

【総 説】

牛サルモネラ症由来株の分子疫学的解析

玉 村 雪 乃 内 田 郁 夫

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 北海道支所

(〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4番地)

サルモネラ

サルモネラはグラム陰性通性嫌気性菌で、腸内細菌科の一属に属する細菌である。本菌は *Salmonella enterica*、*S. bongori*、*S. subterranea* の3菌種に分類され⁽¹²⁾、*S. enterica* はさらに6亜種に分類される。また、菌体抗原 O 抗原と鞭毛抗原 H 抗原の組み合わせにより約2700の血清型に区別される。人および動物のサルモネラ症原因菌の多くは、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* に含まれる。ネズミチフス菌は *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium であるが、煩雑であるため、*Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) と簡略化して表記することが多い。

サルモネラ属菌は血清型ごとに、動物宿主域と病原性の程度に違いがある。特定の動物のみに強毒で、全身性のチフス用疾患や敗血症を起こす血清型として、*S. Typhi* (人の腸チフス)、*S. Paratyphi A* (人のパラチフス)、*S. Gallinarum* (家禽チフス)、*S. Pullorum* (ひな白痢)、*S. Abortusequi* (馬パラチフス) などがある。特定動物にチフス用疾患を起こすほか、人や他の動物に急性胃腸炎または敗血症を起こす血清型として、*S. Typhimurium*、*S. Enteritidis* (人の腸炎、牛の下痢・敗血症、鶏パラチフス)、*S. Choleraesuis* (豚のサルモネラ症)、*S. Dublin* (牛の流産・敗血症) などがある。さらに上記以外の血清型で、特定の宿主域はないが人および動物に急性胃腸炎を起こすものがある。

サルモネラの病原性に関わる様々な因子が報告されている⁽⁵⁾。腸管粘膜への付着および定着、上皮細胞侵入性、マクロファージ殺菌抵抗性、血清(補体)抵抗性等が知られており、マウスに対する病原性には少なくとも60の遺伝子が関与しているといわれている⁽¹⁵⁾。このうちゲノム上の *Salmonella* pathogenicity island (SPI) とよばれる遺伝子領域が注目され、腸管上皮細胞への侵

入や、マクロファージ内での生存および増殖に関与している。また、サルモネラはマウスに対する致死性等に関与している血清型特異的なプラスミドを保有しており、*S. Typhimurium*、*S. Dublin*、*S. Enteritidis* はそれぞれ94kb、75kb、54kbのプラスミドを保有している。

牛のサルモネラ症

種々の血清型の *Salmonella* に起因する感染症で、下痢・敗血症を主徴とした急性、あるいは慢性の伝染性疾病である。牛のサルモネラ症では *S. Typhimurium*、*S. Dublin*、*S. Enteritidis* の3血清型によるものが届出伝染病に指定されている。現在最も多く分離される血清型は *S. Typhimurium* だが、近年上記の3血清型以外による牛のサルモネラ症も増加傾向にある。世界各国で発生があり、常在化している地域もある。なかでも、イギリス、フランス、アメリカ、カナダなどの欧米各国で増加傾向にある。

感染は主に経口感染によるが、子宮、結膜、呼吸器などからも侵入する。経口感染したサルモネラは胃を通過し小腸に達し、そこで増殖する。菌は腸管粘膜上皮細胞に侵入し、腸炎を誘発する。さらにマクロファージに貪食され、リンパ管から血行性に全身に広がり、敗血症を誘発する。このような経過の推移は、感染菌の血清型や宿主の免疫能力により異なる。菌は糞便だけでなく、乳汁や膣分泌物中にも含まれ、排出された菌により汚染された敷きわら、飼料、飲み水などが感染源となる。その他に牛以外の保菌動物、衛生昆虫なども汚染拡大の要因となる。

子牛での感染は胃腸炎型が最も多く、症状が激しく死亡率も高い。発熱、食欲不振、悪臭のある黄色下痢便、粘血便、削瘦、脱水、ときに肺炎等の症状を示し、急性例では敗血症により数日以内に死亡する。回復しても予後不良となる場合が多い。慢性例では、関節腫脹や神経

