

表2. SEの家畜種別薬剤耐性率(%)

薬剤	Cattle (n=16)	Goat (n=2)	Pig (n=2)	Poultry (n=38)	合計 (n=58)
ABPC	12.5	0	50	5.3	8.6
DSM	31.3	100	0	55.3	48.3
GM	6.3	0	0	0	1.7
KM	6.3	0	0	0	1.7
OTC	18.8	0	0	7.9	10.3
CP	18.8	0	0	2.6	6.9
TMP	0	0	50	0	1.7

表3. SEの年次別耐性パターン

Resistance pattern	1976~1982		1989~1999		2000~2004			Total
	cattle	pig	cattle	poultry	cattle	goat	pig	
ABPC-DSM-KM-OTC-CP	1							1
ABPC-DSM-OTC-CP	1							1
DSM-OTC-CP	1							1
ABPC-DSM				1				1
ABPC-TMP							1	1
DSM-OTC				2				2
DSM-CP							1	1
ABPC							1	1
DSM			1	10	1	2	7	21
GM					1			1
Susceptible	3	1	2	4	5		12	27

図2. 家畜種別カンピロバクター分離率

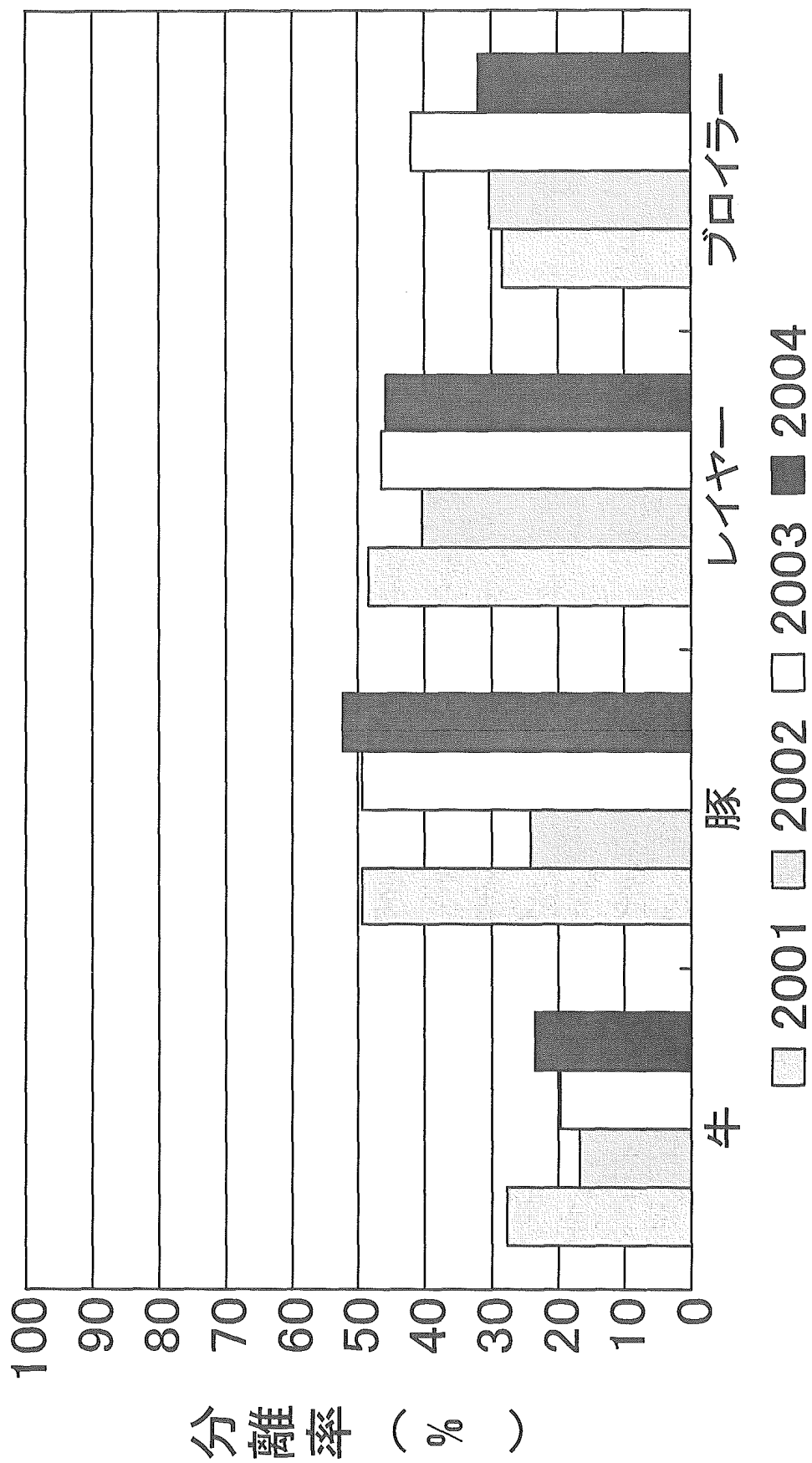
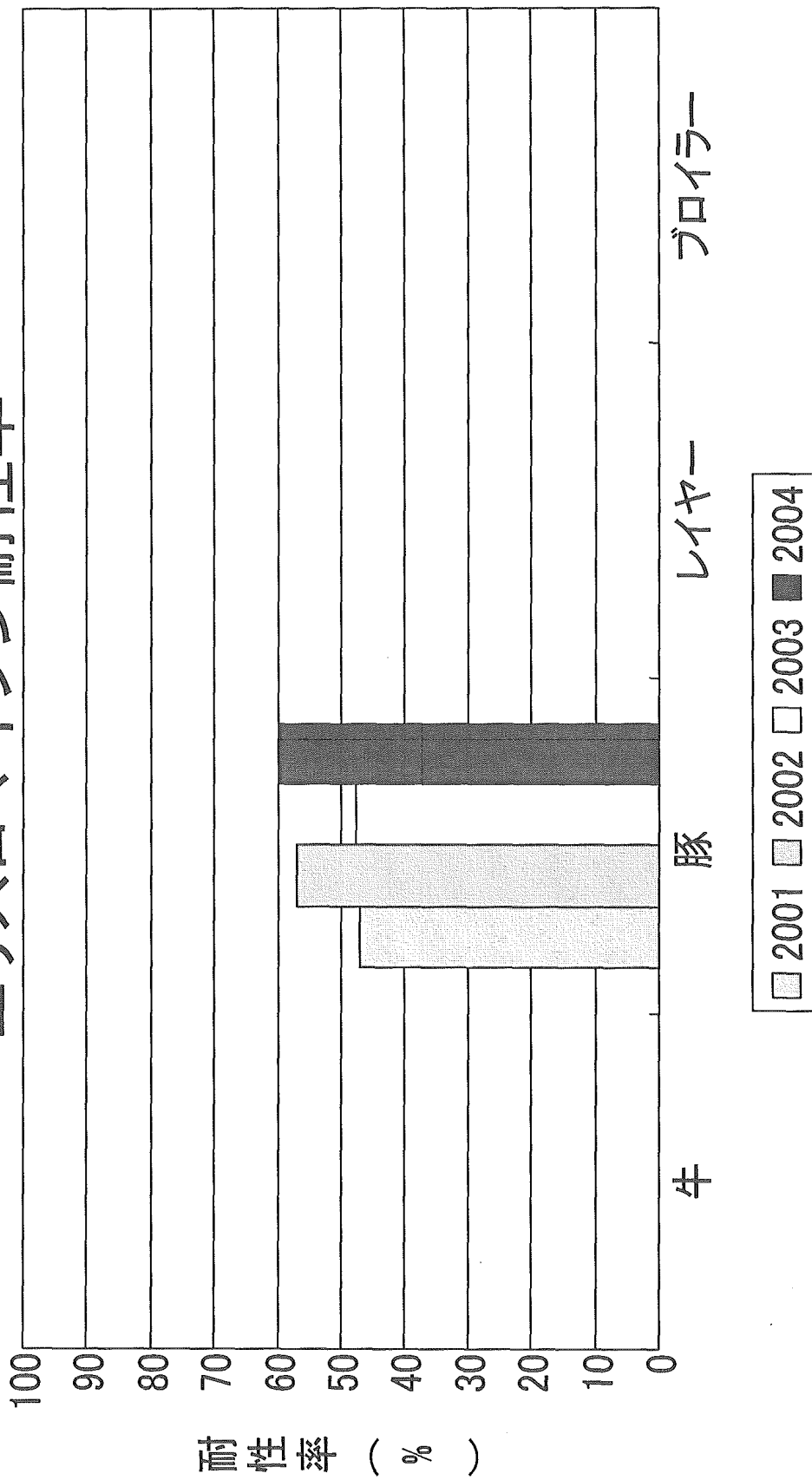
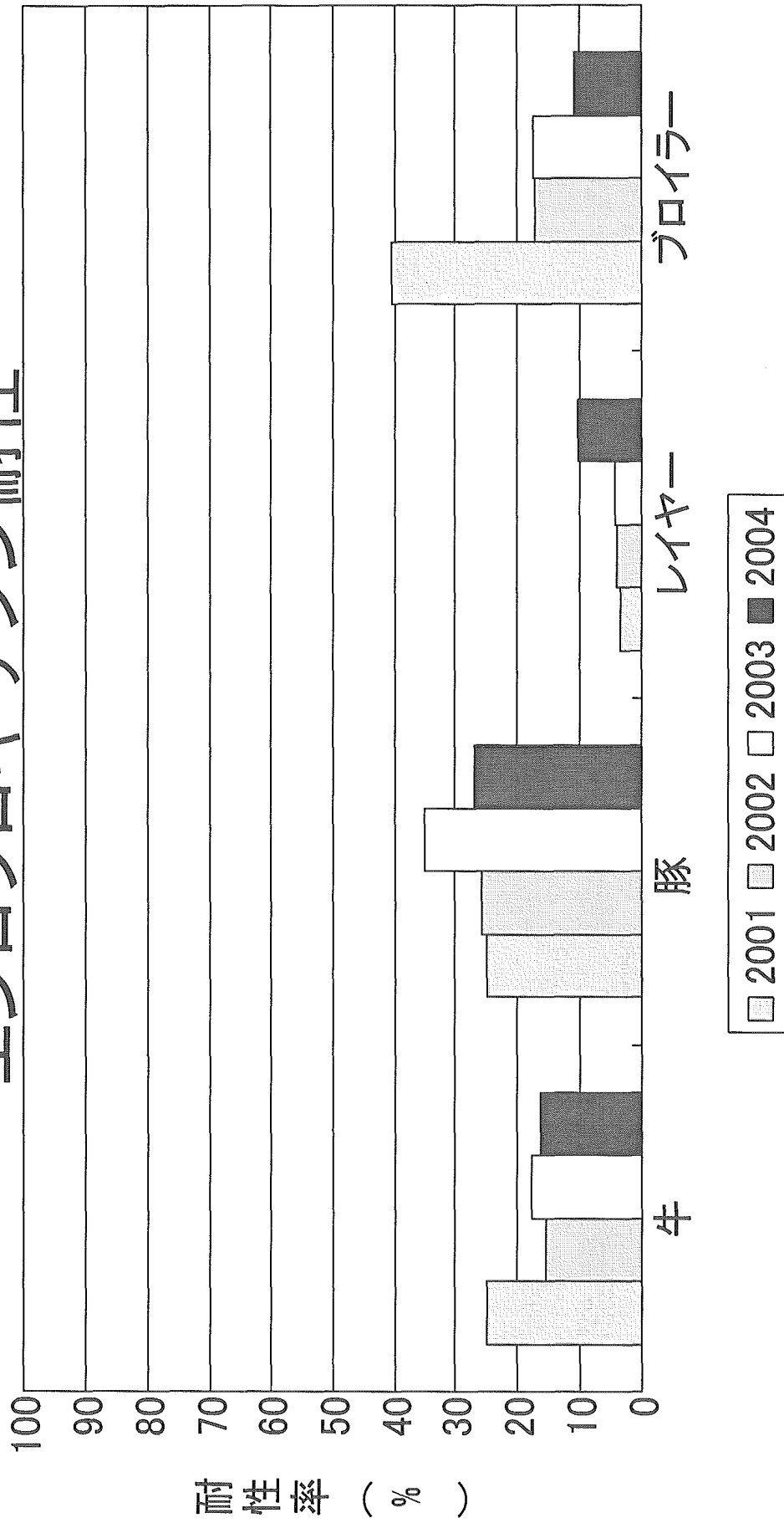


