

食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究
分担課題 無症状保菌者由来サルモネラの薬剤感受性プロファイル解析に
関する研究

研究分担者 大西 真 (国立感染症研究所・細菌第一部・部長)
研究協力者 泉谷秀昌 (国立感染症研究所・細菌第一部・室長)

研究要旨

この研究では、サルモネラヒト由来株に焦点をあてて解析する体制構築を目指した。食品からヒトへの菌の伝播を考えるうえで重要な健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った。

A. 研究目的

腸チフス、パラチフスを除くサルモネラ (non-typhoidal *Salmonella*, NTS) 症は食中毒の中で件数、患者数とも上位を占めることが知られている。また、食品由来感染症（食中毒として捉えることができない事例を含む）としても、カンピロバクター感染症とともに未だ多数の症例が国内で存在することが推定されている。サルモネラ属菌による食品由来推定患者数は年間 14～25 万人程度（2005～2008）とされている（平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業『食品衛生関連情報の効率的な活用に関する研究』：分担研究「宮城県における積極的 食品由来感染症病原体サーベイランスならびに急性下痢症疾患の実被害者数推定」 分担研究者 窪田邦宏、春日文子、2010、p. 117-136.）。

大規模流通食品の汚染が、直接大規模事例につながる危険がある。そのため、散发例の把握、食品汚染の実態の把握からリスク要因を抽出し、NTS 対策の効率化、高度化が望まれる。また、薬剤感受性プロファイルを理解することで、NTS の動物-ヒト間の伝播の様子を探る上でも分離株の詳細な検討が必要である

本研究では、国立感染症研究所で収集された NTS 株の整理をするとともに、健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制について検討を行った

B. 研究方法

健康サルモネラ保菌者由来株の解析体制の構築

業務従事者の検便を実施している検査会社から、2013 年から 2017 年に分離された血清群 04、08 及び 09 の株の分与を受け、これについて H 型別及び薬剤感受性試験を行った。

薬剤感受性試験はディスク法を用いて行った。供試薬剤はアンピシリン (ABPC もしくは A と略記)、ストレプトマイシン (SM もしくは S)、テトラサイクリン (TC もしくは T)、カナマイシン (KM もしくは K)、クロラムフェニコール (CP もしくは C)、ST 合剤 (Sx)、ゲンタマイシン (GM もしくは G)、ナリジクス酸 (NA もしくは N)、セフトキシム (CTX もしくは Ct)、セフトジジム (CAZ もしくは Cz)、セフォキシチン (FOX)、シプロフロキサシン (CPFX もしくは Cp)、ホスホマイシン (FOM もしくは F)、アミカシン (AMK)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、アジスロマイシン (AZM もしくは

Zm) の 17 薬剤であった。

上記供試菌株のうち、主要血清型もしくは CTX 等重要な薬剤に耐性を示した株 106 についてゲノム解析を行い、耐性遺伝子の分布を調べた。

供試菌株から DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン社) によりゲノム DNA を調整、Nextera XT DNA Library Preparation Kit 及び MiSeq Reagent Kit v3 (イルミナ社) によりショートリードデータを取得した。リードデータから SPAdes を用いて配列をアッセンブルし、当該配列データを Bionumerics にとりこみ耐性遺伝子の検索を行った。

倫理面への配慮

いずれも菌株のみの解析であり、個人情報 は連結不可能匿名化されている。

C. 研究結果

血清型別、薬剤感受性試験に供試した株は 04 群 736 株、08 群 449 株、09 群 131 株であった。

1. 04 群の結果 (図 1a、2a) :

主な血清型の内訳は Schwarzengrund 34%、04:i:- 14%、Agona 10%、Saintpaul 9%、Typhimurium 8% であった。主要薬剤に対して 50% 以上耐性となったのは Schwarzengrund (SM : 70%、TC : 74%、KM : 74%)、04:i:- (ABPC : 78%、SM : 79%、TC : 84%)、Typhimurium (ABPC : 57%、SM : 51%) であった。

2. 08 群の結果 (図 1b、2b) :

主な血清型の内訳は Manhattan 27%、Newport 18%、Corvallis 11%、Litchfield 8%、Nagoya 5% であった。主要薬剤に対して 50% 以上耐性となったのは、Manhattan (SM : 88%、TC : 84%)、Kentucky (ABPC : 56%、TC : 75%、CPFX : 69%)、Hadar (TC : 85%、KM : 54%)、Blockley (ABPC : 91%、CP : 100%、SM : 100%、TC : 82%、KM : 100%、AZM : 91%) であった。

3. 09 群の結果 (図 1c、2c) :

