

18. 無症状保菌者から分離されたサルモネラ属菌の

薬剤耐性状況調査

○松田 達也、齋藤 典子、安井 善宏（愛知県衛生研究所）

四本 信輔、富永 聡子、小林 慎一

（一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センター）

【研究目的】

サルモネラ属菌は食中毒原因菌としてだけでなく、増加傾向にある薬剤耐性菌としても大きな問題になっている。薬剤耐性サルモネラ属菌については、分離頻度の高い血清型に関する報告が多く、血清型毎の詳細な報告は少ない。

本研究では無症状保菌者から分離されたサルモネラ属菌について、薬剤感受性試験及び薬剤耐性遺伝子検索を行い、血清型毎の薬剤耐性傾向の有無を調査することを目的とした。

【研究の必要性】

サルモネラ属菌はヒトに急性胃腸炎や発熱を引き起こす食中毒原因菌であり、食中毒発生件数が細菌性食中毒の中で常に上位にランクされている公衆衛生上重要な細菌である。

近年、日本において、ESBL 遺伝子を保有する薬剤耐性サルモネラ属菌が報告¹⁾されており、海外においても、アメリカ疾病予防管理センター（CDC）より、2009年から2017年でニューキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン非感受性サルモネラの割合が約4倍に増加していると報告²⁾されている等、薬剤耐性株の出現率は増加傾向にある。

サルモネラ属菌の血清型は2,000種類以上に細分化されるが、病原微生物検出情報³⁾によると2007年から2019年に地方衛生研究所等で分離されたサルモネラ属菌は*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Thompson*, *S. Saintpaul*, *S. Typhimurium*, *S. Schwarzengrund*, *S. Braendrup*の7血清型が6割弱を占めており、食中毒事例等から分離される血清型には偏りがある。

一方で、サルモネラ属菌の感染者は無症状のまま保菌者となることもあるが、無症状保菌者から分離される血清型は食中毒事例等と異なり、多岐にわたる。

現在、薬剤耐性サルモネラ属菌の報告は、分離頻度の高い血清型が多く、無症状保菌者から分離された稀な血清型の薬剤耐性に関する知見は少ない。

当所では、2002年から一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターにおいて分離されたサルモネラ属菌の菌株を受領し血清型決定後保管している。受領した菌株の4割は先の7血清型であり、残りの6割は稀な血清型が検出されている。

無症状保菌者から分離されたサルモネラ属菌について、血清型毎の薬剤耐性を網羅的に把握し血清型による薬剤耐性傾向の有無を調査することで、血清型毎の適切な治療が可能になる等、サルモネラ腸炎治療の薬剤選択に対する重要なデータとなる。

【研究計画】

2007年から2019年までに一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターにて分離された菌株のうち、同一血清型が5株以上検出された40血清型1,269株を供試菌株とした。この1,269株に対し、以下の(1)及び(2)に示した検査を実施した。

(1) 薬剤感受性試験

供試菌株1,269株に対し、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) のガイドライン (M100 ED33:2023) に従い、寒天平板希釈法にてアンピシリン (ABPC) 及びシプロフロキサシン (CPFX) の最少発育阻止濃度 (MIC) を測定し、SIRの判定を行った。

(2) 薬剤耐性遺伝子検査

① β -ラクタマーゼ遺伝子

(1)の結果、ABPCに耐性を示した34株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子の検索を行った。PCR法にてESBL遺伝子 (CTX-M-1group、CTX-M-9group、TEM、SHV、CTX-M-8/25group、CTX-M-2group)⁴⁾、カルバペネマーゼ遺伝子 (KPC、IMP、NDM、VIM、OXA-48、GES)⁵⁾、AmpC β ラクタマーゼ遺伝子 (MOX、CIT、DHA、ACC、EBC、FOX)⁶⁾の検索を行い、TEM、CTX-M-1groupが検出された株について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、ResFinder 4.1を用いて遺伝子型を決定した。また、ESBL遺伝子陽性株はクラブラン酸を用いたディスク法によりESBL産生性を確認した。

