

原 著

CTX-M-55 β-ラクタマーゼ産生性 *Salmonella enterica* 血清型 4:i:- による

牛サルモネラ症発生事例と薬剤耐性遺伝子の解析

貞弘 恵¹・鈴木一步²・室伏淳一³・松井小雪⁴・秋庭正人⁵

¹ 静岡県中部家畜保健衛生所、島田市野田 1120-1、427-0007、静岡県

現：静岡県立農林環境専門職大学、磐田市富丘 678-1、438-8857、静岡県

² 静岡県東部家畜保健衛生所、田方郡函南町仁田 101、419-0114、静岡県

現：NOSAI 宮崎児湯家畜診療所、児湯郡新富町新田 17938-5、889-1406、宮崎県

³ 静岡県東部家畜保健衛生所、田方郡函南町仁田 101、419-0114、静岡県

⁴ 静岡県中部家畜保健衛生所、島田市野田 1120-1、427-0007、静岡県

現：静岡県西部農林事務所、浜松市中区中央 1 丁目 12-1、430-0929、静岡県

⁵(独) 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門、つくば市観音台 3-1-5、305-0856、茨城県

要 約 2013 年 4 月初旬に静岡県内の酪農家において分娩後数日経過した成牛 3 頭が発熱、水様性下痢、血便を呈し相次いで死亡した。さらに、同居牛群に同様の症状が蔓延し、5 月中旬までに成牛 6 頭が死亡した。病性鑑定の結果、死亡牛の腸管内容物と腸間膜リンパ節および同居牛の直腸便から *Salmonella enterica* 血清型 4:i:- が分離された。薬剤感受性試験、P/Case test、double disk synergy test の結果、本菌は基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) を産生し、第 4 世代セファロスポリンにも耐性を示す多剤耐性菌であることが示された。さらに、耐性遺伝子の塩基配列を確認したところ、本菌は ESBL 遺伝子 *bla*_{CTX-M-55} を染色体上に保有することが明らかとなった。本報は CTX-M-55 β-lactamase 産生株による牛サルモネラ症に関する初めての報告である。

キーワード: *bla*_{CTX-M-55}, 染色体, 基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ, 第 4 世代セファロスポリン, サルモネラ 血清型 4:i:-

受領日: 08.12.2020. 受理日: 02.02.2021.
日本畜産環境学会会誌 No20 (1) pp22-29. 2021

No.19/20 合併号としての発刊に伴い、掲載ページが改訂されました. No19/20 (1) pp34-41. 2021

緒 言

牛のサルモネラ症は種々の血清型のサルモネラに起因する感染症で、下痢、敗血症を主徴とする急性あるいは慢性の伝染性疾病である。本症では *Salmonella* Typhimurium (以下 ST)、*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。中でも ST は原因血清型として重要視されており、この 2 相鞭毛抗原が発現しない単相変異株とされる *S. 4:i:-* が人や家畜のサルモネラ症の原因菌として 2010 年以降増加傾向にある [7, 8]。さらに、サルモネラの多剤耐性化が問題となる中、2006 年に国内で初めて家禽から CMY-2 型耐性遺伝子をもつ

S. Infantis が分離され[18]、2010年にはTEM型耐性遺伝子を保有する *S. Infantis* が食鳥処理場へ出荷された家禽から分離される [16] など、国内でも家畜からの基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生性サルモネラの分離に関する報告が散見される。

本報では、静岡県内の酪農家において発生した第4世代セファロスポリンを含む複数の抗菌剤に耐性を示す *S. 4:i:-* による成牛のサルモネラ症の概要と薬剤耐性遺伝子の解析結果について報告する。

材料および方法

発生農場及び経緯：静岡県東部の発生農場はフリーストール牛舎で乳用牛310頭を飼養する酪農場である。当該農場では、購入粗飼料、配合飼料におから等食品残さを加えた自家製TMRを給与していた。またサルモネラ症ワクチンは接種しておらず、2012年12月以降の牛の移出入はなかった。