主な血清型の内訳は、Enteritidis 75%、Panama 8%、Javiana 5% であった。主要薬剤に対して 50% 以上耐性となったのはなかつ

た。

上記薬剤耐性に係る遺伝的背景を調べるためゲノム解析を行った。ゲノム解析に供試した 106 株の血清型の内訳は、04:i:- (14)、Agona (9)、Albany (1)、Blockley (10)、Heidelberg (2)、Indiana (1)、Kentucky (11)、Manhattan (17)、Muenchen (1)、Saintpaul (3)、Schwarzengrund (28)、Stanley (1)、Typhimurium (8) であった。04:i:-、Agona、Manhattan、Schwarzengrund、Typhimurium は主要血清型の観点から、それ以外の血清型はセフトキシム、シプロフロキサシンなどの重要な薬剤に対する耐性の観点から選択された。

4. テトラサイクリン耐性遺伝子 (図 3)

tetA、*tetB*、*tetG*、*tetM* が検出された。*tetA* が最も高頻度 (64%) かつ広範な血清型に検出された。*tetB* は 04:i:- のみに、*tetG* は Typhimurium のみに検出された。

5. サルファ剤耐性遺伝子 (図 2)

sul1、*sul2*、*sul3* がそれぞれ 51%、14%、3% の頻度で検出された。いずれも複数の血清型に分布していた。

6. アミノグリコシド耐性遺伝子-1 (図 4)

aadA1、*aadA2*、*aadA7*、*aadA17*、*aadA24* が検出された。*aadA1* が最も高頻度 (42%) かつ広範な血清型に検出された。*aadA7* の検出頻度は 9% であったが、検出された血清型は Kentucky のみであった。

7. トリメトプリム耐性遺伝子 (図 5)

dfrA1、*dfrA12*、*dfrA14* が検出された。*dfrA14* の検出頻度が 17% と最も高く、その 78% が Schwarzengrund であった。

8. アミノグリコシド耐性遺伝子-2 (図 6)

aph(3')-Ia、*aph(3'')-Ib*、*aph(3')-IIa*、*aph(4)-Ia*、*aph(6)-Ic*、*aph(6)-Id* が検出された。*aph(3')-Ia*、*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id* の検出頻度が高く、それぞれ 31%、24%、25% であった。*aph(3')-Ia* は Blockley と Schwarzengrund に、*aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id* は 04:i:- と Blockley に多く見られた。

9. β ラクタマーゼ関連遺伝子 (図 7)

TEM、CARB、CTX-M、SHV など 9 種類の遺伝子が検出された。最も検出頻度が高かったのは *bla*TEM-1B で 24%、次いで *bla*CTX-M-15 の 9%であった。前者は 04:i:-、Kentucky、Typhimurium に、後者は Blockley において多く検出された。

10. クロラムフェニコール耐性遺伝子 (図 8)

catA1、*catA2*、*cmlA1* の 3 種類が検出され、その頻度は併せて 14%であった。*catA2* が 10%の検出頻度で、そのほとんどは Blockley において検出された。

11. キノロン耐性遺伝子

キノロン耐性に係る *gyrA* 遺伝子などにおける点変異が検出された株は 19%であった。Kentucky は 11 株すべてにおいて点変異が検出され、*GyrA* に 2 か所 (S83F+D87N)、*ParC* に 1 か所 (S80I) の 3 重変異を有していた。他に 3 重変異を有していたのは Indianal 株であった。

D. 考察

サルモネラ属菌は様々な動物へ適応することでその多様性を獲得してきたと考えられている。各血清型のサルモネラ属菌の宿主域により、リスク食品や接触感染のリスクが規定される。ヒトへは、食品を介する感染が主であり、一部ヒトと動物の接触によるヒト感染が存在する。ヒト-ヒトの直接感染のリスクは腸チフス原因菌 (チフス菌、パラチフス菌) ほど明確ではないが、調理従事者の保菌が食品の汚染の原因となることは否定できない。

サルモネラ属菌がヒト腸管内に存在している状態 (健康保菌) についての知見には限りがある。本研究では、これらの分離株を詳細に解析することでサルモネラ属菌の耐性化機構の一つの側面を考察することを目的としている。

2013 から 2017 年に分離された健康保菌者由来サルモネラ 1,316 株について血清型別及び薬剤感受性試験を行った。04 群及び 08 群は多様な血清型が検出されたが、09 群は Enteritidis が 75%を占め、多様性の低さが顕著であった。また薬剤耐性も 09 群に

おいては全般に低かった。

04 群及び 08 群では Schwarzengrund、Manhattan などの主要な血清型では SM、TC あるいは KM などの共通の薬剤に耐性を示す株が多かった。一方で、04 群の Saintpaul、Stanley、08 群の Newport、Corvallis、Litchfield などのようにほとんどの薬剤に感受性を示す血清型もあり、血清型によって薬剤耐性の分布に多様性が観察された。

