

## 研 究

# 乳用牛から分離された*Salmonella* Newportの薬剤耐性及び分子疫学的解析

江頭 宏之<sup>1)</sup>、小寺 文<sup>2)</sup>、松田 悦子<sup>1)</sup>

1) 宮城県仙台家畜保健衛生所

2) 宮城県大河原家畜保健衛生所

## 要 約

*Salmonella* Newport (SN) による牛サルモネラ症は、平成15年度以降国内の複数の地域で発生が報告されている<sup>1)</sup>。本県においても平成15年度に乳用牛からSNが初めて分離され、平成27年度には4農場の乳用牛で発生が認められた。平成27年度の発生は、発生時期が近く、疫学的な関連がみられたことから、平成15及び17年度に本県で分離された乳用牛由来SNと合わせて分子疫学的解析及び薬剤感受性試験を実施した。生化学性状試験結果と薬剤感受性試験結果は全株で一致し、17薬剤中8薬剤耐性と、多剤耐性であることが確認された。また、第3世代セフェム系薬剤であるセフォタキシムに耐性が確認され、プラスミドプロファイル結果からも全10株から165kb以上のプラスミドが検出されたことから、プラスミド性のβラクタマーゼ産生菌を疑い、基質拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 及びAmpC型βラクタマーゼについて調査した結果、全ての株でAmpC型βラクタマーゼ産生菌の性状を示した。パルスフィールドゲル電気泳動法では、平成27年度分離株は全て同一の切断パターンを示し、同一由来株によるまん延の可能性が示唆された。

## I. はじめに

牛サルモネラ症は1980年代までは子牛での発生が主体であったが、1990年代になって成牛、特に搾乳牛での発生が多く報告されている<sup>2)</sup>。また、SNによる牛サルモネラ症は、平成15年度以降国内の複数の地域で発生がみられている<sup>1)</sup>。

本県においても平成15年度に乳用牛からSNが初めて分離され、平成27年度にはSNによる牛サルモネラ症が4農場 (A~D農場) において発生し、発生時期が近く、疫学的な関連がみられたことから、分離されたSNを用いて薬剤耐性状況を調べると共に、分子疫学的解析を実施したので、その概要を報告する。

## II. 材料および方法

## 1 発生農場概要 (表1)

A農場は酪農経営であり、初回立入時の飼養頭数は成牛22頭、育成牛6頭、子牛2頭であった。5月下旬~6月中旬にかけて7頭で発熱及び水様性下痢の症状がみられ、立入を実施し発症牛の直腸便からSNが分離された。対策前に実施した全頭の糞便培養検査では、30頭中29頭からSNが分離され、農場内でのSNのまん延が確認された。初発時にはセファメジン (大洋薬品工業株式会社) を用いて治療を行っていたが、SN分離後に薬剤感受性試験結果に基づきマルボシル (Meiji Seikaファルマ株式会社) に切り替え、全頭への投与と畜舎消毒を実施した。

B農場は乳肉複合経営であり、初回立入時の飼養頭数は、乳用牛が成牛23頭、育成牛4頭、肉用繁殖牛が9頭であった。6月上旬に乳用牛1頭で発熱及び下痢の症状がみられ、数日後には搾乳牛ほぼ全頭が発症し、発熱、下痢、食欲不振及び乳量低下（通常の4分の1）を認めた。立入を実施し、発症牛の直腸便からSNが分離された。対策前に実施した全頭の糞便培養検査では、36頭中26頭からSNが分離され、農場内でのSNのまん延が確認された。発生当初はサルファ剤を用いて治療を行っていたが、SN分離後に薬剤感受性試験結果に基づきマルボシルに切り替え、全頭へのマルボシルの投与及び畜舎消毒を実施した。また、B農場ではSNの関与が疑われる乳用牛のへい死が4頭みられた。

C農場は酪農経営であり、初回立入時の飼養頭数は、成牛17頭、育成牛2頭、子牛5頭であった。6月下旬に1頭で発熱・水様性下痢を確認し、セファメジンを用いて治療を行うも症状は改善せず、立入を実施しSNが分離された。全頭へのマルボシルの投与及び畜舎消毒を行い、その後実施した全頭検査で24頭中2頭からSNが分離された。

