

新潟県内で分離された *Salmonella* *Infantis* のパルス フィールドゲル電気泳動及び薬剤耐性による型別

佐 藤 博^{1)†} 川 瀬 雅 雄²⁾

1) 新潟県新発田食肉衛生検査センター (〒957-0064 新発田市奥山新保430)

2) 新潟県保健環境科学研究所 (〒950-2144 新潟市西区曾和314-1)

(2016年3月8日受付・2016年6月20日受理)

要 約

新潟県内で1998～2015年に分離された *S. Infantis* 58株を PFGE 及び薬剤耐性により型別した。これらの58株は PFGE により32型に分類され、薬剤耐性により11型に分類された。3つの PFGE 型は薬剤耐性型により細分され、PFGE と薬剤耐性型を組み合わせた型別により、58株は36の型に分類された。人由来株、ブロイラー株、豚由来株が同じ型に分類されたことから、鶏肉及び豚肉は人の *S. Infantis* の感染源であることが示唆された。採卵鶏由来株は人由来株と一致するものはなかったが、遺伝子的に近縁な株が認められた。よって、鶏卵も人の感染源となり得ると考えられた。——キーワード：薬剤耐性、*Infantis*、PFGE、*Salmonella*、型別。

-----日獣会誌 69, 475～480 (2016)

サルモネラ食中毒は世界的に重要な細菌性食中毒の1つであり、主要な原因食品は鶏卵をはじめとした畜産物で、サルモネラ属菌には2,600以上の血清型があるとされている [1]。厚生労働省の「食中毒統計」によると、細菌性食中毒は2010～2014年の年平均で469件発生し、最も多い食中毒はカンピロバクター食中毒で2位はサルモネラ食中毒であった。サルモネラ食中毒の年平均発生数は50件で細菌性食中毒の10.6%を占め、患者数は1,503名で19.3%を占めている。国立感染症研究所の「病原微生物検出情報」によると、2011～2015年の間に人から分離されたサルモネラ属菌の血清型は *Salmonella* *Enteritidis* が最も多い。*Salmonella* *Infantis* (*S. Infantis*) は年により2～4位と変動するが、*S. Enteritidis* に次いで人から分離される頻度の高い血清型であり、サルモネラ食中毒予防の観点から *S. Infantis* は重要な血清型である。

鶏肉はサルモネラ属菌の汚染率が高く、分離される血清型は *S. Infantis* が多いことが知られており、加藤ら [2] は市販鶏肉の *S. Infantis* 汚染率を19.8%と報告した。鶏肉のサルモネラ属菌汚染の背景として、同菌によるブロイラー農場の汚染が指摘され、ブロイラーにおけ

る *S. Infantis* を主としたサルモネラ属菌の高い保菌率が報告されている。また山田ら [3] はブロイラーの *S. Infantis* 保菌率を23.2%と報告している。一方、ブロイラー以外の家畜も *S. Infantis* を保菌することがあり、採卵鶏について太田ら [4] は保菌率を13%と報告している (個別検体について集計し算出)。また、豚について吉田ら [5] は保菌率を1.47%と報告し、福安ら [6] は0.41%が保菌していると報告した。

このように家畜は *S. Infantis* のリザーバーであり、畜産物は人の *S. Infantis* 感染症の原因食品といわれている [8, 9]。新潟県では2002年、2008年に *S. Infantis* による食中毒が発生したが、原因となった食材は特定されなかった。当県でも家畜・畜産物から *S. Infantis* が分離されているが、これまで人由来株と家畜由来株との疫学的関連性は調査されていない。そこで、過去の人の *S. Infantis* 感染例の感染源を推定するために、県内の分離菌株をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及び薬剤耐性試験により型別し、各々の由来別に比較した。

† 連絡責任者：佐藤 博 (新潟県新発田食肉衛生検査センター)