図3. カンピロバクターの家畜種別
エリスロマイシン耐性率



*牛、レイヤーおよびブロイラーは*C. jejuni*、豚由来は*C. coli*を示した。

図4. カンピロバクターの家畜種別
エンロフロキサシン耐性



*牛、レイヤーおよびブロイラーは*C. jejuni*、豚由来は*C. coli*を示した。

図5. カンピロバクターの薬剤耐性率(菌種・年次別)

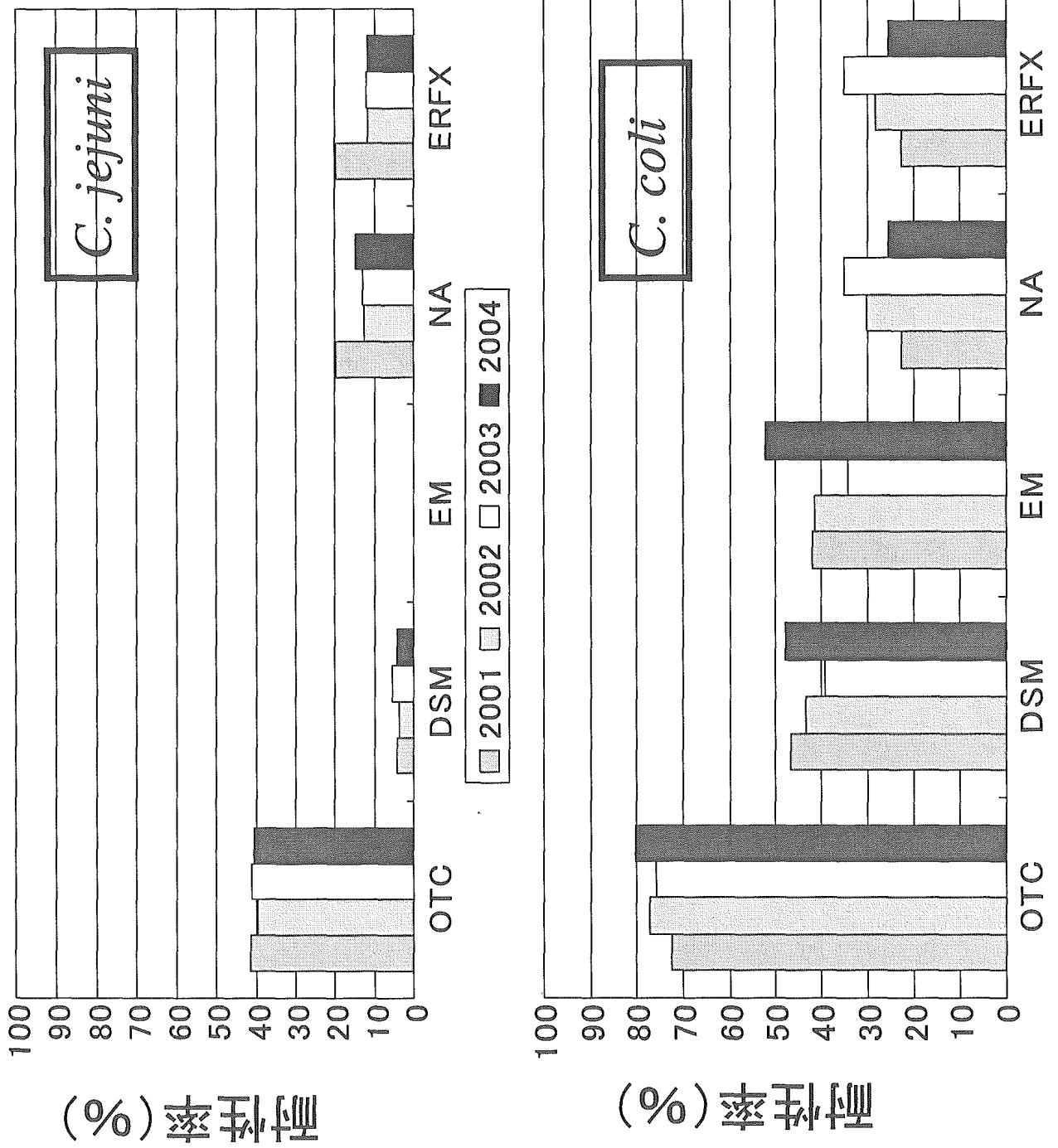


図6. 実験プロトコール

材料

2004年にJVARMにより分離された豚由来 *C. coli* 72株

方法

・Vacherà (2003)の方法によるPCR-RFLPによる点変異の検出

The peptidyl-encoding region in domain V of the 23S rRNA gene

2066	2075	2066	2075
CAAGACGGAA	→	CAAGACGGCA	2075
		CAAGACGGAG	} 当該変異の検出
		CAAGACGGCG	

・薬剤感受性試験

- 14員環マクロライド: EM
- 15員環マクロライド: アジスロマイシン (AZM)
ツラスロマイシン (TLM)
- 16員環マクロライド: タイロシン (TS)
リンコマイシン (LCM)

表4. EM耐性*C. coli*の遺伝子変異検出結果

No. of isolates	Susceptibility to EM	23S rRNA gene mutation				MIC (mg/L)			
		2074	2075	AZM (15)	TLM (15)	TS (16)	LCM		
44	Resistance	WT	A->G	512->512	64->128	128->512	128->512	128->512	
28	Susceptible	WT	WT	0.25-2	0.5-4	2-32	4-64	4-64	

WT; wild type. 括弧内の数はマクロライド系薬剤の員環数を示す

平成 17 年度厚生労働省食品安全確保研究事業分担研究報告書

分担課題名：家畜由来 *Salmonella* Typhimurium の多剤耐性化の誘因及び耐性化機構の解明

分担研究者	中澤宗生	農業・生物系特定産業技術研究機構	動物衛生研究所
協力研究者	秋庭正人	農業・生物系特定産業技術研究機構	動物衛生研究所
協力研究者	鮫島俊哉	農林水産省	動物医薬品検査所
協力研究者	吉井紀代	農業・生物系特定産業技術研究機構	動物衛生研究所

