

牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium  
に関する分子疫学的研究

玉村 雪乃

獣医細菌学ユニット  
指導教員 教授 菊池 直哉

2015 年度

## 略語表

ABPC: アンピシリン

CAZ: セフトジジム

CEZ: セファゾリン

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

CP: クロラムフェニコール

CPFX: シプロフロキサシン

CTX: セフォタキシム

ERFX: エンロフロキサシン

GM: ゲンタマイシン

KM: カナマイシン

MLVA: Multi-locus variable number tandem repeats analysis

MMC: マイトマイシン C

NA: ナリジクス酸

PCR: polymerase chain reaction

PFGE: pulsed-field gel electrophoresis

RDNC: reacted but did not conform with clear phage types

SM: ストレプトマイシン

SUL: サルファ剤

SXT: スルファメトキサゾール/トリメトプリム

TC: テトラサイクリン

TMP: トリメトプリム

UPGMA: unweighted pair group method arithmetic mean

目次	項
緒言	1
第 I 章 過去 33 年間に北海道内で分離された牛由来 <i>Salmonella</i> Typhimurium の分子疫学的解析	6
1. 序言	7
2. 材料と方法	8
3. 結果	
(1) 545 株の遺伝子型別と遺伝子型の経年変化	13
(2) MLVA	13
(3) 薬剤感受性試験	13
(4) DT104 特異的配列保有率	22
(5) フェージ型別	22
(6) VII型菌の各種遺伝子保有状況	26
4. 考察	32
5. 小括	36
第 II 章 北海道内の一酪農場において分離された <i>Salmonella</i> Typhimurium の分子疫学的解析	37
1. 序言	38
2. 材料と方法	39
3. 結果	
(1) <i>Salmonella</i> の分離状況	42
(2) 薬剤感受性試験	42

(3) プラスミドプロファイル	42
(4) PFGE	42
(5) MLVA	44
(6) ファージ型別	44
(7) 初発牛由来株およびスズメ由来株の病原性	44
4. 考察	47
5. 小括	51

第III章 <i>Salmonella</i> Typhimurium DT104 が産生する百日咳毒素様蛋白 ArtAB の性状解析	52
1. 序言	53
2. 材料と方法	54
3. 結果	
(1) PCR による <i>artAB</i> の検出	61
(2) ArtAB の産生誘導および精製	61
(3) ArtAB の構造解析	61
(4) マウスに対する致死活性	67
(5) ArtAB の赤血球凝集活性、インスリン分泌応答増強活性、白血球増 多活性	67
4. 考察	72
5. 小括	76
第IV章 多剤耐性 <i>Salmonella</i> Typhimurium PFGE VII型菌が保有する薬剤耐性 病原性プラスミドの性状解析	77

1. 序言	78
2. 材料と方法	79
3. 結果	
(1) 薬剤耐性病原性プラスミドの解析	80
(2) <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> プラスミドの解析	83
(3) 接合伝達試験	85
4. 考察	86
5. 小括	89
総括	90
謝辞	93
引用文献	94
付図説明	108

## 緒言

*Salmonella* はグラム陰性桿菌であり、腸内細菌科の一属に分類される。本菌は *Salmonella enterica*, *S. bongori* の2菌種に分類され、さらに *S. enterica* は6亜種 (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) に分類される。ほ乳類や鳥類の病気の原因となる菌の多くは、*S. enterica* subsp. *enterica* に属する。また、*Salmonella* は、菌体抗原 O 抗原および鞭毛抗原 H 抗原により、2500 以上の血清型に分類され、血清型ごとに病原性の程度や宿主域が異なる。特定の動物のみに全身性のチフス性疾患や敗血症を起こす血清型としては、*S. Typhi*、*S. Paratyphi A*、*S. Gallinarum*、*S. Pullorum*、*S. Abortusequi* があげられる。特定動物にチフス性疾患を起こすほか、人や他の動物に急性胃腸炎または敗血症を起こす血清型として、*S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*S. Choleraesuis*、*S. Dublin* などがある。さらに、上記以外の血清型で、特定の宿主域はないが人および動物に急性胃腸炎を起こすものがある。

*Salmonella* は腸管粘膜への付着および定着、上皮細胞侵入性、マクロファージ殺菌抵抗性、補体抵抗性等に関与する、様々な病原因子を保有している [16]。マウスに対する病原性には、少なくとも 60 の遺伝子が関与していると考えられている [16, 78]。これらの病原因子に関連する遺伝子のほとんどは染色体上に存在し、多くは染色体上の *Salmonella pathogenicity island* という領域に含まれる。これに加え、一部の血清型では病原性に関連した血清型特異的なプラスミドを保有する [60]。血清型特異的病原性プラスミド上には、マクロファージ内での増殖に関与する *Salmonella plasmid virulence (spv)* 領域が共通に存在する [60]。*S. Typhimurium* は約 94 kb の血清型特異的病原性プラスミドを保有しており、*spv* 領域以外に、線毛に関連する *pef* (plasmid-encoded fimbriae) オペロンや、補体抵抗性に関連する *rck* (resistance to complement killing) および *srgA*、*srgB*、*srgC* (*SdiA*-regulated genes) 等の因子を含んでいる [60]。

牛サルモネラ症は種々の血清型のサルモネラに起因する伝染性疾病であり、発症牛

は発熱、下痢、肺炎等の症状を示し、重症例では敗血症を呈して死亡する。本症は世界各国で発生が認められ、我が国においては、*S. Typhimurium*、*S. Dublin*、*S. Enteritidis* の3血清型が家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されており、北海道では、これらの3血清型による牛サルモネラ症の発生が、年間100~350頭程度認められている [51]。近年では届出対象以外の血清型による発生が増加しているものの、*S. Typhimurium* による発生が依然として最も多く、乳用牛においては約8割、肉用牛においては約6割を占める [49, 50, 51]。牛サルモネラ症は、以前は肉用牛での発生がほとんどであったが、1992年以降では、乳用牛での発生が増加し、現在では肉用牛における発生よりも圧倒的に多くなっている。さらに、発症牛の発育ステージにも変化が見られており、1980年代までは子牛での発生が主体であったが、1990年代以降は成牛における発生が急増した [51]。このような傾向は北海道だけでなく、ほぼ全国的に認められた。また、欧米でも同様な傾向が認められている。フランスにおける成牛のサルモネラ症発生件数は、1986~1987年では253件であるのに対し、1988~1989年では680件となり、著しい増加が認められた [64]。同様に、イギリス、オランダにおいても1990年代以降に成牛におけるサルモネラ症発生数の増加が認められている [64]。搾乳牛での発生は、死産、乳量低下、生乳出荷停止等により、子牛での発生と比較して多大な経済的損失を被ることになる。このような搾乳牛のサルモネラ症増加の原因の一つとして、飼養環境の変化が指摘されている。すなわち、1990年代に泌乳量増加を目的としてルーメンバイパス蛋白等の高蛋白飼料の多給が開始されたが、これにより、ルーメン機能が低下し、生理機能が失調したことで抗病性が低下し、サルモネラ感受性が高まったとの説が提唱されている [46]。

一方で、牛サルモネラ症の原因菌にも変化が見られていたことが報告されている。1991年以降、それまで国内において牛から分離されていなかった *S. Typhimurium* 多剤耐性ファージ型 DT104 が、高率に分離されていたことが明らかとなった [62]。DT104 は、イギリスで1984年に人から、1988年に牛から初めて分離され、その後世

界各国で各種の動物から分離された。DT104 の多くはアンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、サルファ剤 (SUL)、テトラサイクリン (TC) の 5 剤耐性であり、その耐性遺伝子は染色体上の *Salmonella* genomic island I に含まれるインテグロン構造中に存在する [7]。マウス個体や細胞を用いた実験では、DT104 が他のファージ型菌より高病原性であるという結果は得られていないが [4]、他のファージ型菌が感染した場合と比較して重症化しやすいことなどから、病原性が強いものと考えられている [21]。近年、DT104 が共通に保持する遺伝子として百日咳毒素遺伝子と相同性を示す *artA* および *artB* (*artAB*) が見出された [22, 61]。 *artAB* は溶原ファージゲノム上に存在しており、その産物である ArtA/ArtB (ArtAB) は、DT104 U1 株にマイトマイシン C (MMC) を添加して培養することにより、培養上清中に産生される [61, 79]。 ArtAB を含む DT104 U1 株培養上清は、百日咳毒素感受性 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) を ADP-リボシル化し、百日咳毒素と同様に Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞集塊形成活性を示す [79]。一方、*S. Typhi* においても百日咳毒素様蛋白をコードする遺伝子 *pltA* および *pltB* (*pltAB*) の存在が知られ、この遺伝子は *artAB* と高い相同性を示す [70]。 *pltA* の遺伝子産物である PltA は、宿主細胞の蛋白質を ADP-リボシル化するが、標的となる蛋白質の詳細は明らかとなっていない [70]。 *S. Typhi* は、宿主細胞のアポトーシスの誘導や、細胞周期の阻害に関連する cytolethal distending toxin (CDT) を産生する [19]。 PltA および PltB は、CDT の一つの構成要素である CdtB と複合体を成し、CdtB を標的細胞内へ輸送する役割を果たすと考えられている [70]。 *cdtB*、*pltA*、*pltB* の 3 遺伝子は、染色体上の CdtB-islet と呼ばれる領域にあり、*S. Typhi* の他に、*S. Montevideo*、*S. Javiana* 等、複数の血清型において当該領域の存在が報告され [45]、*Salmonella* 属菌の新たな病原性遺伝子として注目されている。しかし、DT104 において *cdtB* 遺伝子は存在せず、ArtAB の毒性や病原性に果たす役割については明らかとなっていない。いずれにしても、成牛型サルモネラ症の増加の原因が、飼養環境の変化によるものなのか、原因菌の変化によるものなの



か、あるいは両者が要因なのかは不明である。

国内で牛から分離された DT104 は、その分離時期および海外での分離状況から、海外から導入された可能性が推測される。近年における牛や飼料の移動を含めた農産物流通のグローバル化により、海外で流行している病原体の国内への侵入がより容易になっていると考えられる。このような状況の中、牛サルモネラ症の防疫対策の的確化を図るために、原因菌の流行型の特定や感染源・感染経路を究明する疫学的調査が必須である。そのためには、菌株間の関連性を科学的に解析するための手法が必要である。

*S. Typhimurium* の分子疫学的解析方法として、フェージ型別、薬剤感受性プロファイル、プラスミドプロファイル、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 、Multi-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) が知られている [20, 28, 43, 44, 48, 74, 82]。これらの手法を用いることにより、異なる地域や年代における分離株間の関連性を解析することが可能となる。PFGE は *Salmonella* の遺伝子型別手法のゴールドスタンダードとして利用されている。また、近年ゲノム上の反復縦列配列を含む複数の遺伝子座位の塩基配列を決定し、繰り返し数を解析することにより型別する MLVA も、その型別能の高さから注目されている [43, 44, 82]。Multi-locus sequence typing は分子疫学的解析手法の一つとして様々な細菌に用いられているが、*Salmonella* においては PFGE、MLVA と比較して識別能力が低く、血清型間の違いを検出する方法として用いることは可能であるが、限定された地域における同一血清型の分離菌株を詳細に型別する方法としては適していない [1]。

本研究では、牛サルモネラ症の主な原因菌である *S. Typhimurium* 分離株の遺伝学的性状とその変遷を明らかにすることを目的とし、北海道で 1977 年から 2009 年までの 33 年間に分離された牛由来 *S. Typhimurium* について、PFGE、MLVA および薬剤耐性プロファイル等の分子疫学的手法を用いて解析し、さらに一発生事例の疫学的調査を実施し、遺伝学的性状のデータベースの有用性について検証した。加えて、近年分離

された主な流行型株が産生する毒素の性状や、薬剤耐性因子に関する解析を実施した。

第 I 章では、上述の分子疫学的解析手法を用いて *S. Typhimurium* 545 株の遺伝子型を決定し、その経年的な推移を解析し、近年分離される新しい遺伝子型菌を検出した。

第 II 章では、2008 年に北海道内の一酪農場において発生した牛サルモネラ症に関する分子疫学的解析を実施した。農場分離株について第 I 章で得られた北海道内の分離菌株の遺伝学的性状のデータベースと比較することにより、感染源・感染経路について考察した。

第 III 章および第 IV 章では、第 I 章の解析により検出された、新しい遺伝子型菌の特徴を明らかにすることを目的とした。第 III 章では、1992 年以降に分離数が増加した PFGE I 型菌の特徴を解析した。I 型は DT104 およびその近縁株で構成されるため、DT104 が共通して保有するとされる *artAB* の *S. Typhimurium* 545 株における保有状況、およびその遺伝子産物 (ArtAB) の毒素活性等の生物学的性状を解析した。

第 IV 章では、2000 年以降に分離数が増加した PFGE VII 型菌の特徴を明らかにするために、VII 型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミドの構造を解析した。

第 I 章 過去 33 年間に北海道内で分離された牛由来 *Salmonella*  
Typhimurium の分子疫学的解析

## 1. 序文

牛サルモネラ症は種々の血清型の *Salmonella* により引き起こされる伝染性の疾病である。発熱、下痢を主症状として、肺炎、泌乳量減少などを示す症例も認められ、重症例では敗血症を呈して死亡する。本症の原因となる血清型は年々多様化する傾向にあるが、*Salmonella Typhimurium* によるものが最も多く、北海道内の牛サルモネラ症の約 8 割を占める [50]。牛サルモネラ症は、以前は子牛に多く認められていたが、近年では成牛、特に搾乳牛における発生が増加しており、その原因として、1990 年代以降、泌乳量増加のために高蛋白飼料が多給されるようになったことなど、飼養環境が大きく変化したことが考えられている [47]。しかし同時期に、世界各国で様々な動物種で分離されていた *S. Typhimurium* フェージ型 DT104 が、日本国内の牛からも分離されていたことが報告されており、サルモネラ症の原因となる菌側にも変化がみられたことが明らかにされている [62]。

本章では 1979 年から 2009 年までの 33 年間に北海道内で分離された牛由来 *S. Typhimurium* を分子疫学的に解析し、分離された *S. Typhimurium* の遺伝学的性状の変遷を検討した。

## 2. 材料および方法

### (1) 使用菌株

1977年から2009年に、北海道内において分離された牛由来 *S. Typhimurium* 545株を供試した。

### (2) 薬剤感受性試験

センシディスク (ベクトン・ディッキンソン、Franklin Lakes、USA)を用いて、Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) に準拠した方法により試験した [52]。供試菌株を滅菌生理食塩水にマクファーランド 0.5 になるように懸濁し、その 0.1 ml をミューラーヒントン寒天培地へ接種し、センシディスクを配置した後、37°Cで一晩培養した。培養後、センシディスク周辺の阻止円の大きさを測定し、CLSI 判定基準に従い感受性を決定した。アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、サルファ剤 (SUL)、トリメトプリム (TMP)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム (SXT)、セファゾリン (CEZ)、セフトジジム (CAZ) セフトキシム (CTX)、ナリジクス酸 (NA)、ゲンタマイシン (GM)、シプロフロキサシン (CPFX) の 13 剤を使用した。

### (3) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

供試菌株を Luria-Bertani (LB) 液体培地に接種し、37°Cで5時間振とう培養した。培養後、100°C10分で加熱し、12,000 rpm で3分間遠沈し、沈渣を NT バッファー {10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 M NaCl} 100  $\mu$ l に懸濁後、低融点アガロースと混合し、プラグモールドに注入して凝固させた。プラグモールドからプラグを取り出し、Lysis 溶液 {6 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM NaCl、100 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.5% ポリオキシエチレンセチルエーテル、0.2% デオキシコール酸ナトリウム、0.5% N-ラ

