

厚生労働省食品の安全確保推進研究事業  
「食品由来細菌のサーベイランスシステムの強化と国際対応に関する研究」

分担研究報告書（平成 26 年度）

分担課題名：家畜由来腸内細菌の薬剤耐性化機構の解析

研究分担者：秋庭正人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所  
研究協力者：楠本正博 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所  
研究協力者：岩田剛敏 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所  
研究協力者：黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター  
研究協力者：関塚剛史 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

#### 研究要旨

国内でヒト、家畜、環境から分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12: i: - 51 株を Pulsed-field gel electrophoresis と Multilocus variable-number tandem repeat analysis により型別したところ、両者の組み合わせにより識別力が向上することが示された。本法により家畜由来 3 株がヒト由来株と識別不能であり、何らかの疫学的関連の存在が示唆されたが、これら菌株は供試した全ての薬剤に感受性または単剤耐性であった。多剤耐性を示す一群の菌株はヒト由来株の他、主に豚由来株から構成されていた。薬剤耐性菌が豚肉を介してヒトに感染していることを示唆する成績と考えられた。また、これら菌株の一部は薬剤耐性型やファージ型がヨーロッパで流行している菌株と一致しており、何らかの関連が示唆された。

#### A . 研究目的

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4, [5], 12: i: - ( 4: i: - ) は血清型 Typhimurium ( 4, [5], 12: i: 1, 2 ) の単相変異株と考えられており、多くの先進国で最も高頻度にヒトから分離されるサルモネラ血清型の 1 つとなっている。わが国のヒト由来株の中では 2000 年代後半から目立ち始め、2014 年には Enteritidis に次いで最も分離頻度の高い血清型となった( 図 1 )。Typhimurium によるサルモネラ感染症は家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されているため、全国的な発生状況を把握できるが、4: i: - は届出の対象とならず、その発生状況は不明である。しかしながら、某県

における近年の集計( 図 2 ) では Typhimurium の分離頻度が減少し、4: i: - のそれが上昇している傾向が明らかである。すなわち、ヒトからの 4: i: - 分離頻度上昇は家畜における本菌の分離頻度上昇とリンクしており、畜産物を介したヒトへの感染ルートが存在が示唆される。そこで、今年度は 4: i: - のヒト由来株と家畜等由来株を Pulsed-field gel electrophoresis ( PFGE ) および Multilocus variable-number tandem repeat analysis ( MLVA ) の手法を用いて詳細に分析し、家畜からヒトへの薬剤耐性菌の流れを指摘できるか否かを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌

県の衛生研究所または家畜保健衛生所で2000～2010年に分離同定された4:i:-、51株を実験に供した。由来はヒト、牛、豚、鶏、ペンギン、カラス、オウインコ、豚肉、河川水である。

### 2. PFGEによる型別

制限酵素BlnI消化後のゲノムDNAを1%アガロースゲルに包埋し、TBE緩衝液中、6V/cm、14で泳動した。装置はCHEF DR (Bio-Rad Laboratories社)を用い、スイッチ時間2.2～63.8秒で19時間泳動した。得られた泳動像はTIFFフォーマットで保存し、Fingerprinting informatics software (Bio-Rad Laboratories社)を用いてダイスの係数に基づくクラスター解析を行い、系統樹を作成した。

### 3. MLVAによる型別

既報 (Lindstedt et al., 2004, J Microbiol Methods 59:163-172) の手法に従い、ゲノム上の5つの部位(STTR-9, STTR-5, STTR-6, STTR-10pl, STTR-3)をPCR増幅し、キャピラリーシーケンサーを用いてその塩基配列を決定した。タンデムリピートの数はGenetyx version 10.0 (Genetyx)を用いて目視で数え、得られたデータをBioNumerics version 6.5 (Applied Maths社)に取り込みminimum-spanning tree (MST)を作成した。各ローカスの多様性を評価するため、POPGENE version 1.32 ([http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene\\_download.html](http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_download.html))を用いてNei's diversity indicesを算出した。

