

## 7 *Salmonella* Typhimurium (ST) 及び 4:i:- の分子疫学 解析を用いた浸潤状況と薬剤耐性

中央家畜保健衛生所

○石原 径佳・中井 悠華

### I はじめに

サルモネラ症は様々な血清型のサルモネラ属菌に起因する感染症であり、下痢・敗血症を主徴とした急性あるいは慢性の伝染性疾病である。*Salmonella* Typhimurium (ST) は家畜のサルモネラ症の主要な血清型であり、家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されている。さらに、近年、ST の第 2 相の鞭毛抗原が発現しない血清型 4:i:- の分離頻度が上昇し、問題となっている。4:i:- の病原性は ST と差がない<sup>1)</sup> ことから、農林水産省は、2018 年 4 月から 4:i:- も ST と同等に届出伝染病として扱うことを決定した<sup>2)</sup>。

全国的に 4:i:- の分離頻度が上昇しているが、本県においても、2013 年に県内初分離以降、4:i:- の分離頻度が上昇している (図 1)。そこで、本県における ST 及び 4:i:- の浸潤状況を把握するため調査を実施した。また、国内では 2006 年に初めて CMY-2 型の耐性遺伝子をもつ *S. Infantis* が家畜から分離された報告<sup>3)</sup> があり、その後、薬剤耐性サルモネラ属菌の報告が散見される<sup>4,5)</sup> ため、薬剤感受性試験を実施し、多剤耐性が認められた株については、耐性遺伝子の保有状況を調査した。

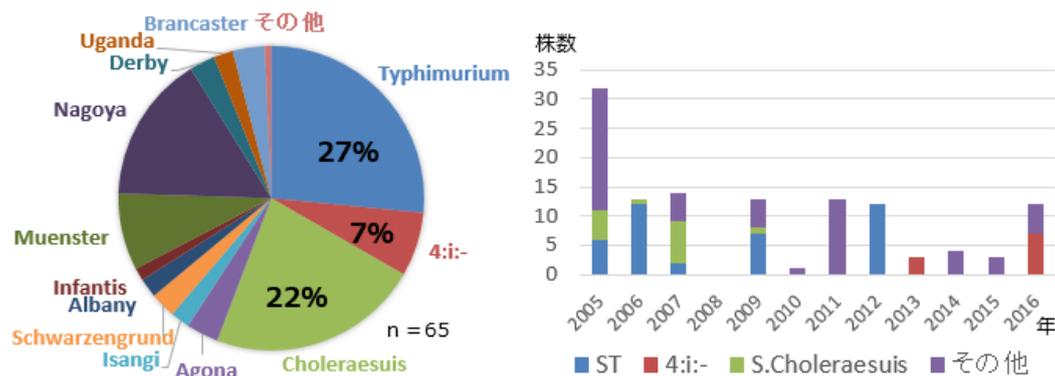


図 1 県内で分離された家畜由来サルモネラ属菌の血清型割合

### II ST 及び 4:i:- の浸潤状況及び薬剤耐性状況調査

#### 1 材料

材料は、2005 年から 2012 年に分離された ST20 株 (全て乳用牛由来・8 農場) と、

2013 年から 2016 年に分離された 4:i:-10 株（乳用牛由来 4 株・2 農場、家きん由来 6 株・1 農場）を用いた。

## 2 方法

まず、各農場分離株の近縁関係を調査するため、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)<sup>6)</sup> を実施した。また、県内株を国内流行株と比較するために、9 つの遺伝子型に区別する allele-specific (AS)-PCR による SNP 遺伝子型別<sup>7)</sup> を、動物衛生研究部門に依頼して実施した。

薬剤感受性試験は、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトキシム (CTX)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、ナリジクス酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) の計 11 薬剤について、1 濃度ディスク拡散法で実施した。

## 3 結果

### 1) PFGE 及び SNP 型別結果

PFGE では、Tenover らの判定基準<sup>8)</sup> に基づき、バンド 3 本以内の変異の場合、近縁度が高い同一由来株と判定したところ、ST は、I ~IV の 4 種類に分類され、さらに II と III 型は亜型 (II a~b、III a~f) に細分された。一方、4:i:- は、V と VI 型に分類された。SNP 型別では、ST は、2、7、8、9 型のいずれかに型別され、4:i:- は、8 又は 9 型に型別された (図 2、3)。

ST、4:i:- とともに、同じ農場では性状の均一な株が分離されていたが、一部異なる農場 (C・D・E) で、数か月の期間を空けて、同じ PFGE や SNP 型の株が分離された例や、同じ市内の近隣農場 (I・J) で、数年の期間を空けて、同じ PFGE や SNP 型の株が分離された例があった。