② キノロン耐性決定領域のアミノ酸配列解析

(1)の結果、CPFXに耐性を示した8株について、Qiaseq FX DNA Library (QIAGEN) を用いてライブラリを作製し、イルミナ社の次世代シーケンスシステムを用いて、DNA断片の両端150塩基の塩基配列を取得するペアエンドシーケンスにより、ライブラリの塩基配列を取得した。取得した塩基配列をUnicyclerにてアセンブルし、ResFinder 4.1を用いてキノロン耐性決定領域の変異を検索した。また、CPFXに耐性を示した8株及び中間を示した25株の計33株に対し、プラスミド媒介性キノロン耐性 (PMQR) 遺伝子 (*qnrA*, *qnrD*, *qnrB*, *qnrS*, *oqxAB*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *qnrC*)⁷⁾の検索を行った。

【実施内容・結果】

検出結果をまとめて表に示した。

(1) 薬剤感受性試験

1,269株中ABPC耐性株は34株 (2.7%、全株MIC 128 μ g/mL以上) 検出され、中間の株は検出されなかった。一方でCPFX耐性株は8株 (0.63%、MIC 1または2 μ g/mL)、CPFX中間株は25株 (2.0%) であった。

ABPC耐性株は、14血清型から検出され、04:i:-が14株 (41.2%、14/34) と最多であった。CPFX耐性株は、5血清型から検出され、Schwarzengrundが3株 (37.5%、3/8) と最多であった。また、CPFX中間株は、13血清型から検出され、Schwarzengrund及びInfantisが5株 (20.0%、5/25) と最多であった。ABPC及びCPFXに耐性が確認された株は5株 (0.39%) あり、その血清型はSaintpaul (CPFX MIC 1 μ g/mL 1株、2 μ g/mL 1株) 2株、Schwarzengrund (CPFX MIC 2 μ g/mL) 1株、Montevideo (CPFX MIC 1 μ g/mL) 1株、Thompson (CPFX MIC 1 μ g/mL) 1株であった。

ABPC 耐性株及び CPFY 耐性・中間株のうち、ABPC 耐性 34 株中 26 株 (76.5%)、CPFY 耐性 8 株中 7 株 (87.5%) は 2014 年以降に検出されていた。一方で CPFY 中間株は 2007 年から 2013 年に 14 株、2014 年以降に 11 株検出されており、分離年度による偏りはなかった。

(2) 薬剤耐性遺伝子検査

① ABPC 耐性 34 株中、TEM 遺伝子が検出された株が 26 株 (76.4%)、CTX-M-1group 遺伝子が検出された株が 4 株 (11.8%)、CIT 遺伝子が検出された株が 2 株 (5.9%) あり、全ての遺伝子が検出されなかった株が 4 株 (11.8%) あった。なお、TEM 遺伝子と CTX-M-1group 遺伝子が同時に検出された株が 2 株あった。

TEM 遺伝子の内訳は、TEM-1B or 206 が 26 株中 21 株と最も多く、TEM-1A or 98、TEM-52C 及び TEM-52B がそれぞれ 1 株ずつ検出された。今回使用した塩基配列解析用プライマーでは候補の遺伝子型が 3 種類以上確認された株が 2 株あった。CTX-M-1 group 遺伝子の内訳は、CTX-M-55 or 164 及び CTX-M-62 がそれぞれ 2 株ずつであった。

② CPFY 耐性 8 株中、キノロン耐性決定領域に点変異が確認された株は 6 株あり、*gyrA* 遺伝子及び *parC* 遺伝子の変異が 3 株 (*gyrA* S83F, *parC* T57S 2 株、*gyrA* D87Y, *parC* T57S 1 株)、*parC* 遺伝子の単独変異が 3 株 (全株 T57S) であった。

CPFY 耐性・中間 33 株中、PMQR 遺伝子が検出された株は 15 株あり、*qnrB* 遺伝子保有株が 6 株、*qnrS* 遺伝子保有株が 6 株、*qnrD* 遺伝子保有株が 2 株、*qnrA* 遺伝子及び *aac(6)-Ib-cr* 遺伝子同時保有株が 1 株であった。残り 18 株から PMQR 遺伝子は検出されなかった。

