

9 県内で分離された *Staphylococcus aureus*

菌株の特徴

東青地域県民局地域農林水産部青森家畜保健衛生所

○高橋 優 太田 智恵子
米田 有希 佐藤 宏樹
金野 加奈 林 敏展
角田 裕美 中村 成宗

1 背景

Staphylococcus aureus(以下、「SA」という。)は、人や動物に化膿性炎症や毒素性食中毒を引起すグラム陽性球菌で、病畜だけでなく、健康動物の粘膜や皮膚、腸管などからも検出される。SAが産生するエンテロトキシン(以下、「SE」という。)やSE様毒素(以下、「SE1」という。)は現在、SEA~SE1Xの存在が報告¹⁾され、疫学の指標となるコアグラエーゼ(以下、「Coa」という。)はI~X型に分類される。近年では、ヒトの医療現場と性状の異なる家畜由来メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(以下、「MRSA」という。)が国内で分離されている。²⁾

今回、分離したSAのSE、Coaの遺伝子型を調査するとともにMRSA保菌状況を調査したので報告する。

2 材料および方法

(1) 材料

平成10年から令和2年に健康動物及び病性鑑定動物から分離されたSA特異的遺伝子である*femA*及び*femB*を保有する保存菌株98株を材料とした。

その内訳は、乳牛由来50株、肉牛由来6株、豚由来16株、鶏由来5株及びイルカ由来21株である。

(2) 方法

ア PCR-based ORF Typing(以下、「POT」という。)法

市販のSA用分子疫学解析POTキット(Cica)を用いて、PCRを行った。このキットはプロフェージを構成する遺伝子や*mecA*、*SCCmec*関連遺伝子の増幅パターンを利用するもので、3つの数値の組み合わせ「POT1-POT2-POT3」で表される。また、メチシリン耐性に関与する*mecA*を保有する場合、1つ目の数値(POT1)が64以上となり、MRSAと判断

される。

イ パルスフィールド電気泳動(以下、「PFGE」という。)法

PulseNet に記載された方法³⁾に従い、全ゲノムDNAを制限酵素 Sma I で処理し、泳動パターンを解析した。

ウ Coa 型別

InstaGene DNA 精製マトリックス (Bio-Rad) で DNA を抽出後、Hirose らが作成したプライマー⁴⁾を用いて、multiplex PCR を行い、保有する遺伝子から I ~ X 型に分類した。

PCR で型別が不能だった株については、市販のウサギ血漿 (栄研化学 (株)) を用いた試験管法により確認試験を実施した。

エ SE 型別

狩野らで作成したプライマー⁵⁾を用いて multiplex PCR を行い、その泳動パターンにより *sea*~*selq* を検出した。また、毒素性ショック症候群に關与する *tsst-1* 遺伝子を検出した。

オ 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は動物用医薬品危機管理対策事業の方法⁶⁾に従って、ペニシリン (PCG)、セファゾリン (CEZ)、セフトキシム (CTX)、セフォキシチン (CFX)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、エリスロマイシン (EM)、アジスロマイシン (AZM)、シプロキサシン (CPFX)、クロラムフェニコール (CP) について、ディスク拡散法により実施した。

加えて、耐性が報告されているバンコマイシン (VCM) とオキサシリン (MPIPC)

については、ドライプレート栄研 (栄研化学 (株)) を用いて微量液体希釈法により実施し、CLSI のガイドライン⁷⁾に基づいて判定した。

3 結果

(1) POT 法による型別

乳牛及び肉牛由来株の結果は表 1 に示すとおり、19 パターンに分類された。POT 1 が 64 以上を示した株はなく、MRSA は確認されなかった。また、牛由来 56 株中 33 株が No. 4 及び No. 12 の POT 型に分類された。

表 1 POT 法による分類

No.	POT型				乳牛		肉牛		計
	0	-	0	-	0	82	1	1	
1	0	-	0	-	0		1		1
2	0	-	8	-	82	1			1
3	0	-	17	-	0		1		1
4	0	-	17	-	34	13	4		17
5	0	-	25	-	16	1			1
6	0	-	25	-	34	1			1
7	2	-	9	-	16	2			2
8	4	-	16	-	0	3			3
9	4	-	62	-	42	1			1
10	6	-	0	-	56	1			1
11	6	-	17	-	0	2			2
12	6	-	17	-	34	16			16
13	6	-	17	-	42	1			1
14	6	-	32	-	8	1			1
15	6	-	34	-	0	1			1
16	6	-	34	-	8	2			2
17	6	-	50	-	24	2			2
18	6	-	96	-	0	1			1
19	22	-	96	-	0	1			1

豚、鶏、イルカの結果は表 2 に示すとおり、20 パターンに分類された。No. 3 や No. 11 の POT 型のように、由来動物種の異なる株が同一の POT 型に分類されるものもあった。POT 1 が 64 以上を示した株はなく、MRSA は確認されなかった。

