

同一農場から分離された複数の薬剤耐性パターンを示す *Salmonella* Typhimurium の解析

菅原 克

福島県会津家畜保健衛生所 (〒 965-0077 福島県会津若松市高野町上高野字村前 90)

1. はじめに

牛における *Salmonella* Typhimurium 感染症は子牛のみならず搾乳牛においても、発熱、下痢などの症状を示し、重篤例では死に至る場合もある伝染性疾患である。また、*S. Typhimurium* は、サルモネラ属菌の中で代表的な人獣共通感染症原因菌として認識されており、さらに本菌の多剤耐性化が近年公衆衛生上問題視されている。*S. Typhimurium* の多剤耐性菌として代表的なものは、1990年代に流行した5薬剤（アンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、サルファ剤に耐性を示すフェージ型 DT104) があり [7]、近年には医療上重要薬剤なセフェム系薬剤に対する耐性増加が欧米諸国で報告されている [3]。

2007年11月、福島県において交雑種約300頭の牛を飼養する農場で発熱、下痢を主徴とする *S. Typhimurium* 感染症が発生した。その後、約3ヵ月にわたって同農場の発症牛および環境材料から分離した *S. Typhimurium* を用い一濃度ディスク法による薬剤感受性試験を実施した結果、5つの薬剤耐性パターンに分類され、そのうち3パターンは公衆衛生上重要なセフェム系薬剤についても耐性であった。薬剤感受性試験は、有効薬剤の選択に使用されるだけでなく、簡易に表現型を識別する方法として認識されている [1]。また、分離株を型別することは、農場内のサルモネラ浸潤状況、新たなサルモネラの農場内への侵入の確認、発生農場のサルモネラ清浄化などの防疫対策を実

施するうえで非常に重要である。

過去の福島県牛由来 *S. Typhimurium* 分離株の調査では、1農場につき一つの薬剤耐性パターンしか示さず、本事例のように同一農場で複数の耐性パターンを示す事例は皆無であった [12]。本稿の目的は、同一農場から分離された異なる薬剤耐性パターンを示す株を材料に、①農場内に複数株存在するのか、あるいは単一株から派生したものなのか、②単一株由来ならばどのように派生したのかを検証するため解析を実施した。

2. 材料と方法

使用菌株は、2007年11月から2008年2月に1農場から分離された異なる薬剤耐性パターンを示す *S. Typhimurium* 5株を用いた (表1)。

フェージ型別は、国立感染症研究所に依頼し、MIC測定による薬剤感受性試験はCLSI法に準拠した寒天平板希釈法 [10] によりABPC、セファゾリン (CEZ)、セフトロフル (CTF)、SM、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、TC、CP、トリメトプリム (TMP)、ナリジク酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX) の11薬剤について実施した。なお、各薬剤のブレイクポイントは以下の文献などの値を参考にした [6, 8, 11]。

プラスミドプロファイルおよびPFGEは常法により実施した。プラスミドサザンハイブリダイゼーションは各株のプラスミドDNAを抽出し、アガロースゲルにて電気泳動後、Roche社のマニュアル [5] に基づき実施した。

プラスミド伝達試験は、NA耐性である大腸菌

表 1 *S. Typhimurium* 分離株およびそのトランスコンジュガントのファージ型と薬剤耐性パターン

分離株 / トランスコンジュガント	ファージ型別	薬剤耐性パターン
19-1820	DT104	ABPC, SM, TC
19-1821	Untypable	ABPC, SM, KM, TC, CP,
19-1822	Untypable	ABPC, CEZ, CTF, SM, GM, TC, CP,
19-1823	Untypable	ABPC, CEZ, CTF, SM, KM, GM, TC, CP,
19-1824	Untypable	ABPC, CEZ, CTF, SM, KM, GM, TC, CP, TMP
ML/19-1822 ^{a)}	NT ^{b)}	ABPC, CEZ, SM, GM, TC, CP, NA
ML/19-1823 ^{a)}	NT	ABPC, CEZ, SM, KM, GM, TC, CP, NA
ML/19-1824 ^{a)}	NT	SM, TMP, NA
ML1410 ^{c)}	NT	NA

a) トランスコンジュガントの株名は、ML/ 親株とした

b) NT: 実施せず

c) レシピエント

ML1410 株をレシピエントとして用い、Akiba ら [2] の方法を基に実施した。なお、得られたトランスコンジュガントの株名はドナー株名の頭に ML/ を付けることとした (表 1)。