研究要旨

Salmonella genomic island 1 (SGI1) は *S. Typhimurium* DT104 の多剤耐性を規定する染色体上の 43 kb の領域として初めて報告された。SGI1 は部位特異的挿入により他のサルモネラに水平伝播することが示唆されている。我々は国内外で分離された *S. Derby* に SGI1 を保有する例を見いだし、その構造を解析したところ、SGI1-A、C、及び I の 3 バリエントを確認した。パルスフィールドゲル電気泳動によるゲノム DNA の制限酵素断片長多型解析と SGI1 挿入部位前後の塩基配列比較の結果から、SGI1 保有 SD には、少なくとも 2 つの遺伝的系統が存在することが明らかとなった。これまで SGI1 は 10 を超える血清型で、その存在が報告されている。加えて一つの血清型の SGI1 保有株にも複数の遺伝的系統が存在することは、SGI1 の拡散に部位特異的水平伝播が重要な役割を演じていることを示唆している。SGI1 の獲得はサルモネラが多剤耐性化につながることから、今後は国内のサルモネラにおける SGI1 の保有状況を継続的に監視していく必要がある。

A. 研究目的

サルモネラは食中毒の主要原因菌の一つとして注目されているが、なかでも *S. Typhimurium* (ST) は牛サルモネラ症の主要血清型でもあり、家畜衛生、公衆衛生の両観点から重要視されている。特に 1990 年代に侵入した多剤耐性 ST DT104 はわが国の畜産経営に深刻な経済的被害をもたらした。ST DT104 の多剤耐性は主に染色体上に存在する *Salmonella*

genomic island 1 (SGI1) と呼ばれる 43 kb の領域に規定されている。SGI1 上にはストレプトマイシン (SM)、サルファ剤、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、アンピシリン (ABPC) 等に対する耐性遺伝子を含む複雑な構造のクラス 1 インテグロンが存在している。

今回、我々は豚等の家畜が保菌し、ときにヒト食中毒の原因ともなる *S. Derby* (SD) が SGI1 を保有する例を見いだした。

そこで、わが国で分離された SD における SGI1 の浸潤状況や SGI1 獲得による多剤耐性化機構の一端を明らかにする目的で、今年度は SD における SGI1 の分布調査と、これまでに得られた SD 株の SGI1 構造解析を行った。

B. 研究方法

1) 供試菌株

SGI1 の構造解析に用いた株を表 1 に示した。この他、1976 年から 2001 年に国内の家畜から分離された血清型 Derby、23 株を SGI1 のスクリーニングに供した。

2) 薬剤感受性試験

日本 BD 社のセンシディスクを用いて、NCCLS に準拠した方法で耐性度を判定した。供試抗菌剤としてアンピシリン 10、セファゾリン 30、セフトリアキソン 30、クロラムフェニコール 30、カナマイシン 30、ストレプトマイシン 10、テトラサイクリン 30、スルファメチゾール 250 (TH)、SXT、ナリジクス酸 30、シプロフロキサシン 5、オフロキサシン 5 ノルフロキサシン 10、ホスホマイシン 50 の 14 薬剤を選択した。

3) PCR 法によるインテグロン関連遺伝子の検索

供試した菌株がクラス 1 及び 2 インテグロンを保有するか否かを調べるため、Barlow らの方法 (Antimicrob. Agents. Chemother. 48: 838-42, 2004) にしたがって PCR を実施した。クラス 1 インテグロンの検出にはプライマー

HS 463a:

5' -CTGGATTCGATCACGGCACG-3'

HS464:

5' -ACATGCGTGAAATCATCGTCG-3'

を、クラス 2 インテグロンの検出にはプライマー

RB 201:

5' -GCAAACGCAAGCATTTCATTA-3'

RB 202:

5' -ACGGATATGCGACAAAAAGG-3'

を用いた。インテグロン陽性の株については、次に薬剤耐性遺伝子の挿入部位、いわゆる可変領域を増幅するため、Zhao らの方法 (J. Clin. Microbiol. 41: 5366-71, 2003) にしたがって PCR を実施した。プライマーは

5' -CS:

5' -GGCATCCAAGCACAAGC-3'

3' -CS:

5' -AAGCAGACTTGACTGAT-3'

を用いた。増幅産物を精製後、DNA シークエンサーを用いて、その塩基配列を決定した。

4) PCR マッピングによる SGI1 の同定

SGI1 の構造を明らかにするため、Doublet ら (Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2510-7, 2004) の方法にしたがって PCR マッピングを実施した。用いたプライマーを表 2 に示した。得られた増幅産物の一部は塩基配列を決定し、遺伝子構造を確認した。

5) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) によるゲノム DNA の制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析

Akiba らの方法 (Vet. Microbiol. 92:

379-88, 2003) にしたがって菌のゲノム DNA を包埋したプラグを作製し、それらを制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I で消化後、PFGE を行った。泳動条件は 6V、14℃、ランプ時間 5-50 秒、22 時間とした。BioNumericsRソフトウェア (インフォコム(株)扱い) を用いて泳動像のクラスター解析を実施した。

C. 結果

1) SGI1 バリエーションの同定

薬剤感受性試験の結果、W4、W5、W11、及び W12 株は ABPC、CP、SM、TH、TC、SXT の 6 剤に耐性であった。W7 株は SM、TH に耐性を示した。

そこで、これらの多剤耐性にインテグロンが関与しているかどうか明らかにする目的で、Barlow ら (2004) の方法による PCR を実施した。その結果、これらの株でクラス 1 インテグロンの存在を示唆する成績が得られたので、次に Zhao ら (2003) の方法による PCR でインテグロン可変領域を増幅した。6 剤耐性を示した W4、W5、W11、及び W12 株では 1.2 kb と 1.0 kb の増幅が、W7 では 1.0 kb の増幅のみ認められた。これらの増幅産物の塩基配列を決定したところ、1.2 kb の増幅産物には *pse-1* と呼ばれる ABPC 耐性遺伝子が、1.0 kb の増幅産物には *aadA2* と呼ばれる SM/スペクチノマイシン耐性遺伝子が存在することが明らかとなった。

以上の成績は ST 等の SGI1 保有株の特徴と一致している。そこで、これらの株が SGI1 を保有しているか否かを明らかにする目的で Doublet ら (2004) の方法による PCR マッピングを行った。その結

果、W4、W5、W11、及び W12 株では SGI1-A を、W7 株では SGI1-C と呼ばれる SGI1 バリエーションを保有することが明らかとなった (図 1)。

