

2007 年から 2010 年に山梨県で分離された 散発下痢症患者由来サルモネラ属菌の薬剤耐性

柳本恵太 大沼正行 植松香星

Antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from patients
with sporadic diarrhea in Yamanashi prefecture, 2007-2010.

Keita YANAGIMOTO, Masayuki OHNUMA, Kousei UEMATSU

キーワード：サルモネラ、薬剤耐性、散発下痢症

サルモネラ属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌で、O 抗原と H 抗原の組み合わせにより現在 2500 種類以上の血清型に分類されている。動物の腸管に生息していることが多く、汚染された食品等を喫食すると下痢、腹痛、発熱などの消化器症状を引き起こすことで知られている。2011 年の細菌性食中毒では患者数は最も多く、件数でも 2 番目に多い状況にあり、患者が死亡する事例も 3 件発生している¹⁾ことから、依然として重要な食中毒原因菌の一つである。

当所では以前よりサルモネラ食中毒を防止するための基礎資料を得る目的で、サルモネラ属菌の各種性状を調査してきた²⁾⁻¹⁶⁾。その中でも近年公衆衛生上の問題となっている薬剤耐性菌の調査により、2002 年及び 2006 年にフルオロキノロン系抗菌薬耐性の 10 剤及び 11 剤耐性菌が確認されている¹⁶⁾。フルオロキノロン系抗菌薬はサルモネラの治療薬として使用されることが多いため、耐性菌の拡大は非常に重要な問題となる。また、2008 年には新種の β -ラクタマーゼである NDM-1 を持つ多剤耐性菌が発見され¹⁷⁾、国内の患者からも分離されている¹⁸⁾。この NDM-1 がコードされているプラスミドはサルモネラ属菌に接合伝達が可能であることが確認され¹⁹⁾、実際に米国ではサルモネラ属菌からも検出されている²⁰⁾。これらのことから、薬剤耐性パターンの変化が生じつつあるサルモネラ属菌の薬剤耐性を引き続きモニタリングしていくことは重要であると考えられる。そこで、

今回は 2007 年から 2010 年に山梨県内で分離された散発下痢症患者由来サルモネラ属菌の薬剤耐性について調査したので報告する。

材料と方法

1 供試菌株

県内の医療・検査機関で分離され、血清型別の依頼を受けた散発下痢症患者由来のサルモネラ属菌 102 株を供試した。

2 サルモネラの同定法

サルモネラの同定は常法に従い、生化学的性状からサルモネラと同定し、サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)により血清型を決定した。

3 薬剤感受性試験

CLSI の規格に準拠した一濃度ディスク法 (BD センシディスク) によって測定した。使用薬剤はスルフィソキサゾール (SA), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), カナマイシン (KM), アンピシリン (ABPC), セファロチン (CET), セフォキシチン (CFX), セフォタキシム (CTX), ゲンタマイシン (GM), ラタモキシセフ (LMOX), ホスホマイシン (FOM), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), シプロフロキサシン (CPF), スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤

(ST) の 16 薬剤とした。

4 プラスミドプロファイル

Kado と Liu の方法²¹⁾に準拠して行った。プラスミド DNA を抽出後、0.65 % のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下でプラスミドを確認した。

結果

1 分離株の血清型

サルモネラ属菌 102 株は 24 種類の血清型に分類された (表 1)。最多分離血清型は *Salmonella* Enteritidis (SE) で 26 株 25.5 % を占め、次いで *S. Typhimurium* (ST) が 13 株 12.7 %、次に *S. Saintpaul* が 10 株 9.8 % だった。SE は 1997 年から 2006 年までの既報¹⁶⁾では 68.5 % であるため、今回は大幅に減少した。

