

短 報

鶏盲腸内容物から分離されたサルモネラ属菌の薬剤耐性

水本嗣郎^{1)†} 鈴木香菜²⁾ 大越 魁¹⁾ 小川 紋¹⁾ 久家力也³⁾
 森主博貴¹⁾ 長岡宏美¹⁾ 村上光一⁴⁾

- 1) 静岡県環境衛生科学研究所 (〒426-0083 藤枝市谷稲葉 232-1)
- 2) 静岡県動物管理指導センター (〒431-1102 浜松市西区大山町 3551-1)
- 3) 静岡県中部健康福祉センター (〒426-0075 藤枝市瀬戸新屋 362-1)
- 4) 国立感染症研究所 (〒208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1)

(2020年6月29日受付・2021年7月5日受理)

要 約

2017年8～10月に静岡県内食鳥処理場に搬入された肉用鶏及び産卵鶏の盲腸内容物、計150検体についてサルモネラ属菌の有無及び薬剤耐性を調査し、58検体から96株分離した。同一検体由来の同一血清型の株はパルスフィールドゲル電気泳動法に基づき同一と判断したので、1検体1株のみとし、60株について12剤の薬剤感受性試験を実施した。肉用鶏由来株57株のすべてが2剤以上耐性であり、耐性薬剤はテトラサイクリン、ナリジクス酸、ストレプトマイシン及びカナマイシン (KM) のいずれかであり、産卵鶏由来株3株はすべての薬剤に耐性を示さなかった。また、*S. Schwarzengrund* を中心とする KM 耐性の 30 株について KM 耐性関連遺伝子を確認したところ、すべての株で *aphA1-Iab* 及び *aac(6′)-Iaa* を保有していた。——キーワード：薬剤耐性、サルモネラ属菌。

-----日獣会誌 74, 743～748 (2021)

細菌の薬剤耐性獲得は人の感染症治療の妨げとなり、医療現場において大きな問題となっている [1]。日本においても、薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議：薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020 (National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020), (<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>), (accessed 2020-06-08)) が公表され、耐性菌の問題は人の医療以外にも、動物、食品及び環境におけるさまざまな観点から取り組む必要があり、それぞれの分野における薬剤耐性菌の動向を把握することが対策を進める上で重要である。

鶏肉あるいは鶏卵を生産する肉用鶏及び産卵鶏を汚染する薬剤耐性サルモネラは、公衆衛生上大きな問題である [2]。養鶏業において、ワクチン接種時に第三世代セファロスポリンが投与されていたため第三世代セファロスポリン耐性サルモネラが鶏肉において一時的に増加したが、当該薬剤使用中止 (2012 年) により減少した [3、

4]。その後のサルモネラの薬剤耐性に関しては、鹿児島県を調査地域とした Ducら [5] の盲腸内容物由来サルモネラに関する報告があるが、国内の詳細な状況は不明である。また、産卵鶏由来サルモネラの薬剤耐性状況に関しては情報が少ない。

今回、静岡県内の産卵鶏及び肉用鶏が保菌するサルモネラ属菌の薬剤耐性状況を明らかにすることを目的に食鳥処理場に搬入された鶏の盲腸内容物を対象に調査した。

材料及び方法

材料：2017年8～10月に静岡県内食鳥処理場に搬入された肉用鶏4農場100羽 (A～D農場より各25検体) 及び産卵鶏1農場50羽 (E農場) の盲腸内容物を供試した。なお、すべての農場の試料は各1日で検体を採材した。

サルモネラ属菌の分離及び同定：採材した盲腸内容物 1g に緩衝ペプトン水 (Oxoid, U.K.) 10ml を加え 37℃, 24 時間培養し、その培養液 0.1ml をラパポート・

† 連絡責任者：水本嗣郎 (静岡県環境衛生科学研究所微生物部細菌班)