### 4. 型別法の識別力判定

Simpson's diversity index (DI)と95%信頼区間はEpicompare version 1.0 (<http://www3.ridom.de/epicompare/>)を用いて算出した。

## C. 研究結果

### 1. PFGEによる型別

BlnI-PFGEにより28のプロファイルが観察された(DI,0.94; 95%CI, 0.91-0.98)(図3)。クラスター解析の結果、7つのプロファイル群(クラスターC, D, G, H, J, L, M)と7つのプロファイル(A, B, E, F, I, K, N)が認められた。最優勢のクラスターC(20株)には5つのプロファイル(C1-C5)が含まれていた。他の6つのクラスターには2～4のプロファイルが含まれ、それらは2～7株から構成されていた。

### 2. MLVAによる型別

MLVAでは27のプロファイルが観察された(DI,0.96; 95%CI, 0.93-0.98)。5つのローカスの多様性の程度は異なっており、Nei's diversity indicesはSTTR-3, 0.52; STTR-5, 0.74; STTR-6, 0.83; STTR-9, 0.58; STTR-10pl, 0.85と算出された。作成したMSTから8つのクラスター(1～ )と5つのプロファイル(～ )が認められた(図4)。最優勢なクラスターは2つのMLVAプロファイルを含み、13株から構成されていた。クラスターは7つのMLVAプロファイルを含み、11株から構成されていた。他のクラスターは1～5つのプロファイルを含み、2～8株から構成されていた。

### 3. PFGEとMLVAの組み合わせによる型別

PFGEとMLVAの型別の組み合わせにより34のCombination type (CT)(DI, 0.97; 95% CI, 0.94-0.99)が観察された(図3)。最優勢のCT3(PFGE, C1; MLVA, a)は同じ町内の異なる農家で分離された8株から構成されていた。CT6(PFGE, C3; MLVA, c)は異なる町の牛に由来する2株とヒト由来1株から構成されていた。CT7(PFGE, C3; MLVA, b)は異なる散発事例のヒト由来2株、豚由来1株、下水由来1株から構成さ

れていた。CT18 (PFGE, G1; MLVA, f) は同じ町内の異なる散発事例から分離されたヒト由来 4 株から構成されていた。CT30 (PFGE, L1; MLVA, ) と 32 (PFGE, M1; MLVA, ) は、それぞれ同じ町内の異なるサンプルから分離された 2 株から構成されていた。

#### 4. ヒト由来株とそれ以外の株の関連

本研究では PFGE と MLVA の組み合わせによる型別で牛由来 2 株 (6 型の C9 および C10 株) と豚肉由来 1 株 (7 型の M1 株) が、それぞれヒト由来株 (H6 および H10 株) と識別不能であった (図 3)。6 型の牛由来株はアンピシリン耐性、ヒト由来株は供試した全ての薬剤に感受性を示す点で異なっていたが、これらの株は全て 2008 年に岩手県内で分離された株であった。7 型の豚肉およびヒト由来株は供試した全ての薬剤に感受性であった。これら 2 株は共に秋田県内の分離株であるが、分離年は 2 年異なっていた。

類似度の高い菌株をグループとして見たとき、PFGE C3 型の中にはヒト由来株の他、牛、鶏、豚肉、河川水由来株が含まれていたが分離年や分離年は一定でなかった (図 3)。PFGE 型別の相同係数 70% をカットオフ値としたとき、H~K 型を 1 つのクラスターと見ることができる。これら菌株は多剤耐性を示し、ヒト由来 2 株の他は主に豚由来株で占められていたが、分離地や分離年は一定でなかった。このうちヒト由来 2 株と豚由来 1 株のファージ型は 193 であった (昨年度成績)。

#### D. 考察

型別法の識別力を比較するための指数として DI が用いられる。これは型別した集団の中から 2 株を無作為に選んだとき、それらが異なる型に型別される確率を示す。本研究において PFGE と MLVA の DI は、それぞれ 0.94 および 0.96 と算出され、MLVA の識別力の方が若干高かった。これら 2 つを

