

3 調査研究 3・1 報 文

1) 熊本県産の野生猪から分離された多剤耐性 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* biotype *Kunzendorf*

戸田純子*1, 原田誠也, 西村浩一*2, 大迫英夫

要旨

2016年2月に検査した県内の1頭の野生の猪の肝臓から、ペニシリン、オキサシリン、アンピシリン、セファロチン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン及びST合剤に耐性の *Salmonella Choleraesuis* biotype *Kunzendorf* を分離した。本分離株はTEM-1型のペニシリナーゼ遺伝子を保有していた。食用である野生の猪の肝臓から本菌が検出されたことから、人が多剤耐性サルモネラに曝露される可能性が示唆された。

キーワード：野生猪, *Salmonella Choleraesuis*, 多剤耐性

はじめに

サルモネラ属菌は家畜に下痢や敗血症を引き起こす細菌で、*Salmonella enterica* subsp.*enterica* Dubulin, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 及び *S. Choleraesuis* (以下、「SC」という)による家畜の牛、豚、猪、鶏等の疾病は“サルモネラ症”として家畜伝染病予防法に定める届出伝染病とされている。国内における豚のサルモネラ症は届出対象とされた1998年以降から毎年発生しており、2001年度の2,647頭の届出を境に減少傾向であるが、年間300頭前後の届出があり¹⁾、主要なサルモネラの血清型は *S. Typhimurium* 及び *S. Choleraesuis* biotype *Choleraesuis* である²⁾。熊本県においても1999年の発生から年間1～数頭の豚サルモネラ症の届出がなされているが³⁾、家畜猪については報告がない。また、野生猪についても、届出義務の対象外であることから、サルモネラ症についての知見はない。

熊本県では食品の安全性を確保するため、食品衛生法により微生物学的な成分規格が定められていない食品等を対象として、モニタリング検査を行っている。例年、県内で捕獲された猪及びシカ等の野生鳥獣肉について、細菌数、大腸菌群、サルモネラ属菌(定性)

及びE型肝炎ウイルス(定性)のモニタリング検査を2008年から実施しており、これまで合計123検体(猪50頭(筋肉49検体、肝臓23検体)、鹿34頭(筋肉33検体、肝臓18検体))について検査を行った(Table 1)。今回、2016年2月に検査した県内の野生猪肝臓から、人にも感染し敗血症を引き起こすことが知られている *S. Choleraesuis* biotype *Kunzendorf* (以下、「SCK」という)を初めて分離したので報告する。

材料と方法

1. モニタリング検査の検体

2016年2月に搬入された野生の猪8頭(筋肉8検体、肝臓4検体)及び鹿2頭(筋肉2検体、肝臓1検体)を検査材料とした。

2. サルモネラ属菌検査

「食品、添加物等の規格基準に定めるサルモネラ属菌及び黄色ブドウ球菌の試験法の改正について」⁵⁾に示された方法に準じて行った。

3. 生菌数、大腸菌群及びカンピロバクター属菌検査 食品衛生検査指針2015²⁻⁴⁾に準じて行った。

*1 現 県北広域本部保健福祉環境部(菊池保健所)

*2 現 環境生活部環境保全課

4. E型肝炎ウイルス (HEV) 検査

細切した検体 2g を滅菌 PBS (-) (日水製薬 (株), 東京) で 50% 乳剤とし, 10,000rpm, 10 分間遠心した。上清 50 μ l から AGPC 法で RNA を抽出し, 20 μ l の DEPC 水 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) に溶解した。これを鋳型として, Li らの方法⁵⁾により HEV 遺伝子の検査を行った。

