

図3. 家畜種別カンピロバクター分離率

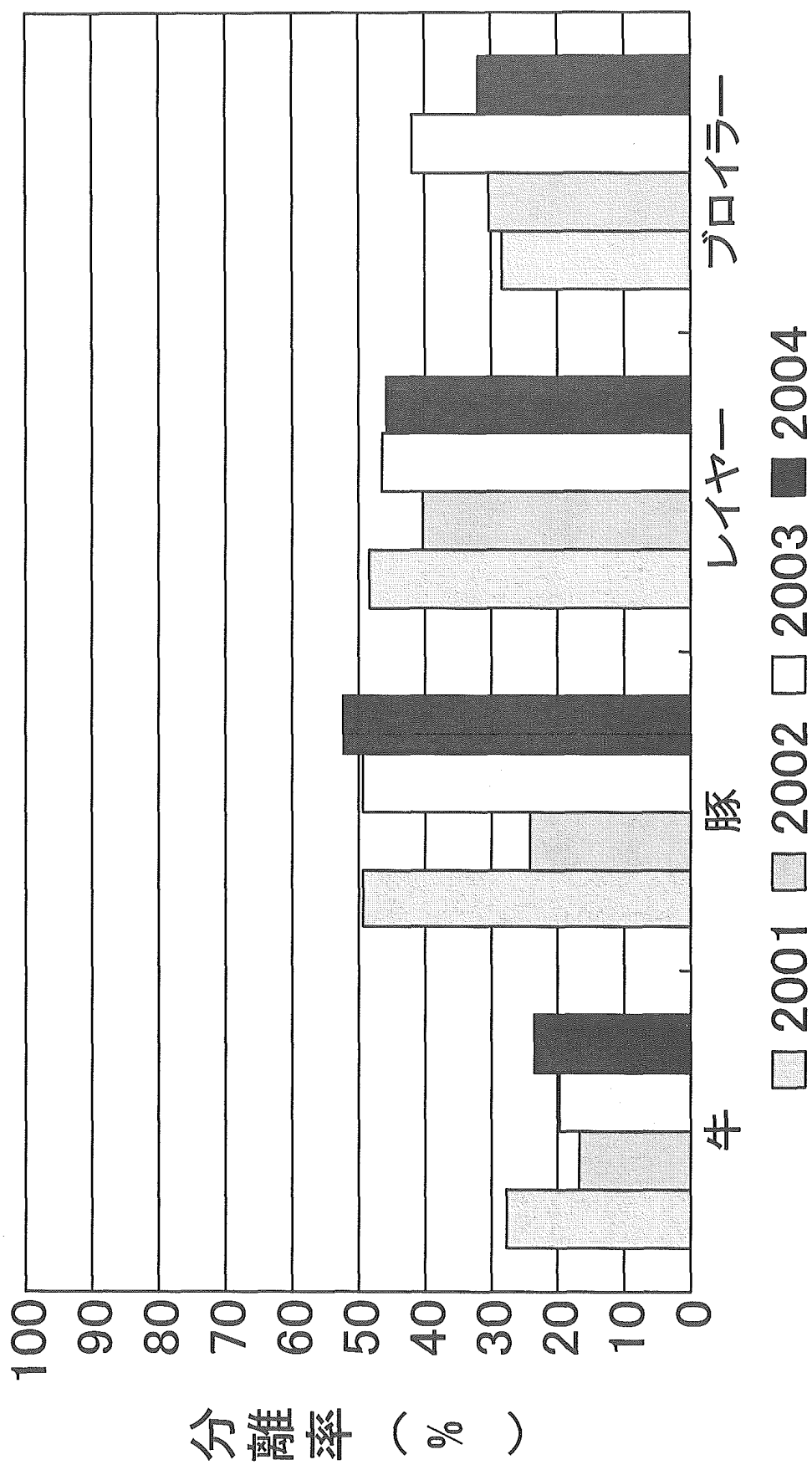
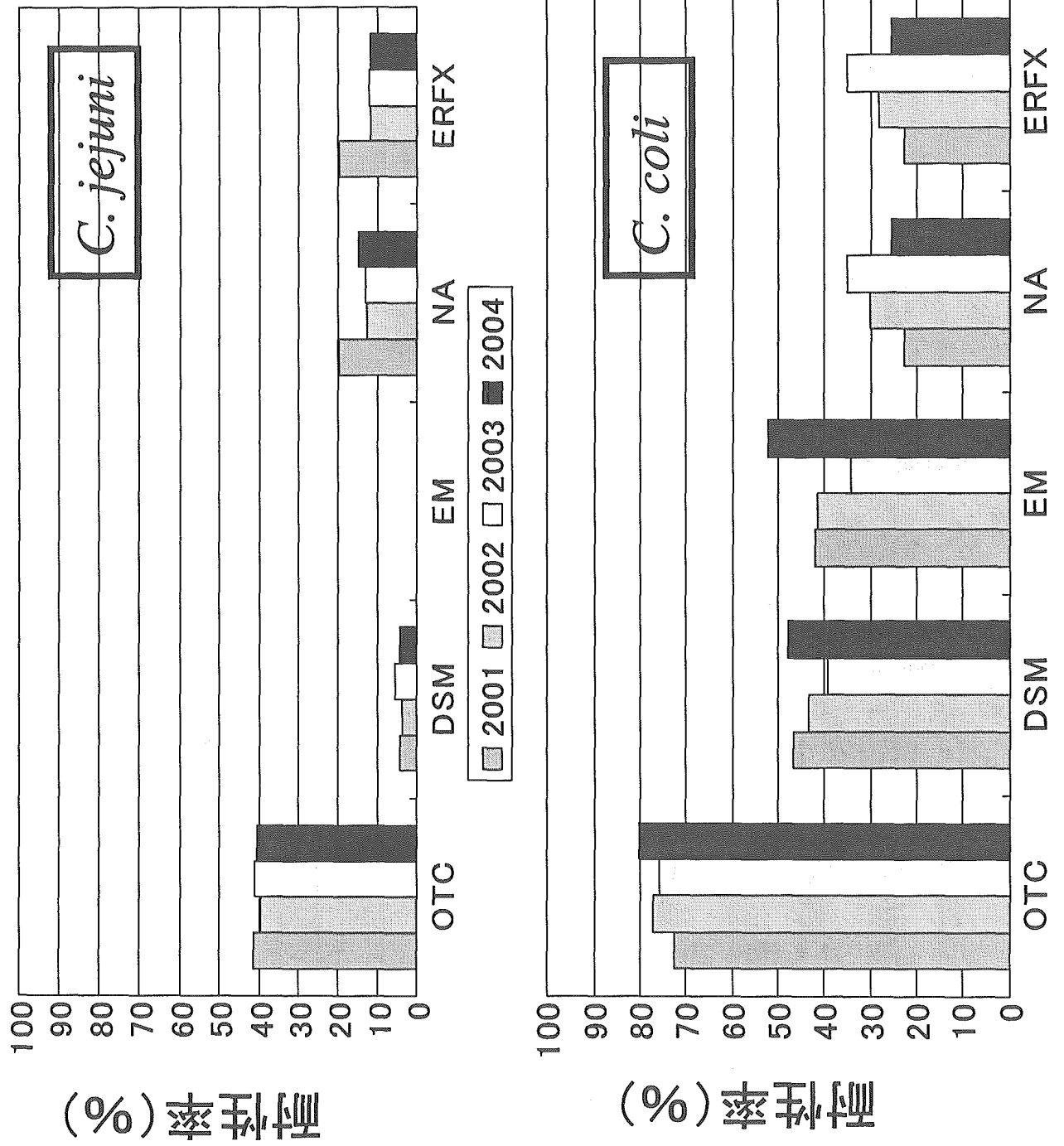


