

## 10 同一牛から分離された性状の異なる *Salmonella*

### Typhimurium (O4:i:-) の分子疫学的解析と薬剤耐性について

宗谷家畜保健衛生所

○井澤 将規 原 希和子  
稲垣 華絵

#### はじめに

サルモネラ症は、人を含む動物全般に発生する人獣共通感染症であり、種々の血清型のサルモネラに起因する。近年、*Salmonella* Typhimurium (ST) の2相H抗原が発現しない変異株である *Salmonella* 血清型 (O4:i:-) の分離頻度が上昇している[1,2,3]。本血清型はSTの遺伝子の一部が変異したものであるため、平成30年4月1日よりSTとして届出の対象となった[4]。

今回、宗谷管内で発生した牛サルモネラ症において、同一個体から性状の異なる(O4:i:-)を複数分離した。病性鑑定における培養検査や使用抗菌剤の選択等、防疫上、注意を要する事例であると考え、分離株の性状解析及び分子疫学的解析を実施したので、概要を報告する。

#### 1 発生の概要

##### 1 発生経過

平成30年10月、管内の乳肉複合農場において、哺乳子牛3頭が発熱や下痢を呈し死亡したため、原因検索のため死亡子牛1頭(黒毛和種、雄、9日齢)について、病性鑑定を実施した。

##### 2 病性鑑定成績

###### (1) 剖検所見

頭尾長100cm、体格普通、体型異常なし。腹腔内には黄色透明の腹水が増量し、線維素の析出がみられた。肝臓は黄褐色を呈し、腫大していた。空回腸漿膜面及び腸間膜は暗赤色、水腫を呈し、腸間膜リンパ節の腫大がみられた(図1)。空回腸粘膜面には黄白色の偽膜が付着していた。他臓器に著変はみられなかった。

###### (2) 細菌学的検査

脳、五大臓器、腸管内容物、胸水及び腹水について、定法により有意菌の分離培養を実施した。

諸臓器、腸管内容物、胸水及び腹水から *Salmonella* 血清型 (O4:i:-) を分離した。分離株は、MLCB培地で発育が弱いMLCB弱発育株と、発育が良好なMLCB良発育株の2種類が確認された(図2)。SS培地及びESII培地では、発育性の異なる株はみられなかった。



図1 空腸及び腸間膜の水腫及び腸間膜リンパ節の腫



図2 MLCB培地での発育性の違い(左)良発育(右)弱発育 37°C、24時間培養

### (3) ウイルス学的検査

空腸内容物、結腸内容物及び腹水について、A、B、C 群ロタウイルス、牛コロナウイルス、牛アデノウイルス、牛トロウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス遺伝子検索のため、既知のプライマーを用いて PCR を実施した [5,6,7,8,9]。