ウロイルサルコシナトリウム、 0.1% リゾチーム、 0.0004% RNase }およびプロテイナーゼ K 溶液 {0.5 M EDTA (pH 7.5)、 0.5%N-ラウロイルサルコシナトリウム、 1 mM Proteinase K} 各 500  $\mu$ l ずつ混合し、プラグを 54°Cで 18 時間保温した。反応後、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) を含む TE バッファー {10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 0.1 mM EDTA}によりプラグを室温で 1 時間処理した後、PMSF を含まない TE バッファーにより洗浄した。その後制限酵素用バッファー{100 mM Tris-HCl (pH 7.5)、 100 mM MgCl<sub>2</sub>、 0.5 M NaCl、 10mM ジチオスレイトール (DTT)}で 37°C 30 分平衡化させた後、*Xba* I により 37°Cで 2 時間処理した。処理後のプラグを 1% Seakem Gold Agarose (Lonza、 Rockland、 USA) に埋め込み、CHEFFDR II (Bio-Rad、 Hercules、 USA) を用いて泳動した。泳動は、電圧 6 V/cm、パルスタイム 2.2-63.8 秒の条件下で 22 時間電気泳動した。DNA サイズマーカーには Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs、 Ipswich、 USA) および *S. enterica* serovar Braenderup H9812 の *Xba* I 処理 DNA を使用した。PFGE 泳動像は BioNumerics software version 5.1 (Applied Maths、 Sint-Martens-Latem、 Belgium) を用いて解析した。類似度は Dice 法で計算し、系統樹はトレランス 1%の条件で unweighted pair group method arithmetic mean (UPGMA) 法を用いて作成した。

#### (4) Polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子検出

薬剤耐性遺伝子 { $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*) TEM 型 (*bla*<sub>TEM-1</sub>)、 CMY-2 型 (*bla*<sub>CMY-2</sub>)、 フロルフェニコール耐性遺伝子 (*floR*)}、 インテグラーゼ遺伝子 (*intI*)、 *S. Typhimurium* 血清型特異的病原性プラスミド上の遺伝子 {プラスミド複製関連遺伝子 (*repFIIA*)、 *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) 遺伝子群 (*spvA*、 *spvB*、 *spvC*)、 接合伝達因子 (*traT*)、 血清抵抗性因子 (*rck*)、 線毛遺伝子 (*pefA*)}、 *Salmonella* の染色体上に存在する上皮細胞侵入性関連遺伝子 (*invA*)、 DT104 特異的な 16S-23S rRNA 領域における配列 (162-bp amplicon) を、 文献に記載されたプライマーを使用して PCR で検出し

た [6, 17, 18, 42, 56, 59, 75]。供試菌株を LB 寒天培地で 37°C 20 時間培養後、1 白金耳量のコロニーを 400  $\mu$ l の滅菌蒸留水懸濁し、100°C 5 分間煮沸した後急冷し、5 分間氷上で静置した。その後、4°C で 13,000  $\times$  g、5 分間遠心し、その上清を PCR のテンプレートとした。

#### (5) Multilocus-variable number tandem repeats analysis (MLVA)

反復縦列配列を含む 5 カ所の遺伝子座位を増幅するために、プライマー (STTR3-F、STTR3-R、STTR5-F、STTR5-R、STTR6-F、STTR6-R、STTR9-F、STTR9-R、STTR10pl-F、STTR10pl-R) [43, 44] を使用し、PCR を実施した。被検菌株の DNA 抽出は上述の方法により実施した。反復縦列配列の繰り返し数 (RN) を解析するために、PCR 産物を QIAquick PCR Purification Columns (キアゲン、Venlo、Netherlands) により精製し、塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。即ち、上記のプライマーを使用し、ABI Prism BigDye Terminator、version 3.1、Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、Foster City、USA) と DNA sequencer (ABI 3130; Applied Biosystems) を使用して塩基配列を決定した。得られた塩基配列から、それぞれの遺伝子座位の RN を Genetyx Version 10.0 (ジェネティクス、東京) を用いて算出し、BioNumerics Software Version 5.1 (Applied Maths) により系統樹解析を行った。

#### (6) プラスミドプロファイル

供試菌株からプラスミド DNA を Kado と Liu の方法 [34] に準じて抽出し、0.8% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色し、UV 光下で確認した。マーカーには、BAC-Tracker Supercoiled DNA Ladder (Epicentre Biotechnologies、Madison、USA) を使用した。

#### (7) サザンハイブリダイゼーション

プラスミド DNA 上の *bla*<sub>TEM-1</sub>、*bla*<sub>CMY-2</sub>、*spvC* をサザンハイブリダイゼーションにより検出した。上記の 3 遺伝子の PCR 産物を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) により精製し、DIG High Prime Labeling Kit (ロシュダイアグノスティックス, Indianapolis, USA) を用いてジゴキシゲニン (DIG)-11-dUTP で標識し、サザンハイブリダイゼーション用プローブとした。プラスミド DNA を 0.8% アガロースゲルで泳動し、キャピラリー法によりナイロンメンブレン、ポジティブチャージ(ロシュダイアグノスティックス) に転写した。Easy Hyb Solution (ロシュダイアグノスティックス) により 40°C、30 分間前処理を実施した後、DIG 標識プローブを含んだ Easy Hyb solution を 40°C で 16 時間反応させた。室温で、メンブランを低ストリンジェント洗浄液 {2×Saline Sodium Citrate (SSC) バッファー、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)} を用いて洗浄した後、68°C の高ストリンジェント洗浄液 (0.1×SSC、0.1% SDS) により洗浄し、洗浄液 (DIG Wash and Block Buffer set; ロシュダイアグノスティックス) ですすいだ後、ブロッキング液 (DIG Wash and Block Buffer set; ロシュダイアグノスティックス) に 30 分間浸した。次いで、ブロッキング液で希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche Diagnostics) で 30 分間反応させ、洗浄液で洗い、検出バッファーで 3 分間平衡化した後、Disodium 3-(4-methoxyspiro 1, 2-dioxetane-3, 2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl) phenyl phosphate (CSPD)、ready-to-use (ロシュダイアグノスティックス) を 5 分間反応させた。その後、メンブレンを Hyper MP film (GE Healthcare) とともに X 線フィルムカセットに入れ、10 分間感光しアルカリフォスファターゼ反応を検出した。

#### (8) 形質転換株の作出

供試菌株のプラスミドを、エレクトロポレーション法を用いて *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Electro-Cells (タカラバイオ、滋賀) に導入した。蒸留水に溶解したプラスミド DNA 溶液 5  $\mu$ l と、DH5 $\alpha$  Electro-Cells 50  $\mu$ l を混合し、ギャップ幅 2 mm キュベット



に入れ、1.25 kV、100 Ω、25 μF の条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後の菌液に SOC 培地 (タカラバイオ) 500 μl を加え、37°C で 30 分間振とう培養した。培養液を LB 寒天培地 (ベクトン・ディッキンソン) に ABPC (100 μg/ml) または CEZ (50 μg/ml) を添加した培地に塗り広げて 37°C で一晩培養し、形質転換株を選択した。得られた形質転換株は薬剤感受性試験に供した。

#### (9) ファージ型別

供試菌株のファージ型別を国立感染症研究所に依頼し、英国の Public Health Laboratory Service の手法に基づき実施した [5]。

### 3. 結果

#### (1) 545 株の遺伝子型別と遺伝子型の経年変化

545 株の *S. Typhimurium* は、PFGE により 116 種のプロファイルに分類された (図 1)。菌株間の関連性を解析するために UPGMA を用いて系統樹を作成した。類似度が 74%以上となるプロファイルを 1 つのグループとして分類した結果、116 プロファイルは、9 つの PFGE 型 (I ~IX型) に分けられた (図 1)。1992 年以降に分離された菌株の 88% (411/469) が I 型または VII 型に分類された (表 1)。I 型は 21 の PFGE プロファイルで構成され、248 株が含まれていた (図 1)。I 型は、1986 年に初めて分離され、1992 年以降から分離数が増加し、2004 年以降は減少していた (表 1)。VII 型は 21 の PFGE プロファイルで構成され、165 株が含まれていた (図 1、表 1)。VII 型は、2000 年に初めて分離され、2002 年以降増加した (表 1)。その他、II、IV、VI 型が主要な PFGE 型であり、それぞれ 37 株、36 株、31 株が分類された (図 1、表 1)。IV 型および VI 型の多くが、I 型が増加する前の 1985 年から 1992 年に分離されていた (表 1)。

#### (2) MLVA

116 PFGE プロファイルの各プロファイルから代表株 1 株ずつを選出し、計 116 株を MLVA に供した。その結果、116 株は 68 プロファイルを示した (図 2、表 2)。各円は 1 つの MLVA プロファイルを表し、円の大きさは菌株数を反映する。異なる RN を示した遺伝子座位が 1 カ所以内のプロファイルを太線で連結し、太線で連結されたプロファイルを同一クラスターとして囲った。これによって 4 つの主要な MLVA クラスター (A~D) が形成された (図 2)。21 株の PFGE I 型代表株のうち、18 株が MLVA クラスター A に、21 株の PFGE VII 型代表株のうち、19 株が MLVA クラスター D に分類された。

#### (3) 薬剤感受性試験

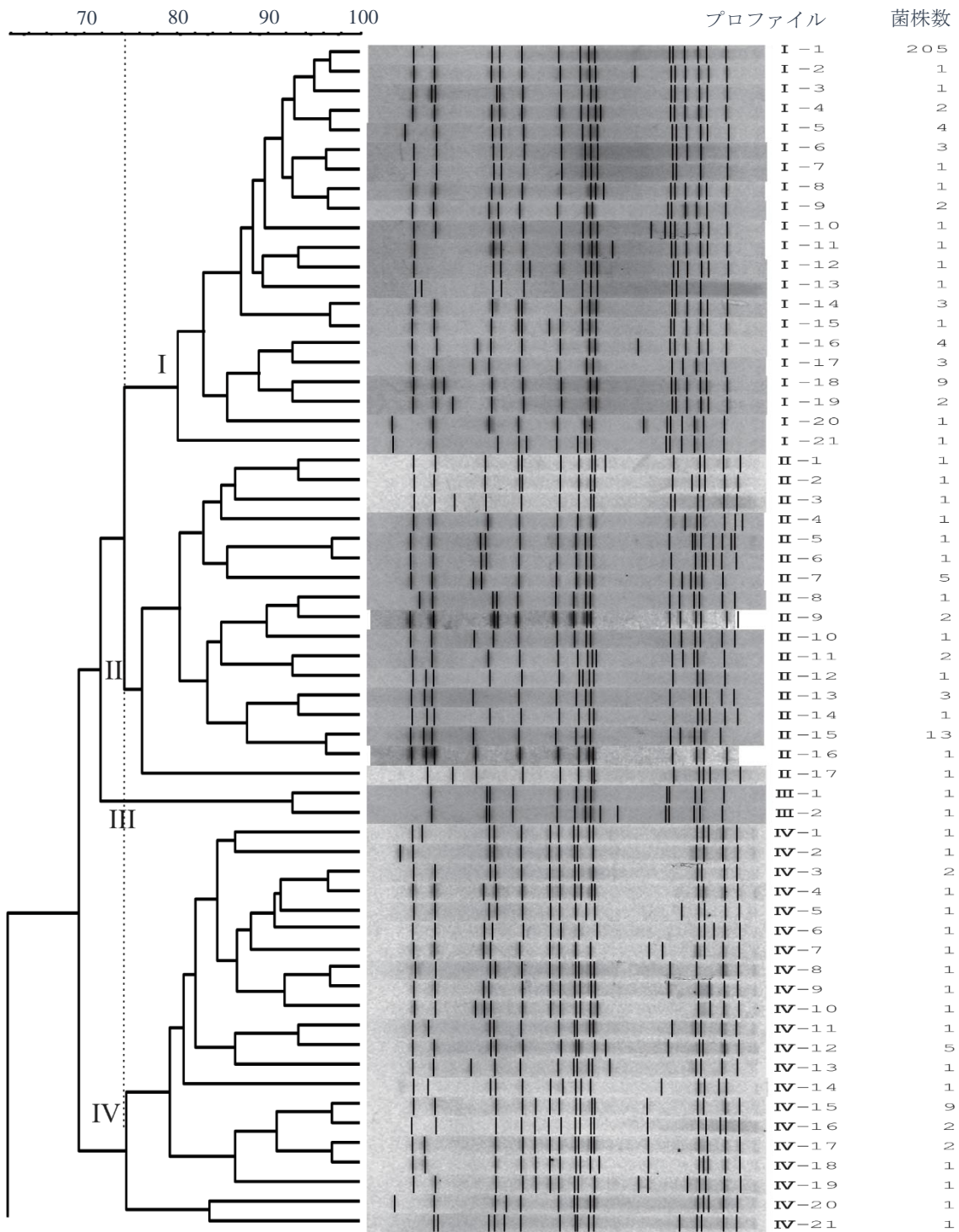


図 1-1 *S. Typhimurium* 545 株の制限酵素 *Xba*I を用いた PFGE プロファイルの系統樹解析結果

類似度 74%以上となるプロファイルを同一 PFGE 型とした。

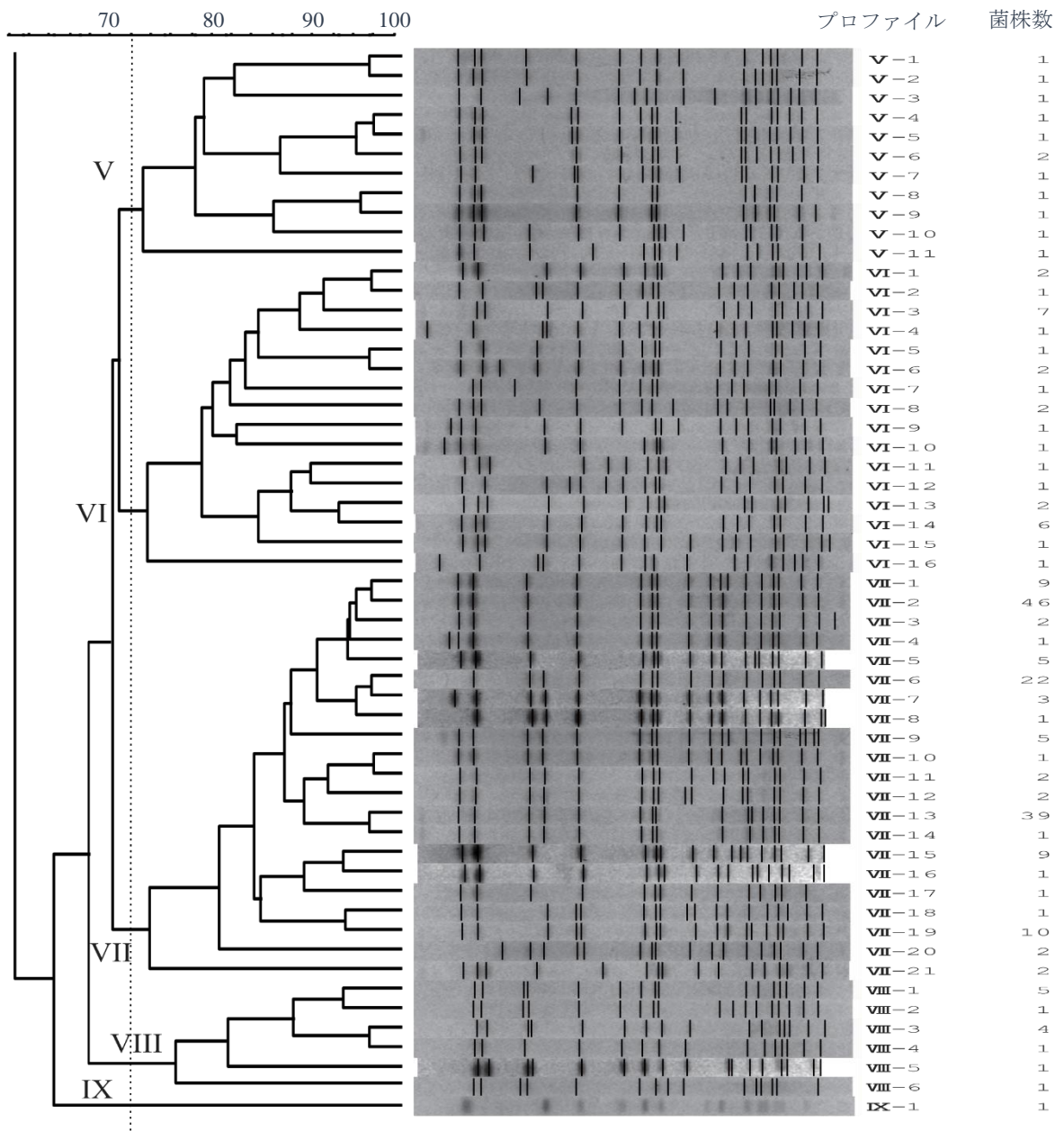


図 1-2 *S. Typhimurium* 545 株の制限酵素 *Xba* I を用いた PFGE プロファイルの系統樹解析結果

表 1 1977 年から 2009 年に分離された *S. Typhimurium* における PFGE 型の変遷

年	PFGE 型									計
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
1977		1 <sup>a)</sup>								1
1980								2		2
1981		1								1
1982								4		4
1983								1		1
1984		1			1			2		4
1985					1	6		3		10
1986	1				1	7			1	10
1987		3		5		1				9
1988				6		1				7
1989		2		5		2				9
1990				4		1				5
1991	1			10		2				13
1992	4	1		5	1	6				17
1993	27					3				30
1994	38			1	1					40
1995	22				2					24
1996	12				1					13
1997	21									21
1998	19	1	2					1		23
1999	28									28
2000	9	2				1	1			13
2001	13	1			1	1	1			17
2002	13	3			1		10			27
2003	18	5					12			35
2004	6	3					19			28
2005	3	1			2		42			48
2006		5					32			37
2007	10	3					44			57
2008	1	2					3			6
2009	2	2					1			5
計	248	37	2	36	12	31	165	13	1	545

