

札幌市内で分離されたヒト由来サルモネラの 伝達性 R プラスミドについて

Survey for Transmissible R Plasmids in Salmonella Isolated from Human Sources in Sapporo City

鈴木 欣哉 大森 茂 清水 良夫 富所 謙吉
高杉 信男

Kin-ya Suzuki, Shigeru Ohmori, Yoshio Shimizu,
Kenkichi Tomidokoro, Nobuo Takasugi

1983年から1986年までの4年間に札幌市内で分離されたヒト由来サルモネラ311株のうち、薬剤耐性株120株について伝達性Rプラスミドの保有状況を調査した。接合伝達試験はE. coli K-12 CSH-2を受容菌とする混合培養法で行った。Rプラスミドの保有率は45%であったが、国内由来株の52%に比べ、海外旅行者由来株は6%と低率だった。最優勢血清型であるS. typhimuriumのRプラスミド耐性パターンは、6剤耐性型と単剤耐性型とに2極分化していた。セフェム系薬剤のCEX耐性を伝達する株が1株認められた。

1 緒 言

近年の薬剤耐性菌の増加の原因は、抗菌剤の大量の使用による選択的増加と、その耐性因子の多くが、伝達性Rプラスミド上にあるためだと言われている^{1), 2)}。Rプラスミドは接合によって菌から菌へ、種、属を越えて移行し、耐性菌を蔓延させるため、疫学上重要な問題となっている。

一方、サルモネラは、細菌性食中毒や散発性下痢症など急性胃腸炎の重要な病原菌の一つである。当所では、札幌市におけるサルモネラ・サーベイランスとして、ヒト及び環境中から検出されたサルモネラの血清型別を行ってきた³⁾。

本稿では、1983年から1986年の4年間にヒトから分離されたサルモネラのうち、各種抗菌剤に耐性を示した株について、伝達性Rプラスミドの保有状況を調査した結果を報告する。

2 方 法

2-1 実験材料

1983年から1986年の4年間に当所において食中毒検査、防疫、健康診断のための検便から検出した、ヒト由来のサルモネラ137株及び、市内医療機関で分離された174株の合計311株を用いた。

2-2 薬剤感受性試験

サルモネラの薬剤感受性試験は、昭和ディスクによる一濃度ディスク法と、最小発育阻止濃度を測定する寒天希釈法⁴⁾を併用して行った。

使用した薬剤は、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)、カナマイシン(KM)、アミノベンジルペニシリン(ABPC)、スルフイソキサゾール(SA)、ナリジクス酸(NA)、セファレキシン(CEX)で、これらの8薬剤のうち1剤以上に耐性を示した

120株のサルモネラを薬剤耐性サルモネラとし、接合伝達試験の供与菌として伝達性Rプラスミドの検討を行った。

なお薬剤の選択濃度は、SM、CP、TC、KM、ABPC、NA、CEXは25 μ g/ml、SAは100 μ g/mlとした。

2-3 接合伝達試験

接合伝達試験の受容菌としてはNA耐性あるいはリファンピシン(RFP)耐性を付与した*Escherichia coli* K-12 CSH-2を用いた。また、二次伝達試験の受容菌としては*E. coli* K-12 W-677を用いた。

耐性伝達は金子⁵⁾の方法に準じて以下のように行った。受容菌及び供与菌の薬剤耐性サルモネラをそれぞれペナッセイブロスにて37 $^{\circ}$ C 1夜培養し、それぞれの培養液1mlを新鮮なペナッセイブロス9mlに別々に接種して、37 $^{\circ}$ C 1時間振とう培養した。次に受容菌4.5mlと供与菌0.5mlを新鮮なペナッセイブロス5mlに加えて混合培養し、37 $^{\circ}$ C 1時間及び24時間培養後に、選択培地にその混合培養液を希釈または原液のまま塗抹した。

選択培地として、受容菌の耐性薬剤であるNAあるいはRFPと供与菌の耐性薬剤を1剤加えたBTB培地を用いた。薬剤濃度はNA、RFP、SM、CP、TC、KM、ABPC、CEXは25 μ g/ml、SAは100 μ g/mlとした。選択培地を1夜培養後、出現したコロニーを純培養し、薬剤感受性試験を行って耐性パターンを調べた。

次に、得られた薬剤耐性の*E. coli* K-12 CSH-2を供与菌として二次伝達試験を同様の方法で行った。選択培地としては、受容菌の発育に必要なアミノ酸と供与菌の耐性薬剤を1剤加えた最小栄養培地を使用した。

