豚疣贅性心内膜炎から分離した *Streptococcus suis* の薬剤感受性及び分子疫学的解析

北海道早来食肉衛生検査所　○大野祐太　柳沢梨沙　横山光恵　古﨑洋司
酪農学園大学獣医食品衛生　大久保寅彦
北海道立衛生研究所　池田徹也　清水俊一

1　はじめに

当所が所管すると畜場では、豚疣贅性心内膜炎の原因菌として *Streptococcus suis*（以下、*S. suis*）を頻繁に検出する。本菌は豚において心内膜炎だけでなく関節炎や髄膜炎を起こし、と畜検査における廃棄対象となるほか、人に対しても髄膜炎などを引き起こすことが知られている。国内では *S. suis* の薬剤耐性についての報告はまだ多くないことから、今回、分離された *S. suis* の薬剤耐性状況及び株間の近縁性について調査し、若干の知見を得たので報告する。

2　材料および方法

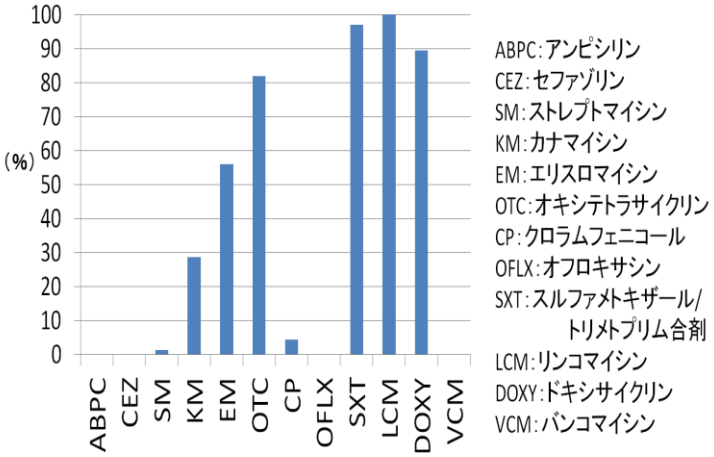
平成 22 年から平成 24 年にかけてと畜検査時に発見した疣贅性心内膜炎から定法により菌を分離後、ラピット ID32 ストレップアピ（BIOMERIEUX）で *S. suis*1 及び 2 と同定した 20 生産者由来の 66 分離株を検体とした。薬剤感受性試験は薬剤含有ディスクを用いて Kirby-Bauer 法に基づき実施した。試験薬剤はアンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、ストレプトマイシン（SM）、カナマイシン（KM）、エリスロマイシン（EM）、オキシテトラサイクリン（OTC）、クロラムフェニコール（CP）、オフロキサシン（OFLX）、スルファメトキサゾール/トリメトプリム合剤（SXT）、リンコマイシン（LCM）、ドキシサイクリン（DOXY）、バンコマイシン（VCM）を使用した。薬剤耐性遺伝子についてはリアルタイム PCR 法を用いてマクロライド耐性 1 種類(*ermB*)とテトラサイクリン耐性 2 種類（*tetM*、*tetO*）を検出した。また、生産者間や農場間における株の遺伝学的近縁性を調べるため、各菌株ゲノム DNA を制限酵素 Sma I により処理し、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）による系統解析を実施した。

3　成績

（1）薬剤感受性試験

66 株すべてが、ABPC、CEZ、OFLX、VCM を除くいずれかの薬剤に耐性があり、最少で 2 種類、最多で 7 種類の薬剤に対しての多剤耐性を示した。

薬剤別での耐性株数は LCM で 66 株（100%）、SXT で 64 株（97.0%）、DOXY で 59 株（89.4%）、OTC で 54



第 1 図：66 株の薬剤に対する耐性率

株（81.8%）、EM で 37 株（56.1%）、KM で 19 株（28.8%）、CP で 3 株（4.5%）、SM が 1 株（1.5%）であった（第 1 図）。今回の調査で薬剤耐性結果を分類したところ 18 パターンに分けられ、それらを生産者間で比較した。分離株の多い生産者 A（9 株）と B（9 株）では下表に示す薬剤耐性パターン①（LCM、SXT、DOXY、OTC 、KM、EM 耐性）がそれぞれ 3 株と 2 株、パターン②（LCM、SXT、 DOXY、OTC、EM 耐性）がそれぞれ 3 株と 6 株みられた。また、生産者 C は距離の離れた 2 つの農場 a と b を有し、a 農場から 8 株、b 農場から 15 株が分離されたうち、パターン⑦（LCM、SXT、DOXY、OTC、KM 耐性）が a 農場で 4 株と b 農場で 1 株、パターン⑧（LCM、SXT、DOXY、OTC 耐性）が a 農場で 4 株と b 農場で 7 株であった（第 1 表）。

