

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受領した、2013 年から 2017 年に分離された血清群 04、08、09 群サルモネラ菌株を供試した。昨年度までの薬剤感受性試験、血清型別の結果を踏まえ、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

供試菌株 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。

#### 1. テトラサイクリン耐性遺伝子 (図 1)

*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。

#### 2. 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。

#### 3. アミノグリコシド耐性遺伝子-1 (図 3)

*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。

#### 4. トリメトプリム耐性遺伝子 (図 4)

*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。

#### 5. アミノグリコシド耐性遺伝子-2 (図 5)

*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。

#### 6. βラクタマーゼ関連遺伝子 (図 6)

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つ  
たのは *blaTEM-1B* で 24%、次いで  
*blaCTX-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。

#### 7. クロラムフェニコール耐性遺伝子 (図 7)

*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。

#### 8. 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%であつ  
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  
Indiana1 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 ではストレプトマイシン、テトラサイクリン耐性が多い。前者については *aadA1* が、後者については *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。

ST 合剤はサルファ剤及びトリメトプリムからなるが、ディスク法で薬剤感受性試験を行う場合、サルファ剤及びトリメトプリムは現在入手できない。本研究から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。ゲノム情報から上記薬剤の単独耐性について情報が得られた。

カナマイシン耐性は近年 Schwarzengrund を中心に高頻度に検出されるようになってきている。当該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。

アンピシリン耐性に係る *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。セフトキシム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。

クロラムフェニコール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。

*tetG*、*bla*CARB-2、*floR* は多剤耐性 Typhimurium DT104 において見られた遺伝子群であり、本研究でも Typhimurium において検出された。当該遺伝子保有株は DT104 と関連性があることが考えられる。

04:i:-は Typhimurium 由来の単相菌と考

えられている。本研究では、例えば *tet* 遺伝子に関して *tetB* は前者に *tetG* は後者に特異的に分布していたり、*aph* 遺伝子に関して、前者は *aph(3'')-Ib* が多いのに対し、後者では分布が多様であるなど、必ずしも関係性が高いわけではないことが示唆された。

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。

## 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、本年度はゲノム解析による薬剤耐性遺伝子の検索を行った。これまで得られた薬剤耐性の遺伝的背景が明らかとなり、血清型ならびに薬剤耐性の観点、さらにその遺伝的背景から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 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)