症状を呈することがある。下痢便には多量のサルモネラが含まれており、回復後も長期間保菌して、間欠的に排菌する。成牛では、*S. Typhimurium* による搾乳牛の症例が最も多い。症状は子牛と同様、発熱、下痢、時に肺炎がみられ、重症例では死に至る。泌乳牛では産乳量低下と投薬による牛乳出荷停止により、経済的被害は甚大となる。また、発症した妊娠牛の一部で流産がみられる。特に *S. Dublin* の感染は、妊娠後期の牛、特に黒毛和種に早・流産を引き起こす。

成牛型サルモネラ症の増加

牛のサルモネラ症は、以前は子牛に下痢・肺炎症をもたらす疾病であり、成牛での発生は散発的であった。しかし近年、成牛、特に搾乳牛における *S. Typhimurium* 感染症の発生が増加し、酪農経営に大きな被害を与えている。北海道においては、1987年から乳用牛での発生が認められるようになった。1992年から発生が増加し始め、1994年には発生数が109戸632頭にまで増加し、肉用牛における発生よりも圧倒的に多くなった⁽⁷⁾。その後発生は減少したものの、2001年以降再び増加傾向にある。これらの乳用牛での発生は、哺育牛や育成牛にも認められるが、ほとんどが成牛である。原因となる血清型は年々多様化しているが、*S. Typhimurium* によるものが最も多く、全体の約80%を占めている。このような成牛のサルモネラ症の発生は、同時期に全国的なレベルで増加した。また、わが国だけでなく、欧米でも同様な増加傾向が認められる。フランスにおける成牛のサルモネラ症発生件数は、1986～1987年では253件であるのに対し、1988～1989年では680件となり、著しい増加が認められた⁽¹⁰⁾。同様に、英国、オランダ、米国においても1990年代になってからの成牛における発生例の増加が認められている。

成牛型サルモネラ症増加の要因の一つとして、搾乳牛の飼養方法の変化が挙げられている。わが国の生乳生産量は、1990年に著しく増加した。全国平均泌乳量は一頭あたり7,576kgとなり、1980年におけるレベル(6,102kg)と比較して25%もの増加が認められる⁽⁶⁾。このような泌乳量の増加は、牛の遺伝的改良だけでなく、ルーメンバイパス蛋白とよばれる高蛋白飼料の多給により達成されたものと考えられる。成牛、特に搾乳牛のサルモネラ症増加の原因に関しては、このような高蛋白飼料の過給により、ルーメン機能が低下し、生理機能が失調したことにより、抗病性が低下し、サルモネラに対する感受性が高まったのであろう、との仮説が提案されている。

一方、成牛型サルモネラ症の増加に伴い、分離される

S. Typhimurium の性状にも変化がみられることが明らかとなった。サルモネラの感染源追求のための疫学マーカーとして、ファージ型別が用いられる。*S. Typhimurium* の場合、200以上のファージ型に型別される。ファージ型別は国内では唯一国立感染症研究所でのみ実施されている。1990年代に欧米諸国において、多剤耐性の *S. Typhimurium* definitive phage type 104 (DT104) とよばれるファージ型の菌に起因した食中毒の発生が増加した。DT104はアンピシリン(A)、クロラムフェニコール(C)、ストレプトマイシン(S)、サルファー剤(Su)、テトラサイクリン(T)の5剤に耐性を示すことを特徴とする。わが国でも2004年に、患者数358人の集団発生例が報告されている。DT104は、1984年にイギリスで人から初めて分離され、その後1988年に牛からも分離された。さらに、豚、羊、家禽等の家畜からの分離例が増加している。欧米では、牛がDT104の最も重要なリザーバーであると考えられている。1990年代から、わが国の牛由来サルモネラにおいても高率にDT104が分離されていたことが、*Sameshima* らによって初めて報告された⁽⁹⁾。これにより、欧米と同様にわが国にも1990年代にDT104が侵入していたことが明らかにされた。

ファージ型別を実施するには、専門機関に依頼しなければならない。そのため家畜衛生の分野では多くの場合実施されていないのが現状である。現在、サルモネラの分子疫学解析の手法として、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)およびmultiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA)を用いることが多い。著者らは、1977年から2009年までの33年間に道内の牛から分離された *S. Typhimurium* 545株について、制限酵素 *Xba*I を用いてPFGEを実施した⁽¹⁴⁾。この結果、*S. Typhimurium* 545株から116種類のプロファイルが検出され、これらは9型(I～IX型)に分類された(図1)。図2はPFGE型の経年的変化をまとめたものである。1992年から、PFGE I型の増加が認められる。PFGE I型はそれ以前では1991年に1株、1986年に1株分離されているのみであった。1992年は成牛型サルモネラ症が増加した時期であり、I型菌と成牛型サルモネラ症との関連が示唆される。I型には248株が含まれており、その87%がACSSuTの5剤に対する耐性を持ち、さらに98%の菌株において、DT104が共通に保有するシーケンスが検出された。実際に一部の菌でファージ型別を実施し、DT104であることが確認された。したがってI型は、DT104およびDT104に近縁な株から構成されていると考えられる。以上の結果は、1992年以降、DT104あ

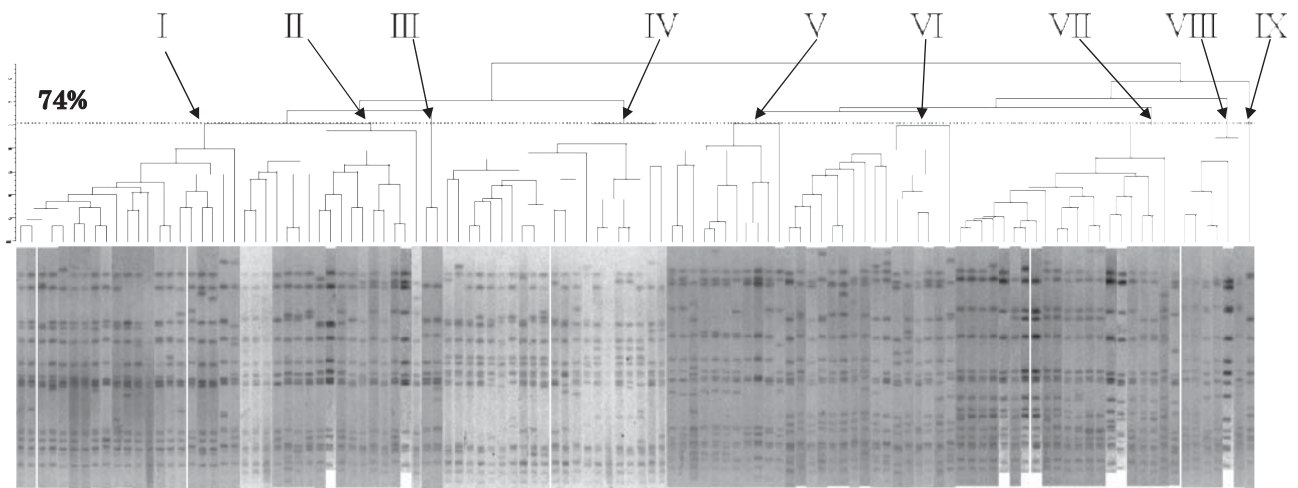


図1 牛由来 S. Typhimurium の PFGE プロファイル

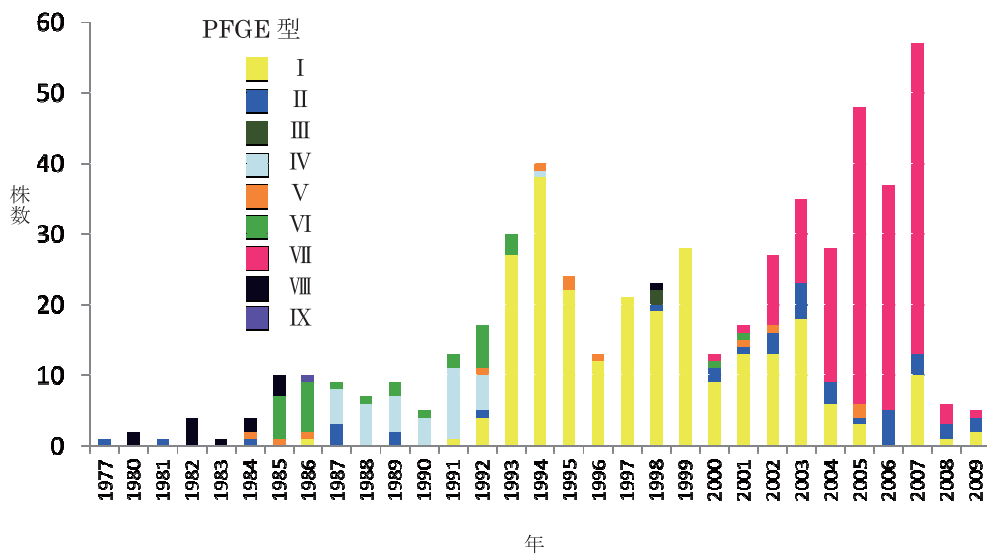


図2 PFGE 型の経年的変化

るいはそれに類似した菌による牛のサルモネラ症が増加したことを示している。なお、I型は2004年以降減少傾向にある。