〒426-0083 藤枝市谷稲葉 232-1

☎ 054-625-9128 FAX 054-625-9142

E-mail : shiro1_mizumoto@pref.shizuoka.lg.jp

表1 カナマイシン薬剤耐性関連遺伝子検出用 PCR プライマーのヌクレオチド配列

標的遺伝子	プライマーのヌクレオチド配列 (5' → 3')	産物サイズ(bp)	引用文献
<i>aadD</i>	F*: ATATTGGATAAAATATGGGGAT R: TCCACCTTCCACTCACCGGTT	161	[6]
<i>aphA-3</i>	F: CTGTTCCAAAGGTCCTGCACT R: CAATTCGGCTAAGCGGCTGTC	215	[6]
<i>aphA/aph(3')-Id</i>	F: ATGGGCGCCTATCACAATTGG R: TCGCCTCCAGCTCTTCGTAGA	257	[6]
<i>aphA-7</i>	F: GGAAACACATAGATTGCTTTA R: CTCCACATCTTGCCAAATCAT	342	[6]
<i>aphA1-Iab</i>	F: AAACGTCTTGCTCGAGGC R: CAAACCGTTATTCATTCGTGA	461	[6]
<i>kn</i>	F: ACTGGCTGCTATTGGGCGA R: CGTCAAGAAGGCGATAGAAGG	516	[6]
<i>kan</i>	F: GTGTTTATGGCTCTCTTGGTC R: CCGTGTCGTTCTGTCCACTCC	622	[6]
<i>aac(6')-Iaa</i>	F: CCCGACCTTTTCTGTATGA R: ATCATGTCAACCCCTCATC	496	本研究 (参考配列: Accession No.CP048297.1)
<i>aac(6')-Iaa</i>	F: CAATCAATTGTTTCGCTACGC R: GATTGCGAAAACAGCTCTGG	246	本研究 (参考配列: Accession No.CP048297.1)

*F: forward, R: reverse

バシリアディス培地 (Oxoid, U.K.) 10ml に接種して 42℃, 24 時間培養した. 培養液を選択性に差のある DHL 寒天培地 (日水製薬株, 東京) 及び SSB 寒天培地 (日水製薬株, 東京) の 2 種類の選択培地に接種し, 各平板からサルモネラ属菌を疑う 1 コロニーを釣菌し, TSI 寒天培地 (日水製薬株, 東京) 及び LIM 寒天培地 (日水製薬株, 東京) に接種して生化学的性状を確認後, サルモネラ免疫血清 (デンカ生研株, 東京) で O 型別及び H 型別試験を実施した.

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析: 分離された菌株において Ribot ら [6] の方法を応用し, 制限酵素 *Xba* I (タカラバイオ株, 滋賀) を使用してパルスフィールドゲル電気泳動装置 (CHEF-DR III, Bio-Rad, U.S.A.) により泳動を実施した. 泳動条件は, 電圧 6V, パルスタイム 2.2~63.8 秒で 12℃, 20 時間とし, 画像解析には BioNumerics (Applied Maths, Belgium) を使用し, 類似度は Dice 係数 (トレランス 1%), デンドログラムには非加重結合法を用いた.

薬剤感受性試験: 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, 東京) を用い, ディスクの説明書に従って薬剤感受性試験を行った. 供試薬剤は, アンピシリン (ABPC), セフトキシム (CTX), セフトジジム (CAZ), セフトドキシム (CPDX), セフィキシム (CFIX), セフォキシチン (CFX), メロベネム (MEPM), テトラサイクリン (TC), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン (NFLX), ストレプトマイシン (SM) 及びカナマイシ

ン (KM) の 12 薬剤を用いた. 35℃ で 16~24 時間培養し, 耐性の判定は阻止円の直径を計測し, 説明書の感受性判定表に従った. 精度管理菌株として大腸菌 ATCC 25922 を用いた.

KM 耐性関連遺伝子検出: KM に耐性であった分離株について, 5% キレックス (Chelex 100 Resin, Bio-Rad, U.S.A.) 溶液により DNA を熱抽出し (96℃ 10 分間), 表 1 に示す Frana ら [7] の報告及び本研究にて設計した KM 耐性関連遺伝子を標的としたプライマーを用いて PCR を行い, 各遺伝子の保有状況を確認した. プライマー (標的遺伝子 *aac(6')-Iaa* 及び *aac(6')-Iaa*) の設計は, Accession No. CP048297.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP048297.1>), (accessed 2020-12-20) を参考とした. PCR 反応は 95℃, 5 分間変性後, 95℃ 1 分間, 60℃ 1 分間, 72℃ 1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクルの増幅を行い, さらに 72℃ で 10 分間追加伸長反応を行った.