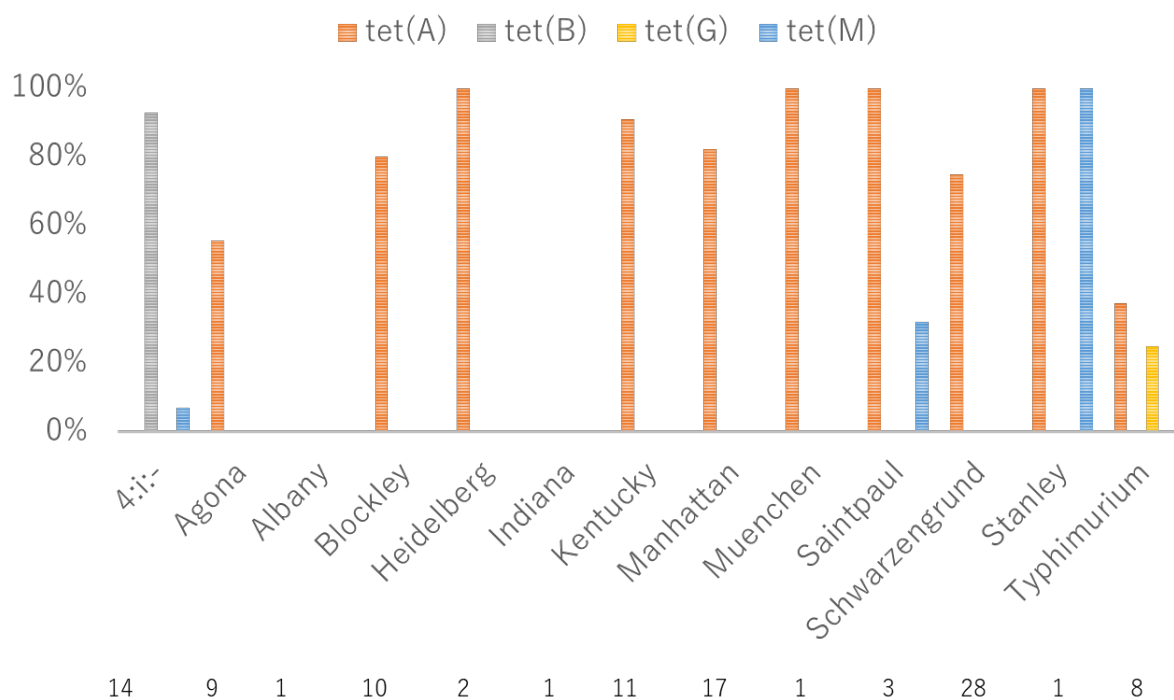


図2 サルファ剤耐性遺伝子の分布

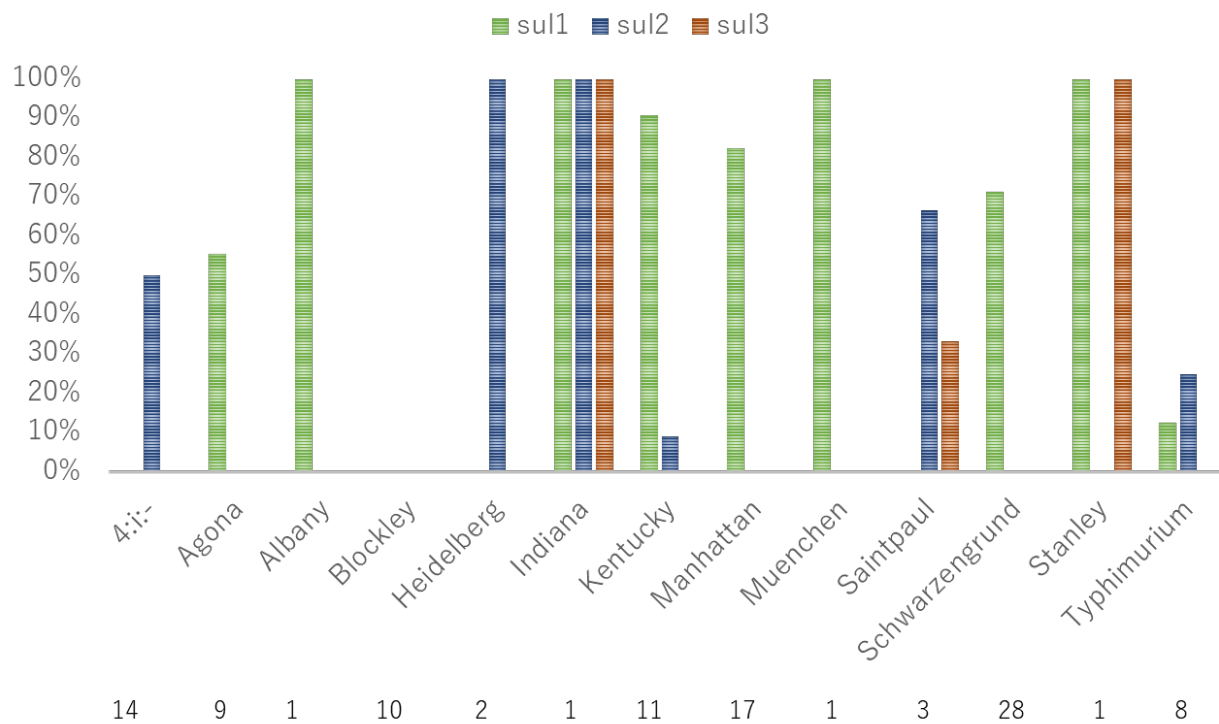


図3 アミノグリコシド耐性遺伝子 *aadA* の分布

