

## 熊本県で捕獲された野生の猪から分離された多剤耐性

*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar*Choleraesuis* biotype Kunzendorf戸田純子<sup>†</sup> 原田誠也 西村浩一 大迫英夫

熊本県保健環境科学研究所 (〒 869-0425 宇土市栗崎町 1240-1)

(2017年1月11日受付・2017年5月8日受理)

## 要 約

熊本県では野生獣肉の安全性を確保するため、独自のモニタリング検査を実施している。2016年2月に猪8頭及び鹿2頭の検査を実施し、そのうち1頭の野生の猪の肝臓から本邦で初めて、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 enterica* subspecies *enterica* serovar *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。また、野生の猪が本菌を保菌し、養豚場への汚染源となり得ることがわかった。

——キーワード：多剤耐性サルモネラ, *Salmonella Choleraesuis*, 野生猪肉。

-----日獣会誌 70, 381~384 (2017)

サルモネラ属菌は、人や家畜に下痢や敗血症を引き起こす細菌である。特に *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 及び *S. Choleraesuis* (以下, SC) による牛, 豚, 猪及び鶏等の疾病は“サルモネラ症”として家畜伝染病予防法に定められた届出伝染病とされている[1]。熊本県では1999年の発生以降、年間1~数頭の豚サルモネラ症の届出がなされているが、家畜として飼育されている猪(以下,「家畜の猪」という)についての届出はなく、また、野生の猪については届出義務の対象となっていないため、実態はよくわかっていない。

熊本県では、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について、独自にモニタリング検査を行っている。1例として、県内で捕獲された野生の猪及び鹿の野生獣肉等について、2008年から衛生指標菌や汚染微生物の検査を行っている。今回、2016年2月に検査した猪の肝臓から、本邦で初めて、人にも感染して敗血症を引き起こすことがある SC biotype Kunzendorf (以下, SCK) を分離したので報告する。

## 材料及び方法

**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。

**サルモネラ属菌検査**：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)の別添1に示された方法に準じて行った。

**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2015[2-4]に準じて行った。

**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㈱, 東京)で50%乳剤とし、10,000rpm, 10分間遠心した。上清50 $\mu$ lからAGPC法でRNAを抽出し、20 $\mu$ lのDEPC水(Thermo Fisher Scientific, U.S.A.)に溶解した。これを鋳型として、Liら[5]の方法によりHEV遺伝子の検査を行った。

**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(National Committee for Clinical Laboratory Standards: Susceptibility Testing Process, Performance Standards for antimicrobi-

<sup>†</sup> 連絡責任者：戸田純子(熊本県保健環境科学研究所)

〒 869-0425 宇土市栗崎町 1240-1

☎ 0964-23-5771 FAX 0964-23-5260

E-mail: toda-j-w@pref.kumamoto.lg.jp

表1 猪から分離したサルモネラ株と S. Choleraesuis の生化学性状比較

生化学的性状	分離株	S. Choleraesuis		
		Biovar Choleraesuis	Biovar Kunzendorf	Biovar Decatur
TSI	K/A	K/A	K/A	K/A
硫化水素 (TSI)	+	-	+	+
ガス (TSI)	+	+	+	+
リジン (LIM)	+	+	+	+
インドール反応 (LIM)	-	-	-	-
運動性 (LIM)	+	+	+	+
オキシターゼ	-	-	-	-
VP	-	-	-	-
クエン酸 (シモンズ)	+	+	+	+
尿素	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-
ズルシトール	-	-	-	+
ラクトース	-	-	-	-
サリシン	-	-	-	-
ソルビトール	+	+	+	+
マロン酸	-	-	-	-
ゼラチン液化能	+	+	+	+
d- 酒石酸塩	+	+	+	+
粘液酸塩	-	-	-	-

K: アルカリ性 A: 酸性

al disk susceptibility test, Approved Standards, 12 thed, 15-39, pennsylvania (2015)) 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, U.S.A., 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: 10U), オキサシリン (MPIPC: 1 $\mu$ g), アンピシリン (ABPC: 10 $\mu$ g), セファロチン (CET: 30  $\mu$ g), セフォタキシム (CTX: 30 $\mu$ g), セフトラジジム (CAZ: 30 $\mu$ g), セフォキシチン (CFX: 30 $\mu$ g), セフメタゾール (CMZ: 30 $\mu$ g), セフミノクス (CMNX: 30 $\mu$ g), イミペネム (IPM: 10 $\mu$ g), メロペネム (MPEM: 10 $\mu$ g), ゲンタマイシン (GM: 10 $\mu$ g), カナマイシン (KM: 30 $\mu$ g), ストレプトマイシン (SM: 10 $\mu$ g), アミカシン (AMK: 30 $\mu$ g), テトラサイクリン (TC: 30 $\mu$ g), クロラムフェニコール (CP: 30 $\mu$ g), ナリジクス酸 (NA: 30 $\mu$ g), ノルフロキサシン (NFLX: 10 $\mu$ g), オフロキサシン (OFLX: 5 $\mu$ g), シプロフロキサシン (CPFX: 5 $\mu$ g), ST 合剤 (ST: 23.75 $\mu$ g/1.25 $\mu$ 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.