空腸及び結腸内容物より、A 群ロタウイルス遺伝子を検出した。

### (4) 病理学的検査

空腸に線維素性壊死性腸炎像がみられた。肝臓には小壊死巣及びチフス結節が散在していた (図 3、4)。

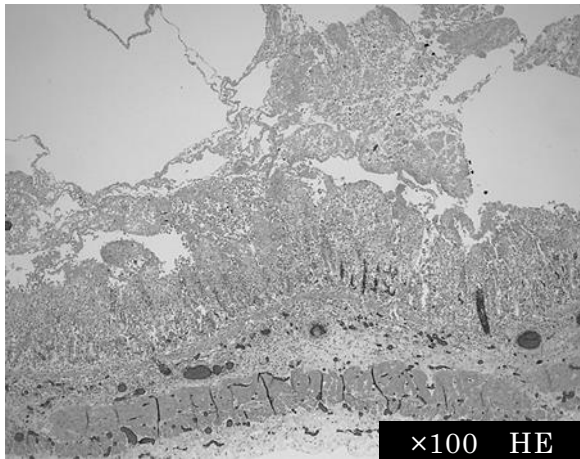


図 3 空腸 線維素性壊死性腸炎

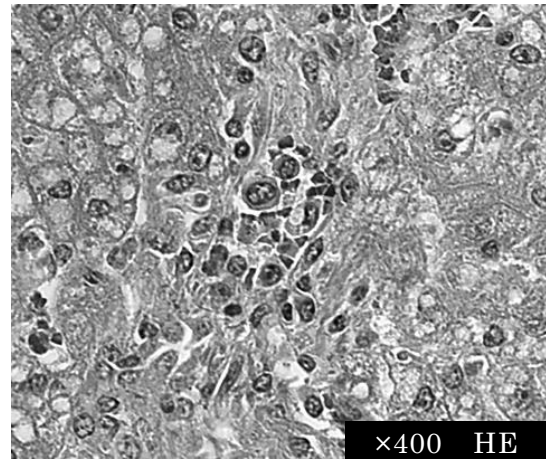


図 4 肝臓 チフス結節

## II 分離株の解析

### 1 材料と方法

#### (1) 材料

病性鑑定において死亡子牛から分離した MLCB 弱発育株 8 株 (心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胸水、腹水、盲腸内容物、結腸内容物由来、各 1 株) 及び、MLCB 良発育株 4 株 (第四胃内容物、腸間膜リンパ節、空腸内容物、結腸内容物由来、各 1 株) 計 12 株を供試菌株とした。

#### (2) 方法

##### ア クリスタルバイオレット (CV) 添加培養試験

MLCB 培地 (CV 10mg/L 含有) における発育性の違いの要因を検討するため、含有色素である CV を普通寒天培地に最終濃度 10、5、1、0.5mg/L となるように添加し、供試菌株を接種後、37℃、24 時間、好気条件下で培養した。発育性の判定基準は、画線部末端まで発育するものを「++ (発育良好)」、接種部のみに発育するものを「+ (発育中等度)」、発育しないものを「- (発育不良)」とした。

##### イ 薬剤感受性試験

一濃度ディスク拡散法 (ディスク法) により、アンピシリン (ABMP)、ストレプトマイシン (SM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、フロルフェニコール (FFC)、ST 合剤 (SMX/TMP)、ナリジクス酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX)、オルビフロキサシン (OBFX)、コリスチン (CL) について、薬剤感受性試験を実施した。

## ウ 薬剤耐性要因検索

### (ア) キノロン耐性

キノロン耐性決定領域 (QRDR) である *gyrA*、*gyrB*、*parC*、*parE* 遺伝子のシーケンス解析を実施し、プラスミド媒介性キノロン耐性 (PMQR) 遺伝子である *qnrA*、*qnrB*、*qnrS* 遺伝子の保有状況を PCR により確認した [10,11]。

### (イ) コリスチン耐性

コリスチン耐性遺伝子の 1 つである *mcr-1* の保有状況について、PCR により確認した [12]。

## エ 分子疫学的解析

### (ア) パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)

制限酵素 *Xba* I を用い、定法に従い実施した。

### (イ) 一遺伝子多型 (SNP) 遺伝子型別法

Arai らの方法により、PCR により SNP 遺伝子型別を実施した [13]。

## 2 結果

### (1) CV 添加培養試験

全 12 株のうち、MLCB 弱発育株であった 8 株の CV 発育性は、10 mg/L 及び 5mg/L の CV 添加普通寒天培地では「-」、1mg/L では「+」、0.5mg/L では「++」であった。MLCB 良発育株であった 4 株の CV 発育性は、全濃度域の CV 添加培地で「++」であった。

試験結果より、CV 添加培地で発育抑制のみられた MLCB 弱発育株 8 株を I 群、発育抑制のみられなかった MLCB 良発育株 4 株を II 群と分類した (表 1)。

表 1 CV 発育性における群分類

菌株番号	分離箇所	CV添加普通寒天培地				グループ
		10mg/L	5mg/L	1mg/L	0.5mg/L	
1	心臓					
2	肝臓					
3	腎臓					
4	脾臓					
5	胸水	-	-	+	++	I 群
6	腹水					
7	盲腸内容物					
8	結腸内容物					
9	第四胃内容物					
10	腸間膜リンパ節	++	++	++	++	II 群
11	空腸内容物					
12	結腸内容物					

++ : 発育良好    + : 発育中等度    - : 発育不良

## (2) 薬剤感受性試験

ABMP、SM、OTC、FFC、SMX/TMP に対しては、I 群及びII 群とも耐性を示した。キノロン系抗菌剤である NA、ERFX、OBFX と CL に対しては、I 群は耐性、II 群は感受性を示した。