a) 菌株数

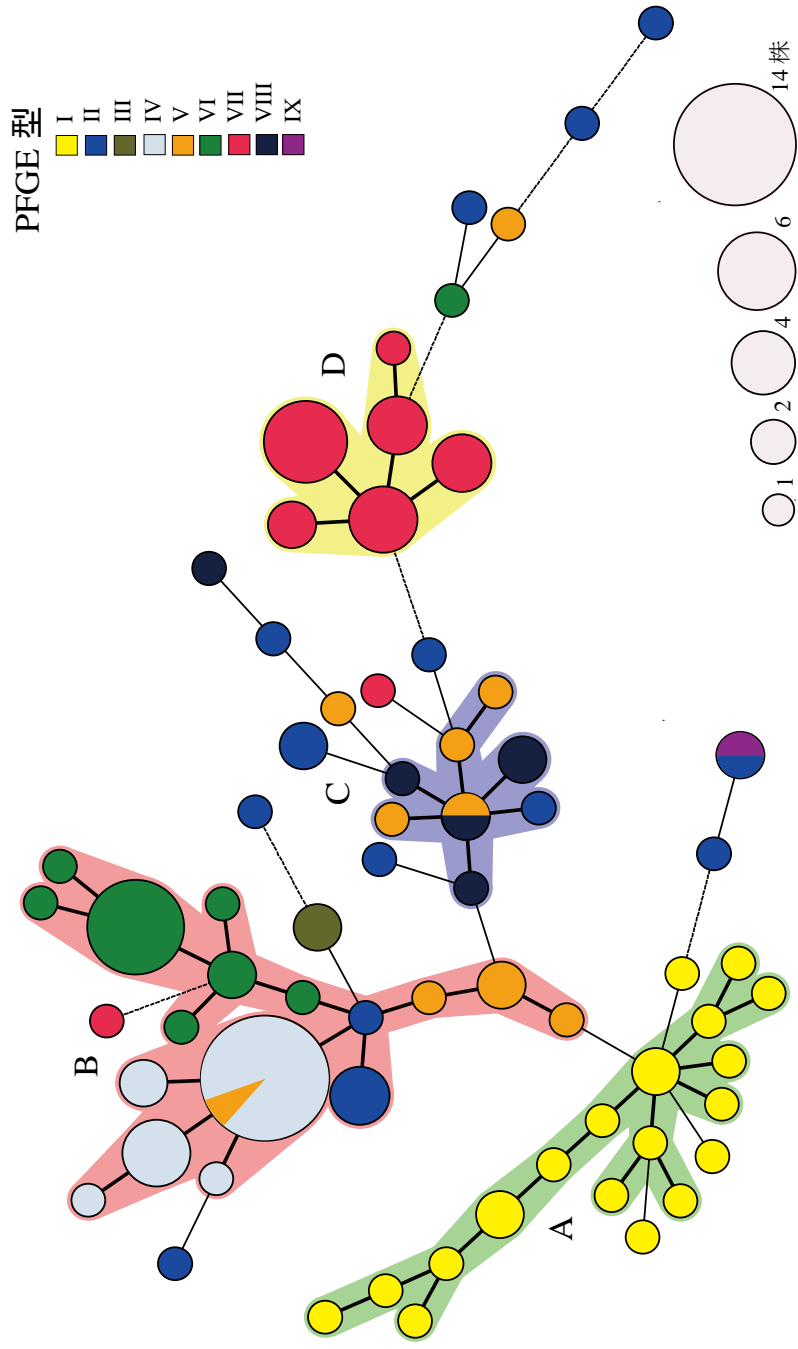


図2 PFGE 代表株 116 株の MLVA プロファイルに基づく系統樹

Minimum Spanning Tree による系統樹。円の大きさは同じプロファイルを示した菌株数を反映する。円の中は、PFGE 型で色分けした。MLVA プロファイルの違いが 1 遺伝子座位以内のプロファイルを太線で連結し、2 遺伝子座位異なるプロファイルを細線で、3 遺伝子座位以上異なるプロファイルを点線で連結した。太線で連結されたプロファイルを囲い、4 つのクラスターとした (A:緑、B:ピンク、C:紫、D:黄色)

表 2 *S. Typhimurium* 代表株 116 株の PFGE、MLVA、薬剤耐性プロファイル

菌株名	分離年	PFGE プロファイル	MLVA プロファイル					MLVA クラスタ	薬剤耐性プロファイル <sup>a)</sup>
			STTR 3	STTR 5	STTR 6	STTR 9	STTR 10		
IS18-33	2006	II-15	7 <sup>b)</sup>	3	4	3	10	NT <sup>c)</sup>	ND <sup>d)</sup>
IS19-6	2007	VII-21	10	17	6	3	6	NT	ND
TST-77	1991	VI-16	10	17	7	4	0	B	ACSSuTK
TST-156	1987	VI-8	10	17	7	4	0	B	ACSSuTKN
TST-163	1986	VI-15	10	17	7	4	0	B	ACSSuT
TST-165	1986	VI-4	10	17	7	4	0	B	ACSSuTN
TST-171	1985	VI-1	10	17	7	4	0	B	ACSSuTK
TST-172	1985	VI-7	10	17	7	4	0	B	ASu
TST-174	1985	VI-11	10	17	7	4	0	B	ACSSuTKN
TST-178	1985	VI-3	10	17	7	4	0	B	ACSSuTK
TST-78	1992	VI-5	10	17	8	4	0	B	Su
TST-82	1993	VI-6	10	17	8	4	0	B	ND
KST-5	1990	VI-14	10	17	8	5	0	B	Su
NET55	1993	VI-12	10	17	9	4	0	B	ND
TST-162	1986	VI-10	10	18	7	4	0	B	AT
N59	1989	VI-2	10	18	8	4	0	B	ASSuTK
TST-175	1985	VI-9	10	20	7	4	0	B	ACSSuTK
TST-219	2006	II-6	11	11	13	6	8	NT	ASSuT
TST-24	2005	II-8	11	12	6	3	13	NT	ND
TST-49	1998	III-1	11	12	8	4	0	NT	ASSuT
TST-50	1998	III-2	11	12	8	4	0	NT	SSuT
NET25	1989	II-11	11	14	7	5	8	NT	SSuT
07IS-20	2007	II-9	11	15	5	3	10	NT	ND
SH 1-1	2006	II-12	11	16	0	4	0	NT	ND
TST-164	1986	IX-1	11	18	9	5	8	NT	ACSSuTKCEZ
TST-183	1984	II-4	11	18	9	5	8	NT	ACSSuTK
TST-116	1994	V-8	11	19	9	6	10	NT	ND
KST-156	2001	VI-13	11	19	13	6	11	NT	Csu
NET20	1981	II-17	12	7	9	3	5	C	Asu

TST-176	1985	V-1	12	8	0	3	5	C	SuN
TST-173	1985	VIII-2	12	8	7	3	5	C	SSuTN
TST-179	1985	VIII-6	12	8	7	3	5	C	Su
KST-2	1982	VIII-4	12	8	9	3	0	C	Su
TST-181	1984	VIII-1	12	8	9	3	5	C	ASTCEZN
TST-182	1984	V-2	12	8	9	3	5	C	SuN
TST-132	1995	V-11	12	8	9	3	9	C	ND
TST-131	1995	V-9	12	8	11	3	9	C	ND
TST-139	1996	V-10	12	9	7	3	8	NT	ACSu
KST-1	1982	VIII- 3	12	9	9	3	5	C	Su
AST-4	2002	II-13	12	9	10	3	6	NT	SuT
AST-7	2002	II-14	12	9	10	3	6	NT	SuT
NST-95	2003	VII-17	12	9	19	3	9	NT	ND
09IB-1	2009	II-16	12	11	3	3	0	NT	ND
KST-105	1998	II-10	12	12	12	3	9	NT	S
TST-122	1995	I-6	12	13	0	4	18	A	ACSSuT
TST-136	1996	I-7	12	13	0	4	23	A	ASSuT
TST-154	1987	II-2	12	13	8	4	0	B	ASTK
TST-155	1987	II-1	12	13	8	4	0	B	AST
TST-159	1987	II-3	12	13	8	4	0	B	ST
KST-75	1995	I-19	12	13	14	4	16	A	ACSSuT
N36	1992	I-10	12	13	14	4	18	A	ACSSuT
TST-84	1993	I-12	12	13	15	4	18	A	ACSSuT
TST-125	1995	I-9	12	13	15	4	18	A	ACSSuT
KST-22	1993	I-17	12	13	15	4	19	A	ACSSuT
TST-129	1995	I-2	12	14	7	4	29	A	SSu
AST-38	2005	V-5	12	14	9	4	0	B	ND
KST-20	1993	I-1	12	14	12	4	26	A	ACSSuT
NST-108	2005	I-3	12	14	13	4	24	NT	Ssu
KST-49	1994	I-15	12	14	14	4	19	A	ACSSuT
TST-103	1993	I-20	12	14	14	4	19	A	ACSSuTK
KST-43	1994	I-5	12	14	14	4	25	A	ACSSuT
KST- 19	1993	I-16	12	14	14	4	26	A	ACSSuT



KST-38	1994	I-13	12	14	14	4	28	A	ACSSuT
KST-26	1994	I-11	12	14	15	4	19	A	ACSSuT
N77	1992	V-7	12	15	8	4	0	B	S
AST-3	2002	V-6	12	15	9	4	0	B	ND
KST-150	2001	V-4	12	15	9	4	0	B	ND
KST-31	1994	I-4	12	15	14	4	19	A	ACSSuT
KST-59	1994	I-8	12	15	14	4	24	A	ACSSuT
TST-107	1994	I-18	12	15	14	4	26	A	ACSSuT
KST-133	1999	I-21	12	15	16	4	19	A	ACSSuT
N54	1988	IV-18	12	16	6	4	0	B	ACSSuTK
KST- 95	1997	I-14	12	16	15	4	26	NT	ACSSuT
TST-79	1992	IV-13	12	17	6	4	0	B	ACSuT
TST-151	1988	IV-16	12	17	6	4	0	B	CSuTK
KST-9	1991	IV-12	12	18	6	4	0	B	ACSSuT
KST-10	1991	IV-21	12	18	6	4	0	B	Su
KST-12	1991	IV- 8	12	18	6	4	0	B	T
KST-17	1992	IV-14	12	18	6	4	0	B	SuN
KST- 18	1992	IV- 1	12	18	6	4	0	B	ACSSuTN
N48	1987	IV-15	12	18	6	4	0	B	ACSSuTK
NET30	1989	IV- 5	12	18	6	4	0	B	SuK
NET40	1991	IV- 7	12	18	6	4	0	B	ACSSuT
TST-75	1991	IV- 3	12	18	6	4	0	B	Su
TST-149	1988	IV-20	12	18	6	4	0	B	SuTKN
TST-150	1988	IV- 2	12	18	6	4	0	B	SuT
TST-157	1987	IV-17	12	18	6	4	0	B	Su
TST-160	1987	IV-19	12	18	6	4	0	B	Su
TST-161	1986	V-3	12	18	6	4	0	B	ACSSuTK
478	1977	II-5	12	18	8	4	0	B	SSuT
KST-7	1991	IV-6	12	19	6	4	0	B	ACSSuT
KST-8	1991	IV-9	12	19	6	4	0	B	ACSSuK
KT 3	1991	IV-10	12	19	6	4	0	B	ACSuTK
KT 6	1991	IV-4	12	19	6	4	0	B	ACSSuT
TST-117	1994	IV-11	12	19	7	4	0	B	ACSSuT

07IS-1	1998	VIII-5	12	20	13	3	7	NT	ND
KST-16	1992	II-7	12	28	13	3	8	NT	ND
07S-9	2006	VII-4	13	16	12	3	11	D	ASSuTK
KST-158	2002	VII-12	13	16	12	3	11	D	ASSuTK
KST-161	2002	VII-13	13	16	12	3	11	D	ASSuTK
KST-165	2002	VII-10	13	16	12	3	11	D	ASSuT
NST-78	2003	VII-11	13	16	12	3	11	D	ASSuTK
TST-31	2003	VII-19	13	16	12	3	11	D	ASSuTK
R18-1	2006	VII-3	13	16	13	3	11	D	ASSuTK
HID	2004	VII-18	13	17	11	3	11	D	ASSuTK
TST-207	2006	VII-9	13	17	11	3	11	D	ACSSuTKCEZ CTX
07IB-1	2007	VII-16	13	17	12	3	11	D	ASSuTK
KST-271	2005	VII-20	13	17	12	3	11	D	ACSSuTKCEZ
KST-291	2007	VII-7	13	17	12	3	11	D	ASSuTK
TST-233	2007	VII-15	13	17	12	3	11	D	ASSuTK
KST-262	2005	VII-6	13	17	12	3	12	D	ACSSuTKCEZ
KST-302	2007	VII-8	13	17	12	3	12	D	ACSSuTKCEZ
NST-110	2005	VII-14	13	17	12	3	12	D	ATK
KST-261	2005	VII-2	13	17	13	3	11	D	ASSuTK
TST-205	2006	VII-1	13	17	13	3	11	D	ASSuTK
TST-228	2007	VII-5	13	17	13	3	11	D	ASSuTK

a) : A, アンピシリン; C, クロラムフェニコール; S, ストレプトマイシン; Su, サルファ剤; T, テトラサイクリン; K, カナマイシン; SXT, スルファメトキサゾール/トリメトプリム; CEZ, セファゾリン; CTX, セフォタキシム; N, ナリジクス酸; G, ゲンタマイシン

b) 繰り返し数

c) NT: 型別されず

d) ND: 検出されず

545 株中、41 株が全ての薬剤に対し感受性を示し、423 株が 5 剤以上の薬剤に耐性を示した (表 3)。耐性率の高い順に、SUL (90%)、TC (84%)、SM (83%)、ABPC (81%)、CP (55%)、KM (36%)、SXT (5.5%)、CEZ (5.3%)、NA (3.7%) となった。CIP に耐性を示す株はなかった。43 種類の薬剤耐性プロファイルが検出され、PFGE I 型菌の 91% が DT104 に特徴的な耐性パターンである ABPC、CP、SM、SUL、TC (ACSSuT) の 5 剤に耐性を示した (表 3)。VII 型菌は、165 株中 162 株が ABPC 耐性、26 株が CEZ 耐性を示し、24 株が ABPC、CP、SM、SUL、TC、KM、CEZ、SXT 耐性、125 株が ABPC、SM、SUL、TC、KM 耐性であった (表 3)。VII 型菌のうち 3 株は、全ての薬剤に感受性であり、このうち 2 株は代表株として MLVA に供試したが、クラスター D に分類されなかった (図 2、表 3)。2000 年以前の分離株では、CEZ 耐性株は 2 株のみであったが、2000 年以降、耐性株の分離数が 24 株に増加した (表 3)。