2013 から 2017 年に分離された健康保菌者由来サルモネラのうち 106 株についてゲノム解析を行い、主要な薬剤に対する耐性遺伝子を検索した。

主要血清型である (04:i:-、Agona、Manhattan、Schwarzengrund、Typhimurium) において多く見られる SM、TC 耐性について、前者は *aadA1* が、後者は *tetA* が大きく関与していることが示唆された。一方で、04:i:- については *tetB* が、Typhimurium には *tetG* が、*aadA7* については Kentucky が特異的に関連していることも示唆された。

サルファ剤耐性遺伝子 *sul* は比較的広く検出された。一方で、トリメトプリム耐性遺伝子 *dfr* は主に Schwarzengrund に偏って検出された。ST 合剤耐性は上記耐性遺伝子の組み合わせによるが、ゲノム情報から単独耐性について情報が得られた。

KM 耐性に係る耐性遺伝子 *aph* は 6 種類検出された。Schwarzengrund では *aph(3')-Ia* が、04:i:-では *aph(3'')-Ib*、*aph(6)-Id* が Blockley では上記 3 種類が高頻度に検出され、血清型によって遺伝子の分布が異なることが示唆された。

ABPC 耐性に係る *bla* 遺伝子としては TEM1b が多く検出され、複数の血清型に分布していた。CARB-2 は Typhimurium でのみ検出された。CTX 耐性に係る遺伝子としては CTX-M-15 が Blockley に、TEM-52b が Manhattan に偏って検出された。

CM 耐性に係る遺伝子としては *catA2* が Blockley に偏って検出された。また *floR* が Typhimurium をはじめ複数の血清型において検出された。

キノロン耐性に係る遺伝子として *gyrA*、*parC* に点変異が検出された株が、特に

Kentucky において顕著であった。海外でもニューキノロン耐性 Kentucky ST198 は問題となっており、本研究の Kentucky 株もこれらと関係する可能性が考えられる。

全般的に *tetA*、*aadA1* などの広範に分布する耐性遺伝子もあるものの、同じ薬剤耐性でも *aph* 遺伝子のように血清型によって分布の組み合わせが異なるもの、*tetB* のように特定のサブタイプが特定の血清型に偏って検出されるものなど、遺伝的背景も多様性があることが示唆された。

E. 結論

検便検査会社の協力をえて、04 群、08 群及び 09 群サルモネラ属菌の性状解析を実施するための体制の構築を始め、血清型、薬剤耐性、並びに耐性の遺伝的背景の多様性が明らかとなり、多様なサルモネラが健康保菌者から分離されていることが示され

た。今後の解析の参照として重要な知見であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

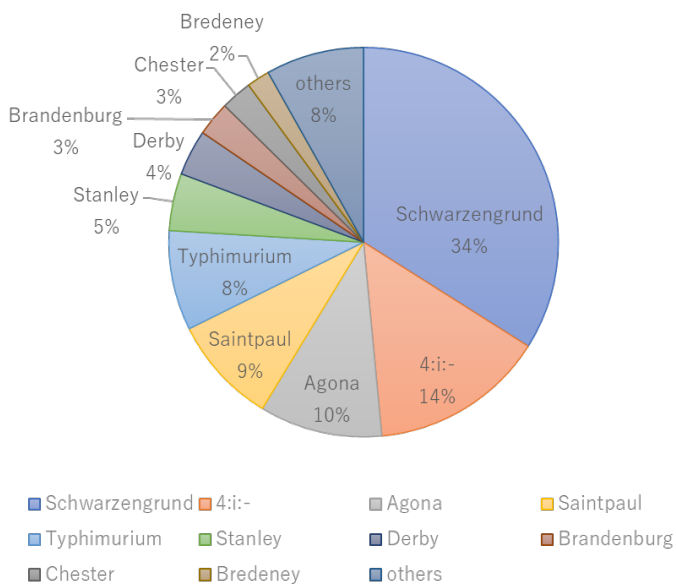
2. 実用新案登録

なし

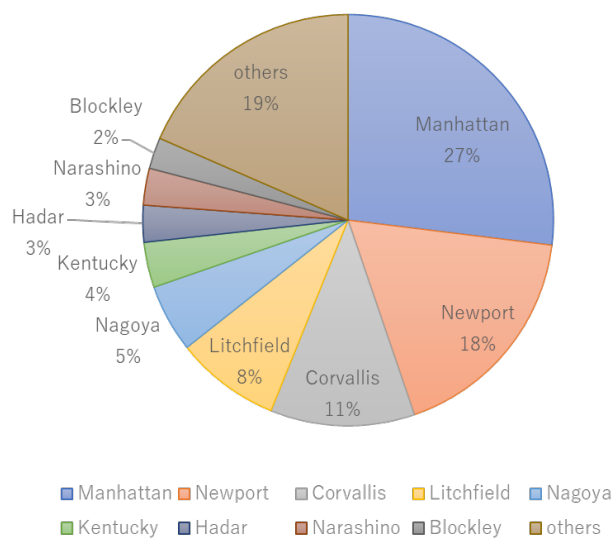
3. その他

なし。

図1 サルモネラ血清型分布 (a) 04群、(b) 08群、(c) 09群
(a)