## (3) 薬剤耐性要因検索

### ア キノロン耐性

キノロン系抗菌剤に耐性を持つ I 群 8 株のうち、菌株番号 1 では QRDR の 1 つである *gyrA* の 83 番目のセリンがフェニルアラニンに、菌株番号 2-8 では *gyrA* の 83 番目のセリンがチロシンに置換していた。キノロン系抗菌剤に感受性の II 群 4 株では、QRDR の変異は認められなかった。

I 群及び II 群ともに、PMQR 遺伝子の保有は認められなかった。

### イ コリスチン耐性

コリスチンに耐性を持つ I 群 8 株には *mcr-1* の保有が確認された。コリスチン感受性の II 群 4 株では、*mcr-1* の保有は認められなかった。

## (4) 分子疫学的解析

### ア PFGE

I 群及び II 群は、全て同一の PFGE パターンを示した (図 5)。

### イ SNP 遺伝子型別法

I 群及び II 群は、全ての SNP9 型に分類された。

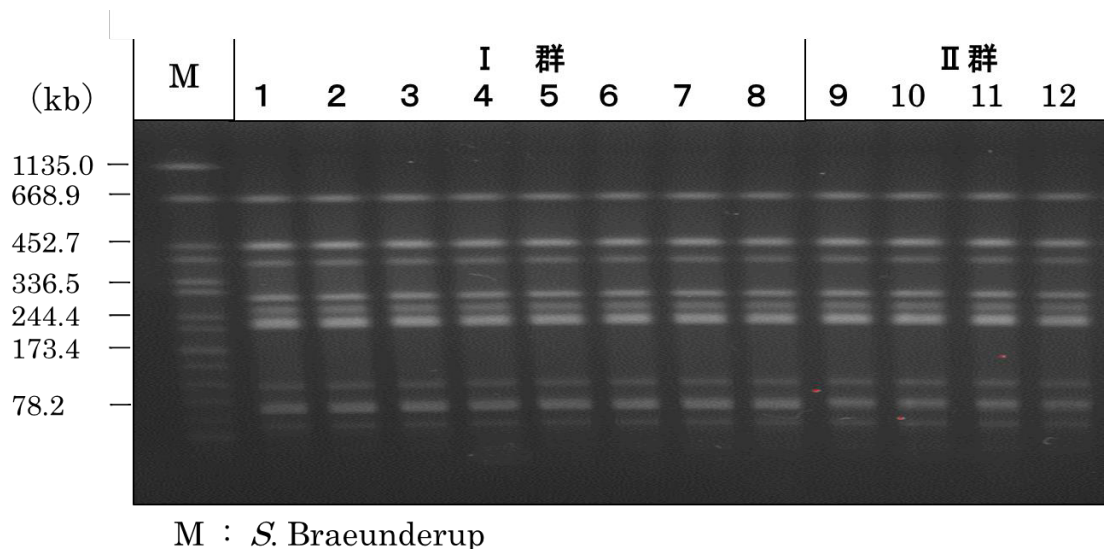


図 5 PFGE 像 (制限酵素 *Xba* I)

## III まとめ及び考察

今回、牛サルモネラ症発生事例において、同一個体より MLCB 培地での発育性状が異なる 2 種類の (O4:i:-) を分離した。分離株計 12 株は、CV 添加培養試験における発育抑制の有無により I 群及び II 群に分類した。I 群はキノロン系抗菌剤とコリスチンに耐性を示し、QRDR 変異と *mcr-1* の保有を認めた。一方、II 群はキノロン及びコリスチン感受性で、QRDR 変異及び *mcr-1* の保有は認めなかった。分子疫学的解析における PFGE パターン及び SNP 遺伝子型は、I 群及び II 群で同一であった (表 4)。

表 4 結果まとめ

グループ	分離箇所	性状		薬剤耐性		分子疫学的解析	
		CV存在下での 発育性	ERFX OBFX NA CL	QRDR 変異	<i>mcr-1</i>	PFGE	SNP
I 群	心臓	— ) ++	耐性	+	+	同一 パターン	9型
	肝臓						
	腎臓						
	脾臓						
	胸水						
	腹水						
II 群	盲腸内容物	++	感受性	—	—		
	結腸内容物						
	第四胃内容物						
	腸間膜リンパ節						
	空腸内容物						
	結腸内容物						