組み合わせることにより、DI は 0.97 と算出され、単独で用いるより識別力が高くなることが示された。

一部のヒトおよび家畜由来株で PFGE と MLVA の組み合わせ型別で識別できない株が認められた。すなわち、組み合わせ型別 6 型の C9 および C10 株は 2008 年に岩手県の牛から分離されている。これらと識別不能なヒト由来 H6 株も 2008 年の岩手県分離株であり、薬剤感受性に若干の相違が認められたものの、何らかの疫学的関連が疑われる。また、2005 年に秋田県の豚肉から分離された組み合わせ型別 7 型の M1 株は 2007 年に秋田県のヒトから分離された H10 株と識別不能であった。これらは供試薬剤の全てに感受性を示す点でも一致しており、特定の菌株が地域で維持されていた可能性が示唆される。

一方、複製の回数に応じて菌株には変異が蓄積され、徐々に遺伝子型が変化することが知られている。したがって、遺伝子型が完全に一致する場合だけでなく、類似度の高い菌株をグループとして捉える視点も必要である。PFGE 型別の相同係数 70% をカットオフ値としたとき、H~K 型を 1 つのクラスターと見ることができる。分離地や分離年は一定でないが、これら菌株は 2~4 剤に耐性を示すという共通の特徴が認められた。本クラスターのヒト由来株の他は主に豚由来株で占められていたことは興味深い。ヨーロッパでは 4:i:- の感染源は豚であるとされており、それらの多くが国内株で認められる ASSuT に耐性を示すファージ型 193 であることが報告されている (Hauser et al., 2010, *Appl Environ Microbiol* 76:4601-4610)。本クラスターに含まれる菌株のうち、ヒト由来 2 株と豚由来 1 株はファージ型 193 であることから、少なくともこれら 3 株はヨーロッパと何らかの関連を有するのかもしれない。また、これらの成績は豚肉を介して薬剤耐性菌がヒトに感染する可能

性を示唆する成績と考えられる。

#### E．結論

4:i:-の型別法としてはPFGEとMLVAが優れており、これらの組み合わせにより、さらに詳細な型別が可能となる。国内のヒト、動物、環境に由来する51株を解析したところ、ヒトおよび家畜由来株で識別不能となる株が一部認められた。また、多剤耐性を示す一群の菌株がヒトと豚から分離されており、豚肉を介したヒトへの薬剤耐性菌伝播の可能性が示唆された。

#### F．知的財産権の出願・登録状況

なし

#### G．健康危害情報

なし

#### H．研究発表

(紙上発表)

1. Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M. Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- as a monophasic variant of serovar Typhimurium. PLoS ONE 9(8): e104380.
2. Ido N, Iwabuchi K, Sato'o Y, Sato Y, Sugawara M, Yaegashi G, Konno M, Akiba M, Tanaka K, Omoe K, Uchida I. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- isolates from humans, animals, and river water in Japan by multilocus variable-number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis. J Vet Med Sci. (in press)