5. サルモネラ属菌の薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準⁷⁾に基づき, Kirby - Bauer法により市販の感受性試験用ディスク (センシディスク, Becton Dickinson, New Jersey, USA, 及び, KBディスク, 栄研化学 (株), 東京) を用いて行った。使用薬剤はペニシリン (PCG; 10 U), オキサシリン (MIPIC; 1 μ g), アンピシリン (ABPC; 10 μ g), セファロチン (CET; 30 μ g), セフォタキシム (CTX; 30 μ g), セフトジジム (CAZ; 30 μ g), セフォキシチン (CFX; 30 μ g), セフメタゾール (CMZ; 30 μ g), セフミノクス (CMNX, 30 μ g), イミペネム (IPM, 10 μ g), メロペネム (MPEM, 10 μ g), ゲンタマイシン (GM; 10 μ g), カナマイシン (KM; 30 μ g), ストレプトマイシン (SM; 10 μ g), アミカシン (AMK; 30 μ g), テトラサイクリン (TC; 30 μ g), クロラムフェニコール (CP; 30 μ g), ナリジクス酸 (NA; 30 μ g), ノルフロキサシン (NFLX; 10 μ g), オフロキサシン (OFLX; 5 μ g), シプロフロキサシン (CPFEX; 5 μ g), S T 合剤 (ST; 23.75 μ g/1.25 μ g) の 22 剤である。判定は, ディスク添付の判定表に基づき, 阻止円の直径により, S を感受性, R または I を耐性とした。

6. β -ラクタマーゼ阻害薬の影響の確認

β -ラクタマーゼ阻害薬の影響があるか確認するため, Double-Disk Synergy test (DDST)⁸⁾ に準じて検査を行った。対象とする薬剤は, 耐性が認められた, ペニシリン系 3 剤 (PCG, MIPIC, ABPC) 及び第一世代セファロsporin 1 剤 (CET) であり, β -ラクタマーゼ阻害薬として, スルバクタム/アンピシリン (SBT/ABPC) (Becton Dickinson), 及びアモキシシリン/クラブラン酸 (ACV) (栄研化学 (株)) の各種ディスクを用い, β -ラクタマーゼ阻害薬による阻止円の拡張の有無を確認した。

7. β -ラクタマーゼ遺伝子検査法

TEM-型, SHV-型⁹⁾, 及び CTX-M-1, -2, -9 group¹⁰⁾ を増幅するプライマーを用いて, PCR法により β -ラクタマーゼ遺伝子を検出した。得られた PCR 産物を PCR 産物

精製キット (ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-UP, Affymetrix, Santa Clara, USA) で精製し, シークエンサー (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers, Thermo Fisher Scientific) を用いたダイレクトシークエンシング法により塩基配列を決定した。得られた配列を Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) により相同性検索を行った。

結 果

1. サルモネラ分離と分離株の生化学的性状及び血清学的診断

今回の検査では, TT 培地から ES サルモネラ II 寒天培地上に塗抹した場合のみに桃色に発色したサルモネラの定型的集落認められた。釣菌した 3 つの集落はいずれも TSI 寒天培地において斜面アルカリ性, 高層酸性, 硫化水素産生性, ガス非産生性, LIM 培地においてリジン脱炭酸試験陽性, インドール反応陰性, 運動性陽性を呈した。また, 生化学的性状試験の結果, オキシターゼ陰性, VP 試験陰性, クエン酸利用能陽性, ONPG 試験陰性を呈し, ゼラチン液化能及びソルビトール分解性を呈した。一方, マロン酸, 粘液酸塩, d-酒石酸及び尿素利用能は陰性で, ズルシトール, サリシン及びラクトースは非分解であった (Table 2)。さらに, 血清型が (O6, 7:c:1, 5) であったことから SCK と同定した。なお, この肝臓と同一個体の筋肉からサルモネラ属菌は検出されなかった。

2. 生菌数, 大腸菌群, カンピロバクター属菌及び HEV 検査

肝臓の生菌数は 5CFU/g であり, 大腸菌群及びカンピロバクター属菌は陰性であった。HEV は検出されなかった。

3. 薬剤耐性試験

分離された SCK は, ペニシリン系薬剤 3 剤 (PCG, MIPIC, ABPC), 第一世代セファロsporin 1 剤 (CET), アミノグリコシド系の 2 剤 (SM, GM) 及び ST に耐性を示した (Table 3)。