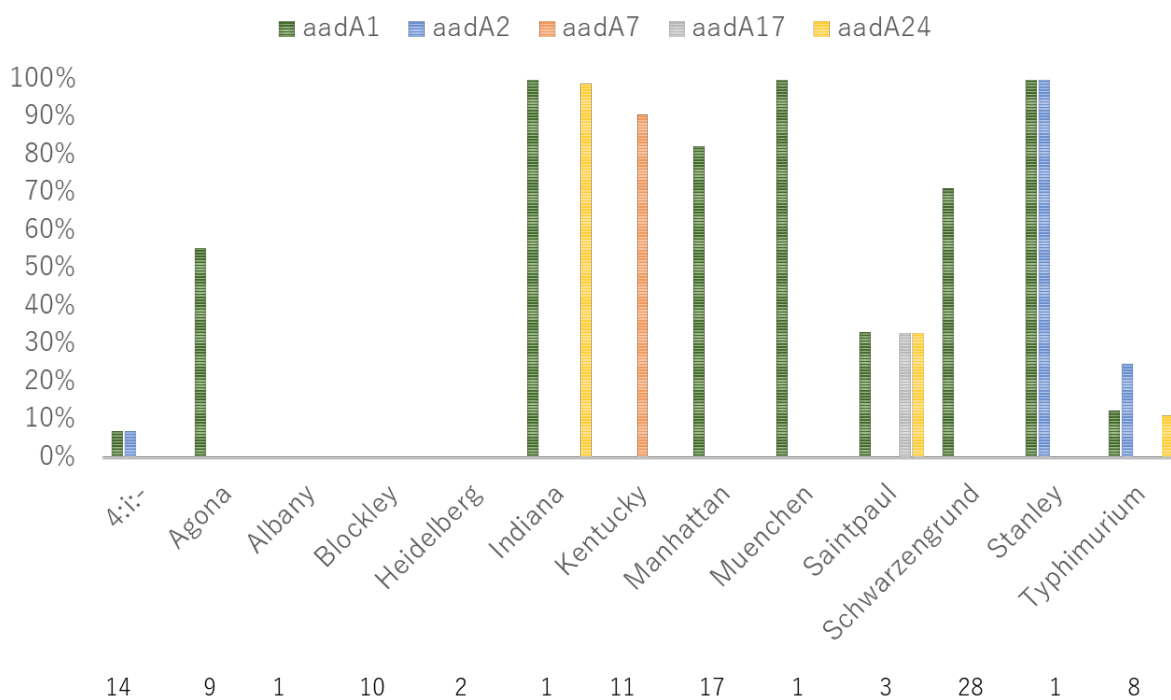


図4 トリメトプリム耐性遺伝子の分布

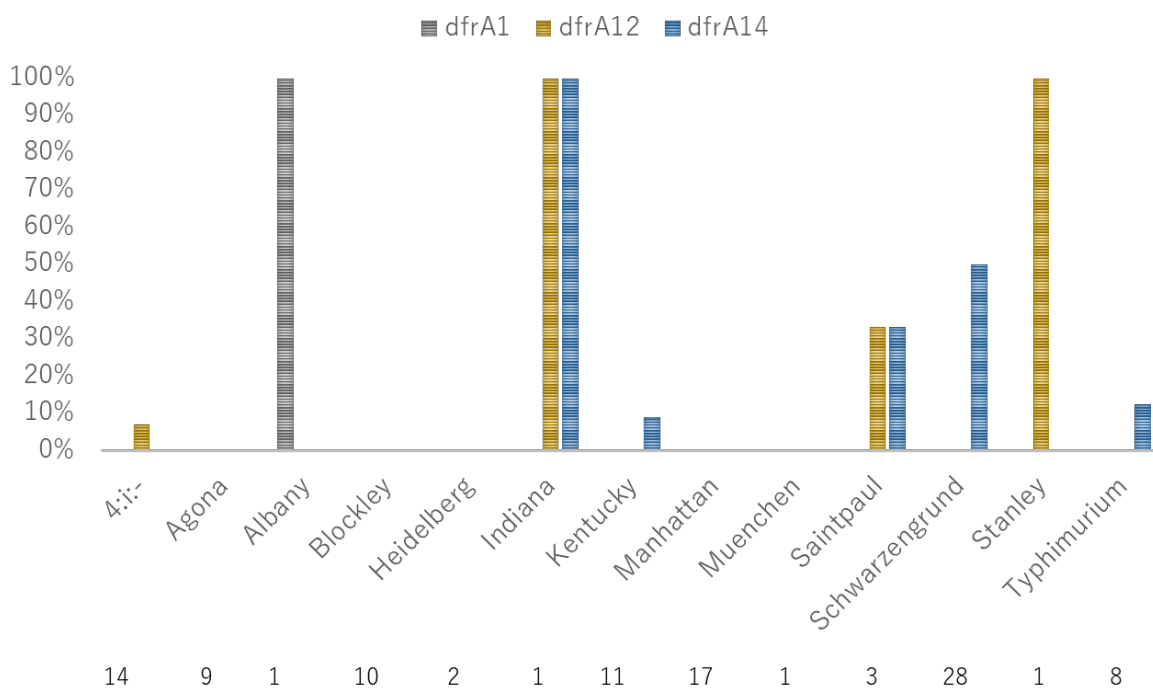


図5 アミノグリコシド耐性遺伝子 *aph* の分布