第 1 表：各生産者の薬剤耐性パターン及び該当する株数

パターン	耐性のあった薬剤								各パターンの分離株数				
	LCM	SXT	DOXY	OTC	KM	EM	SM	CP	生産者A	生産者B	生産者C		他生産者
											a 農場	b 農場	
①	○	○	○	○	○	○			3	2			3
②	○	○	○	○		○			3	6			10
③	○	○	○	○		○		○	1				1
④	○	○		○		○			1				0
⑤	○	○		○	○	○				1			0
⑥	○	○			○	○	○		1				0
⑦	○	○	○	○	○						4	1	0
⑧	○	○	○	○							4	7	3
⑨	○	○	○									6	0
⑩	○	○										1	0
⑪	○	○	○	○	○	○		○					1
⑫	○	○	○		○								1
⑬	○	○	○			○							1
⑭	○	○			○	○							1
⑮	○	○			○								1
⑯	○	○											1
⑰	○		○	○	○	○							1
⑱	○		○	○		○							1
計									9	9	8	15	25

○：耐性あり

（２）薬剤耐性遺伝子

薬剤耐性遺伝子として *ermB* を 65 株で、*tetO* を 63 株で検出したが、*tetM* は検出されなかった。マクロライド系の耐性遺伝子である *ermB* が検出された 65 株のうち 37 株が EM と LCM 両方に対して耐性を示し、28 株が LCM に対してのみ耐性を示した。*ermB* が検出されなかった 1 株は LCM に対して耐性を示した（第 2 表）。テトラサイクリン系の耐性遺伝子 *tetO* を検出した 63 株のうち 49 株が OTC と DOXY の両方に対して耐性を示し、3 株が OTC のみ耐性、8 株が DOXY のみ耐性、3 株が両方とも耐性なしであった。*tetO* を検出しなかった 3 株では、2 株が両方とも耐性、1 株が両方とも耐性なしであった（第 3 表）。

第 2 表: *ermB* 遺伝子の有無と EM / LCM 耐性の関係（株数）

	*ermB*遺伝子＋	*ermB*遺伝子－
EM耐性 ＋ LCM耐性 ＋	37	0
EM耐性 ＋ LCM耐性 －	0	0
EM耐性 － LCM耐性 ＋	28	1
EM耐性 － LCM耐性 －	0	0

第 3 表 : *tetO* 遺伝子の有無と OTC / DOXY 耐性の関係（株数）

	*tetO*遺伝子 ＋	*tetO*遺伝子 －
OTC耐性 ＋ DOXY耐性＋	49	2
OTC耐性 ＋ DOXY耐性－	3	0
OTC耐性 － DOXY耐性＋	8	0
OTC耐性 － DOXY耐性－	3	1

