

### 3 栃木県で分離された *Salmonella* Typhimurium 単相変異株 O4:i:- の解析

県央家畜保健衛生所

赤間俊輔 手塚典子

#### はじめに

家畜のサルモネラ症は、種々の血清型のサルモネラに起因する感染症であり、牛や豚では、下痢や敗血症、流産等を主徴とする。

例年、分離数が最も多いのは *Salmonella* Typhimurium (ST、抗原構造 O4:i:1,2) である。STは、家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されており、その発生動向、被害状況等が監視されている。

一方、近年、STのH抗原の第2相が検出できない、いわゆる単相変異株 (O4:i:-) が増加傾向にあり全国的に問題となっている (図1)。

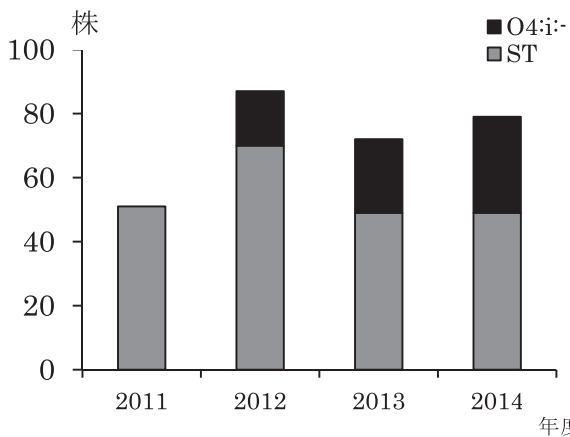


図1 全国でのST及びO4:i:-分離株数

(動物医薬品検査所ホームページから集計)

O4:i:-は、STがH抗原第2相の発現に関連する遺伝子が欠落すること等により生じる<sup>1)</sup>とされているが、本県においても、近年、顕著な増加が認められ、2012年の県内初分離以降、サルモネラ分離例11例中8例(2016.6現在)がO4:i:-となっている(図2)。

しかし、O4:i:-は、現時点でSTとは別の血清型とみなされ届出の対象となっていない。そのため、増加の原因のほか、発生動向や被害状況等もほとんど把握されていないのが現状である。

そこで今回、県内におけるO4:i:-急増の背景を

解明するため、本県で過去に分離されたST及びO4:i:-の疫学解析及び薬剤感受性試験を実施し、既報と比較検討した。その結果、いくつかの新しい知見が得られたので、その概要を報告する。

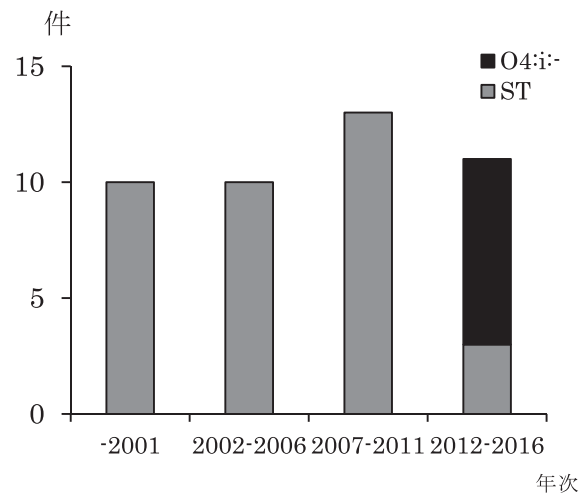


図2 本県におけるST及びO4:i:-分離状況

#### 材料

県内において1999年～2013年に分離されたST39株(牛由来26株、豚由来10株、その他3株)及び2012年～2016年に分離されたO4:i:-8株(牛由来3株、豚由来4株、その他1株)計47株を検査に供した。

#### 方法

##### 【疫学解析】

1. multi-locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)

10分間煮沸した菌液の遠沈上清あるいは精製DNAをテンプレートに用い、反復縦列配列を含む5種類の遺伝子座位(STTR3、STTR5、STTR6、STTR9、STTR10)<sup>2)</sup>についてPCRで増幅、PCR産物のシーケンス結果から、リピート数を算出しプロファイルを決定した。次いでプロファイルに基づきBionumerics (Applied Maths)による系統樹解析を行った。

2. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

MLVA で同一クラスターに分類された菌株について PFGE パターンを比較した（同一農場分離株は 1 株のみ選出）。なお、制限酵素は Xba I を用い、泳動条件は、パルスネットの protocols<sup>3)</sup> に従った。判定は Tenover らの方法<sup>4)</sup> により行い、バンド 3 本以内の変異の場合、同一クローンの可能性が高いと判断した。

【薬剤感受性試験】

1 濃度ディスク法（センシディスク：BD 社）により、アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、セフォタキシム（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）、シプロフロキサシン（CPF）、ST 合剤（ST）の計 11 薬剤について実施した。