D農場は乳肉複合経営であり、初回立入時の飼養頭数は乳用牛が成牛11頭、育成牛5頭、子牛2頭、肉用繁殖牛が成牛3頭、育成牛及び子牛3頭であった。8月下旬～9月上旬にかけて乳用牛3頭で発熱及び水様性下痢がみられ、立入を実施し発症牛の直腸便からSNが分離された。対策前に実施した全頭の糞便培養検査では、24頭中6頭からSNが分離された。初発時にはカナマイシンを用いて治療を行っていたが、SN分離後に薬剤感受性試験結果に基づきマルボシルに切り替え、全頭への投与と畜舎消毒を実施した。

## 2 材料

平成27年度に分離されたA～D農場由来のSN各2株（A-1、A-2、B-1、B-2、C-1、C-2、D-1、D-2）に加え、県内で過去に分離されたSNと比較するため、平成15年度及び平成17年度に乳用牛から分離されたSN1戸2株（H15、H17）の計10株を試験に供した。

## 3 方法

### (1) 疫学調査

4農場（A～D農場）の疫学的な関連を調べるため、農場への聞き取りを行った。

### (2) 生化学性状試験

市販の同定キットAPI20E（シスメックス・バイオメリュー株式会社）を用いて実施した。

### (3) 薬剤感受性試験

ミュラー・ヒントン寒天培地（Difco）を用いて、アンピシリン（ABPC）、アモキシシリン（AMPC）、セファゾリン（CEZ）、セフォタキシム（CTX）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、ストレプトマイシン（SM）、テトラサイクリン（TC）、オキシテトラサイクリン（OTC）、エンロフロキサシン（ERFX）、シプロフロキサシン（CPFX）、マルボフロキサシン（MBFX）、ナリジクス酸（NA）、コリスチン（CL）、ST合剤（ST）、ホスホマイシン（FOM）、クロラムフェニコール（CP）の17薬剤について1濃度ディスク法で実施した。なお、エンロフロキサシンはバイエル薬品株式会社から、マルボフロキサシンはMeiji Seikaファルマ株式会社からの試供品を用い、その他の薬剤はセンシディスク（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いた。

### (4) プラスミドプロファイル

関崎の変法<sup>3)</sup>により抽出し、0.8%アガロースゲルで電気泳動を行った。

### (5) パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）

秋庭の報告<sup>4)</sup>に準じて行い、制限酵素はXba I（TaKaRa）及びBln I（TaKaRa）を用いて、泳動条件6V/cm、5-50秒、22時間で実施した。結果の解析はTenoverらの報告<sup>5)</sup>による評価基準に基づき行った。

### (6) ダブルディスクシナジーテスト

AmpC/ESBL鑑別ディスク（関東化学株式会社）を使用し実施した。

### Ⅲ. 結果

#### 1 疫学調査 (表1、図1)

農場間距離はA、C農場間で約860m、A、D農場間で約2.6km、D、C農場間で約3.4kmであり、A、C、Dの3農場は比較的近隣であった。B農場とA、C、D農場では約70km離れていた。酪農組合はA、B、Cの3農場が共通であり、D農場は異なった。市販購入飼料はA、D農場で共通であり、B、C農場で共通であった。診療獣医師は、A、D農場で共通であり、その他は異なった。また、牛の導入状況は、A、D農場は平成26年3～4月の導入が直近の導入であり、B農場は平成27年5月に黒毛和種を2頭導入、C農場は乳用牛を平成27年6月に導入しており、A、B、Dの3農場はサルモネラ症発生時期前後に乳用牛の導入はなかった。その他の関連情報としては、A、C農場間で飼養者の往来があり、またD農場の従事者のA農場への立ち入りが確認された。