No	農家	分離年月	PFGE	SNP
1	A	2005.4	I	8
2				
3	B	2005.11	IIa	2
4				
13	F	2007.6	IV	9
17				
18	H	2012.3	IIb	2
19				
20				
5				
6	C	2006.6	IIIa	7
7				
9	D	2006.9		
11	E	2007.2		
12				
8	D	2006.9	IIIb	
10	D	2006.9	IIIc	
14	G	2009.6	III d	
15	G	2009.6	III e	
16	G	2009.6	III f	

図 2 ST の PFGE 及び SNP 型別結果

No	農家	分離年月	PFGE	SNP
21				
22	I	2013.8	V	9
23				
24	J	2016.12		
25				
26				
27	K	2016.6	VI	8
28	※家きん			
29				
30				

図 3 4:i:-の PFGE 及び SNP 型別結果

2) 薬剤感受性試験成績

PFGE と SNP 型別ごとに一覧にした結果、SNP7 型の ST と SNP9 型の 4:i:-が多剤耐性傾向であった(表 1)。

表 1 薬剤感受性試験成績

ST														
PFGE	SNP	株数	農家	ABPC	CEZ	CTX	SM	KM	GM	OTC	CP	NA	ERFX	ST
I	8	1	A	S	I	S	I	S	S	I	S	S	S	S
IIa	2	3	B	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S
IIb	2	4	H	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
IIIa	7	3	C	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S
III a,b,c	7	3	D	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
III a,d,e,f	7	5	E,G	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
IV	9	1	F	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S
4:i:-														
PFGE	SNP	株数	農家	ABPC	CEZ	CTX	SM	KM	GM	OTC	CP	NA	ERFX	ST
V	9	4	I,J	R	S	S	R	S	S	R	S	I	S	S
VI	8	6	K	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S

III βラクタマーゼ産生性の確認のための追加試験

SNP7 型の ST がセファロスポリン系薬剤に耐性であったため、βラクタマーゼ産生状況を調べるため、追加試験を実施した。

1 材料

SNP7 型 ST のうち、ABPC、CEZ に耐性で異なる農場由来で異なる PFGE 型を示す 8 株を用いた(表 2)。

表 2 SNP7 型 ST のうち ABPC, CEZ 耐性の 8 株

株No	PFGE	農家	ABPC	CEZ	CTX	SM	KM	GM	OTC	CP	NA	ERFX	ST
5	IIIa	C	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S
8	IIIa	D	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
9	IIIb	D	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
10	IIIc	D	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R
11	IIIa	E	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
14	III d	G	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
15	IIIe	G	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
16	III f	G	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S

2 方法

βラクタマーゼ産生性の確認のため、P/C アーゼテスト（日水）及びダブルディスク法(クラブラン酸（CVA）やスルバクタム（SBT）による阻害効果の確認)を実施し、AmpC 型 βラクタマーゼ産生性の確認のため、ボロン酸による阻害効果の確認を実施した<sup>9)</sup>。さらに、βラクタマーゼの代表的な遺伝子型である、TEM 型・SHV 型、CTX-M 型、CMY-2 型を型別するため、それぞれ PCR<sup>10, 11, 12)</sup> による耐性遺伝子の検出を実施した。

3 結果

No.5、11、14、15、16 は、ペニシリナーゼのみを産生し、CVA 及び SBT による阻害効果が認められ、PCR の結果 TEM 型の耐性遺伝子の保有が確認された。

No.8、9、10 は、第三世代セファロスポリン系薬剤の CTX にも耐性であり、ペニシリナーゼ及びセファロスポリナーゼを産生し、CVA 及び SBT だけでなくボロン酸による阻害効果が認められ、PCR の結果、TEM 型だけでなく CMY-2 型の耐性遺伝子の保有が確認された（表 3）。

表 3 βラクタマーゼ産生性の追加調査

株 No	PF GE	農家	CEZ	CTX	ペニシリナーゼ産生	セファロスポリナーゼ産生	CVA 阻害	SBT 阻害	ボロン酸阻害	PCR
5	IIIa	C								
11	IIIa	E								
14	III d	G	R	S	+	-	+	+	-	TEM型
15	IIIe	G								
16	III f	G								
8	IIIa	D								TEM型
9	IIIb	D	R	R	+	+	+	+	+	TEM型及び
10	IIIc	D								CMY-2型