成 績

サルモネラ属菌の検出状況: 肉用鶏及び産卵鶏の計 5 農場 150 検体のうち, すべての農場の 58 検体 (39%) から 96 株のサルモネラ属菌が分離された (表 2). 血清型の内訳は, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Manhattan (S. Manhattan), S. Schwarzengrund, S. Infantis, S. Braenderup 及び型別不明の株が分離された. サルモネラ属菌が分離された 58 検体のうち, 2 検体から 2 種類の血清型 (A 農場の S. Schwarzengrund

表2 農場別サルモネラ属菌の血清型と薬剤耐性パターン

農場	供試 検体数	サルモネラ属菌が 分離された検体数	分離された血清型*1	当該血清型分離菌株数 ／分離された検体数*2	薬剤感受性試験に 供した菌株数*3 ／分離元の検体数	耐性薬剤*4	
肉用鶏	A	25	24	S. Schwarzengrund S. Infantis	42/24 1/1	24/24 1/1	TC, SM, KM TC, SM
	B	25	19	S. Manhattan	36/19	19/19	TC, SM
	C	25	6	S. Infantis 型別不明 [OUT:r:1, 5]	5/5 1/1	5/5 1/1	NA, KM NA, KM
	D	25	7	S. Manhattan S. Manhattan	5/5 2/2	5/5 2/2	TC, NA, SM TC, SM
産卵鶏	E	50	2	S. Braenderup 型別不明 [OUT:b:en, x]	1/1 3/2	1/1 2/2	- -
計	150	58 (39%)		96/58	60/58		

*1: S. Schwarzengrund: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund

*2: 1 検体から2種類の血清型が分離されたものは2検体であった (A農場の検体 No. 9の S. Schwarzengrund 及び S. Infantis (No. 9-1 及び 9-2), 並びに E農場の検体 No. 57の S. Braenderup 及び型別不明 (No. 57-1 及び 57-2))。

*3: 同一検体から得られた2株が同一血清型であり, かつパルスフィールドゲル電気泳動型が同一であった場合は1株のみを薬剤感受性試験に供した。つまり A農場の S. Schwarzengrund 18 菌株, B農場の S. Manhattan 17 菌株及び E農場の型別不明 1 菌株は薬剤耐性試験に供しなかった。

*4: アンピシリン, セフトキシム, セフトジジム, セフトドキシム, セフィキシム, セフォキシチン, メロベネム, テトラサイクリン (TC), ナリジクス酸 (NA), ノルフロキサシン, ストレプトマイシン (SM) 及びカナマイシン (KM) を供試した。

及び S. Infantis, 並びに E農場の S. Braenderup 及び型別不明) が分離された。36 検体からは同一の血清型あるいは型別不明が1検体から2株分離され (A農場の18 検体からは S. Schwarzengrund が, B農場の17 検体からは S. Manhattan が, E農場の1 検体からは型別不明株が2株ずつ分離された), 残りの20 検体は1 検体から1株のみ分離された。

PFGE 解析: 分離した96 株中, C農場から分離された6 株 (S. Infantis 及び型別不明) はスメア状となり, 画像解析はできなかった。それを除く90 株の型別の結果, 同一農場及び同一血清型で類似のパターンを示した。さらに前述の1 検体から同一の血清型あるいは型別不明が2株分離された36 検体は, 両株がすべて同一の PFGE パターンを示した (図)。

薬剤感受性試験: 1 検体から同一の血清型が2株分離された36 検体は, 両株がすべて同一の PFGE パターンを示したため, 1 株のみ薬剤感受性試験を実施し, 計60 株のサルモネラ属菌の薬剤耐性パターンを得た (表2)。肉用鶏由来株では, TC 耐性 89.5% (51/57), SM 耐性 89.5% (51/57), KM 耐性 52.6% (30/57), NA 耐性 19.3% (11/57) であり, 全57 株において2 剤以上の薬剤に耐性が認められた。また, 耐性パターンは S. Schwarzengrund の24 株が TC, SM, KM に対して, S. Manhattan では5 株が TC, NA, KM の組み合わせで3 剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。