2 年次別分離株数

年次別の分離株数では 2008 年が最多の 40 株であり、最少は 2010 年の 17 株であった。2010 年の分離株数は 1985 年の調査開始以来最も少ない株数となった。年平均の分離株数は 25.5 株で、既報¹⁶⁾の年平均 133 株と比較すると 1/5 以下に減少した。また、2010 年には SE が 1 株のみの分離となり、SE の分離数として調査開始以来最少となった。一方で、*S. Nagoya* は 4 年間で 6 株分離されており、既報¹⁶⁾と比較し年平均で 4 倍程度に増加した。

3 分離株の薬剤耐性

102 株のうち 16 薬剤のいずれかに耐性を示したのは 8 種類の血清型の 36 株で、全体の 35.3 % だった。分離数が多かった血清型では *S. Infantis* (SI) 77.8 %、ST 53.8 %、SE 42.3 % の順に耐性率が高く、この 3 つの血清型で耐性株全体の

表 1 年次別血清型別の分離株数及び薬剤耐性状況

血清型	2007 年	2008 年	2009 年	2010 年	合計	耐性率
	耐性/分離	耐性/分離	耐性/分離	耐性/分離	耐性/分離	
<i>S. Enteritidis</i>	2 / 9	3 / 8	6 / 8	0 / 1	11/26	42.3 %
<i>S. Typhimurium</i>	1 / 1	3 / 8	1 / 1	2 / 3	7/13	53.8 %
<i>S. Saintpaul</i>	0 / 5	0 / 2	0 / 3		0/10	0.0 %
<i>S. Infantis</i>	2 / 2	3 / 3	2 / 3	0 / 1	7/9	77.8 %
<i>S. Nagoya</i>	0 / 1	0 / 2		0 / 3	0/6	0.0 %
<i>S. Newport</i>	0 / 1		0 / 1	0 / 1	0/3	0.0 %
<i>S. Narashino</i>	0 / 2	0 / 1			0/3	0.0 %
<i>S. Paratyphi B</i>		0 / 2			0/2	0.0 %
<i>S. Schwarzengrund</i>		2 / 2			2/2	100.0 %
<i>S. Manhattan</i>		2 / 2			2/2	100.0 %
<i>S. Thompson</i>		0 / 1		0 / 1	0/2	0.0 %
<i>S. Agona</i>			1 / 1	0 / 1	1/2	50.0 %
<i>S. Mikawashima</i>				0 / 2	0/2	0.0 %
<i>S. Choleraesuis</i>		1 / 1			1/1	100.0 %
<i>S. Derby</i>			1 / 1		1/1	100.0 %
Others	0 / 3	2 / 8	0 / 3	2 / 4	4/18	22.2 %
合計	5/24	16/40	11/21	4/17	36/102	
(耐性率)	(20.8 %)	(40.0 %)	(52.4 %)	(23.5 %)	(35.3 %)	

69.4%を占めていた。SE,ST,SI の耐性率を既報¹⁶⁾と比較すると SE は 30 ポイント以上、ST は 10 ポイント程度それぞれ減少し、SI はほぼ同程度であった。

4 年次別薬剤耐性

年次別耐性率は 2007 年が 20.8%、2008 年が 40%、2009 年は 52.4%と増加傾向にあったが、2010 年は 23.5%と大幅に減少した。この理由は 2010 年では他の年と比べ主要な薬剤耐性菌である SI,ST,SE の合計分離数が他の年の 1/2~1/4 程度と少なかったためであり、SI,ST,SE の分離数が年次別耐性率に大きく影響していた。

5 薬剤別耐性

薬剤別では 9 薬剤に対し耐性が認められ、全菌株における耐性率は高いものから SM (23.5%)、SA (21.6%)、TC (19.6%) の順となった。各薬剤に対する耐性率および主要血清型の各耐性率に占める割合を図に示した。SI は特に SA,SM,TC に高い割合を示し、ST は多くの薬剤に耐性株が分布しており、SE は NA に高い割合を示した。既報¹⁶⁾と比較すると SM に対する耐性率は 57.4%から 23.5%と 1/2 以下に減少していた。一方、SA,TC,ABPC,NA に対する耐性率は 2 倍以上、特に NA については 3 倍以上に増加していた。