図4. カンピロバクターの薬剤耐性率(菌種・年次別)



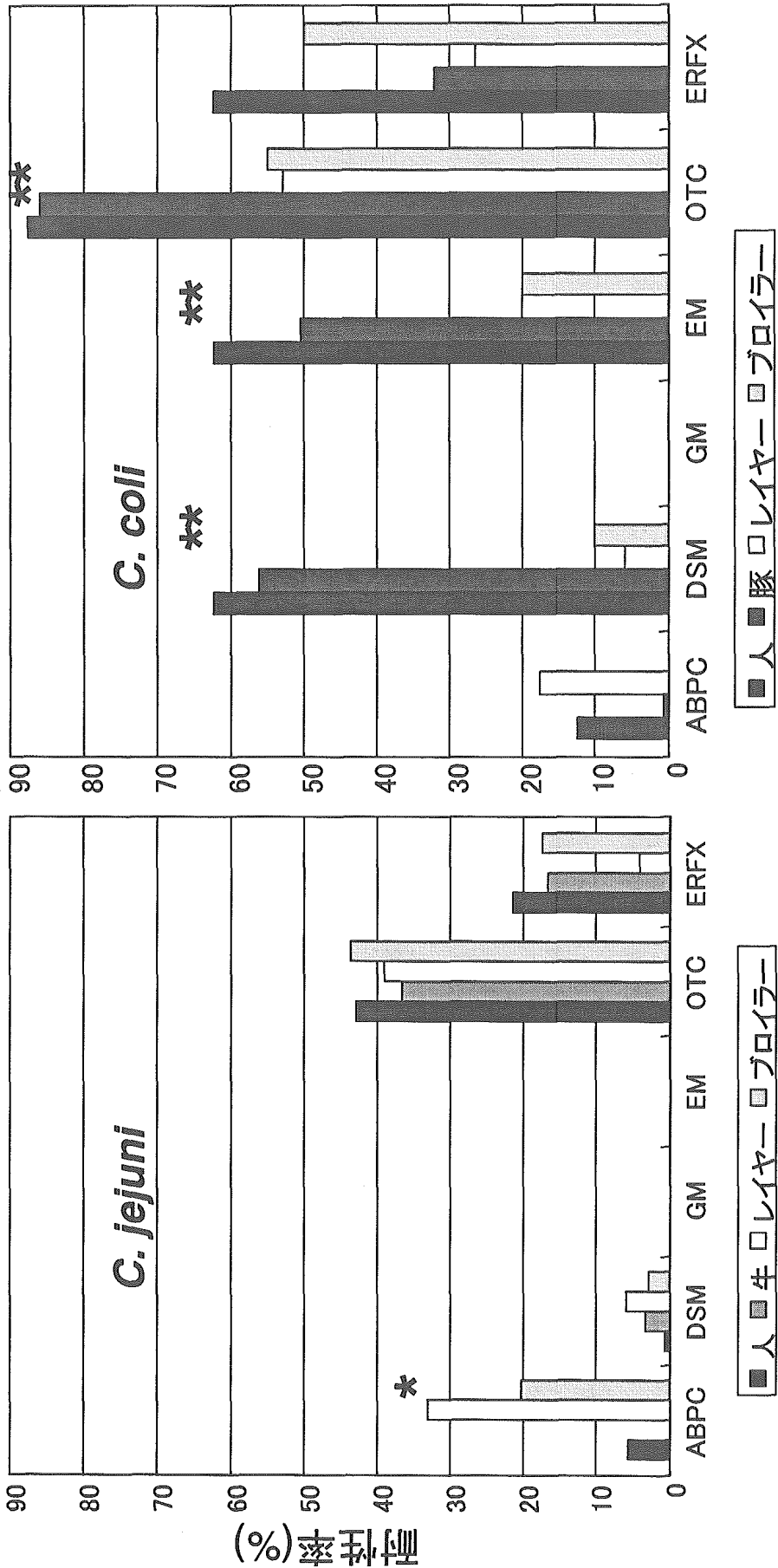


図5 2001-2003年における *Campylobacter* の薬剤耐性率

*C. jejuni* 355株(人126株、牛60株、採卵鶏100株、ブロイラー69株)

*C. coli* 183株(人8株、豚121株、採卵鶏34株、ブロイラー20株)

