

[ノート]

鶏肉及び人から分離された *Salmonella* Infantis の薬剤感受性試験 及び分子疫学解析

西海弘城* 辻英高 福永真治 山岡政興

Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis
isolated from chicken and human

Hiroki NISHIUMI*, Hidetaka TSUJI, Masaharu HUKUNAGA and Masaoki YAMAOKA

Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and
Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We used antimicrobial susceptibility and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to study the genetic relatedness of 19 isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) isolated from chicken and human. All isolates from chicken were at least resistant to streptomycin and tetracycline. PFGE was able to discriminate between chicken and human isolates of *S. Infantis*. PFGE was useful as epidemiological tools for *S. Infantis*. Moreover, antibiotic patterns of *S. Infantis* corresponded to that of PFGE considerably.

はじめに

サルモネラは腸炎ピブリオと並んで我が国における主要な食中毒原因菌の一つである。近年、サルモネラに汚染された鶏卵や卵加工品を原因食品とした食中毒が多発し、大きな社会問題となっている。一方、食肉も重要なサルモネラ感染源と考えられており、特に鶏肉では 20～50%がサルモネラで汚染されている^{1,2,3)}。*Salmonella* Infantis(以下 *S. Infantis*)は、鶏肉から頻りに分離されるサルモネラの一つであり、近年の薬剤耐性菌の増加傾向と合せてサルモネラ感染症を拡大させるのではないかと考えられている。

そこで、兵庫県下で分離された *S. Infantis* について、薬剤感受性試験を実施すると共にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いて遺伝子型別を試み、疫学的解

析における本法の有用性について検討した。また、薬剤感受性パターンと遺伝子型別との関連性についても検討を行った。

材料と方法

1. 菌株

2004年4月から2005年6月に県内で市販されている鶏肉から分離された *S. Infantis* 16株及び定期検診で健康保菌者から分離された3株を試験に供した。

2. 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会(NCCLS)の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準⁴⁾に基づき、市販の感受性試験用ディスク(センシディスク:BD)を用いて行った。使用薬剤はアンピシリン(ABPC; 10µg)、セフトキシム(CTX; 30µg)、ゲンタマイシン(GM; 10µg)、カナマイシン(KM; 30µg)、ストレプトマイシン(SM; 10µg)、テトラサイクリン(TC; 30µg)、シプロフロキサシン(CPFX; 5µg)、ナリジクス酸(NA; 30µg)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム

感染症部

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究センター
感染症部 西海弘城

合剤(SXT; 23.75/1.25 µg), クロラムフェニコール(CP; 30 µg), トリメトプリム(TMP; 5 µg), ホスホマイシン(FOM; 50 µg)の12剤を用いた。

3. 薬剤耐性遺伝子の解析

SM 耐性遺伝子(*aadA1*), TC 耐性遺伝子(*tetA*)について, それぞれの遺伝子に特異的なプライマー(Table 1)を用いてPCRにより検出を行った。PCR反応は95 5分変性後, 95 30秒, 60 30秒, 72 30秒を1サイクルとして35サイクルの増幅を行い, さらに72 で7分間追加伸長反応を行った。

Table 1. PCR primers used in this work

Gene	Size(kb)	Primer	Sequence 5'-3'	Reference
<i>aadA1</i>	526	aadA1F	GTGGATGGCGGCTGAAG	Sandvang et al (5)
		aadA1B	ATTGCCAGTCGGCAGCG	
<i>tetA</i>	210	tetAF	GCTACATCTGCTTGCCTT	Ng et al(6)
		tetAB	CATAGATCGCCGTGAAGA	

4. PFGE 法による遺伝子解析

Tryptosoy broth で一晩静置培養し Ribot らの方法⁷⁾ に準じてプラグを作成した。プラグは 30U の *Bln* 及び *Xba* I で 37 , 2 時間処理した。電気泳動は, 0.5×TBE buffer, 1%アガロースゲル, 電圧 6V/cm, パルスタイム 2.2-54.2 秒, 泳動時間 19 時間で CHEF DR II (BIO-RAD) を用いて行った。泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, 切断パターンを比較した。菌株間の相違は 2 つの菌株において共有される DNA 断片の割合 (Dice 係数: S_D) を計算することによって調べた。この Dice 係数は, 公式: $S_D = 2 n_{xy} / (n_x + n_y)$ に従って計算した。 n_x は分離菌株 X からの DNA 断片総数, n_y は分離菌株 Y からの DNA 断片総数, n_{xy} は 2 つの分離菌株で共通の DNA 断片数を示す。この S_D 値が 1.0 に近いほど, それら 2 つの分離株は近縁種であることを示す。算出された Dice 係数をもとにデンドログラムを UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) 法で MEGA 3⁸⁾ を用いて作成し, 菌株間の相関を比較した。