一方, 産卵鶏由来株3 株すべてがいずれの薬剤にも耐性を示さず, 肉用鶏及び産卵鶏ともに ABPC, CTX,

CAZ, CPDX, CFIX, CFX, MEPM 及び NFLX に耐性を示す株はみられなかった。

KM 耐性関連遺伝子保有状況: KM に耐性であった A農場の S. Schwarzengrund 24 株, C農場の S. Infantis 5 株及び型別不明 1 株の計30 株について, KM 耐性関連遺伝子の保有状況を確認したところ, すべての株で *aphA1-Iab* 及び *aac(6)-Iaa* の遺伝子が検出され, 他の遺伝子は検出されなかった。

考 察

今回の調査においては, 肉用鶏及び産卵鶏ともに菌が分離された。産卵鶏は, 主として生殖器部分はそのまま, 他の部位はひき肉加工品として一般消費者あるいは加工業者に供される (Murakami K: Chicken derivative food supply chains in Fukuoka Prefecture, Japan, 福岡県保健環境研究所年報, 42, 126-127 (2015), (online), (<http://www.fihes.pref.fukuoka.jp/~kikaku/Reports/Report42/pdf/np42report07.pdf>), (accessed 2020-06-20)). このため, 肉用鶏のみならず産卵鶏も食中毒原因食品となり得るのでさらなるデータ収集の必要性があると考えられた。

本研究において, 血清型は肉用鶏では S. Schwarzengrund, S. Infantis, S. Manhattan が主に分離され, これらは2013年から2016年にかけて鹿児島県のプロイラー192群から分離された菌とまったく同一の血清型であった [5]。

