

12 県内で分離された *Salmonella* Typhimurium の

SNP 型別と PFGE による分子疫学的解析

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○木村 祐介 齋藤 豪
奈良 史子 林 敏展
佐藤 尚人 森山 泰穂
渡部 巖

1 はじめに

近年になり *Salmonella* Typhimurium(以下、定型 ST)の単相変異株 o4:i:- (以下、非定型 ST)の分離数増加が見られている¹⁾。非定型 ST は、県内においても平成 12 年以降、鶏、豚、牛などから分離されており、特に平成 22 年以降は牛からの分離が増加している (図 1)。

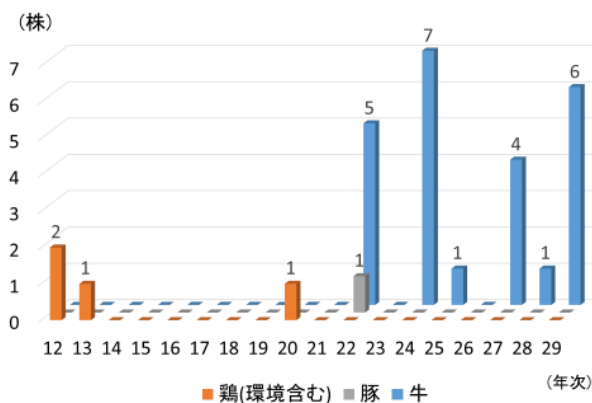


図 1 非定型 ST の分離状況

当所においては、これまで、渡邊らが牛由来の非定型 ST と定型 ST の性状比較²⁾、太田らが非定型 ST の薬剤感受性と分子疫学的解析³⁾を行ってきた。

非定型 ST の病原性は定型 ST と同程度と

考えられているが¹⁾、平成 29 年度以前は届出対象の血清型ではなかったために、発生状況が把握できず防疫上問題となっていた。そのため、秋庭らにより全国的な調査、検査手法の検討¹⁾が行われ、平成 30 年度以降、非定型 ST は届出対象の血清型となった。

SNP とは、一塩基多型と訳され、一塩基の変異が遺伝子上に複数箇所存在することによって生じる多様性をいい、遺伝的背景を調べる DNA マーカーや遺伝性疾患の予測医療、肉用牛の肉質改善等に利用されている。定型 ST と非定型 ST は、多箇所の SNP を系統解析した情報と、分離された地域、動物、年などの疫学情報を照らし合わせることで、大きく 9 つの集団に分類できる。

現在、それぞれの集団に特異的な SNP を検出する 9 種類のアリル特異的 PCR(以下、AS-PCR) が構築されたことで⁴⁾、PCR による SNP 型別が可能となった。

今回は定型・非定型 ST について、新たに構築された SNP 型別と薬剤感受性試験およびパルスフィールドゲル電気泳動(以下、

PFGE) を実施し、県内の定型 ST が非定型 ST に変異した可能性について検討した。

2 材料

平成 12 年から 29 年に県内で分離された株を、由来、分離時期から選別した。

定型 ST については、乳牛由来 2 株、豚由来 4 株、採卵鶏由来 1 株、採卵鶏環境由来 1 株、合鴨環境由来 2 株、ネズミ由来 1 株、ペンギン由来 1 株の 12 株を用いた。

非定型 ST については、乳牛由来 3 株、肉牛由来 6 株、豚由来 1 株、採卵鶏環境由来 1 株、肉用鶏環境由来 1 株、肉用鶏由来 1 株の 13 株を用いた。

3 方法

(1) ST および変異同定

再確認のため、非定型 ST の同定法マニュアルに基づき、ST 同定用 IS200PCR と、変異同定用 PCR を実施し、相誘導および H 型別は常法に従い実施した。

(2) SNP 型別

9 つの SNP 型について AS-PCR⁴⁾ を実施した。

(3) 薬剤感受性試験

以下の 12 薬剤について一濃度ディスク拡散法で実施した。アンピシリン(ABPC)、セファゾリン(CEZ)、セフォタキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、コリスチン(CL)、ST 合剤(ST)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)

(4) PFGE

制限酵素に Xba I を用い PulseNet の方法

⁵⁾ に準じて実施し、系統樹解析は動物衛生研究部門に依頼した。

4 成績

(1) ST および変異同定

定型 ST 全株について ST 同定用 PCR と変異同定用 PCR で陽性、2 相 H 抗原は 1, 2 を確認し、非定型 ST 全株について ST 同定用 PCR で陽性、変異同定用 PCR で陰性を確認した。