#### (4) DT104 特異的配列保有率

545 株について、DT104 と関連する 2 遺伝子 (*intI*、*floR*) および DT104 に特異的な配列である 162-bp amplicon を PCR で検出した。I 型の 248 株のうち、243 株 (98 %) が 162-bp amplicon を保有していた (表 4)。他の PFGE 型で当該配列を保有する株は認められなかった。*floR* は、I 型の 227 株 (92 %) および VII 型 165 株中 26 株 (16 %) から検出されたが、その他の型では検出されなかった (表 4)。*intI* は I 型の 244 株 (98 %)、IV 型 36 株中 22 株 (61 %)、VII 型 160 株 (97 %) から検出され、その他の型で検出されたものは 5 株のみであった (表 4)。

#### (5) ファージ型別

35 株をファージ型別に供試した結果、12 株が DT104、4 株が DT193 に型別され、DT120、U302、DT168A、DT40、DT12、DT9 に型別された株がそれぞれ 1 株ずつであった (表 5)。また、3 株がファージに感受性を示したが、既知の溶菌パターンに該当

表3 S. Typhimurium 545株の薬剤耐性プロファイルと PFGE 型

薬剤耐性プロファイル <sup>a)</sup>	PFGE 型									合計
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, CEZ, SXT							24 <sup>b)</sup>			24
ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, CEZ, CTX							1			1
ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, CEZ									1	1
ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, NA						3				3
ABPC, SM, SUL, TC, KM, CEZ, SXT							1			1
ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, SXT	1									1
ABPC, SM, SUL, TC, KM, CEZ								1		1
ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM	1	1		5	1	9	2			19
ABPC, CP, SM, SUL, TC, NA	5			1		1				7
ABPC, SM, SUL, TC, KM, GM							1			1
ABPC, SM, SUL, TC, KM, SXT							4			4
ABPC, CP, SUL, TC, NA				1						1
ABPC, SM, TC, CEZ, NA								1		1
ABPC, CP, SM, SUL, KM				1						1
ABPC, CP, SM, SUL, TC	218			6		2				226
ABPC, CP, SUL, TC, KM				3		1				4
ABPC, SM, SUL, TC, KM						1	125			126
ABPC, CP, SUL, TC, SXT				1						1
ABPC, CP, SUL, TC	3			3						6
ABPC, SM, SUL, TC	2	1	1				1			5
ABPC, SM, TC, KM		1								1
ABPC, SUL, TC, KM							1			1
CP, SUL, TC, KM				1						1
SM, SUL, TC, NA				1				2		3
SUL, TC, KM, NA				1						1
ABPC, CP, SUL					1					1
ABPC, SM, TC		1								1
ABPC, TC, KM							1			1
SM, SUL, TC		5	1			1		1		8
SM, TC, KM								1		1
CP, SUL, TC				1						1
ABPC, SUL	1	1				1	1			4
ABPC, TC						1				1
CP, SUL						1				1
SM, SUL	13									13
SM, TC		1						1		2
SUL, KM				1						1
SUL, NA				1	2					3
SUL, TC		3		1						4
NA								1		1
SM		1			1					2
SUL		4		5		5		3		17
TC				1						1
全薬剤感受性	4	18		2	7	5	3	2		41
合計	248	37	2	36	12	31	165	13	1	545

a) ABPC, アンピシリン; CP, クロラムフェニコール; SM, ストレプトマイシン; SUL, サルファ剤; TC, テトラサイクリン; KM, カナマイシン, SXT, スルファメトキサゾール/トリメトプリム; CEZ, セファゾリン; CTX, セフトキシム; NA, ナリジクス酸; GM, ゲンタマイシン

b) 菌株数

表4 DT104 関連遺伝子 (*floR*、*intI*、162-bp amplicon)、薬剤耐性遺伝子(*bla*<sub>TEM-1</sub>、*bla*<sub>CMY-2</sub>)、病原性プラスミド関連遺伝子 (*spvC*) 保有状況

PFGE 型	標的遺伝子または配列						
	<i>invA</i>	<i>floR</i>	<i>spvC</i>	<i>intI</i>	162-bp amplicon	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
I	248 (100 %) <sup>a)</sup>	227 (92 %)	247(99.6 %)	244 (98 %)	243 (98 %)	ND <sup>b)</sup>	ND
II	37 (100 %)	0 (0 %)	30 (81 %)	1 (3 %)	0 (0 %)	ND	ND
III	2 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	ND	ND
IV	36 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	22 (61 %)	0 (0 %)	ND	ND
V	12 (100 %)	0 (0 %)	6 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	ND	ND
VI	31 (100 %)	0 (0 %)	2 (6.5 %)	3 (9 %)	0 (0 %)	ND	ND
VII	165 (100 %)	26 (16 %)	155 (94 %)	160 (97 %)	0 (0 %)	162 (98%)	26 (16%)
VIII	13 (100 %)	0 (0 %)	11 (85 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	ND	ND
IX	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	ND	ND

a) : 菌株数 (%)

b) : PCRによる検査を実施していない

表 5 S. Typhimurium 代表株のフェージ型

菌株名	PFGE プロファイル	フェージ型
KST-20	I-1	104
KST-25	I-1	104
KST-100	I-1	104
KST-103	I-1	104
KST-134	I-1	104
KST-167	I-1	104
KST-177	I-1	104
KST-189	I-1	104
TST-10	I-1	U302
KST- 95	I-14	104
KST-139	I-14	104
KST- 19	I-16	104
KST-70	I-18	104
TST-219	II-6	193
05R-7	II-7	168A
TST- 24	II-8	RDNC
NET25	II-11	193
IS18-33	II-15	40
KST-203	II-15	9
TST- 49	III-1	120
KST-150	V-4	RDNC
AST-3	V-6	12
TST-205	VII-1	UT
KST-261	VII-2	UT
KST-220	VII-6	UT
TST-207	VII-9	UT
KST-165	VII-10	UT
NST-78	VII-11	UT
KST-158	VII-12	UT
KST-161	VII-13	UT
NST-110	VII-14	UT
NST-95	VII-17	RDNC
TST-31	VII-19	UT
07IS-1	VIII-5	193
TST-164	IX-1	193

しないタイプ (RDNC: reacted but did not conform with clear phage types) となり、10 株がファージに感受性を示さない、型別不能となった (表 5)。供試した I 型菌 13 株の全株が DT104 あるいは DT104 と近縁とされる U302 に型別された。VII型菌 11 株中 10 株が型別不能となり、1 株 (NST-95) は RDNC となった (表 5)。

#### (6) VII型菌の各種遺伝子保有状況

VII型菌のうち薬剤感受性株 3 株を除いた 162 株全てが *bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子を保有し、26 株が *bla*<sub>CMY-2</sub> を保有していた (表 4)。VII型菌のプラスミド保有状況を明らかにするために、VII型菌が示した 21 種類の PFGE プロファイルから 1 株ずつ代表株を選出し、計 21 株からプラスミドを抽出して電気泳動によりプラスミドプロファイルを解析した。さらに、薬剤耐性遺伝子の局在を明らかにするために、薬剤耐性遺伝子である *bla*<sub>TEM-1</sub>、*bla*<sub>CMY-2</sub>、および血清型特異的な病原性プラスミド上の遺伝子である *spvC* のプローブを使用し、サザンハイブリダイゼーションを行った。比較のために、他の PFGE 型の代表株を 1 株ずつ選出し、同様に解析した。21 株のVII型代表株は、78 kb～130 kb のプラスミドを保有していた (表 6、図 3)。VII型代表株 21 株のうち、ABPC 耐性株 19 株は *bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子を保有しており、このうち 16 株は、*bla*<sub>TEM-1</sub> を 110 kb または 130 kb のプラスミド上に保有していた (表 6、図 3)。さらに、*bla*<sub>TEM-1</sub> を保持するプラスミドにおいては、*spvC* も同時に検出された (表 6、図 3)。NST110 株、TST233 株、07IB1 株では、それぞれ 97 kb、120 kb、95 kb の *bla*<sub>TEM-1</sub> 保有プラスミドが検出され、これらのプラスミド上にも、110 kb または 130 kb の *bla*<sub>TEM-1</sub> 保有プラスミドと同様に、*spvC* が検出された (表 6、図 3)。PCR では、TST233 株および 07IB1 株からは *spvC* は検出されなかったが、サザンハイブリダイゼーションによって検出された (表 6、図 3)。他の PFGE 型には、*bla*<sub>TEM-1</sub> と *spvC* を同一プラスミド上に保有する株はな

表 6 VII型代表株およびその他の PFGE 型代表株の性状

菌株名	PFGE プロ ファイル	MLVA クラスター <sup>a)</sup>	薬剤耐性プロファイル <sup>b)</sup>	プラスミド プロファイル	標的遺伝子または配列							
					<i>floR</i>	162-bp amplicon	<i>spvC</i>		<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>		<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	
							PCR に よる検出 <sup>c)</sup>	Plasmid size (kb) <sup>d)</sup>	PCR に よる検出 <sup>c)</sup>	Plasmid size (kb) <sup>d)</sup>	PCR に よる検出 <sup>c)</sup>	Plasmid size (kb) <sup>d)</sup>
KT20	I -1	A	ABPC, CP, SUL, TC,	94	+	+	+	94	-	-	-	-
IS18-33	II -15	NT	-	94	-	-	+	94	-	-	-	-
TST49	III-1	NT	ABPC, SM, SUL, TC,	ND <sup>e)</sup>	-	-	-		+	ND	-	-
N48	IV-15	B	ABPC, CP, SM, SUL, TC,	190, 145	-	-	-		-		-	-
TST161	V -3	B	ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM	130	-	-	-		-		-	-
TST178	VI-3	B	ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM	190	-	-	-		+	190	-	-
TST205	VII-1	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	-	-	+	130	+	130	-	-
KT261	VII-2	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	-	-	+	130	+	130	-	-
R18-1	VII-3	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130, 96	-	-	+	130	+	130	-	-
07SY9	VII-4	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	-	-	+	130	+	130	-	-
TST228	VII-5	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130, 78	-	-	+	130	+	130	-	-
KT262	VII-6	D	ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM CEZ, SXT	130	+	-	+	130	+	130	+	+
KT291	VII-7	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	-	-	+	130	+	130	-	-
KT302	VII-8	D	ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM CEZ, CAZ	130, 95	+	-	+	130	+	130	+	+
TST207	VII-9	D	ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, CEZ, CAZ, CTX, STX	120, 110	+	-	+	110	+	110	+	120
KT165	VII-10	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	-	-	+	110	+	110	-	-
NST78	VII-11	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	-	-	+	110	+	110	-	-
KT158	VII-12	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	-	-	+	110	+	110	-	-
KT161	VII-13	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	-	-	+	110	+	110	-	-
NST110	VII-14	D	ABPC, TC, KM	97	-	-	+	97	+	97	-	-
TST233	VII-15	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	120, 95	-	-	-	120	+	120	-	-
07IB1	VII-16	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	95	-	-	-	95	+	95	-	-
NST95	VII-17	NT	-	94	-	-	+	94	-		-	-
HD	VII-18	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	-	-	+	130	+	130	-	-
TST31	VII-19	D	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	-	-	+	110	+	110	-	-



KT271	VII-20	D	ABPC, CP, SM, SUL, TC, KM, CEZ, SXT	130	+	-	+	130	+	130	+
IS19-6	VII-21	NT	-	94	-	-	+	94	-	-	-
TST181	VIII-1	C	ABPC, SM, TC, CEZ, NA	94, 8.4	-	-	+	94	+	8.4	-
TST164	IX-1	NT	ABPC, CP, SM, SUL, TC, CEZ	94	-	-	+	94	+	-	-

a) NT: MLVA クラスタ A~D 以外

b) ABPC, アンピシリン; CP, クロラムフェニコール; SM, ストレプトマイシン; SUL, サルファ剤; TC, テトラサイクリン; KM, カナマイシン;

CEZ, セファゾリン; CAZ, セフトアジジム ; CTX, セフトキシム; SXT, スルファメソキサゾール/トリメトプリム; NA, ナリジクス酸; -. 全薬剤感受性.

c) + : PCR 陽性, - : PCR 陰性

d) サザンハイブリダイゼーションにより遺伝子の存在が認められたプラスミドのサイズ

e) 検出されず

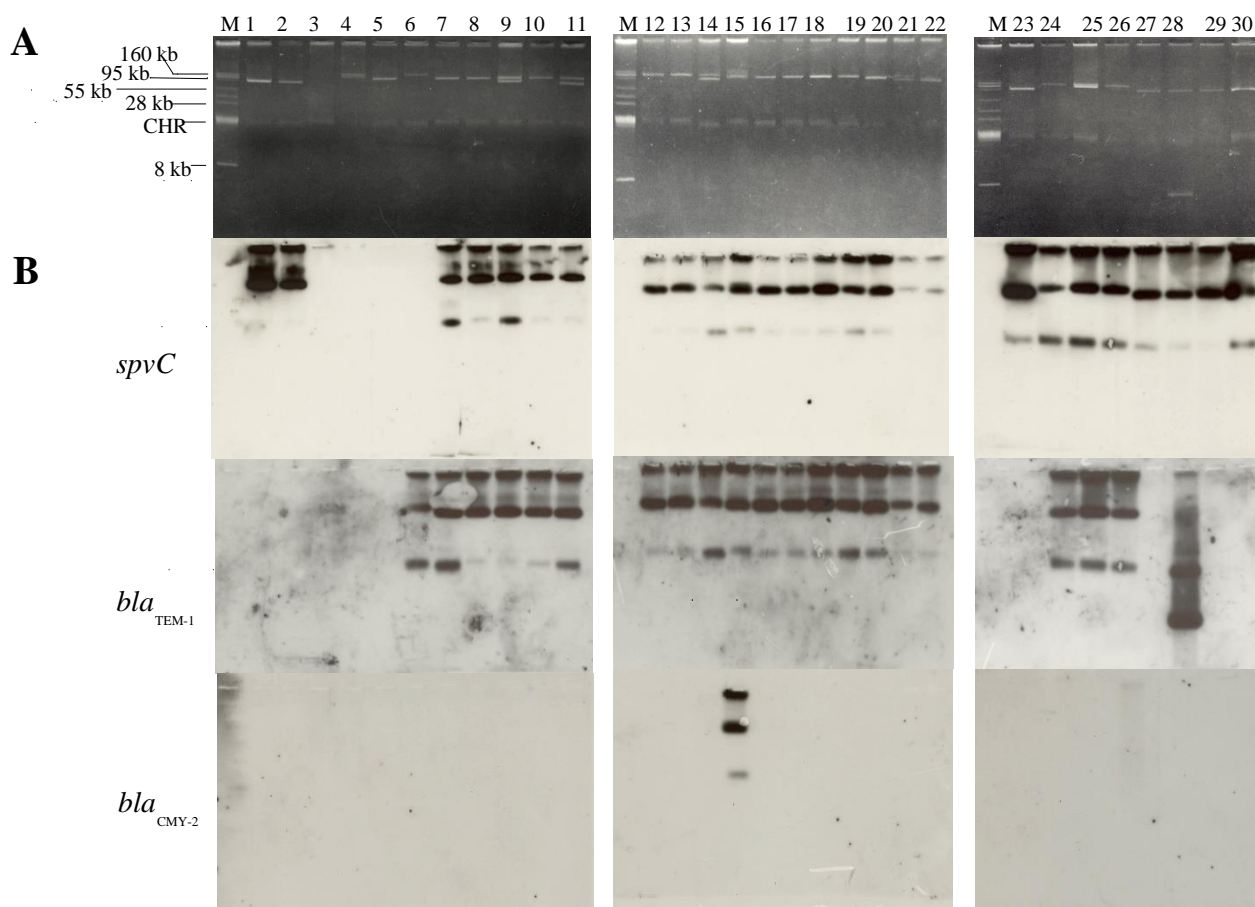


図3 VII型代表株およびその他の PFGE 型代表株のプラスミドプロファイル (A) とサザンハイブ  
ダイゼーション (B)

M: BAC-Tracker supercoiled DNA ladder, 1: KT20 (I-1), 2: IS18-33 (II-15), 3: TST49 (III-1),  
4: N48 (IV-15), 5: TST161 (V-3), 6: TST178 (VI-3), 7: TST205 (VII-1), 8: KT261 (VII-2), 9: R18-1  
(VII-3), 10: 07SY9 (VII-4), 11: TST228 (VII-5), 12: KT262 (VII-6), 13: KT291 (VII-7), 14: KT302 (VII-  
8), 15: TST207 (VII-9), 16: KT165 (VII-10), 17: NST78 (VII-11), 18: KT158 (VII-12), 19: KT161 (VII-  
13), 20: NST110 (VII-14), 21: TST233 (VII-15), 22: 07IB1 (VII-16), 23: NST95 (VII-17), 24: HD (VII-  
18), 25: TST31 (VII-19), 26: KT271 (VII-20), 27: ISI19-6 (VII-21), 28: TST181 (VIII-1), 29: TST164  
(IX-1), 30: LT2.

使用したマーカーのサイズおよびプローブを左に示した。

かった。VII型の19株が保有する *bla*<sub>TEM-1</sub> の塩基配列を解析したところ、GenBank に登録されている配列 (GenBank accession no. AM234722) と 100%一致した。

CTX 耐性株である TST207 株は、110 kb および 120 kb のプラスミドを保有しており、それぞれのプラスミド上に *bla*<sub>TEM-1</sub> および *bla*<sub>CMY-2</sub> が検出された(表 6、図 3 レーン 15)。*spvC* は、110 kb のプラスミド上にのみ存在していた (表 6、図 3 レーン 15)。TST207 株およびその他の CEZ 耐性株 (KT262、KT302、KT271) が保有する *bla*<sub>CMY-2</sub> は、塩基配列解析の結果、GenBank に登録されている配列 (GenBank accession no. Y16784) と 100%一致した。

VII型代表株 19 株由来の *bla*<sub>TEM-1</sub>、*spvC* 陽性プラスミドを、エレクトロポレーションにより大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入し、形質転換株を作出して薬剤感受性試験を実施した。1 株を除いた全ての形質転換株で、ABPC、SM、SUL、TC、KM に耐性を示した (表 6)。NST110 株由来 97 kb プラスミドの形質転換株は ABPC、TC、KM に耐性を示したが、SUL、SM に感受性となった (表 7)。TST207 株が保有する 110 kb のプラスミドの形質転換株も、他の形質転換株と同様に ABPC、SM、SUL、TC、KM に耐性を示した。一方で、120 kb の *bla*<sub>CMY-2</sub> 保有プラスミドの形質転換株は、ABPC、CP、SM、SUL、TC、CEZ に耐性を示した (表 7)。

*bla*<sub>TEM-1</sub> 保有プラスミドの形質転換株を用いて、血清型特異的病原性プラスミド上に存在する各種病原性関連遺伝子 (*spvA*、*spvB*、*spvC*、*traT*、*rck*、*pefA*) および複製関連遺伝子 (*repFIIA*) の有無を、PCR により調べた。その結果、全株で、*pefA* 以外の全ての遺伝子が陽性となった (表 7)。一方、120 kb の *bla*<sub>CMY-2</sub> 保有プラスミドは、全ての遺伝子で陰性となった (表 7)。

表7 形質転換株の薬剤耐性プロファイルおよび各種遺伝子保有状況

形質転換株名	供与株の PFGE プロファイル	薬剤耐性プロファイル <sup>a</sup>	プラスミドのサイズ (kb)	標的遺伝子						
				<i>repFIIA</i>	<i>spvA</i>	<i>spvB</i>	<i>spvC</i>	<i>rck</i>	<i>traT</i>	<i>pefA</i>
TF:TST205	VII-1	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT261	VII-2	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:R18-1	VII-3	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:07SY9	VII-4	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TFTST228	VII-5	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT262	VII-6	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT291	VII-7	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT302	VII-8	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:TST207-1	VII-9	ABPC, CP, SM, SUL, TC, CEZ	120	-	-	-	-	-	-	-
TF:TST207-4	VII-9	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	+	+	+	+	-	+	-
TF:KT165	VII-10	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	+	+	+	+	+	+	-
TF:NST78	VII-11	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT158	VII-12	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT161	VII-13	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	+	+	+	+	+	+	-
TF:NST110	VII-14	ABPC, TC, KM	97	+	+	+	+	+	+	-
TF:TST233	VII-15	ABPC, SM, SUL, TC, KM	120	+	+	+	-	+	+	-
TF:07IB1	VII-16	ABPC, SM, SUL, TC, KM	95	+	+	+	-	+	+	-
TF:HD	VII-18	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-
TF:TST31	VII-19	ABPC, SM, SUL, TC, KM	110	+	+	+	+	+	+	-
TF:KT271	VII-20	ABPC, SM, SUL, TC, KM	130	+	+	+	+	+	+	-

<sup>a</sup>: ABPC, アンピシリン; CP, クロラムフェニコール; SM, ストレプトマイシン; SUL, サルファ剤; TC, テトラサイクリン; KM, カナマイシン; CEZ, セファゾリン

#### 4. 考察

本章では、過去 33 年間に北海道において分離された牛由来 *S. Typhimurium* 545 株について、PFGE により I ～IX型の 9 つの遺伝子型に型別した。多くの株が I 型またはVII型に分類され、1992 年以降は I 型、2000 年以降はVII型が主な分離株であることが明らかとなった。さらに、I 型およびVII型は、一部の例外的な株を除き、ほとんどの株が MLVA によってもそれぞれ一つのクラスター (クラスターA および D) を形成した。異なる型別方法によってもそれぞれがクラスターを形成することから、I 型およびVII型は、それぞれ遺伝学的に近縁な株で構成されていることが示唆された。I 型菌の多くが ABPC、CP、SM、SUL、および TC の 5 剤に対して耐性となるプロフェイル (ACSSuT) を示し、DT104 に特異的な配列 162-bp amplicon や *int1*、*floR* を保有していたことから、I 型は DT104 に型別される株、あるいはそれと近縁な株で構成されることが示唆された。実際に I 型に分類された 12 株についてファージ型別を実施したところ、全株が DT104 と同定された。また、162-bp amplicon は I 型以外の菌株には認められず、I 型以外の PFGE 型から 23 株を選びファージ型別を実施したところ、全株が DT104 以外のファージ型か、あるいは型別不能となった。これらのことから、DT104 は I 型菌に包括されることが示された。DT104 を含む I 型菌の分離が増加した 1992 年は、成牛のサルモネラ症が増加した時期と一致し、I 型菌と成牛のサルモネラ症との関連が強く示唆される。I 型菌は、2004 年以降減少傾向にある。2002 年から 2005 年の調査では、国内の牛由来 *S. Typhimurium* における DT104 の割合が減少し、DT104 以外の多剤耐性菌が増加したことが報告されており [35]、本研究の結果と一致している。

2000 年以降増加したVII型は、多くが ABPC、SM、SUL、TC、KM (ASSuTK) の 5 剤耐性を示し、165 株中 162 株が ABPC、26 株が CEZ に耐性を示した。2000 年以前は CEZ 耐性株が 2 株しか分離されていなかったが、2000 年以降急激に増加した。VII型のうち 11 株についてファージ型別を実施したが、全て型別不能であった。VII型菌は

様々なサイズのプラスミドを保有しており、それらのプラスミド上にはβラクタマーゼ遺伝子である *bla*<sub>TEM-1</sub> とともに血清型特異的病原性プラスミド上の遺伝子 *spvC* が検出された。さらにこれらのプラスミドを用いた大腸菌の形質転換株からは、*pefA* を除いた全ての血清型特異的病原性プラスミド上の遺伝子 (*repFIIA*、*spvA*、*spvB*、*spvC*、*traT*、*rck*) が検出された。以上のことから、VII型菌は *S. Typhimurium* の血清型特異的病原性プラスミドに *bla*<sub>TEM-1</sub> が付加された薬剤耐性病原性プラスミドを共通に保有することが明らかとなった。このようなプラスミドは他の PFGE 型株には認められないことから、VII型に特有な性状であると考えられる。VII型菌のプラスミドの形質転換株は、ABPC の他に SM、SUL、TC、KM に耐性を示し、これらの薬剤に対する耐性遺伝子も、同一プラスミド上に存在していることが示唆された。TST233 株および 07IB1 株において、*spvC* がサザンハイブリダイゼーションによって検出されたが、PCR では検出されなかった。この理由として、これら 2 株において、*spvC* 検出用のプライマー結合部位に変異があり、PCR では増幅できなかったことが考えられる。

VII型菌のうち、TST207 株は CTX に耐性を示した。TST207 株は、110 kb および 120 kb のプラスミドを保有しており、110 kb のプラスミドは *bla*<sub>TEM-1</sub> と *spvC* が共存している薬剤耐性病原性プラスミドであった。一方で 120 kb のプラスミド上には *bla*<sub>CMY-2</sub> が検出され、*spvC* は認められなかった。形質転換実験により、120 kb 上には CEZ 耐性に関与する *bla*<sub>CMY-2</sub> 以外に CP、SM、SUL、TC に対する耐性遺伝子も存在することが示唆された。

近年、北米で特定の PFGE プロファイル WA-TYP035 および WA-TYP187 (WA-TYP035/187) を示す多剤耐性 *S. Typhimurium* の分離数が増加していることが報告されている [2, 9]。WA-TYP035/187 はファージ型別不能であり、PFGE プロファイル VII-9 および VII-10 は、WA-TYP035 と類似していた。さらに、VII型菌の 13 株が示す 3 つの MLVA プロファイル (13-16-12-3-11、13-17-12-3-11、13-17-12-3-12) は、WA-TYP035/187 のものと一致した [2] (表 2)。これらのことから、WA-TYP035/187 と遺伝学的に極め

て類似した菌株が、北海道内の牛群において拡散したことが示唆された。

WA-TYP035/187 において CAZ 耐性菌の急増が観察され、これらの株は *bla<sub>CMY-2</sub>* を含むプラスミドを保有することが明らかにされている [2, 9]。VII型においては、26 株が CEZ に耐性を示すが、CAZ 耐性株は 4 株のみであり、さらに CTX に耐性を示したのは *bla<sub>CMY-2</sub>* をプラスミド上に保有する TST207 株 1 株のみであった。CEZ 耐性株 26 株は全て *bla<sub>CMY-2</sub>* を保有しており、このうち PFGE プロファイル VII-6 を示す 22 株は、全株が染色体上に *bla<sub>CMY-2</sub>* を含む薬剤耐性領域 GI-VII-6 を保有することが明らかにされている [67]。同様に、残りの CEZ 耐性株 3 株も、染色体上に *bla<sub>CMY-2</sub>* を保有していることが推測される。このように VII型の PFGE および MLVA プロファイルは WA-TYP035/187 と類似しているが、CAZ のような第三世代セファロスポリンに対する耐性獲得状況が大きく異なっている。WA-TYP035/187 が分離されたワシントン州における調査では、第三世代セファロスポリンであるセフトオフルが牛の感染症の治療に最も使用される抗生物質の一つとなっており [57]、薬剤耐性獲得状況違いは、治療に使用される薬剤の違いを反映していると考えられる。日本においては、これまでに extended-spectrum  $\beta$ -lactamase 産生 *E. coli* が牛から、*S. Senftenberg* および *S. Infantis* がブロイラーから分離されている [27, 30, 66, 68]。さらに、福島県で CTX 耐性 *S. Typhimurium* が牛から分離されたことが報告されている [72]。今後、日本においてもセフトオフル等のセファロスポリンの使用が第 3 世代セファロスポリン耐性菌の増加を促進する可能性がある。

以上のように PFGE および MLVA は菌株間の遺伝学的性状の比較を可能にする。特に MLVA は海外で報告されたプロファイルとの比較が容易であり、データの互換性という観点から、PFGE と比較して汎用性が高いと考えられる。一方で、MLVA よりも PFGE の識別能力が高くなる場合もあり [39]、詳細な型別には両者を併用することが重要であると考えられる。

以上、DT104 を含む PFGE I 型の分離数が 1992 年に増加し、2004 年以降減少して

おり、一方で 2002 年以降 PFGE VII 型の分離数が増加したことを明らかにした。VII 型菌は北米で分離されている株と類似しており、多剤耐性を示し、一部の株は CEZ に耐性を示す。このことから、I 型から VII 型への分離菌株の変化は、北米から菌が導入され、さらに牛の感染症治療にセファロスポリンが使用されたことが一因となっている可能性が考えられた。1996 年にセフトオフルが動物用医薬品として承認され、牛への使用が可能となったことも関連している可能性がある。本研究により、PFGE および MLVA は、異なる地域や年代で分離された菌株の比較を可能とし、これらの手法を用いた長期的な疫学的調査とそのデータの蓄積は、新型菌の検出等の疫学的解析に極めて有用なツールとなることが示された。



## 5. 小括

北海道内で 1977 年から 2009 年の間に分離されたサルモネラ症発症牛由来 *S. Typhimurium* 545 株は、PFGE により 116 種類のプロファイルを示し、9 つの遺伝子型 (I ~IX型) に分類された。全株の内 248 株が PFGE I 型に、165 株が PFGE VII型に分類され、2 つの優勢な遺伝子型が存在することが示された。さらに、MLVA により各 PFGE 型の代表株 116 株について解析した結果、4 つの MLVA クラスタ (A~D) が形成され、MLVA クラスタ A は PFGE I 型、MLVA クラスタ C は PFGE VII型で構成された。PFGE I 型および VII型は、異なる型別手法を用いてもそれぞれ同じグループに分類されることから、これらの PFGE 型菌はそれぞれ遺伝学的に近縁な株で構成されていることが示唆された。I 型の多くは 1992 年から 2004 年の間に分離されており、1990 年代に世界的に流行した多剤耐性ファージ型 DT104 が含まれていた。VII 型は全て 2000 年以降分離されており、多くの株が多剤耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドを共通に保有していた。さらに、VII型のうち 1 株が第 3 世代セファロスポリンである CTX に耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドの他に、CMY-2 型  $\beta$  ラクターマーゼ遺伝子である *bla*<sub>CMY-2</sub> を含むプラスミドを保有していた。以上のことから、1992 年以降、DT104 を含む I 型菌が増加したが、2004 年以降減少し、それに代わり 2000 年以降、新型の多剤耐性 VII型菌が出現し、これによるサルモネラ症が増加したことが明らかとなった。

## 第Ⅱ章 北海道内の一酪農場において分離された *Salmonella* Typhimurium の分子疫学的解析

## 1. 序文

第 I 章では PFGE I 型が 1992 年、VII 型が 2000 年以降出現し増加したことを明らかにした。このように I 章で実施した PFGE や MLVA を用いた分子疫学的な解析は、新たに出現する流行株の検出を可能とする。さらに、遺伝子型や薬剤耐性プロファイル等の細菌学的疫学マーカーのデータベースは、異なる年代や地域で分離された菌株間の比較を可能にする。すなわち、分子疫学的な解析は、新型菌の検出だけでなく、感染源および感染経路の特定に有用であると考えられる。

2008 年 2 月に、北海道石狩地方の一酪農場において牛サルモネラ症が発生した。当該農場では外部からの導入牛がなかったことから、野生動物との接触等により感染した可能性が考えられる。本章では、サルモネラの農場内における浸潤状況を調査するとともに、分離菌株について第 I 章で用いた分子疫学的解析手法により解析し、感染経路等の疫学的背景を考察し、細菌学的疫学マーカーのデータベースの有用性を検証した。

## 2. 材料および方法

### (1) 分離農場の疫学的概要

本農場は北海道石狩地方に立地し、乳用成牛約 100 頭、育成牛および哺育牛約 50 頭の合計約 150 頭を飼養しており、外部からの牛の導入はなかった。それぞれのステージの牛が、フリーストール牛舎、自動搾乳システム牛舎、育成牛舎、哺育牛舎等で飼育されている。牛サルモネラ症は 2008 年 2 月にフリーストール牛舎内の分娩房で発生し、2008 年 8 月の発生を最後に全頭菌分離陰性となった (表 8)。2008 年 8 月に排菌が認められた牛に対しては、抗生剤を投与した後に安楽殺処分を実施し、その他の排菌牛は抗生剤を投与せずに直ちに安楽殺処分を実施した。菌分離後は牛舎消毒をした。