薬剤感受性試験では, 肉用鶏由来株において全57 株が2 剤以上に薬剤耐性を示し, 特に S. Schwarzengrund

鶏盲腸内容物から分離されたサルモネラ属菌の薬剤耐性

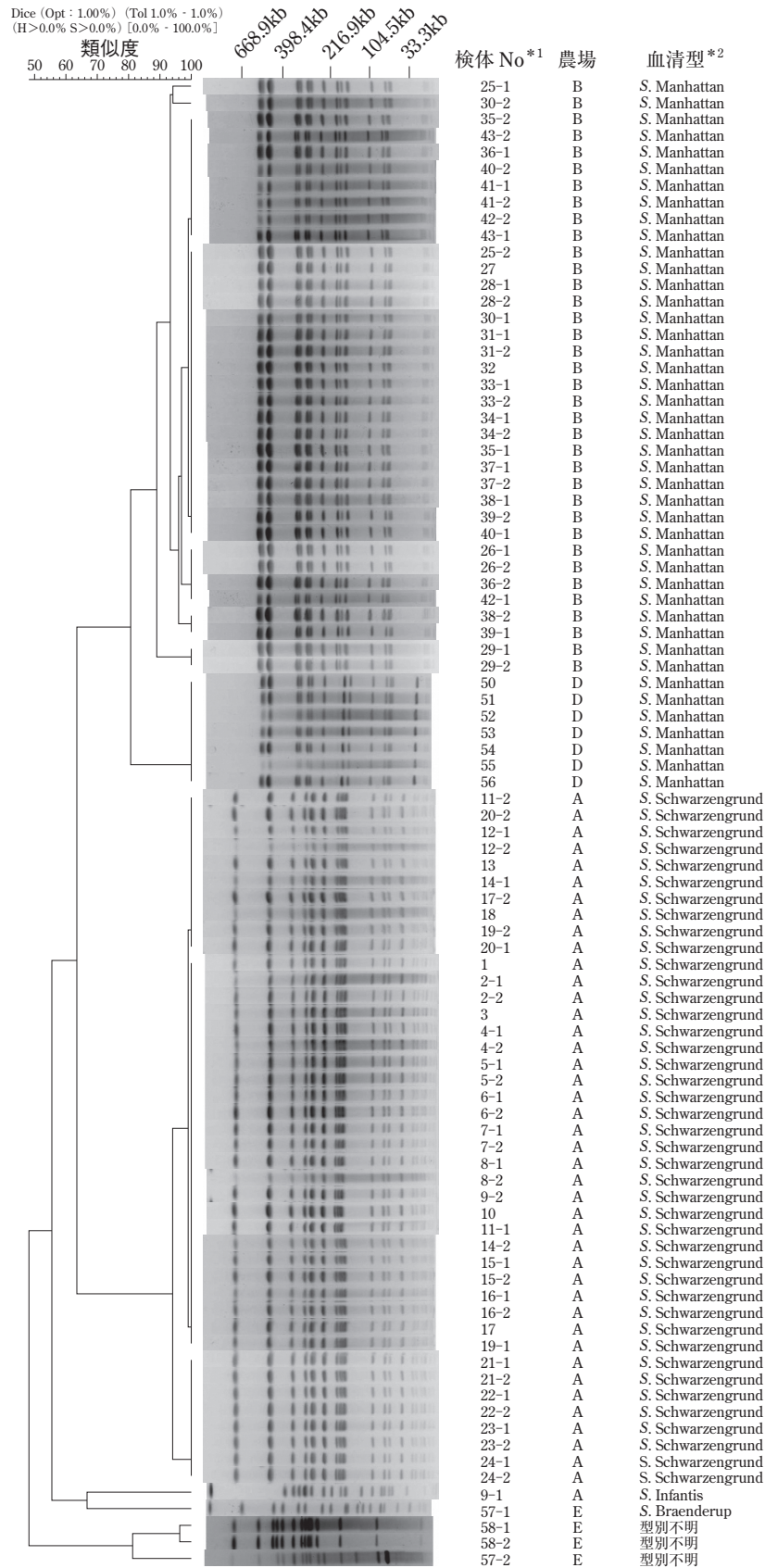


図 パルスフィールドゲル電気泳動解析結果

- *1 : 分離菌株の検体番号 A 農場 : 1~24, B 農場 : 25~43, C 農場 : 44~49, D 農場 : 50~56, E 農場 : 57・58
1 検体から 2 株分離された場合は、枝番で示す。なお、C 農場の菌株 (44~49) については、泳動像がすべてスメア状であったため、解析できなかった
- *2 : S. Schwarzengrund : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund

und は全株が TC, SM 及び KM の 3 剤に耐性を示す多剤耐性菌であった。薬剤別にみると, TC, SM 及び KM 耐性はそれぞれ 89.5%, 89.5% 及び 52.6% と高い耐性率であったが, 加藤ら [8] の国内産鶏肉から検出されたサルモネラ属菌の報告 (1992~2012 年調査) でも, TC, SM 及び KM 耐性株はそれぞれ 77.8%, 81.8% 及び 45.5% を占め, 今回の結果はこれと類似したものであった。

なお, すべての分離株は第三世代セファロスポリンに耐性を示さなかった。Shigemura ら [4] は, 第三世代セファロスポリン耐性サルモネラが鶏肉において 2011 年から減少したと報告しており, 今回の調査においても当該薬剤における耐性率が低い水準を保っていることが窺えた。

今回, *S. Schwarzengrund* を中心に, *S. Infantis* 及び型別不明の計 30 株で KM 耐性関連遺伝子 *aphA1-Iab* 及び *aac(6')-Iaa* を検出した。*aphA1-Iab* に関しては Frana ら [7] の家畜や家禽を含む鳥類等由来の *S. Typhimurium* においても当該遺伝子が最も多く検出され, Shahada ら [9] も KM 耐性の *S. Infantis* の 40% が保有していたと報告している。今回の調査を含め, 血清型の枠を越えて *aphA1-Iab* の保有がみられ, 遺伝子の伝達により KM 耐性株が増加する恐れも考えられた。

また, 検出した *aac(6')-Iaa* は, サルモネラ属菌の染色体上に保有しているが, 種々の要因が影響して耐性が発現すると想定されている [10]。今回のカナマイシン耐性に影響を及ぼした可能性も考えられた。

人医療にて重要な第三世代セファロスポリンやカルバペネム耐性菌が増加しているなか [1], さらに今回明らかとなったように KM 耐性遺伝子を持つサルモネラが鶏肉を介して人に感染することは, 人医療現場において悪影響を及ぼす可能性がある。今後もワンヘルスの概念をもとに, 人や畜産分野など多角的なモニタリングを実施し, 薬剤耐性等の傾向を確認する必要があると考えられる。

