

養豚団地及びその近隣農場由来 *Salmonella* Typhimurium 単相変異株の解析

中央家畜保健衛生所 ^{わたんど えり いなばななみ} 渡戸英里、稲葉七巳

【はじめに】

豚サルモネラ症は *Salmonella enterica* の感染によって起こり、この中でも血清型 Typhimurium, Choleraesuis, Enteritidis によるものが届出伝染病に指定されている。

原因血清型として最も報告が多いのは *Salmonella* Typhimurium (抗原構造 04:i:1,2、定型 ST) だが、近年、定型 ST が H 抗原 2 相を発現する能力を失った単相変異株 (抗原構造 04:i:-、非定型 ST) (図 1) が全国的に増加し、問題となっている。非定型 ST の病原性は定型 ST と同等と考えられているが、届出対象外の血清型であるため、全国的な被害状況等、まだ解明されていない点も多い。

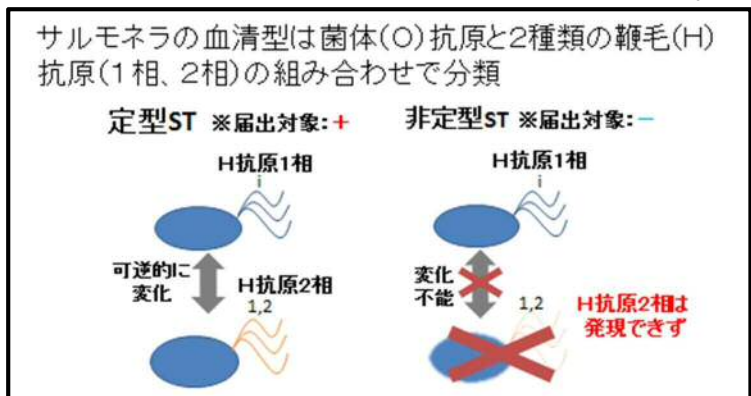


図 1 定型 ST と非定型 ST の比較

平成 28 年 5 月から平成 29 年 9 月にかけて、同一養豚団地内にある 5 農場 (A, B, C, D, E 農場) 及びその近隣の 2 農場 (F, G 農場) で非定型 ST による豚サルモネラ症が県内で初めて発生した。今回の事例について、各農場分離株の疫学的関連及び薬剤感受性を調査したので、その概要を報告する。

【発生状況】

平成 28 年 5 月に養豚団地内にある A 農場の肉豚舎で下痢が発生した。その後、同年 11 月～平成 29 年 3 月に A 農場と同一養豚団地内の 4 農場 (B～E 農場) において、また平成 29 年 9 月には発生養豚団地近隣の 2 農場 (F, G 農場) でも下痢が発生した (表 1)。

なお、A～G 農場は全て同一市内に位置し、この中でも養豚団地内の A～E 農場は隣接している。

表 1 発生農場一覧

所在地	農場	規模	発生年月日	
同一養豚団地内	A	母豚230頭 一貫	H28.5.24	
	B	母豚190頭 一貫	H28.11.30	
	C	母豚120頭 一貫	H28.12.8	
	D	本場	母豚215頭 一貫	H28.12.22
		分場		
E	母豚190頭 一貫	H29.3.10		
養豚団地近隣	F	母豚100頭 一貫	H29.9.5	
	G	母豚315頭 一貫	H29.9.29	

【材料及び方法】

表 2 菌株分離状況一覧

発生農場では初発以降も下痢の病性鑑定依頼があった際は随時糞便検査を実施すると共に、A～E農場については症状の有無に関わらず四半期に1度、農場全体の定期的な糞便検査を実施した。

菌分離は常法に基づき、糞便をハーナ・テトラチオン酸塩培地で42℃24時間増菌培養後、培養液をノボビオシン添加DHL寒天培地に塗抹し、37℃24時間培養した。黒色コロニーが認められたものについては、市販免疫血清（デンカ生研）を用いた従来法とST同定用m-PCR及び変異同定用PCRを併用し、血清型別を実施した。