\*: 人由来および鶏由来に大きな差が認められた。

\*\* : 人由来および豚由来で同様の傾向が認められた。

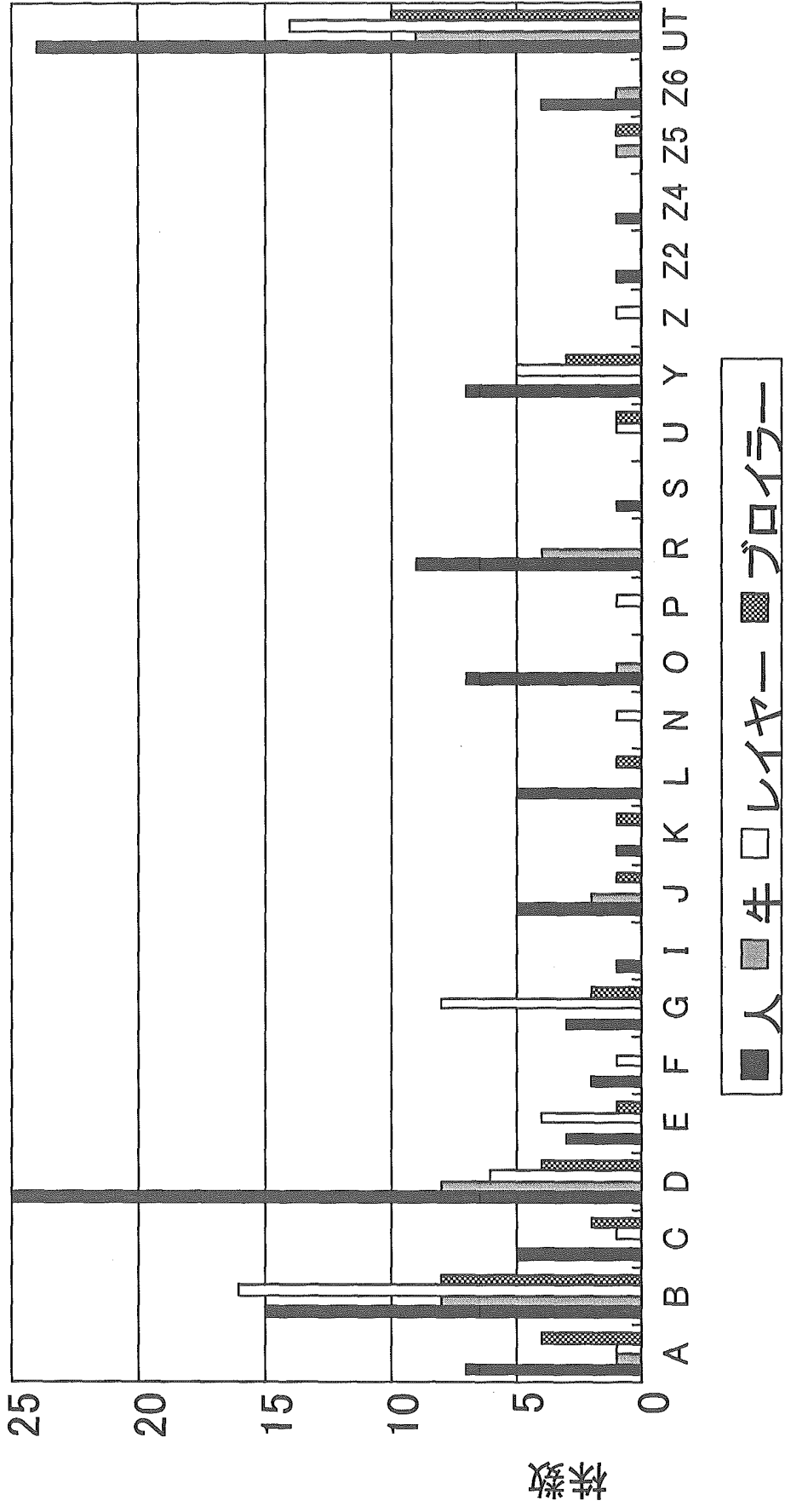


図6 各由来C. jejuniの血清型

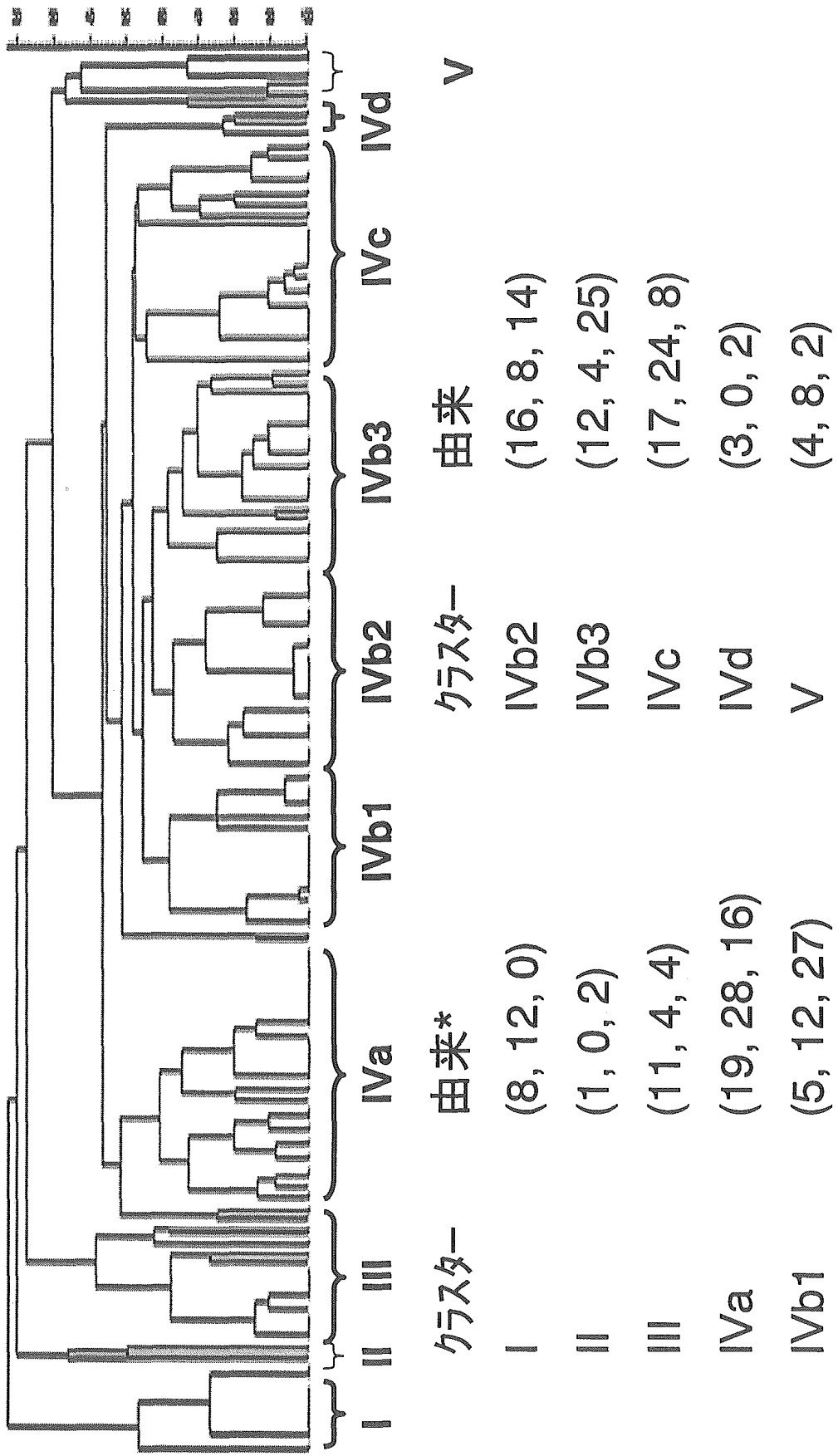
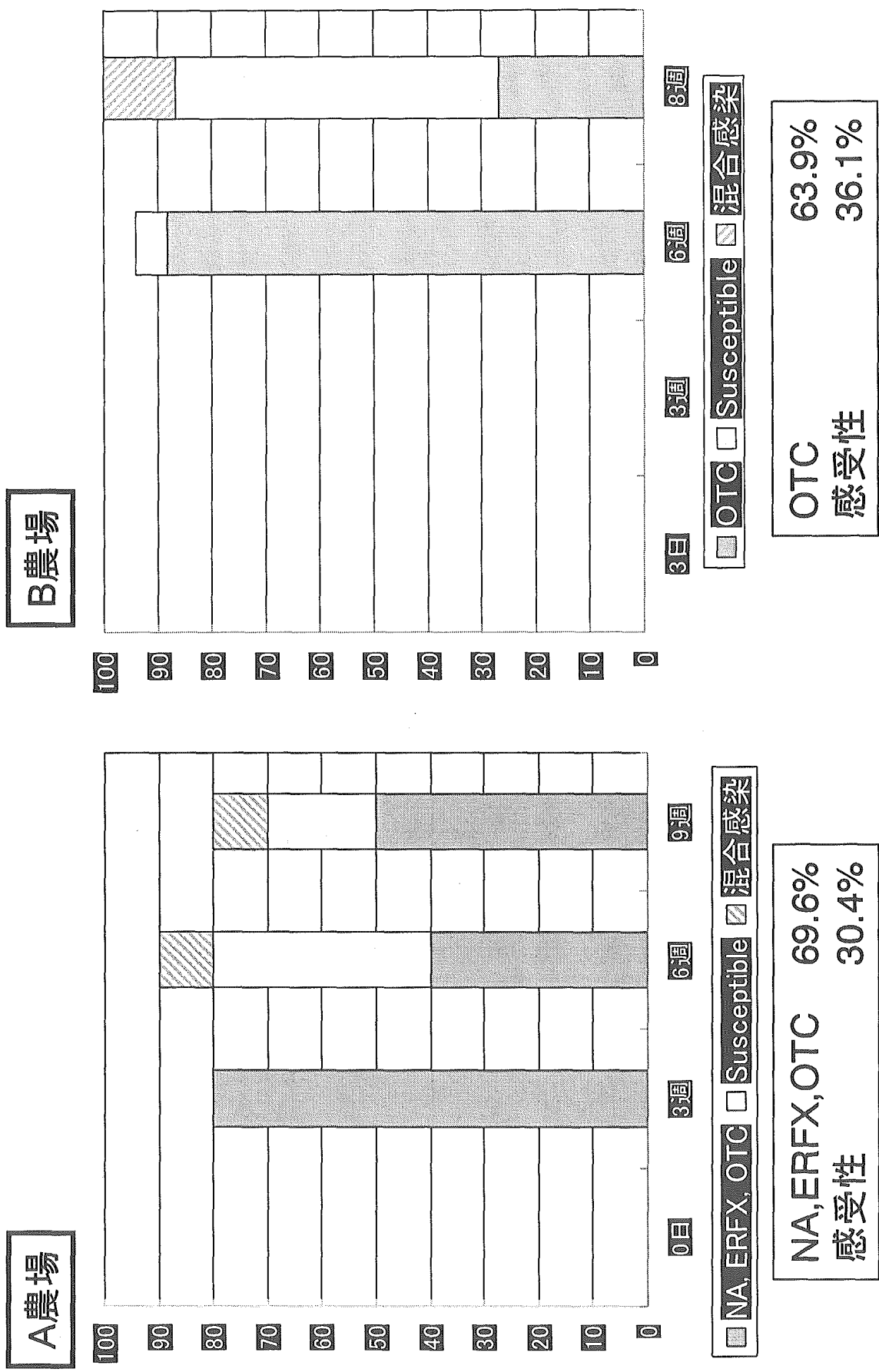