\* 各都道府県市の地方衛生研究所からの分離報告を図に示した

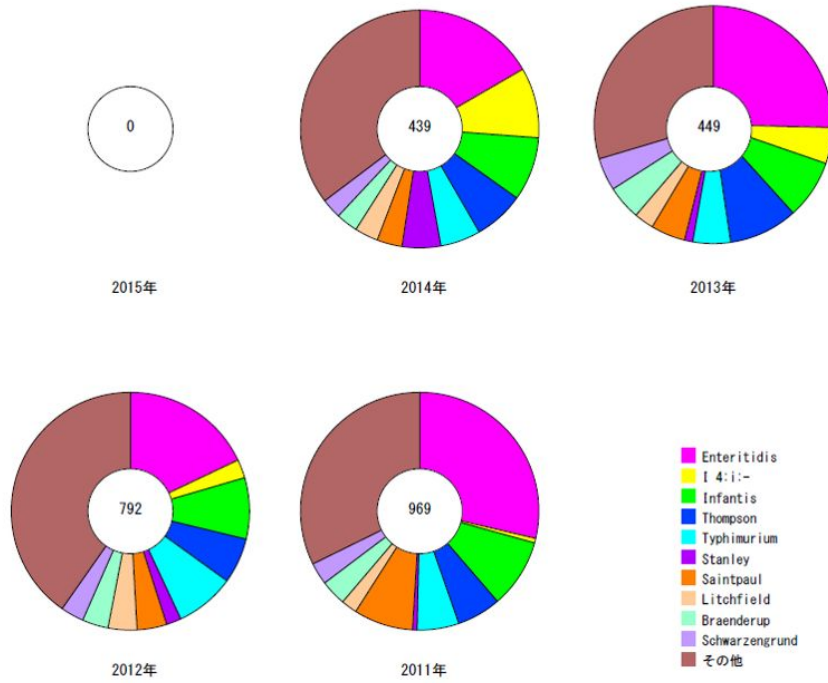
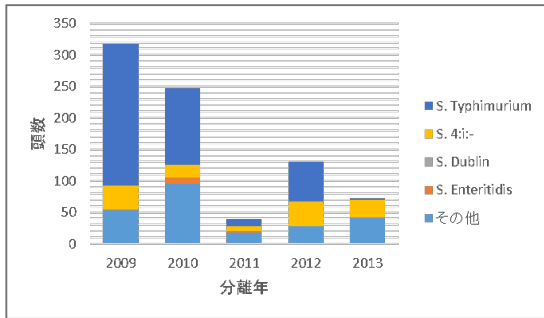
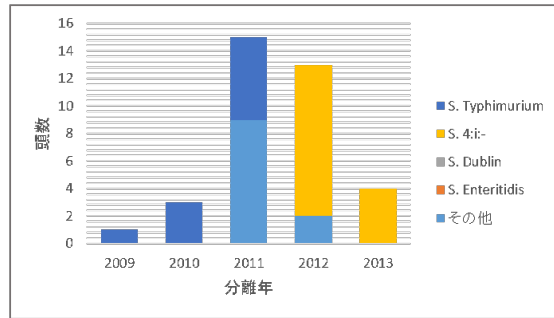


図1. ヒトから分離されたサルモネラの血清型割合 (2011 ~ 2015 年)

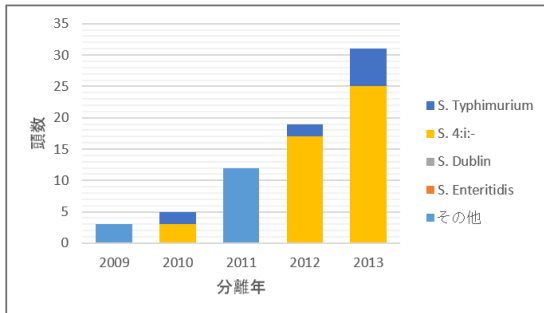
乳牛



肉牛



豚



鶏

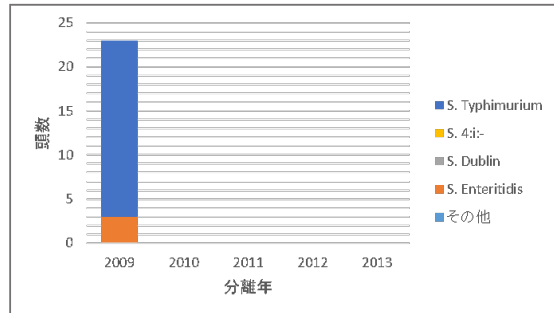


図2. 某県における家畜由来サルモネラ分離状況 (2009 ~ 2013 年)

