

4. 茨城県内流通食肉から検出された サルモネラ属菌の薬剤耐性状況に関する調査研究

○相原 義之（茨城県衛生研究所）

鯉淵 裕子（旧：茨城県衛生研究所 現：茨城県立こころの医療センター）

深谷 節子（茨城県衛生研究所）

【研究目的】

病原性細菌の薬剤耐性化は細菌感染症治療の困難化を引き起こし、患者の予後を著しく悪化させる。そのため、薬剤耐性菌の蔓延予防は临床上においても公衆衛生上においても重要な課題となる。しかし、偏に「薬剤耐性菌」といってもその定義は非常に幅広いものであるため、その全てに対策を講じるのは現実的ではなく、リスク評価に基づく優先順位の設定が不可欠である。ここでリスク評価において重要となる考え方として、①どの薬剤に耐性を示すのか、②どの細菌が薬剤耐性化するのか、の2点が挙げられる。このうち①については、临床上で切り札的位置づけとなるβ-ラクタム系（特にカルバペネム系）、フルオロキノロン系、アミノグリコシド系の3系統の抗菌薬への耐性が問題視され、これらの薬剤に耐性を示す菌は「多剤耐性菌」として全世界的に警戒されている。一方で、②については、ヒトに対して重篤な症状を引き起こし、かつ日常生活で接触機会が比較的多い細菌であるほうが社会的なインパクトは大きい。その観点から考えると、大規模食中毒をしばしば引き起こし、かつ動物由来感染症起因菌でもあるサルモネラ属菌は、一度薬剤耐性化が起これば、耐性菌が蔓延してしまうと健康危害のリスク増大が計り知れないものとなることは疑いようがなく、その動向の把握は欠かせないものである。

日本で報告されているサルモネラ症の大部分は食中毒によるものであり、原因食品としては2010年頃までは鶏卵が筆頭に挙げられていた。しかし、近年ではカンピロバクター食中毒と同様に食肉（特に鶏肉）を原因とする事例が増加傾向にあり、食肉由来サルモネラ属菌は食品衛生上、注目を集めている¹⁾。その対象には薬剤耐性状況の把握も含まれているが、現状、流通食肉由来のサルモネラ属菌においてはモニタリング体制が構築されておらず、関係自治体による調査に依存している。こうした背景を踏まえ、茨城県においても、県内流通食肉から検出されたサルモネラ属菌について薬剤耐性動向を調査することとした。

【研究計画】

平成24～28年度に収去された茨城県内流通食肉600検体(120検体/年)から検出されたサルモネラ属菌82株(表1)を供試菌株とした。血清型別の内訳は*S. Infantis*が51株(62%)と最も多く、次いで*S. Schwarzengrund*が14株(17%)であった。この82株に対し、以下の(1)～(4)に示した検査を実施した。

表1. 県内流通食肉由来サルモネラ属菌の検出状況と血清型別

血清型	年度別検出株数					合計
	2012年度	2013年度	2014年度	2015年度	2016年度	
<i>S. Infantis</i>	9	7	9	12	14	51
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	2	2	5	4	14
<i>S. Typhimurium</i>	0	0	2	1	1	4
<i>S. Manhattan</i>	0	0	1	0	3	4
<i>S. Heidelberg</i>	1	0	1	0	0	2
<i>S. Yovokome</i>	2	3	0	0	0	5
<i>S. Give</i>	1	0	0	0	0	1
<i>S. Minnesota</i>	0	0	0	0	1	1
合計	14	12	15	18	23	82

(1) 薬剤感受性検査(Kirby-Bauer 法)

供試菌株 82 株に対し、アンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、セフトジジム(CAZ)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、テトラサイクリン(TC)、ホスホマイシン(FOM)、ST 合剤(ST)、クロラムフェニコール(CP)の 11 種の薬剤ディスクを用い、CLSI のガイドライン(100S-M24)に従って実施した。

(2) 薬剤耐性遺伝子検査 (β -ラクタマーゼ関連遺伝子)

