3.00%	3.50%	20.50%	1.50%	0.00%	0.00%	1.00%	3.00%			200
2005	23.53%	25.34%	14.93%	1.81%	1.36%	1.36%	22.62%	0.00%	0.90%	0.00%	0.90%	1.81%			221
2006	12.06%	18.59%	16.08%	3.02%	1.01%	3.02%	20.10%	0.50%	1.01%	0.00%	2.01%	0.00%			199
2007	11.50%	22.00%	17.00%	4.00%	2.50%	1.50%	23.50%	0.50%	0.50%	0.00%	1.50%	0.00%	6.50%		200
2008	15.69%	21.57%	15.20%	3.43%	0.49%	2.94%	20.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.98%	0.00%	4.90%	0.00%	204
2009	15.03%	26.80%	20.92%	3.92%	2.61%	3.27%	26.80%	0.65%	1.31%	0.00%	1.96%	1.96%	5.23%	0.65%	153
2010	19.63%	27.57%	20.09%	2.34%	1.87%	2.80%	26.64%	0.00%	0.93%	0.00%	0.47%	2.34%	28.50%	0.00%	214
2011	14.43%	19.07%	10.82%	0.52%	5.15%	4.64%	19.59%	0.00%	0.00%	0.00%	0.52%	1.03%	13.92%	0.52%	194
2012	14.62%	19.81%	15.09%	1.89%	1.89%	2.83%	19.34%	0.00%	1.89%	0.47%	0.00%	0.94%	8.96%	0.00%	212
2013	9.31%	14.22%	8.33%	2.45%	2.94%	3.92%	14.22%	0.98%	0.98%	0.00%	0.49%	0.49%	10.29%	0.00%	204
平均	13.60%	20.06%	14.55%	2.80%	1.74%	2.98%	20.54%	0.34%	0.55%	0.03%	0.86%	1.11%	4.48%	0.19%	3547

表 1、STEC 薬剤耐性分布（1998-2013、ディスク法）

	AZM50	CPFX0.1	CTX1	FOM50
R	1.88%	0.53%	1.47%	1.06%
r	0.38%	0.06%	0.06%	
S	97.75%	99.41%	98.47%	98.94%
計	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

表 2、STEC 薬剤耐性分布（1濃度スクリーニング、2013、N=3200）

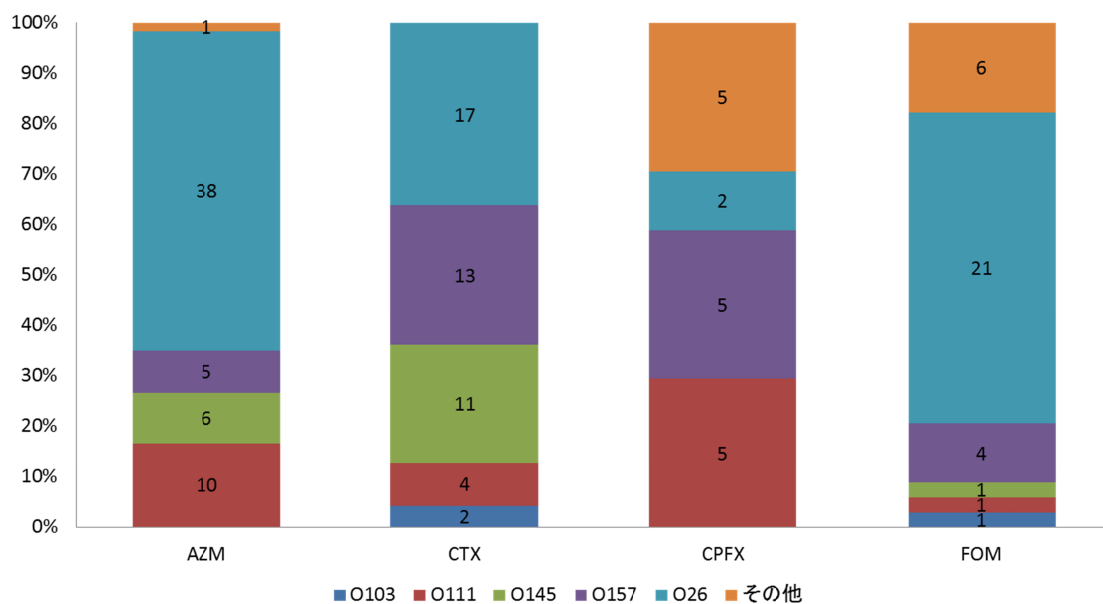


図 1、各耐性における血清群分布。AZM、アジスロマイシン；CTX、セフトキシム；CPF、シプロフロキサシン；FOM、ホスホマイシン。

	R	I	S	計
CTX23-25	0.72%	0.96%	98.32%	100.00%
CTX27.5	2.64%		97.36%	100.00%
CF6	0.96%		99.04%	100.00%

表 3、CLSI (CTX23-25)、GFN-EQA (CTX27.5) 基準による耐性、中間、感受性の分布 (STEC2012-13)、CF6、セファロチン阻止円なしの分布。

	CF														
CTX	6	7	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22	総計
6	2														2
12	1														1
25						3		1							4
26							1								1
27								3							3
28	1			1	1	3	4	36	32	24	19		1		122
29						5	1	1	8	6	3				24
30		1	1		4	2	6	46	59	50	30	1	5	1	206
31						2		3	1	8	4				18
32							1	3	7	6	7		1		25
33								2		2	3	1	1		9
34											1				1
総計	4	1	1	1	5	15	13	95	107	96	67	2	8	1	416

表 4、セファロチン (CF) とセフトキシム (CTX) 阻止円分布 (mm) (STEC2012-13)