DT104の病原性に関して、マウスを用いた感染実験やマウスマクロファージ内での生残、培養上皮細胞に対する付着性等が調べられている。しかし、DT104が他の S. Typhimurium よりも病原性が強いという報告はない⁽²⁾。DT104と同定された株の培養上清に、マウス腸管ループを用いた実験により、cytotoxin 活性が認められたとの報告もあるが⁽³⁾、この菌が牛などに対して他の菌株よりも強い病原性を示すか否かについては、現在までのところ明らかにされていない。著者らは、DT104の溶原ファージ上に、百日咳毒素と相同性を示す遺伝子 (*artA* /*artB*) を見出した⁽⁸⁾。この遺伝子は DT104を含む I 型のほとんどと、II 型の一部の菌が保有しているが、その他の型の菌には全く検出されない。これまでに、*artA* /

artB の遺伝子産物 (ArtA/ArtB) が、百日咳毒素と同様に、細胞内情報伝達に関与する GTP 結合蛋白質 (G 蛋白) を ADP リボシル化すること、マイトマイシン C および H₂O₂ により誘導的に発現すること、CHO 細胞に対するクラスター形成活性を有することが、明らかになっている⁽¹⁶⁾。ArtA/ArtB の病原因子としての役割については、今後さらに検証を進める必要がある。

新型菌の出現

I 型に代わり増加したのが VII 型である。VII 型は 2000 年に初めて出現し、2002 年以降増加した。現在では最も多く分離される型となっている。VII 型には 165 株が含まれる。I 型菌と同様に多くが多剤耐性であり、75% が AS-SuTK (カナマイシン) の 5 剤に耐性を示す。アンピシリンに関しては、98% の株が耐性を示す。15% の株が第一世代セフェム系抗生物質であるセファゾリンに耐性を

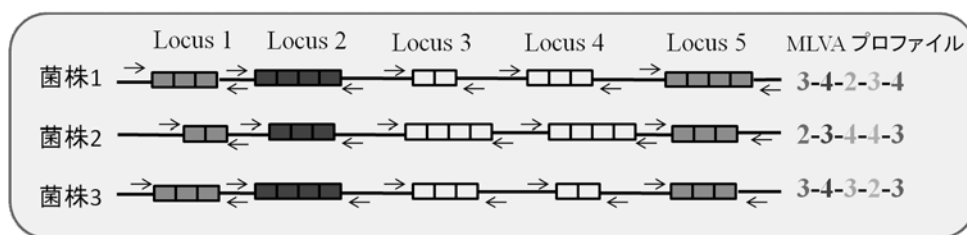
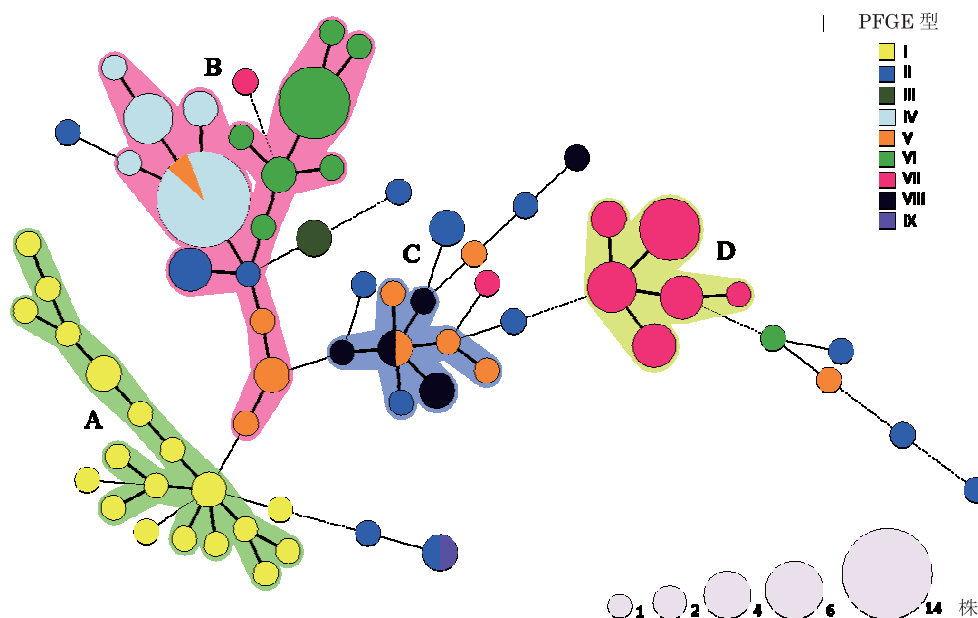