(b)



(c)

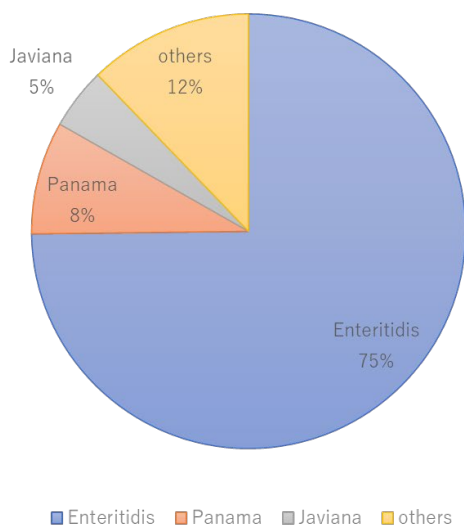


図2 サルモネラ薬剤耐性率 (a) 04 群、(b) 08 群、(c) 09 群

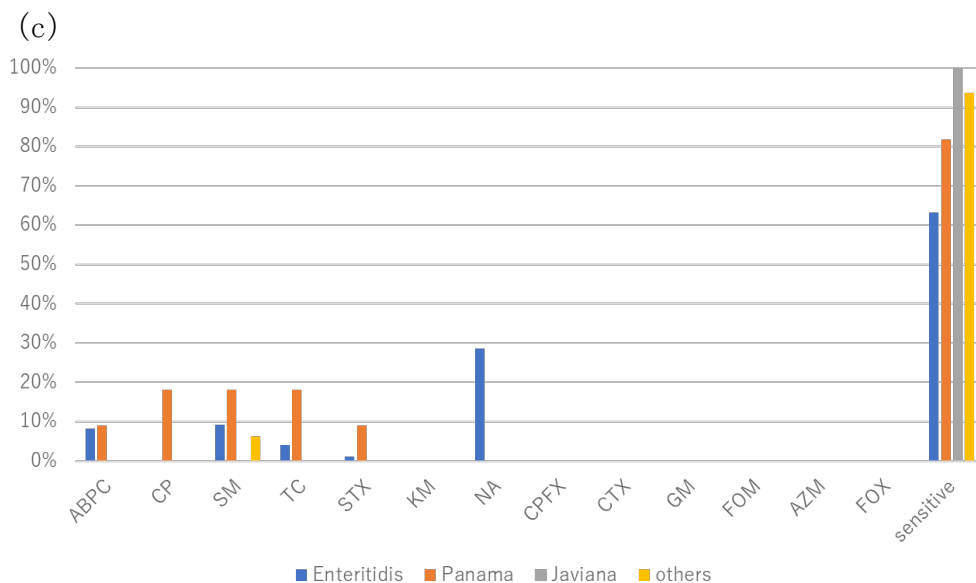
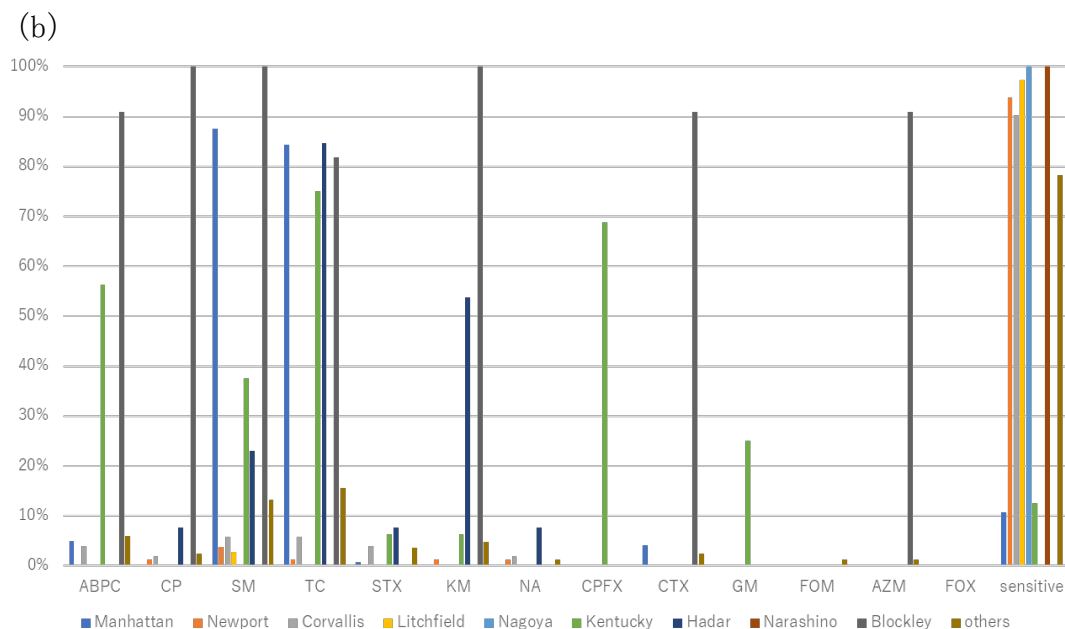
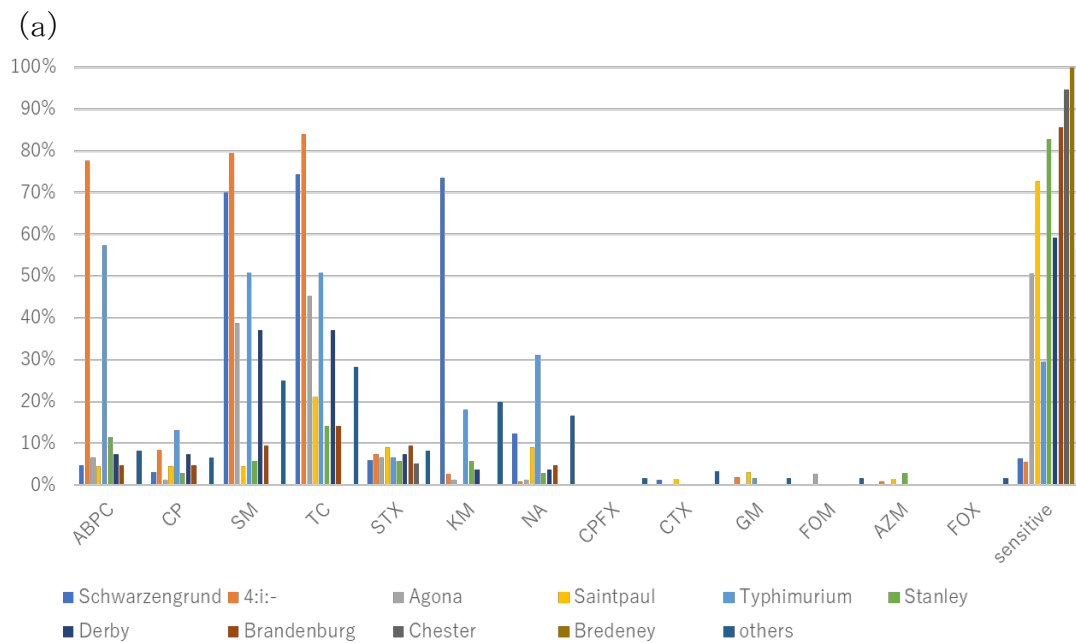