(1)の結果、アンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、セフトジジム(CAZ)のいずれかに耐性を示した株について、平成 26 年度薬剤耐性菌研修会資料(国立感染症研究所 細菌第二部作成)に示された方法に従って実施した。まず、各種 β -ラクタマーゼ阻害剤(クラブラン酸、スルバクタム、メルカプト酢酸ナトリウム、3-アミノフェニルボロン酸)を用いた β -ラクタマーゼ型別検査を行い、クラブラン酸(またはスルバクタム)で阻害が確認された菌株をクラス A、メルカプト酢酸ナトリウムで阻害が確認された菌株をクラス B、3-アミノフェニルボロン酸で阻害が確認された菌株をクラス C と分類した。その後、クラス A については ESBL 遺伝子 5 種類²⁾(TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9)、クラス B はカルバペネマーゼ遺伝子 5 種³⁾(KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48)、クラス C は AmpC β -ラクタマーゼ遺伝子 6 種⁴⁾(MOX, CIT, DHA, ACC, EBC, FOX)について、PCR による検出を行った。

(3) キノロン耐性決定領域のアミノ酸配列解析

(1)の結果、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)に耐性を示した株について、DNA ジャイレース(*gyrA*)、DNA トポイソメラーゼ(*parC*)の 2 つのキノロン耐性決定領域の解析を行った⁵⁾。まず、両領域について PCR 増幅を行った後、得られた産物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、BLAST 検索(国立遺伝学研究所データベース、DDBJ)により塩基配列の変異を調べた。

(4) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

(1)~(3)の結果、同一血清型で β -ラクタム系もしくはキノロン系に耐性を示し、かつ薬剤感受性パターンが類似している菌株群について実施した。制限酵素は *Xba*I, *Bln*I の 2 種を用い、電圧 6V/cm、スイッチングタイム 2.2sec~63.8sec、buffer 温度 12 度の反応条件で 20 時間泳動を行った。

【実施内容・結果】

(1) 薬剤感受性検査

実施結果を表2に示した。全82株のうち71株(87%)はいずれかの薬剤に耐性を有しており、特にテトラサイクリン耐性株は63株(77%)と高率であった。また臨床上重要な位置付けを占めるβ-ラクタム剤については、アンピシリン耐性株が11株(13%)確認され、そのうち7株は第3世代セファロスポリン系抗菌薬(セフォタキシム、セフトラジジム)にも耐性を示した。一方でキノロン耐性株については、ナリジクス酸耐性株が11株確認された(いずれもシプロフロキサシンには中間耐性であった)。また、*S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Heidelberg* および *S. Minnesota* では5剤耐性菌が確認された。

表2. 茨城県内流通食肉由来サルモネラ属菌の薬剤耐性状況

血清型	None	TC	KM	TC, KM	TC, ST	TC, NA	KM, NA	TC, KM, ST	ABPC, CTX, CAZ	ABPC, NA, TC	ABPC, NA, TC, KM	ABPC, CTX, CAZ, TC	ABPC, CTX, CAZ, KM, TC	ABPC, CTX, CAZ, NA, TC
<i>S. Infantis</i>	9	17	1	13	4	1	0	3	1	0	0	1	1	0
<i>S. Schwarzengrund</i>	0	2	4	5	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>S. Typhimurium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
<i>S. Yovokome</i>	1	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Manhattan</i>	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Heidelberg</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. Give</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Minnesota</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

(2) 薬剤耐性遺伝子検査 (β-ラクタマーゼ関連遺伝子)

アンピシリン耐性株(11株)について実施した結果を表3にまとめた。まず、*S. Typhimurium*は4株全てが第3世代セファロスポリン系抗菌薬感受性株であり、TEM型遺伝子が検出された。残りの株は全て第3世代セファロスポリン系抗菌薬耐性であり、*S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Minnesota*からはCIT型遺伝子が検出された。一方で、*S. Schwarzengrund*からは基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)の1種であるCTX-M-1グループ遺伝子が検出された。

