

多剤耐性サルモネラ菌の耐性遺伝子の耐性出現頻度の解析

Thuy Nguyen

畜産学研究科畜産衛生学専攻環境衛生学講座（博士後期課程1年）

1. 目 的

サルモネラ菌は世界の主要な食品媒介病原体として知られており、動物由来食品の汚染は人間のサルモネラ感染症の主要原因である。最近、人間と動物において、抗生物質は広く使用されており、耐性菌の出現の大きな要因となっている。特に、1984年に最初にイギリスで検出された多剤耐性サルモネラ、*S. Typhimurium* DT104が出現し問題となってきた。耐性遺伝子が他の細菌種に容易に水平伝播し、その結果、耐性菌により人間や動物の化学療法に深刻な障害になる可能性が危惧されている。日本でも、薬剤耐性サルモネラが広範囲に拡がっている。この研究では、十勝地方の豚において、サルモネラの汚染状況の把握と薬剤耐性菌の出現、および耐性遺伝子の伝播について研究を行い、食肉から人へ耐性菌が移る可能性について検討した。

2. 方 法

帯広市の食肉検査所で計103個の糞便、および1個の肉のサンプルが集められ、サルモネラの検出を試みた。サンプル各0.1gを0.9mlのバッファペプトン水と混合し、18時間、37℃で培養した。翌日、培養液の0.1mlを10mlのラパポート培地（関東化学株式会社）に接種し、24時間、42℃で培養した。培養液の一部をDHL寒天（栄研化学株式会社）とCHROMagar TM *Salmonella*（関東）上で培養した。サルモネラの同定には、TSI培地（栄研）とLIM培地（栄研）が使用された。サルモネラ血清型別は、*Salmonella* 診断用抗血清（デンカ生研）によって決定された。

分離されたサルモネラの薬剤耐性を調べるために、センシディスク（Becton Dickinson）を使用した。使用方法はマニュアルに従った。以下に示す8種類の抗生物質に対するディスクを使用した：ampicillin (Am) 10 µg, chloramphenicol (Cm) 30 µg, kanamycin (Km) 30 µg, nalidixic acid (Nal) 30 µg, streptomycin (Sm) 10 µg, sulfisoxazole (Su) 250 µg, tetracycline (Tc) 30 µg および gentamicin (Gm) 10 µg。次に、分離されたサルモネラの遺伝学的相関性を調べるために、制限酵素 *Xba*I と *Bln*I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols.htm>) の方法に従って行った。

S. Typhimurium は抗生物質に耐性であったので、No.7株がRプラスミドを保有しているかどうか、液体およびフィルタによる伝達接合試験で調べた。受容菌は大腸菌 C600 (Rif^r) と *S. Typhimurium* LT2 (Nal^r) 株を使用し、No.7株をドナー株として使用した。L-ブロスを基礎培地として使用した。ドナー株と受容株を混合し、transconjugant は Rif100 µg/ml もしくは Nal50 µg/ml を含む DHL 寒

天上で、さらに Am100 µg/ml, Tc30 µg/ml, Cm30 µg/ml および Km50 µg/ml を含む DHL 寒天上で選択した。ネズミ体内で耐性遺伝子が伝達するかどうかを、*S. Typhimurium* No.7株と *S. Typhimurium* LT2株の同量をネズミ体内に経口的に接種し、耐性遺伝子を獲得した LT2株を糞便から分離し、頻度を調べた。

3. 結 果

全てのサンプルのうち15サンプルから、サルモネラが分離された。血清型別による内訳は、*S. Typhimurium* が 7 (6.7%), *S. Derby* が 2 (1.9%), *S. Southampton* が 2 (1.9%), そして *Salmonella* (O4:d, -) が 4 (3.8%) 検体の分離であった (表1)。*S. Typhimurium* は4農場から分離された。薬剤耐性については、分離された *S. Typhimurium* は全てが1~5種類の抗生物質に耐性があったが、他の血清型は調べた種類の抗生物質に対して感受性であった (表1)。多剤耐性 *S. Typhimurium* に関して、DT104に特異的なプライマーセット、DT104-F (5'-GTCAGCAGTGTATGGAGCGA-3') と DT104-R (5'-AGTAGCGCCAGGACTCGTTA-3'), によるPCRを行ったが、DT104は分離できなかった。PFGE解析では、*Bln*I および *Xba*I 切断により、5パターンに分類された (表1, 図1, 図2, 図3)。さらにタイプ X2と B2は、わずかの差により3パターンに分類された (表1, 図1)。また、すべての株のプラスミドプロフィールを調べても、わずかの差はあるものの、大きいプラスミドを保有していた。伝達試験の結果、Am, Km および Tc 耐性 transconjugant は、大腸菌 C600と *S. Typhimurium* LT2では約 10^{-3} の頻度で得られた。ネズミを用いた伝達試験の結果、Km と Tc 耐性の transconjugant は *S. Typhimurium* LT2で、約 10^{-6} の頻度で分離された。

4. 考 察

分離された農場や日付が同じで、薬剤耐性パターンが異なっているにもかかわらず、*S. Typhimurium* No.1株のPFGEパターンは、No.11 and No.14株と同じパターンを示していた (表1, 図1)。同様に、*S. Southampton* No.10株と No.15株のPFGEパターンはお互いほとんど同じであった (表1, 図3)。また、農場IIでは、分離日付が2週間の間隔があったにもかかわらず、4株の *Salmonella* (O4:d) では同じPFGEパターンを示した (表1, 図2, 図4)。これらの結果は、似た遺伝子型をもつサルモネラが北海道でブタと農場の中で既に広まっていることを示しているのかもしれない。また、DT104は一般的に人間や牛から分離されてきたので、日本のブタの中で広くあまり分布していないのかもしれない。

ネズミの体内で耐性遺伝子が他の菌に伝達したことは、抗生物質耐性菌が腸管に存在すると、様々な抗生物質の耐性菌が新たに発生すると考えられる。抗生物質は、医療や獣医療分野で必須なので、耐性菌の出現は感染症の治療の大きい障害となる。今回、薬剤耐性遺伝子が生体内で移行したので、食品を介して薬剤耐性病原体による人間への健康被害が起こるかもしれない。

キーワード：サルモネラ, 薬剤耐性, 豚

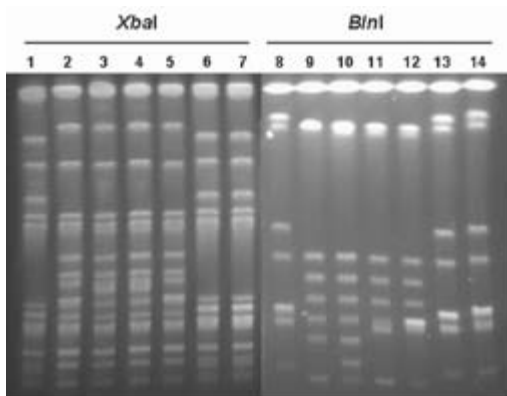


Figure 1: PFGE pattern of *S. Typhimurium* isolates. Total DNA of isolates No. 1 (lanes 1 and 8), No. 2 (lanes 2 and 9), No. 4 (lanes 3 and 10), No. 6 (lanes 4 and 11), No. 7 (lanes 5 and 12), No. 11 (lanes 6 and 13), No. 14 (lanes 7 and 14) was digested with *Xba*I (lanes 1 to 7) or *Bln*I (lanes 8 to 14).

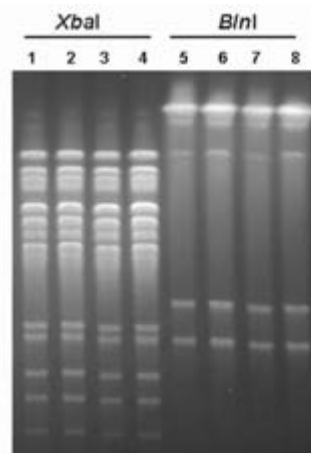


Figure 2: PFGE patterns of *Salmonella* UT(O4:d-) isolates. DNA of isolates No. 3 (lanes 1 and 5), No. 5 (lanes 2 and 6), No. 8 (lanes 3 and 7), No. 9 (lanes 4 and 8) was digested with *Xba*I (lanes 1 to 4) or *Bln*I (lanes 5 to 8).

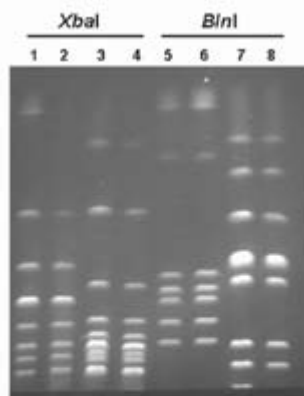


Figure 3: PFGE patterns of *S. Southampton* and *S. Derby*. DNA isolates No. 10 (lanes 1 and 5), No. 15 (lanes 2 and 6), No. 12 (lanes 3 and 7), No. 13 (lanes 4 and 8) was digested with *Xba*I (lanes 1 to 4) or *Bln*I (lanes 5 to 8). Lane M: *S. cerevisiae* DNA as the size marker.

Table 1. Antimicrobial resistance patterns and genotypes of *Salmonella* isolates

Isolats	Isolation date	Source	Farm	Resistant pattern	PFGE pattern		Ability of conjugal transfer
					<i>Xba</i> I	<i>Bln</i> I	
<i>S. Typhimurium</i> No.1	2006/12/14	Stool	I	CmSu	X1	B1	—
<i>S. Typhimurium</i> No.2	2006/12/14	Meat	II	AmKmSuTc	X2a	B2a	—
<i>S. Typhimurium</i> No.4	2006/12/14	Stool	II	AmKmSuTc	X2b	B2b	—
<i>S. Typhimurium</i> No.6	2006/12/14	Stool	II	AmKmSuTc	X2b	B2c	—
<i>S. Typhimurium</i> No.7	2006/12/14	Stool	II	AmKmSuTcSm	X2a	B2c	+
<i>S. Typhimurium</i> No.11	2006/12/15	Stool	III	Su	X1	B1	NT
<i>S. Typhimurium</i> No.14	2006/12/15	Stool	IV	Su	X1	B1	NT
<i>Salmonella</i> (O4 : d, -) No.3	2006/12/14	Stool	II	—	X3	B3	NT
<i>Salmonella</i> (O4 : d, -) No.5	2006/12/14	Stool	II	—	X3	B3	NT
<i>Salmonella</i> (O4 : d, -) No.8	2006/12/21	Stool	II	—	X3	B3	NT
<i>Salmonella</i> (O4 : d, -) No.9	2006/12/21	Stool	II	—	X3	B3	NT
<i>S. Southampton</i> No.10	2006/12/21	Stool	II	—	X4	B4	NT
<i>S. Southampton</i> No.15	2006/12/21	Stool	V	—	X4	B4	NT
<i>S. Derby</i> No.12	2006/12/15	Stool	VI	—	X5	B5	NT
<i>S. Derby</i> No.13	2006/12/15	Stool	VI	—	X5	B5	NT

NT : Not tested