図4 テトラサイクリン耐性遺伝子の分布 (下段の数字は供試菌株数; 以下の図に関しても同じ)

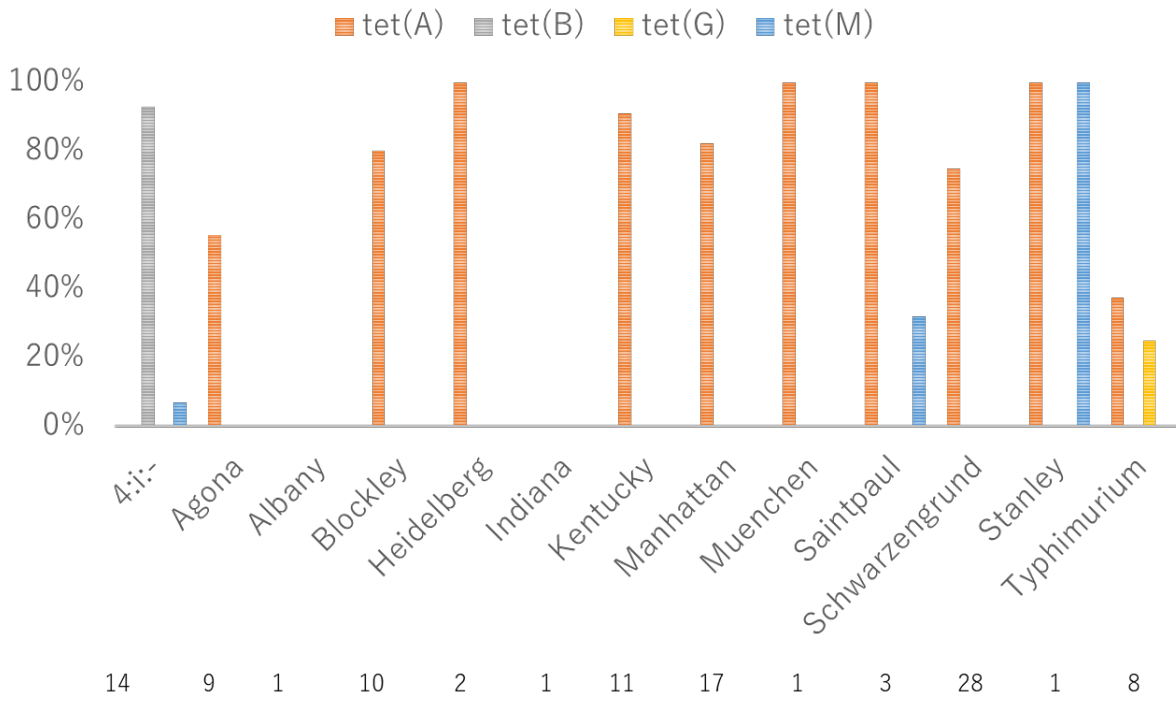


図5 サルファ剤耐性遺伝子の分布

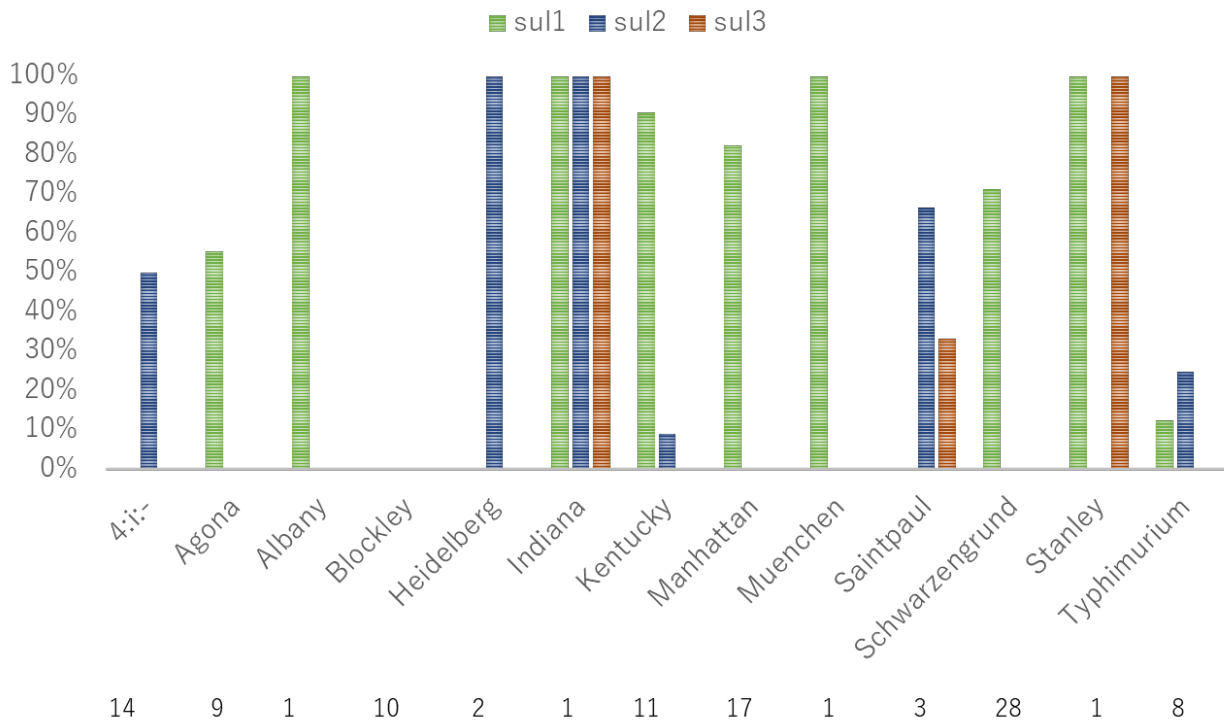


