

2011 年から 2020 年に山梨県で分離された ヒト由来サルモネラ属菌の薬剤耐性

柳本恵太 山上隆也 植松香星

Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolates from Humans in Yamanashi, 2011-2020

Keita YANAGIMOTO, Takaya YAMAGAMI and Kousei UEMATSU

キーワード：サルモネラ、薬剤耐性

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あり、下痢、腹痛、発熱などの症状を引き起こすことが知られている。動物の腸管に生息していることが多いため、食肉からの検出率が比較的高い。特に鶏肉から最も高率に検出されており、21~54%の市販鶏肉がサルモネラ属菌に汚染されていると報告されている¹⁻³⁾。また、当所で実施した調査では鶏内臓肉（レバー、ハツ）の58%からサルモネラ属菌が検出された⁴⁾。さらに、2020年の細菌性食中毒では件数が2番目に多い状況にある⁵⁾。サルモネラ属菌は身近な食品中に高率に存在しており、食中毒も多く発生していることから、依然として重要な食中毒原因菌の一つであると認識することができる。

当所では1985年よりヒト由来サルモネラ属菌の調査を継続して実施している⁶⁾。2007年以降の調査では、1990年代から2000年代前半にかけて優占種であった *Salmonella enterica* serovar Enteritidis が大幅な減少傾向にあること、菌株の薬剤耐性率が低下し、耐性を獲得している薬剤の種類に変化があること、分離菌株数が大幅に減少していることを報告した⁷⁾。これらのことから、ヒト由来のサルモネラ属菌の量的、質的変化を引き続き調査することは重要であると考えられる。そこで、本研究では2011年から2020年に山梨県内で分離されたヒト由来サルモネラ属菌の解析を行ったので報告する。

調査方法

1 供試菌株

県内の医療機関・検査機関から菌株の提供があったヒト由来のサルモネラ属菌209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生化学的性状による鑑別、または Rahn ら⁸⁾のPCRでの特異的遺伝子 (*invA*) の検出により行った。血清型はサルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)により決定した。

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(センシディスク:BD)によって測定した。使用薬剤はアンピシリン(ABPC)、セフトキシム(CTX)、セフォキシチン(CFX)、ホスホマイシン(FOM)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、クロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合剤(ST)、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(CPFX)の13薬剤とした。

結果

1 分離株の血清型

サルモネラ属菌209株は45血清型に分類された(表1)。最も多く分離されたのは型別不能株(04:i:-)で29株(14%)を占め、*S. Enteritidis*が20株(10%)、*S. Typhimurium*が17株(8%)と続いた。また、*S. Infantis*、*S. Agona*、*S. Nagoya*、*S. Thompson*、*S. Saintpaul*で10株以上の分離があり、上位10血清型で全体の約70%を占めるなど、分離される血清型に偏りがあった。一方で、*S. Bovismorbificans*、*S. Give*、*S. Mbandaka*、*S. Oslo*など過去にほとんど確認されていない血清型が確認され、*S. Colindale*、*S. Corvallis*、*S. Hindmarsh*は調査開始以降初めての分離となるなど、県内ではまれな血清型が複数確認された。本研究の主要血清型の分離株数について既報^{6,7)}の1991年から2000年、2001年から2010年の10年間ごとのデータと比較すると、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*については急減、*S. Thompson*、*S. Infantis*、*S. Saintpaul*については減少傾向、*S. Newport*はほとんど増減がなく、*S. Agona*、04:i:-、*S. Nagoya*については増加傾向にあった(表2)。

