

国内における豚由来多剤耐性サルモネラ

江 寄 英 剛 (農林水産省動物医薬品検査所)

Esaki, H. (2003) Multidrug-resistant *Salmonella* isolated from pigs in Japan*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 44, 20-22.

1. はじめに

家畜衛生分野における薬剤耐性菌モニタリング体制 (JVARM) において、家畜の細菌性感染症の原因となるサルモネラについては、健康家畜だけでなく、病性鑑定材料より分離された菌株についても薬剤感受性を調査している。健康豚糞便由来としては *Salmonella* Typhimurium が毎年分離されており、且つ健康豚由来血清型において高い割合 (約40%) を占めていることから、本血清型が健康豚の保菌するサルモネラとして重要と考えられる。一方、豚病性鑑定材料から分離される血清型についてみると、健康材料同様に *S. Typhimurium* が主要血清型であるが、それに加えて *S. Choleraesuis* も毎年分離され、高い割合を占めている。以上のことから、健康豚、病性鑑定共に重要な血清型である *S. Typhimurium* と病性鑑定において重要と思われる *S. Choleraesuis* に関して、薬剤耐性をキーワードに JVARM 調査・研究の中で得られた知見を紹介する。

2. 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium DT104

S. Typhimurium は豚サルモネラ症の原因血清型の一つである他、ヒト食中毒の原因血清型としても重要であり、家畜衛生のみならず、公衆衛生上も重要な血清型である。我が国では食中毒患者より分離されるサルモネラの血清型において、*S. Typhimurium* は上位5位以内に、欧米でも1位もしくは2位を争う主要な血清型である (<http://idsc.nih.gov/iasr/index-j.html>)。更に、本血清型の多くの株は多剤耐性化が問題となっており、特に *S. Typhimurium* のファージ型の一つである DT104 (DT104 とは *Salmonella* Typhimurium を型別用バクテリオファージで処理した際、その溶菌パターンから104に分類されるもの。以後 ST-DT104) の多くはアンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、サルファ剤、テトラサイクリンの5剤 (ACSSuT) に対して耐性を示すことが知られている¹⁾。ST-DT104 における5剤耐性は、染色体上のインテグロン構造における耐性遺伝子により担われている

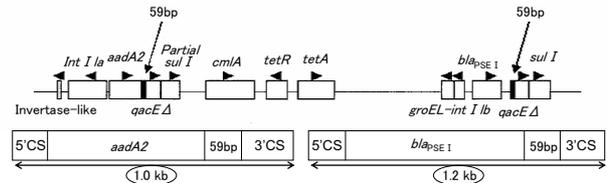


図1 DT104 における多剤耐性遺伝子をコードする遺伝子クラスター (インテグロン)

(図1)。インテグロンの保有と多剤耐性 ST-DT104 との間には高い関連性が認められており、インテグロン構造の有無を調べることで ST-DT104 の簡易識別が可能である。識別法の原理は以下の通りである。即ち、インテグロン構造の両端には保存性の高い領域 (図1の5'CS及び3'CS) があり、それらの領域に特異的に反応するPCRを実施し、その増幅産物 (1.0kb及び1.2kb) の有無を電気泳動により確認する (図2)。両方の増幅産物もしくはいずれか一方が認められた株に

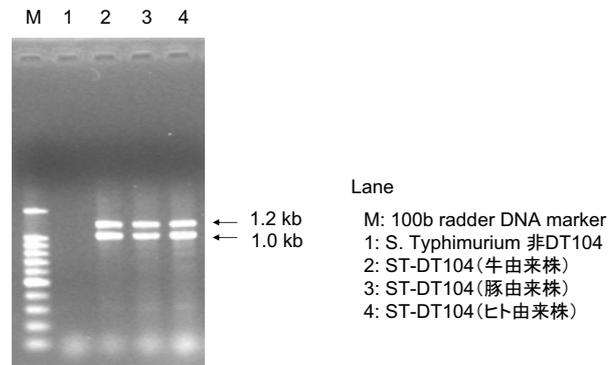


図2 インテグロン PCR 泳動像

についてはインテグロン構造を保有していると考えられ、ST-DT104 である可能性が高い。JVARM において、1999年度から2001年度までの3年間に家畜より分離・収集された *S. Typhimurium* についてこのインテグロンPCRを実施し、陽性のものについては国立感染症研究所にそのファージ型別を依頼した。その結果、分離されたすべての *S. Typhimurium* のうち ST-DT104 の占める割合は牛由来株で8割程度と最も高く、一方、鶏では ST-DT104 は全く分離されなかった (表1)。豚