分離株およびトランスコンジュガントの PCR によるプラスミド型別、 β ラクタマーゼ型別および IncA/C プラスミド backbone 解析は、それぞれ Carattoli ら [4], Kojima ら [9] および Welch ら [13] の方法に従い実施した。

3. 結果

S. Typhimurium のファージ型別では 19-1820 株のみ DT104 と型別され、その他の 4 株はファージ型別不能 (untypable) であった (表 1)。

MIC 測定による薬剤感受性試験では、3~9 薬剤に耐性が認められ、5 株すべて異なる耐性パターンを示した (表 1)。また、19-1822 株、19-1823 株および 19-1824 株の 3 株では、第 3 世代セフェムである CTF についても耐性を示した。

プラスミドプロファイルにおいても 5 株すべてで異なるプロファイル像を示し、19-1820 株以外の株については、165kbp 以上の巨大プラスミドを含む 2 つ以上のプラスミドの保有が確認された (図 1)。

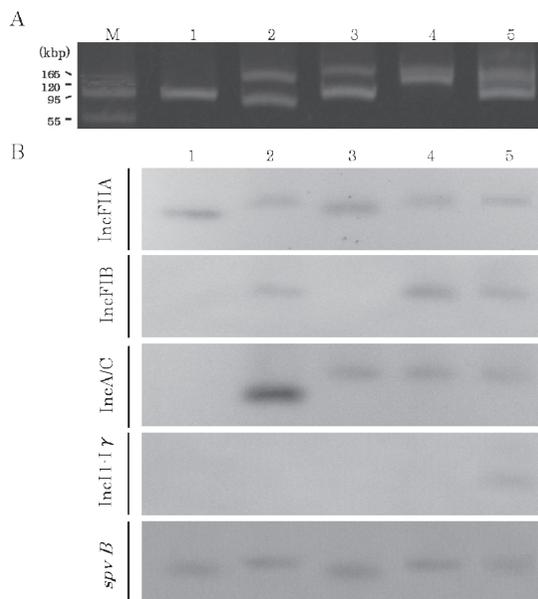


図 1 *S. Typhimurium* のプラスミド解析

A: プラスミドプロファイル, B: 図の横に示されている特異遺伝子プローブを用いたプラスミドサザンハイブリダイゼーション

M: BAC-Tracker Supercoiled DNA ladder, 1: 19-1820, 2: 19-1821, 3: 19-1822, 4: 19-1823, 5: 19-1824.