以上の株は全てベトナム・メコンデルタ地域の水系から分離したものである。わが国の家畜から分離される SD に SGI1 保有株が存在するかどうかを明らかにするために、1976 年から 2001 年に分離された 23 株を用いて、同様の手法で SGI1 のスクリーニングと PCR マッピングを行ったところ、L-2275 株が CP、SM、TH、TC、SXT に耐性を示し、SGI1-I と呼ばれるバリエーションを保有することが明らかとなった。

2) PFGE によるゲノム DNA の RFLP 解析

SGI1 保有 SD 株の関連を明らかにする目的で PFGE を行った。半径 500 m 以内の近接した水系において同日に採材した水サンプルから分離された W4、W5、W7、W11、及び W12 株のうち、SGI1-A を保有する W4、W5、W11、及び W12 株の泳動像は互いに類似度が高かった (図 2)。W7 株と上記 4 株の泳動像を比較すると、制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I のいずれを用いた場合も、異なるバンドの数は 10 本以上認められ、由来が異なる可能性が考えられた (図 2)。一方、国内の豚から 1994 年に分離された SGI1-I 保有株である L-2275 の泳動像は、W7 株のそれと極めて類似度が高かった (図 2)。

3) SGI1 挿入部位前後の塩基配列の比較

SGI1 保有 SD 株の関連を明らかにする目的で、SGI1 挿入部位前後、計 359 bp

の塩基配列を比較した。SGI1-Aを保有するW4、W5、W11、及びW12株の塩基配列は全て同一であった。SGI1-Cを保有するW7株の塩基配列はSGI1-Iを保有するL-2275株のそれと同一であったが、SGI1-A株のそれとは6塩基(図3の-91、15、25、40、117、191番目塩基)異なっていた。

D. 考察

Levingsら(J. Bacteriol. 187: 4401-9, 2005)はマレーシアで感染したと考えられるサルモネラ症患者からSDを分離し、その株がSGI1-Iを保有することを報告した。これがSGI1保有SDに関する初めての報告である。我々は本研究においてSGI1-AとCを保有するSDを初めて見いだした。また、国内の豚から1994年に分離されたSDがSGI1-Iを保有することを見いだした。

Boydら(Antimicrob. Agents Chemother. 46: 1714-22, 2002)はSGI1バリエーション派生機構について興味深い仮説を提唱している。SGI1の多剤耐性を規定する領域はIn4ファミリーに属する一つのインテグロンと考えることができるが、その構造内に典型的なクラス1インテグロン構造を2つ有しており、塩基配列の相同な領域が存在する。これらの配列間における相同組換えにより、SGI1の一部が欠失しバリエーションが派生し得るといえる。この仮説に従えばSGI1-CはSGI1-Aから派生したものと考えられることができる。

本研究で供試したSGI1-Aを保有す

るW4、W5、W11、及びW12株、及びSGI1-Cを保有するW7株は、半径500m以内の近接した水系において同日に採材した水サンプルから分離された株であることから、SGI1-Cを保有するW7株は、この地域に存在したSGI1-A保有株から派生した可能性が考えられた。その場合、SGI1内に存在する2カ所の*qacEΔ1/sul1*間で相同組換えを起こし、その間に存在する遺伝子群が欠失することになる。その領域には一つの*Xba*I切断部位が存在するが、*Bln*I切断部位は存在しない(Accession No. AF261825)。したがってW7株がW4、W5、W11、及びW12といったSGI1-A保有株から派生したものであれば、いずれの制限酵素で消化後にPFGEを行っても、両者の間で異なるバンドの数は3本以下となるはずである(Tenoverら, J. Clin. Microbiol. 33: 2233-9, 1995)。しかしながら、本研究では両者の間で異なるバンドの数は、いずれの酵素を用いた場合でも10本以上認められ、関連性の乏しい株であることが示唆された。

一方、SGI1は異なる株間で部位特異的に水平伝播することが実験的に証明されている(Doubletら, Mol. Microbiol. 55: 1911-24, 2005)。もしW7がSGI1-A保有株から派生したものであれば、SGI1挿入部前後の塩基配列に相違はないと考えられるが、逆にW7株がSGI1-A保有株から派生したものでなく、異なるSGI1水平伝播に由来する場合は、SGI1挿入部前後の塩基配列に相違が認められる可能性がある。そこでPCRマッピングで増幅した左接合部と右接合部の塩基配列を上記の株間で比較したところ、SGI1-Cを保有

する W7 株の塩基配列は SGI1-I を保有する L-2275 株のそれと同一であったが、SGI1-A 株のそれとは 6 塩基異なっていた。したがって W7 株の SGI1-C は W4、W5、W11、W12 の SGI1-A とは異なる水平伝播に由来するものと考えられた。W7 株は SGI1-I を保有する L-2275 株と近縁度が高く、SGI1 を保有する SD には少なくとも 2 つの遺伝的系統が存在するものと考えられた。

E. 結論

半径 500 m 以内の近接した水系において、同日に採材した水サンプルから分離された SD に認められた SGI-A 及び C は、異なる SGI1 水平伝播に由来することが示唆された。SGI1-C 保有株は疫学的関連のない SGI1-I 保有株と近縁で、SGI1 を保有する SD には少なくとも 2 つの遺伝的系統が存在するものと考えられた。

ST DT104 では単一のクローンが世界中に拡散したと考えられており、その過程で相同組換え等の機構により SGI1 バリエーションが派生したと考えられる。一方、現在では 10 を超える血清型で SGI1 の保有例が報告されている。加えて我々が示したように、一つの血清型における SGI1 保有株でも複数の遺伝的系統が存在する可能性があることは、SGI1 の拡散に部位特

異的水平伝播が重要な役割を演じていることを示唆している。SGI1 の獲得はサルモネラの多剤耐性化につながることから、今後は国内のサルモネラにおける SGI1 の保有状況を継続的に監視していく必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(和文発表)

1. 秋庭正人、TRAN Thi Phan、LY Thi Lien Khai、林谷秀樹、鮫島俊哉、伊藤博哉、吉井紀代、中澤宗生. 2005. メコンデルタ水系からのサルモネラ分離と分離菌の性状解析. 獣医畜産新報. 58(4): 331-332.

2. 秋庭正人、吉井紀代、中澤宗生. 2006. 牛由来サルモネラの薬剤耐性に関する最近の知見. 臨床獣医. 24(3): 20-26.