表1 由来動物別分離STに対するDT104の割合
(1999-2001年度)

由来動物	分離ST (株数)	ST-DT104 (株数)	(%)
病鑑	47	33	(70.2%)
牛 健康	17	14	(82.4%)
小計	64	47	(73.4%)
病鑑	20	1	(5.0%)
豚 健康	15	10	(66.7%)
小計	35	11	(31.4%)
病鑑	8	0	(0%)
鶏 健康	0	-	-
小計	8	0	(0%)
合計	107	58	(54.2%)

では、健康家畜糞便由来 *S. Typhimurium* におけるDT104の割合は約70%と高かったが、病性鑑定由来のそれは5%と低かった。

家畜由来 *S. Typhimurium* 株について、20種類の薬剤に対する感受性を調べたところ、ST-DT104の多くはアンピシリン、クロラムフェニコール、ジヒドロストレプトマイシン、スルファジメトキシシ、オキシテトラサイクリンの5剤に耐性を示す典型的なACS-SuT耐性型であったが、中にはこれら5剤に加え、トリメトプリムに耐性を示すものも見られた(表2)。

表2 動物由来 *S. Typhimurium* の薬剤耐性パターン

薬剤耐性パターン	ST-DT104 (株数)	<i>S. Typhimurium</i> 非DT104(株数)
単剤 SDMX		16 (1)
2剤 ABPC, SDMX	1	
DSM, SDMX	2	
OTC, SDMX		4 (3)
3剤 DSM, SDMX, OTC		12 (12)
4剤 ABPC, CP, DSM, SDMX		1 (1)
ABPC, DSM, SDMX, OTC	1 (1)	1 (1)
ABPC, DSM, SDMX, KM		1
5剤 ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC	43 (9)	6 (1)
ABPC, DSM, OTC, KM		1
ABPC, DSM, OTC, TMP		2 (2)
6剤 ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, BCM	4	
ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, KM	1	
ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, TMP	1 (1)	
ABPC, DSM, SDMX, OTC, TMP, KM		2 (2)
7剤 ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, NA, OA	5	1
ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, TMP, KM	1	
8剤 ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, TMP, KM, GM	1	2
ABPC, CP, DSM, SDMX, OTC, TMP, KM, OA		1 (1)

()内は豚由来株数を示す

ST-DT104以外の *S. Typhimurium* については、ジヒドロストレプトマイシン、スルファジメトキシシ及びオキシテトラサイクリンの3剤に耐性を示す耐性型が最も多く、ST-DT104以外の *S. Typhimurium* においても多剤耐性の傾向が認められ、中には8剤(アンピシリン、クロラムフェニコール、ジヒドロストレプトマイシン、サルファジメトキシシ、オキシテトラサイクリン、トリメトプリム、カナマイシン、オキソリン酸)に耐性を示す株も見られた。

これまでの研究から、国内のヒト(食中毒)由来ST-DT104は遺伝的類似性(clonality)が高いことが

判明しており、また、世界的にみても同一起源の菌が蔓延している状況が明らかになってきている²⁾。そこで、国内の家畜より分離されたST-DT104について、遺伝的な類似性を調べる目的でパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を実施した。その結果、豚由来株は2つの近縁な遺伝子型に分類され、これらは牛及びヒト由来ST-DT104でみられる主要遺伝子型と一致した。これらの結果からST-DT104は豚-牛-ヒト間で共通の菌株が蔓延している可能性が示唆された。

国内において、家畜よりDT104が分離されたのは1990年の最初の報告(ヒトでは1988年の分離株に認められている)であり³⁾、僅か10年程度で、遺伝的類似性の高いST-DT104が *S. Typhimurium* の大半を占めるに至ったという興味深い結果が得られた。ST-DT104が短期間で蔓延した理由に関しては、ヒト及び動物の移動、野生動物による伝播、飼料の汚染などが種々論じられているが、薬剤使用による選択圧も考慮すべきであろう。

3. フルオロキノロン耐性 *S. Choleraesuis*

台湾の大学病院において、2000年以降、フルオロキノロンに耐性を獲得した *S. Choleraesuis* が、ヒトの臨床症例から分離され、その分離頻度も高率となってきたことが報告された。その分子疫学的解析の結果からは、豚由来株との類似性も示唆されている⁴⁾。