〒957-0064 新発田市奥山新保430

☎ 0254-24-5281 FAX 0254-26-2117

E-mail : sato.hiroshi5@pref.niigata.lg.jp

表1 *Salmonella* Infantis 58 株の由来及び分離年

由来 (合計株数)	分離年	株数	分離材料等
人 (13)	1998	1	散发患者
	2002	3	A 食中毒従事者 3 名
	2003	1	散发患者
	2004	3	食品従事者 3 名
	2008	3	B 食中毒患者 3 名
	2008	2	C 食中毒患者 2 名
プロイラー (33)	1998	2	市販鶏肉
	2001	6	盲腸内容物等, 3 農場
	2003	2	市販鶏肉
	2006	4	市販鶏肉
	2007	6	と体, 3 農場
	2008	4	盲腸内容物, 4 農場
	2009	2	市販鶏肉
	2015	5	市販鶏肉
	2015	2	盲腸内容物等
採卵鶏 (3)	2009	3	盲腸内容物, 2 農場
豚 (8)	1998	2	糞便, 1 農場
	2002	3	糞便等, 2 農場
	2005	1	糞便
	2014	2	盲腸内容物
食品 (1)	2008	1	B 食中毒原因食品

材料及び方法

菌株：県内で 1998～2015 年に分離された 58 株の *S. Infantis* 保存菌株を材料とした。人由来株は、3 株が A 食中毒の従事者由来株 (A 食中毒株)、3 株が B 食中毒の患者由来株 (B 食中毒株)、2 株が C 食中毒の患者由来株 (C 食中毒株) で、ほかに散发患者、食品従事者由来株を含め合計 13 株を用いた。家畜由来株はプロイラーが 33 株、採卵鶏が 3 株、豚が 8 株の合計 44 株であった。また、ほかに B 食中毒の原因食品となったエビグラタンから分離した 1 株 (B 原因食品株) を用いた (表 1)。

PFGE 解析：PFGE は寺嶋ら [9] の方法に準じ実施した。トリプトソイブイオンで増菌培養した菌体をアガロースに包埋し、溶菌処理後、タンパク質分解酵素阻害剤 (Pefabloc SC, Roche, Germany) による前処理を行い、バッファーの平衡化後、制限酵素 *Bln* I (タカラバイオ株, 滋賀県) により切断した。また、*Xba* I (Roche, Germany) による切断も合わせて行った。泳動用ゲルをアガロース (Seakem Gold Agarose, Lonza, U.S.A.) で作製しパルスフィールド電気泳動装置 (CHEF DR-II, Bio-Rad, U.S.A.) を使用し、泳動条件は電圧 6V, 緩衝液温度 14℃, パルスタイム 2.2～63.8 秒で、19 時間とした。ゲルをエチジウムブロマイドで染色後、画像撮影装置 (Gel Doc XR, Bio-Rad, U.S.A.) でゲルの泳動像をデジタル化し、画像処理ソフトウェア (Quantity One, Bio-Rad, U.S.A.) でプロファイル化し、

表2 *Salmonella* Infantis 58 株の薬剤耐性型

耐性型	耐性 パターン*	由来別株数					合計
		人	プロイ ラー	採卵鶏	豚	食品	
R1	TC-SM-NA-KM		1				1
R2	TC-SM-NA-ABPC		1				1
R3	TC-SM-NA	1	5				6
R4	TC-SM		14				14
R5	TC-SM-KM		5				5
R6	TC-ABPC-ST				1		1
R7	TC-KM	1					1
R8	TC-NA	1					1
R9	NA				1		1
R10	KM		1				1
非耐性		10	6	3	6	1	26
合計		13	33	3	8	1	58
耐性株 (%)		3 (23)	27 (82)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	32 (55)