表2 POT法による分類

No.	POT型	(株数)			
		豚	鶏	イルカ	計
1	0 - 0 - 0			1	1
2	0 - 0 - 33	5			5
3	0 - 8 - 80	1		2	3
4	0 - 9 - 16	1			1
5	0 - 25 - 80			1	1
6	0 - 25 - 82			1	1
7	2 - 183 - 37			2	2
8	4 - 8 - 80			7	7
9	4 - 18 - 16		1		1
10	4 - 26 - 48			1	1
11	6 - 0 - 0	2		3	5
12	6 - 16 - 80			1	1
13	6 - 16 - 99	2			2
14	6 - 16 - 103	1			1
15	6 - 17 - 0			1	1
16	6 - 18 - 1		4		4
17	6 - 25 - 80			1	1
18	6 - 80 - 111	2			2
19	6 - 81 - 1	1			1
20	6 - 81 - 111	1			1

(2) PFGE型とPOT型

PFGE型とPOT型により菌株間を比較し、図1に示した。調査した全ての動物種において、PFGE像が類似している場合は同一のPOT型に分類され、PFGE像が異なる場合はPOT型も異なる結果となった。

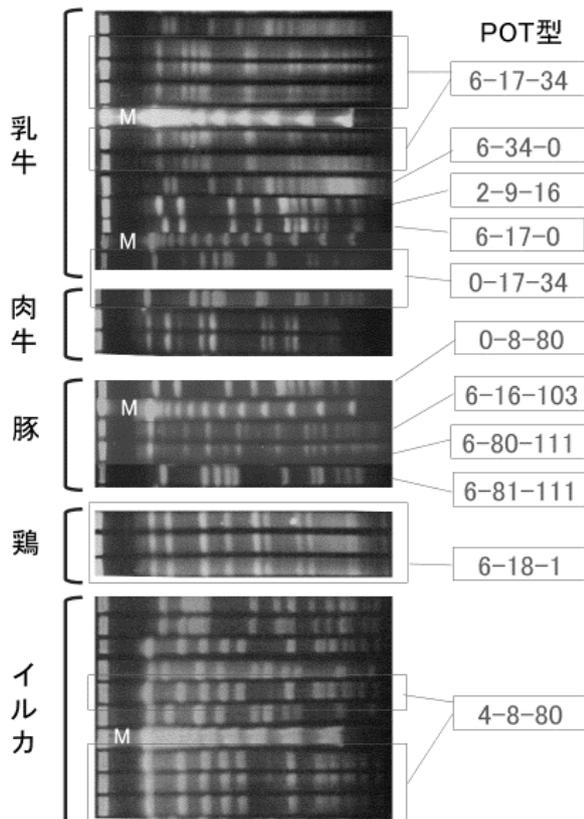


図1 PFGE像とPOT型

(3) Coa型別

Coa型は表3に示すとおり、保有する遺伝子からII~VIII型に分類された。乳牛由来株はVI型、豚由来株はIVa型、鶏及びイルカ由来株はVa型が多くみられた。

なお、肉牛由来の6株全てがPCRで型別できず、全動物種合わせると43株が型別不能であった。このうち乳牛由来株、豚由来株、イルカ由来株各1株は試験管法で陰性を示した。

表3 Coa型別結果

Coa型	(株数)				
	乳牛	肉牛	豚	鶏	イルカ
II	3			1	
III			1		
IVa			6		
Va			5	4	14
Vb	1				
VI	11				
VII	1		1		6
VIII	1				
型別不能	33	6	3		1
試験管法					
陰性	1		1		1

(4) SE遺伝子保有状況

乳牛由来株のSE遺伝子保有状況は表4に示すとおり、*sea*は20株、*seb*は1株、*sec*は9株保有していた。その他、SE1遺伝子を含めるとその組み合わせは14パターンであった。*sec*を保有する9株中8株が*tsst-1*を保有していた。また、16株はSE遺伝子を保有していなかった。

表4 SE 遺伝子保有状況

										(株数)	
遺伝子										乳牛	
A											4
A	B								P		1
A		C	G	I	L		N		tsst-1		2
A		C	G	I	L						1
A		G									5
A		G	I			M	N	O			3
A		G	I				N				1
A		G	I								3
		C	G	I	L		N		tsst-1		3
		C	G	I	L				tsst-1		2
		C			L		N		tsst-1		1
			G	I		M	N	O			3
			G								3
							N				2
noSE											16

A: sea B: seb C: sec G: seg I: sei L: sell
M: selm N: seln O: selo P: selp

その他の動物種については、表5に示すとおり、30株が sea~sed を保有しており、SE 様毒素遺伝子を含めるとその組み合わせは 20 パターンであった。

表5 SE 遺伝子保有状況

										(株数)				
遺伝子										肉牛	豚	鶏	イルカ	
A														4
A	C	G	I	L	M	N	O		tsst-1					1
A		G								2	1			
A		G	H	I	K		M	N	O				Q	1
A		G	I			M	N	O						7
A		G	I				N					2	4	
A		G					N				1			
A		H		K					Q					2
B		G												1
B		G	I			M	N	O						1
B		G							P					1
B									P					1
		D									1			
		G	I			M	N	O					1	2
		G	I				N						2	
		G				M					1			
		G					N					5		
			I									1		
									P				1	1
noSE										2	2			

