

【研究紹介】

牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium に関する分子疫学的研究

玉 村 雪 乃

動物衛生研究所 寒地酪農衛生研究領域
(〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

1. はじめに

Salmonella はグラム陰性桿菌であり、腸内細菌科の一属に分類される。本菌は *Salmonella enterica*、*S. bongori* の2菌種に分類され、さらに *S. enterica* は6亜種 (*enterica*、*salamae*、*arizonae*、*diarizonae*、*houtenae*、*indica*) に分類される。ほ乳類や鳥類の病気の原因となる菌の多くは、*S. enterica* subsp. *enterica* に属する。また、*Salmonella* は菌体抗原O抗原および鞭毛抗原H抗原により2500以上の血清型に分類され、血清型ごとに病原性の程度や宿主域が異なる。牛サルモネラ症は種々の血清型の *Salmonella* に起因する伝染性疾病であり、発症牛は発熱、下痢などの症状を示し、重症例では敗血症を呈して死亡する。本症は世界各国で発生が認められ、我が国においては *S. Typhimurium*、*S. Dublin*、*S. Enteritidis* の3血清型が家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されている。近年では届出対象以外の血清型による発生が増加しているものの、*S. Typhimurium* による発生が最も多い。牛サルモネラ症は、以前は肉用子牛を中心に発生が認められていたが、1992年以降搾乳牛における発生が急増した。このような傾向は全国的に認められた。この原因として、1990年代の乳用牛の高泌乳化・多頭化に伴う飼養管理方法の変化などが指摘されている。

一方で、成牛のサルモネラ症が増加した時期に、牛サルモネラ症の原因菌にも変化が見られていたことが報告されている。1991年以降、それまで国内において牛から分離されていなかった *S. Typhimurium* 多剤耐性ファージ型 DT104 が、高率に分離されていたことが明らかとなった。DT104 は、イギリスで1984年にヒトから、1988

年に牛から初めて分離され、その後世界各国で各種の動物から分離された。DT104 の多くはアンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、サルファ剤 (SUL)、テトラサイクリン (TC) の5剤に耐性を示す。マウス個体や細胞を用いた実験では、DT104 が他のファージ型菌より高病原性であるという結果は得られていないが、野外では他のファージ型菌が感染した場合と比較して重症化しやすいことなどから、病原性が強いものと考えられている。近年、DT104 が共通に保持する遺伝子として、百日咳毒素遺伝子と相同性を示す遺伝子 *artA* および *artB* (*artAB*) が見出された。*artAB* は溶原ファージゲノム上に存在しており、その産物である ArtA/ArtB (ArtAB) は DT104 U1 株にマイトマイシン C (MMC) を添加して培養することにより培養上清中に産生される。ArtAB を含む DT104 U1 株培養上清は、百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) を ADP-リボシル化し、百日咳毒素と同様に Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞集塊形成活性を示す。しかしながら ArtAB のサルモネラの病原因子としての役割は明らかになっていない。成牛のサルモネラ症増加の原因が飼養環境の変化なのか、原因菌の変化なのか、あるいは両者なのかは不明である。

国内で牛から分離された DT104 は、その分離時期および海外での分離状況から、海外から導入された可能性が推測される。近年における農産物流通のグローバル化により、海外の流行株の国内への侵入はより容易になっていると考えられる。このような状況の中で牛サルモネラ症の防疫対策の的確化を図るためには、原因菌の流行型の特定や感染源・感染経路を究明する疫学的調査が必

須である。S. Typhimuriumの分子疫学的解析方法として、ファージ型別、薬剤感受性プロファイル、プラスミドプロファイル、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)、Multi-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) などが知られている。PFGEはSalmonellaの遺伝子型別手法のゴールドスタンダードとして利用されている。また、近年ゲノム上の反復縦列配列を含む複数の遺伝子座位の塩基配列を決定し、繰り返し数を解析することにより型別するMLVAも、その型別能の高さから注目されている。これらの手法を用いることにより、異なる地域や年代における分離株間の関連性を解析することが可能となる。

そこで本研究では、牛サルモネラ症の主な原因菌であるS. Typhimurium分離株の遺伝学的性状とその変遷を明らかにすることを目的とし、北海道で1977~2009年までの33年間に分離された牛由来S. Typhimuriumについて、分子疫学的手法を用いて解析した。さらに一発生事例の疫学的調査を実施して、遺伝学的性状のデータベースの有用性について検証した。また、近年分離された主な流行型株の産生毒素や薬剤耐性因子に関する解析を実施した。なお、本稿は酪農学園大学より獣医学博士を授与された学位論文内容の一部を紹介するものである。