結 果

1. 兵庫県で分離された *S. Infantis* の薬剤感受性

兵庫県における 2004 年 9 月から 2005 年 4 月にかけて分離された鶏肉由来株は, すべてが薬剤耐性株であり, それぞれ 2 剤以上の多剤耐性を示した (Table 2)。鶏肉由来株は 5 剤耐性が最も多く (7 株: 44%), 以下 4 剤耐性 (4 株: 25%), 2 剤耐性 (3 株: 19%) の順で, 3 剤耐性と 6 剤耐性が 1 株 (6%) ずつだった。薬剤耐性パターンは, 同一販売店由来の菌株間ではお互いに同一で, 7 つの店由来

Table 2. Drug resistance pattern of *S. Infantis* strains isolated from chicken and human

Resistance Pattern	Number of isolates (%)	
	Human	chicken
ABPC, KM, SM, TC, SXT, TMP		1(6)
ABPC, SM, TC, SXT, TMP		3(19)
KM, SM, TC, SXT, TMP		4(25)
SM, TC, SXT, TMP		4(25)
KM, SM, TC		1(6)
SM, TC	1(33)	3(19)
Susceptible	2(67)	
Total	3(100)	16(100)

の菌株は 6 つのパターンを示した (Table 3)。

一方, 健康保菌者由来株 3 株のうち 2 株は, すべての薬剤に感受性を示し, 1 株は SM 及び TC の 2 剤に対して耐性を示した (Table 2, 3)。兵庫県で分離された鶏肉及び人由来の *S. Infantis* 19 株のうち 17 株はすべて, 少なくとも SM と TC の 2 剤以上に耐性を示し, すべての薬剤耐性株からは, SM 耐性遺伝子 *aadA1* 及び TC 耐性遺伝子 *tetA* が検出された。一方, 人から分離された感受性株 2 株からはいずれの耐性遺伝子も検出されなかった。

Table 3. Characteristics of *S. Infantis* isolated from chicken and human.

No.	Shop	Source	Resistance Pattern	PFGE	
				<i>Bln</i>	<i>Xba</i>
1	A	Chicken	KM, SM, TC	B1	X1
2		Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
3		Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
4	B	Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
5		Chicken	SM, TC, SXT, TMP	B2	X2
6		Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
7		Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
8	C	Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
9		Chicken	KM, SM, TC, SXT, TMP	B3	X2
10	D	Chicken	ABPC, KM, SM, TC, SXT, TMP	B4	X3
11		Chicken	SM, TC	B5	X4
12	E	Chicken	SM, TC	B5	X4
13	F	Chicken	SM, TC	B3	X5
14		Chicken	ABPC, SM, TC, SXT, TMP	B6	X3
15	G	Chicken	ABPC, SM, TC, SXT, TMP	B6	X3
16		Chicken	ABPC, SM, TC, SXT, TMP	B7	X6
17	-	Human	SM, TC	B8	X7
18	-	Human	Susceptible	B9	X8
19	-	Human	Susceptible	B10	X9

2. 兵庫県で分離された *S. Infantis* の PFGE による遺伝学的解析

PFGE による解析の結果, 33.3~668.9kb に出現したバンド数は *Bln* I では 7~11 本, *Xba* I では 16~20 本だった。これらのうち 1 本でも差異が見られた場合, それぞれ異なるパターンとし, 任意に B1~B10 (*Bln* I), X1~X9 (*Xba* I) と分類した (Fig. 1, 2)。鶏肉由来株 16 株は *Bln* I で 7 種類 (B1~B7), *Xba* I で 6 種類 (X1~X6) のパターンを示した。複数の菌株が分離された 4 販売店のうち 3 店の菌株の PFGE パターンは *Bln* I, *Xba* I いずれで処理された場合においてもお互いに同一であったが, G 店の 3

株は2種類のパターンが混在していた (Table 3, 4). 健康保菌者由来株3株は *Bln* I 及び *Xba* I でそれぞれ3種類 (B8 ~ B10, X7 ~ X9) のパターンを示し, 鶏肉由来株と PFGE パターンが一致する例は見られなかった. UPGMA 法で菌株間の相関を調べたところ, 88%の similarity で *Bln* I では5つクラスターに (Fig.3), *Xba* I では4つのクラスターに分かれた (Fig.4). また, *Bln* I の10パターンでは5.5%以上, *Xba* I の9パターンは84.7%以上の相関を示した (Fig.3, 4).