表1 発生農場概要①

| 農場   | A                             | B                     | C                             | D                             |
|------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 経営   | 酪農                            | 乳肉複合                  | 酪農                            | 乳肉複合                          |
| 飼養頭数 | 【乳用】<br>搾乳 20<br>育成 8<br>子牛 2 | 【乳用】<br>搾乳 23<br>育成 4 | 【乳用】<br>搾乳 17<br>育成 2<br>子牛 5 | 【乳用】<br>搾乳 10<br>育成 6<br>子牛 2 |
|      |                               | 【肉用】<br>繁殖 9          |                               | 【肉用】<br>繁殖 3<br>育成・子牛 3       |
|      | 酪農組合                          | ①                     |                               | ②                             |
| 飼料   | ③                             | ④                     |                               | ⑤                             |
| 獣医師  | ⑥                             | ⑦                     | ⑧                             |                               |

※ ABD農場はサルモネラ症発生時期前後に乳用牛の導入無し



| 農場    | A                   | B             | C                   | D                    |
|-------|---------------------|---------------|---------------------|----------------------|
| 農場間距離 | C:約860m<br>D:約2.6km | ACD:<br>約70km | A:約860m<br>D:約3.4km | A:約2.6km<br>C:約3.4km |
| 関連    | 飼養者がC農場と往来          | なし            | 飼養者がA農場と往来          | 従事者がA農場へ立入           |

図1 発生農場概要②

#### 2 生化学性状試験

試験に供した10株は全て、API20E code : 6704552 (Salmonella spp : %id=89.6) であり、同一の性状を示した。

#### 3 薬剤感受性試験 (表2)

10株全ての結果は一致し、アンピシリン (ABPC)、アモキシシリン (AMPC)、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)、テトラサイクリン (TC)、オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP) に耐性を示した。17薬剤中8薬剤に耐性を示し、多剤耐性SNであることが確認された。

表2 薬剤感受性試験結果

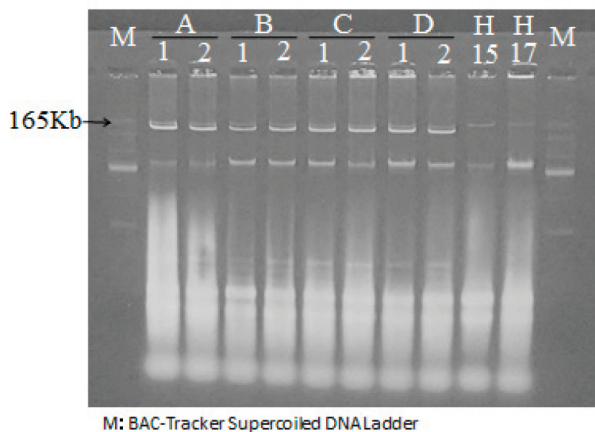
|     | ペニシリン系 |      | セファロスピリン系 |     | アミノグリコシド系 |    |    | テトラサイクリン系 |     | その他  |      |      |    |    |    |     |    |
|-----|--------|------|-----------|-----|-----------|----|----|-----------|-----|------|------|------|----|----|----|-----|----|
|     | ABPC   | AMPC | CEZ       | CTX | KM        | GM | SM | TC        | OTC | ERFX | CPFX | MBFX | NA | CL | ST | FOM | CP |
| A-1 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| A-2 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| B-1 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| B-2 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| C-1 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| C-2 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| D-1 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| D-2 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| H15 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |
| H17 | R      | R    | R         | R   | S         | S  | R  | R         | R   | +++  | S    | S    | S  | S  | S  | S   | R  |

17薬剤中8薬剤に耐性 → 多剤耐性SN

※ S:感受性 I:中間 R:耐性 ERFXは+, ++, +++で判定

#### 4 プラスミドプロファイル (図2)

平成27年度に分離された8株から165kbのプラスミドを検出し、平成15年度、平成17年度に分離された2株から165Kb以上のプラスミドを検出した。



M: BAC-Tracker Supercoiled DNA Ladder

図2 プラスミドプロファイル結果



## 5 PFGE (図3)

制限酵素Xba I 及びBln I のどちらを用いた場合でも、平成27年度に分離されたA～D農場由来の8株は同一の切断パターンを示した。また、平成15、17年に分離された1戸2株も同一の切断パターンを示した。この2つのパターンの間では、どちらの酵素を用いた場合でも4本以上切断パターンに相違がみられた。