A: sea B: seb C: sec D: sed G: seg H: seh
I: sei K: selk L: sell M: selm N: seln
O: selo P: selp Q: selq

(5) 薬剤感受性

ディスク拡散法による薬剤感受性試験の結果は表6のとおり、乳牛由来株では PCG や SM 耐性の株がみられ、2 剤以上耐性株が確認

されたが、肉牛由来株の耐性薬剤は確認されなかった。豚由来 16 株中 6 株、鶏由来 5 株中 4 株が PCG 耐性を示した。イルカ由来 21 株中 13 株が PCG 耐性であり、多剤耐性株を 7 株確認した。

微量液体希釈法を行った VCM 及び MIPIC については全ての菌株が MIC 値 ≤ 2 μg/mL であった。

表6 薬剤感受性

動物種	耐性薬剤	株数
乳牛 (n = 50)	PCG	3
	SM	4
	PCG, CPFX	1
	TC, EM, AZM	1
肉牛 (n = 6)	なし	
豚 (n = 16)	PCG	1
	PCG, TC, CP	1
	PCG, TC, EM, AZM	3
	PCG, TC, CP, EM, AZM	1
鶏 (n = 5)	TC, EM, AZM	1
	PCG, GM, KM, EM, AZM	4
イルカ (n = 21)	PCG	6
	CPFX	1
	PCG, CPFX, EM, AZM	2
	PCG, GM, KM, EM, AZM	4
	PCG, GM, KM, CPFX, EM, AZM	1

4 まとめ及び考察

県内で分離された 98 株の SA の性状について調査したところ、全ての株がメチシリン耐性に関与する mecA 陰性であり、MRSA は確認されなかった。

ヒトの SA 感染症分子疫学調査で使用される POT キットを用いて調査したところ、POT 型は多様であり、PFGE 型が類似している場合は同一の POT 型であった。このことから、PFGE よりも短時間で簡便に解析できる POT 法は家畜の感染症における疫学調査にも有用であると考えられる。

Coa型は保有する遺伝子からⅡ～Ⅷ型に分類された。牛乳房炎由来株はⅥ型が多く検出されるといわれている。⁸⁾今回調査した乳牛由来株は全て乳房炎由来株であり、既報と同様の結果となった。

98株中40株はPCRによる型別が不能であったことから、この40株はⅠ～Ⅹ型以外の型であることが示唆された。また、このうちの3株はSA特有の遺伝子である*femA*及び*femB*を保有するにも関わらず、試験管法でCoa陰性を示した。このことから、①ウサギ血漿が不適合、②Coa微弱産生株、もしくは③Coa産生能のないSAだった可能性が考えられた。

SEについて調査したところ、98株中60株が*sea*～*see*を保有しSE1遺伝子を含めると、その保有遺伝子の組み合わせは多彩であった。乳牛では*sec*と*tsst-1*が乳房炎と関連あるとの報告⁹⁾があるが、今回の調査では乳房炎由来の株から*sea*を多く検出し、他のSEも検出されたことから既報とは異なる結果となった。

薬剤感受性試験では、98株中34株で薬剤耐性が認められた。これらの株は病性鑑定動物由来であり、投薬治療の影響による結果だと考えられた。また、豚及び鶏由来株は乳牛由来株と比較して、多剤耐性の傾向があった。

今回の調査では、動物種や分離由来による菌株類似性は認められたものの、多彩な遺伝子の保有を確認した。MRSAは検出されなかったものの、多剤耐性菌が分離されていることから、抗菌剤の慎重使用を呼びかけながら今後も菌株を収集し、MRSAに着目して調査を継続していきたい。

参考文献

- 1) 胡東良ら：ブドウ球菌エンテロトキシンに関する最新の知見—特に分子多様性と生物学的多機能性について—, 日本食品微生物会雑誌 32(2), 87-94. (2015)
- 2) Furuno M, et al.: J Glob Antimicrob Resis (2018)
- 3) PulseNet: Laboratory Protocol for Molecular Typing of *S. aureus* by Pulsedfield Gel Electrophoresis (PFGE), https://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf (2021.3.19)
- 4) Mina Hirose et al.: Jpn. J. Infect. Dis., 63, 257-263, (2010)
- 5) 狩野ら：ブドウ球菌エンテロトキシンを網羅的に検出する multiplex PCR, 岩獣会報, Vol. 35(No. 2), 43-48 (2009)
- 6) 農林水産省動物医薬品検査所：令和2年度動物用医薬品危機管理対策事業 薬剤耐性菌の発現状況調査テキスト2 (薬剤感受性試験法), 令和2年7月
- 7) CLSI: <https://clsi.org/> (2021.3.19)
- 8) Hata et al.: J Vet Med Sci., 68(2), 165-70, (2006)
- 9) 小峰ら：乳牛の健康ならびに乳房炎乳房の乳汁中ブドウ球菌とその産生毒素の検出, 日獣会誌 53 435-440 (2000)