これにより二次伝達が確認された株のみを伝達性Rプラスミド保有のサルモネラとした。なお、*E. coli* K-12 CSH-2及び*E. coli* K-12 W-677は国立公衆衛生院より分与された。

3 結 果

3-1 伝達性Rプラスミドの年次別分離頻度

実験材料として用いたサルモネラ311株の薬剤耐性株数とRプラスミド保有株数を年次別に表1に示した。4年間の薬剤耐性株120株のうち54株にRプラスミド保有が認められた。1983年、1984年のRプラスミド保有率が、それぞれ16%、29%と低いのに対し、1985年、1986年ではそれぞれ62%、58%と半数以上がRプラスミド保有株であり増加傾向を示していた。

表1 Rプラスミドの年次別分離状況

年次	分離株数	耐性株数(%)	Rプラスミド保有株数(%)
1983	94	25(27)	4(16)
1984	82	24(29)	7(29)
1985	76	45(59)	28(62)
1986	59	26(44)	15(58)
合計	311	120(39)	54(45)

3-2 伝達性Rプラスミドの由来別保有率

分離株の由来別Rプラスミド保有数を表2に示した。散発性下痢症由来が大多数を占める医療機関の株は保有率57%と最も高かった。

国内由来株全体の保有率が52%であるのに対し、海外旅行者の検便による海外由来株は6%と低かった。

表2 Rプラスミドの由来別保有数

由来	分離株数	耐性株数(%)	Rプラスミド保有株数(%)
海外旅行者	55	18(33)	1(6)
食中毒	68	22(32)	10(45)
一般依頼等	14	8(57)	2(25)
医療機関	174	72(41)	41(57)

3-3 血清型別のRプラスミド保有株数

分離されたサルモネラ 311 株の血清型は39種類あり、そのうち薬剤耐性株が20種類、Rプラスミド保有株は8種類あった。8種類の血清型別に、Rプラスミド保有株数を表3に示した。Rプラスミド保有株数が最も多い血清型は *S. typhimurium* (37株)、次に *S. litchfield* (10株) で、これらで全体の87%を占めた。*S. typhimurium* は分離株の45%、耐性株の53%、Rプラスミド保有株の69%を占め、いずれも最優勢血清型となった。

海外旅行者由来の血清型のうち、*S. krefeld* の1株だけがRプラスミドを保有していた。

S. panama は分離株10株全てが海外由来株で耐性率100%であったが、Rプラスミド保有株は認められなかった。

表3 血清型別のRプラスミド保有株数

血清型	分離株数	耐性株数 (%)	Rプラスミド保有株数 (%)
<i>S. typhimurium</i>	140	63(45)	37(59)
<i>S. litchfield</i>	39	19(49)	10(53)
<i>S. agona</i>	9	3(33)	2(67)
<i>S. paratyphi B</i>	13	1(8)	1(100)
<i>S. infantis</i>	8	3(38)	1(33)
<i>S. krefeld</i>	4	2(50)	1(50)
<i>S. heidelberg</i>	3	1(33)	1(100)
<i>S. II sofia</i>	1	1(100)	1(100)
その他(31種)	94	27(29)	0(0)

3-4 薬剤別のRプラスミド保有株数

使用した8種類の薬剤別に、Rプラスミド保有株数を求めた(表4)。*SM*, *CP*, *TC*, *KM*, *ABPC*, *CEX*, *SA* の7剤については伝達性を認めたが、*NA* 耐性の伝達株は検出されなかった。*TC* 耐性型が耐性株及びRプラスミド保有株ともに、それぞれ113株、53株と、最も多かった。耐性株数に対するRプラスミド保有率は、*KM* 耐性型が69%と最も高かった。

表4 薬剤別のRプラスミド保有株数

薬剤	耐性株数 (%)	Rプラスミド保有株数 (%)
<i>SM</i>	78(25)	19(24)
<i>CP</i>	55(18)	27(49)
<i>TC</i>	113(36)	53(48)
<i>KM</i>	29(9)	20(69)
<i>ABPC</i>	50(16)	24(48)
<i>NA</i>	27(9)	0(0)
<i>CEX</i>	2(1)	1(50)
<i>SA</i>	74(24)	31(42)

総菌株数：311

3-5 血清型別のRプラスミド耐性パターン

Rプラスミド保有を認めた8種類の血清型別に、その耐性パターンを表5に示した。

54株中39株(72%)では、サルモネラの耐性パターンがそのまま伝達されていたが、14株(26%)では耐性の一部が欠落していた。欠落した薬剤は *SM* (14株), *KM* (1株), *NA* (1株), *SA* (1株) であった。また、*S. typhimurium* の1株は「*TC*, *ABPC*」の耐性パターンが、伝達後は「*TC*」あるいは「*ABPC*」のいずれか一方のパターンになった。

