

研 究

過去12年間における乳用牛由来 *Salmonella* Typhimurium の
分子疫学的解析

檜崎菜々子、江頭宏之、高橋幸治

宮城県仙台家畜保健衛生所

要 約

過去12年間（平成17～28年度）に県内8農場（A～H）で分離された乳用牛由来 *Salmonella* Typhimurium（ST）21株の分子疫学的解析を実施した。ディスク法による薬剤感受性試験（18薬剤）では、耐性の少ない（0～1薬剤）5農場（B、C、D、E、G）と多剤耐性（7～10薬剤）の3農場（A、F、H）に分類された。F、H農場ではA農場の7薬剤耐性に3薬剤加えた、10薬剤で耐性が確認された。制限酵素Xba I、Bln Iを用いたパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）及びMultiple locus variable number tandem repeats analysis（MLVA）では、農場毎の分離株は同一株由来であった。農場間で比較したところ、CとE農場、FとH農場の分離株はそれぞれ同一株由来と示唆され、これらの事例は発生時期も近く、農場も近隣であった。MLVAの結果から、A農場由来株（H17）は、北海道で平成14年以降に増加したPFGEⅦ型に近縁であり、F、H農場由来株（H28）とも関係がある可能性が示唆された。この結果から本県にも、少なくとも平成17年度にはPFGEⅦ型に近縁な株が浸潤していたことが判明した。また、本県では北海道流行株とは異なる様々な遺伝子型が確認され、多様なST株が県内に侵入していることが判明した。

Ⅰ．はじめに

牛サルモネラ症は、発熱、下痢、肺炎の症状を示し、重症例では敗血症を呈し死亡する¹⁾。1980年代までは子牛での発生が主体であったが、1990年以降は成牛における発生が急増した²⁾。また、近年では、搾乳牛の発生が増加し、乳量低下や生乳出荷停止など経済的な損失も大きい²⁾。国内で発生した牛サルモネラ症は *Salmonella* Typhimurium（ST）が最も多く分離されており、県内における過去12年間の牛サルモネラ症の発生もSTによる発生が47%（8/17件）を占めている。近年、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）およびMultiple locus variable number tandem repeats analysis（MLVA）を用いたサルモネラ症の分子疫学的解析が報告されている³⁾。そこで、過去12年間に県内8農場で分離された乳用牛由来STについて薬剤感受性試験、PFGE及び

MLVAを用いた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

過去12年間に県内8農場（A～H）の乳用牛からSTが分離された。平成17年度にAおよびB農場、平成24年度にC農場、平成25年度にDおよびE農場、平成28年度はF、G、H農場で発生が認められた。農場の位置は、CとE農場、FとH農場がそれぞれ近隣であった。飼養頭数は、A農場212頭、B農場30頭、C農場30頭、D農場100頭、E農場36頭、F農場60頭、G農場49頭、H農場6頭であった。飼養形態は、D農場が乳肉複合経営でそれ以外の農場は酪農経営であった。また、F、H農場は診療獣医師が同一であった。

2 材 料

平成17～28年度に県内のA～H農場で分離された乳用牛由来ST21株（A-1～4、B-1、C-1、2、D-1～3、E-1～3、F-1～3、G-1～3、H-1、2）を試験に供した。

3 方 法

(1) 薬剤感受性試験

ミューラー・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)、セフロキシム (CXM)、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)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、マルボフロキサシン (MBFX)、エンロフロキサシン (ERFX)、コリスチン (CL)、ST合剤 (ST)、ホスホマイシン (FOM) 及びクロラムフェニコール (CP) の18薬剤について1濃度ディスク法で実施した。なお、ERFXはバイエル薬品株式会社から、MBFX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。

(2) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

秋庭の報告⁴⁾に準じて行った。制限酵素はXba I (TaKaRa) 及びBln I (TaKaRa) を用いて、泳動条件6 V/cm、5-50秒、22時間で実施した。結果の解析はTenoverらの判定基準⁵⁾に基づき、3本以内の切断パターンの相違を同一株由来とした。

(3) Multiple locus variable number tandem repeats analysis (MLVA)

復縦列配列を含む5カ所の遺伝子座位をPCRで増幅し、シーケンサーにより得られた塩基配列から繰り返し回数を算出し、系統樹解析を行った。また、北海道の牛由来STはPFGEとMLVAによるデータベース化が進んでいることから、県内分離株と比較を実施した⁶⁾。

Ⅲ. 結 果

1 薬剤感受性試験 (表1)

対象農場は、7～10薬剤に耐性を示したA、F、H農場の多剤耐性農場と、0～1薬剤に耐性を示したB、C、D、E、G農場の2グループに分類された。A農場は、ABPC、AMPC、KM、SM、TC、OTC、CPで耐性を示した。F、H農場では、A農場で耐性を示した7薬剤に加えて、CEZ、CXM、NAの3薬剤でも耐性を示した。耐性の少ない農場のG農場は、SMの1薬剤で耐性を示し、その他の農場は耐性を示さなかった。

