

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告書

サルモネラ属菌の薬剤耐性プラスミドの解析

担当責任者 大西真 国立感染症研究所 細菌第一部 部長

研究要旨

本邦にて分離された第三世代セファロスポリン薬耐性チフス菌、パラチフス A 菌の耐性決定因子を決定した。2008 年以降で耐性チフス菌、耐性パラチフス A 菌がそれぞれ 1 株ずつ確認され、いずれからも CTX-M-15 型の基質拡張型ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子が検出された。また耐性菌特異的なプラスミドが確認され、そのプラスミドを用いた形質転換により感受性大腸菌が耐性となったことから、プラスミド上に ESBL 遺伝子がコードされていることが示唆された。さらには耐性プラスミドの完全長配列の決定を目指し、プラスミドの配列を含む耐性株のドラフト配列を取得した。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスの治療にはニューキノロン薬が第一選択薬として使われていたが、輸入感染症としての特徴から海外で出現している治療薬に対する耐性菌の問題がわが国にも波及し、治療無効例が増加した。現在ではニューキノロン薬の単独使用は少なくなり、第三代セファロスポリン薬との併用や第三代セファロスポリン薬の単独使用が行われるなど、第一選択薬として第三世代セファロスポリン薬も考慮されている。しかしながら、既に少数ながら基質拡張型ラクタマーゼ（ESBL）による第三世代セファロスポリン薬耐性株が出現し、本邦においても報告されている。ニューキノロン薬耐性菌はゲノム上の *gyrA* 遺伝子及び *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域における変異が耐性化の主要な因子であるが、第三代セファロスポリン薬耐性遺伝子はプラスミドにより媒介される。その伝達性から、他の血清型のサルモネラ属菌への伝播や耐性チフス菌、パラチフス A 菌の蔓延が考えられ、その出現機序や拡散リスクを評価することは防疫施策上重要である。そこで本研究課題では、第三世代セファロスポリ

ン耐性チフス菌、パラチフス A 株の耐性遺伝子、菌株の系統解析、プラスミド解析から、薬剤耐性菌の出現メカニズムを検証することを目的とする。

本年度は第三世代セファロスポリン耐性チフス菌、パラチフス A 株について、薬剤耐性プラスミド上の耐性遺伝子を決定した。また、第三世代セファロスポリン薬非感受性菌を含む第三世代セファロスポリン耐性菌のドラフトゲノム配列を取得した。

B. 研究方法

国内で分離されたチフス菌、パラチフス A 菌の薬剤感受性試験を実施した。対象は 2008 年に本邦で初めて ESBL 産生チフス菌が確認されたことから、2008 年以降に分離されたチフス菌、パラチフス A 菌 406 株とした。セフトリアキソンの MIC 値を微量液体希釈法に測定し、CLSI2014 のブレイクポイントに従って、感受性（1）、中間（2）、耐性（4）を決定した。耐性菌については耐性プラスミドの確認のため、プラスミド抽出後、感受性大腸菌を形質転換した。また非感受性菌のゲ

ノム DNA を精製し、次世代シーケンサーを用いてドラフト配列を取得した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする研究ではなく、また動物実験も行っていないので、該当しない。

C. 研究結果

第三世代セファロスポリン薬であるセフトリアキソンに対する感受性試験の結果、耐性チフス菌 1 株、耐性パラチフス A 菌 1 株が確認された。また、MIC 値が 2 であるチフス菌が 1 株確認された(表)。

耐性を示した 2 株について、さらなる解析を試みたところ、プラスミドプロファイルから耐性菌に特異的なプラスミドが観察された。このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換したところ、第三世代セファロスポリン薬に対して耐性となった。また両耐性菌からは CTX-M-15 型 ESBL 遺伝子が検出され、当該遺伝子がプラスミド上にコードされていることが示唆された。一方、耐性菌 2 株を含む非感受性菌 3 株のゲノム DNA ライブラリーを、Illumina 社 MiSeq でペアエンド解読し、一株あたり約 382Mb の解読情報を得た。

D. 考察

腸チフス、パラチフスの治療での第三世代セファロスポリン薬の使用例が増加している現状において、耐性チフス菌、パラチフス A 菌の出現は深刻な問題である。この耐性を担う ESBL 遺伝子がプラスミド上にコードされていたことから、今後第三世代セファロスポリン耐性が広範囲に伝播する危険性は十分に考えられる。その拡散リスクを評価するために、耐性遺伝子やプラスミドの由来を明確にし、伝播メカニズムの推定をしておかなくてはならない。本年度ではドラフトゲノムを得ることはできたが、解析までは至らなかった。今後、ドラフトゲノムの解析を進め、プラスミド

の完全長配列から、耐性遺伝子の獲得機序、伝播様式などが明らかになると期待される。

E. 結論

CTX-M-15 型 ESBL 遺伝子をコードしたプラスミドにより第三世代セファロスポリン薬耐性となったチフス菌 1 株、パラチフス A 菌 1 株が分離された。

F. 健康危機情報

特に無し。

G. 研究発表

特に無し。

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し。

表 セフトリアキソン非感受性菌における各種薬剤のMIC値

	Serovar	AP	NA	CPFX	CTRX
#1	<i>S. Typhi</i>	>64	>128	0.5	>32
#2	<i>S. Paratyphi A</i>	>64	>128	1	>32
#3	<i>S. Typhi</i>	32	>128	16	2

AP:ampicillin, NA: nalidixic acid, CPFX: ciprofloxacin, CTRX: ceftriaxone