表 1 2011 年から 2020 年にヒトから分離されたサルモネラ属菌の血清型別菌株数

血清型	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	計
04:i:-	0	1	3	17	2	0	2	3	1	0	29
Enteritidis	3	4	6	2	1	0	2	2	0	0	20
Typhimurium	0	4	6	0	1	1	2	1	0	2	17
Infantis	0	0	1	3	5	1	1	0	2	2	15
Agona	1	0	3	2	0	1	2	0	3	2	14
Nagoya	3	0	3	0	1	0	2	1	0	2	12
Thompson	3	1	0	0	3	3	1	0	0	0	11
Saintpaul	0	1	1	1	2	2	2	1	0	0	10
Newport	1	2	0	1	2	1	0	2	0	0	9
Bareilly	1	0	0	1	1	0	1	2	1	0	7
Stanley	0	0	0	0	0	0	4	1	1	0	6
Bovismorbificans	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5
Brandenburg	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	5
Schwarzengrund	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	5
Litchfield	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	3
Senftenburg	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	3
Blockley	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Javiana	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Mikawashima	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
Montevideo	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	2
04:b:-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
08:-:1,5	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
08:e,h:-	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
ParatyphiB	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
Singapore	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Braenderup	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Bredeney	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Colindale	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Corvallis	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Derby	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Give	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Havana	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Hindmarsh	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Kottbus	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Manhattan	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Mbandaka	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Narashino	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
013:e,h:1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
04:e,h:-	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
07:k:1,-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Oslo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
OUT:r:1,5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Virchow	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Gallinarum	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Weltevreden	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
計	16	20	25	31	24	19	23	20	15	16	209

表 2 主要血清型別の各年代の分離株数

	1991-2000 ⁶⁾	2001-2010 ^{6,7)}	2011-2020
Enteritidis	1438	187	20
Typhimurium	144	52	17
Thompson	33	8	11
Infantis	31	22	15
Saintpaul	21	36	10
Newport	11	12	9
Agona	8	10	14
O4:i:-	1	8	29
Nagoya	1	9	12

2 年次別分離株数

年間の分離株数は15~31株で平均分離株数は21株だった。2014年はO4:i:-の分離が17株あったことから菌株数が増加した。2019年の15株は調査開始以降最少の分離株数となった。

3 分離株の薬剤耐性

209株の分離株のうち1種類以上の薬剤に耐性を示した菌株は21血清型の88株(42%)であった。5株以上分離のあった血清型ではO4:i:-の29株全てが耐性株であり、*S. Infantis*、*S. Agona*、*S. Saintpaul*、*S. Schwarzengrund*は分離株の60%以上が耐性株であった。一方で、*S. Enteritidis*は分離株の15%が耐性株で、*S. Thompson*、*S. Stanley*、*S. Bovismorbificans*、*S. Braenderburg*では耐性株は認められなかった(図1)。

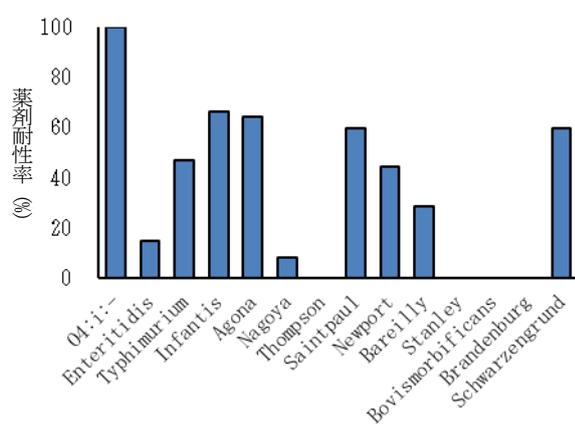


図1 血清型別薬剤耐性状況

4 年次別薬剤耐性

薬剤耐性状況を年次別に確認すると2014年が最も耐性率が高く、70%を超えていた。次に耐性率が高い2013年を除くと、概ね20~40%程度の薬剤耐性率で推移しており、大きな変化はなかった(図2)。