図7 *C. jejuni*のPCR-RFLPによる*flaA*-typing  
(*DdeI*)

\*: (人、牛、ブロイラー)%

# 図8 薬剤耐性パターンの変化



\*コリスチン、エンラマイシンおよびサリノマイシンの感受性に差はなかった。

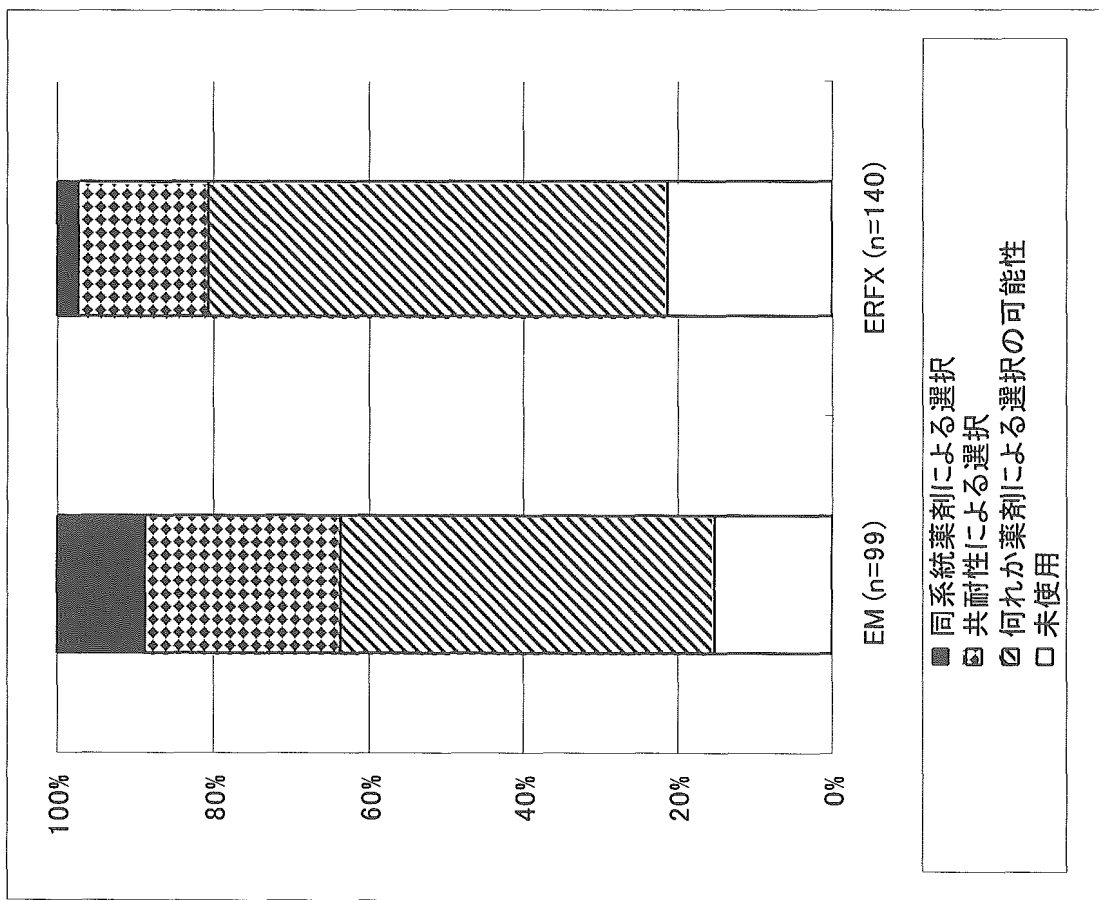


図9 抗菌剤耐性カンピロバクター分離農場における抗菌性物質の使用状況(2001-2003)