図6 アミノグリコシド耐性遺伝子 *aadA* の分布

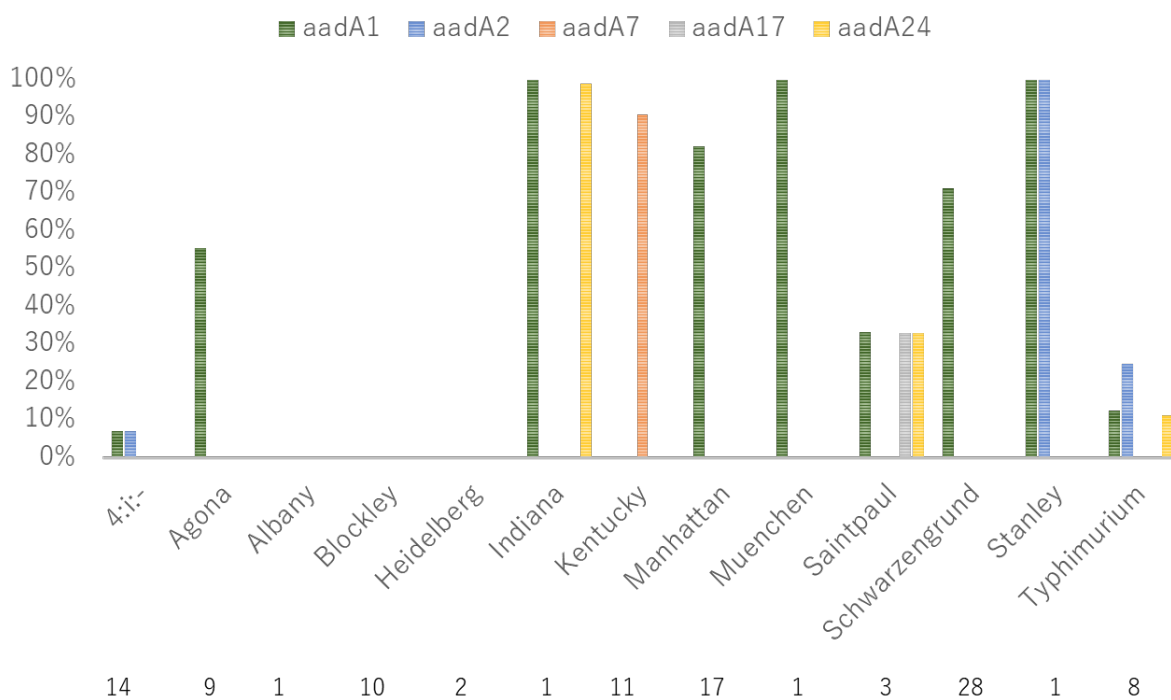


図7 トリメトプリム耐性遺伝子の分布

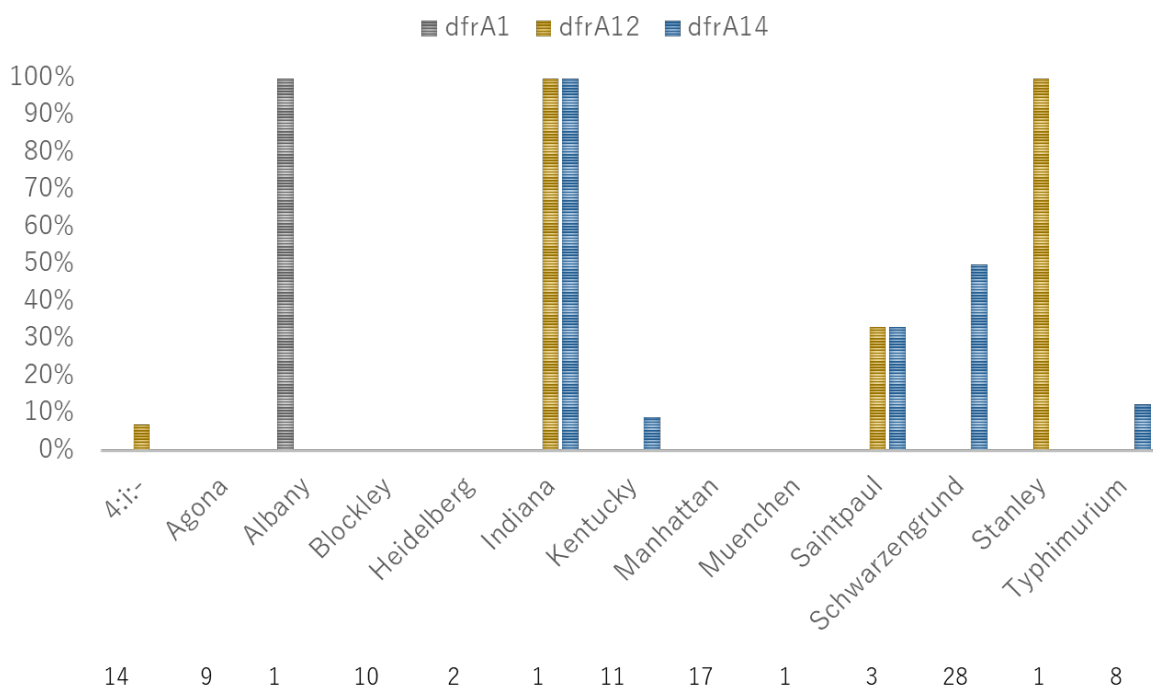