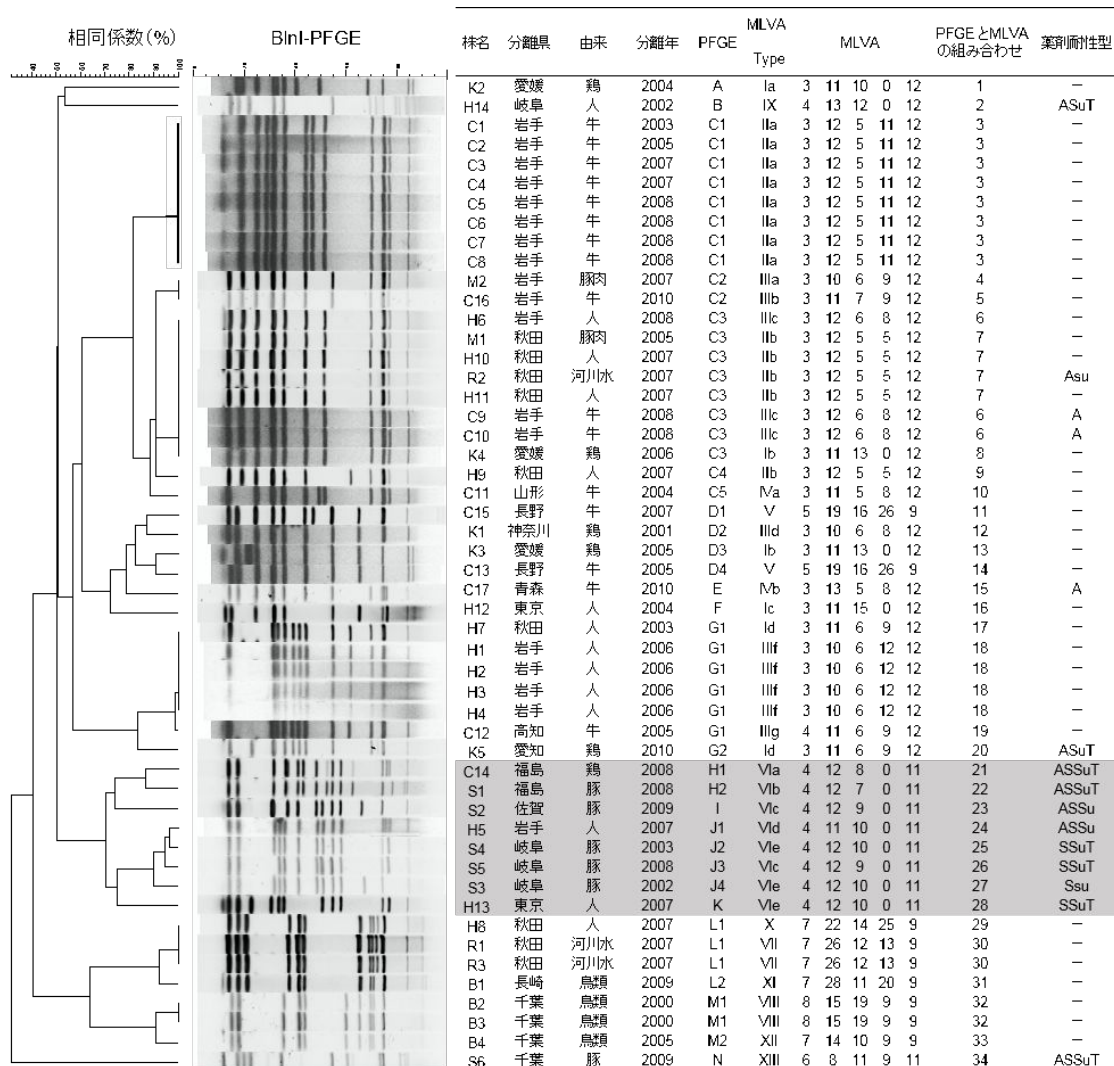


図3. 国内で分離された4:i-株のPFGEとMLVAによる型別結果

薬剤耐性型 A, アンピシリン; S, ストレプトマイシン; Su, スルファメトキサゾール; T, テトラサイクリン; -, 全ての薬剤に感受性