一方、国内においてはフルオロキノロンに耐性を示すサルモネラの報告は稀であり、2001年度の調査において、国内の家畜由来株としては初めてフルオロキノロン耐性の *S. Choleraesuis* が分離された。その耐性株の出現背景を探る目的で、国内のフルオロキノロン耐性 *S. Choleraesuis* が分離された農場の聞き取り調査の結果、その農場では豚群に下痢、呼吸器等多様な感染症が認められており、その治療に際してフルオロキノロン剤を含む抗菌剤を多用していたことが確認された。

そこで、台湾での分離株と同一の血清型であったことから、台湾で問題となっているフルオロキノロン耐性株との遺伝的関連性を調べる目的で、2001年度に分離されたキノロン耐性株と台湾分離株との比較を行った。

フルオロキノロン耐性の機構は標的となる酵素の変化、膜の浸透性の変化、膜タンパクによる薬剤の汲み出しなどが知られているが、最も重要なのは標的酵素の変化であり、DNA gyraseをコードする *gyrA* 遺伝子

の変異、及びもう一つの標的酵素である Topoisomerase IV をコードする *parC* 遺伝子の変異が知られている⁵⁾。そこで、キノロン剤に対する耐性機構を比較する目的で、国内分離株及び台湾分離株について、*gyrA* 及び *parC* 遺伝子の変異を調べた。

キノロン剤（オールドキノロン及びフルオロキノロン）に耐性を示す株は全て *gyrA* 遺伝子 87 位のアスパラギン酸をコードする塩基の点変異により、他のアミノ酸に置換されていた。フルオロキノロンに耐性を示す株は、*gyrA* 遺伝子 87 位のアスパラギン酸に加え、83 位のセリン及び *parC* 遺伝子 80 位のセリンに同様の置換がみられた。国内及び台湾で分離されたフルオロキノロン耐性 *S. Choleraesuis* 株については、共に *gyrA* 遺伝子に 2 カ所、*parC* 遺伝子に 1 カ所変異を起こしていたが、その変異の様式は異なっていた。また、国内及び台湾で分離されたフルオロキノロン耐性株のエンロフロキサシンに対する最小発育阻止濃度（MIC）を調べたところ、それぞれ 2 及び 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、4 管の開きがあった。これらの結果より、これまでの知見通りに *gyrA* 及び *parC* 遺伝子におけるアミノ酸の変異がキノロン耐性には重要であり、その際のアミノ酸変異数（変異が 1 カ所か複数か）及び、変異の際に置換されるアミノ酸の種類がフルオロキノロンに対する耐性に影響を及ぼしているものと考えられた。フルオロキノロンに対する耐性度及び遺伝子構造に違いが見られたことから、国内分離株と台湾分離株は異なる菌株であると思われた。そこで、さらに PFGE 解析を行ったところ、日本と台湾において分離された株は異なる菌株であることが確認された。

4. おわりに

これまでの JVARM の中で分離・収集された家畜由来多剤耐性サルモネラに関する話題を述べた。抗菌薬自体には、薬剤に対する耐性化を促す作用（変異原性）は認められていないが、抗菌剤の使用による選択圧が薬剤耐性菌の生存に有利な状況を生じ、結果として薬剤耐性菌の蔓延を起こす。耐性菌問題に対する獣医療領域の主要な対応策は、人の医療分野と同様であり、国際的な共通認識となっている「慎重使用の原則」の遵守である。JVARM における薬剤耐性調査は、抗菌剤の選択に際して必要な薬剤感受性データを提供するものであり、また、JVARM の中で分離収集された菌株に関する分子疫学的解析、薬剤耐性機構、抗菌剤使用と耐性菌の蔓延の関係等について調査・研究を進め

ることも、抗菌剤の適正使用を考える上で必要なデータを提供するものと考えている。

参考文献

- 1) Briggs, C. E., and P. M. Fratamico. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:846-849.
- 2) Izumiya, H., Terajima, J., Matsushita, S., Tamura, K., and Watanabe, H. 2001. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 39:2700-2703.
- 3) Sameshima, T., Akiba, M., Izumiya, H., Terajima, J., Tamura, K., Watanabe, H., and Nakazawa, M. 2000. *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53:15-16.
- 4) Chiu, C. H., Wu, T. L., Su, L. H., Chu, C., Chia, J. H., Kuo, A. J., Chien, M. S., and Lin, T. Y. 2002. The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis*. *N. Engl. J. Med.* 346:413-419.
- 5) Piddock, L. J. V. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 3-16.