2. 過去33年間に北海道内で分離された牛由来S. Typhimuriumの分子疫学的解析

牛サルモネラ症の主な原因菌であるS. Typhimurium分離株の遺伝学的性状とその変遷を明らかにするため、1977~2009年までに分離された545株の牛由来S. Typhimuriumについて、薬剤感受性試験、PFGE、MLVA、PCRによる遺伝子検出、プラスミドプロファイルを実施した。また、サザンハイブリダイゼーションによりプラスミド上の遺伝子を検索した。

PFGEにより、545株のS. Typhimuriumから116種類のプロファイルが検出された。類似度が74%以上となるプロファイルを1つのグループとして分類した結果、9つのPFGE型 (I~IX型) に分けられた。1992年以降に分離された菌株の88%がI型またはVII型に分類された。I型 (248株) は1992年以降分離数が増加し、2004年以降は減少していた (表1)。VII型 (165株) は2000年に初めて分離され、2002年以降増加した (表1)。116 PFGEプロファイルの各プロファイルから代表株1株ずつを選出し、計116株についてMLVAにより5カ所の遺伝子座位を解析した結果、68プロファイルが検出された (図1)。異なる繰り返し数を示した遺伝子座位が1カ所以内のプ

ロファイルを太線で連結し、太線で連結されたプロファイルを同一クラスターとして囲った結果、4つの主要なMLVAクラスター (A~D) が形成され、MLVAクラ

表1. 1977年から2009年に分離されたS. TyphimuriumにおけるPFGE型の変遷

| 年 | PFGE型 | | | | | | | | | 計 |
|-----------|-------|----|-----|----|----|----|-----|------|----|-----|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | |
| 1977-1991 | 2 | 8 | 0 | 30 | 3 | 20 | 0 | 12 | 1 | 76 |
| 1992 | 4 | 1 | | 5 | 1 | 6 | | | | 17 |
| 1993 | 27 | | | | | 3 | | | | 30 |
| 1994 | 38 | | | 1 | 1 | | | | | 40 |
| 1995 | 22 | | | | 2 | | | | | 24 |
| 1996 | 12 | | | | 1 | | | | | 13 |
| 1997 | 21 | | | | | | | | | 21 |
| 1998 | 19 | 1 | 2 | | | | | 1 | | 23 |
| 1999 | 28 | | | | | | | | | 28 |
| 2000 | 9 | 2 | | | | 1 | 1 | | | 13 |
| 2001 | 13 | 1 | | | 1 | 1 | 1 | | | 17 |
| 2002 | 13 | 3 | | | 1 | | 10 | | | 27 |
| 2003 | 18 | 5 | | | | | 12 | | | 35 |
| 2004 | 6 | 3 | | | | | 19 | | | 28 |
| 2005 | 3 | 1 | | | 2 | | 42 | | | 48 |
| 2006 | | 5 | | | | | 32 | | | 37 |
| 2007 | 10 | 3 | | | | | 44 | | | 57 |
| 2008 | 1 | 2 | | | | | 3 | | | 6 |
| 2009 | 2 | 2 | | | | | 1 | | | 5 |
| 計 | 248 | 37 | 2 | 36 | 12 | 31 | 165 | 13 | 1 | 545 |

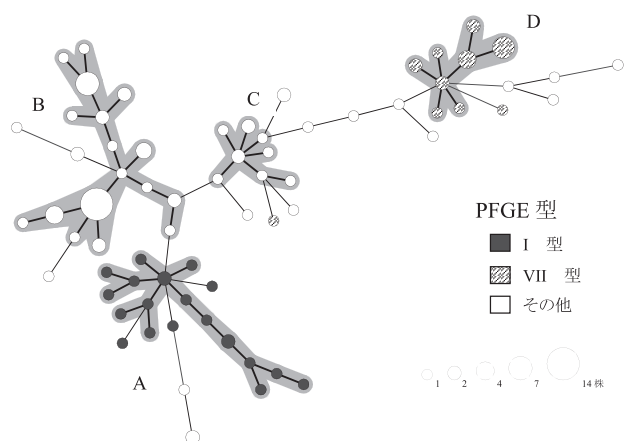


図1. PFGE代表株116株のMLVAプロファイルに基づく系統樹

Minimum Spanning Treeによる系統樹。円の大きさは同じプロファイルを示した菌株数を反映する。円の中は、PFGE型で色分けした。MLVAプロファイルの違いが1遺伝子座位以内のプロファイルを太線で連結し、2カ所以上の遺伝子座位が異なるプロファイルを細線で連結した。太線で連結されたプロファイルを囲い、4つのクラスターとした (A~D)。