上記の株は全て、2006から2009年に分離

#### IV まとめと考察

PFGE では、同じ農場で性状の均一な株が分離されていたが、一部、同一市内の近隣農場で同じ PFGE や SNP 型の ST や 4:i:- が分離されていたことから、地域で同一性状株が浸潤していた可能性が示唆された。SNP 型別では、SNP7 型の ST は、国内で 2004 年から 2007 年に分離が増加している<sup>7)</sup> が、県内でも同様に 2006 年から 2009 年に分離されていた。また、SNP9 型の 4:i:- は 2012 年以降国内で分離が増加している<sup>7)</sup> が、県内でも同様に 2013 年以降に分離されていた。これらのことから ST・4:i:- とともに、国内の流行と一致して、県内に浸潤していることが判明した。薬剤感受性試験では、既報<sup>7)</sup> で、SNP7 型の ST は、ABPC、SM、KM、テトラサイクリン、サルファ剤に、SNP9 型の 4:i:- は、ABPC、SM、テトラサイクリン、サルファ剤に耐性傾向があるとされているが、県内株もほぼ一致していた。

βラクタマーゼ産生性の確認では、2006 年に分離された SNP7 型の ST が、第 3 世代セファロスポリン系薬剤の CTX に耐性であり、PCR の結果 TEM 型及び CMY-2 型の耐性遺伝子の保有が確認された。CMY-2 型の遺伝子は染色体上又はプラスミド上に保有され、プラスミド上に保有していると CTX にまで耐性を示す傾向があり<sup>13)</sup>、今回の株もその可能性が高いと考えられた。また、国内（福島県）では、第三世代セファロスポリン耐性で、プラスミド上に CMY-2 型を保有している ST が乳用牛から 2007 年に分離された事例<sup>14)</sup> があり、今回、県内でも同時期に乳用牛から第三世代セファロスポリン耐性で、CMY-2 型の遺伝子を保有する ST が分離されていたことが判明した。両者の疫学関連は不明だが、類似した性状と推定される ST が国内で広範囲に分布していた可能性も考えられた。

耐性遺伝子を保有する多剤耐性菌は、家畜診療だけでなく公衆衛生上でも問題である。そのため、畜産現場では抗生物質の慎重使用を今後も継続するとともに、人、家畜間の感染を防止する為にも飼養衛生管理の徹底が求められる。

#### V 謝辞

PFGE 及び SNP 型別を実施していただいた、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生部門 細菌・寄生虫領域 腸管病原菌ユニット 玉村雪乃先生に深謝いたします。

#### VI 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課, サルモネラ(4:i:-)の同定法マニュアル, 平成 29 年 10 月 16 日, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 腸管病原菌ユニット
- 2) 農林水産省消費・安全局動物衛生課, サルモネラ(4:i:-)の取り扱いについて, 平成 30 年 3 月 29 日, 29 消安第 6791 号

- 3) Taguchi M, et al. Jpn J Infect Dis 2006. 59 : 144-6. CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from poultry in Japan.
- 4) 石畝 史ら, 感染症学雑誌, 2005. 79 (4), 270- 275, 多剤耐性 *Salmonella enterica* Serovar Newport における患者由来株と下水由来株との比較検討
- 5) Izumiya H, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2005. Jun; 49(6): 2568 - 2570. Identification of CTX-M-14  $\beta$ -Lactamase in a *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolate from Japan.
- 6) Tamamura Y, et al. Appl Environ Microbiol. 2011. Mar;77(5):1739-50. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone.
- 7) Arai N, et al. J Clin Microbiol. 2018. Apr 25;56(5). e01758-17. Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant isolated from food animals in japan revealed replacement of major epidemic clones in the last 4 decades.
- 8) Tenover FC, et al. J Clin Microbiol. 1995. Sep;33(9):2233-9. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.
- 9) 中村文子ら, モダンメディア, 2010. 56 巻, 10 号, 18-24, 臨床検査ひとくちメモ No. 205
- 10) Yagi T, et al. FEMS Microbiol Lett. 2000. Mar 1;184(1):53-6. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan.
- 11) Shibata N, et al. Antimicrob Agents Chemother. 2006. Feb;50(2):791-5. PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan.
- 12) Dallenne C, et al. J Antimicrob Chemother. 2010. Mar;65(3):490-5. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*.
- 13) 玉村雪乃ら, 北獣会誌, 2012. 56, 157-162, 牛サルモネラ症由来株の分子疫学解析
- 14) Sugawara M, et al. J Vet Med Sci. 2011. Mar;73(3):345-9. Molecular and phenotypic characteristics of CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan.