

【はじめに】

家畜のサルモネラ症は種々の血清型のサルモネラに起因する感染症であり、下痢・敗血症を主徴とした急性あるいは慢性の伝染性疾患である。*Salmonella* Typhimurium (ST) はサルモネラ症の原因血清型として重要視されており、家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されている。近年STの2相鞭毛抗原が発現しない変異株である血清型 4:i:- (非定型 ST) の分離頻度が上昇して問題となっているが、非定型STはSTと病原性等性状も同様であることから [1]、平成30年度より非定型STについても、届出伝染病 (ST) として取扱うこととされている [2]。

今回、愛知県内の酪農家 (農場 A) において非定型STによるサルモネラ症が発生した。県内では、平成30年度から令和5年度の間には豚で20事例の非定型STによるサルモネラ症が発生しているが (表1、図1)、牛での同疾患の発生は本事例が初である。これを踏まえ、本事例で分離された牛由来非定型STと本県で過去に分離された豚由来非定型STの薬剤感受性調査及び分子疫学的解析を実施し、牛由来株と豚由来株の関連性について調査した。

表1 愛知県のサルモネラ分離状況 (H28~ R5 年度)

血清型	牛	豚	鶏	計
Typhimurium (O4:i:-)	1	20		21
Choleraesuis (O7:c:1,5)		3		3
Typhimurium (O4:i:1,2)		3		3
Schwarzengrund (O4:d:1,7)			3	3
Pakistan or Litchfield (O8:L,v:1,2)		2		2
Infantis(O7:r:1,5)	1		1	2
Chester(O4:e,h:e,n,x)	1			1
計	3	28	4	35



図1 非定型 ST の発生状況

【材料と方法】

材料として A 農場で非定型STと同定された株及び過去20件の事例で分離された非定型STを用いた (表2)。血清型別はサルモネラ (4:i:-) の同定法マニュアルに基づき [1]、市販免疫血清を用いる従来法と、遺伝子学的検査を用いた非定型STの同定を行った他、県内株と国内流行株の遺伝的背景を比較するため、STをゲノム系統から9つの遺伝子型に区別するアレル特異的 PCR (AS-PCR) による SNP 遺伝子型別を実施した [3]。

畜種及び地域別の薬剤耐性パターンを比較するため、農場 A の環境由来株 7 株及び牛由来株 3 株、過去に同一由来株による続発が確認された同市内の養豚農家 (農場 B、C) 及

び他市町村養豚農家（農場 D、E）由来の非定型 ST4 株について12薬剤（アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、コリスチン、テトラサイクリン、ナリジクス酸、エンロフロキサシン、ST合剤、クロラムフェニコール）を用いた一濃度ディスク拡散法（ディスク法）の結果を比較した。また、各農場分離株の近縁関係を調査するため、農場 A の糞便及び環境由来株と農場 B～E 由来株でパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を利用したゲノム DNA の切断パターンによる分子疫学的解析を実施した。

その他、県内での薬剤耐性傾向をより詳細に調べるため、ディスク法で発育阻止円の大き

表 2 材料

さにばらつきの見られたアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール及びディスク法で正確な判定結果が得られない可能性が指摘されているコリスチンについては[4]、平成28年度から令和5年度までの非定型ST分離全事例から1株ずつ抽出し、寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度（MIC）について調査した。

【牛】				【豚】			
地域	農場	在席	由来	地域	農場	年度	由来
			牛 糞便（下痢症状子牛）	a市	B	H28	回腸
			牛 解剖牛小腸		B	H28	糞便
			環境 南牛舎水バケツ		I	H28	糞便
			環境 北牛舎ウォーターカッブ		K	H28	糞便
			環境 北牛舎畜舎		H	H28	不明
					M	H28	不明
A市	A	R5	牛 糞便（ホル錠）		P	H29	糞便
			環境 農業用水1		Q	H29	不明
			環境 農業用水2		B	H30	糞便
			環境 北牛舎もみ殻由来1		J	H30	小腸
			環境 北牛舎もみ殻由来2		I	H30	糞便
					B	R2	糞便
					C	R2	糞便
					G	R2	糞便
					M	R3	糞便
					B	R5	糞便
				b市	O	R3	肝臓
				c市	F	H30	小腸
				d市	D	H30	小腸
				e市	F	R1	糞便

<span style="border: 1px solid red; display: inline-block; width: 15px; height: 15px;"></span>	ディスク法
<span style="border: 1px solid yellow; display: inline-block; width: 15px; height: 15px;"></span>	PFGE
<span style="border: 1px solid blue; display: inline-block; width: 15px; height: 15px;"></span>	寒天平板希釈法

【結果】

従来法と遺伝子学的検査及び SNP 遺伝子型別の結果、農場 A から分離された株は、2相 H 抗原の発現を規定する遺伝子領域を欠失した非定型STの一塩基多型9型で、その他の豚由来株とも同じだった（表3）。

一濃度ディスク拡散法の結果、A農場由来株に多剤耐性の傾向は認められず、10株すべてがテトラサイクリンにのみ耐性を示した。豚由来株ではそれぞれ0～5剤への耐性が認められ、牛由来株と同様の耐性パターンを示す株はなかった（表4）。

表 3 血清型別及び遺伝子学的検査結果

地域	農場	由来	血清型別試験			Salmonella遺伝子検査			
			O抗原	H抗原1相	H抗原2相	サルモネラ特異的	ST特異的	非定型ST型	SNP型
a市	A	牛	4	i	-	+	+	A,B	9
		牛				+	+	A,B	9
		環境	4	i		+	+		
		環境				+	+		
		環境				+	+	A,B	9
		環境	4	i		+	+	A,B	9
		環境				+	+		
		環境	4	i		+	+		
		環境				+	+		
a市	B	豚	4	i	-	+	+	A,B	9
b市	D	豚	4	i	-	+	+	A,B	9
c市	E	豚	4	i	-	+	+	A,B	9

表 4 ディスク法による薬剤耐性パターン

地域	農場名	由来	アンピシリン	セファゾリン	セフトキシム	ストレプトマイシン	カナマイシン	ゲンタマイシン	コリスチン	テトラサイクリン	ナリジクス酸	エンロフロキサシン	ST合剤	クロラムフェニコール
a市	A	牛	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		牛	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		牛	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
		環境	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
a市	B	豚	R	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	
a市	C	豚	R	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	
b市	D	豚	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	
c市	E	豚	R	S	S	R	I	S	S	R	S	S	R	

S: 感受性 I: 中間 R: 耐性

分子疫学的解析では、PFGEにおいてA農場の牛由来株2株及び環境由来株1株は全て同一泳動パターンを示した。一方、豚由来株との比較ではB、C、D農場由来株3株で7本以上、E農場由来株1株で5本のバンドの相違がみられた。

PFGEの結果はTenoverらの基準に基づき[5]、泳動像でみられるバンドの差異から、同一の流行株である可能性の低いバンド数の差異4本以上をローマ数字で、同一流行株の可能性が高いバンド数の差異3本以下をアルファベットで区別して分類すると、A農場由来株はI、同市内のB、C農場由来株はII a, b、他市内のD、E農場由来株はそれぞれIII、IVに分類された(図2)。

寒天平板希釈法の結果、A農場由来株は使用薬剤すべてに感受性で低いMICを示したのに対し、豚由来株ではアンピシリンで90%、クロラムフェニコールで40%が耐性を示し、特にアンピシリン耐性株はMICも高値を示す傾向があった(表5)。

### 【考察】

従来法と遺伝子学的検査の結果から、A農場由来株及び過去の豚由来株は近年国内で優勢とされている[3]非定型STと同様の遺伝的背景を持つと推測された。またA農場の牛由来株及び環境由来株で同様の薬剤耐性パターンがみられ、PFGE像が一致したことから、農場内に広く同一株が浸潤していると考えられた。一方、A農場由来株と豚由来株とのPFGE像の比較では、バンド3本以内の変異の場合に近縁度が高い同一由来株とすると、牛由来株と豚由来株の由来は異なることが示唆されたが、同市内の養豚農家では疫学関連が示唆された。豚由来株では多剤耐性傾向及び高いMICを示す株が多く、抗菌剤の多用による影

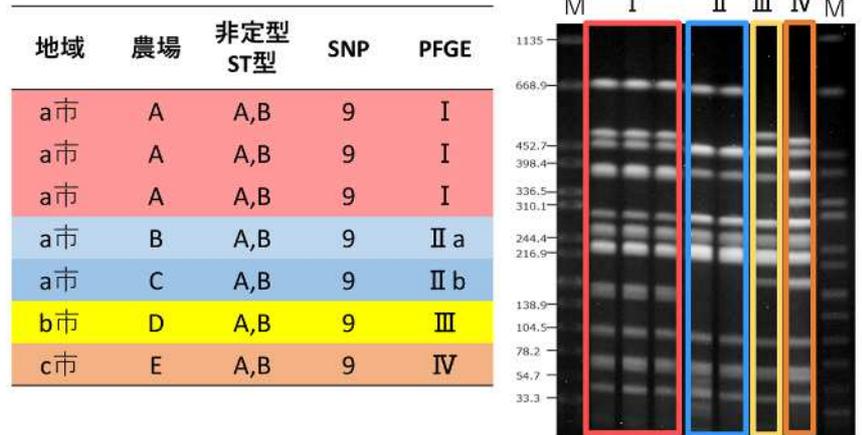


図2 PFGE結果 M: マーカー

表5 寒天平板希釈法による判定結果及びMIC

地域	農場	畜種	由来	アンピシリン		カナマイシン		コリスチン		クロラムフェニコール	
				μg/ml	判定	μg/ml	判定	μg/ml	判定	μg/ml	判定
a市	A	乳牛	ホルスタイン雄	1	S	2	S	2	I	4	S
	A	環境	用水フィルター	2	S	4	S	2	I	4	S
	B	豚	糞便	512<	R	2	S	2	I	256	R
	M	豚	糞便	512<	R	2	S	2	I	256	R
	B	豚	糞便	512<	R	2	S	2	I	256	R
	C	豚	糞便	512<	R	2	S	2	I	256	R
	G	豚	糞便	512<	R	2	S	2	I	256	R
	B	豚	糞便	512<	R	2	S	2	I	256	R
	J	豚	小腸	512<	R	2	S	1	I	4	S
	L	豚	糞便	512	R	2	S	2	I	4	S
	P	豚	糞便	512	R	2	S	2	I	4	S
	Q	豚	不明	512<	R	2	S	2	I	512<	R
	B	豚	回腸	512	R	2	S	2	I	4	S
	B	豚	糞便	512	R	4	S	2	I	4	S
I	豚	糞便	512	R	4	S	1	I	4	S	
K	豚	糞便	1	S	2	S	2	I	4	S	
H	豚	不明	512	R	2	S	1	I	4	S	
M	豚	不明	512	R	2	S	2	I	4	S	
b市	O	豚	肝臓	2	S	2	S	2	I	4	S
c市	E	豚	小腸	512	R	4	S	2	I	4	S
d市	D	豚	小腸	512	R	2	S	2	I	4	S
e市	F	豚	糞便	512	R	2	S	2	I	256	R

S: 感受性 I: 中間 R: 耐性

響が考えられた。これらの薬剤耐性菌が感染すると抗生剤による治療が難しくなることが予想されるため、適切な薬剤選択による治療を行うことで薬剤耐性菌の出現を防ぎ、飼養衛生管理基準の順守による農場内への蔓延を予防及び地域への拡散を今後も防止することが重要である。

#### 【謝辞】

ご助言及びPFGEを実施していただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生部門 細菌・寄生虫領域 腸管病原菌ユニット 新井暢夫先生に深謝いたします。

#### 【参考文献】

- [1] 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課, サルモネラ (4:i:-) の同定法マニュアル, 平成 29 年 10 月 16 日, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 腸管病原菌ユニット
- [2] 農林水産省消費・安全局動物衛生課, サルモネラ (4:i:-) の取り扱いについて, 平成 30年 3月29日, 29 消安第 6791 号
- [3] Arai N, et al. 2018. Phylogenetic Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Its Monophasic Variant Isolated from Food Animals in Japan Revealed Replacement of Major Epidemic Clones in the Last 4 Decades. *J. Clin. Microbiol.* 56:e01758-17.
- [4] Simner PJ, et al. 2020. Two-Site Evaluation of the Colistin Broth Disk Elution Test To Determine Colistin In Vitro Activity against Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol* 57 (2): e01163-18.
- [5] Tenover FC, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* Sep;33(9):2233-9.