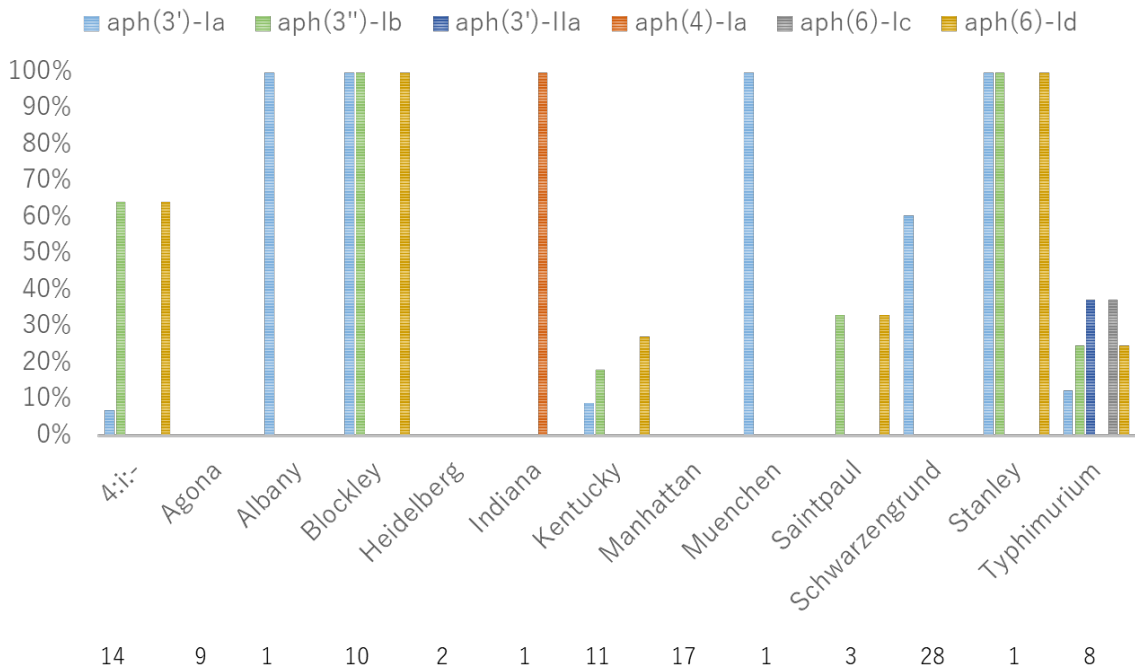


図6  $\beta$ -ラクタマーゼ関連遺伝子の分布

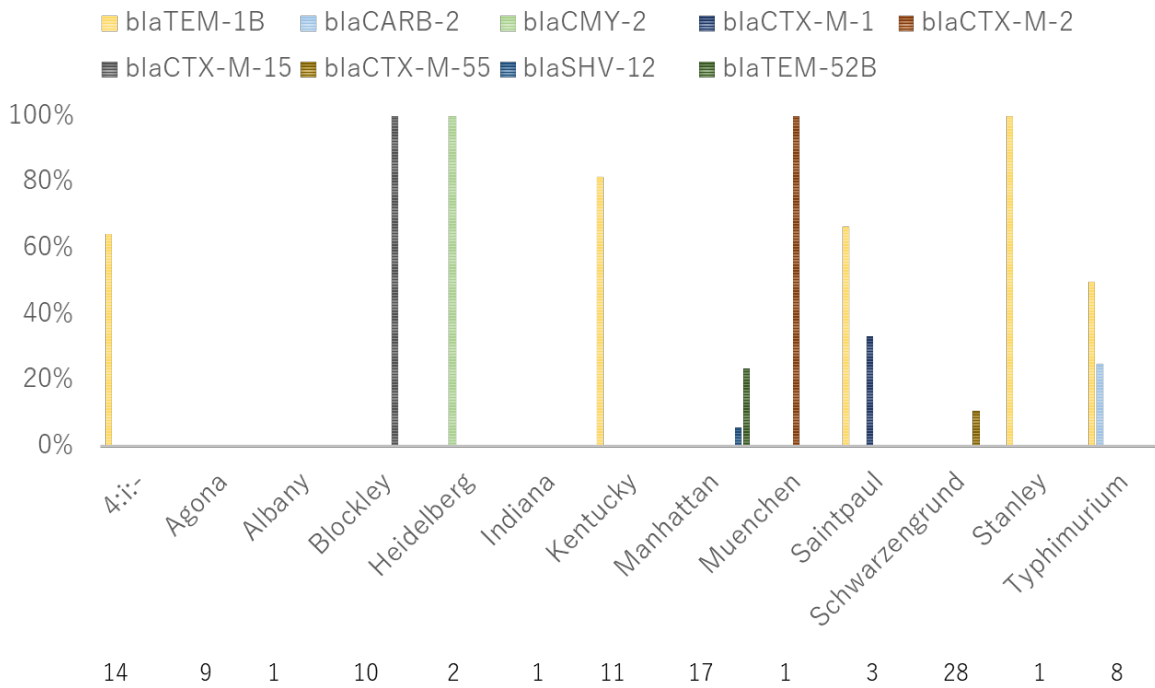


図7 クロラムフェニコール耐性遺伝子の分布