表3. アンピシリン耐性株の内訳とβ-ラクタマーゼ関連遺伝子検出状況

血清型	耐性薬剤	由来検体	検出年度	産地	β-ラクタマーゼ型別検査	薬剤耐性遺伝子型
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC	鶏肉	2014	国産	クラスA	TEM型
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC	鶏肉	2014	国産	クラスA	TEM型
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC	鶏肉	2015	国産	クラスA	TEM型
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC, KM	鶏肉	2016	国産	クラスA	TEM型
<i>S. Infantis</i>	AM, CTX, CAZ, KM, TC	鶏肉	2014	国産	クラスC	CIT型
<i>S. Infantis</i>	AM, CTX, CAZ, TC	鶏肉	2015	国産	クラスC	CIT型
<i>S. Infantis</i>	AM, CTX, CAZ	鶏肉	2015	国産	クラスC	CIT型
<i>S. Schwarzengrund</i>	AM, CTX, CAZ, KM, TC	鶏肉	2015	国産	クラスA	CTX-M-1型
<i>S. Heidelberg</i>	AM, CTX, CAZ, NA, TC	鶏肉	2012	ブラジル	クラスC	CIT型
<i>S. Heidelberg</i>	AM, CTX, CAZ, NA, TC	鶏肉	2014	ブラジル	クラスC	CIT型
<i>S. Minnesota</i>	AM, CTX, CAZ, NA, TC	鶏肉	2016	ブラジル	クラスC	CIT型

(3) キノロン耐性決定領域のアミノ酸配列解析

ナリジクス酸耐性株(11株)の解析結果について、表4に示した。今回の検討において確

認められたアミノ酸変異部位とその変異パターンは、いずれもナリジクス酸耐性菌株において報告されているものであったことから、点変異によるナリジクス酸への耐性化がうかがえた。また、同一血清型では変異パターンが共通していることが確認された。

表 4. ナリジクス酸耐性株の内訳とキノロン耐性決定領域の遺伝子変異状況

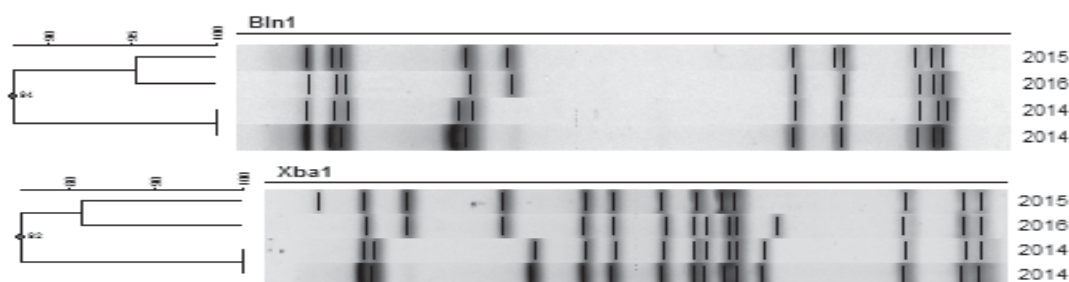
血清型	耐性薬剤	由来検体	検出年度	産地	キノロン耐性決定領域のアミノ酸変異	
					<i>gyrA</i> (53~170)	<i>parC</i> (16~120)
<i>S. Infantis</i>	NA, TC	鶏肉	2013	国産	D87→Y	T57→S
<i>S. Schwarzengrund</i>	NA, KM	鶏肉	2015	国産	変異なし	T57→S
<i>S. Schwarzengrund</i>	NA, TC	牛・鶏合挽	2016	アメリカ	変異なし	T57→S
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC	鶏肉	2014	国産	D87→Y	変異なし
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC	鶏肉	2014	国産	D87→Y	変異なし
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC	鶏肉	2015	国産	D87→Y	変異なし
<i>S. Typhimurium</i>	AM, NA, TC, KM	鶏肉	2016	国産	D87→Y	変異なし
<i>S. Heidelberg</i>	AM, CTX, CAZ, NA, TC	鶏肉	2012	ブラジル	S83→F	T57→S
<i>S. Heidelberg</i>	AM, CTX, CAZ, NA, TC	鶏肉	2014	ブラジル	S83→F	T57→S
<i>S. Yovokome</i>	NA, TC	鶏肉	2012	国産	S83→F	T57→S
<i>S. Minnesota</i>	AM, CTX, CAZ, NA, TC	鶏肉	2016	ブラジル	変異なし	T57→S