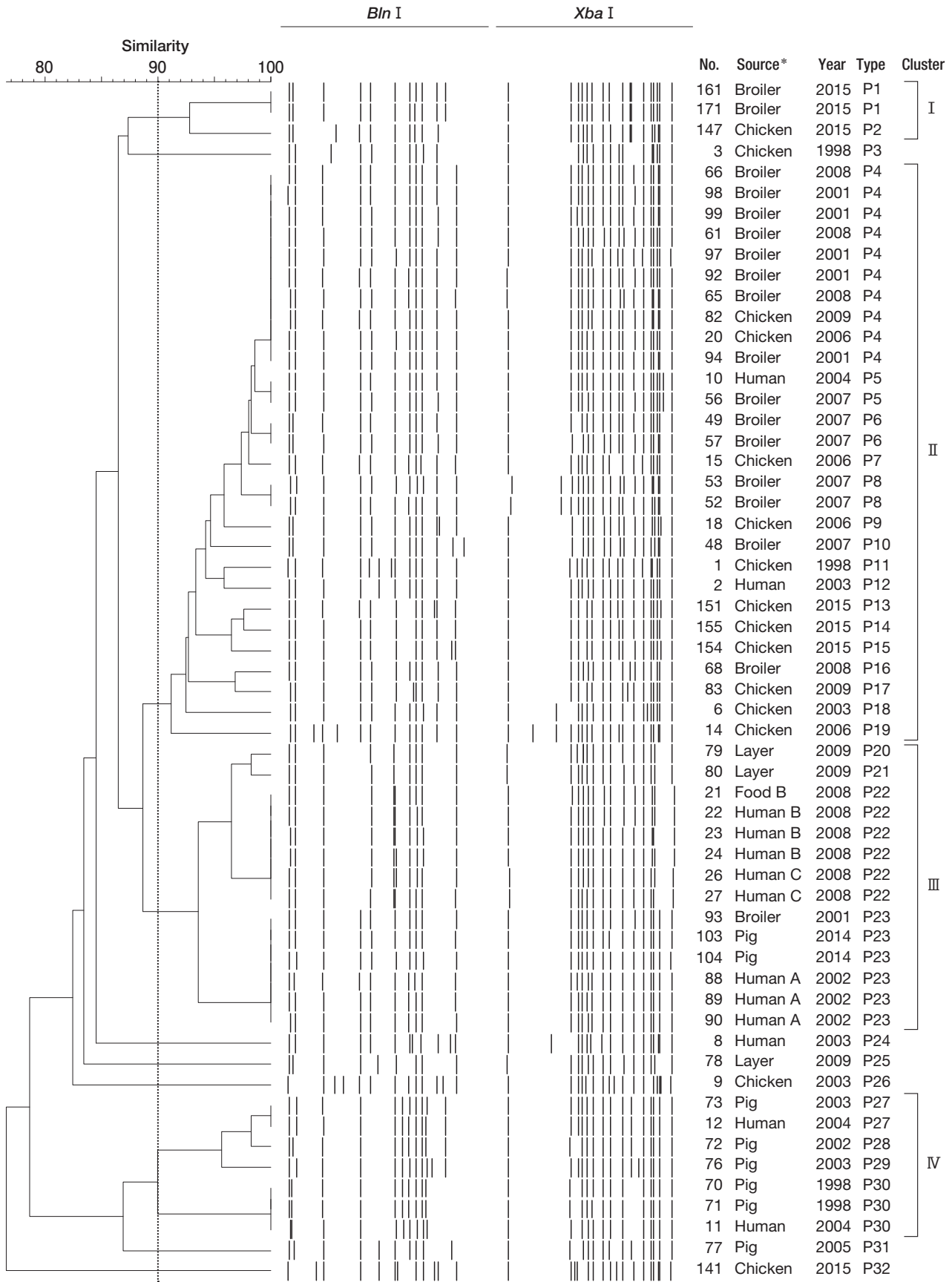
*TC：テトラサイクリン, SM：ストレプトマイシン, NA：ナリジクス酸, KM：カナマイシン, ABPC：アンピシリン, ST：スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤
ゲンタマイシン, クロラムフェニコール, シプロフロキサシン, セフォタキシム耐性はなかった。