2013年4月初旬に分娩直後の成牛3頭に40°Cの発熱、食欲不振、水様性下痢および血便が確認され、4月9日に1頭、同14日に2頭が相次いで死亡した。発生当初は、コクシジウム症を疑い管理獣医師による治療を実施していたが、症状が改善されないため、一部アンピシリンの投薬も行われた。しかし、4月中旬以降に新たに2頭が同様の症状を呈したことから、2013年4月22日に畜主及び

管理獣医師から病性鑑定の依頼に基づき次の検査を実施した。なお病性鑑定の依頼以降も下痢症状を示す牛は増加し、5月中旬までに合計6頭が死亡した。表1に下痢症状を呈した死亡牛の詳細を列記する。

剖検及び病理組織学的検査：水様性下痢、起立不能を呈し死亡した牛（表1、No.4）を剖検し、主要な臓器を採材した。定法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。また一部の組織標本について、サルモネラ04群抗血清（デンカ株式会社）を用いた免疫組織化学染色を実施し、顕微鏡観察を行った。

ウイルス学的検査：病性鑑定牛、下痢発症牛2頭、同居牛8頭の直腸便について簡易抗原検出キット（ラピッドテストアタローアデノ、清水メディカル株式会社、Rainbow Calf Scours-BIO K 288, Bio X Diagnostics）を用いてロタウイルス、アデノウイルスおよびコロナウイルスについて検査を行った。

寄生虫学検査：病性鑑定牛、下痢発症牛2頭、同居牛8頭の直腸便について浮遊法にてコクシジウムオーシストの有無の確認を行った。

細菌学的検査：剖検で採材した主要臓器および下痢発症牛、同居牛の直腸便について、5%綿羊血液加トリプトソイ寒天培地、DHL (Deoxycholate Hydrogen sulfide lactose)

表1 下痢症状を呈した死亡牛の概要

No.	発症日	死亡日	発症月齢	主な症状
1	2013/4/2	2013/4/9	57	下痢、発熱
2	2013/4/2	2013/4/14	31	第四胃変位、下痢、発熱
3	2013/4/6	2013/4/14	45	ケトーシス、起立不能、下痢、発熱
4 (病性鑑定牛)	2013/4/14	2013/4/23	76	暗赤色水様性下痢、起立不能、発熱
5	2013/4/26	2013/5/7	79	下痢、発熱
6	2013/5/7	2013/5/14	66	食欲不振、下痢、発熱

寒天培地を用い、ガスパック法による CO₂ 培養（アネロパック・CO₂, 三菱ガス化学株式会社）と 5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天培地を用いたガスパック法による嫌気培養（アネロパック・ケンキ, 三菱ガス化学株式会社）を実施した。さらに直腸便についてハーナーテトラチオン酸塩培地で 42°C、20 時間増菌培養後、DHL 寒天培地を用いた好気培養を実施した。TSI 寒天培地（栄研化学）、シモンズクエン酸ナトリウム培地（栄研化学）、SIM 培地（栄研化学）、リジン脱炭酸試験用培地（栄研化学）にて生化学的性状検査を実施した。サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ株式会社）にて血清型別を実施するとともに、ST 同定のため *Salmonella* serovar Typhimurium Identification Kit (TaKaRa) を用いて PCR を実施した。さらに、サルモネラの 2 相 H 抗原を規定する遺伝子 (*fljB*) を検出する PCR [5] を行った。

薬剤感受性試験：薬剤感受性用ディスク（センシディスク, 日本 BD）を用い、一濃度ディスク拡散法により実施した。供試薬剤はアンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、セフォキシチン (CFX)、セフォタキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ)、セフェピム (CFPM)、セフピロム (CPR)、クロラムフェニコール (CP)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ナリジクス酸 (NA) およ

びシプロフロキサシン (CPFX) の 13 薬剤である。さらに ESBL 産生性を確認するため Double Disc Synergy Test、P/Case Test（日水）を実施した。

ESBL 遺伝子解析: β ラクタマーゼ遺伝子型を決定するために、Akiba らの報告 [2] にあるプライマーを用いて、報告に従い PCR を行った。増幅した β -ラクタマーゼ遺伝子について、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した後、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, [3]) を用いて相同性検索を行い、 β -ラクタマーゼ遺伝子型を決定した。さらに、分離株におけるプラスミドの存在ならびに β -ラクタマーゼ遺伝子の存在位置を確認するため、Shahada らの報告 [17] に従い、S1 ヌクレアーゼ（タカラバイオ株式会社）で消化し、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 後、サザンブロット解析を行った。加えて、ゲノム DNA を I-CeuI (New England BioLabs) で消化し、泳動した PFGE 像を用いて同様に解析した。