(2) SNP 型別

定型 ST については、1 型に 4 株、6 型に 2 株、3 型に 4 株、5 型に 2 株が分類された。SNP 型ごとに整理すると、1 型は乳牛とネズミおよび採卵鶏由来、3 型は豚由来、5 型は合鴨環境由来、6 型はペンギンと採卵鶏環境由来となった (表 1)。

表 1 定型 ST の SNP 型

| SNP型 | No. | 分離年 | 由来 |
|------|-----|-----|-------|
| 1 | 3 | H15 | 乳牛 |
| 1 | 4 | H15 | ネズミ |
| 1 | 5 | H19 | 乳牛 |
| 1 | 10 | H25 | 採卵鶏 |
| 3 | 2 | H13 | 豚 |
| 3 | 6 | H22 | 豚 |
| 3 | 9 | H24 | 豚 |
| 3 | 11 | H27 | 豚 |
| 5 | 1 | H12 | 合鴨環境 |
| 5 | 8 | H24 | 合鴨環境 |
| 6 | 7 | H23 | ペンギン |
| 6 | 12 | H27 | 採卵鶏環境 |

なお、SNP 型と分離年に関係性は見られなかった。

非定型 ST では、平成 22 年以前に分離された株は 8 型、平成 24 年以降に分離された牛由来株は 9 型に分類された (表 2)。

表 2 非定型 ST の SNP 型

| No. | 分離年 | 由来 | SNP型 |
|-----|-----|-------|------|
| 13 | H12 | 採卵鶏環境 | 8 |
| 14 | H13 | 肉用鶏環境 | 8 |
| 15 | H20 | 肉用鶏 | 8 |
| 16 | H22 | 乳牛 | 8 |
| 17 | H22 | 豚 | 8 |
| 18 | H24 | 肉牛 | 9 |
| 19 | H24 | 乳牛 | 9 |
| 20 | H24 | 肉牛 | 9 |
| 21 | H25 | 肉牛 | 9 |
| 22 | H27 | 乳牛 | 9 |
| 23 | H27 | 肉牛 | 9 |
| 24 | H28 | 肉牛 | 9 |
| 25 | H29 | 肉牛 | 9 |

(3) 薬剤感受性試験

定型 ST では、いずれかの薬剤に耐性が見られたのは 1 型と 3 型であった。1 型のうち、乳牛とネズミ由来株が ABPC、CEZ、SM、TC、CP の 5 剤に耐性を示していた。3 型は 4 株中 3 株が SM、TC に耐性を示していた(表 3)。

表 3 定型 ST の薬剤感受性

| SNP 型 | No. | 分離年 | 由来 | ABPC | CEZ | CTX | KM | GM | SM | TC | CP | CL | ST | NA | CPFX |
|-------|-----|-----|-------|------|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| 1 | 3 | H15 | 乳牛 | R | R | I | I | S | R | R | R | S | S | S | S |
| 1 | 4 | H15 | ネズミ | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S |
| 1 | 5 | H19 | 乳牛 | R | R | I | I | S | R | R | R | S | S | S | S |
| 1 | 10 | H25 | 採卵鶏 | S | I | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S |
| 3 | 2 | H13 | 豚 | S | I | S | I | S | R | R | R | S | S | S | S |
| 3 | 6 | H22 | 豚 | S | I | S | I | S | R | R | R | S | S | S | S |
| 3 | 9 | H24 | 豚 | S | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S |
| 3 | 11 | H27 | 豚 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | R | S |
| 5 | 1 | H12 | 合鴨環境 | S | I | I | I | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 5 | 8 | H24 | 合鴨環境 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 6 | 7 | H23 | ペンギン | S | I | I | I | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 6 | 12 | H27 | 採卵鶏環境 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S |

S 感受性 I 中間 R 耐性

非定型 ST では、8 型は、肉用鶏環境由来の 1 株がアミノグリコシド系に耐性を示していた。9 型は全株が ABPC、CEZ、SM、TC に耐性を示し、コリスチンに耐性を示す株も見られた (表 4)。