今回の調査には平成28年5月から平成29年10月までにA～G農場で分離された非定型ST計28株を供した（表2）。

各農場分離株の近縁関係を調査するためにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を、県内流行株の疫学的背景を調査するためにSNP型別を、動物衛生研究部門に依頼して実施した。なお、PFGEとSNP型別の特徴は図2に示す通りである。薬剤感受性試験（1濃度ディスク法）はアンピシリン（ABPC）、アモキシシリン（AMPC）、セファゾリン（CEZ）、セフトフル（CTF）、セフォキシム（CTX）、セフトジジム（CAZ）、ストレプトマイシン（SM）、カナマイシン（KM）、ゲンタマイシン（GM）、オキシテトラサイクリン（OTC）ドキシサイクリン（DOXY）、コリスチン（CL）、スルファメトキサゾールトリメトプリム（ST）、ナジグクス酸（NA）、エンロフロキサシン（ERFX）、オルビフロキサシン（OBFX）、ノルフロキサシン（NFLX）、クロラムフェニコール（CP）の計18薬剤について実施した。

農場	分離時期									
	平成28年			平成29年						
	5月	11月	12月	1月	3月	4,5月	8月	9月	10月	
	下痢病畜	下痢病畜	下痢病畜	下痢病畜	下痢病畜	団地定期検査(春)	団地定期検査(夏)	下痢病畜	団地定期検査(秋)	
A	1	1		1		-	+		4	
B		1				-	-			
C		1				2	+		1	
D 本場			4			1	-		1	
D 分場			1			2	+		-	
E					1	2	+		2	
F								1		
G								1		

※ 赤太枠:初発
 ※ 8月分離株は調査に使用せず
 (菌分離陽性: + 菌分離陰性: -)

	特殊な泳動装置が必要	PCRのみで完結
	PFGE	SNP型別
目的	調査する菌株が同一由来かを判断	ST国内流行株を遺伝学的背景により9タイプに分類する手法
解析原理	電気泳動(フラグメント)	シーケンス(塩基配列)
解析対象	特定の制限酵素が切断する塩基配列の分布(位置・数)	特徴的な一塩基変異(SNPs)を検出
データの共有	・手技の影響を受けやすい ・異なる施設間での比較は困難	・再現性が高い ・異なる施設間での比較が容易
解析に適する場面	比較的近い菌株間の比較(食中毒・院内感染など)	比較的遠い菌株間の比較(国内外など)

図 2 PFGE と SNP 型別の比較

【結果】

PFGE の泳動パターンは、PFGE 型 I a, I b, I c の 3 種類に分かれ、A 農場由来 4 株は I a 型、D 農場由来 1 株は I c 型、それ以外の 23 株は I b 型に分類されたが、バンドの違いが 3 本以内であったことから、調査株は全て同一由来と推察された (図 3)。SNP 型別では全株が 9 型に分類された。

薬剤感受性試験では、多剤耐性の傾向が認められ、28 株中 8 剤耐性が 5 株、7 剤耐性が 1 株、6 剤耐性が 4 株あった。

最も多く認められた耐性パターンは ABPC, AMPC, SM, OTC, DOXY だった。第二次選択薬である第 3 世代セフェム系 (CTF, CTX, CAZ) には全株感受性だったが、CL 耐性傾向の株 (阻止円 11 mm 未満) が 2 株あり、特に I a 型 4 株は、8 剤耐性かつフルオロキノロン (FQ) 系 (ERFX, OBFX) の感受性が中間だった (図 4)。