【考察と今後の課題】

1,269 株中 ABPC 耐性株は 34 株 (2.7%) であった。一般財団法人東京顕微鏡院が行った食品取扱者から分離されたサルモネラ属菌の薬剤感受性調査⁸⁾では、ABPC 耐性率は 7.6%と報告されており、薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書⁹⁾では、ヒト由来サルモネラ属菌の ABPC 耐性率は 17.0%となっていることから、愛知県のサルモネラ属菌の ABPC 耐性は低い状況にあると考えられる。血清型毎の ABPC 耐性率は、04:i:- が 60.9%と非常に高率を示しており、全ての株で TEM-1B or 206 遺伝子を保有していた。厚生労働科学研究報告書¹⁰⁾によると、04:i:- の ABPC 耐性率は 79%と本研究と同様に高率であり、国内分離株において 04:i:- は薬剤耐性傾向が強いと考えられる。本研究で 04:i:- が高率に保有していた TEM-1B or 206 遺伝子はプラスミド上にコードされている可能性が高いため、04:i:- のプラスミド獲得能をさらに調査していくことで、今後の薬剤耐性サルモネラ属菌対策に寄与できると考えられる。なお、04:i:- は Typhimurium の変異型とされ、近年多剤耐性化傾向が問題視されている血清型である¹¹⁾。Typhimurium は食中毒事例からも多く分離されること、04:i:- は国内においても分離事例が増加していることから、本血清型株の薬剤耐性状況は今後も継続的に調査していく必要があると考えられた。

CPFY 耐性株は 8 株 (0.63%) あり、一般財団法人東京顕微鏡院が行った食品取扱者から分離されたサルモネラ属菌の薬剤感受性調査⁸⁾での CPFY 耐性率は 0.3%と大きな差異はなく、愛知県のサルモネラ属菌の CPFY 耐性は低い状況にあると考えられる。CPFY 耐性株のうち、6 株は既存のキノロン耐性決定領域に点変異が確認されているため、水平伝播による拡散は少ないと考えられるが、CPFY 耐性株の検出状況が 2014 年以降に集まっていることから、CPFY

耐性率の動向に注視する必要があると考えられた。

また、CPFX 中間株 25 株中 8 株から PMQR 遺伝子が検出されていたため、薬剤感受性試験において耐性となった株だけでなく、中間を示した株においても薬剤耐性遺伝子の積極的な確認が望まれる。プラスミド媒介性遺伝子は同種の菌だけでなく、他の菌種にも伝播する可能性があるため、今後も耐性遺伝子の保有状況を監視する必要がある。今回、無症状保菌者から分離されたサルモネラ属菌の薬剤耐性状況の調査を行い、全体的な薬剤耐性割合は低いものの徐々に増加していること、ABPC 耐性度が非常に高い血清型が存在すること、プラスミド媒介性キノロン耐性遺伝子が無症状保菌者でも検出されているため水平伝播の危険性があることが明らかとなった。血清型分布や薬剤耐性状況の把握は、感染症等の予防対策を行う科学的根拠の一端を担うものであり、今後もサルモネラ属菌における薬剤耐性状況について動向を注視していきたい。