### (2) 採材および *Salmonella* 分離培養

初発である 2008 年 2 月以降、2 週間に一度の採材を約一年間実施した。乳用牛全頭から直腸便を採取し、糞便サンプルとした。また、フリーストール牛舎、ロボット牛舎、乾乳舎、分娩房、試験畜舎の飼槽と水槽、ウェイティングサークル、飼料などを滅菌綿棒で拭い、環境サンプルとした。培養材料は、約 1 g をハーナ・テトラチオン酸塩培地 (栄研) 10 ml に接種し、37°C で 24 時間培養後、DHL 寒天培地 (日水製薬、東京) に 1 白金耳量を接種し、37°C、24 時間培養した。DHL 寒天培地上のサルモネラ様コロニーを釣菌し、サルモネラ診断用免疫血清 (デンカ生研、東京) を用いて凝集試験を行い、Kaufmann - White の抗原構造表に従って血清型を決定した [15]。

### (3) 供試菌株

薬剤感受性試験については、分離菌株全 16 株 (表 8) を用いた。ファージ型別、PFGE、MLVA、プラスミドプロファイルについては、牛直腸便および環境材料から分離された代表株 9 株 (RG08-1~RG08-9) と、2006 年 4 月に旭川で採取したスズメ由

表 8 牛糞便および環境からの *Salmonella* の分離状況

検査時期	成牛	子牛	環境	合計
2008/2/8	1 <sup>a)</sup>			
2/12	0/90 <sup>b)</sup>	0/67	6/42	6/199
/27	1/89	1/66	0/41	2/196
3/8	0/96	0/69	0/47	0/212
18	0/89	0/70	0/46	0/205
4/3	1/88	0/71	5/135	6/294
17	0/83	0/66	0/51	0/200
5/7	0/84	0/58	0/50	0/192
21	0/117	0/33	0/50	0/200
6/4	0/110	0/40	0/50	0/200
18	0/108	0/39	0/50	0/197
7/16	0/106	0/43	0/50	0/199
8/11	1/90	0/54	0/50	1/194
14	NT <sup>c)</sup>	NT	0/23	0/23
9/1	0/24	NT	NT	0/24
16	0/85	0/63	0/56	0/204
10/22	0/89	0/57	0/56	0/202
2009/2/13	0/89	0/58	0/50	0/197
合計	4/1,437	1/854	11/847	16/3,138

a) 初発例

b) 陽性数/検体数

c) 検査を実施せず

来株 3 株 (RG08-10~12)、参考株として第 I 章で用いた *S. Typhimurium* IS18-33 を用いた。

#### (4) 薬剤感受性試験

ディスク法により薬剤感受性試験を第 I 章と同様に実施した。第 I 章で使用した薬剤に加え、セフトリアキソン、コリスチン、ホスホマイシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、スルファモノメトキシシ・オルメトプリム、スルフィソキサゾールを使用した。

#### (5) ファージ型別、プラスミドプロファイル、PFGE、MLVA

上述の代表株 12 株のファージ型別について、国立感染症研究所に依頼し、英国の Public Health Laboratory Service の手法 [5] に基づき実施した。プラスミドプロファイル、PFGE、MLVA は第 I 章と同様に実施した。

#### (6) 感染実験および LD<sub>50</sub> の算出

分離菌株の代表株として初発例由来 RG08-1 株とスズメ由来 RG08-10 株、参考菌株として U1 株 (DT104: I 型菌) および、KST220 (VII 型菌) を 0.3 M NaCl 加 LB 培地で 37°C、20 時間培養した。培養液を 8,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て、沈渣を PBS で懸濁し、再度遠心した。これを 2 回繰り返して菌を洗浄した。洗浄後 PBS で沈渣を懸濁し、10 倍階段希釈し、接種菌液とした。LB 寒天培地に各希釈倍率の接種菌液を 25 µl ずつ滴下して 20 時間培養し、コロニー数を計測した。4 時間絶食させた Balb/c メス 6 週齢 1 群 5 匹に各希釈倍率の菌液 200 µl を、経口投与針 (夏目製作所、東京) を用いて胃内投与した。投与後マウスの生死を 3 週間観察し、Reed and Muench の方法 [58] で LD<sub>50</sub> を算出した。

### 3. 結果

#### (1) *Salmonella* の分離状況

2008年2月8日に北海道石狩地方の一酪農場の分娩房中で飼養されていた成牛1頭が分娩後下痢症状を呈した。発生直後から翌年2月まで経時的にサルモネラ検索を行った結果、成牛3頭、子牛1頭、環境材料11検体からサルモネラが分離された。発生直後の検査では初発例の牛が飼養されていた分娩房の飼槽からサルモネラが分離された。2月27日の検索で成牛および子牛1頭ずつからサルモネラが分離された。3月の検査では全頭陰性であったが、4月の検査で成牛1頭が陽性となり、フリーストール牛舎の飼槽および通路、ミルクパールのウェイティングサークルからも分離された。7月までの6回の検査では全検体陰性となったが、8月の検査では成牛1頭が陽性となった。その後は翌年2月まで、菌は分離されなかった。分離菌株は合計16株となった(表8)。血清型別の結果、分離株は全て *S. Typhimurium* であると同定された。

#### (2) 薬剤感受性試験

17薬剤を供試し、全分離菌株16株について試験した結果、全菌株が全薬剤に対し、中間から感受性を示した。

#### (3) プラスミドプロファイル

供試菌株12株のプラスミドを抽出し、泳動した結果、全株が94 kbのプラスミドを保有していた。その他のサイズのプラスミドは認められなかった。

#### (4) PFGE

供試菌株12株のうち、8月に放牧牛556から分離されたRG08-5を除く11株が、同一のプロファイルを示した(図4)。参考株として用いた *S. Typhimurium* IS18-33は、

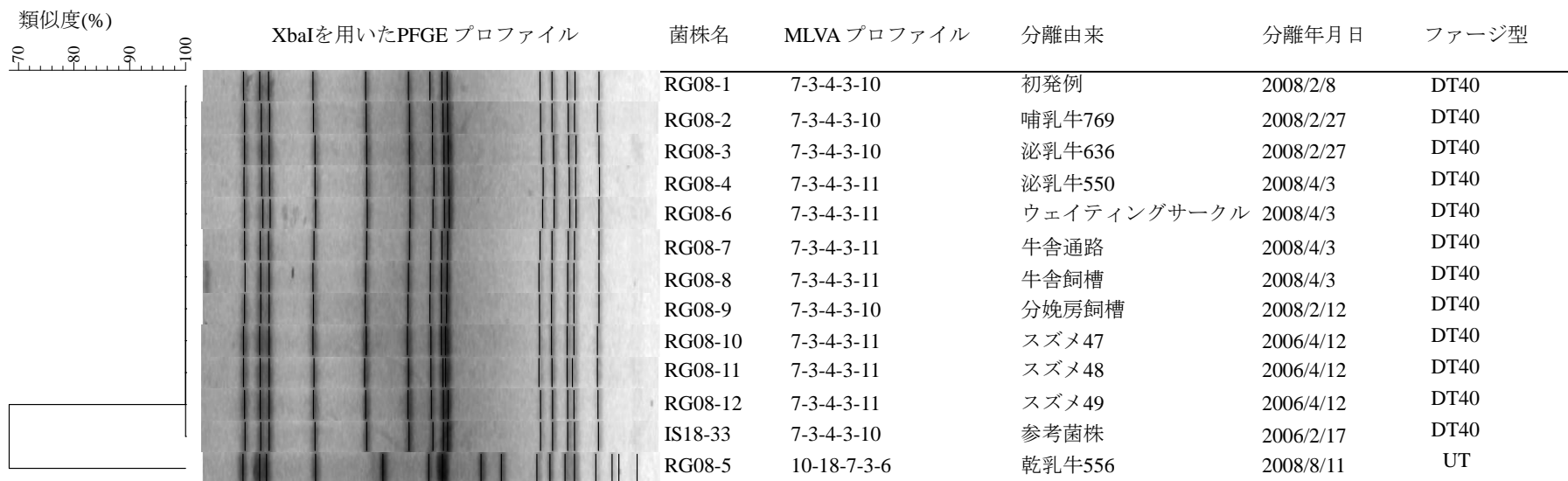


図4 北海道内の一酪農場で分離された *S. Typhimurium* および旭川で採取したスズメ由来株の PFGE および MLVA 解析

a) UT: 型別不能



第 I 章の解析で PFGE II-15 に分類された。UPGMA 法により系統樹を作成したところ、RG08-5 のプロファイルは他の株のプロファイルと比較し、68.3 %の類似度を示した(図 4)。

#### (5) MLVA

MLVA の結果、供試菌株 12 株は 3 種の MLVA プロファイルを示した (図 4)。RG08-1~3 および RG08-9 は MLVA プロファイル 7-3-4-3-10 を示し、タイプ 1 とした。RG08-4、6、および 7 が示したプロファイル 7-3-4-3-11 をタイプ 2 とした。タイプ 2 はタイプ 1 と比較し、1 カ所の遺伝子座 (STTR10) における RN が異なっていた。RG08-5 のプロファイルは 10-18-7-3-6 となり、タイプ 1 および 2 とは 4 カ所の遺伝子座における RN が異なっており、これをタイプ 3 とした。それぞれのタイプの代表株 RG08-1、RG08-5、RG08-10 を選出し、第 I 章で解析した 116 株と共に MLVA プロファイルに基づく系統樹を作成した (図 5)。その結果、3 株は一章で述べた A~D のいずれのクラスターにも分類されなかった。タイプ 1 およびタイプ 2 代表株である RG08-1 および RG08-10 は、MLVA クラスター D の近傍に位置し、タイプ 3 のプロファイル (10-18-7-3-6) は VII 型菌の薬剤感受性株 IS19-6 株のプロファイル (10-17-6-3-6) と比較して 2 箇所の遺伝子座における RN が異なっていた (図 5)。

#### (6) フェージ型別

供試菌株 21 株のうち、RG08-5 を除く全株が、DT40 と同定された (図 4)。RG08-5 は型別不能 (UT) となった (図 4)。

#### (7) 初発牛由来株およびスズメ由来株の病原性

マウスに対し、RG08-1 および RG08-10 を胃内投与したところ、LD<sub>50</sub> 値はともに

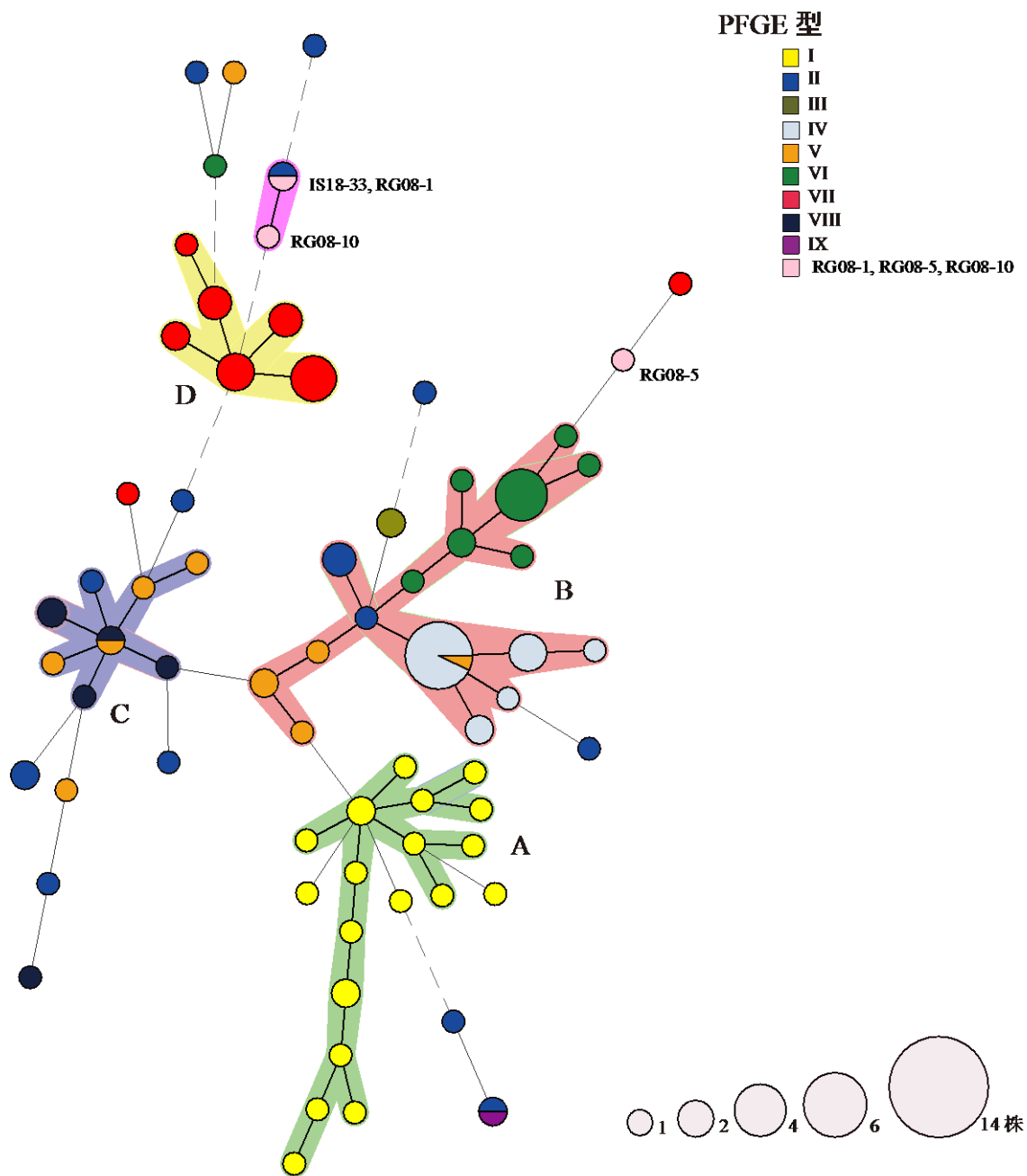


図 5 MLVA プロファイルに基づく *S. Typhimurium* 116 株および一酪農場分離株の系統樹

第 I 章で示した 116 株の Minimum Spanning Tree に、一酪農場由来株 (RG08-1、RG08-5、RG08-10) が示した MLVA タイプ 1~3 を加え、系統樹を作成した。

$10^{3.6}$  cfu/匹となった。 U1 株 (DT104:I 型菌) および、KST220 (VII型菌)では、LD<sub>50</sub> 値はそれぞれ  $10^{1.9}$  cfu/匹および  $10^{4.3}$  cfu/匹以上となった。

### 3. 考察

一年間にわたる *Salmonella* 検索の結果、北海道石狩地方の一酪農場において、*S. Typhimurium* が分離された。感染は分娩牛、哺育牛、高泌乳牛、乾乳牛で確認され、発育ステージによる偏りはみられなかった。初発例を除き陽性牛が臨床症状を示さなかったことから、病原性の比較的低い、不顕性感染を起こす株であることが推測された。

2008年8月に放牧牛から分離された RG08-5 を除いた供試菌株 12 株全てが、同一の PFGE プロファイルを示した。RG08-5 は他の菌株と比較し、類似度が 68.3% と低い値であった。第 I 章と同様に類似度 74% 以上のプロファイルを同一クラスターとして分類すると、RG08-5 は他の菌株とは異なる PFGE 型に分類される。MLVA による解析では、タイプ 1~3 の 3 種類のプロファイルが検出され、RG08-5 を除く 12 株がタイプ 1 またはタイプ 2 を示した。タイプ 1 および 2 は STTR10 における RN のみが異なり、タイプ 2 で 1 リピート多くなっていた。STTR10 は *S. Typhimurium* の血清型特異的病原性プラスミド上に存在する領域であり、寒天平板培地およびマウスを用いた継代による高頻度の可変性が報告されている [10]。従って、タイプ 1 および 2 を示す株は同一のクローンから派生したものであり、STTR10 における 1 リピートの違いは、農場内における伝搬の間に生じた可能性が考えられる。一方で RG08-5 が示したタイプ 3 は、タイプ 1 および 2 とは 4 カ所の遺伝子座における RN が異なっていた。以上のように、PFGE および MLVA の結果から、RG08-5 を除く供試菌株 11 株は同一クローンから由来したものであり、RG08-5 はそれらの株とは由来が異なることが示唆された。RG08-5 が分離された乾乳牛 556 は放牧場で飼養されていた。そのために、放牧時における野生動物との接触等により、新たな菌株が導入された可能性が考えられる。

RG08-5 を除く農場およびスズメ由来の 11 株は、参考株である IS18-33 と同一の PFGE プロファイルを示した。IS18-33 は I 章での解析で PFGE II-15 に分類されてい