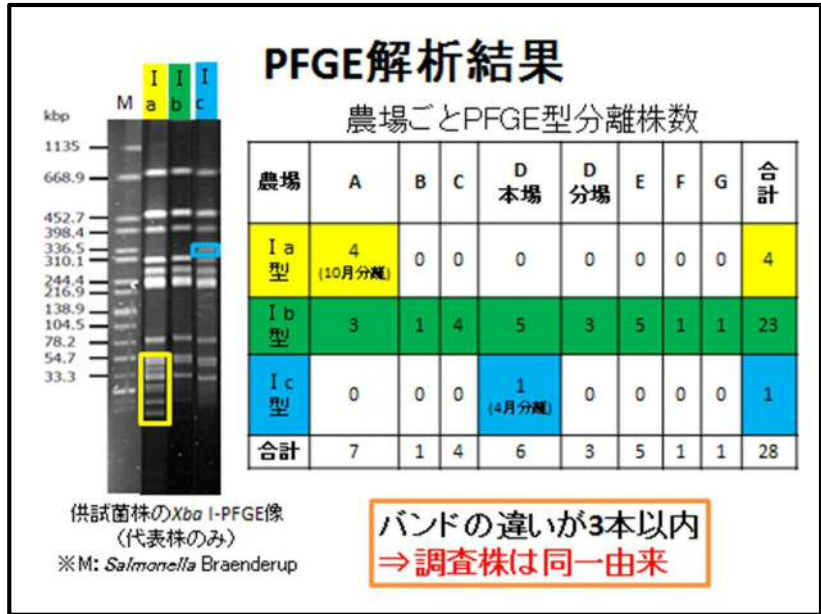


図 3 PFGE 結果

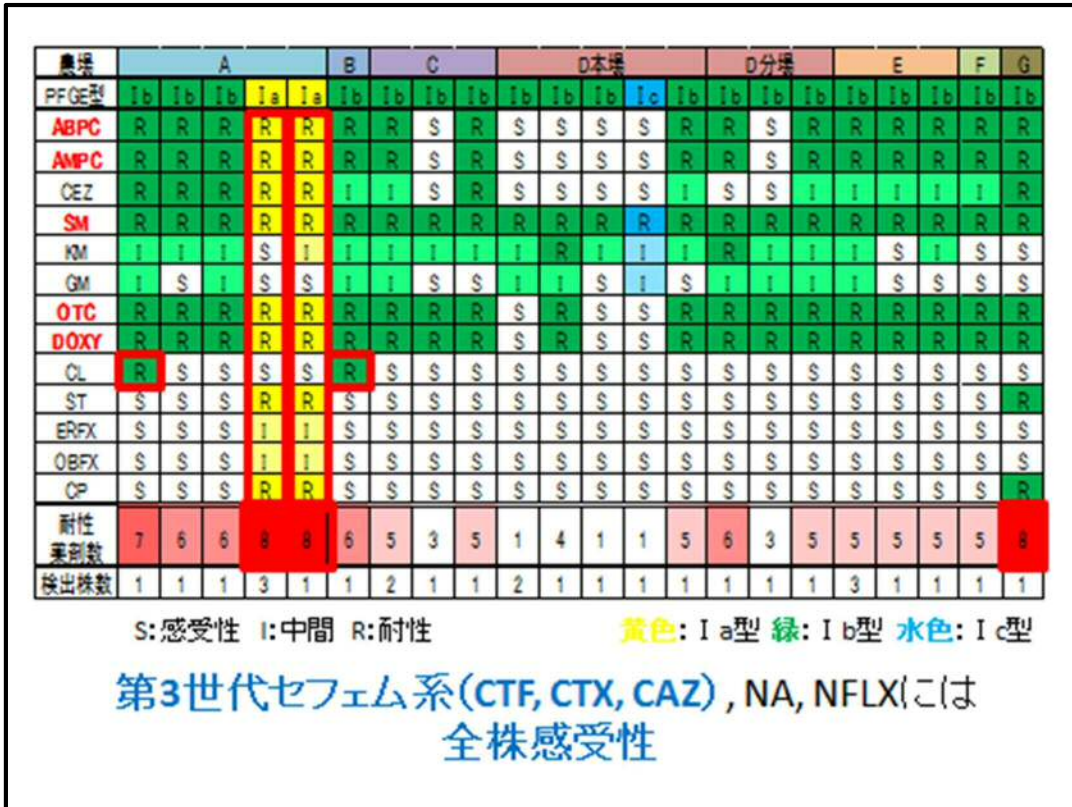


図 4 薬剤感受性試験結果

【考察】

PFGE 解析により 28 株は同一由来と考えられたが、PFGE 型や薬剤耐性パターンには多様性が認められ、供試株は県内に侵入後、伝播する過程で多様化したと考えられた。SNP 型別では全株が 9 型に分類された。9 型は欧州流行株と近縁で、欧州では豚で流行後、牛で流行したことが報告されているが¹⁾、日本国内では豚からの分離も報告されているものの、2012 年以降、主に牛で流行している²⁾。よって、今回本県で分離された非定型 ST 流行株は、本県で地域的に流行していた定型 ST が単相変異化したものではなく、国内で全国的に流行している非定型 ST のクローンだと考えられた。