スター A は PFGE I 型、MLVA クラスター D は PFGE VII 型で構成された。PFGE I 型および VII 型は MLVA によってもそれぞれクラスターを形成したことから、それぞれ遺伝学的に近縁な株で構成されていることが示唆された。

PFGE I 型菌の 91% が DT104 に特徴的な薬剤耐性パターン (ACSSuT) を示し、さらに 98% が DT104 特異的な配列である 162-bp amplicon を保有していた。このことから、I 型は DT104 およびその近縁株で構成されることが示唆された。VII 型菌は、165 株中 162 株が ABPC 耐性、26 株が第一世代セファロスポリンであるセファゾリン (CEZ) 耐性を示し、1 株が第三世代セファロスポリンであるセフォタキシム (CTX) に耐性を示した。また、125 株が ABPC、SM、SUL、TC、カナマイシン (KM) の 5 剤に耐性を示した。VII 型菌の 98% が TEM 型 β -ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{TEM-1} を保有しており、サザンハイブリダイゼーションによりプラスミドを解析した結果、*bla*_{TEM-1} は 95-130 kb の血清型特異的な病原性プラスミド上に存在することが明らかとなった。CTX 耐性株においては薬剤耐性病原性プラスミドに加え、CMY-2 型 β -ラクタマーゼ遺伝子である *bla*_{CMY-2} を含むプラスミドを保有していた。

以上のことから、1992 年より DT104 を含む I 型菌が増加したが、2004 年以降減少し、2000 年以降においては、新型の多剤耐性 VII 型菌が出現して本菌によるサルモネラ症が増加したことが明らかとなった。

3. 北海道内の一酪農場において分離された *Salmonella* Typhimurium の分子疫学的解析

2008 年 2 月に、北海道石狩地方の一酪農場において牛サルモネラ症が発生した。本研究では、サルモネラの農場内における浸潤状況を調査するとともに、分離菌株に

ついて分子疫学的解析手法により解析し、感染経路など疫学的背景の考察および細菌学的疫学マーカーの有用性の検証を実施した。

本農場では乳用成牛約 100 頭、育成牛および哺育牛約 50 頭の合計約 150 頭を飼養しており、外部からの牛の導入はなかった。牛サルモネラ症は 2008 年 2 月にフリーストール牛舎内の分娩房で発生し、2008 年 8 月の発生を最後に全頭菌分離陰性となった。初発である 2008 年 2 月以降約 1 年間乳用牛全頭の直腸便および牛舎内環境材料を採取した。*Salmonella* 分離培養後、分離株を 2006 年 4 月に旭川で採取したスズメ由来株とともに PFGE、MLVA、ファージ型別により解析した。

各種材料から 25 株が分離され、そのうち代表的な 9 株を解析した結果、最後に分離された 1 株 (RG08-5) を除いた 8 株が同一の PFGE プロファイルおよび類似した MLVA プロファイルを示し、2 種類のクローン由来株による流行が示唆された (図 2)。RG08-5 以外の株は道内のスズメ由来株と同一あるいは類似した PFGE および MLVA プロファイルを示しており、ファージ型もスズメ由来株と同様の DT40 であった (図 2)。以上のことから、本農場で発生したサルモネラ症の原因菌のうち RG08-5 以外の株は、スズメ由来株と同一であると考えられ、スズメとの接触が感染経路である可能性が示された。2005~2006 年に北海道内各所でスズメの大量死が確認されており、死亡したスズメから *S. Typhimurium* が分離され、DT40 と同定された。また、2008~2009 年にも同様に旭川市周辺でスズメの大量死が認められ、死亡したスズメからは DT40 を含むいくつかのファージ型の *S. Typhimurium* が分離されている。本農場由来株と同一の MLVA プロファイルを示す菌が 2006 年以降道央地域の他の農場においても分離されており、スズメの大量死