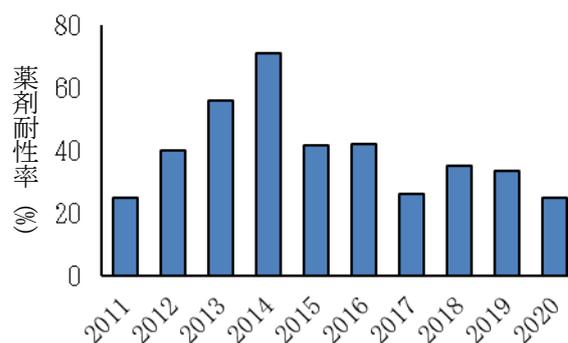


図2 年次別薬剤耐性状況

5 薬剤別耐性

薬剤別の耐性状況では10剤に対し耐性が認められ、TC 65株(31%)、SM 57株(27%)、ABPC 41株(20%)の順に耐性株が多かった。一方で、第二世代セフェム系抗菌薬であるCFXやニューキノロン系抗菌薬であるNFLX、CPFIXに対しては全ての株が感受性であった(図3)。ABPC耐性株の約80%はO4:i:-および*S. Typhimurium*であり、ST耐性株は*S. Infantis*、*S. Saintpaul*、*S. Schwarzengrund*のみであった。一方でTC耐性は13血清型、SM耐性は16血清型で確認され、広範な血清型に耐性が広がっていた。

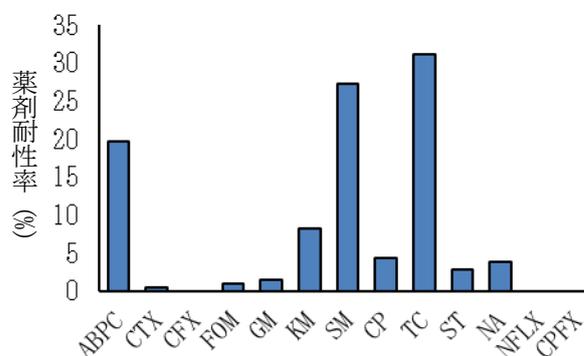


図3 薬剤別耐性状況

6 薬剤耐性プロファイル

5株以上分離のあった血清型別耐性株の薬剤耐性プロファイルを表3に示す。*S. Infantis*は10耐性株で7種類のプロファイルを示すなど多様性がある一方で、O4:i:-は29株の耐性株で6種類であり、ABPC、SM、TCの3剤耐性株が多かった。*S. Agona*、*S. Infantis*、*S. Newport*ではTC耐性株が、*S. Schwarzengrund*ではKM耐性株が多かった。*S. Infantis*で8剤、*S. Agona*、O4:i:-、*S. Saintpaul*、*S. Schwarzengrund*で5剤耐性が認められた。一方で、*S. Enteritidis*では全て1剤耐性で、2剤以上の耐性株は確認されなかった。

表 3 主要血清型の薬剤耐性プロファイル

血清型	ABPC	CTX	FOM	GM	KM	SM	CP	TC	ST	NA	菌株数
Agona	■		■			■	■	■			1
Agona						■		■			4
Agona								■			4
Bareilly						■		■			1
Bareilly	■										1
Enteritidis						■					1
Enteritidis								■			1
Enteritidis										■	1
Infantis	■	■	■		■	■	■	■		■	1
Infantis					■	■		■	■		1
Infantis					■	■		■			2
Infantis					■			■			1
Infantis						■		■	■		1
Infantis						■		■		■	1
Infantis						■		■			3
Newport						■		■			1
Newport								■			3
04:i:-	■			■		■	■	■			1
04:i:-	■					■		■			22
04:i:-	■					■		■			1
04:i:-	■					■		■			1
04:i:-						■					2
04:i:-								■	■		2
Saintpaul	■				■		■	■	■		1
Saintpaul	■							■	■		1
Saintpaul							■	■			1
Saintpaul								■	■		3
Schwarzengrund					■	■	■	■	■	■	1
Schwarzengrund					■	■		■	■		1
Schwarzengrund					■	■		■	■		1
Typhimurium	■				■			■			5
Typhimurium	■					■	■	■			1
Typhimurium	■							■		■	1
Typhimurium				■		■	■	■			1

灰色の四角は各薬剤に対する耐性

考 察

本研究では、2011年から2020年までの10年間に山梨県内で分離されたヒト由来サルモネラ属菌について解析を行った。2000年前半から分離株数が減少し、分離される血清型に大きな変化が確認されていたが、本研究においても分離株数、血清型、薬剤耐性状況など2000年前後とは異なる状況が持続していた。