（３）菌株の類縁関係の比較

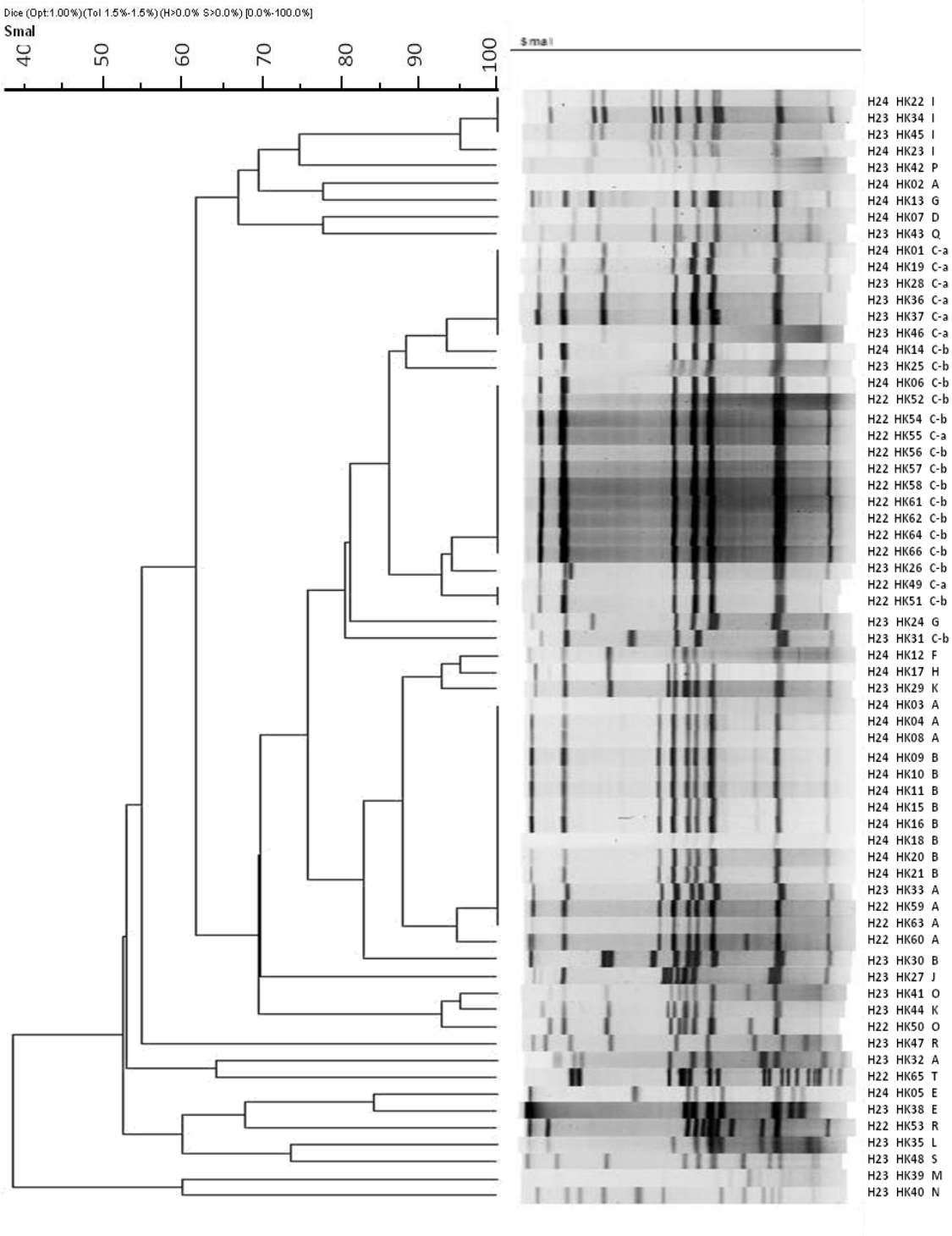
PFGE 法の結果、生産者 A、B、C に由来する株を生産者間で比較したところ、類似した泳動パターンが見られた（第 2 図）。生産者 A と B に由来する株の間で 90%以上の近縁性が認められ、生産者 C の a 、 b 農場において、90%以上の近縁性をもつ群が約 25 km 離れた２つの農場から分離された。

また、この生産者 A、B、C の菌株の縁類関係について経時的に比較したところ、生産者 A では平成 22 年～24 年の 3 年間で得られた株に 90%の相同性が認められ、生産者 C も同様に 3 年間で得られた株に 90%の相同性が認められた（第 2 図）。

４　考察

LCM 、SXT、DOXY 及び OTC に対しては分離株の 80%以上が耐性を示し、生産者毎の類似した薬剤耐性パターンが見られた。LCM と EM は高い交差耐性を示すといわれているが、今回の調査で交差耐性が見られたのは 37 株（56%）であり、マクロライド系の耐性遺伝子である *ermB* が検出されたにも拘わらず EM に耐性を示さない株があった。これは *ermB* による薬剤耐性が誘導性であるからだと考えられる。また、それらの株が示した LCM 耐性については、薬剤排出ポンプに関わる遺伝子など *ermB* とは別の要因が推察される。

PFGE 法による系統解析の結果、別々の生産者から分離された株間で近縁性が認められたことから、農場間を行き来する要因で同一の *S. suis* 株が拡散した可能性が考えられた。したがって、農場へ出入りする場合の汚染予防対策及び施設内消毒等が重要であると考えられ、今回の調査結果について疾病発生予防のために生産者に対してフィードバックし、農場を *S. suis* から清浄化する対策を促すことにより、敗血症による全部廃棄を減少させられるかもしれない。また、*S. suis* による疣贅性心内膜炎は全道的によく見られる疾病であるため、今後、農場間の広がりを含めた全道的調査を行い、実態把握と疾病減少に向けて取り組んでいきたい。



第２図：66 株の PFGE 法の結果からの系統樹

凡例　　H24　　HK22　　I

（検体採取年度）（検体番号）（農場記号）