る。従って RG08-5 を除く農場およびスズメ由来の 11 株も、PFGE II-15 に分類される。II-15 に属する菌株は第 I 章で解析した 545 株中 13 株存在し、Kurosawa ら [39] の報告によると、このうち 7 株がタイプ 1 または 2 と同一の MLVA プロファイルを示す。これらの 7 株は全て 2006 年以降に分離されており、分離された地域は石狩地方 (5 株)、胆振地方 (1 株)、後志地方 (1 株)であった。このことから、MLVA タイプ 1 および 2 のクローンによる牛サルモネラ症は、道央地域に限局して発生していることが考えられた。一方、RG08-5 の PFGE プロファイルは VII-21 に類似しており、VII-21 に分類される菌株 IS19-6 株および 07Ishikari-25 株と MLVA プロファイルの遺伝子座における RN がそれぞれ 2 カ所および 1 カ所のみ違いであった [39]。VII-21 に属する菌株は全ての薬剤に対して感受性であり、他の VII 型菌と異なり MLVA クラスタ D には分類されない。以上のことから RG08-5 を含む農場分離株は、近年増加した多剤耐性の VII 型菌とは異なるタイプの菌であると考えられる。

農場由来 9 株のうち、RG08-5 を除いた全株がスズメ由来株 RG08-10~12 と同一の PFGE プロファイルを示し、同一、または類似した MLVA プロファイルを示した。また、2008 年 2 月のサルモネラ症発生以前から、本農場では外部からの導入牛はなかった。これらの遺伝学的性状および疫学的背景から、本農場で発生した牛サルモネラ症はスズメにより農場内へ持ち込まれて拡散した可能性が考えられる。*S. Typhimurium* は一般的にはカタラーゼ反応陽性、クエン酸利用陽性となる。しかし RG08-5 を除く農場由来株は、カタラーゼ反応が弱く、クエン酸利用能は陰性と、非定型的な生化学性状を示した。これらの性状は死亡した野鳥から分離される *S. Typhimurium* DT40 の特徴と一致する [29, 80]。実際にフェージ型別により、RG08-5 以外の全供試菌株が DT40 と同定された。2005 年から 2006 年に北海道内各所でスズメの大量死が確認されており、調査の結果、死亡したスズメから *S. Typhimurium* が分離され、分離菌株は DT40 と同定された [80]。また、2008 年から 2009 年にも同様に北海道の旭川市周辺でスズメの大量死が認められ、死亡したスズメからは DT40 を含むいくつかのファー

ジ型の *S. Typhimurium* が分離されている [12]。スズメの死亡の原因としては融雪剤中毒の可能性も挙げられているが [76]、2008年から2009年の調査においては死亡鳥の臓器における生化学検査により融雪剤中毒は否定されている [12]。イギリスでは DT40、DT41、DT56 variant がスズメを含む野鳥から高頻度に分離されており、野鳥間でこれらの菌株が維持されていると考えられている [29, 40, 53]。2005年から2006年および2008年から2009年の二度にわたる菌分離から、日本国内においてもスズメの間で菌株が維持されている可能性が考えられる。DT40 はスズメに対しては高病原性を示すと考えられるが、牛等の家畜からの分離頻度は低く [54]、牛における症例報告は少ない。国内においては2006年に黒毛和種での発生が認められ、一頭が死亡したことが報告されている [31, 32]。本章において述べた発生例においても同様に、分娩後の成牛が症状を示して死亡し、また同居牛への感染が認められた。このように、DT40 は牛へ感染する頻度は低いものの、抵抗力の低下した牛には感染し死に至らしめる毒力を有することが示唆された。上述した MLVA プロファイルタイプ 1 および 2 を示す道央圏の牛由来株 7 株については、フェージ型別を実施していないが、遺伝学的特徴から DT40 である可能性が示唆される。2006年における調査では、スズメの死亡数が最も多かったのが上川であり、次いで石狩、胆振、後志となっており [31]、道央圏の牛由来株 7 株に関してもスズメが関与している可能性が考えられる。

本章ではマウスを用いた感染実験により、農場分離株、スズメ由来株、I型菌である DT104 およびVII型菌の病原性を比較した。その結果、初発例由来株 RG08-1、スズメ由来株 RG08-10 の LD<sub>50</sub> はともに 10<sup>3.6</sup> cfu/匹となり、DT40 は鳥類だけでなくマウスに対しても病原性を示すことが明らかとなった。これら 2 菌株のマウスに対する病原性は DT104 U1 株と比較すると低いが、VII型菌 K220 株よりわずかに高かった。本研究における解析ではVII型菌のマウスに対する病原性は他の菌に比較して低いものであった。しかしVII型菌の牛からの高率な分離頻度から、牛に対して宿主特異性の高いことが推察され、この菌が牛に対しては強い病原性発現を示す可能性も考えられる。

以上、本章では第 I 章で用いた分子疫学的解析手法により、一農場で分離された菌株を解析した。その結果、2 種類のクローン由来の菌株により農場内が汚染されており、その感染源がスズメである可能性があることを示した。また他の農場で分離された株と PFGE および MLVA プロファイルを比較したことで、道央圏の他の農場でもスズメ由来と考えられる株による牛サルモネラ症の発生があることが判明した。本章の成績から、継続的な菌株の収集とそれらの細菌学的疫学マーカーに関するデータの蓄積が、牛サルモネラ症の詳細な疫学的解析を可能とすることが検証された。

#### 4. 小括

北海道内道央地域の一酪農場において発生した牛サルモネラ症の分子疫学調査を実施した。2008年2月から2009年2月まで当該農場の乳用牛の糞便および環境材料を採取し、増菌培養によるサルモネラの検出、分離菌のPFGE、MLVA、ファージ型別による解析を行った。各種材料から25株が分離され、そのうち代表的な9株を解析した結果、最後に分離された1株(RG08-5)を除き全株が同一のPFGEプロファイルおよび類似したMLVAプロファイルを示し、2種類のクローン由来株による流行が示唆された。RG08-5以外の株は道内のスズメ由来株と同一あるいは類似したPFGEおよびMLVAプロファイルを示しており、ファージ型もスズメ由来株と同様のDT40であった。以上のことから、当該農場で発生したサルモネラ症の原因菌のうちRG08-5以外の株は、スズメ由来株と同一であると考えられ、放牧時におけるスズメとの接触が感染経路である可能性が示された。また、これらの菌株と同一のMLVAプロファイルを示す菌が、道央地域の他の農場においても分離されており、当該タイプの菌による限局的な流行が示唆された。



第Ⅲ章 *Salmonella* Typhimurium DT104 が産生する百日咳毒素様蛋白  
ArtAB の性状解析

## 1. 序文

第 I 章では、成牛のサルモネラ症が増加した 1992 年に、北海道の牛において *S. Typhimurium* PFGE I 型菌の分離数が増加したことを明らかにし、成牛のサルモネラ症の増加と PFGE I 型菌が関連する可能性を示唆した。さらに、I 型菌は MLVA によっても 1 つのクラスターを形成することから、これらは近縁な株で構成されたグループであり、DT104 およびその近縁株を含むことを示した。

DT104 は *S. Typhimurium* のフェージ型の 1 つであり、1980 年代にイギリスで初めて人から分離された後、世界各国で様々な動物種から分離されるようになった [77]。DT104 は牛からも分離されており、国内においては 1990 年代に分離数が増加したことが報告されている [62]。DT104 は重症例が多いなどの疫学的な観点から病原性の強い菌であることが推察されるが [21]、マウスを用いた感染実験や細胞への付着性等を解析した実験では DT104 が他の *S. Typhimurium* と比較して病原性が強いとされる成績は得られていない [4]。DT104 は溶原フェージ上に百日咳毒素と相同性を示す遺伝子 *artAB* を保有し、それらはマイトマイシン C (MMC) により誘導的に発現し、遺伝子産物である ArtAB は細胞のシグナル伝達分子の一つである百日咳毒素感受性 GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) を ADP-リボシル化する [61, 79]。これまでにサルモネラにおいてこのような毒素は報告されておらず、ArtAB の新たな病原因子としての可能性が注目される。

本章では、DT104 が産生する ArtAB の病原因子としての役割を検討するため、牛由来 ST における *artA* および *artB* 遺伝子保有状況を調査し、さらに ArtAB の精製方法を確立し、その生物活性について解析した。

## 2. 材料および方法

### (1) 使用菌株

*artA* および *artB* 遺伝子検出には、第 I 章で用いた 545 株の牛由来 *S. Typhimurium* を供試した。*artAB* の発現誘導および遺伝子産物である ArtAB の精製には、*artAB* 保有牛由来 *S. Typhimurium* DT104 U1 株を供した。

### (2) PCR による遺伝子検出

第 I 章と同様にして供試菌株から DNA を抽出し、*artA* および *artB* を PCR で検出した。プライマーとして、ART-1 (5'-CTGGTTATGCAAGTGCTGTT-3') /ART-2 (5'-CTCCCCGTGCGTCATAAAAC-3')、ARTB-1 (5'-GGCAACGTAGGTCCC ATACA-3') /ARTB-2 (5'-TTGCGTCGTTATCCAGTGTT-3') [61] を用いた。

### (3) ArtAB 産生誘導およびカラムクロマトグラフィーによる精製

MMC を添加した培地で U1 株を培養することにより *artAB* の発現を誘導した。すなわち、Syncase broth [11] 10 ml で供試菌株を 37°C で 18 時間前培養し、これを 200 mL の Syncase broth に加え、さらに 6 時間 37°C で振とう培養 (振とう速度 120 rpm、振幅 25 mm) した。MMC を最終濃度 0.5  $\mu\text{g/ml}$  に加え、さらに 14 時間振とう培養を続けた。培養後の菌液を 8,000 rpm 5 分間遠心し、上清を回収して孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブランフィルターを用いて濾過滅菌した。滅菌後の培養上清を 1N の HCl により pH 6.0 に調整し、アフィゲルブルー (バイオ・ラッド、Hercules、USA) を培養上清の 1/50 量加えて 4°C で 18 時間攪拌した。攪拌を止めてゲルを沈め、上清を捨てた後、ゲルを 100 ml の 0.25 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) および 100 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄した。洗浄はゲルをバッファーで懸濁し、遠沈することで実施した。洗浄後のゲルをラボラトリー・ポリエチレンカラム

(MoBiTec, Goettingen, Germany) に充填し、ペリスタ・バイオミニポンプ (アトー、東京) により 1 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) で ArtAB を溶出した。カラムから流出したバッファーを 1 ml ずつ小試験管に採取し、30 本採取してフラクション 1~30 とした。採取した各小試験管のサンプルを SDS-PAGE により泳動し、クマシールリアントブルー (CBB) により染色した。ArtA および ArtB の分子量はそれぞれ 12.5 kDa および 25 kDa であり[79]、それらの位置にバンドが存在する分画を回収した。

回収したサンプルのバッファーを PD-10 カラム (GE ヘルスケア、Milwaukee, USA) により 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0) に交換し、ハイドロキシアパタイトカラム (バイオ・ラッド) に添加して吸着させた。さらに、10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.0)、0.1M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) それぞれ 50 ml を順にカラムに流し、0.5 M NaCl を含む 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) により ArtAB を溶出した。バッファーのカラムへの送液およびサンプルの添加は、上述のバイオミニポンプを使用した。カラムから流出したバッファーを 1 ml ずつ小試験管に採取し、30 本回収した (フラクション 1~30)。各小試験管のサンプルを SDS-PAGE により泳動し、CBB 染色後、12.5 kDa および 25 kDa のバンドを含む分画を回収した。

回収したサンプルのバッファーを PD10 カラムにより 1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 0.05 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に交換し、ビバスピン (ザルトリウス; 膜材質 PES、分画分子量 10 K) を用いた限外濾過により 2 ml に濃縮した。次に、AKTA<sub>FPLC</sub> クロマトグラフィーシステム (GE ヘルスケア) を用いて、1.5 M の硫酸アンモニウムを含む 0.05 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) で平衡化した疎水性相互作用カラム (RESOUCE PHE カラム; GE ヘルスケア) にサンプルを添加し、1.5 M から 0 M の濃度に硫酸アンモニウムを含む 0.05 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を用いたリニアグラジエント溶出法により、ArtAB を溶出した。カラムから

の流出液を 1 ml ずつ小試験管に採取し、30 本回収した (フラクション 1~30)。各小試験管のサンプルを SDS-PAGE により泳動し、CBB による染色後、12.5 kDa および 25 kDa のバンドを含む分画を回収した。その後、PD10 カラムにより PBS にバッファー交換して-80°Cに保存した。

#### (4) 抗血清の作成

ArtA の 14 残基 (Arg<sup>10</sup>-His<sup>23</sup>) のペプチドを外部委託 (シグマアルドリッチジャパン、東京) し、ウサギを用いて抗体を作成した。DT104 U1 株培養上清から精製した ArtAB に対する抗体は精製 ArtAB 40 µg をウサギの皮下にアジュバント Titer Max Gold (TiterMax、Norcross、USA) とともに 2 週間おきに 3 回接種することにより作成した。さらに、マウスの尾根部に ArtAB 5 µg を Titer Max Gold とともに 2 週間おきに 3 回皮内接種して免疫し、マウス抗 ArtAB 抗体を得た。

#### (5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) およびウエスタンプブロッキング

SDS-PAGE 試料調整用バッファー (アトー) とサンプルを等量混合し、100°Cで 10 分間加熱した。15% SDS-PAGE ゲル (コンパクトゲル; アトー) にサンプルを添加し、コンパクトスラブ電気泳動槽 (アトー) を用いて 30 分間泳動した。ゲルと同じ大きさのろ紙 4 枚および PVDF メンブレン (バイオ・ラッド) 1 枚をブロッキングバッファー (25 mM Tris-HCl、192 mM グリシン、20% v/v メタノール) に浸し、ゲルを挟み込み Powered BLOT One (アトー) を用いて定電流 2 mA/cm<sup>2</sup> で 30 分通電した後、メンブレンをブロッキングバッファー (ロシュダイアグノスティックス) に浸して 1 時間室温にて静置した。ブロッキング後、メンブレンを 10% ブロッキングバッファー加一次抗体に浸して室温で 1 時間振とうした。一次抗体にはウサギ抗 ArtA 合成ペプチド抗体を 1,000 倍希釈したものをを用いた。TBS-T (Tris Buffered Saline、5% Tween20) で

メンブレンを洗浄後、二次抗体に浸して室温で 30 分振とうした。二次抗体には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (バイオ・ラッド) を 20,000 倍希釈して用いた。ペルオキシダーゼ反応は、ECL Prime Western Blotting Detection System (GE ヘルスケア) を用いて実施し、化学発光を化学発光用フィルム (Hyperfilm ECL ; GE ヘルスケア) への感光により検出した。

#### (6) G 蛋白質の ADP-リボシル化

ADP-リボシル化の標的蛋白として牛の脳由来百日咳毒素感受性 G 蛋白質 (Calbiochem-Novabiochem、0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) を用いた。50  $\mu\text{M}$  ビオチン化 NAD、25 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1 mM ATP、20 mM DTT、5 mM ADP-リボース、1 mM EDTA の反応液に、G 蛋白質 100 ng と ArtAB 100 ng を加え 37°C 1 時間反応させた。これを 100°C で 10 分間加熱し、12.5% の SDS-PAGE ゲルを用いて 30 分間泳動し、上述の条件で PVDF メンブレン (バイオ・ラッド) へ転写した。転写後のメンブレンをブロッキングバッファー (Roche Diagnostics Co.) に 1 時間浸し、ブロッキングバッファーにより 10,000 倍に希釈した HRP 標識アビジン (VECTOR Laboratories, Burlingame, USA) に浸して 1 時間室温で振とうした。TBS-T で洗浄後、上述と同様に ECL Prime Western Blotting System と化学発光用フィルム (Hyperfilm ECL ; GE ヘルスケア) を用いてペルオキシダーゼ活性を検出することにより、ADP-リボシル化された G 蛋白質を検出した。