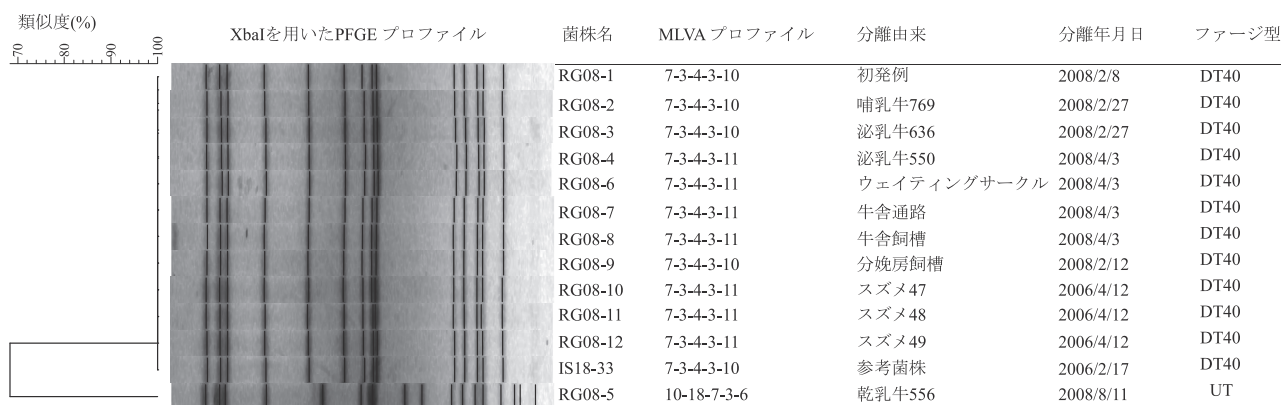


図 2. 北海道内の一酪農場で分離された *S. Typhimurium* および旭川で採取したスズメ由来株の PFGE および MLVA 解析

a) UT: 型別不能

発生以降、当該タイプの菌が拡散したことが示唆された。これらの成績から、継続的な菌株の収集とそれらの細菌学的疫学マーカーに関するデータの蓄積は、牛サルモネラ症の疫学的解析において有用であることが明らかとなった。

4. *Salmonella* Typhimurium DT104が産生する百日咳毒素様タンパク ArtABの性状解析

PFGE I 型はDT104で構成され、成牛のサルモネラ症増加と関連する可能性がある。本研究ではDT104が産生する ArtABの病原因子としての役割を検討するため、牛由来*S. Typhimurium*の *artA* および *artB* 遺伝子保有状況を調査するとともに、ArtABの精製方法を開発してその生物活性を解析した。

545株のSTについて *artAB* 遺伝子をPCRにより検出した。DT104 U1株をMMCで刺激することにより ArtAB産生を誘導し、培養上清を用いたカラムクロマトグラフィーにより ArtABを精製した。次に、精製 ArtABを用いてイオン交換カラムクロマトグラフィーにより ArtABの構造を解析するとともに、百日咳毒素の活性として知られる赤血球凝集活性、インスリン分泌応答活性および白血球増多活性について解析し、また、マウス接種実験により LD₅₀を決定した。

牛由来545株のうち、I型菌の98%と、II型に属する14%の分離株が *artAB* 遺伝子を保有しており、他のPFGE型菌においては検出されなかった。遺伝子産物である ArtABは、複数のカラムクロマトグラフィーの実

施により精製できた。さらにイオン交換カラムクロマトグラフィーにより構造を解析した結果、ArtABは百日咳毒素と同様にAユニット1つとBユニット5つで構成されることが明らかとなった。精製 ArtABをマウスに腹腔内接種すると致死活性が認められ、そのLD₅₀は0.21 μg/匹であった。ArtABは赤血球凝集活性およびインスリン分泌亢進活性を示したが、白血球増多活性が欠如している点が百日咳毒素と異なっていた。以上の結果から、ArtABは百日咳毒素に類似した毒素であることが示されたが、病原因子としての役割の解明には更なる解析が必要と考えられた。また、I型菌のみならず、II型菌においても *artAB* の保有が認められたことから、他のPFGE型や血清型にもこの遺伝子が伝達する可能性が懸念された。

5. 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium PFGEVII型菌が保有する薬剤耐性病原性プラスミドの性状解析

2002年以降PFGEVII型菌の分離数が増加した。これらの多くの株が多剤耐性であり、それらは薬剤耐性遺伝子を含んだ95-130 kbの血清型特異的病原性プラスミド（薬剤耐性病原性プラスミド）を共通に保有している。このうち1株は、第3世代セファロスポリンであるCTXに耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドの他に *bla*_{CMY-2}を含むプラスミドを保有する。本研究では、VII型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミドおよびCTX耐性株が保有する *bla*_{CMY-2} プラスミドの構造を解析し、VII