分離菌株の血清型では04:i:-、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*の順に菌株数が多かった。1989年からの*S. Enteritidis*の急激な増加以降、2006年を除き2009年まで全ての年で、*S. Enteritidis*が最も多く分離された血清型であったが^{6,7)}、本研究では2014年以降に*S. Enteritidis*が最多となる年はなかった。また、1996年には最多となる266株が分離されていた⁶⁾が、2016年は1985年の調査開始以降初めて、1年を通して*S. Enteritidis*が分離されない年となり、これは2019年、2020年と続いた(表1)。1991年からの10年ごとの*S. Enteritidis*の分離株数とサルモネラ属菌全体に占める割合は、それぞれ1991年から2000年が1438株、73%、2001年から2010年が187株、41%である^{6,7)}が、本研究(2011年から2020年)では20株、10%であり、大きな減少が確認された。*S. Typhimurium*についても同様に分

離株数の減少がみられた一方で、*S. Typhimurium*のmonophasic variant⁹⁾とされる04:i:-、県内および近隣のブローラーの地域特有的な優占種である¹⁰⁾ *S. Agona*、および2010年から増加しつつある⁷⁾ *S. Nagoya*は2010年以前の分離株数は少なかったが、サルモネラ属菌全体の分離株数が減少する中で増加傾向にあり、本研究では主要な血清型となった(表2)。*S. Agona*については、県内下水処理場流入水(2016年から2020年採水)から、ヒト由来株と同一の遺伝子型が複数分離され、ヒト由来株との関連性を指摘した下水流入水由来株の中でも上位の分離株数であったこと¹¹⁾もこの結果を支持していると考えられる。

最多の分離株数となった04:i:-は2014年に17株分離されている。分離された季節は全て夏季以降であり、8月に11株、9月、10月に2株ずつと特定の時期に集中しており、分離株の薬剤耐性状況(ABPC、SM、TC耐性)も同一であった。このことから、集団食中毒の可能性が考えられたが、由来となったヒトからの調査ができず、感染源や全体像の把握ができなかった。

1991年からの30年間に分離された血清型に大きな変化が確認された詳細な理由は不明であるが、金子ら⁶⁾は*S. Enteritidis*の減少について、鶏卵の食中毒防止対策が講じられたことを指摘している。それ以外には、国内の*S. Enteritidis*の分離が1989年から急増し、それ以降の国内の鶏や牛などの家禽や家畜由来*S. Enteritidis*は、それ以前とは異なる遺伝子型に置換されたことが確認されており¹²⁾、この現象は海外からの家禽や種鶏の輸入が原因となった可能性が指摘されている¹³⁾。また、村上ら¹⁰⁾により県内のブローラー由来株が*S. Infantis*から*S. Agona*に置換されたことが確認され、Toriiら¹⁴⁾はその遺伝子型の*S. Agona*は、他地域ではほとんど確認されないことを報告し、Yokoyamaら¹⁵⁾はその遺伝子型の*S. Agona*が県内のヒトへ感染していることを確認している。さらに、四宮ら¹⁶⁾は同一血清型であるヒト由来株と鶏肉由来株の薬剤耐性状況は強い類似性があることを報告している。これらのことから、ヒト由来サルモネラ属菌の変化には、家禽および家畜における特定の血清型の置換が関連している場合がある。増加している*S. Agona*以外の血清型についても、家禽または家畜等の由来株において特定の血清型の置換が発生し、その株の分布状況の拡大により、食肉等を通じてヒトへの感染が広がっている可能性が、減少している血清型は別の血清型の置換により分布状況が縮小している可能性が考えられた。

サルモネラ属菌のヒトからの分離状況については、調査方法の違いが結果に影響を与えている可能性もあるが、地域により大きく異なることが確認されている。例えば、北海道の2014~2015年におけるヒト由来サルモネラ属菌で最も多い分離数となった血清型は04:i:-で、*S. Infantis*、*S. Manhattan*と*S. Typhimurium*の順に多かった¹⁷⁾。一方で、宮崎県の2013~2014年では*S. Thompson*