## 図10. 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

・Vacherら(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10. 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		
28	Susceptible	WT	WT	0.25-2	0.5-4	2-32	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

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

1990 年代にわが国の牛群に侵入した *Salmonella* Typhimurium (ST) DT104 はインテグロンを内包する *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) の保有に基づく多剤耐性を示す。本研究では ST の薬剤耐性化機構の解明を目的として、ST を含むいくつかの家畜由来サルモネラについて、その薬剤感受性とインテグロンの保有状況を調べた。国内の家畜から分離された ST では、DT104 の侵入以前の 1980 年代にインテグロンを保有する株が認められた。*S. Enteritidis* ではインテグロンを介した多剤耐性株が 1970 年代に分離されており、両血清型ともインテグロンの保有とミノサイクリン耐性との間に相関が認められた。SGI1 は部位特異的に水平伝播されることが実験的に証明されており、現在、10 を超える血清型で、その存在が報告されている。我々は国内外で分離された *S. Derby* に 3 種類の SGI1 バリエーションを見いだした。これらの SGI1 保有株には少なくとも 2 つの遺伝的系統が存在していた。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、今後も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。インテグロンとは、いわば細菌の遺伝子取り込み・発現装置であり、外来の薬剤耐性遺伝子カセットを取り込むことで菌に薬剤耐性を付与する。サルモネラにおいてもインテグロンの存在が報告されているが、わが国の家畜由来サルモネラにおけるインテグロンの分布状況は明らかでない。そこで本研究では主に国内の家畜から分離されたサルモネラのインテグロン及びインテグロンを内包する SGI1 の保有状況やその構造を調べることで、STを含むサルモネラが多剤耐性化の誘因と耐性化機構の一端を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 薬剤感受性試験

日本 BD 社のセンシディスクを用いたディスク拡散法で実施し、NCCLS に準拠した手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、セフメタゾール 30、セフトリアキソン 30、カナマイシン 30 (KM)、ストレプトマイシン 10、テトラサイクリン 30、ミノサイクリン 30 (MINO) クロラムフェニコール 30、シプロフロキサシン 5、スルファメチゾール 250 (TH)、ナリジクス酸 30 (NA)、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。

### 2) *int 11* 及び *floR* 遺伝子の PCR 検出

SGI1の中にはIn4ファミリーに属する複雑な構造のインテグロン、In104 (約13 kb)が存在する。In104の中には典型的なクラス1インテグロンが2

コピー存在し、それらの間にCP/フロルフェニコール耐性を規定する *floR* 遺伝子が存在する。したがってインテグラーゼを規定する *int 11* 遺伝子

(Int) と *floR* 遺伝子 (Flo) をPCR検出することで、SGI1の存在を間接的に確認することができる。そこで家畜及びその飼養環境から分離されたST、

*S. Enteritidis* (SE)、*S. Dublin*、及びその他血清型について、両遺伝子のPCR検出を行った。

### 3) 接合伝達試験

伝達性薬剤耐性 (R) プラスミドを介した薬剤耐性の伝達とインテグロン性の多剤耐性との関連を検討するため、接合伝達試験を実施した。接合伝達試験の供与菌としてはプラスミドを多数保有する1980年代の菌株を中心にST 24株、SE 15株を、受容菌としてリファンピシン耐性のみを保有する *Escherichia coli* C<sup>11</sup> 株を供試した。接合伝達試験は常法に従って実施し、KM、TC、CPの3薬剤に注目して耐性獲得クローンを選択した。得られたクローンについてはプラスミドの伝達を確認後、R プラスミド上のインテグロンの存在をPCRで判定した。

### 4) *S. Derby* (SD) が保有する SGI1 の構造解析

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SDの国外分離株がSGI1を保有する例を見いだした。SGI1は部位特異的に他のサルモネラに水平伝播することが知られている。SGI1の獲得はサルモネラが多剤耐性化につなが

ることから注意が必要である。そこで、わが国で分離されたSDにおけるSGI1の浸潤状況を明らかにする目的で、1976年から2001年に国内の家畜から分離されたSD、23株のSGI1保有状況を調べた。また、SGI1には現在SGI1-A~Jの10バリエーションが報告されていることから、得られたSGI1保有SD株のSGI1構造をPCRマッピング法で調べた。さらに菌株の由来を明らかにする目的で、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)像やSGI1挿入部位前後の塩基配列を比較した。

### C. 結果

#### 1) 家畜由来サルモネラにおけるインテグロンの浸潤状況

1973年から1999年にかけて分離された家畜由来STについてInt-PCRによるインテグロンの分布状況を調べた。その結果、Int+/Flo+の性状を示すDT104は1990年代以降国内で分離されているのに対して、Int+/Flo-の性状を示す菌株が1980年代初頭には存在していたことから、DT104の浸潤以前に既にウシ由来STにインテグロンを介した薬剤耐性が存在したことが明らかとなった(表1)。Int+/Flo- ST 21株について薬剤耐性型を調べたところ、DT104(Int+/Flo+)に典型的なASTC型は見られず、しかもその多くがDT104と異なりミノサイクリン耐性を示した(表2)。

近年食中毒の主要原因菌となっているSEにおいてもSTほどではないが、やはり多剤耐性化の傾向が認められる。そこでSTと同様の手法を用いて1972年から1996年にかけて分離された野外株

100株について薬剤耐性型とInt-PCR結果との相関を検討したところ、牛由来の多剤耐性株にInt+が多く見られた(表3)。分離年次から見ると、STより遡った1970年代にSEにおいて既にインテグロンを介した多剤耐性が存在していた(表4)。さらにこれらの陽性株はDT104とMIC値で比較するとミノサイクリンに対して明らかに耐性を示しており、STの非DT104型のインテグロンと高い相関があることが示唆された(表5)。