**$\beta$ -ラクタマーゼ阻害薬の影響の確認:**  $\beta$ -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) [6] に準じて検査を行った. 対

表2 分離株の薬剤感受性試験結果

抗生物質 (略号)	薬剤含有量 ( $\mu$ g)	判定結果
ペニシリン (PCG)	10U	耐性
オキサシリン (MPIPC)	1	耐性
アンピシリン (ABPC)	10	耐性
セファロチン (CET)	30	耐性
セフォタキシム (CTX)	30	感受性
セフトラジジム (CAZ)	30	感受性
セフォキシチン (CFX)	30	感受性
セフメタゾール (CMZ)	30	感受性
セフミノクス (CMNX)	30	感受性
イミペネム (IPM)	10	感受性
メロペネム (MEPM)	10	感受性
ストレプトマイシン (SM)	10	耐性
ゲンタマイシン (GM)	10	耐性
カナマイシン (KM)	30	感受性
アミカシン (AMK)	30	感受性
テトラサイクリン (TC)	30	感受性
クロラムフェニコール (CP)	30	感受性
ナリジクス酸 (NA)	30	感受性
ノルフロキサシン (NFLX)	10	感受性
オフロキサシン (OFLX)	5	感受性
シプロフロキサシン (CPFX)	5	感受性
ST 合剤 (ST)	23.75/1.25	耐性

象とする薬剤は, 耐性が認められた, ペニシリン系 3 剤 (PCG, MPIPC, ABPC) 及び第 1 世代セファロスポリン 1 剤 (CET) であり,  $\beta$ -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, U.S.A.), 及びアモキシシリン/クラブラン酸 (ACV) (栄研化学(株), 東京) の各種ディスクを用い,  $\beta$ -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.

**$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子検査法:** TEM-型, SHV-型 [7], 及び CTX-M-1, -2, -9 group [8] を増幅するプライマーを用いて, PCR 法により  $\beta$ -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<sup>®</sup> For PCR Product Clean-UP, Affymetrix, U.S.A.) で精製し, シークエンサー (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzers, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) を用いたダイレクトシークエンス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.

## 成 績

**サルモネラ属菌検査:** 野生の猪の肝臓 1 検体を培養した TT 培地を塗抹した ES サルモネラ II 寒天培地にのみ, 桃色に発色したサルモネラ様の定型的集落が少数認められた. 釣菌した 3 つの集落は, いずれもサルモネラ属菌の生化学性状 (表 1) を示し, 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。

**生菌数、大腸菌群及びカンピロバクター属菌検査：**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検査：**HEVは検出されなかった。

**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1世代セファロスポリン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(表2)。

**$\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の影響：**阻止円のみられなかったABPC単剤に比べ、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤を含む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に阻止円の拡張がみられた。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。

**$\beta$ -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 $\beta$ -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[9]。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によ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[10]。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, 11-13]があり、Matayoshiら[11]による薬剤耐性遺伝子の調査では、 $\beta$ -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[14]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。

今回われわれは、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, MIPIC, ABPC)、第1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 $\beta$ -ラクタマーゼは、ペニシリン系と第1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 $\beta$ -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[15]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[16]、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[16]。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、と殺解体時に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。

## 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 Microbi-*

- ol 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, (公社)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, (公社)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, (公社)日本食品衛生協会, 東京 (2015)
- [5] 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)
- [6] 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)
- [7] 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)
- [8] 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)
- [9] Chiu CH, Su LH, Chu C : *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment, Clin Microbiol Rev, 17, 311-322 (2004)
- [10] Asai T : *Salmonella Choleraesuis* infection in swine, All About Swine, 36, 16-18 (2010)
- [11] 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)
- [12] 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, 266-270 (2004)
- [13] 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, 321-326 (2011)
- [14] 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)
- [15] Bush K, Jacoby GA : Updates functional classification of  $\beta$ -lactamases, Antimicrob Agents Chemother, 54, 969-976 (2010)
- [16] 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)

Case Study of Multidrug-resistant *Salmonella Enterica* Subspecies *Enterica* Serovar Choleraesuis Biotype Kunzendorf Isolated from a Wild Boar Captured in Kumamoto Prefecture, Japan

Junko TODA<sup>†</sup>, Seiya HARADA, Koichi NISHIMURA and Hideo OSAKO

\*Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, 1240-1 Kurisaki-machi, Uto City, 869-0425, Japan

SUMMARY

To ensure the safety of wild meat such as wild boar or wild deer meat, the microbiological inspection of wild meat has been performed annually in Kumamoto Prefecture since 2008. In February 2016, we investigated the microbiological inspection of eight wild boars and two wild deer, and isolated *Salmonella Choleraesuis* biotype Kunzendorf, resistance to penicillin, oxacillin, ampicillin, cephalothin, streptomycin, gentamicin and sulfamethoxazole/trimethoprim, and the TEM-1 gene, in a wild boar liver. This finding indicates that multidrug-resistant *Salmonella* can pass to humans through wild boar meat. In addition, it suggests that wild boars captured in Kumamoto Prefecture are potential carriers of *S. Choleraesuis* and may be a source of *Salmonella* infection for domestic swine. — Key words : multidrug-resistant *Salmonella*, *Salmonella Choleraesuis*, wild boar meat.

<sup>†</sup> Correspondence to : Junko TODA (Kumamoto Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science) 1240-1 Kurisaki-machi, Uto City, 869-0425, Japan  
TEL 0964-23-5771 FAX 0964-23-5260 E-mail : toda-j-w@pref.kumamoto.lg.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 381 ~ 384 (2017)