(4) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

これまでの結果から、表 5 に示すように、*S. Typhimurium* 4 株の薬剤耐性状況、薬剤耐性遺伝子型別、遺伝子変異パターンが非常に類似していることが判明した。そこで、分子疫学解析 (PFGE) をおこなったところ、2014 年度株は同一株、2015 年度株と 2016 年度株は PFGE パターンの類似度が 80% 以上となった。

表 5. 薬剤耐性状況が類似した *S. Typhimurium* (4 株) の情報と PFGE 解析画像

	検出年度	収去HC	由来	産地	薬剤耐性	βラクタマーゼ遺伝子	キノロン耐性決定領域の変異	
							<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
菌株1	2014	A	鶏肉	国産	ABPC, NA, TC	TEM型	D87→Y	変異なし
菌株2	2014	A			ABPC, NA, TC	TEM型	D87→Y	変異なし
菌株3	2015	B			ABPC, NA, TC	TEM型	D87→Y	変異なし
菌株4	2016	B			ABPC, KM, NA, TC	TEM型	D87→Y	変異なし



【考察と今後の課題】

今回の検討において、カルバペネム耐性菌は検出されなかったものの、第 3 世代セファロスポリン系抗菌薬に耐性を示した株は確認され、検出された薬剤耐性遺伝子型は CIT 型が最も多かった。CIT 型遺伝子は、2000 年以降、日本において食肉から検出される第 3 世代セファロスポリン耐性サルモネラ属菌や同薬剤耐性大腸菌から検出されることが多く、幅広い食肉由来細菌の薬剤耐性化に寄与してきた。そのため、長らく公衆衛生上問題視さ

れていたが、2011年、畜産業界において動物用第3世代セファロスポリン系抗菌薬であるセフチオフルのニワトリへの卵内接種自粛が開始されると、第3世代セファロスポリン系抗菌薬耐性菌とともに検出率が低下したとの報告がある⁶⁾。しかし、依然としてCIT遺伝子は一定の割合で検出される状況にあり、今後も同遺伝子の検出傾向をモニタリングし、蔓延状況の確認を継続していくことが重要であると考ええる。

一方で、*S. Typhimurium*については、2014年度の2株は同一施設からの収去食品由来であったため菌株間の関連が示唆されるものの、その他の菌株はそれぞれ検出年度、由来食品を収去した保健所が異なっており、菌株間の関連性は薄いと考えられた。にもかかわらず類似した薬剤耐性状況とPFGEパターンを示したことから、同血清型については同様の性質を示す菌株が広がっている可能性が示唆された。*S. Typhimurium*は*S. Enteritidis*などと同様、食中毒起因菌として検出報告の多い血清型であり、茨城県においても平成26年度に加熱不十分の鶏肉を喫食したことによる食中毒事例が発生している。したがって、その薬剤耐性状況の把握は意義深く、今後も動向を注視することが肝要であると考えられる。

【参考文献】

1. 平成28年度食中毒発生状況（厚生労働省）
2. Shibata, N. *et al*, *Antimicrob. Agents Chemother.*;2006(50),791-795.
3. Shibata, N. *et al*, *J. Clin. Microbiol.*;2003(41),5407-5413.
4. Pérez-Pérez, F. J. *et al*, *J. Clin. Microbiol.*;2002(40),2153-2162.
5. Giraud, E. *et al*, *Antimicrob. Agents Chemother.*;1999(43),2131-2137.
6. Hiki, M. *et al*, *Foodborne. Pathog. Dis.*;2015 Jul(7),639-643

【経費使途明細】

使 途	金 額
薬剤感受性検査用ディスク 18 種	35,900 円
ミューラーヒントンⅡ寒天培地	42,800 円
薬剤耐性遺伝子解析用プライマー	19,790 円
Illustra Hot Start Mix RTG	55,960 円
MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	11,600 円
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	37,000 円
Big Dye Terminator v3.1 Purification Kit	21,320 円
PFGE 解析用制限酵素(BlnI, XbaI)	33,920 円
カジトン培地（菌株保存用）	17,689 円
消費税	22,077 円
銀行振込手数料	1,944 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円