系統樹作成ソフトウェア (Fingerprinting II, Bio-Rad, U.S.A.) により複合解析を行い、「実験より取得」, 「UPGMA」のパラメーターで系統樹を作成した。

薬剤耐性試験：薬剤耐性試験は、薬剤感受性試験用ディスク (BD センシ・ディスク, 日本ベクトン・ディッキンソン株, 福岡) を用い、1 濃度ディスク拡散法で実施した。使用した試験用ディスクは、アンピシリン (ABPC), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), テトラサイクリン (TC), クロラムフェニコール (CP), ナリジクス酸 (NA), シプロフロキサシン (CPFX), セフォタキシム (CTX), スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) の 10 種とし、「阻止円判定表」の区分に基づき耐性の有無を判定した。

成績

PFGE 解析：*Bln* I, *Xba* I による PFGE の複合解析により、*S. Infantis* 58 株は P1～P32 の PFGE 型に分類された。これらの型を類似度 90% でクラスターを分けると、4 つのクラスターと 6 つの単独株に分類された (図)。各クラスターを構成する株の由来には傾向があり、クラスター I はプロイラー由来株のみで 3 株から構成された。クラスター II は、プロイラー由来 26 株と人由来 2 株で構成され、このクラスターはプロイラー由



*Broiler：ブロイラー，Chicken：市販鶏肉，Food B：B食中毒原因食品，Human：患者，従事者，Human A：A食中毒従事者，Human B：B食中毒患者，Human C：C食中毒患者，Layer：採卵鶏，Pig：豚

図 Bln I 及び Xba I 切断の PFGE による *Salmonella Infantis* 58 株の複合解析

表3 *Salmonella* Infantis 58株のパルスフィールドゲル電気泳動型と薬剤耐性型による分類

クラスター	PFGE 型	薬剤耐性型	由来別株数					合計
			人	ブロイラー	採卵鶏	豚	食品	
I	P1	非耐性		2				2
	P2	非耐性		1				1
	単独株	P3	R5		1			1
			R3		1			1
		P4	R4		6			6
			R5		3			3
			R3		1			1
		P5	R8	1				1
		P6	R3		2			2
		P7	R10		1			1
		P8	R4		2			2
	II	P9	R1		1			1
		P10	R2		1			1
		P11	R5		1			1
		P12	R7	1				1
		P13	R4		1			1
		P14	R4		1			1
		P15	R4		1			1
		P16	非耐性		1			1
P17		非耐性		1			1	
P18		R3		1			1	
	P19	R4		1			1	
III	P20	非耐性			1		1	
	P21	非耐性			1		1	
	P22	非耐性	5				1	6
						1		1
	単独株	P23	R9 非耐性	3	1		1	5
単独株	P24	R3	1				1	
単独株	P25	非耐性			1		1	
単独株	P26	R4		1			1	
IV		P27	非耐性	1			1	2
		P28	非耐性				1	1
		P29	R6				1	1
		P30	非耐性	1			2	3
	単独株	P31	非耐性				1	1
単独株	P32	R4		1			1	
	合計		13	33	3	8	1	58

来33株中の26株を含むブロイラーの優勢クラスターであった。クラスターⅢは人由来8株、ブロイラー由来1株、採卵鶏由来2株、豚由来2株から構成され、由来に多様性があり、B原因食品株もこのクラスターに含まれた。クラスターⅣは人由来2株と豚由来5株から構成され、豚由来8株中の5株が含まれた。人由来株はクラスターⅡ、Ⅲ及びⅣに分布し、ほかにP24型の単独株があった。A、B及びC食中毒株はいずれもクラスターⅢに含まれ、B、C食中毒株はP22型に、A食中毒株は