#### 2) 一部のインテグロンはRプラスミド上に存在する

KM、TC、CP耐性を指標とした接合伝達試験によりRプラスミドを検索したところ、STでは24株中7株より7種のRプラスミドが得られた。さらに、Int-PCR法によりうち2株にインテグロンの存在が示唆された(図1)。

SEではInt-PCR陽性株について同様の試験を行った結果、4株から5種のRプラスミドが得られ、ST同様SEにおいても、うち3種のRプラスミドがInt-PCR陽性を示した(図2)。No. 8株では薬剤感受性試験の結果、TC、CPに加えてSM、TH耐性もRプラスミド上に存在したことから、クラス1インテグロンである可能性が示唆された。

#### 3) SDが保有するSGI1の構造

ベトナム・メコンデルタ地域の水系から分離されたW4、W5、W11、W12株はABPC、CP、SM、TH、TC、SXTの6剤に耐性を示し、SGI1-Aを保有していることが明らか

となった。近接した水系から分離された W7 株は SM、TH の 2 剤に耐性を示し、SGI1-C を保有していた。1994 年に国内の豚から分離された L-2275 株は CP、SM、TH、TC、SXT の 5 剤に耐性を示し、SGI1-I を保有していることが明らかとなった (図 3)。

ベトナム・メコンデルタで分離された W4、W5、W7、W11、W12 株は、近接した水系から分離された株であり、SGI1-C 保有 W7 株は SGI1-A を保有株から派生した可能性が考えられた。そこで、SGI1-C 保有株と SGI1-A 保有株を PFGE により比較したところ、制限酵素 *Xba* I、*Bln* I のいずれを用いた場合にも、異なるバンド数は 10 本以上認められ、関連性の乏しい株であると考えられた。一方、W7 株の PFGE 像は国内の豚から分離された SGI1-I 保有 L-2275 株と類似度が高かった (図 4)。

そこで、これら菌株間の関連をさらに調べる目的で、SGI1 挿入部位前後、計 359 bp の塩基配列を比較した。その結果、SGI1-A を保有する W4、W5、W11、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 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 (図 5)。

#### D. 考察

サルモネラの多剤耐性は 1980 年代から問題視されており、これまでに R プラスミドを介した多剤耐性の獲得、伝播に関する研究が数多く報告されてきた。それに加えて 1990 年前後から世界各国と時期を同じくして、ST DT104 が国内に浸潤していることが明らかになって

きたことにより、インテグロンや SGI1 による多剤耐性の概念が新たに加わった。そこで本研究では PCR 法を用いてインテグラーゼ遺伝子の一部を検出することにより、家畜由来株におけるインテグロンの浸潤状況を調査した。その結果、DT104 の侵入以前の 1980 年代にインテグロン構造を保有する ST が存在したことが明らかとなり、インテグロンもまたサルモネラの多剤耐性化を論じる上で重要な要因であると考えられた。

SE についても同様の検索を実施したところ、ST よりさらに遡った 1970 年代にインテグロンを介した多剤耐性株が分離されており、血清型間の伝播の可能性も示唆された。これらのインテグロンはいずれも TH に耐性を示すことから、DT104 同様クラス 1 インテグロンであると推察されたが、その反面 MINO に対して耐性を示す菌株が多いことから、薬剤耐性遺伝子の保有状況は DT104 と異なっていると考えられた。

多剤耐性へのインテグロンの関与と、これまでサルモネラの多剤耐性の主因と考えられていた R プラスミドとの相関を明らかにするために接合伝達試験を実施し、伝達された R プラスミド上にインテグロンが存在するか否かを検討した。その結果、ST、SE いずれにおいてもインテグロン構造を保有する R プラスミドの存在が明らかになったことから、インテグロン性の多剤耐性がプラスミドを介して他の菌株に伝達される可能性が示唆された。

一方、我々は国内外で分離された SD に 3 種類の SGI1 バリエーションを見いだした。

SG11-I については、SD からの分離報告があるが、SG11-A 及び C については、これが初めての分離報告である。

SG11-A 及び C を保有する SD は半径 500 m 以内の近接した水系において、同日に採剤した水サンプルから分離された株であり、SG11-C 保有株は SG11-A を保有株から派生した可能性が考えられた。そこで、これらの株の PFGE 像と SG11 挿入部位前後の塩基配列を比較したところ、SG11-C 保有株は SG11-A 保有株と関連性が低く、むしろ国内で分離された SG11-I 保有株と近縁であることが明らかとなった。SG11 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推察された。

#### E. 結論

ST DT104 の侵入以前の 1980 年代に MINO 耐性と関連するインテグロン構造を保有する ST が国内に存在したことが明らかとなり、インテグロンもまたサルモネラが多剤耐性を示す上で重要な要因であると考えられた。

SE についても同様の検索を実施したところ、ST よりさらに遡った 1970 年代にインテグロンを介した多剤耐性株が分離されており、これらの株は上記 ST 株と同様、MINO 耐性を示したことから、血清型間のインテグロン伝播の可能性も示唆された。

また、ST と SE ではインテグロン性の多剤耐性がプラスミドを介して他の菌株に伝達される可能性が示唆された。

一方、一つの血清型における SG11 保有株でも複数の遺伝的系統が存在すること

は、SG11 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。SG11 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 SG11 の保有状況を継続的に監視していく必要があると考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

(和文発表)

1. 鮫島俊哉. 2003. 話題－*Salmonella* Typhimurium DT104 について－. 獣医畜産新報. 56(8): 677-680.
2. 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.
3. 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. 家畜由来 ST の Int/Flo PCR 結果

分離年次	Int/Flo			計
	+ / +	+ / -	- / -	
1973-1979			11	11
1980-1984		3	26	29
1985-1989		4	6	10
1990-1994	30	12	5	47
1995-1999	20	2	5	27
計	50	21	53	124

表2. Int+ / Flo- ST 株の薬剤耐性型の年次分布

薬剤耐性型	80-84	85-89	90-94	95-99	計
ASKTMNC	1		2		3
ASKTMC	1	4	7		12
ASKTC			1		1
ASTMC	1				1
AST				1	1
S			2	1	3
計	3	4	12	2	21

A : アンピシリン、S : ストレプトマイシン、K : カナマイシン、  
 T : テトラサイクリン、M : ミノサイクリン、N : ナリジクス酸、  
 C : クロラムフェニコール