結 果

剖検及び病理組織学的検査：剖検では、主要臓器は全体的に煮肉様で、腸管粘膜からの出血が顕著に認められた。また第四胃に潰瘍が認められた。組織学的に第四胃では、粘膜

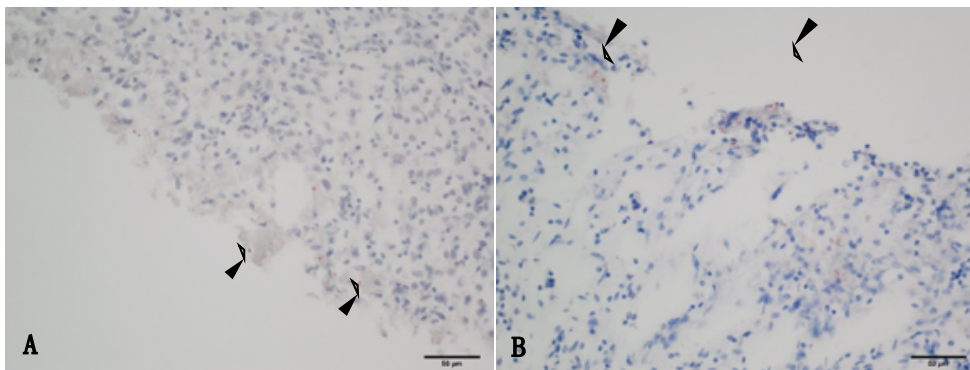


図1 解剖牛の病理組織所見
第四胃 (A)、子宮 (B) において *Salmonella* 04 群に対する陽性反応 (矢頭) が認められた。
(*Salmonella* 04 群抗血清による免疫組織化学的染色 Bars=50 μ m)

上皮の剥離、粘膜固有層から粘膜下織に至る炎症細胞浸潤、出血が認められた。子宮では粘膜上皮における細菌を伴う炎症細胞浸潤内膜炎が認められた。サルモネラ 04 群抗血清を用いた免疫組織化学染色では回腸、盲腸、腸間膜リンパ節、第四胃 (図 1A)、子宮 (図 1B) でサルモネラ 04 群の陽性反応が認められた。

ウイルス学的検査：簡易抗原検出キットを用いた検査では、ロタウイルス、アデノウイルスおよびコロナウイルスのいずれも陰性であった。

寄生虫学検査：浮遊法による検査では、コクシジウムオオシストは検出されなかった。

細菌学的検査：病性鑑定牛の腸間膜リンパ節、盲腸内容、結腸内容および子宮内容、さらに下痢発症牛の直腸便からから *Salmonella* spp. が分離された。血清型別の結果、抗原構造は 4:i:- と判定された。確認のために実施した ST 同定 PCR では、サルモネラが共通に保有する遺伝子 (*invA*:605bp) および ST が特異的に保有する遺伝子 (94bp、196bp、303bp) が検出されたが、*fljB* 遺伝子 (394bp) は検出されなかった。

薬剤感受性試験：キノロン系、セファマイシン系には感受性を示したが、ABPC、CEZ に加え、第3、第4世代セファロスピリンの CTX、CAZ、CFPM および CPR に耐性を示した (表2)。さらに CP、TC および GM にも耐性を示し、供試した 13 薬剤のうち 8 薬剤に耐性を示した。

また、Double Disc Synergy Test では、供試した 4 薬剤 (CTX、CAZ、CFPM、CPR) でい

れも阻止帯が形成され、クラブラン酸による阻害効果が認められたことから本サルモネラは ESBL 産生菌と判定された。さらに P/Case Test によりペニシリナーゼ陽性、セファロスピナーゼ陰性であったことから、ESBL 単独産生菌と判定された。