P23型に分類された。

薬剤耐性試験：いずれかの薬剤に耐性があった株は58株中の32株(55%)で、残る26株(45%)はいずれの薬剤にも耐性はなかった。耐性を示した薬剤数は1~4剤で、その耐性パターンによりR1~R10の薬剤耐性型に分かれ、非耐性型を加えると11タイプに分類された(表2)。由来別の耐性株数は、人由来で13株中の3株(23%)、ブロイラー由来で33株中の27株(82%)、採卵鶏由来に耐性株はなく、豚由来で8株中の2株(25%)であり、ブロイラーに耐性株が多かった。耐性株の中にはTCとSMに耐性を示す株が多く、両薬剤に耐性の株はR1~R5型の合計27株で、耐性株32株中の82%を占め、人由来の1株を除くとすべてブロイラー由来株であった(表2)。耐性株数は、TC耐性が30株(52%)、SM耐性が27株(47%)、NA耐性が10株(17%)、KM耐性が8株(14%)、ABPC耐性が2株(3.4%)、ST耐性が1株(1.7%)であった。なお、GM、CP、CPFX、CTXに耐性を示す株はなかった。

PFGE型と薬剤耐性型による分類：58株の*S. Infantis*はPFGEにより32の型に分類され、薬剤耐性試験により11の型に分類された。PFGE型を薬剤耐性型で細分類すると、P4型は3つに、P5型は2つに、P23型は2つに分かれ、32のPFGE型が36の型(複合型)に分類された。P5型には人由来1株とブロイラー由来1株が含まれていたが、複合型による分類で両者は別の型となった。また、P23型には人由来3株、ブロイラー由来1株、豚由来2株の計6株が含まれていたが、複合型による分類で豚由来の1株は他の5株と区別され別の型となった(表3)。人由来株と家畜由来株に共通する複合型は3つあり、P23・非耐性型は人由来3株、ブロイラー由来1株、豚由来1株に共通し、P27・非耐性型は人由来1株と豚由来1株に共通し、そしてP30・非耐性型は人由来1株と豚由来2株に共通していた。採卵鶏由来株については、人由来株と一致する複合型の株はなかった(表3)。しかしB、C食中毒株(P22・非耐性型)はPFGE解析で採卵鶏由来株(P20・非耐性型、P21・非耐性型)と最も近縁で、これらの株の類似度は96.51%であった。

考 察

人及び家畜由来*S. Infantis*を複合型で分類したところ、36の複合型の中では3つの複合型が人由来株と家畜由来株に共通していた。人由来株と同じ複合型がブロイラー由来株、豚由来株に認められたことは、人の感染源として鶏肉と豚肉が関与することが考えられた。今回、採卵鶏由来株では人由来株の複合型と一致する株はなかった。しかし、B、C食中毒株と最も近縁な株は採卵鶏由来株であり、薬剤耐性はいずれも非耐性型で一致

していた。また、B 食中毒の疫学調査では、鶏卵が原因食品に使用されていたことが分かっている。B 食中毒株、B 原因食品株及び C 食中毒株は同一の複合型になったこと、これらの食中毒は同じ年に発生したことから、B、C 食中毒は *S. Infantis* に汚染された共通の食品または食材が原因と考えられた。*S. Infantis* の型別に PFGE は有用な分子疫学的解析の手法であるとされている。伊藤ら [7] は人、ブロイラー、採卵鶏由来株を PFGE により解析し、汚染された鶏肉と鶏卵は *S. Infantis* による食中毒の原因になり得ると報告した。また、Noda ら [8] も鶏肉は人の *S. Infantis* 感染源の一つと報告している。われわれの成績でも、人由来株と同一の複合型をブロイラー及び豚由来株に認めたことから、鶏肉、豚肉は人の *S. Infantis* 感染の原因食品になる可能性が考えられた。また、複合型では一致しなかったが、採卵鶏由来株と人由来株とは近縁であることから採卵鶏も同様であると考えられた。