4. β -ラクタマーゼ阻害薬の影響

阻止円の見られなかった ABPC 単剤に比べ, β -ラクタマーゼ阻害薬を含む SBT/ABPC では阻止円の拡張が認められた。また, SBT/ABPC を用いた DDST で, CET に阻止円の拡張が見られた。一方 ACV を用いた DDST では, PCG, ABPC, CET において阻止円の拡張が認められた。

5. β-ラクタマーゼ遺伝子の検査

SCK 分離株から TEM-型遺伝子のみが検出され、得られた配列は TEM-1 のラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）（Accession No. AHB36963）と 99%の相同性を示した。

考 察

SCは宿主特異性が比較的高いサルモネラであり、宿主は豚である¹¹⁾。SCには3つの生物型があり、硫化水素を産生しない biotype Choleraesuis、硫化水素を産生する biotype Kunzendorf 及び硫化水素を産生しズルシトールを分解する biotype Decatur に区別されている。本邦における豚サルモネラ症は、SCを原因とするものが増加傾向にあり、関東では、biotype Choleraesuis が優勢であるのに対し、九州、近畿及び四国では、SCKが優勢である¹²⁾。また、豚から分離されたSCには、SM・TCの2剤ABPC・SM・GM・ST and/or OTCの4剤もしくは5剤、さらにNAもしくはCPを加えた5剤、6剤、AMPC・DSM・KM・SM・TC・STの6剤等といった多剤耐性株の報告^{1, 13-15)}があり、Matayoshiら¹³⁾による薬剤耐性遺伝子の調査では、β-ラクタマーゼ遺伝子としてTEM型のみが検出されている。

一方Sasakiら¹⁶⁾は、野生の猪121頭の細菌学的調査を行い、東海地方、関東及び四国で捕獲された猪の腸内容物9検体（7.4%）から、ジヒドロストレプトマイシン（DSM）の1剤もしくはオキシテトラサイクリン（OTC）を加えた2剤に耐性の*S. Agona*, *S. Narashino*, *S. Infantis* 及び*S. Thompson*を分離したが、SCは分離していない。国内で初めての猪におけるSC分離報告は、大石らが平成24年度全国家畜保健衛生業績抄録に記載した、山口県内の猪を飼養している農場で発生した事例であるが、これは家畜の猪からの分離事例であり、これまでに野生の猪からSCは分離されていなかった。

今回我々は、本邦において初めて野生の猪からSCを分離した。この株は、ペニシリン系3剤（PCG, MPIP, ABPC）、第一世代セファロスポリン系1剤（CET）、アミノグリコシド系2剤（SM, GM）及びSTに耐性を示す多剤耐性菌であった。本株のβ-ラクタマーゼは、ペニシリン系と第一世代セファロスポリン系薬剤に耐性を示し、クラブラン酸等のβ-ラクタマーゼ阻害剤の影響を受け、薬剤TEM-1型のペニシリナーゼ遺伝子が検出されたことから、本株はBush-Jacobyの分類¹⁷⁾における2bのペニシリナーゼであると考えられた。本菌が多剤耐性であったことから、豚が保有する多剤耐性のSCが野生の猪へ偶発的に感染した可能性や、さらには、野生の猪の間で保菌されている可能性が示唆された。

SCが分離された猪は、捕獲の際に行動的異常はなく、解体処理後の筋肉、肝臓にも肉眼的な病変は認められなかった。肝臓の生菌数は5CFU/g、大腸菌群、カンピロバクター属菌及びHEVは陰性であった。さらに、肝臓の検査は、表面をトリミングした内部の組織を用いたことから、SCは肝臓表面ではなく肝臓内部に保菌されていたものと考えられた。なお、今回は糞便の検査を行っていないため、実際に猪の糞便中にSCが排菌されていたのか不明であるが、腸肝循環によって腸管内にも保菌され、排便時に排菌されることが考えられた。サルモネラは糞便及び環境中で長期間生存することが知られており¹⁷⁾、糞中に排泄されたSCが野外環境を長期にわたり汚染すれば、人、器具器材あるいは車両、また、野鳥やネズミなどの小型野生動物や節足動物を介して養豚場へ侵入する可能性が考えられる。