表3. 家畜由来 *S. Enteritidis* の薬剤耐性型の分布

薬剤耐性型	牛 (Int+)	豚	鶏	計
ASKTMNC	1 (1)			1
ASKTMC	1			1
STMCR	1 (1)			1
ASTMC	3 (3)			3
ASKTM			4	4
STMN			1	1
STMC	3 (3)			3
TMC	3 (3)			3
ASK	1			1
STM		1	6	7
AS			1	1
ST			1	1
S	7		11	18
—	24		21	55
計	54 (11)	1	55	100

A: アンピシリン、S: ストレプトマイシン、K: カナマイシン、  
T: テトラサイクリン、M: ミノサイクリン、N: ナリジクス酸、  
C: クロラムフェニコール、R: リファンピシン



表4. 家畜由来 *S. Enteritidis* の薬剤耐性型の年次分布

薬剤耐性型	72-79 (Int+)	80-84 (Int+)	85-89	90-94	95-99	計
ASKTMNC		1 (1)				1
ASKTMC		1				1
STMCR		1 (1)				1
ASTMC		3 (3)				1
ASKTM					4	4
STMN					1	1
STMC	3 (3)					3
TMC	3 (3)					3
ASK	1					1
STM				1	6	7
AS			1			1
ST					1	1
S	3			3	12	18
—	23	6	10	6	10	55
計	33 (6)	12 (5)	11	10	34	100

A: アンピシリン, S: ストレプトマイシン, K: カナマイシン, T: テトラサイクリン,  
M: ミノサイクリン, N: ナリジクス酸, C: クロラムフェニコール, R: リファンピシン

表5. Int-PCR (+) 株の MIC 分布 (Minocycline)

	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )								計
	1.5	3.1	6.2	12.	25	50	100	>10	
DT104 Int (+) / Flo (-)	6	3	5	5				0	20
ST/SE Int (+) / Flo (-)						13	9	5	27