Rプラスミドの耐性パターンは13種類あり、最も多かったのは「*TC*」単剤耐性パターンで17株、次に「*SM*, *CP*, *TC*, *KM*, *ABPC*, *SA*」の6剤耐性パターンが16株あった。これらのほとんどが *S. typhimurium* によるもので、「*TC*」耐性と6剤耐性とに2極分化している傾向があった。*S. litchfield* のRプラスミド耐性パターンは、「*SM*, *CP*, *TC*, *SA*」か「*CP*, *TC*, *SA*」と他の血清型には見られない特徴的なものであった。

表5 血清型別のRプラスミド耐性パターン

血清型	Rプラスミド耐性パターン総数	S	S	S	S	S	C	T	T	T	T	T	T
		C	C	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T
		K	T	K	T	T	T	T	K	T	T	T	T
		P	P	P	P	A	A	P		P	A	P	P
		A	A		A	A	A	A				X	
<i>S. typhimurium</i>	38	16	1						2	1	1		16
<i>S. litchfield</i>	10					1	9						
<i>S. agona</i>	2			1							1		
<i>S. paratyphi B</i>	1								1				
<i>S. infantis</i>	1											1	
<i>S. krefeld</i>	1												1
<i>S. heidelberg</i>	1				1								
<i>S. II sofia</i>	1							1					
合計	55	16	1	1	1	1	9	1	2	2	2	1	17

S : SM, C : CP, T : TC, K : KM, P : ABPC, A : SA, X : CEX

4 考 察

札幌市内で分離されたヒト由来サルモネラのRプラスミド保有率は、45% (1983~1986年) で、市瀬ら¹⁾による東京都の報告 (38%, 1976~1981年) とほぼ同様の結果であった。

Rプラスミドの年次別保有率は、1983年 (16%)、1984年 (29%) が、1985年 (62%)、1986年 (58%) の半分以下と低かった。1983年の保有率が極めて低い原因は、その年の *S. typhimurium* の耐性パターンが他の3年と異なっていたためだと考えられる。即ち、*S. typhimurium* はRプラスミド保有株の69%を占める最優勢血清型であったが、そのRプラスミド年次別保有率は、11% (1983)、57% (1984)、76% (1985)、94% (1986) と1983年が著しく低率であった。*S. typhimurium* のRプラスミド保有率は、耐性パターンが「SM, CP, TC, KM, ABPC, SA」または「TC」のときに、それぞれ94%、83%と高率なのに対し、その他のパターンのときは21%と低い。1983年に分離された耐性 *S. typhimurium* の95%はその他のパターンにあ

り、他の3年ではいずれも50%以下であるのに比べて特異的であった。また、1984年のRプラスミド保有率が低いのは、耐性サルモネラの50%が海外旅行者由来株であったためだと考えられる。これらの海外由来株は全てRプラスミドを保有せず、1984年の保有率を低下させる原因になっていた。他の3年の耐性株に占める海外由来株の割合はいずれも10%以下で、Rプラスミド保有率に及ぼす影響は小さかった。

耐性株を10株以上保有する血清型は *S. typhimurium* (63株)、*S. litchfield* (19株)、*S. panama* (10株) の3種類があった。これらのRプラスミド保有率は *S. typhimurium* と *S. litchfield* がそれぞれ59%、53%と高率である一方、*S. panama* は0%であった。堀内ら²⁾によると、これら3種類の血清型のRプラスミド保有率は、*S. typhimurium* (69.7%)、*S. litchfield* (40.3%)、*S. panama* (66.2%) でいずれも高率な血清型として報告されている。当所で分離した *S. panama* は全て海外由来株であり、これらの事実からRプラスミ

ドによる薬剤耐性は、海外由来株で低く、国内由来株でより進行していることが推察される。

Rプラスミドの薬剤耐性パターンのうち、2剤以上耐性の多剤耐性型は67%を占めたが、*S. typhimurium*では55%にとどまり、他の血清型のほとんどが多剤耐性型であったのと対照的であった。これは、*S. typhimurium*の「TC」単剤耐性型が42%を占め、「SM, CP, TC, KM, ABPC, SA」6剤耐性型と同様多かったためである。また、これら2種類のパターンをもつ耐性株のRプラスミド保有率は、いずれも8割以上と極めて高いため、薬剤耐性菌対策の点からも、今後もその動向を注目していく必要があると思われる。