ESBL 遺伝子解析：本菌の ESBL の遺伝子型は *bla*_{CTX-M-55} と判定された。また、S1-PFGE ではプラスミドのバンドは認められず、その後のサザンブロット解析で染色体由来フラグメントに *bla*_{CTX-M-55} プローブのシグナルが認められた。I-CeuI-PFGE 後のサザンブロット解析においても染色体由来のフラグメントに *bla*_{CTX-M-55} プローブのシグナルが認められた (図2)。以上の結果から *bla*_{CTX-M-55} が染色体上に存在することが明らかとなった。

考 察

S. 4:i:- は ST の 2 相鞭毛抗原が発現しない変異株であり、その病原性は ST と同等であることから、2018 年 4 月 1 日より本菌も届出伝染病として扱うことになった [14]。*S.* 4:i:- は人や家畜のサルモネラ症の原因菌として増加傾向にあり、全国におけるサルモネラ症の発生状況調査の結果、牛サルモネラ症の約 10% は本菌が原因で発生しており、乳用牛、肉用牛ともに本菌の分離頻度が 2012 年以降に上昇していることが明らかになっている [1]。静岡県における *S.* 4:i:- の牛サルモネラ症の発生は 2013 年の本症例が初めてであり、全国の流行と一致して県内にも侵入していたことになる。今回、病原体の農場へ

表2 薬剤感受性試験結果

	ABPC	CEZ	CFX	CTX	CAZ	CFPM	CPR	CP	TC	KM	GM	NA	CPFX
病性鑑定牛 由来株	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	S	I
同居牛 由来株	R	R	S	R	I	R	R	R	R	I	R	S	I

R: 耐性、 I: 中間、 S: 感性

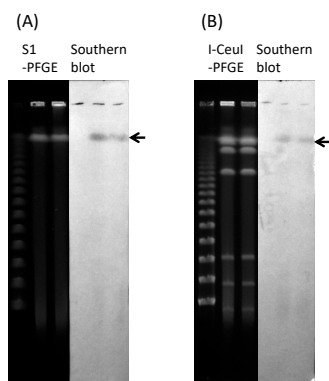


図2 β-ラクタマーゼ遺伝子に関するサザンブロット解析
(A) S1ヌクレアーゼ処理; (B) I-Ceu I 処理; M、ラムダラダーマーカー; レーン1、病性鑑定牛分離株; レーン2、同居牛分離株; いずれも左側はPFGE像、右側はサザンブロット; 矢印はサザンブロットで検出されたバンド位置を示す。

の侵入経路について詳細な調査は行われなかったが、水圏環境、土壌、野生動物、ハエなどの衛生昆虫を介した経路が薬剤耐性菌の伝播・拡散において重要な役割を果たしていると考えられており [20]、農場における人、家畜、物の移動のみならず、農場周辺の環境を含めた様々な経路を介しての侵入・伝播を考慮する必要がある。

本症例から分離されたサルモネラは第 3、4 世代セファロスポリンを含む複数の抗菌剤に耐性を示す多剤耐性菌であり、ESBL 遺伝子 *bla*_{CTX-M-55} を染色体上に保有していた。第 3、4 世代セファロスポリンは小児サルモネラ症の主要な治療薬であり、それらに耐性を示すサルモネラが家畜から分離されたことから、公衆衛生上、特段の注意を払う必要があると考えられた。人の臨床現場において ESBL 産生菌が大きな問題となっている [9] が、近年、家畜を含む動物からの分離報告が増えている [6]。ESBL にはさまざまな型が存在し、主要なものでは TEM 型、SHV 型および CTX-M 型があるが [4]、国内において家畜由来の細菌で検出される ESBL は、人由来の細菌と同様に CTX-M 型が主流であり [6, 19]、その多くは大腸菌で検出されている [6, 10, 12, 15]。一方、国内の家畜由来 ESBL 産生サルモネラの報告は大腸菌と比較して

少なく、ブロイラー由来 *S. Infantis* や *S. Hader* で報告 [11, 16] が散見されるが、本症例のように牛由来 ESBL 産生 ST および *S. 4:i:-* の報告は国内においても 1 例 [13] のみであり、本報は *bla*_{CTX-M-55} 遺伝子保有菌による牛サルモネラ症としては初めての報告である。また、多くの場合、プラスミド上に存在する CTX-M 型 ESBL 遺伝子が、染色体上に存在していることが特徴的であった。本症例は