SCは人に対しても病原性を有し、菌血症や転移性病巣感染を引き起こすことがある。人のSC感染例は、本邦においても、数例ではあるが報告されている¹⁸⁾。今回、野生の猪の肝臓がSCに汚染されていたことから、猪肉を喫食する際には十分に加熱すること、獣肉処理の従事者は、とさつ解体時にSCに曝露される危険性があることから、十分に汚染防止に留意して作業に当たること、さらには、今後も衛生指導を強化していく必要があることが示唆された。

今後も、モニタリング検査を継続し、野生獣肉の安全性と注意すべき点を関係者に啓発していきたい。

Table 1. Result of microbiological monitoring in wild boar and wild deer in Kumamoto Prefecture, Japan

Season	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	Total
No. of animals (No. of samples)									
Wild boar	0	0	9 (m=9, l=7)	7 (m=7, l=3)	7 (m=7, l=1)	11 (m=10, l=3)	8 (m=8, l=5)	8 (m=8, l=4)	50 (m=49, l=23)
Wild deer	3 (m=3)	3 (m=3, l=3)	8 (m=8, l=4)	6 (m=6, l=4)	4 (m=4, l=2)	4 (m=3, l=1)	4 (m=4, l=3)	2 (m=2, l=1)	34 (m=33, l=18)
<i>Salmonella</i>									
No. of samples	3	6	28	20	14	17	20	15	123
No. of positive samples	0	0	0	0	0	0	0	1	1
No. of positive animal species (organs)								B (l): 1	B (l): 1
Standard plate count									
No. of samples	3	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	17	20	15	35
cfu (/g)						<300 - 530,000	<300 - 1,085,000	≤15 - 5,400,000	≤15 - 5,400,000
Faecal coliforms									
No. of samples	3	6	28	20	14	17	20	15	123
No. of positive samples	0	3	14	11	3	3	7	5	46
No. of positive animal species (organs)									
			B (m): 1	B (m): 2		B (m): 2	B (m): 2	B (m): 1	B (m): 8
			B (l): 2			B (l): 1	B (l): 2	B (m, l): 2	B (l): 5
			B (m, l): 2	B (m, l): 2	B (m, l): 1		B (m, l): 1		B (m, l): 8
			D (m): 1	D (m): 2	D (m): 1		D (m): 1		D (m): 5
			D (l): 1	D (l): 1					D (l): 2
			D (m, l): 1	D (m, l): 2	D (m, l): 2				D (m, l): 5
<i>Campylobacter</i>									
No. of samples	3	6	28	20	14	17	20	15	123
No. of positive samples	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hepatitis E virus									
No. of samples	3	6	28	20	14	17	20	15	123
No. of positive samples	0	0	1	1	1	0	0	0	3
No. of positive animal species (organs)									
			B (m): 1		B (m): 1				B (m): 2
									B (l): 1

m: muscles, l: livers, B: wild boar, D: wild deer, N. T.: Not tested

Table 2. Comparison of biochemical characteristics between the isolated strain and reference *S. Choleraesuis*

Test	The isolated strain	<i>S. Choleraesuis</i>		
		Choleraesuis	Kunzendorf	Decatur
TSI	K/A ¹⁾	K/A	K/A	K/A
H ₂ S (TSI)	+	-	+	+
Gas (TSI)	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-
VP	-	-	-	-
Simmons citrate	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	+
Lactose	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+
Malonate	-	-	-	-
Gelatinase	+	+	+	+
<i>d</i> -tartrate	+	+	+	+
Mucate	-	-	-	+

1) K: Alkaline, A: Acid

Table 3. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test of the isolated strain