6 薬剤耐性型

耐性型は 1~5 剤耐性であり、その中でも 3 剤耐性が最も多く SA,SM,TC 耐性が全耐性株の 27.8%にみられた (表 2)。この耐性型は SI に多くみられ、これにより上記 3 薬剤の耐性株に占める SI の割合が増加した。また、ST ではフェージ型 D104 などで見られる SA,SM,TC,CP,ABPC 耐性株が 2 株確認された。他にも 3 剤、4 剤耐性もみられたため、様々な種類の薬剤に耐性を示した。さらに SE はほとんどが 2 剤以下の耐性で、NA および SM1 剤耐性株が SE の耐性株の半数以上を占めていた。既報¹⁶⁾では SE の SM1 剤耐性の耐性株に占める割合は 78.9%であったが、今回はわずかに 5.6%と大幅に減少した。

7 プラスミド保有状況

耐性菌 36 株中 21 株 (58.3%) が 50~>200 kbp のプラスミドを保有していた。最も多かったのは 60 kbp のプラスミド単独保有株 5 株で、次いで 94.5 kbp 3 株、58 kbp 3 株の順だった (表 3)。SE は比較的小さいサイズのプラスミドを、SI は大きいプラスミドを保有する傾向があった。耐性型との関連性についてはプラスミドのサイズによる血清型の偏りがあるため、解析は困難であった。

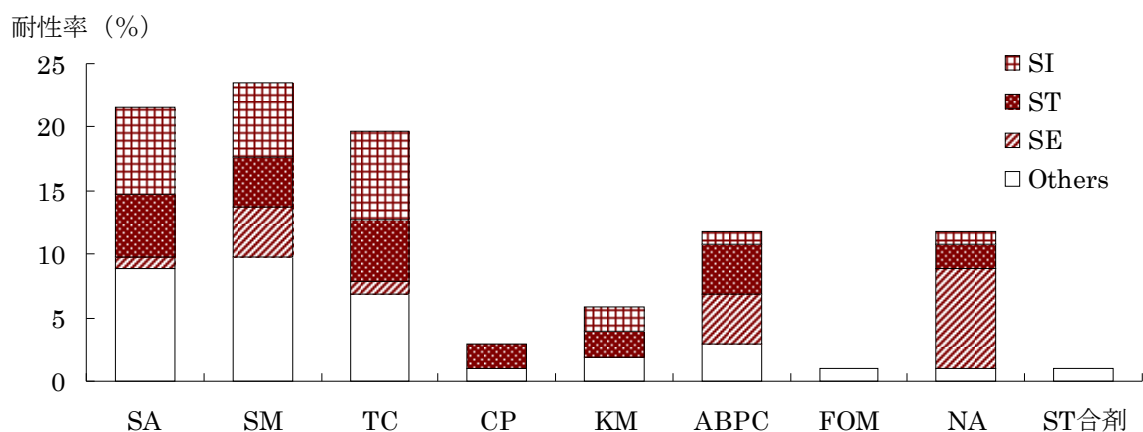


図 各薬剤に対する耐性率および主要血清型の各耐性率に占める割合

表 2 薬剤耐性型

耐性型	株数 (%)	血清型 (株数)
SM	2 (5.6)	Enteritidis (2)
NA	4 (11.1)	Enteritidis (4)
ABPC NA	3 (8.3)	Enteritidis (3)
SA SM TC	10 (27.8)	Infantis (3) Typhimurium (2) Manhattan (2) Schwarzengrund (1) Derby (1) Agona (1)
SA SM TC KM	3 (8.3)	Infantis (2) Schwarzengrund (1)
TC ABPC KM NA	1 (2.8)	Typhimurium (1)
SA,SM,TC,CP,ABPC	2 (5.6)	Typhimurium (2)
Others	11 (30.6)	