表1 薬剤感受性試験結果

農場	ペニシリン系		セフェム系			アミノグリコシド系			テトラサイクリン系		キノロン系				その他				耐性数
	ABPC	AMPC	CEZ	CXM	CTX	KM	GM	SM	TC	OTC	NA	CPFX	MBFX	ERFX	CL	ST	FOM	CP	
A	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	+++	S~1	S	S	R	7
B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	+++	S	S	S	S	0
C	S	S	S	S	S	S	S	S~1	S	S	S	S	S	+++	S	S	S	S	0
D	S	S	S	S	S	S	S	S	S~1	S	S	S	S	+++	S	S	S	S	0
E	S	S	S	S	S	S	S	S	S~1	S	S	S	S	+++	S	S	S	S	0
F	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	+	S	S	S	R	10
G	S	S	S	S	S	S	S	R	S~1	I	S	S	S	+++	S~1	S	S	S	1
H	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S~1	S	S	++~+	S	S	S	R	10

※S: 感受性, I: 中間, R: 耐性 ERFXは-, +, ++, +++で判定

2 PFGE (図1)

Xba I、Bln I どちらの酵素を用いた場合も、農場毎に分離された株は同一パターンもしくは、切断パターンの相違は3本以内であった。また、CとE農場由来株、FとH農場由来株の切断パターンの相違も3本以内であり、AとF、H農場由来株の切断パターンの相違は、Xba I の場合4～6本、

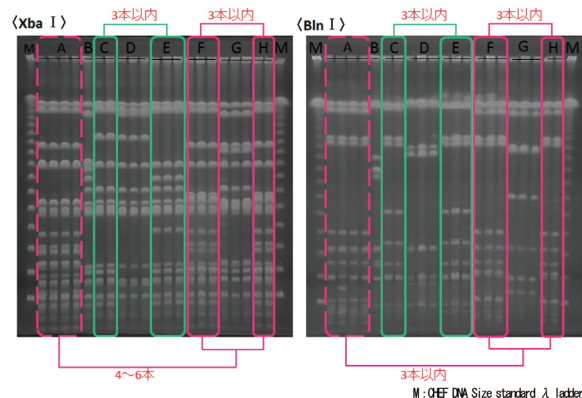


図1 PFGEパターン

Bln I の場合 3 本以内であった。一方、それ以外の農場では切断パターンの相違は 7 本以上であった。

3 MLVA

STの5カ所の遺伝子座位における縦列反復配列のプロファイルとPFGEの結果を基に系統樹を作成した(図2)。CとE農場由来株、F農場由来のF-1、3株とH農場由来株は、同一プロファイルに分類された。F農場由来のF-2株はF-1、3株とH農場由来株プロファイルと1遺伝子座位異なり、A農場由来のA-1、2、4株とは2遺伝子座位異なった。A農場由来のA-3株は、A-1、2、4株と一遺伝子座位異なった。一方、その他の農場由来株は、3遺伝子座位以上異なった。多剤耐性農場由来株(A、F、H)は、プロファイル間の距離が2遺伝子座位以内と比較的近く、薬剤耐性の少なかった農場由来株(B、C、D、E、G)のプロファイル間の距離は全て3遺伝子座位以上異なった。

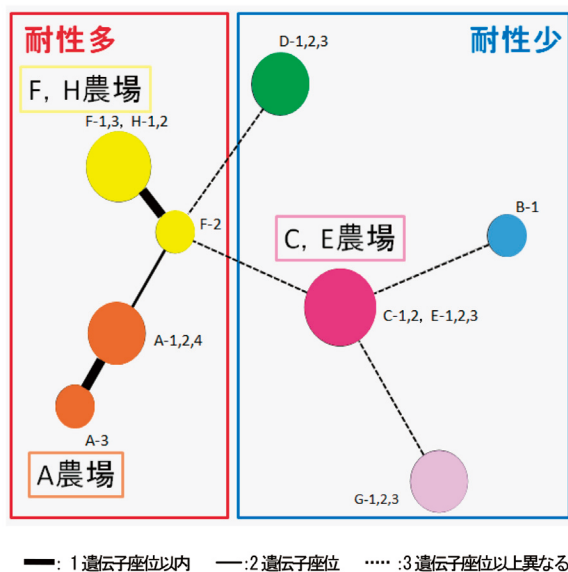


図2 MLVAの結果に基づく系統樹

円の大きさはプロファイルの菌株数を表し、円の中の色はPFGE型を表す。円の間はプロファイル間の距離を表し、1遺伝子座位以内を太線、2遺伝子座位のものを細い線、3遺伝子座位以上異なるものを破線で連結した。