本事例では、I 群にキノロン及びコリスチン耐性獲得が認められた。キノロン耐性は、主に標的遺伝子である DNA ジャイレースをコードする *gyrA*、*gyrB* 及びトポイソメラーゼ IV をコードする *parC*、*parE* といった QRDR の遺伝子変異によって生じるとされており、PMQR 遺伝子もキノロン耐性の獲得に関係しているとされている [14,15]。また、コリスチン耐性は、染色体性、細胞膜性並びにプラスミド性の耐性機構がある [16]。今回、薬剤耐性の獲得について、キノロン系抗菌剤は、農場での使用歴があり、耐性菌選択圧の可能性が示唆された。しかし、コリスチンについては治療薬及び飼料添加剤として使用歴はなかった。

CV の濃度依存性に発育が抑制され、キノロン及びコリスチン耐性を持つ I 群の株は、主に臓器から分離され、CV 全濃度で発育良好でありキノロン及びコリスチン感受性の II 群の株は、主に腸管から分離される傾向にあった。菌株の体内分布と発育性状、薬剤感受性との関連性は不明であった。

SNP 遺伝子型別法は、ST 及び (O4:i:-) のゲノム上に存在する SNP に対して系統解析を行う事で 9 つの遺伝子型に分類し、各遺伝子型の特異的な SNP を特定、PCR により検出することで、簡便かつ再現性の高い遺伝子型別を行うことができる方法である。この SNP 遺伝子型別法と PFGE を組み合わせることで、より詳細な遺伝的背景の疫学的考察が可能となるとされている [17]。今回、PFGE パターン及び SNP 遺伝子型別において、両群が同一の結果を示したことから、全 12 株は同一由来株であり、発育性状の変化及び薬剤耐性獲得により、異なる 2 つの群に変化したと考えた。

サルモネラ防疫においては、本事例のように性状の異なる複数の株が関与している可能性を考慮し、選択性の異なる培地により複数の菌株を選択し、それぞれに薬剤感受性試験を実施することが重要であると再認識した。また、QRDR 変異と *mcr-1* を保有するキノロン及びコリスチン耐性 (O4:i:-) の管内への侵入を確認したため、薬剤耐性対策及びワンヘルスアプローチの観点から、抗菌剤の適正使用の啓発と指導が、家畜保健衛生所の役割として今後、より一層重要になると考えた。

## 引用文献

- [1] Ido,N : Characteristics of *Salmonella* enterica serovar 4,[5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium, PLoS One, 2014
- [2] 秋庭正人:平成 28 年度戦略的監視・診断体制整備推進事業(病原体(サルモネラ(4:i:-))の収集・解析委託事業調査報告書, 2017
- [3] 北海道:サルモネラ発生状況, 北海道事業成績, 2018
- [4] 農林水産省,サルモネラ(4:i:-)の取扱について, 2018
- [5] Fukuda M, et al. : Arch Virol, 157, 1063-1069, 2012
- [6] Tsunemitsu H : Arch Virol, 144, 167-175, 1999
- [7] Maluquer de Motes, C., et al. : Environ.Microbiol, 70, 1448-1454, 2004
- [8] T.Ito,N.Okada,S.Fukuyama : Virus Res, 126, 32-37, 2007
- [9] Vilcek, S., et al. : Arch. Virol, 136, 309-323, 1994
- [10] Cattoir V : Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France, J antimicrob Chemother, 59(4), 751-754, 2007
- [11] D J Griggs : Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* isolated from humans and animals, Antimicrob Agents Chemother, 40(4),1009-1013, 1996
- [12] Rebelo AR : Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes, Eurosurveillance, v.23 (6), 2018
- [13] Arai N : 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, J Clin Microbiol, 56(5), e01758-17, 2018
- [14] 吉田博明:細菌におけるキノロン耐性メカニズム, 日本細菌学雑誌, 51, 973-992, 1996
- [15] 平井敬二:キノロン系薬の作用機序と耐性機構研究の歴史, 日本化学療法学会雑誌, Vol.53, 349-356, 2005
- [16] Z.Aghapour : Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae, Infection and Drug Resistance, 12, 965-975, 2019
- [17] 農研機構:*Salmonella* Typhimurium の遺伝的背景を判定するための新しい型別法, 2018