図3 MLVA法の原理

図4 *S. Typhimurium* 代表株116株の MLVA 系統樹解析 (Minimum-spanning tree)

円はそれぞれのプロファイルを表す。円の大きさは、そのプロファイルの菌株数を表し、円の中の色は、PFGE型を表す。円の中の線は、プロファイル間の距離を表しており、太くなるほど近いプロファイルであることを表す。プロファイルの違いが1カ所以内のものを一つのクラスターとした (クラスターA: 緑、B: ピンク、C: 青、D: 黄色)。

示すが、セファゾリン耐性株は、2000年以前では1株しか分離されていない。同様な耐性株が福島県においても分離されたことが、Sugawaraらによって報告されており⁽¹³⁾、全国的な拡散が懸念される。

PFGE プロファイルの代表株116株について、MLVAを用いて解析を試みた。MLVAとは、ゲノム中の反復縦列配列を含む数種類の遺伝子座位をPCRで増幅し、繰り返し回数を解析する手法である。PFGEより識別能力が高く、短時間に解析可能であり、データベース化が容易であるという利点がある。PFGEに代わる新たな遺伝子解析の手法になり得ると考えられている。MLVAの原理を図3に、使用したプライマーを表1に示した。MLVA解析により、116株は4つの主要なクラスター(A~D)に分類された(図4)。PFGE I型21株のうち18株がクラスターAに分類され、VII型21株のうち薬剤感受性株を除いた19株がクラスターDに分類された。PFGE I型とVII型は、このようにMLVAによっ

表1 MLVA法で使用したプライマー

増幅領域	プライマー	配列 (5'-3')
STTR3	STTR3-F	CCCCCTAAGCCCGATAATGG
	STTR3-R	TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA
STTR5	STTR5-F	ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT
	STTR5-R	GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT
STTR6	STTR6-F	TCGGGCATGCGTTGAAA
	STTR6-R	CTGGTGGGGAGAATGACTGG
STTR9	STTR9-F	ATGATCGACCACGATCTTGCC
	STTR9-R	CAAACGACCGCTATTTCGTCG
STTR10	STTR10pl-F	CCATTCTGATGCATTCTGCC
	STTR10pl-R	CTGTCAGGGAATATCAGCAGC