表. 血清型毎の薬剤耐性状況及び遺伝子検出結果

O群	血清型	ABPC		CPFX		薬剤耐性遺伝子				株数	
		SIR	MIC	SIR	MIC	ABPC	ESBL	点変異	PMQR		
4	Derby	R	128<	S	0.03	ND				1	
		S	>1	I	0.125				—	1	
	O4:i:-	R	128<	S	0.06	TEM-1B or 206				7	
		R	128<	S	0.03	TEM-1B or 206				7	
	Saintpaul	R	128<	R	2	TEM-1B or 206/CTX-M-55 or 164	○	—	qnrS	1	
		R	128<	R	1	TEM-1B or 206/CTX-M-55 or 164	○	—	qnrS	1	
		R	128<	S	0.03	TEM-1B or 206				1	
		S	>1	I	0.5				—	1	
		S	>1	I	0.25				—	1	
	Schwarzengrund	R	128<	R	2	TEM-1B or 206			gryA S83F, parC T57S	qnrS	1
		S	>1	R	2				gryA S83F, parC T57S	qnrB	1
		S	4	R	1				gyrA D87Y, parC T57S	—	1
		S	4	I	0.5					—	1
		S	>1	I	0.5					qnrB	2
		S	>1	I	0.25					—	2
Stanley	R	128<	S	0.06	ND					1	
	R	128<	S	0.03	TEM*					1	
	S	>1	I	0.25					—	1	
Typhimurium	R	128<	S	0.03	ND					1	
7	O7:-:-	R	128<	S	0.03	CTX-M-62	○			1	
		S	>1	I	0.5				—	1	
	Infantis	R	128<	S	0.03	CTX-M-62	○			1	
		R	128<	S	0.03	CIT					1
		S	>1	I	0.5					—	4
		S	>1	I	0.25					—	1
	Montevideo	R	128<	R	1	ND			parC T57S	qnrA, aac(6)-Ib-cr	1
		R	128<	I	0.5	TEM-1A or 98				qnrB	1
	Rissen	R	128<	S	0.03	TEM-1B or 206					1
	Singapore	S	>1	I	0.25					—	2
Thompson	R	128<	R	1	CIT			parC T57S	qnrS	1	
6,8	Chailey	S	>1	R	1			parC T57S	qnrS	1	
		S	>1	I	0.5				qnrS	1	
	O6,8:-:-	S	>1	I	0.5				qnrB	1	
		R	128<	S	0.03	TEM-52C	○				1
	Manhattan	R	128<	S	0.016	TEM-52B	○				1
		R	128<	I	0.5	TEM-1B or 206				qnrB	1
Newport	R	128<	S	0.03	TEM-1B or 206					1	
	R	128<	I	0.25	TEM*				—	1	
9	Enteritidis	S	>1	I	0.25				—	1	
		S	>1	I	0.25				qnrD	2	
1,3,19	Senftenberg	S	>1	I	0.25				qnrD	2	

S(感受性), I(中間), R(耐性)、ND : not detected、*今回使用した塩基配列解析用プライマーでは、候補の遺伝子型が3種類以上確認された。

【謝辞】

長年にわたり菌株の分与をいただいている一般社団法人 愛知県食品衛生協会/食品衛生センターに深く感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Jpn. J. Infect. Dis., 67, 54-57, 2014
- 2) ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES 2019
- 3) 病原微生物検出情報 速報グラフアーカイブ 細菌
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/510-graphs/11320-iasrgb-arcb.html>
- 4) 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金（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）成果報告書
https://www.amed.go.jp/content/files/jp/houkoku_h28/0106022/h28_010.pdf
- 5) 病原体検出マニュアル 薬剤耐性菌 令和2年6月改訂版 Ver2.0
- 6) J Clin Microbiol., 2002 Jun;40(6):2153-62., doi: 10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002.
- 7) Journal of Medical Microbiology (2013), 62, 1823-1827
- 8) Jpn. J. Food Microbiol., 39(3), 99-107, 2022
- 9) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書：25, 2020
- 10) 食品由来薬剤耐性菌の発生動向及び衛生対策に関する研究 分担課題 非チフスサルモネラ症の起因菌の薬剤耐性に関する研究
https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2016/163031/201622014A_upload/201622014A0011.pdf
- 11) 東京都微生物検査情報（月報），第31巻第4号，2010

【経費使途明細】

使 途	金 額
ディスプレイ	6,860 円
ピペットチップ	22,000 円
ピペットチップラック	7,730 円
DHL 寒天培地	26,820 円
ミュラー・ヒントン寒天培地	37,600 円
PCR8 連チューブ+フラットキャップ	5,950 円
ニトリルグローブ	1,680 円
Takara EX Taq(Hot start Version)	27,788 円
EnzSAP-500	62,100 円
CleanSEQ Kit	73,600 円
消費税	27,212 円
銀行振込手数料	660 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円