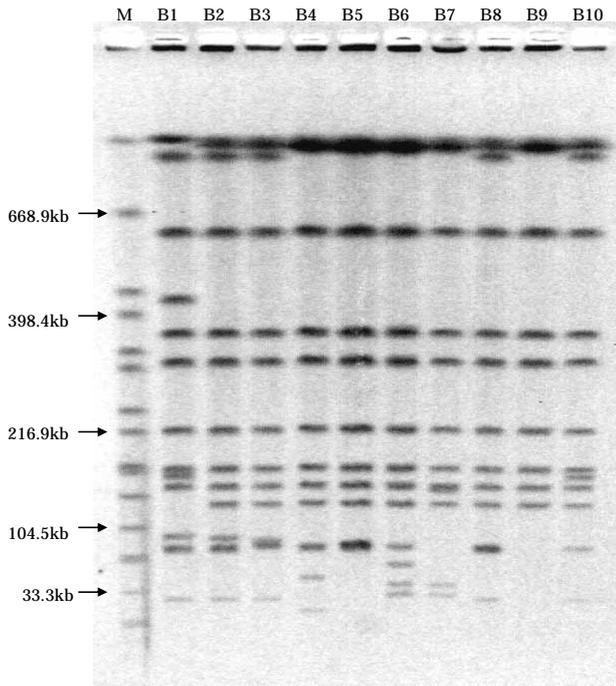


Fig.1. PFGE pattern of *Bln* I-digested chromosomal DNA of *S. Infantis*.
B1 to B7 : isolated from chicken, B8 to B10: isolated from human.
M: *Xba* I-digested chromosomal DNA of *S. Braederup* H9812

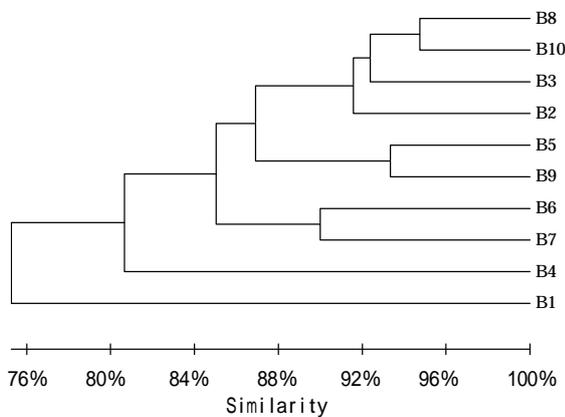


Fig.3. Dendrogram illustrating the clustering of PFGE patterns of *S. Infantis* genomic DNA digested with *Bln* I.

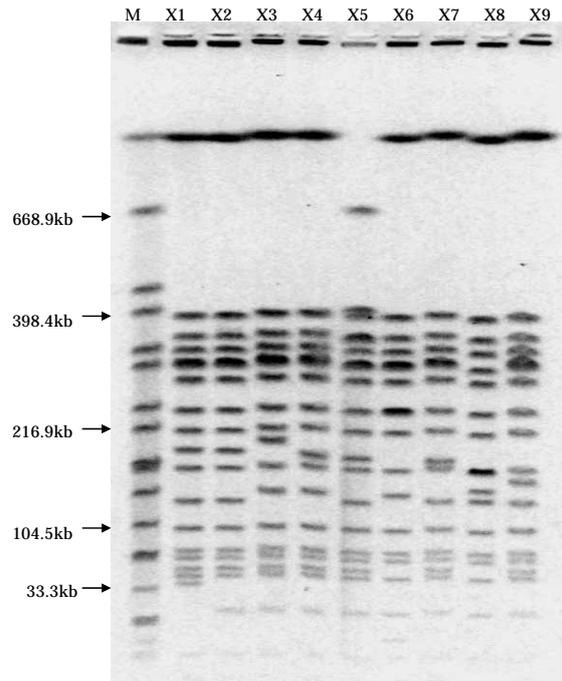


Fig.2. PFGE pattern of *Xba* I-digested chromosomal DNA of *S. Infantis*.
X1 to X6 : isolated from chicken, X7 to X9: isolated from human.
M: *Xba* I-digested chromosomal DNA of *S. Braederup* H9812

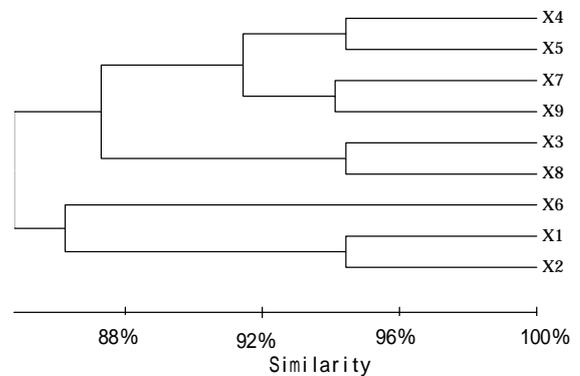


Fig.4. Dendrogram illustrating the clustering of PFGE patterns of *S. Infantis* genomic DNA digested with *Xba* I.

Bln I と *Xba* I の PFGE の結果を二次元で解析した (Table 4). B3 を示した5菌株はさらに X2 と X5 に分類された. これに対して, X2 に属する8株は B2 と B3 に分けられ, X3 を示した3株は B4 と B6 に分けられ, *S. Infantis* 19 株は 11 種類のパターンに分類された (Table 3, 4).

Table 4. Classification of types in isolated *S. Infantis* based on PFGE patterns with restriction enzyme, *Bln* I and *Xba* I

		:isolated from chicken									:isolated from human	Number of strains
		<i>Xba</i> I										
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9		
<i>Bln</i> I	B1	1									1	
	B2		4								4	
	B3		4				1				5	
	B4			1							1	
	B5				2						2	
	B6			2							2	
	B7						1				1	
	B8								1		1	
	B9									1	1	
	B10										1	
Number of strains		1	8	3	2	1	1	1	1	1	19	

3. 薬剤感受性による型別及び *Bln* I と *Xba* I の二次元解析による型別間の相関

兵庫県の鶏肉及び人から分離された *S. Infantis* 19 株の薬剤感受性による型別を *Bln* I と *Xba* I を使用した PFGE パターンの型別と比較した (Table 3) . 薬剤耐性パターンは 6 つ、二次元 PFGE パターンでは 8 つに分類された . 販売店 A ~ D 由来の 10 菌株においては、薬剤感受性と二次元 PFGE パターンが一對一に対応し、販売店ごとに異なっていた . 販売店 E, F 由来の 3 株は SM と TC の 2 剤耐性株で、薬剤感受性では区別できなかったが、PFGE では店によって B5/X3 と B3/X5 に分けられた . 販売店 G 由来の 5 剤耐性 3 株は 2 群に分かれた . また、PFGE の二次元解析により、鶏肉由来株と人由来株はお互いに異なる領域に位置した (Table 4) .

考 察

安藤ら⁹⁾は鶏から分離された *S. Infantis* 28 株の薬剤感受性を調べた結果、全ての株が SM と TC を含む 2 剤以上の薬剤に対して耐性を示したと報告している . また、中村ら¹⁰⁾は人及び鶏から分離された *S. Infantis* 65 株の薬剤感受性を調べた結果、食中毒由来株及び 1 株を除く健康保菌者由来株は全て感受性を示し、鶏由来株は少なくとも SM と TC の 2 剤に対して耐性を示したと報告している . 一方、竹田ら¹¹⁾は散発下痢症患者の他、鶏、豚等の動物から分離された *S. Infantis* 70 株の薬剤感受性を調べ、散発下痢症患者由来 6 株中 5 株及び豚由来株 1 株を除く動物由来 63 株が多剤耐性株であり、多剤耐性株は SM と TC を含む 2 剤以上の薬剤に対して耐性を示したと報告している . 今回、鶏肉由来株は全ての株が SM と TC