てもそれぞれ一つのクラスターを形成し、比較的クローナリティーの高いことが示された。また、I型とVII型は関連性が低いことも明らかとなった。

S. Typhimurium は通常、94kbの血清型特異的病原性プラスミドを保有する。しかし近年、病原性プラスミドに薬剤耐性遺伝子が挿入された、薬剤耐性病原性プラス

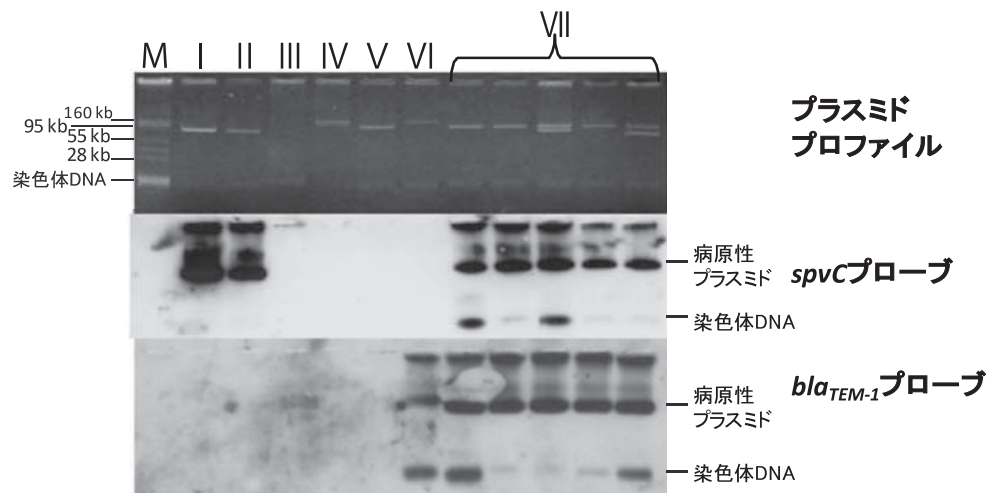


図5 プラスミドプロファイルとサザンハイブリダイゼーション

ミドがいくつか報告されている。2000年以降出現したⅦ型菌は、病原性プラスミド上に薬剤耐性遺伝子を保有していることが明らかとなった。図5はⅠ～Ⅶ型菌のプラスミドプロファイルとサザンハイブリダイゼーションの結果である。Ⅶ型菌のほとんどが、95～130kbのプラスミドを保有していた。サザンハイブリダイゼーションにより、これらのプラスミドが、プラスミド上の病原性遺伝子 *spvC* とともに、アンピシリン耐性遺伝子である *bla*_{TEM-1} を保有し、薬剤耐性病原性プラスミドであることが明らかとなった。さらに、これらのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換すると、形質転換株はアンピシリンだけでなく、ストレプトマイシン、サルファー剤、テトラサイクリン、カナマイシンに対しても耐性を示した。この結果により、これらの薬剤の耐性遺伝子も、プラスミド上に存在していることが明らかとなった。セファゾリン耐性株は25株存在するが、セファゾリン耐性遺伝子 *bla*_{CMY-2} をプラスミド上に保有している株は1株のみであり、それ以外の25株では全て、染色体上に存在していた。*bla*_{CMY-2} は染色体上の genomic island GI-VII-6 とよばれる領域に存在しており、この領域の両端には IS26 トランスポサゼが隣接することが、Shahada らによって報告されている⁽¹¹⁾。

近年、北米で *S. Typhimurium* の新たな薬剤耐性株 WA-TYP035/187 の増加が報告されている^(1,4)。いくつかの株は、Ⅶ型と同様の PFGE、MLVA プロファイルを示す。WA-TYP035/187 において、第3世代セフェム系抗生物質であるセフトジジムに対する耐性の増加が報告されており、これらの株はプラスミド上に *bla*_{CMY-2} 遺伝子を保有している。しかし著者らが解析したⅦ型菌の中でセフトジジム耐性株は4株のみであり、さらにセ

フトキシム耐性株は、プラスミド上に *bla*_{CMY-2} を保有する1株のみである。Ⅶ型の PFGE、MLVA プロファイルは WA-TYP035/187 と類似しているが、第3世代セフェム系抗生物質に対する耐性状況は異なっている。

まとめ

PFGE、MLVA を使用した分子疫学解析により、道内で分離される牛由来サルモネラの性状が変化していることが明らかとなった。成牛型サルモネラ症増加の要因の一つとして、飼養環境の変化など牛側の要因が重要であるものと考えられるが、DT104 (PFGE I 型) が増加した時期と、成牛におけるサルモネラ症の増加した時期が一致しており、I 型と成牛型サルモネラ症との関連についての検討も必要であろう。そのためには、I 型菌において新たに見出された毒素 ArtA/ArtB の病原因子としての性状の解析が急務である。

一方、近年増加している PFGE Ⅶ型菌にも注意しなければならない。Ⅶ型菌のほとんどが多剤耐性であり、少数ではあるが、第3世代セフェム系抗生物質に耐性を示す株も存在する。今後抗生物質使用による選択圧で、北米で報告されているような新たな耐性を獲得した株が増加する可能性が考えられる。