Antimicrobial	Drug Content (µg)	Result	
Penicillins	Penicillin (PCG)	10 U ¹⁾	R ²⁾
	Oxacillin (MIPIC)	1	R
	Ampicillin (ABPC)	10	R
Cephalosporins	Cefalotin (CET)	30	R
	Cefotaxime (CTX)	30	S ³⁾
	Ceftazidime (CAZ)	30	S
Cephamycins	Cefoxitin (CFX)	30	S
	Cefmetazole (CMZ)	30	S
	Cefminox (CMNX)	30	S
Carbapenems	Imipenem (IPM)	10	S
	Meropenem (MEPM)	10	S
β-lactam antibiotic mixtures	Amoxicillin / Clavulanate (AMPC / CVA)	10 / 20	S
	Sulbactam / Ampicillin (SBT / ABPC)	10 / 10	R
Aminoglycosides	Streptomycin (SM)	10	R
	Gentamicin (GM)	10	R
	Kanamycin (KM)	30	S
	Amikacin (AMK)	30	S
	Erythromycin (EM)	15	R
	Tetracycline (TC)	30	S
	Chloramphenicol (CP)	30	S
Quinolones	Nalidixic acid (NA)	30	S
	Norfloxacin (NFLX)	10	S
	Ofloxacin (OFLX)	5	S
	Ciprofloxacin (CPFX)	5	S
Others	Sulfamethoxazole / Trimethoprim (ST)	23.75 / 1.25	R

1) U: Unit, 2) R: Resistant, 3) S: Susceptible

引用文献

- (1) Asai T, Namimatsu T, Osumi T, Kojima A, Harada K, Aoki H, Samashima T, Takahashi T: Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis isolates from diseased pigs in Japan, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 109-119 (2010) .
- (2) 鶴飼良平: 衛生指標菌, 食品衛生検査指針微生物編 2015, 150-214, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2015) .
- (3) 鶴飼良平: カンピロバクター, 食品衛生検査指針微生物編 2015, 312-315, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2015) .
- (4) 鶴飼良平: サルモネラ, 食品衛生検査指針微生物編 2015, 180-191, 公益社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2015) .
- (5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 (平成27年7月29日付け食安発0729第4号)
- (6) Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat, *Emerg Infect Dis*, 11, 1958-1960 (2005) .
- (7) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Susceptibility Testing Process, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 12th ed. 15-39, National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA (2015)
- (8) Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis*, 10, 867-878 (1988) .
- (9) Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y: A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan, *FEMS Microbiol Lett*, 184, 53-56 (2000) .
- (10) Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y: PCR classification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan, *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 791-795 (2006) .
- (11) Chiu CH, Su LH, Chu C: *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment, *Clin Microbiol Rev*, 17, 311-322 (2004) .
- (12) Asai T: *Salmonella* Choleraesuis infection in swine, *All About Swine*, 36, 16-18 (2010) .
- (13) Matayoshi M, Kitano T, Sasaki T, Nakamura M: Resistance phenotypes and genotypes among multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis strains isolated between 2008 and 2012 from slaughter pigs in Okinawa Prefecture, Japan, *J Vet Med Sci*, 77, 705-710 (2015) .
- (14) Esaki H, Morioka A, Ishihara K, Kojima A, Shiroki S, Tamura Y, Takahashi T: Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002) : report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program, *J Antimicrob Chemother*, 53 (2) , 266-270 (2004) .
- (15) Sakano C, Morita Y, Goto K, Yokota Y, Annaka H, Fujita M, Kobatake S, Ishioka T, Hoshino T, Boonmar S, Pulsrikarn C, Nishina A, Kozawa K, Yamamoto S, Kimura H: Prevalence and Genotype of *Salmonella* Choleraesuis in Gunma Prefecture, Japan, *Thai J Vet Med*, 41 (3) , 321-326 (2011) .
- (16) Sasaki Y, Goshima T, Mori T, Murakami M, Haruma M, Ito K, Yamada Y: Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan, *Foodborne Pathog Dis*, 10, 985-991 (2013) .
- (17) Bush K, Jacoby GA: Updates functional classification of β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 969-976 (2010) .
- (18) 浅井鉄夫: 豚のサルモネラ症の現状と対策, 日獣会誌, 58, 780-784 (2005) .