(学会発表)

1. 秋庭正人、中村耕太郎、篠田ダビデ、吉井紀代、伊藤博哉、内田郁夫、中澤宗生. 2005. *Salmonella* Derby に認められた *Salmonella* genomic island 1 の構造解析. 第 140 回日本獣医学会学術集会. 2005 年 9 月 29 日. 鹿児島.

表 1. 供試菌株

株名	サンプル	分離国	分離年	薬剤耐性型 ^a	SGI1 ^b 構造
W4, 5, 11, 12	池水	ベトナム	2001	ACSSuTTm	SGI1-A
W7	池水	ベトナム	2001	SSu	SGI1-C
437	豚糞便	ベトナム	2000	TN	ND ^c
454	豚糞便	ベトナム	2000	STN	ND
L-2275	豚糞便	日本	1994	CSSuTTm	SGI1-I

^aA, アンピシリン; C, クロラムフェニコール; S, ストレプトマイシン; Su, スルファメチゾール;

T, テトラサイクリン; Tm, トリメトプリム; N, ナリジクス酸

^bSGI1, *Salmonella* genomic island 1

^cND, 検出できず

表2. PCR マッピングに用いたプライマー

増幅 ^a	プライマー	遺伝子	サイズ	塩基配列 (5' →3')
左接合部	U7-L12	<i>thdF</i>	500	ACACCTTGAGCAGGGCAAAG
	LJ-R1	<i>int</i>		AGTTCTAAAGGTTTCGTAGTCG
右接合部	104-RJ	S044	500	TGACGAGCTGAAGCGAATTG
	104-D	<i>yidY</i>		ACCAGGGCAAAACTACACAG
A	int1	<i>int I 1</i>	1,135	GCTCTCGGGTAACATCAAGG
	aad	<i>aadA2</i>		GACCTACCAAGGCAACGCTA
B	sulTER	<i>sul Δ 1</i>	942	AAGGATTCCTGACCCTG
	F3	<i>floR</i>		AAAGGAGCCATCAGCAGCAG
C	F4	<i>floR</i>	598	TTCCTCACCTTCATCCTACC
	F6	<i>tetR</i>		TTGGAACAGACGGCATGG
D	tetR	<i>tetR</i>	1,559	GCCGTCCCATAAGAGAGCA
	tetA	<i>tet(G)</i>		GAAGTTGCGAATGGTCTGCG
E	int2	<i>groEL- int I 1</i>	1,338	TTCTGGTCTTCGTTGATGCC
	psel	<i>pse-1</i>		CATCATTTTCGCTCTGCCATT
F	Forf513	<i>orf513</i>	2,144	GCAGCACTACCCAGCCTTCA
	dfrA10-B	<i>dfrA10</i>		AACCAACACCACCAATGACA
G	dfrA10-A	<i>dfrA10</i>	1,269	TGTCATTGGTGGTGTGGTT
	Rsul1	<i>sul1</i>		CGACACCGAGACCAATAGCG
H	int1	<i>int I 1</i>	3,710	GCTCTCGGGTAACATCAAGG
	4142R	<i>orf6</i>		AAGCTCCGCCGTTAATCC
I	S36F2	<i>orf2</i>	4,357	TCTACCAACGCGTACAGCAG
	4142R	<i>orf6</i>		AAGCTCCGCCGTTAATCC