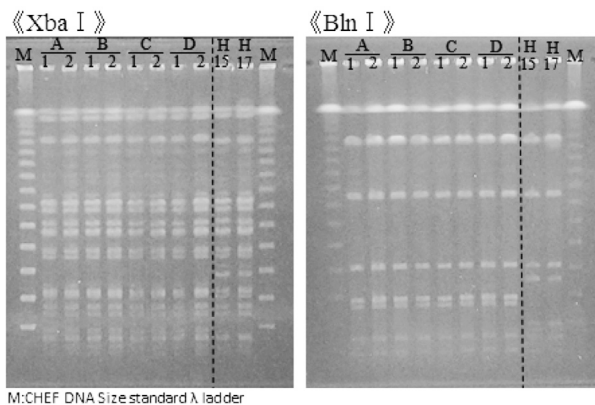


図3 PFGE結果

## 6 ダブルディスクシナジーテスト

全10株でAmpC型βラクタマーゼ産生菌の性状を示した。

## IV. 考 察

プラスミドプロファイルでは、全10株から165kb以上のプラスミドが検出されており、薬剤感受性試験では、第3世代セフェム系薬剤であるセフトキシムに耐性がみられ、また多剤耐性であった。また、第3世代セフェム系薬剤への耐性に関与する遺伝子の保有が疑われたことから、ダブルディスクシナジーテストを実施し、全10株でAmpC型βラクタマーゼ産生菌の性状を示す結果であった。第3世代セフェム系薬剤は人の医療においても重要であり、影響が危惧されている。また、多剤耐性因子はプラスミド上に多くが存在し<sup>6)</sup>、他の腸内細菌にも伝達する可能性があることから、多剤耐性菌のまん延が危惧されている。公衆衛生分野でも多剤耐性SNは問題になっており、米国では多剤耐性SNによる食中毒で畜産物が原因食品とされた例も発生している。

また、日本においても平成15年に人から多剤耐性SNが初分離されている<sup>7)</sup>。今回の症例でも多剤耐性SNが分離されたことから、抗菌性物質の慎重使用に努め、耐性菌の出現及びまん延防止に注意を払う必要がある。

平成27年度に分離されたA～D農場由来のSN8株は、生化学性状試験、薬剤感受性試験、プラスミドプロファイル及びPFGEにおいて同一の結果を示した。PFGEで切断パターンが一致したことから、同一由来株による感染の可能性が示唆された。疫学調査では、A、C、Dの3農場は比較的近隣であり、また疫学的な関連もいくつか確認されたが、B農場は他の3農場とは距離も離れており、酪農組合と市販購入飼料で共通の農場がある以外は疫学的な関連は確認されず、侵入経路は不明であった。また、A～D農場由来の8株と平成15年度、平成17年度に分離された2株とでは、生化学性状試験及び薬剤感受性試験で同一の結果を示したが、PFGEにおいて切断パターンに4本以上相違があることから、A～D農場のサルモネラ症の原因とは異なると推察された。これらの解析結果を、発生時の早期治療及びまん延防止に役立てていきたい。

## 引用文献

- 1) 石地智乃 (2007) 酪農家で分離された *Salmonella* Newport の性状及び遺伝子型の比較と考察. 富山県畜産関係業績集録, 39-44
- 2) 中村政幸 (2012) 牛のサルモネラ症. 臨床獣医. Vol130 No.2, 10-14
- 3) 内田郁夫 (2000) プラスミド抽出法. アニマルバイオテクノロジー. 45
- 4) 秋庭正人 (2000) パルスフィールドゲル電気泳動による腸管出血性大腸菌O157:H7の分子疫学的解析法. JVM. Vol153 No.1, 14-21
- 5) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33. 2233-2239
- 6) 庭野正人 (2004) 搾乳牛由来多剤耐性 *Salmonella* Newport. 平成16年度群馬県家畜保健衛生業績発表会集録, 40-42
- 7) 石畝史, 布施田哲也, 重屋志啓盛ら (2004) 多剤耐性 *Salmonella* Newport の国内初報告例. 感染症誌. 78, 989-990