PFGE では *Xba*I, *Bln*I の両切断像において、19-1820 株以外の 4 株は非常に類似度の高い泳動像を示していた (図 2)。

分離株の β ラクタマーゼ型別では 19-1820 株、

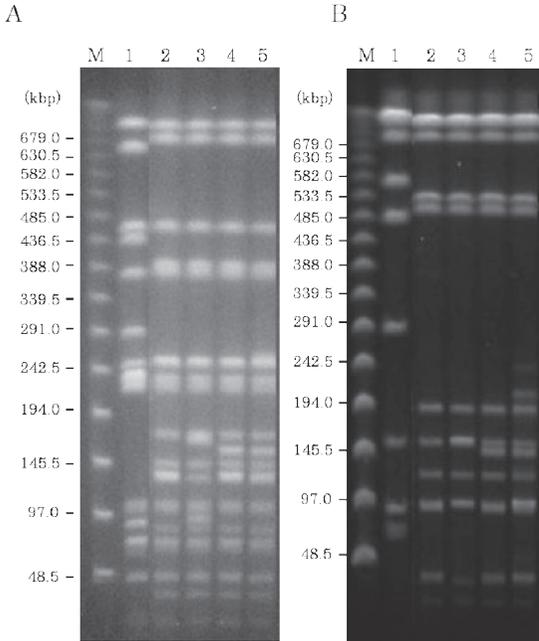


図 2 *S. Typhimurium* の制限酵素 *Xba*I (A) および *Bln*I (B) を用いた PFGE

M : DNA size marker, 1 : 19-1820, 2 : 19-1821, 3 : 19-1822, 4 : 19-1823, 5 : 19-1824.

19-1821 株および 19-1822 株でそれぞれ異なった遺伝子 *pse-1*, *tem-1* および *cmy-2* が PCR にて検出され、19-1823 株および 19-1824 株では *tem-1* と *cmy-2* の 2 つの遺伝子が検出された (表 2)。プラスミド型別では、IncFIIA がすべての株、IncA/C が 19-1820 株を除く 4 株、IncFIB が 19-1821 株、19-1823 株および 19-1824 株の 3 株、IncI-I γ が 19-1824 株のみで検出された (表 2)。また、IncA/C プラスミドを保有する 4 株で IncA/C backbone PCR を実施した結果、19-1821 株のみ 4 ~ 9 のプライマーセットで陰性を示し、その他の 4 株では 12 プライマーセットすべてで増幅産物が確認された (表 2)。

特異的遺伝子プローブを用いたプラスミドサザンハイブリダイゼーションを実施した結果、図 1 および表 3 に示したように、IncFIIA および *spvB* が 95kbp または 165kbp、IncA/C が 80kbp または 165kbp 以上、IncFIB が 165kbp、IncI-I γ が 95kbp プラスミドで特異的なシグナルが得られた。

大腸菌 ML1410 株をレシピエントとして用いたプラスミド伝達性試験では、19-1822 株、19-1823 株および 19-1824 株の 3 株でトランスコンジュガントが得られ、19-1820 株および 19-1821 株では得られなかった。得られたトランスコンジュガントを解析した結果、表 1 および表 2 のようになった。

表 2 *S. Typhimurium* 分離株およびそのトランスコンジュガントの β ラクタマーゼ型別、プラスミド型別および IncA/C backbone PCR

分離株 / トランスコンジュガント	β ラクタマーゼ 型別	プラスミド型別	IncA/C プラスミド backbone PCR ^{c)}														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
19-1820	<i>pse-1</i>	FIIA	NT ^{d)}														
19-1821	<i>tem-1</i>	FIB, FIIA, A/C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
19-1822	<i>cmy-2</i>	FIIA, A/C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
19-1823	<i>cmy-2, tem-1</i>	FIB, FIIA, A/C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
19-1824	<i>cmy-2, tem-1</i>	FIB, FIIA, A/C, I1-I γ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ML/19-1822 ^{a)}	<i>cmy-2</i>	A/C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ML/19-1823 ^{a)}	<i>cmy-2, tem-1</i>	FIB, A/C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ML/19-1824 ^{a)}	ND ^{b)}	I1-I γ	NT														
ML1410 ^{e)}	ND	ND	NT														

a) トランスコンジュガントの株名は、ML/ 親株とした

b) ND: 検出されず

c) IncA/C backbone PCR は Welch らの 12 のプライマーセットを用いた方法に従い実施した [12]

d) NT : 実施せず

e) レシピエント

表 3 S. Typhimurium 分離株のプラスミドサザンハイブリダイゼーション結果

分離株	プラスミドサイズ (Kbp)	プラスミド型別	<i>spvB</i>
19-1820	95	FIIA	+
19-1821	80	A/C	-
	165	FIB, FIIA	+
19-1822	95	FIIA	+
	165<	A/C	-
19-1823	165	FIB, FIIA	+
	165<	A/C	-
19-1824	95	I1-I γ	-
	165	FIB, FIIA	+
	165<	A/C	-