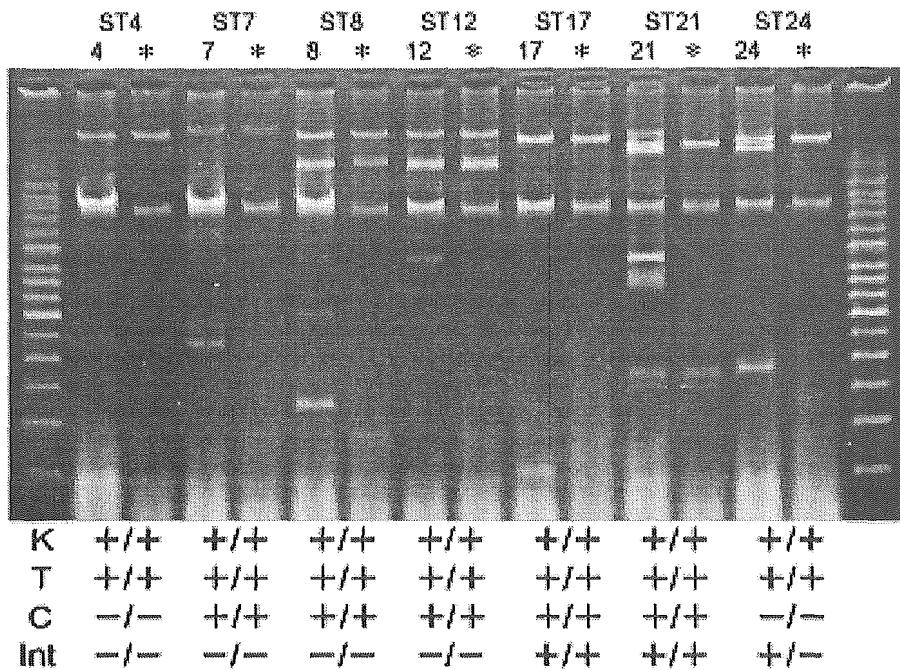


図 1. ST由来RプラスミドとInt遺伝子保有状況 \* :接合伝達体

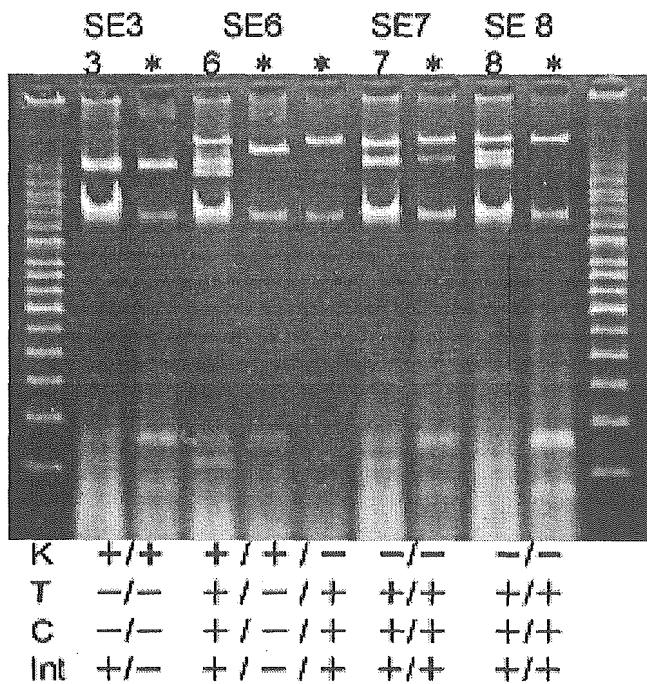


図 2. SEのRプラスミドとInt遺伝子保有状況 \* :接合伝達体

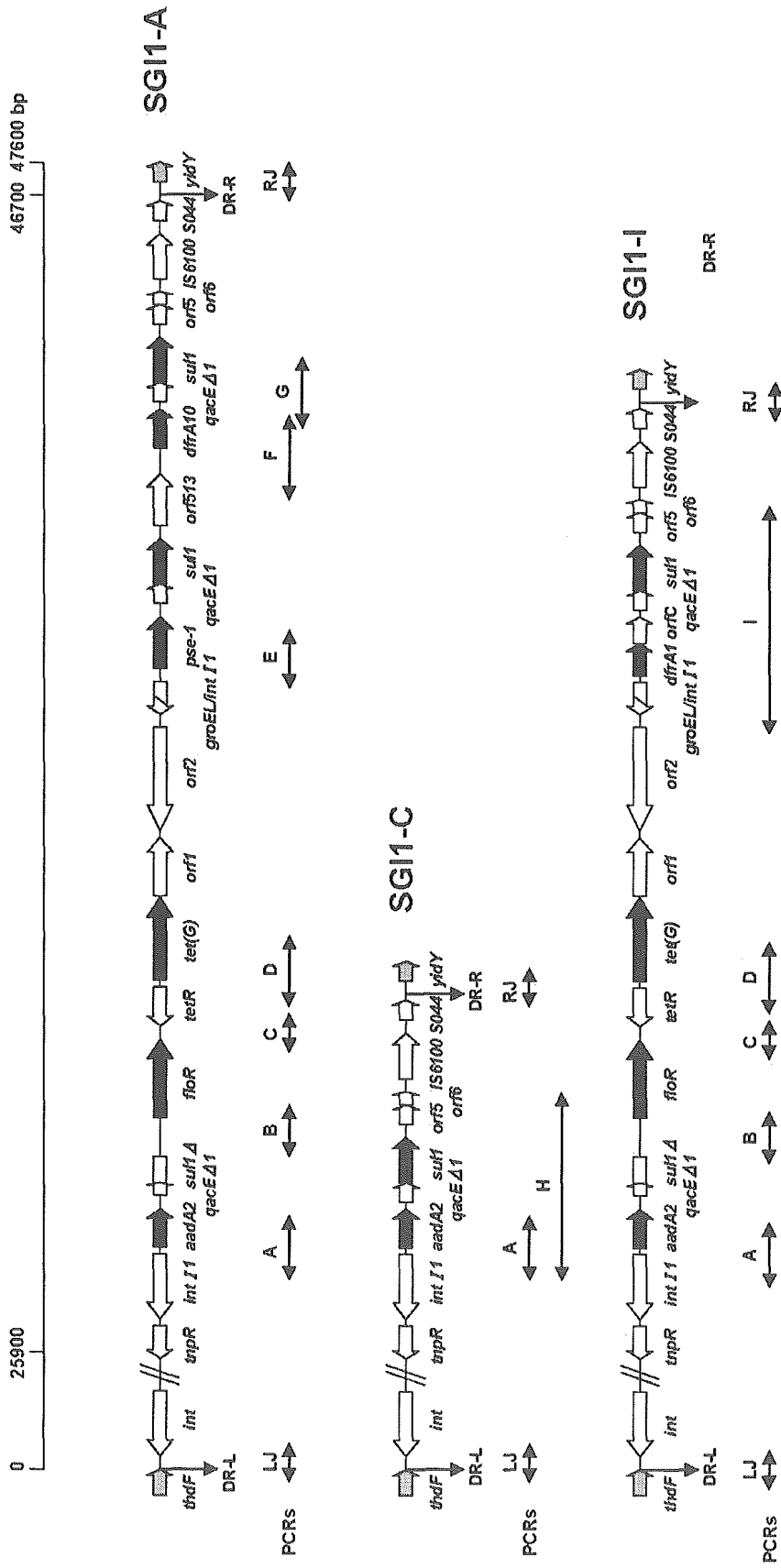
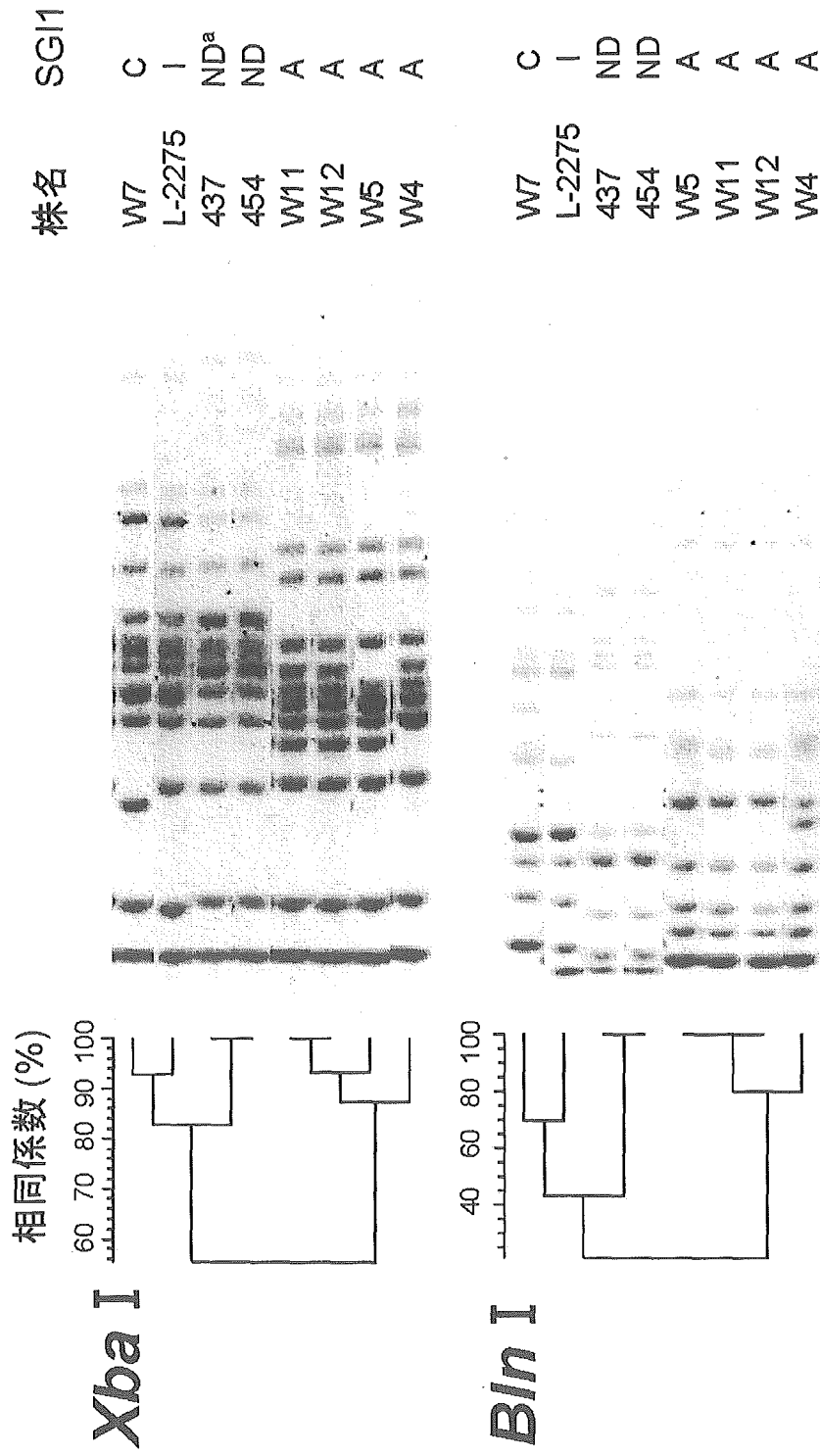


図3. S. Derby に認められた SGI1 バリアントの構造



<sup>a</sup>ND: 検出できず

図4. 供試菌株の PFGE による比較