2013 年に発生したものであるが、2019 年に Zhang らが中国において *bla*_{CTX-M-55} 遺伝子を染色体上に持つサルモネラの出現と流行を報告しており [21]、その動向について今後も注視していく必要がある。

本報告は 2014 年に開催された第 55 回全国家畜保健衛生業績発表会における口頭発表および 2015 年 11 月 30 日発行の家畜衛生週報 (No. 3380) に掲載した内容に近年蓄積された知見を追加し、新たな視点で検討した内容である。

文 献

- [1] 秋庭正人(2017)平成 28 年度戦略的監視・診断体制整備事業 (病原体 (サルモネラ(4:i:-)) の収集・解析委託事業) 調査報告書
- [2] Akiba M, Sekizuka T, Yamashita A, Kuroda M, Fujii Y, Murata M, Lee K, Joshua DI, Balakrishna K, Bairy I, Subramanian K, Krishnan P, Munuswamy N, Sinha RK, Iwata T, Kusumoto M, Guruge KS (2016) Distribution and relationships of antimicrobial resistance determinants among extended-spectrum-cephalosporin-resistant or carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolates from rivers and sewage treatment plants in

- India: Antimicrob. Agents Chemother: 60(5): 2972-2980.
- [3] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool: J Mol Biol: 215:403-410.
- [4] 荒川宜親 (2003) 広域β-ラクタム薬耐性に関するβ-ラクタマーゼの特徴と遺伝的相関: 日臨微生物誌 13: 150-161.
- [5] Echeita MA, Usera MA (1998) Rapid identification of *Salmonella* spp. phase 2 antigens of the H1 antigenic complex using "multiplex PCR", Res Microbiol: 149 (10): 757-761.
- [6] 原田和記, 浅井鉄夫 (2015) 動物に由来する CTX-M 型基質拡張型β-ラクタマーゼ産生大腸菌: 日化療会誌 63: 181-186.
- [7] Ido N, Kudo T, Sasaki K, Motokawa M, Iwabuchi K, Matsudate H, Seimiya Y, Akiba M (2011) Molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i- isolated from cattle and humans in Iwate Prefecture, Japan: J.Vet.Med.Sci: 73 (2): 241-244.
- [8] Ido N, Lee K, Iwabuchi K, Izumiya H, Uchida I, Kusumoto M, Iwata T, Ohnishi M, Akiba M (2014) Characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i- as a monophasic variant of serovar Typhimurium: PLoS One: 9: e104380.
- [9] 石井良和 (2007) 基礎・臨床の両面からみた耐性菌の現状と対策 2 基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌: モダンメディア: 53 巻 4 号: 98-104.
- [10] Kameyama M, Chuma T, Yabata J, Tominaga K, Iwata H, Okamoto K (2013) Prevalence and epidemiological relationship of CMY-2 AmpC β-lactamase and CTX-M extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from broiler farms in Japan: J.Vet.Med.Sci: 75(8):1009-1015.
- [11] 加藤玲, 松下秀, 下島優香子, 石塚理恵, 貞升健志, 甲斐明美 (2015) 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 (1): 46-52.
- [12] 木口陽介, 小嶋暢, 遠藤千春, 齋藤友佳, 楠本正博 (2014) ブロイラーから分離された大腸菌のβ-ラクタマーゼ産生性及び分子疫学的性状に関する研究: 日獣会誌 67: 739-746.
- [13] Kijima M, Shirakawa T, Uchiyama M, Kawamishi M, Ozawa M, Koike R (2019) Trends in the serovar and antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* from cattle and pigs between 2002 and 2016 in Japan: J Appl Microbiol: 127(6): 1869-1875.
- [14] 農林水産省消費・安全局動物衛生課 (2018) サルモネラ (4:i:-) の取り扱いについて: 平成30年3月29日; 29 消安第6791号.
- [15] Norizuki C, Kawamura K, Wachino J, Suzuki M, Nagano N, Kondo T, Arakawa Y (2018) Detection of *Escherichia coli* producing CTX-M-1-group extended-spectrum β-lactamases from pigs in Aichi Prefecture, Japan, between 2015 and 2016: Jpn.J.Infect.Dis: 71: 33-38.
- [16] Shahada F, Chuma T, Dahshan H, Akiba M, Sueyoshi M, Okamoto K (2010) Detection and characterization of extended spectrum β-lactamase (TEM-52)-producing *Salmonella* serotype Infantis from broilers in Japan: Foodborne Pathog Dis: 7(5): 515-521.
- [17] Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, Okazaki H, Tanaka K, Uchida I, Izumiya H, Watanabe H, Tamamura Y, Iwata T, Akiba M (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(9):