ML/19-1822 株では, β ラクタマーゼが *cmv-2*, プラスミドが *incA/C* と型別され, 薬剤耐性パターンは ABPC, CEZ, SM, GE, TC, CP, NA であり, ML/19-1823 株では, ML/19-1822 株の結果に β ラクタマーゼ, プラスミド型別, 薬剤耐性パターンがそれぞれ, *tem-1*, *incFIB*, KM 耐性が追加された結果となった。ML/19-1824 株では β ラクタマーゼが検出されず, プラスミド型別が *IncI1-I γ* , 薬剤耐性パターンは SM, TMP, NA となった。*IncA/C* プラスミドを持つ ML/19-1822 株および ML/19-1823 株の *IncA/C* backbone PCR では, 12 プライマーセットすべてで遺伝子の増幅が確認された (表 2)。なお, 19-1823 株および 19-1824 株をドナーとして用いた伝達性試験においても, ML/19-1822 株と同様の性状を示すトランスコンジュガントが分離された。

4. 考 察

今回解析した薬剤耐性パターンが異なる S. Typhimurium 5 株は, プラスミドプロファイルにおいてもすべて異なるパターンに型別された。一方, ファージ型別および PFGE 結果では 2 つのグループに分類され, 1 つはファージ型 DT104 が 1 株, もう一つはファージ型 untypable が 4 株であり, 後者の 4 株は PFGE では株間で非常に遺伝子的類似度が高い関係であることが示唆された。

ファージ型 untypable の 4 株は *IncA/C* プラス

ミドの保有が確認されたが, 19-1821 株の *incA/C* プラスミドのみ 80kbp であった。また, 19-1821 株の *IncA/C* プラスミドのみ自己伝達能がなく, *IncA/C* backbone PCR では, 一部のプライマーセットで増幅産物が確認されなかった。一方, 他の 3 株の *IncA/C* プラスミドは自己伝達能をもつ 165kbp 以上であり, *IncA/C* プラスミドのみ保有するトランスコンジュガントとともに, *IncA/C* backbone PCR のすべてのプライマーセットで増幅産物を認めた。また 165kbp 以上の *IncA/C* プラスミドにはセフェム系薬剤耐性に関与する *cmv-2* 遺伝子が規定され, 多くの薬剤に耐性を示していた。以上の結果から, サイズの異なる *IncA/C* プラスミドは何らかの原因により, *cmv-2* や自己伝達能に関する遺伝子などが脱落し, 80kbp となったことが示唆された。また, 今回解析した *IncA/C* プラスミドは Welch ら [13] が解析した *Salmonella* Newport 由来 *IncA/C* プラスミドと近縁であり, セフェム系を含む多くの薬剤耐性に関与する自己伝達性プラスミドであるが, 一部の遺伝子が脱落したと示唆された株も検出されたことから, 遺伝子的に不安定なプラスミドであることが推察された。

19-1822 株が他のファージ型 untypable の 3 株と異なる点は, KM 感受性であること, *tem-1* および *IncFIB* プラスミドが検出されなかったことであった。また, *IncA/C* および *IncFIB* プラスミドを保有する ML/19-1823 株は, *IncA/C* プラス

ミドのみ保有する ML/19-1822 株と比べて *tem-1* と KM 耐性が追加されていた。以上の結果から、IncFIB プラスミドは *tem-1* および KM 耐性に関する遺伝子が規定されていると推察された。

19-1824 株では、他のファージ型 untypable の 3 株で検出されなかった 95kbp の IncI1-I γ プラスミドを保有しており、このプラスミドは、伝達性試験によって、TMP 耐性に関する自己伝達性プラスミドであることが示唆された。