結果

【疫学解析】

1. MLVA

本県で分離された 47 株は 29 のプロファイルに分類され、3 つの大きなグループ（クラスター）が確認された（図 3、4）。

クラスター 1 は 1999～2007 年分離の ST9 株、クラスター 2 は 2009～2013 年分離の ST12 株から構成されており、それぞれ北海道において流行が確認されているクラスター A、クラスター C に相当していた。

一方、クラスター 3 は 2012～2016 年分離の O4:i-7 株及び 2001～2003 年分離の ST4 株から構成されていたが、既報に相当する株の流行は認めなかった。

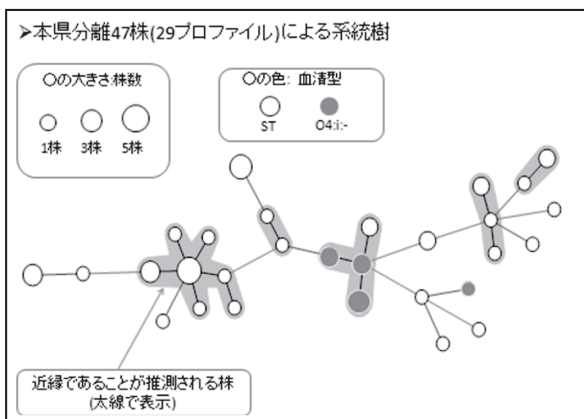


図 3 MLVA プロファイルに基づく系統樹

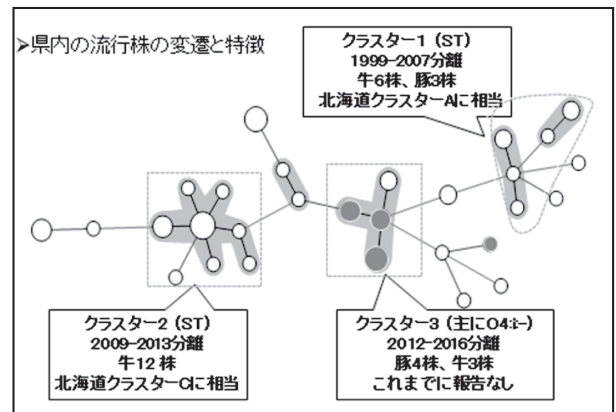


図 4 流行株の変遷と各クラスターの特徴

2. PFGE

クラスター 1（1 株除く）、クラスター 2 に属する株及びクラスター 3 に属する O4:i- は、それぞれ同一の PFGE パターンを示し、同一クローンの可能性が高いと判断した。

一方、クラスター 3 に属する ST は、O4:i- と PFGE パターンが一致せず、異なる由来と判断した（図 5）。

【薬剤感受性試験】

各クラスターの株は、いずれも ABPC、SM、OTC を中心とした 3～7 剤の多剤耐性株を示した。また、クラスター 3、O4:i- の 1 株を含む計 2 株で、第 3 世代セフェムである CTX にも耐性を示した（表 1）。

まとめ及び考察

【疫学解析】

MLVA と PFGE の結果、本県における流行株の変遷と、県内の近年の O4:i- の急増における新しいクローン（クラスター 3、O4:i-）の関与が明らかとなった。

国内の流行株の変遷については、玉村ら<sup>5)</sup> が、北海道の乳牛由来株について疫学解析を実施し、2000～2002 年頃を境に流行株がクラスター A 株からクラスター C 株へと置き換わっていることを報告している。

本県においても同様の傾向にあり、流行株が 2007～2009 年を境にクラスター 1（クラスター A に相当）からクラスター 2（クラスター C に相当）へ置き換わっていた。

さらに、本県では、2012～2013 年を境に、

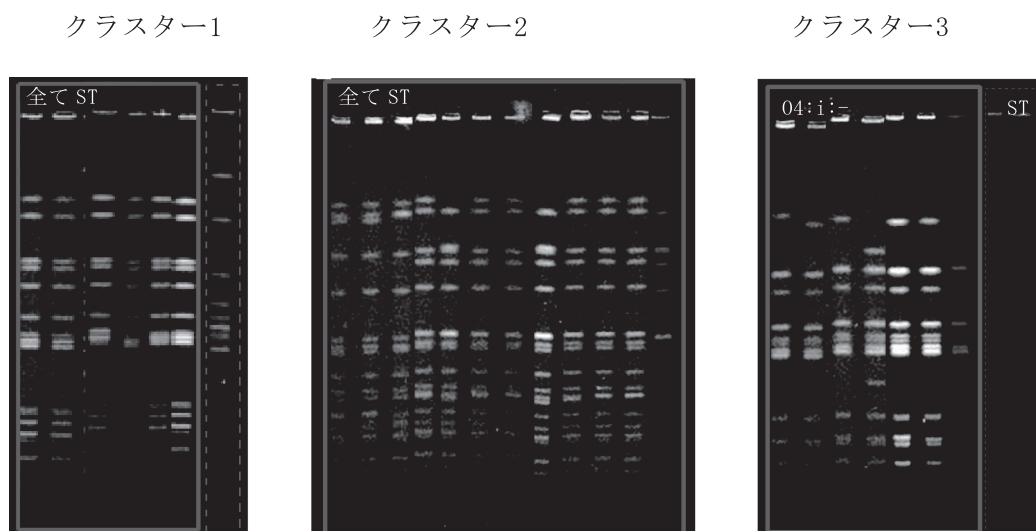


図5 各クラスターに属する株の PFGE パターン

表1 クラスター別の薬剤耐性パターン

S=感受性、R=耐性

クラスター	ABPC	CEZ	CTX	SM	KM	GM	OTC	CP	NA	CPFX	ST	株数
1	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	1
	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	7
2	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	1
	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	7
3	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	4
	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	1
	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	6