表 4 非定型 ST の薬剤感受性

| SNP 型 | No. | 分離年 | 由来 | ABPC | CEZ | CTX | KM | GM | SM | TC | CP | CL | ST | NA | CPFX |
|-------|-----|-----|-------|------|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|
| 8 | 13 | H12 | 採卵鶏環境 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 8 | 14 | H13 | 肉用鶏環境 | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S | S | S |
| 8 | 15 | H20 | 肉用鶏 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 8 | 16 | H22 | 乳牛 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 8 | 17 | H22 | 豚 | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S | S |
| 9 | 18 | H24 | 肉牛 | R | R | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S |
| 9 | 19 | H24 | 乳牛 | R | R | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S |
| 9 | 20 | H24 | 肉牛 | R | R | I | S | S | R | R | S | S | I | I | S |
| 9 | 21 | H25 | 肉牛 | R | R | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S |
| 9 | 22 | H27 | 乳牛 | R | R | I | I | S | R | R | S | S | S | S | S |
| 9 | 23 | H27 | 肉牛 | R | R | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S |
| 9 | 24 | H28 | 肉牛 | R | R | S | S | S | R | R | S | S | S | S | S |
| 9 | 25 | H29 | 肉牛 | R | R | I | I | S | R | R | S | R | S | S | S |

S 感受性 I 中間 R 耐性

(4) PFGE

定型 ST は SNP 型によって特徴的なパターンは確認できなかったが、非定型 ST では 8 型と 9 型で泳動パターンが明確に分かれていた。

PFGE 系統樹解析において、SNP 型と PFGE の関係性を見ると、同じ SNP3 型でも異なる PFGE パターンを示す株や、SNP 5 型と SNP 6 型のように異なる SNP 型でも似た PFGE パターンを示す株が見られた。

また、定型 ST と非定型 ST とに近縁性は見られなかった (図 2)。

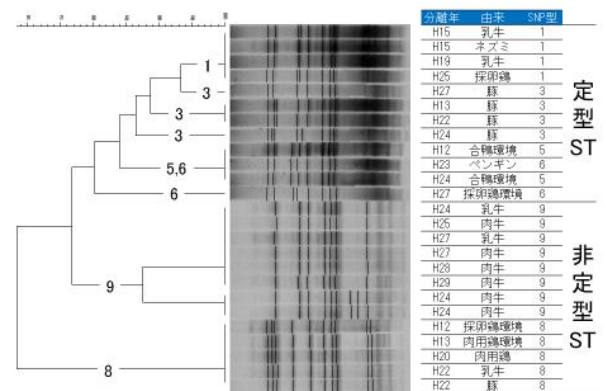


図 2 PFGE 系統樹解析

5 まとめ及び考察

定型 ST の SNP 型は 1、3、5、6 型に分類され、1 型は主に牛から、3 型は豚から、5 型は合鴨環境から、6 型はペンギン、鶏環境から分離され、それぞれの型ごとに由来動物が異なる傾向がみられた。

また、非定型 ST の SNP 型は平成 22 年以前の分離株は 8 型に、平成 24 年以降の分離株は 9 型に分類され、定型 ST と非定型 ST に共通の SNP 型は認められなかった。

既報⁴⁾では国内の定型および非定型 ST の流行型は、6、2、1、7、8 型と入れ代わり変遷し、現在は欧州クローンと近縁の 9 型が流行していると言われている。平成 24 年以降の県内牛由来株は SNP9 型であり、国内の流行と一致した。

SNP8 型は平成 12 年から 22 年まで分離されているが起源は不明だった。

薬剤感受性については、定型 ST は 1、3 型の多くが多剤耐性を示していた。非定型 ST は SNP9 型全株が ABPC、CEZ、SM、TC に耐性を示し、既報³⁾の典型的薬剤耐性型のほか、CEZ にも耐性が認められたが、その獲得過程は不明だった。

定型 ST と非定型 ST を比較すると、SNP 型が異なり、PFGE 系統樹解析でも近縁性がないことから、県内の定型 ST が非定型 ST に変異した可能性は低いと考えられた。

なお、近縁性の比較は、同じ SNP 型でも異なる PFGE パターンを示す株や、異なる SNP 型でも似た PFGE パターンを示す株が見られたことから、SNP 型別をした上で PFGE を実施するのが有効と思われた。

今後、全国的な流行の傾向を把握しつつ、今後分離される株についても継続して調査

し、防疫体制の強化に繋げていきたい。

最後に PFGE 系統樹解析を実施して頂いた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 腸管病原菌ユニットの玉村雪乃先生に深謝する。

<参考文献>

- 1) 秋庭ら：平成28年度戦略的監視・診断体制整備推進事業（病原体（サルモネラ（4:i:-））の収集・解析委託事業）調査報告書(2017)
- 2) 渡邊ら：青森県家畜保健衛生業績発表会(2010)
- 3) 太田ら：青森県家畜保健衛生業績発表会(2015)
- 4) Arai Nら：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, 2018 Apr 25; 56(5). e01758-17
- 5) <https://www.cdc.gov/pulsenet/index.html>