以上の結果から、分離株が得られた農場には、ファージ型 DT104 と untypable の 2 つの株が流行していたことが示された。また、ファージ型 untypable の 4 株は① IncA/C プラスミド、② IncFIB プラスミド、③ IncI1-I γ の 3 つのプラスミドの獲得もしくは脱落という変化により、薬剤耐性やプラスミドプロファイルがそれぞれ 4 つに型別されたことが示唆された。多剤耐性に関する自己伝達性プラスミドやセフェム系薬剤耐性遺伝子の流布は、公衆衛生上非常に重要であり、今後ともこれらの動向をモニタリングなどで注意深く見守る必要がある。

5. 謝 辞

ファージ型別を実施して頂いた国立感染症研究所の泉谷秀昌先生ならびに多大な御助言、技術指導を賜りました(独)農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所の秋庭正人先生に深謝します。

要 約

福島県の一肉牛農場において、*Salmonella* Typhimurium 感染症が発生した。薬剤感受性試験の結果、*S. Typhimurium* 分離株は異なる 5 つの薬剤耐性パターンを示した。これらの分離株の疫学的関連性を明らかとするために、それぞれの耐性パターンを示す代表的な 5 株について、表現型別および遺伝学的手法により解析した。ファージ型別の結果、1 株は DT104 であり、残り 4 株は型別不能であった。また、後者の 4 株は、IncA/C、IncFIB、IncI1-I γ プラスミドの多様なプ

ロファイルを持っており、このことが異なる耐性パターンを示す理由であるかもしれない。

引用文献

- 1) Adaska JM, Silva JA, Berge ACB, Sischo WM: Genetic and phenotypic variability among *Salmonella enteric* serovar Typhimurium isolates from California dairy cattle and humans. *Appl Environ Microbiol*, 72, 6632-6637 (2006)
- 2) Akiba M, Nakaoka Y, Kida M, Ishioka Y, Sameshima T, Yoshii N, Nakazawa M, Uchida I, Terakado N: Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Salmonella enterica* serovar Dublin isolated from cattle in Japan from 1976 to 2005. *J Antimicrob Chemother*, 60, 1235-1242 (2007)
- 3) Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckaert A, Mulvey MR, White DG: *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes Infect*, 8, 1945-1954 (2006)
- 4) Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ: Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 63, 219-228 (2005)
- 5) DIG アプリケーションマニュアル For Filter Hybridization, Roche
- 6) Esaki H, Morioka A, Ishihara K, Kojima A, Shiroki S, Tamura Y, Takahashi T: Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J Antimicrob Chemother*, 53, 266-270 (2004)
- 7) Helms M, Ethelberg S, Mølbak K, DT104 Study Group: International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis*, 11, 859-867 (2005)
- 8) Ishihara K, Takahashi T, Morioka A, Kojima A, Kijima M, Asai T, Tamura Y: National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand*, 51: 35, 1-5 (2009)

- 9) Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K: Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 3533-3537 (2005)
- 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals-second edition: Approved Standard M31-A2, Wayne, PA, USA. (2001)
- 11) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Thirteen Informational Supplement M100-S13, Wayne, PA, USA. Natio (2003)
- 12) 菅原 克, 千葉 正, 荻野 隆明, 伊藤 等, 今田由美子: 福島県で分離された牛由来 *Salmonella* Typhimurium の分子疫学的解析. *日獣会誌*, 59, 820-825 (2006)
- 13) Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, Rahalison L, Leclerc JE, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J: Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk, *PLoS ONE*, 2, e309 (2007)

Analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium with Different Antimicrobial Resistance Patterns Isolated from a Farm

Masaru SUGAWARA

*Fukushima Prefecture Aizu Livestock Hygiene Service Center,
90 Muramae, Kamikoya, Koyamachi, Aizuwakamatsu, Fukushima 965-0077, Japan*

An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection occurred on a beef cattle farm in Fukushima prefecture. By antimicrobial susceptibility testing, the *S. Typhimurium* isolates exhibited five different resistance patterns. To clarify epidemiological relatedness among the isolates, five representatives from isolates with each resistance pattern were further analyzed by phenotypic and genetic techniques. Phage typing revealed that one strain was DT104, whereas the remaining four strains were untypable. In addition, the four untypable strains had varied profiles of IncA/C, IncFIB and IncI1-I γ plasmids, which may be reason of different resistance patterns among these strains.