過去33年間に、分離菌の遺伝子型が変化している状況が確認された。このような遺伝子型の変化は、新型菌の外部からの侵入、あるいは環境に適応するために在来の菌が変化することによるものと考えられる。菌型の交代による病勢の変化や、新たな薬剤耐性の獲得など、野外における病原菌の変化を考えると、分離菌における分子疫学的マーカーのモニタリングが重要であり、それらをデータベース化し、情報を共有するシステムが必要であ

ると考える。

参考文献

- [1] Adhikari, B., T. E. Besser, J. M. Gay, L. K. Fox, D. D. Hancock, and M. A. Davis. 2010. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and plasmid profiling to study the occurrence of *bla*_{CMY-2} within a pulsed-field gel electrophoresis-defined clade of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 76 : 69-74.
- [2] Allen, C. A., P. J. Fedorka-Cray, A. Vazquez-Torres, M. Suyemoto, C. Altier, L. R. Ryder, F. C. Fang, and S. J. Libby. 2001. In vitro and in vivo assessment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 virulence. *Infect Immun* 69 : 4673-4677.
- [3] Carlson, S. A., D. K. Meyerholz, T. J. Stabel, and B. D. Jones. 2001. Secretion of a putative cytotoxin in multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. *Microb Pathog* 31 : 201-204.
- [4] Davis, M. A., T. E. Besser, K. Eckmann, K. MacDonald, D. Green, D. D. Hancock, K. N. Baker, L. D. Warnick, Y. Soyer, M. Wiedmann, and D. R. Call. 2007. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium, Pacific Northwest, United States. *Emerg Infect Dis* 13 : 1583-1586.
- [5] Groisman, E. A., and H. Ochman. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5 : 343-349.
- [6] 中村政幸. 2000. 生体側の要因から見た搾乳牛のサルモネラ症. 臨床獣医 18.
- [7] 中岡祐司. 2010. 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策. 家畜診療 57.
- [8] Saitoh, M., K. Tanaka, K. Nishimori, S. Makino, T. Kanno, R. Ishihara, S. Hatama, R. Kitano, M. Kishima, T. Sameshima, M. Akiba, M. Nakazawa, Y. Yokomizo, and I. Uchida. 2005. The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology* 151 : 3089-3096.
- [9] Sameshima, T., M. Akiba, H. Izumiya, J. Terajima, K. Tamura, H. Watanabe, and M. Nakazawa. 2000. *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn J Infect Dis* 53 : 15-16.
- [10] 佐藤静夫. 2000. 国内外における牛サルモネラ症の発生状況. 臨床獣医 18.
- [11] Shahada, F., T. Sekizuka, M. Kuroda, M. Kusumoto, D. Ohishi, A. Matsumoto, H. Okazaki, K. Tanaka, I. Uchida, H. Izumiya, H. Watanabe, Y. Tamamura, T. Iwata, and M. Akiba. 2011. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. *Antimicrob Agents Chemother* 55 : 4114-4121.
- [12] Shelobolina, E. S., S. A. Sullivan, K. R. O'Neill, K. P. Nevin, and D. R. Lovley. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 70 : 2959-2965.
- [13] Sugawara, M., J. Komori, M. Kawakami, H. Izumiya, H. Watanabe, and M. Akiba. 2011. Molecular and phenotypic characteristics of CMY-2 beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 73 : 345-349.
- [14] Tamamura, Y., I. Uchida, K. Tanaka, H. Okazaki, S. Tezuka, H. Hanyu, N. Kataoka, S. Makino, M. Kishima, T. Kubota, T. Kanno, S. Hatama, R. Ishihara, E. Hata, H. Yamada, Y. Nakaoka, and M. Akiba. 2011. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. *Appl Environ Microbiol* 77 : 1739-1750.
- [15] Tsolis, R. M., L. G. Adams, T. A. Ficht, and A. J. Baumler. 1999. Contribution of *Salmonella* Typhimurium virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 67 : 4879-4885.
- [16] Uchida, I., R. Ishihara, K. Tanaka, E. Hata, S. Makino, T. Kanno, S. Hatama, M. Kishima, M. Akiba, A. Watanabe, and T. Kubota. 2009. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [³²P]NAD. *Microbiology* 155 : 3710-3718.