クラスター2から、これまでに報告されていないクラスター3、O4:i:-に流行株がシフトしていることが判明した。

国内の家畜衛生分野において、従来O4:i:-は多様な由来の株に起因すると考えられており、これまで特定のクローンの流行は報告されていない。本研究により、初めて国内におけるO4:i:-の特定のクローンの存在が明らかとなった。

また、従来、疫学解析に用いられてきたPFGEは、作業が煩雑であること、再現性が必ずしも高くなく研究室間での成績の比較が困難であることなどから、これまで国内の家畜衛生分野においてST及びO4:i:-の全国規模の疫学調査はなされていない。しかし、今回実施したMLVAは、迅速性、識別能に優れ、研究室間の成績の比較が容易とされており<sup>6)</sup>、本研究においても、PFGEに

匹敵する高い識別能を認め、既報との比較を可能とした。一方、MLVAで同一クラスターに分類されるがPFGEパターンの異なる株も確認されており(クラスター3、ST等)、PFGEの必要性も改めて確認できた。

今回確認されたクラスター3、O4:i:-が、本県における地域的な流行株にすぎないのか、全国的なO4:i:-の増加に関与しているのかは、現時点で不明である。今回用いたMLVAを主とし、PFGEで補完する疫学解析手法が普及することで、全国的なST、O4:i:-の疫学背景の解明が進み、今後、クラスター3、O4:i:-の全国的な位置づけが判明することを期待したい。

#### 【薬剤感受性試験】

全ての流行株において、3～7剤の多剤耐性が

確認され、クラスター 2 の ST1 株(2013 年分離)、クラスター 3 の O4:i-1 株 (2015 年分離) の計 2 株は第 3 世代セフェムに耐性を示した。

第 3 世代セフェムは、その効果の高さや、代替薬の乏しさから、フルオロキノロンや 15 員環マクロライドとともに、極めて高度に重要な薬剤と位置付けられており、耐性菌出現防止の各種取組がなされている<sup>7)</sup>。

しかし、懸命な取組にも関わらず、近年、国内外において耐性株が多数報告されている。玉村ら<sup>6,8)</sup>は、その耐性遺伝子がプラスミド上に存在する ST を、貞弘ら<sup>9)</sup>は、染色体上に耐性遺伝子が存在する O4:i- を報告しており、様々な機序で第 3 世代セフェム耐性の獲得が起こりうるものが徐々に明らかになってきている。

本県においても、比較的近年の分離株において耐性が認められていることから、耐性獲得機序を検討していくとともに、薬剤の慎重使用・適正使用を指導していきたい。

O4:i- の全国的な増加は深刻な状況にあり、国をあげて取り組まねばならない喫緊の課題である。しかし、現時点では全国的な被害の実態さえ把握できておらず不明な点が多い。まずは早急に全国的な被害状況・実態を明らかにし、法的対応の検討も視野に入れ、対策に取り組む必要がある。

### 謝辞

稿を終えるにあたり、MLVA の実施をはじめ、数々の御指導、御助言を賜っ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研究部門、細菌・寄生虫研究領域、腸管病原菌ユニット、玉村雪乃研究員、秋庭正人ユニット長に深謝する。

### 参考文献

- 1) Noriko Ido et al. Characteristics of *Salmonella enterica* Serovar 4, [5], 12:i- as a Monophasic Variant of Serovar Typhimurium PLOS ONE August 2014 Volume 9 Issue 8 e104380
- 2) Lindstedt et al. 2004. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 59:163-172

- 3) pulseNet ホームページ  
Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*
- 4) Tenover et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9
- 5) Tamamura Y et al.: Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1739-1750 (2011)
- 6) 玉村雪乃ら: 牛サルモネラ症由来株の分子疫学的解析 北獣会誌 56(2012)
- 7) 農林水産省消費・安全局畜水産管理課  
動物用抗菌薬の『責任ある慎重使用』を進めるために
- 8) 玉村雪乃ら: 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium PFGE VII 型菌が保有する薬剤耐性病原性プラスミドの構造解析 動衛研研究報告第 121 号, 23-25
- 9) 貞弘恵ら: 多剤耐性 *Salmonella* O4:i- による牛サルモネラ症の発生事例と薬剤耐性遺伝子の解析 No. 3380 6-8 家畜衛生週報 (2015)