が最も多く、*S. Corvallis* と *S. Schwarzengrund* が次に多かった¹⁸⁾。また、Furukawa³⁾らによると北海道・東北地域と近畿・四国・九州で生産された鶏肉では、分離される血清型が異なることが確認されている。鶏肉はサルモネラ属菌の重要な感染源と考えられている³⁾ことから、他の一地域のヒトからのサルモネラ属菌の分離状況との比較については、地域的な背景も含めて慎重に行う必要がある。2015～2018 年の全国での分離状況では *S. Infantis*、*S. Enteritidis*、*S. Thompson* の順に多く、04:i:-、*S. Saintpaul* と続いた¹⁵⁾。県内の同期間では *S. Infantis*、04:i:-、*S. Saintpaul*、*S. Thompson* が多く、全国的に多い血清型は県内でも多いことが確認された。

本研究では過去にまれに分離された血清型や分離例のない血清型が複数確認された。特に *S. Bovismorbificans* は 2019 年および 2020 年で 5 株分離されており、下水流入水からも同時期に同一の特徴を持つ株が分離されている¹⁰⁾。このようなまれな血清型の分離は、県内にこれまでにない感染源があることを示している可能性があり、特に食習慣の変化に注意が必要である。あるいは、先に述べたとおり既存の食品中から分離される血清型の置換が起こった可能性もある。いずれにしても主要な血清型だけでなく、現状まれと認識されている血清型の動向についても、今後も引き続き把握していく必要があると思われる。

分離株の薬剤耐性状況では 1 種類以上の薬剤に耐性を示した菌株は全体の 42%と既報の 65%⁶⁾ (1985～2006 年) よりも低く、35%⁷⁾ (2007～2010 年) と同程度であった。年別では 2014 年の薬剤耐性率が高いが、04:i:-の分離数が多かったことが影響していた。それ以外には薬剤耐性率に増加または減少傾向は認められなかった。薬剤別では TC に対する耐性率 (31%) が最も高く、SM (27%)、ABPC (20%) の順であり、全国の状況¹⁸⁾と合致していた。TC の耐性率は既報の 18%⁶⁾、20%⁷⁾ よりも高く、SM の耐性率は 60%⁶⁾ よりも低く、24%⁷⁾ と同程度だった。ABPC の耐性率は 8%⁶⁾、12%⁷⁾ と比較すると 2 倍程度高かった。5 株以上分離があった血清型別の薬剤耐性状況を比較すると、既報と大きく変化したのが、*S. Enteritidis* の耐性率であり、本研究の 15%は 81%⁶⁾、42%⁷⁾ から大きく減少した。一方で、*S. Saintpaul* は 60%であったが、10%⁶⁾、0%⁷⁾ から耐性率が大幅に増加し、*S. Agona* もブロイラー由来株の置換のヒトへの感染¹⁴⁾の影響と考えられるが、耐性率が 64%と 18%⁶⁾ から増加した。*Nagoya* は 1985 年以来耐性株は出現していなかった^{6,7)}が、2015 年分離株に SM 耐性株が認められた。04:i:-については既報の分離株が少ないため比較することは困難であるが、全ての薬剤に感受性を示す株も複数確認できるため、耐性株が増加している可能性は否定できない。

薬剤耐性状況の変遷については、分離される血清型別株数の変化によるところが大きく、特に SM 耐性株が多か

った *S. Enteritidis* の大幅な減少により SM に対する耐性率が減少し、ABPC、SM、TC 耐性の 04:i:-の増加により、ABPC に対する耐性率は増加した。もう一つの要因としては分離株の質的变化であり、TC に対する耐性率の増加については 04:i:-の分離株数の増加もあるが、*S. Saintpaul* や *S. Agona* の耐性率の増加も関連している。*S. Agona* のブロイラー由来株の置換⁹⁾のように、分離株の量的・質的变化が発生した場合、薬剤耐性状況は今後大きく変化していくことが予想される。本研究では *S. Agona* 以外にも 04:i:-、*S. Saintpaul*、*S. Nagoya* の量的または質的变化の可能性を確認することができたため、この変化が地域特異的であるのか、持続するのか、菌株の置換が発生しているのかについても今後確認していく必要があると考えられた。