一般に家畜は畜種ごとに独立した畜舎で飼育され、飼料、畜舎環境等の飼育環境は必ずしも同一ではない。また、バイオセキュリティの確保により外部から畜舎内への病原体の侵入防止が図られている。したがって、畜種ごとの閉鎖的な飼育環境の中で固有の微生物が存在し、起源を同一とする近縁の微生物が分布していると推定されるが、サルモネラ属菌もその一つと考えられる。Asai ら [10] は、全国 10 県のブロイラー農場から分離した *S. Infantis* 33 株中、優勢クラスターが 31 株を占め、そのうちの 27 株がオキシテトラサイクリン及びジヒドロストレプトマイシン耐性で、近縁な株が全国的に分布していると報告した。われわれの成績も、ブロイラーの優勢クラスターを構成する株の多くが TC 及び SM 耐性であったことから、全国的に流行している株と近縁な株と考えられた。豚由来株は 8 株中の 5 株がクラスター IV に含まれ、これが豚の優勢クラスターである可能性が示唆された。豚由来株の薬剤耐性について、福安ら [6] は 28 株中の 2 株 (7%) が耐性株と報告し、Dahshan ら [11] は 5 株中の 2 株 (40%) が耐性株と報告した。われわれの成績では 25% が耐性株であり、他の報告と耐性率は異なるが、豚では少なくともブロイラーのような耐性株の出現がないと考えられた。

人由来 *S. Infantis* が 3 つのクラスターに分布したことは、人の感染源が 1 つではないことを示唆している。ブロイラーの優勢クラスターに属した人由来の 2 株は、複合型ではブロイラー由来株と一致しなかったが、ブロイラー由来株と非常に近縁であり、この 2 株の由来症例は鶏肉が感染源であった可能性が高いと考えられた。人由来株の薬剤耐性について、堀内ら [12] は東京都内で 1974~1979 年に分離した 109 株中の 58 株 (53.2%) が耐性株と、1980~1986 年に分離した 90 株中の 24 株

(26.7%) が耐性株であると報告し、経年ごとの耐性率の低下を指摘した。また、伊藤ら [7] は三重県下で 1993~2000 年に分離した人由来 8 株中の 7 株 (88%) が耐性株と報告した。われわれの成績では 23% が耐性株で堀内らの成績に類似していた。

PFGE は食中毒等において、分離菌の同一性を確認するための有用な分子疫学的手法として活用されている。しかしながら、サルモネラ属菌は高いクローナル性があり、*S. Infantis* については、ブロイラーと採卵鶏で固有の優勢クラスターの存在が報告されている [8, 10] ことなどから、PFGE 分析は由来の推定にも役立つと考えられる。本県で発生した *S. Infantis* による食中毒では原因食材が特定されなかったが、本研究によりその感染源が推定され、新潟県内における *S. Infantis* の疫学的傾向が判明した。したがって、PFGE 分析と薬剤耐性型を組み合わせ、畜種ごとの分離株のプロファイルデータベース化することにより、患者由来株のプロファイルを比較することで、原因食材の特定が可能になると考える。また、本研究のような遡り調査において、より詳細なデータを活用することは、食中毒対策に役立つものと考えられる。