図8 アミノグリコシド耐性遺伝子 *aph* の分布

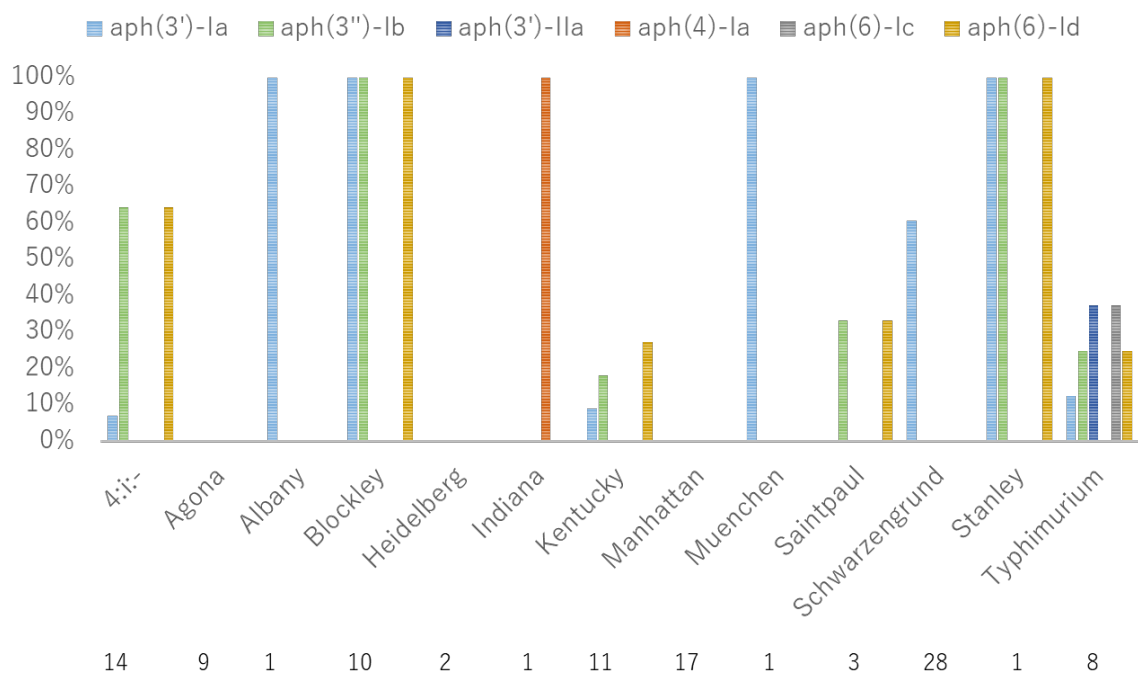


図9 β-ラクタマーゼ関連遺伝子の分布

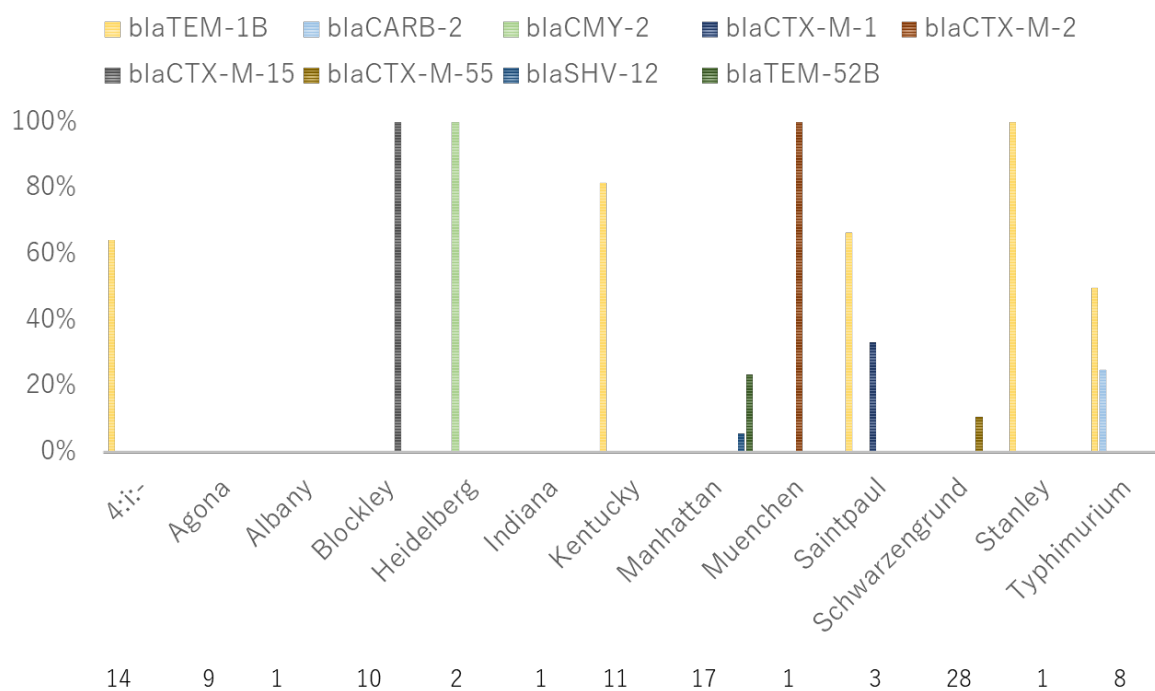


図 10 クロラムフェニコール耐性遺伝子の分布