まとめ

1. ヒト由来サルモネラ属菌について 10 年間の状況を調査した結果、過去のデータと比較し 04:i:-、*S. Agona*、*S. Nagoya* の分離株数が増加し、*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium* は減少していた。
2. 過去に分離数の少ないまれな血清型が複数確認された。特に *S. Bovismorbificans* は 2 年連続で複数株分離された。
3. 分離株の薬剤耐性状況は ABPC に対する耐性率が増加しており、04:i:-の分離株数の増加が原因と考えられた。

謝辞

貴重な菌株を提供いただいた医療機関・検査機関の関係者の皆様に深く感謝します。

本研究の一部は厚生労働科学研究費 (食品の安全確保推進研究事業) 「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」および「食品由来薬剤耐性菌のサーベイランスのための研究」の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) Y. Hara-Kudo et al.: Prevalence of the main food-borne pathogens in retail food under the national food surveillance system in Japan. Food Addit. Contam. Part A, **30**, 1450-1458 (2012)
- 2) M. Hiroi et al.: Antibiotic resistance in bacterial pathogens from retail raw meats and

- food-producing animals in Japan. J. Food Prot., **75**, 1774-1782 (2012)
- 3) I. Furukawa et al.: Prevalence and Characteristics of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail poultry meat in Japan. Jpn. J. Infect. Dis., **70**, 239-247 (2017)
- 4) 植松香星、柳本恵太：牛、鶏及び馬の内臓の生食による健康被害のリスク分析, 山梨衛環研年報, **61**, 41-43 (2017)
- 5) 厚生労働省：食中毒統計資料 令和2年食中毒発生状況 [http://www.mhlw.go.jp/content/R2jokyo.xls] (最終検索日：2021年10月4日)
- 6) 金子通治、野田裕之、大沼正行：1985～2006年の22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推移と疫学的特徴, 感染症学雑誌, **81**, 394-402 (2007)
- 7) 柳本恵太、大沼正行、植松香星：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, 山梨衛環研年報, **55**, 65-70 (2011)
- 8) K. Rahn et al.: Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes, **6**, 271-279 (1992)
- 9) H. Sun et al.: The epidemiology of monophasic *Salmonella* Typhimurium. Foodborne Pathog. Dis., **17**, 87-97 (2020)
- 10) 村上覚史ら：ブロイラーに定着した *Salmonella enterica* serovar Agona と鶏ひき肉におけるサルモネラ汚染状況, 鶏病研究会報, **52**, 180-184 (2016)
- 11) K. Yanagimoto et al.: Characterization of *Salmonella* isolates from wastewater treatment plant influents to estimate unreported cases and infection sources of salmonellosis. Pathogens, **52** (2020)
- 12) A. Kobayashi et al.: Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from food-producing animals in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis: evidence of clonal dissemination and replacement. Acta Vet. Scand., **56** (2014)
- 13) S. Li et al.: Global spread of *Salmonella* Enteritidis via centralized sourcing and international trade of poultry breeding stocks. Nat. Commun. **12** (2021)
- 14) Y. Torii et al.: Genetic characteristics of emerging *Salmonella enterica* serovar Agona strains isolated from humans in the prior period to occurrence of the serovar shift in broilers. J. Vet. Med. Sci., **81**, 1117-1120 (2019)
- 15) E. Yokoyama et al.: Isolation of *Salmonella enterica* serovar Agona strains and their similarities to strains derived from a clone caused a serovar shift in broilers. J. Infect. Chemother., **25**, 71-74 (2019)
- 16) 四宮博人ら：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 地研ネットワークを利用した食品およびヒトから分離されるサルモネラ、大腸菌、カンピロバクター等の薬剤耐性の動向調査, 厚生労働科学研究平成31～令和元年度分担研究報告書, 9-37 (2020)
- 17) 渡邊涼太ら：北海道におけるヒト由来サルモネラ血清型の推移, 北海道立衛生研究所所報, **66**, 65-67 (2016)
- 18) 黒木真理子ら：宮崎県において2008-2014年に分離されたサルモネラの血清型について, 宮崎県衛生環境研究所年報, **26**, 67-71 (2014)