^a 図1参照

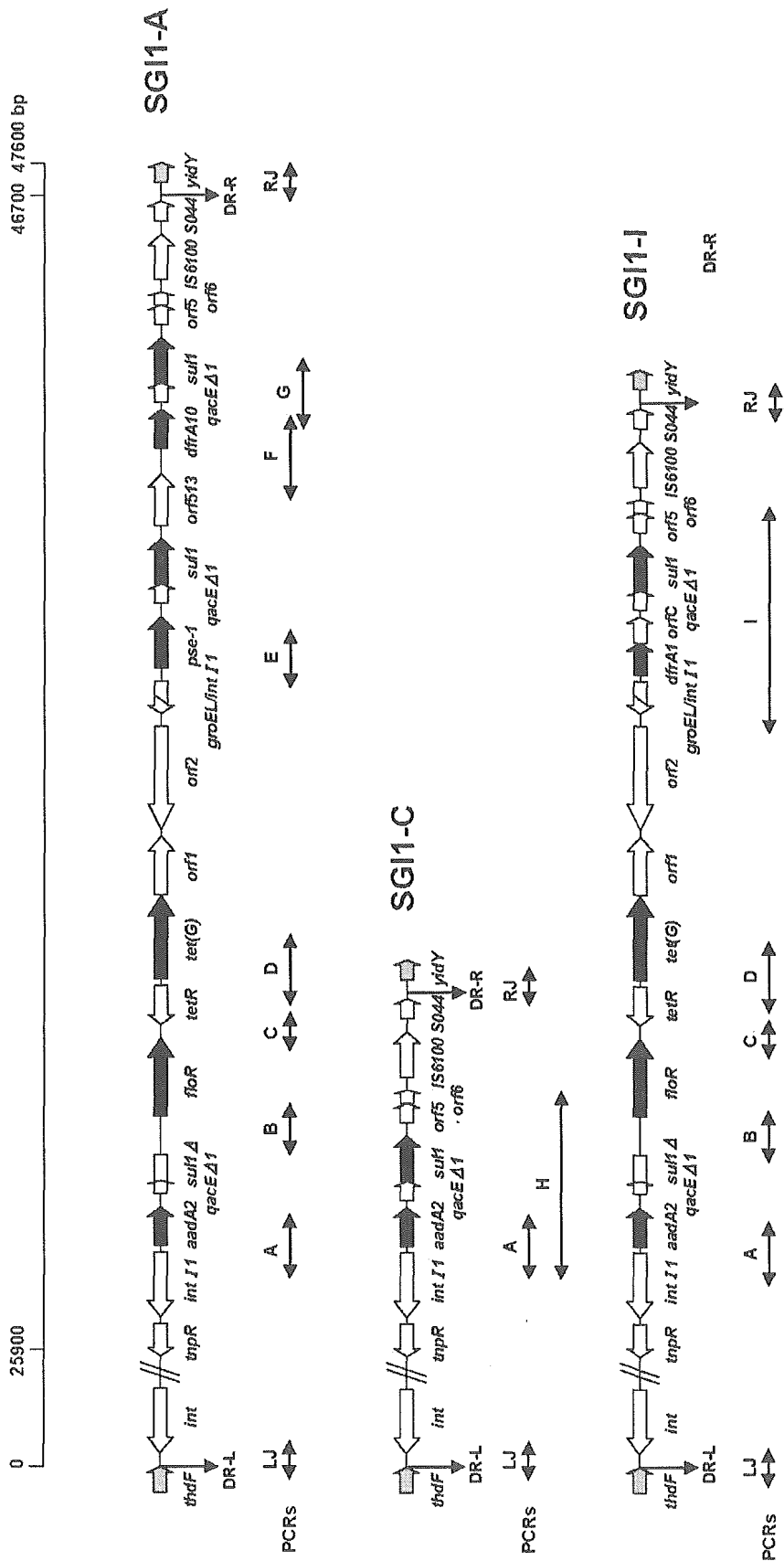
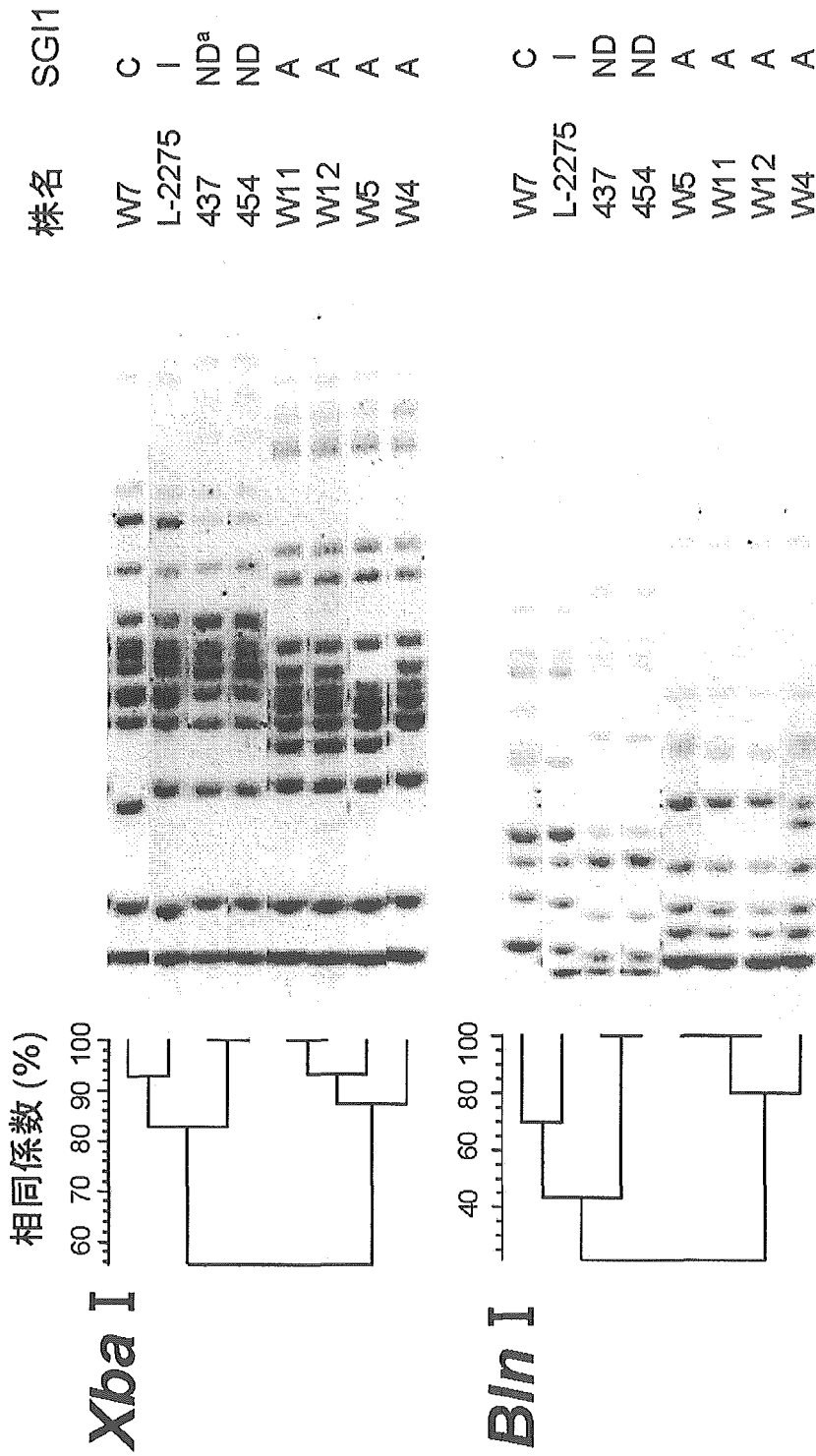