県内と北海道分離株のMLVAプロファイルに基づく系統樹を図3に示した。北海道由来株は6つのクラスターが形成され、A農場由来株はPFGEⅦ型が含まれるクラスターに分類された。一方、A農場以

外の農場由来株はどのクラスターにも分類されなかった。

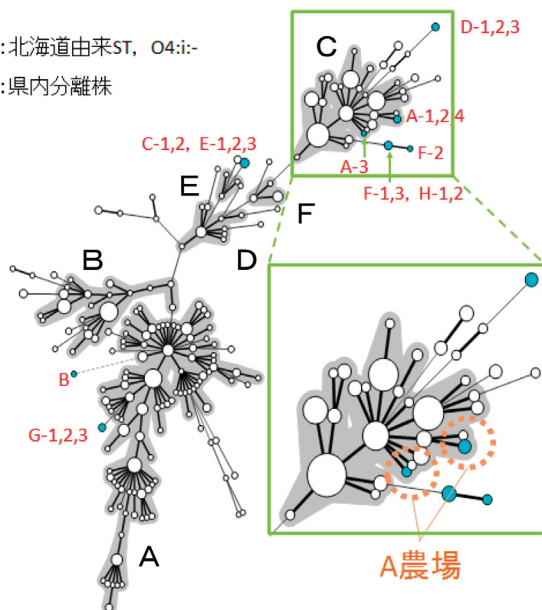


図3 県内と北海道分離株に基づく系統樹
北海道の菌株を白色の円、県内分離株を水色の円で示す。3つ以上のプロファイルが太線で連結された場合は、グレーで囲い1つのクラスターとした。

IV. まとめ及び考察

CとE農場、FとH農場は発生年度が近く、農場間距離も近隣であった。薬剤感受性試験において、CとE農場では耐性なし、FとH農場は多剤耐性で耐性パターンも同一であった。PFGE、MLVAの結果からCとE農場、FとH農場はそれぞれ同一由来株と判定された。A農場の発生年度はF、H農場の発生年度と異なり農場も近隣ではなかったが、多剤耐性で耐性パターンも類似していた。PFGEとMLVAの結果から、A農場由来株とF、H農場由来株は、関係がある可能性が示唆された。

MLVAプロファイルにより、県内分離株と北海道由来株と比較をしたところ、平成17年度に分離されたA農場由来株は、PFGEⅦ型が含まれるクラスターに分類された。PFGEⅦ型とは、玉村らにより北海道由来株のPFGE結果から分類された遺伝子型の1つであり、北海道で2002年以降に増加したことが明らかになっている⁷⁾。その多くは多剤耐性であり、中には第3世代セフェム系薬剤に耐性を示す株

表 2 県内分離株まとめ

農場	CとE		FとH	A
発生年度	H24	H25	H28	H17
農場間距離	近隣		近隣	
薬剤感受性試験	耐性なし		多剤耐性 (10薬剤耐性)	多剤耐性 (7薬剤耐性)
PFGE	同一		同一	F,H農場と関連あり
MLVA			同一 (一株のみ1遺伝子 座位異なった)	

も存在する³⁾。今回の解析結果から、本県にも平成17年度にはPFGEⅦ型に近縁な多剤耐性株が侵入していたことが判明した。また、A農場由来株と関係がある可能性が示唆されたF、H農場由来株は、A農場由来株と比較して、さらに耐性薬剤が増加しており、第2世代セフェム系薬剤にも耐性を示したことから、薬剤感受性試験を行った上で有効な抗菌剤を選択するなど、抗菌剤の慎重使用が重要になる。

一方、本県には北海道流行株とは異なる多様なSTが侵入していることも判明した。今後も、菌株を収集し監視と情報提供を継続していきたい。

V. 謝 辞

稿を終えるにあたり、MLVAの検査及び解析に御協力いただきました、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究部門の玉村雪乃先生に深謝致します。

引用文献

- 1) 川村清市、内藤善久、前出吉光 監修 (2011) 獣医内科学 改訂版 大動物編. 文永堂出版. 231
- 2) 玉村雪乃、内田郁夫. (2015) 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. Bull. Natl. Inst. Anim. Health No 121 : 23-25
- 3) 玉村雪乃、内田郁夫. (2012) 牛サルモネラ症由来株の分子疫学的研究. 北獣会誌. 56. 157-162
- 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. Vol53 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. Journal of clinical microbiology. 33. 2233-2239
- 6) Kurosawa A, Imamura T, Tanaka K. et al. (2012) Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4, 5, 12 : i : - isolates from cattle by multiple locus variable number tandem repeats analysis. Vet Microbiol. 160. 264-268
- 7) Tamamura Y, Uchida I, Tanaka K. et al. (2011) Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium Isolates from Cattle in Hokkaido, Japan : Evidence of Clonal Replacement and Characterization of the Disseminated Clone. Appl Environ Microbiol. 77. 1739-1750