4114-4121.

[18] Taguchi M, Seto K, Yamazaki W, Tsukamoto T, Izumiya H, Watanabe K (2006) CMY-2 beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from poultry in Japan: Jpn J Infect Dis: 59(2): 144-146.

[19] Trott D (2013) β -lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals : Curr Pharm Des: 19: 239-249.

[20] 臼井 優 (2016) 家畜を含む動物における薬剤耐性菌の現状とヒトへの伝播の可能性: Med Technol: 44: 409-413.

[21] Zhang CZ, Ding XM, Lin XL, Sun RY, Lu YW, Cai RM, Webber MA, Ding HZ, Jiang HX (2019) The Emergence of chromosomally located *bla*_{CTX-M-55} in *Salmonella* from foodborne animals in China:Frontiers in Microbiology: 10: 1268.

Original Paper

Bovine salmonellosis caused by CTX-M-55 β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serotype 4: i - and analysis of drug resistance genes

Megumi Sadahiro¹, Kazuho Suzuki², Junichi Murofushi³, Koyuki Matsui⁴, and Masato Akiba⁵

¹ Shizuoka Prefecture Chubu Livestock Hygiene Service Center, 1120-1 Noda, 427-0007, Japan

<Present Office> Shizuoka Professional University of Agriculture, 678-1 Tomioka, 438-8857, Japan

² Shizuoka Prefecture Eastern Livestock Hygiene Service Center, 101 Kannami Nitta, 419-0114, Japan
<Present Office> Miyazaki Agricultural Mutual Aid Association Koyu Livestock Clinic, 17938-5 Shintomi Nyuta, 889-1406, Japan

³ Shizuoka Prefecture Eastern Livestock Hygiene Service Center, 101 Kannami Nitta, 419-0114, Japan

⁴ Shizuoka Prefecture Chubu Livestock Hygiene Service Center, 1120-1 Noda, 427-0007, Japan

<Present Office> : Shizuoka Prefecture Western Agriculture and Forestry Office, 1-12-1, Chuou, Naka, 430-0929, Japan

⁵ Division of Bacterial and Parasitic Disease, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, 305-0856, Japan

In April 2013, three cows presented with fever, watery diarrhea, and bloody stools several days after calving, and died on a daily farm in Shizuoka prefecture, Japan. In addition, similar symptoms prevailed among cohabiting herds on the same farm, and six cows died by the middle of May. The monophasic variant of *Salmonella enterica* serovar 4:i:- was isolated from the intestinal contents, mesenteric lymph nodes of dead cows, and rectal stools of cohabiting cows in the pathological examination. The results of antimicrobial susceptibility, P/Case, and double disk synergy tests, and the analysis of resistance genes revealed that the isolates showed resistance to multiple antimicrobials including 4th generation cephalosporins, and carried the extended-spectrum β -lactamase gene, *bla*_{CTX-M-55}, in the chromosome. This is the first report of bovine salmonellosis caused by CTX-M-55 β -lactamase-producing *Salmonella enterica* in Japan.

Key words: *bla*_{CTX-M-55}, chromosome, extended spectrum β -lactamase, 4th generation cephalosporins, *Salmonella* 4:i:-

Corresponding: Megumi Sadahiro sadahiro.megumi@spua.ac.jp

Receipt of Ms: 08.12.2020. Accepted: 02.02.2021.

Journal of Animal Production Environment Science No.20(1) pp22–29, 2021

The page has been revised due to the publication as a No19/20 merger issue. No19/20 (1) pp34–41.

2021