薬剤感受性については、既報通り SNP9 型の特徴である ABPC, SM, OTC に耐性が認められたが^{1) 2)}、一部、異なる耐性パターンも確認され、FQ 系, CL の耐性化も疑われた。また、FQ 系耐性化が疑われた PFGE I a 型と I b 型のバンドパターンの相違は 50kb 以下の断片に集中していたことから、I a 型は I b 型が新たに薬剤耐性プラスミドを獲得した株である可能性が示唆された。一般的に 9 型の薬剤耐性遺伝子は染色体上に存在するが、今回のようにプラスミドが獲得される可能性も含め、今後も耐性パターンの変化に注意が必要である (図 5)。

欧州では非定型 ST の無症状保菌豚も確認されており、多剤耐性株も存在することから、豚肉を介した人への感染が問題となっている^{1) 2)}。本症を人獣共通感染症としても再認識し、全国的な本症の発生状況を把握し、清浄化に向けた対策を推進するための体制整備が必要と思われる。

【謝辞】

稿を終えるに当たり、今回 PFGE 及び SNP 型別を実施して頂き、ご指導、ご助言を賜りました、動物衛生研究部門の秋庭正人先生、玉村雪乃先生に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) Liljana Petrovska, Alison E. Mather, 1 Manal AbuOun, Priscilla Branchu, Simon R. Harris, Thomas Connor, K.L. Hopkins, A. Underwood, Antonia A. Lettini, Andrew Page, Mary Bagnall, John Wain, Julian Parkhill, Gordon Dougan, Robert Davies,

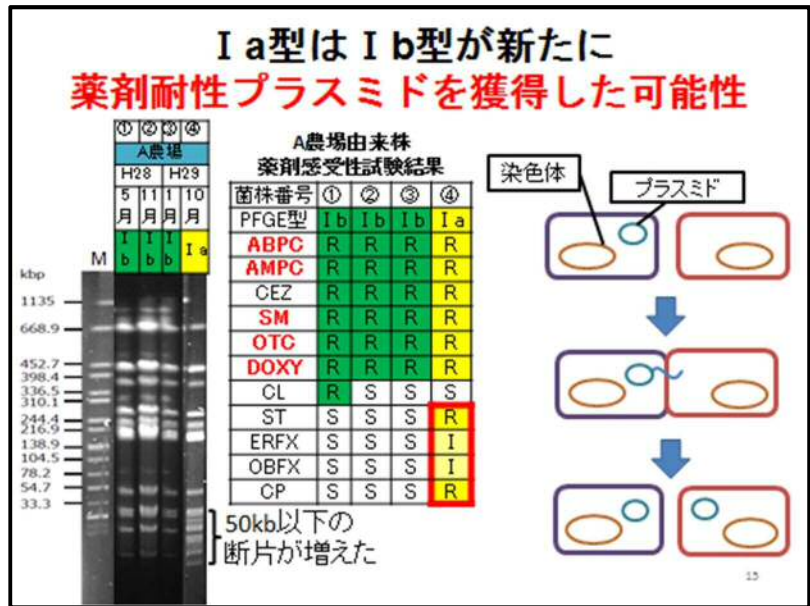


図 5 薬剤耐性プラスミドの獲得について

Robert A. (2016) Kingsley Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010. Emerging Infectious Diseases. www.cdc.gov/eid. 22(4)

2) 秋庭正人 (平成 29 年 3 月 12 日) 平成 28 年度戦略的監視・診断体制整備推進事業 (サルモネラ (4:i:-)) の収集・解析委託事業) 調査報告書