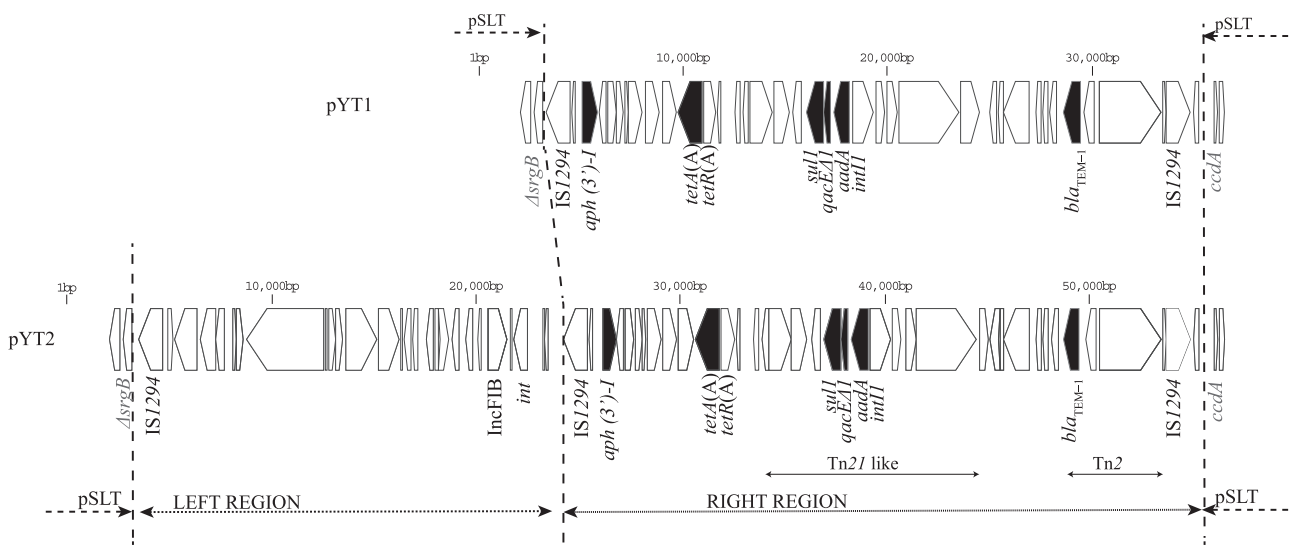


図3. pYT1およびpYT2の挿入領域のマップ

薬剤耐性遺伝子を黒、その他の遺伝子を白いブロック矢印で示した。マップの下部にモバイルエレメントおよびLeft regionとRight regionを矢印で示した。破線矢印はpSLT由来と考えられる領域を示し、挿入領域との境界をマップに垂直な破線で示した。

型菌の遺伝学的性状を明らかにした。

Ⅶ型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミド pYT1 および pYT2 の全塩基配列を決定した結果、これらは *S. Typhimurium* 血清型特異的病原性プラスミド pSLT に、ABPC、SM、SUL、TC、KM 耐性遺伝子を含む領域が挿入されて構成されていた (図 3)。pYT2 では薬剤耐性遺伝子領域に加え、プラスミドの複製や維持に関わる遺伝子を含む領域 (Left region) が挿入されていた (図 3)。これらの遺伝子領域は *S. Dublin* 由来のプラスミド pSD88 と高い相同性を示した。外来遺伝子領域の両端に IS1294 が認められたことから、IS1294 を介した遺伝子領域の獲得が起こったことが推測される。pSLT は遺伝子交換のプラットフォームとしての機能を持ち、環境中の他の菌からの遺伝子獲得を促進すると考えられている。薬剤耐性と病原因子が同一のプラスミド上に存在することで共選択され、より病原性の強い薬剤耐性菌が選択されたために、Ⅶ型菌が流行した可能性が考えられる。CTX 耐性株が保有する *bla*_{CMY-2} プラスミド pYT3 は、大部分が大腸菌由来薬剤耐性プラスミド pAR060302 と高い相同性を示したが、レプリコンを含む領

域は pYT2 の Left region と高い相同性を示し、その両端に IS1294 が認められた。このことから、pYT3 は薬剤耐性プラスミドが pYT2 様プラスミドから IS1294 を介してレプリコンを獲得して、生じたものと推測された。いずれのプラスミドも伝達性は認められなかった。以上の結果から、Ⅶ型菌の特徴および薬剤獲得機構の一端が明らかとなった。

6. おわりに

以上、本研究により、北海道の牛サルモネラ症から分離された株について遺伝子型における経年的変遷が確認され、さらに分子疫学的解析手法を用いることにより異なる農場で分離された菌株間の比較や牛由来株と野生動物由来株との関連性を解析できることが明らかとなった。また、近年分離される牛由来 *S. Typhimurium* の病原性関連因子や薬剤耐性因子に関する特徴を明らかにした。これらの成果は、今後、牛サルモネラ症の防疫対策に活用できる他、本症における発病機構の解明に役立つものと思われる。