討 論 (座長: 江口正志, 畜安研)

質問 (江口正志, 畜安研)

セフェム耐性 *S. Typhimurium* が分離された同一農場から, 5種類の薬剤感受性パターンが見つかったが, それらのパターンを示す株の分離時期は。

答 (菅原 克)

19-1821, 19-1822, 19-1823の3株と同様の薬剤耐性パターンを示す株は, 初発時の牛サルモネラ症発症牛6頭程度の材料(糞便, 消化管内容物, 臓器)

から分離された。

質問 (藤倉孝夫, 動物衛生研究所 OB)

① *S. Typhimurium* は人獣共通感染症の菌の1つだが, 人に異常はでなかったか。

② *S. Typhimurium* で人に変な下痢を引き起こしたことがあったと聞いている。遺伝子型を比較すると人から分離されたものと, 牛から分離されたものが別だという話で, 感染源が違うのではこのこ

とだった。先生の成績かどうか。

答 (菅原 克)

- ①人に異常があったとは聞いていない。
- ②当時の遺伝子型解析の方法がよく分からないので何ともいえない。感染源が違う可能性はある。

質問 (藤本修平, 東海大)

FIIA, FIB プラスミドのマップ上に、コ・インテグレイトを作り易いようなものはありますか。

答 (菅原 克)

そこまでは調べていません。A/C プラスミドはコ・インテグレイトされていない。

質問 (藤本修平, 東海大)

コインテグレイトはよくあることですか。

答 (菅原 克)

もともと S, Typhimurium の 95kbp 病原性プラスミドは FIIA と FIB がコ・インテグレイトされているプラスミドだが、今回報告した FIB プラスミドは検査結果から異なったタイプの薬剤耐性遺伝子が規定されている R プラスミドであると考えます。

質問 (藤本修平, 東海大)

報告はありますか。

答 (菅原 克)

私が調べた限りは同様のプラスミドの報告はない。

質問 (藤本修平, 東海大)

IncFIB と IncFIIA が同時に検出された 165kb プラスミドは、2つのプラスミドが融合したものか。そのプラスミド上には IS などの動く遺伝子は存在するのか。

発言 (秋庭正人, 動衛研)

S, Typhimurium の病原性プラスミド (95b) には、

IncFIB と IncFIIA が存在することが知られている。

165kb プラスミドが IncFIB プラスミドと IncF II A プラスミドの融合したものであるかは不明である。IncA/C プラスミド pSN254 にはトランスポゾン (IS26) が 4 コピー存在することが知られており、本研究における IncA/C プラスミドのサイズ低下が IS26 を介した一部領域の脱落に基づく可能性は考えられる。

発言 (菅原 克)

病原性プラスミドにのっている FIB は PCR では検出されないが、報告した 165kbp プラスミドは FIIA とともに FIB についても PCR とサザンハイブリで検出された。病原性プラスミドに存在する FIB プラスミドとは異なる FIB・R プラスミドが、コ・インテグレイトされたのではないか。

質問 (江寄英剛, 畜安研)

- ① ST が分離された農場において、過去に第 3 世代セフェム系抗菌剤の使用歴はあったか。
- ②最近、第 3 世代セフェムに対する耐性の増加傾向を指摘していたが、CTF に関して、最近、趾間ふらんにも使用できるようになったと思うが、その点との関連性についての意見を聞きたい。

答 (菅原 克)

- ①今回の農場では第 3 世代セフェムは使っていない。診断以前に第 2 世代セフェムは使っていた。診断を受けてからの治療は、薬剤感受性試験の結果に基づいて投薬したので、セフェムは使っていない。
- ②関連性は不明である。