今回使用したセフェム系薬剤のCEX耐性菌は、*S. infantis*で2株検出されただけであったが（耐性率1%）、そのうちの1株は伝達性を示した。近年、セフェム系薬剤の生産量が急増していることから⁶⁾、今後はCEX耐性を示すRプラスミドの検出数が増加することも十分考えられる。

以上のことから、広く衛生行政の面、特にサルモネラによる下痢症や食中毒の予防のための基礎資料を得るため、今後もヒト由来、自然環境由来サルモネラのRプラスミド保有状況を調査していきたいと考えている。

5 結 語

1983年から1986年の4年間に札幌市内で分離されたヒト由来サルモネラの伝達性Rプラスミドにつ

いて調査し、以下の結果を得た。

- 1) Rプラスミド保有率は4年間で45%だった。
- 2) 海外旅行者由来株の保有率は6%で、国内由来株の52%と比べて極めて低かった。
- 3) *S. typhimurium*のRプラスミド耐性パターンは6剤耐性と単剤耐性とに2極分化している傾向を認めた。
- 4) *S. infantis*にCEX耐性のRプラスミドを認めた。

6 文 献

- 1) 市瀬正之ら：感染症学会誌，**57**，946～955（1983）
- 2) 堀内三吉ら：“日本の感染性腸炎” P. 265～286（1986）菜根出版
- 3) 白石圭四郎ら：札幌市衛生研究所年報，**12**，131～140（1985）
- 4) 日本化学療法学会：Chemotherapy，**29**，76～79（1981）
- 5) 金子通治：日本公衆衛生雑誌，**31**，227～233（1984）
- 6) 橋本一ら：モダンメディア，**33**，224～239（1987）

濾紙血液中の乳酸測定による高乳酸血症のスクリーニング法について

Measurement of Lactic Acid in Dried Blood Spot for Screening of Lactic Acidosis

水嶋 好清 山口 昭弘 福士 勝 荒井 修
佐藤 泰昌 清水 良夫 富所 謙吉 高杉 信男

Yoshikiyo Mizushima, Akihiro Yamaguchi, Masaru
Fukushi, Osamu Arai, Yasumasa Sato, Yoshio
Shimizu, Kenkichi Tomidokoro, Nobuo Takasugi

新生児濾紙血液中の乳酸をマイクロプレートを用いる酵素法により測定し、高値検体についてHPLCにより乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸を測定する方法について検討した。酵素法、HPLC法ともに再現性、簡便性等において優れており、高乳酸血症のマス・スクリーニング法としての有用性を認めた。

1 緒 言

近年、高乳酸血症を伴う有機酸代謝異常症が数多く報告され¹⁾、その多くは発育不全や精神運動発達遅延を伴い、代謝性アシドーシスや呼吸不全等で死亡する例も存在するため、早期に発見し、早期に治療を行うことが重要である。しかし、現在新生児期のマス・スクリーニングは技術的に困難とされ、代謝性アシドーシスなどの臨床症状を認めたのち、専門機関でガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC-MS)等による尿中有機酸分析により発見されている例がほとんどである。

先天性高乳酸血症は、多くの酵素欠損によって起ることが知られており、そのおもなものは、ピルビン酸の酸化経路の障害、糖新生経路の障害、電子伝達系の異常などであり、その他にメチルマロン酸血症やプロピオン酸血症などによっても二次的に乳酸が増加することが知られている。

本邦の有機酸代謝異常症は、昭和60年度の全国調査結果²⁾で148例が報告され、高乳酸血症が67例、

メチルマロン酸血症が47例、プロピオン酸血症が18例であり、大多数がこの3疾患で占められている。

また、高乳酸血症などの有機酸血症の治療法は、酵素欠損部位の違いや重症度などによって異なるが、解糖系やTCAサイクルなどの補酵素であるビタミンやジクロル酢酸の投与や、アシドーシスの緩和に重曹の投与、また食事療法として低炭水化物、高脂肪食が有効とされている。

以上のことから、新生児の濾紙血液を用いて血中乳酸を測定することによって、有機酸代謝異常症のうちで主要な疾患についてのスクリーニングが可能と思われる。そこで、一次検査として酵素法により乳酸を測定し、高値検体については、二次検査として高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による簡便な有機酸分析によって、乳酸、ピルビン酸、メチルマロン酸、プロピオン酸、尿酸を検出する方法を検討したので報告する。