本研究は, AMED の課題番号 JP21fk0108103 の支援を受けた。

引用文献

- [1] Levy SB, Marshall B : Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses, *Nat Med* 10, 122-129 (2004)
- [2] Allen KJ, Poppe C : Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by β -lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada, *Can J Vet Res*, 66, 137-144 (2002)
- [3] Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, Furuta M, Onozuka D, Oda T, Asai T, Fujimoto S : Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan, *PLoS One* 10, e0116927, (2015), (online), (DOI: 10.1371/journal.pone.0116927), (accessed 2020-06-10)
- [4] Shigemura H, Matsui M, Sekizuka T, Onozuka D, Noda T, Yamashita A, Kuroda M, Suzuki S, Kimura H, Fujimoto S, Oishi K, Sera N, Inoshima Y, Murakami K : Decrease in the prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* following cessation of ceftiofur use by the Japanese poultry industry, *Int J Food Microbiol*, 274, 45-51 (2018)
- [5] Duc VM, Shin J, Nagamatsu Y, Fuhiiwara A, Toyofuku H, Obi T, Chuma T : Increased *Salmonella* Schwarzengrund prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* isolated from broiler chickens in Kagoshima Prefecture in Japan between 2013 and 2016, *J Vet Med Sci*, 82, 585-589 (2020), (online), (DOI: 10.1292/jvms.20-0096), (accessed 2020-06-08)
- [6] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ : Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet, *Foodborne Pathog Dis* 3, 59-67 (2006)
- [7] Frana TS, Carlson SA, Griffith RW : Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104, *Appl Environ Microb*, 67, 445-448 (2001)
- [8] 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)
- [9] Shahada F, Chuma T, Tobata T, Okamoto K, Sueyoshi M, Takase K : Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar *Infantis* from poultry in Kagoshima, Japan, *Int J Antimicrob Ag*, 28, 302-307 (2006)
- [10] Magnet S, Courvalin P, Lambert T : Activation of the cryptic *aac(6')-Iy* aminoglycoside resistance gene of *Salmonella* by a chromosomal deletion generating a transcriptional fusion, *J Bacteriol*, 181, 6650-6655 (1999)

Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from the Contents of Chicken Cecum
in Shizuoka Prefecture

Shiro MIZUMOTO^{1)†}, Kana SUZUKI²⁾, Kai OKOSHI¹⁾, Aya OGAWA¹⁾, Rikiya KUGE³⁾,
Hiroataka MORINUSHI¹⁾, Hiromi NAGAOKA¹⁾ and Koichi MURAKAMI⁴⁾

- 1) *Shizuoka Institute of Environment and Hygiene, 232-1 Yaynaba, Fujieda, 426-0083, Japan*
- 2) *Shizuoka Prefectural Pet Owners' Guidance Center, 3551-1 Oyamacho, Nishi-ku, Hamamatsu, 431-1102, Japan*
- 3) *Shizuoka Chubu Public Health and Welfare Centers, 362-1 Setoaraya, Fujieda, 426-0075, Japan*
- 4) *Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, 208-0011, Japan*

SUMMARY

We obtained 96 *Salmonella* isolates from 58 of 150 cecal content samples from broilers and laying hens at two processing plants in Shizuoka Prefecture from August to October 2017. Based on pulsed-field gel electrophoresis, 60 isolates from 58 samples were selected for antimicrobial susceptibility testing. All of the 57 isolates from the broilers were resistant to more than two antimicrobials, including tetracycline, nalidixic acid, streptomycin, and kanamycin. None of the three isolates from the laying hens were resistant to the antimicrobials tested. All 30 of the kanamycin-resistant isolates, including 24 isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Schwarzengrund, harbored *aphA1-Iab* and *aac(6')-Iaa*.

— Key words : antimicrobial-resistance, *Salmonella*.

† Correspondence to : Shiro MIZUMOTO (*Shizuoka Institute of Environment and Hygiene*)

232-1 Yaynaba, Fujieda, 426-0083, Japan

TEL 054-625-9128 FAX 054-625-9142 E-mail : shiro1_mizumoto@pref.shizuoka.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 743 ~ 748 (2021)