図1. S. Derby に認められた SGI1 バリアントの構造



^aND: 検出できず

図2. 供試菌株の PFGE による比較

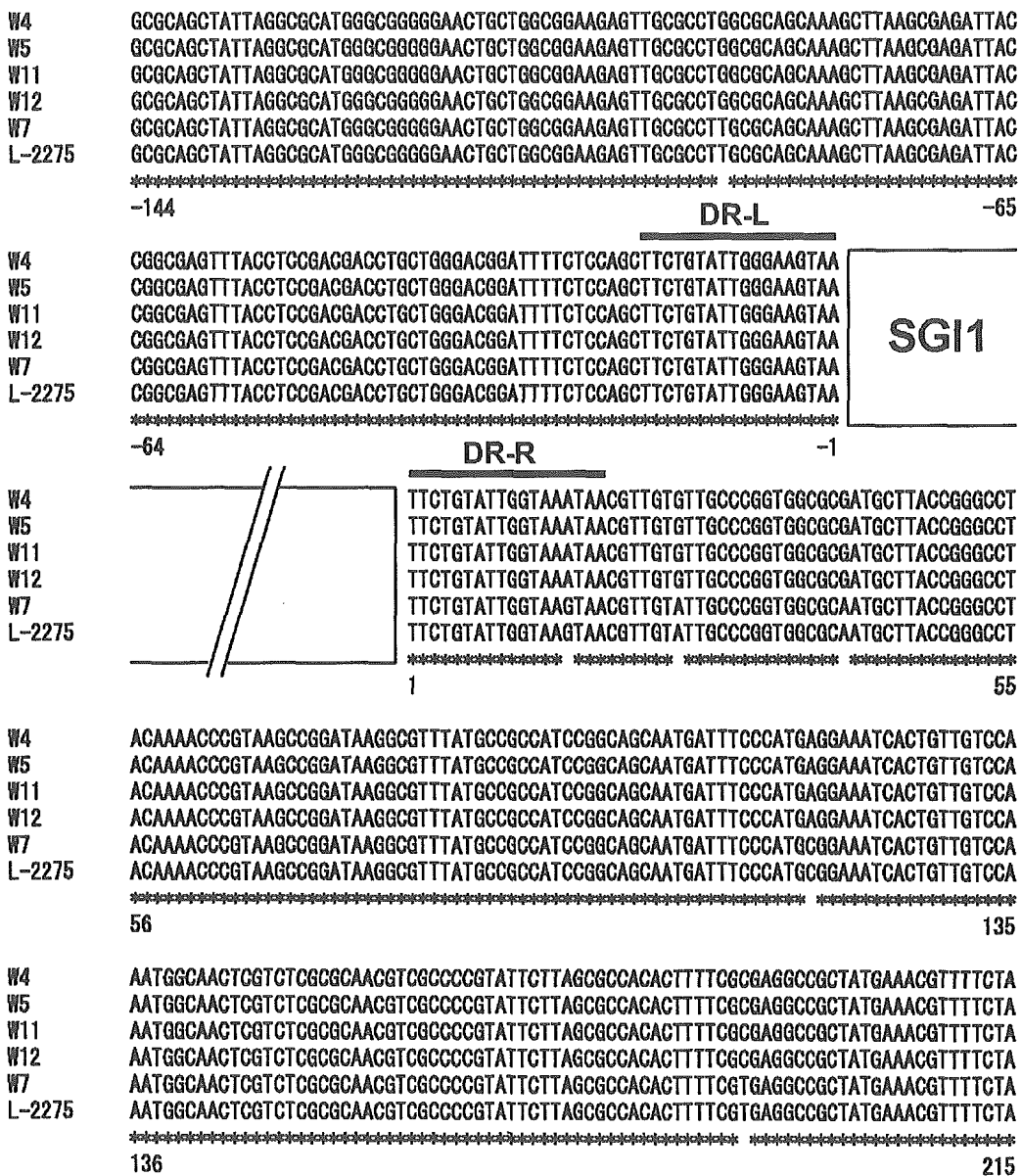


図3. SGI1 周辺部位の塩基配列の比較

A. 論文発表

1. Izumiya H, Mori K, Kurazono T, Yamaguchi M, Higashide M, Konishi M, Kai A, Morita K, Terajima J, Watanabe H Characterization of isolates of *Salmonella enterica* serovar typhimurium displaying high-level fluoroquinolone resistance in Japan. J Clin Microbiol. 43(10):5074-5079. 2005.
2. Izumiya, K. Mori, M. Higashide, K. Tamura, N. Takai, K. Hirose, J. Terajima, and H. Watanabe: Identification of CTX-M-14 β -lactamase in a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolate from Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 49 (6), 2568-2570, 2005.
3. Asai T, Itagaki M., Shiroki Y., Yamada M., Tokoro M., Kojima A., Ishihara K., Esaki H., Tamura Y., and Takahashi T. Antimicrobial resistance types and genes in *Salmonella enterica* Infantis isolates from retail raw chicken meat and broiler chickens on farms. J. Food Protect. 69, 214-216. 2006.
4. Ishihara K., Yamamoto T., Satake S., Takayama S., Kubota S., Negishi H., Kojima A., Asai T., Sawada T., Takahashi T., and Tamura Y. Comparison of *Campylobacter* isolated from humans and food-producing animals in Japan. J. Appl. Microbiol. 100, 153-160. 2006.
5. 秋庭正人、TRAN Thi Phan、LY Thi Lien Khai、林谷秀樹、鮫島俊哉、伊藤博哉、吉井紀代、中澤宗生。メコンデルタ水系からのサルモネラ分離と分離菌の性状解析。獣医畜産新報、58(4): 331-332、2005。
6. 澤田拓士、五十君静信、浅井鉄夫。国内に分布する抗菌剤耐性菌のコントロールに向けて。獣医畜産新報、58:674-676、2005。
7. 石畝史、京田芳人、望月典郎、布施田哲也、重屋志啓盛、泉谷秀昌、渡辺治雄：多剤耐性 *Salmonella enterica* serovar Newport における患者由来株と下水由来株との比較検討。感染症学雑誌、第79巻、270-275、2005。
8. 門間千枝、小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、柴田幹良、藤川浩、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖。死亡者が確認された高齢者福祉施設における腸管出血性大腸菌 O157 感染症集団事例—東京都—。病原微生物検出状況(国立感染症研究所) 20、144-145、2005。
9. 秋庭正人、吉井紀代、中澤宗生。牛由来サルモネラの薬剤耐性に関する最近の知見。臨床獣医、24(3): 20-26、2006。

B. 学会発表

1. 倉園貴至、近 真理奈、砂押克彦、大島まり子、山口正則、泉谷秀昌、渡邊治雄：ヒト由来サルモネラの血清型と薬剤感受性の推移(2002-2004)。日本感染症学会、2005年、名古屋。

2. 秋庭正人、中村耕太郎、篠田ダビデ、吉井紀代、伊藤博哉、内田郁夫、中澤宗生。*Salmonella* Derby に認められた *Salmonella* genomic island 1 の構造解析。第 140 回日本獣医学会学術集会、2005 年 9 月 29 日、鹿児島。
3. 小西典子、森 功次、下島優香子、尾畑浩魅、柴田幹良、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖、泉谷秀昌、渡辺治雄。*Salmonella enterica* serovar Enteritidis におけるナリジクス酸耐性菌の出現状況と耐性遺伝子解析。第 79 回日本感染症学会総会、2005 年 4 月、名古屋。
4. 小西典子、尾畑浩魅、下島優香子、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、諸角 聖。東京都における腸管出血性大腸菌による感染症・食中毒の発生状況と感染源追求。第 9 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2005 年 6 月、盛岡。
5. 甲斐明美、小西典子、尾畑浩魅、矢野一好、諸角 聖。腸管出血性大腸菌検査の現状と課題。第 9 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2005 年 6 月、盛岡。
6. 甲斐明美。細菌性食中毒・感染症の現状と課題。フォーラム 2005：衛生薬学・環境トキシコロジー、2005 年 10 月、徳島。