表 3 プラスミド保有状況

プラスミド (kbp)	株数	血清型 (株数)
>200	2	Infantis (2)
200	1	Infantis (1)
94.5, 65	1	Infantis (1)
94.5	4	Typhimurium (3) O4:i- (1)
70, 50	1	Enteritidis (1)
65, 50	1	Enteritidis (1)
60, 55	1	Enteritidis (1)
60	5	Enteritidis (3) O4:i- (2)
58, 50	1	Enteritidis (1)
58	3	Enteritidis (3)
55	1	Choleraesuis (1)

考 察

当所では消化器症状を引き起こすサルモネラ属菌について、食中毒・感染症を防止するための基礎資料とするべく 1985 年より性状や薬剤耐性などについて調査を継続している。フルオロキノロン系抗菌薬耐性菌や、NDM-1 陽性菌が病原菌であるサルモネラ属菌で確認されており、薬剤耐性菌が注目されている現状においても、既報では 2006 年までの調査結果のみとなっている。そこで今回は 2007 年から 2010 年まで山梨県で分離された散発下痢症患者由来サルモネラ属菌の薬剤耐性についてその特徴をまとめ、動向を調査した。

今回の結果を既報¹⁶⁾と比較すると、大きな変化

が見受けられた。まず、分離株数の減少が非常に顕著であり、年平均で 1/5 以下に減少した。また、血清型についても分離される順位に大きな変動はないものの、最も多い SE が分離率で 40 ポイント以上減少し、実数では 7 %程度に減少した。一方で *S. Nagoya* は実数で 4 倍に増加するなど、分離される血清型の変化が確認された。*S. Nagoya* は県内の河川より分離されることが多い²²⁾ため環境中から直接的あるいは間接的にヒトに感染している可能性が考えられた。さらに、分離株の耐性率は 35.3 %で、既報の 61.7 %と比較し大きく減少した。薬剤別の耐性率では SA,TC,NA ABPC に対する耐性率が増加し、SM に対する耐性率は 1/2 以下に減少した。これらの変化は近年の SM1 剤

耐性 SE の分離頻度が減少したことにより、分離株数や血清型、薬剤耐性率に影響を及ぼしたと考えられた。SM1 剤耐性の SE が減少した理由としては既報¹⁶⁾で指摘しているとおおり、厚生省生活衛生局長通知「食品衛生法施行規則及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について」(平成 10 年 11 月 25 日付生衛発第 1674 号)による卵およびその関連製品によるサルモネラ食中毒防止対策が徹底されていることによると考えられる。