本研究の実施にあたり、菌株を分与いただいた、新潟市食肉衛生検査所及び新潟県中央家畜保健衛生所の関係諸氏に深謝する。

引用文献

- [1] 田口真澄, 泉谷秀昌: サルモネラ, 食品衛生検査指針微生物編 2015, 269-283, (公社)日本食品衛生学会, 東京 (2015)
- [2] 加藤 玲, 松下 秀, 下島優香子, 石塚理恵, 貞升健志, 甲斐明美: 国内産鶏肉から検出されたサルモネラ属菌の血清型と薬剤耐性 (1992~2012 年), 感染症学雑誌, 89, 46-52 (2015)
- [3] 山田 亨, 河野喜美子, 八木利喬: 宮城県における家畜, 食肉・食鳥処理場の汚水, 鶏肉および河川水の *Salmonella* Corvallis 汚染実態調査, 日本食品微生物学会雑誌, 20, 105-110 (2003)
- [4] 太田宏一, 久保田 勉: 廃鶏 (採卵種) のサルモネラ保菌状況調査, 鶏病研報, 29, 81-83 (1993)
- [5] 吉田孝治, 高橋 勇, 澤田拓士: 1975~1989 年に食肉衛生検査所へ搬入された健康豚のサルモネラ保菌状況とその血清型, 日本細菌学雑誌, 50, 537-545 (1995)
- [6] 福安嗣昭, 二川慶子: 健康な豚からのサルモネラ分離と薬剤感受性, 豚病会報, 51, 9-15 (2007)
- [7] 伊藤英雄, 杉山 明, 岩出義人, 庄司 正, 山本絵美: ヒト, ブロイラーおよび採卵鶏由来 *Salmonella* *Infantis* のパルスフィールド電気泳動法による解析, 鶏病研報, 41, 47-51 (2005)
- [8] Noda T, Murakami K, Ishiguro Y, Asai T: Chicken meat is an infection source of *Salmonella* serovar *Infantis* for humans in Japan, *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 727-735 (2010)
- [9] 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 渡辺治雄: 菌株レベルの同定: パ

- ルスフィールドゲル電気泳動法による菌株のサブタイプ
ング, 腸内細菌学雑誌, 18, 117-122 (2004)
- [10] Asai T, Ishihara K, Harada K, Kojima A, Tamura Y, Sato S, Takahashi T: Long-term prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis in the broiler chicken industry in Japan, *Microbiol Immunol*, 51, 111-115 (2007)
- [11] Dahshan H, Chuma T, Shahada F, Akiba M, Fujimoto H, Akasaka K, Kamimura Y, Okamoto K: Characterization of antibiotic resistance and the emergence of AmpC-producing *Salmonella* Infantis from pigs, *J Vet Med Sci*, 72, 1437-1442 (2010)
- [12] 堀内三吉, 稲垣好雄, 中谷林太郎, 後藤延一, 吉田洋子, 楠 淳, 伊藤 武, 大橋 誠: 東京都で1966~1986年にヒトから分離されたサルモネラの血清型, 薬剤耐性, および接合性 R プラスミド, *感染症学雑誌*, 63, 352-362 (1988)

Typing of *Salmonella* Infantis Strains Isolated between 1998 and 2015 in Niigata Prefecture by Pulsed-field Gel Electrophoresis and Antimicrobial Resistance

Hiroshi SATO^{1)†} and Masao KAWASE²⁾

1) Niigata Prefectural Meat Inspection Center, 430 Okuyamashinbo, Shibata, 957-0064, Japan

2) Niigata Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 314-1 Sowa, Nishi-ku, Niigata, 950-2144, Japan

SUMMARY

Fifty-eight *Salmonella* Infantis isolated between 1998 and 2015 in Niigata Prefecture were classified by the PFGE pattern and microbial drug resistance profile. Of these fifty-eight strains, 32 were classified by the PFGE pattern, and 11 were classified by the antibiotic drug resistance profile. In regards to the 32 PFGE types, 3 PFGE types were further subdivided by the antibiotic drug resistance profile, and 58 strains were classified in 36 subtypes using typing combined with the PFGE pattern and the antibiotic resistance pattern. Because strains from human beings, broilers, and pigs were classified in the same subtype, it suggests that chicken and pork are potential sources of *S. Infantis* infection in humans. There were no strains from layers classified in the same strain subtype from humans, but some strains were identified genetically as closely related subtypes to the strains from humans. These results suggest that chicken eggs can be one source of *S. Infantis* infection in humans. — Key words : Antimicrobial resistance, infantis, PFGE, *Salmonella*, typing.

† Correspondence to : Hiroshi SATO (Niigata Prefectural Meat Inspection Center)

430, Okuyamashinbo, Shibata, 957-0064, Japan

TEL 0254-24-5281 FAX 0254-26-2117 E-mail : sato.hiroshi5@pref.niigata.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 475 ~ 480 (2016) —