を含む 2 剤以上の薬剤に対して耐性を示し、これらの報告と一致した . また、鶏肉由来株がすべて多剤耐性を示したのに対し、健康保菌者由来 3 株のうち 2 株は薬剤感受性を示したことから、健康保菌者から分離された *S. Infantis* は鶏肉とは異なる経路による感染であることが示唆された . 薬剤感受性試験の結果から得られたこの鶏肉由来株と人由来株に差異が存在するとした示唆を PFGE による分子生物学的解析によって明確に証明することができた . 以上の結果から PFGE による分子生物学的解析は *S. Infantis* の疫学解析のための有力な手段となることが分かった . また、人由来あるいは鶏肉由来を問わず薬剤耐性株はすべて SM と TC を含む薬剤に対して耐性を示し、他の報告と一致したことから、我が国の鶏は SM 及び TC 耐性遺伝子を獲得した *S. Infantis* が広く侵淫していることが示唆された .

Bln I または *Xba* I による PFGE 法による 2 次元解析を行った結果、鶏肉由来株は由来毎に区別することができた . 一方、今回分離された菌株の PFGE パターンは、健康保菌者由来株を含めて *Bln* I では 75.5% 以上、*Xba* I では 84.7 % 以上の高い相似性を示しており、遺伝学的に非常に近縁なものが広く分布していると考えられた .

S. Infantis は、鶏肉から頻繁に分離されるサルモネラの一つであり、サルモネラ感染症を拡大させる新たな原因となりうると思われる . また、近年、*S. Infantis* の多剤耐性について問題となっており、今後も、菌株数を増やし、有症者由来株も加えて、この血清型の動向を監視し続けていく必要がある .

要 旨

鶏肉および人から分離された *S. Infantis* 菌株間で薬剤感受性試験及び PFGE による DNA 切断パターンの比較を行った。鶏肉由来株はすべて少なくとも SM 及び TC を含む耐性株だった。PFGE による遺伝学的解析によって鶏肉及び人由来の *S. Infantis* は互いに異なることが明確に示され、PFGE は *S. Infantis* の疫学マーカーとして十分な解析力を有することがわかった。また、薬剤耐性パターンと遺伝子型別はほぼ一対一での関連性が示された。

謝 辞

菌株の収集に協力いただいた県下健康福祉事務所の関係諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 山中千恵子, 山本恭子, 森田陽子, 中尾昌史, 梅迫誠一, 市村國俊: 食肉におけるサルモネラ, カンピロバクター, エルシニア, リステリアの検出状況. 奈良衛研年報, **28**, 116-119(1994)
- 2) 安岡富久, 高橋富世, 出口祐男: プロイラー・鶏肉におけるカンピロバクターおよびサルモネラ菌の検出. 高知衛研報, **41**, 37-41(1995)
- 3) 保科健, 糸川浩司, 福島博, 板垣朝夫, 五明田孝: 食肉の流通過程における *Salmonella* 汚染状況. 島根衛公研所報, **35**, 29-33(1993)
- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Approved Standard M2-A7. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 7th ed. NCCLS, Wayne, Pa. (2000)
- 5) Sandvang, D. Aarestrup, F. M. Jensen, L. B.: Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 37-41(1998)
- 6) Ng, L. K. Mulvey, M. R. Martin, I. Peters, G. A. Johnson, W.: Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 3018-21. (1999)
- 7) Ribot, E. M. Fitzgerald, C. Kubota, K. Swaminathan, B and Barret, T. J.: Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*, **39**, 1889-1894 (2001)
- 8) Kumar, S. Tamura, K. Nei, M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, **5**, 150-163(2004)
- 9) 安藤陽子, 小野一晃, 辻りえ, 増谷寿彦, 藤原有紀子, 倉園貴至, 柳川敬子: 市販鶏肉のサルモネラ汚染調査と *Salmonella* *Infantis* の PFGE 法による解析. 日本食品微生物学雑誌, **20**, 123-127(2003)
- 10) 中村寛海, 長谷篤, 石井營次: 大阪市内で分離されたヒトおよび鶏由来 *Salmonella* *Infantis* の薬剤感受性. 大阪市環科研所報, **66**, 59-63(2004)
- 11) 竹田義弘, 東久保靖, 小川博美: 広島県内の動物と散発事例患者から分離されたサルモネラの疫学的比較検討. 広島県保環センター研報, **10**, 19-27(2002)