今回はセフェム系抗菌薬耐性菌が確認されなかったため、NDM-1 陽性のサルモネラ属菌は本県では認められなかった。しかし、海外では環境水系から多菌種の NDM-1 産生菌が分離されており²³⁾、環境中でのプラスミドの伝播が発生していると考えられるため、今後も調査を続けていく必要があると考えられる。また、フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性菌についても今回は確認されなかったが、サルモネラ属菌のフルオロキノロン系抗菌薬耐性機構の一つに QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) の変異があり、QRDR の 1 カ所の変異で NA 耐性となり、フルオロキノロン系抗菌薬の感受性が低下し、2 カ所以上の変異でフルオロキノロン系抗菌薬耐性となるケースが報告されている^{24), 25)}。今回分離された NA 耐性株の耐性機構は不明であるが、NA の感受性を調査することにより、フルオロキノロン系抗菌薬に対する耐性がどの程度進んでいるのか予測できると考えられる。特に、今回の結果では薬剤別耐性率において NA に対する耐性率は 3 倍以上に増加しているため、今後は NA 耐性株の QRDR の変異の有無も含め、引き続き動向を注視していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料 平成 23 年食中毒発生状況 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/11hassei/xls/H23jokyo.xls>
- 2) 金子通治：1989 年を中心とした散発下痢症患者由来サルモネラ血清型 Enteritidis の疫学的解析, 感染症誌, **65**, 1533~1540 (1991)
- 3) 金子通治：1985 年~1994 年の 10 年間に山梨県で分離された散発下痢症患者由来サルモネラの血清型と薬剤感受性, 感染症誌, **69**, 1294~1301 (1995)
- 4) 金子通治, 中村明子：最近 11 年間 (1985~1995 年) に山梨県で分離された散発下痢症患者由来 *Salmonella* serovar Enteritidis の疫学的マーカーの推移と特徴, 感染症誌, **70**, 792~800 (1996)
- 5) 金子通治：山梨県におけるサルモネラ症の原因菌の血清型推移と薬剤感受性 (1985 年 4 月~1996 年 3 月), 山梨衛公研年報, **39**, 39~44 (1995)
- 6) 高橋照美, 金子通治：1996 年の山梨県内のサルモネラによる散発性下痢症について, 山梨衛公研年報, **40**, 17~20 (1996)
- 7) 金子通治ら：山梨県内の散発下痢症由来サルモネラの細菌・疫学的検討 (1997 年), 山梨衛公研年報, **41**, 22~26, (1997)
- 8) 野田裕之ら：山梨県の散発劇症患者由来サルモネラと *S. Enteritidis* 食中毒事例 (1998 年), 山梨衛公研年報, **42**, 25~32 (1998)
- 9) 浅川洋美ら：山梨県の散発下痢症患者由来 *Salmonella* serovar Typhimurium の細菌・疫学的特徴, 山梨衛公研年報, **42**, 33~39 (1998)
- 10) 野田裕之ら：山梨県の散発下痢症患者由来サルモネラの細菌・疫学的検討 (1999 年), 山梨衛公研年報, **43**, 14~20 (1999)
- 11) 浅川洋美ら：O40 群 *S. Johannesburg* による食中毒事例と同時に分離された EHEC O157 について, 山梨衛公研年報, **43**, 21~25 (1999)
- 12) 浅川洋美ら：山梨県における *S. Oranienburg* および *S. Chester* の分離状況と分離株の特徴, 山梨衛公研年報, **43**, 30~33 (1999)
- 13) 野田裕之ら：山梨県における散発下痢症患者由来サルモネラの血清型と薬剤感受性 (1996~2000), 山梨衛公研年報, **44**, 30~34 (2000)
- 14) 野田裕之ら：山梨県の散発下痢症患者由来のサルモネラの細菌・疫学的検討 (2000~2004), 山梨衛公研年報, **45**, 34~39 (2001)
- 15) 大沼正行ら：山梨県における散発下痢症患者由来サルモネラの細菌学的特徴 (2000~2004),

- 山梨衛公研年報, **48**, 35~40 (2004)
- 16) 長田美母衣ら：山梨県における散発下痢症患者由来サルモネラの血清型と薬剤感受性（1997~2006年），山梨衛公研年報, **50**, 28~33 (2006)
 - 17) Dongeun Yong et al.: Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India, Antimicrob. Agents Chemother. , **53**, 5046~5054 (2009)
 - 18) Shingo Chihara et al. : First case of New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing *Escherichia coli* infection in Japan, Clin Infect Dis., **52**, 153~154 (2011)
 - 19) Potron A. et al. : Plasmid-mediated transfer of the *bla*(NDM-1) gene in Gram negative rods, FEMS Microbiol Lett., **324**, 111~116 (2011)
 - 20) Savard P. et al. : First NDM-positive *Salmonella* sp. strain identified in the United States, Antimicrob. Agents Chemother., **55**, 5957~5958 (2011)
 - 21) Kado, C. I. & Liu, S. T. : J. Bacteriol. , **145**, 1365~1373 (1981)
 - 22) 大沼正行ら：山梨県河川水から分離したサルモネラの細菌学的検討（1998~2001），山梨衛公研年報, **44**, 25~29 (2000)
 - 23) Walsh T. R. et al. : Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study, Lancet Infect Dis., **11**, 355~362 (2011)
 - 24) Aarestrup F. M. et al. : Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.?, Antimicrob. Agents Chemother., **47**, 827~829, (2003)
 - 25) Cloeckaert A. et al. : Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*, Vet Res, **32**, 291~300 (2001)