#### (7) 抗 ArtAB IgG の精製

HiTrap ProteinG カラム (GE ヘルスケア) を滅菌蒸留水 5 ml で洗浄し、結合バッファー (20 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ 、pH 7.0) 5 ml で平衡化した。採取したウサギおよびマウスの抗 ArtAB 血清をカラムに添加し、結合バッファーを 10 ml 送液した。回収用の小試験管に予め 50  $\mu\text{l}$  の中和バッファー (1.0 M Tris-HCl、pH 9.0) を加えておき、カラムに溶出バッファー (0.1 M グリシン-HCl、pH 2.7) を送液して IgG を溶出し、回収用小試験管

に 0.5 ml ずつ回収した。回収したサンプルを 12.5%ゲルによる SDS-PAGE で泳動後、CBB 染色によりバンドが認められる分画のみを回収し、抗 ArtAB IgG とした。

#### (8) 蛋白質濃度の測定

精製 ArtAB および抗 ArtAB IgG 濃度は、Quick Start Bradford プロテインアッセイキット (バイオ・ラッド) を用いて Bradford 法 [8] に準じて測定した。スタンダードとして牛  $\gamma$  グロブリンを用いた。

#### (9) ELISA による ArtAB の定量

精製過程における ArtAB の濃度を測定するため、サンドイッチ ELISA を実施した。ウサギ抗 ArtAB IgG (2.9 mg/ml) を PBS で 100 倍に希釈し、96 穴マイクロタイタープレート (Maxisorp Immuno Module; Thermo Scientific、Hudson、USA) に 100  $\mu$ l ずつ加え、18 時間 4°C で静置して固相化した。その後、PBS でウェルを洗浄し、400  $\mu$ l の 5% BSA バッファーをウェルに加えて室温で 18 時間静置してブロッキングした。ウェルを洗浄後、各精製段階の DT104 培養上清をウェルに加えて 2 時間室温で静置し、さらに、PBS でウェルを洗浄し、マウス抗 ArtAB IgG (0.3 mg/ml) を 200 倍に希釈して、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加え、2 時間室温で静置した。その後、PBS で洗浄し、ヤギ抗マウス IgG+M (バイオ・ラッド) を 500 倍希釈して各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加え、2 時間室温で静置した。さらに、PBS で洗浄し、TMB 溶液 {ペルオキシダーゼ EIA Substrate Kit (バイオ・ラッド)} をウェルに 100  $\mu$ l ずつ加えて室温で 20 分反応させた。1 N 硫酸 100  $\mu$ l を加えて反応を止めた後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。スタンダードとして、Bradford 法で蛋白濃度測定した精製 ArtAB を用いた。

#### (10) イオン交換カラムクロマトグラフィーによる A ユニットおよび B ユニットの分離

精製後の ArtAB のバッファーを、PD10 カラムにより 30 mM Tris-HCl (pH 8.8) に交換した。30 mM Tris-HCl (pH 8.8) で平衡化した monoQ5/50GL カラム (GE ヘルスケア) に、AKTA FPLC を用いてバッファー交換後の ArtAB を添加した。その後 0 M から 0.5 M までの NaCl を含む 30 mM Tris-HCl (pH 8.8) を用いたリニアグラジエント溶出法により ArtAB の A ユニットおよび B ユニートを溶出し、それぞれの蛋白量を測定して A ユニットおよび B ユニートのモル比を算出した。

#### (11) マウスに対する致死活性

濾過滅菌した精製した ArtAB、2  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ 、0.5  $\mu\text{g}$ 、0.25  $\mu\text{g}$ 、0.125  $\mu\text{g}$  および陰性コントロールとして PBS を、4 週齢のメスの Balb/c マウス 1 群 8 匹に腹腔内投与した。投与後マウスの生死を 2 週間観察し、Read and Muench の方法 [58] で LD<sub>50</sub> を算出した。

マウス致死活性の抗 ArtAB 抗体を用いた中和試験を実施した。ArtAB 2  $\mu\text{g}$  と、ウサギ抗 ArtAB-IgG 100  $\mu\text{g}$  または陰性コントロールとして非免疫ウサギ IgG 100  $\mu\text{g}$  を混合し、37°C で一晩振とうした。1 群 8 匹の上述のマウスに、1 匹あたり ArtAB 2  $\mu\text{g}$  および IgG 100  $\mu\text{g}$  混合液を腹腔内投与し、2 週間生死を観察した。さらに、ArtAB におけるマウス致死活性の易熱性について調べるため、2  $\mu\text{g}$  の ArtAB を 100°C 30 分間加熱し、1 群 5 匹の上述のマウスに腹腔内投与して 2 週間生死を観察した。

#### (12) CHO 細胞集塊形成活性

CHO 細胞を用いた細胞凝集活性は Hewlett ら [26] の方法に準じて実施した。すなわち CHO 細胞をハム F-12 培地で  $6 \times 10^5$  個/ml に調整し、150  $\mu\text{l}$  をラブテックチャンバースライドシステム (Thermo scientific) のウェルに加えて 2 時間培養後、100 ng の ArtAB をウェルに加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した。陽性対照として 50 ng の百日咳毒素をウェルに加えたものと、陰性対照として PBS を加えたものを同時に



培養した。培養後、培養液を除去して PBS で洗浄後、メタノールをウェルに加えて 10 分固定した。メタノールを除去し、5% ギムザ染色液で 20 分間染色した。

#### (13) 赤血球凝集活性

赤血球凝集活性は Sato らの方法 [63] に従って実施した。鶏翼静脈より採血した血液を 2,000 rpm で 6 分間遠心後、PBS で洗浄し、最終濃度 0.7% (v/v) となるようにペレットを PBS で浮遊させ、赤血球浮遊液とした。マイクロタイタープレート (三光純薬、東京) を用いて、ArtAB をそれぞれ 16  $\mu$ g/ウェルから PBS で 2 倍階段希釈し、各希釈液 50  $\mu$ l と赤血球浮遊液 50  $\mu$ l を混合し、室温で 1 時間静置した。判定は、肉眼的に凝集が確認される最大希釈倍数をその凝集価とした。

#### (14) 末梢血白血球数および血中インスリン濃度の測定

Balb/c マウスのメス 4 週齢に、ArtAB を腹腔内投与し、3 日後に 50% グルコース 0.5 ml をマウスに腹腔内投与し、15 分後に採血した。採取した血液の一部を自動血球計算機 (シメックス、兵庫) により総白血球数を測定した。残りの血液は 2,000 rpm で 30 分間遠心し、血漿を分離した。得られた血漿についてマウスインスリン測定キット (森永生化学研究所、神奈川) を用いてインスリン濃度を測定した。

### 3. 結果

#### (1) PCR による *artAB* の検出

PCR により *S.Typhimurium* 545 株における *artAB* の保有状況を調べた結果、247 株から *artAB* が検出された (表 8)。このうち 242 株が PFGE I 型に属する株であり、残りの 5 株は II 型に分類された株であった。その他の PFGE 型には *artAB* は認められなかった。

#### (2) ArtAB の産生誘導および精製

*artAB* を有する DT104 U1 株を、MMC を添加して培養した培養上清を、アフゲルブルーカラムを用いて溶出した結果、ウエスタンブロッティングによりフラクション 7~14 中に ArtA が検出された。これらをプールしてハイドロキシアパタイトカラムを用いて溶出した結果、フラクション 4~8 に ArtA が検出された。これらを回収してプールし、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーを実施し、フラクション 15、16 に ArtA を検出した。この分画に SDS-PAGE により ArtA および ArtB の 2 種類のバンドが確認された (図 6A、B)。MMC を添加して 18 時間培養し、濾過滅菌した後の培養上清中の ArtAB 量を 100% とすると、2.0% の ArtAB が 3 種類のカラムクロマトグラフィー実施後に溶出され、菌液 800 ml から、57.8  $\mu$ g の ArtAB が得られた (表 9)。精製後の ArtAB は牛脳由来百日咳感受性 G 蛋白質を ADP-リボシル化し(図 7A)、CHO 細胞クラスター形成活性を示した(図 7B)。

#### (3) ArtAB の構造解析

精製後の ArtAB について、イオン交換カラムクロマトグラフィーを実施した結果、2つのピークが得られた (図 8A)。各ピークを回収し、SDS-PAGE で泳動した結果、

表 8 *S. Typhimurium* 545 株における *artAB* の保有状況

PFGE 型	陽性数/供試菌株数 (%)
I	242/248 (98%)
II	5/37 (14%)
III	0/2 (0%)
IV	0/36 (0%)
V	0/12 (0%)
VI	0/31 (0%)
VII	0/165 (0%)
VIII	0/13 (0%)
IX	0/1 (0%)

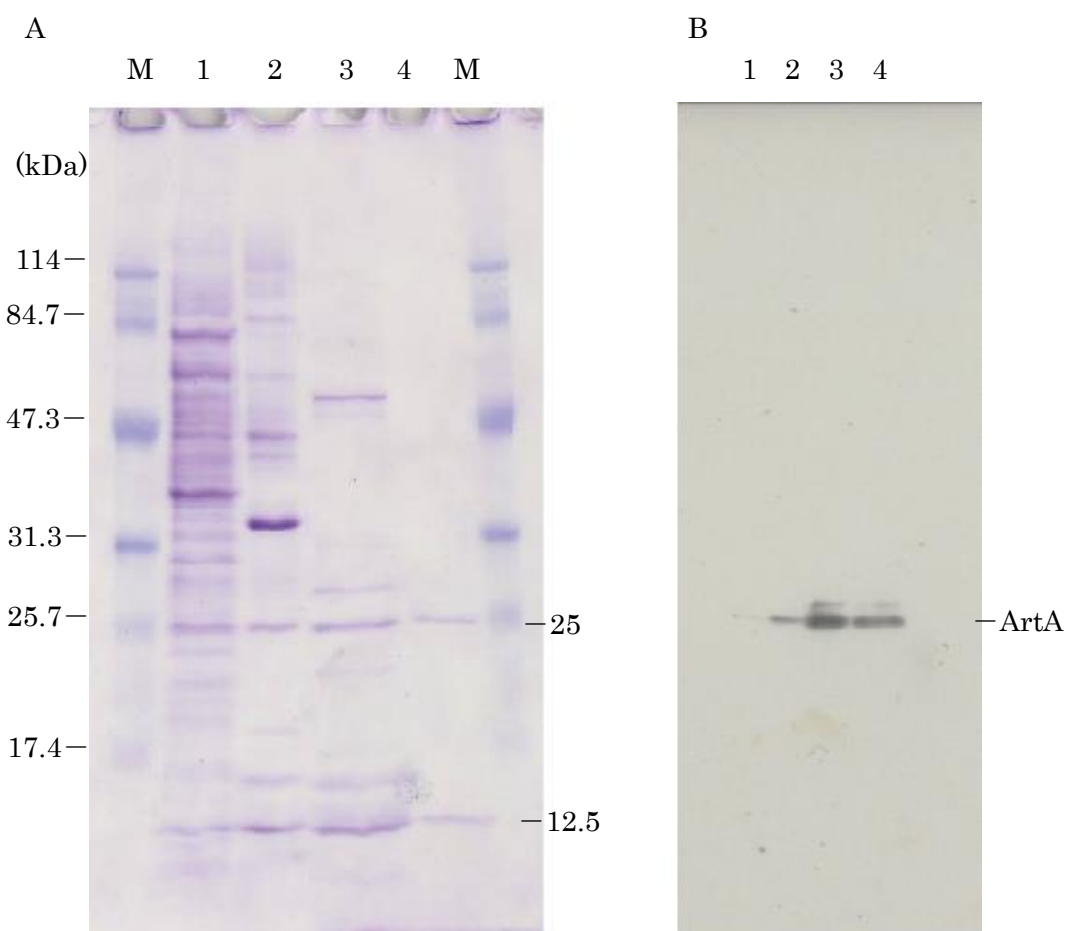


図 6 カラムクロマトグラフィー実施後の ArtAB SDS-PAGE 泳動像 (A) および抗 ArtA 抗体を用いたウエスタンブロッティング (B)

M: サイズマーカー, 1: DT104 培養上清, 2: ブルーゲルカラムクロマトグラフィー実施後, 3: ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー実施後, 4: 疎水性カラムクロマトグラフィー実施後

表9 各クロマトグラフィー実施後の ArtAB 量および回収率

精製段階	容積 (ml)	ArtAB 量 (mg)	ArtAB 回収率
MMC 刺激 DT104 培養上清	800	2.86	100%
ブルーゲルカラムクロマトグラフィー	12	0.385	13.5%
ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー	4	0.176	6.20%
疎水性カラムクロマトグラフィー	3	0.0580	2.00%

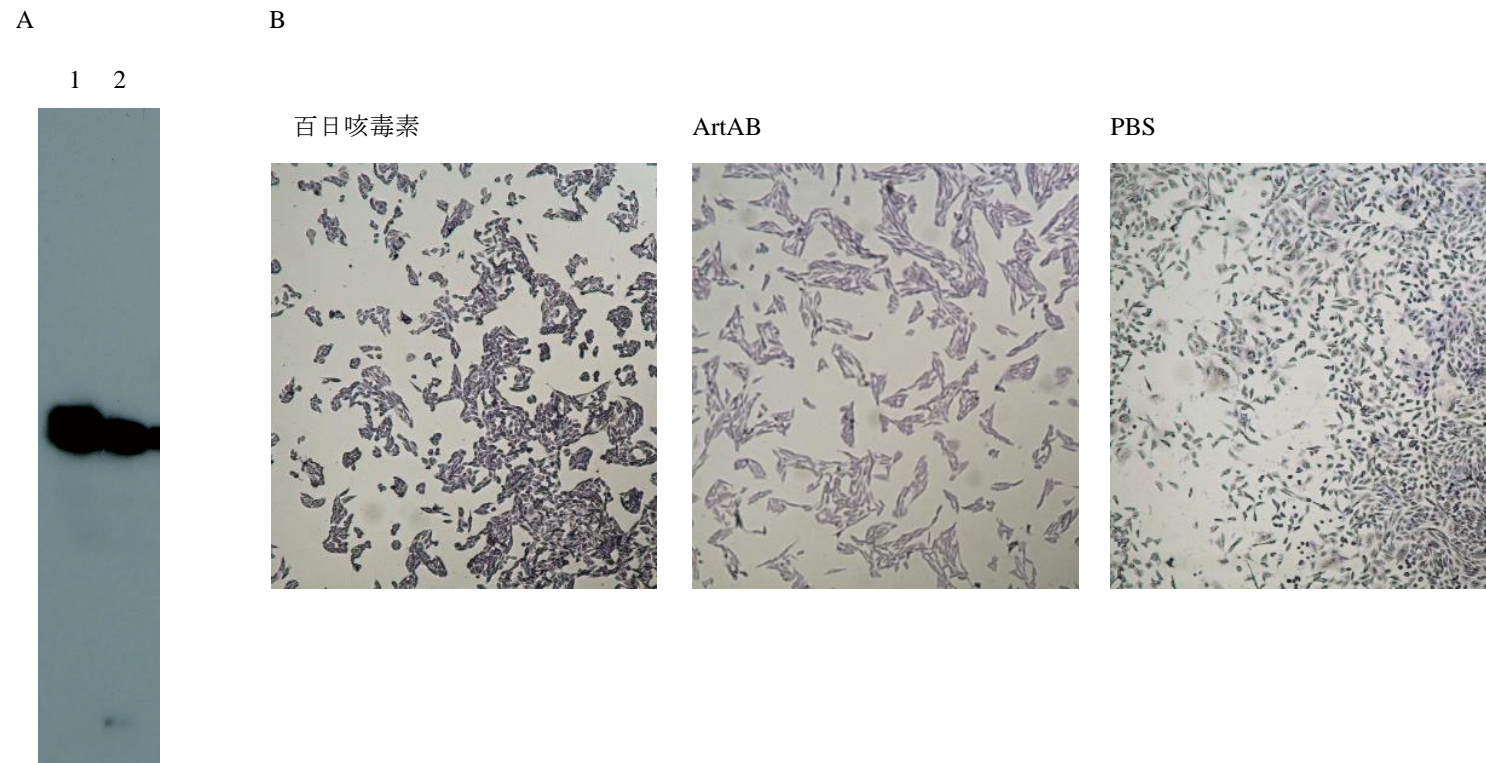


図7 ビオチン化タンパク質の検出による牛脳由来 G 蛋白質の ADP-リボシル化の検出(A)と CHO 細胞のクラスター形成 (B)

図 A : 1: 百日咳毒素, 2: ArtAB

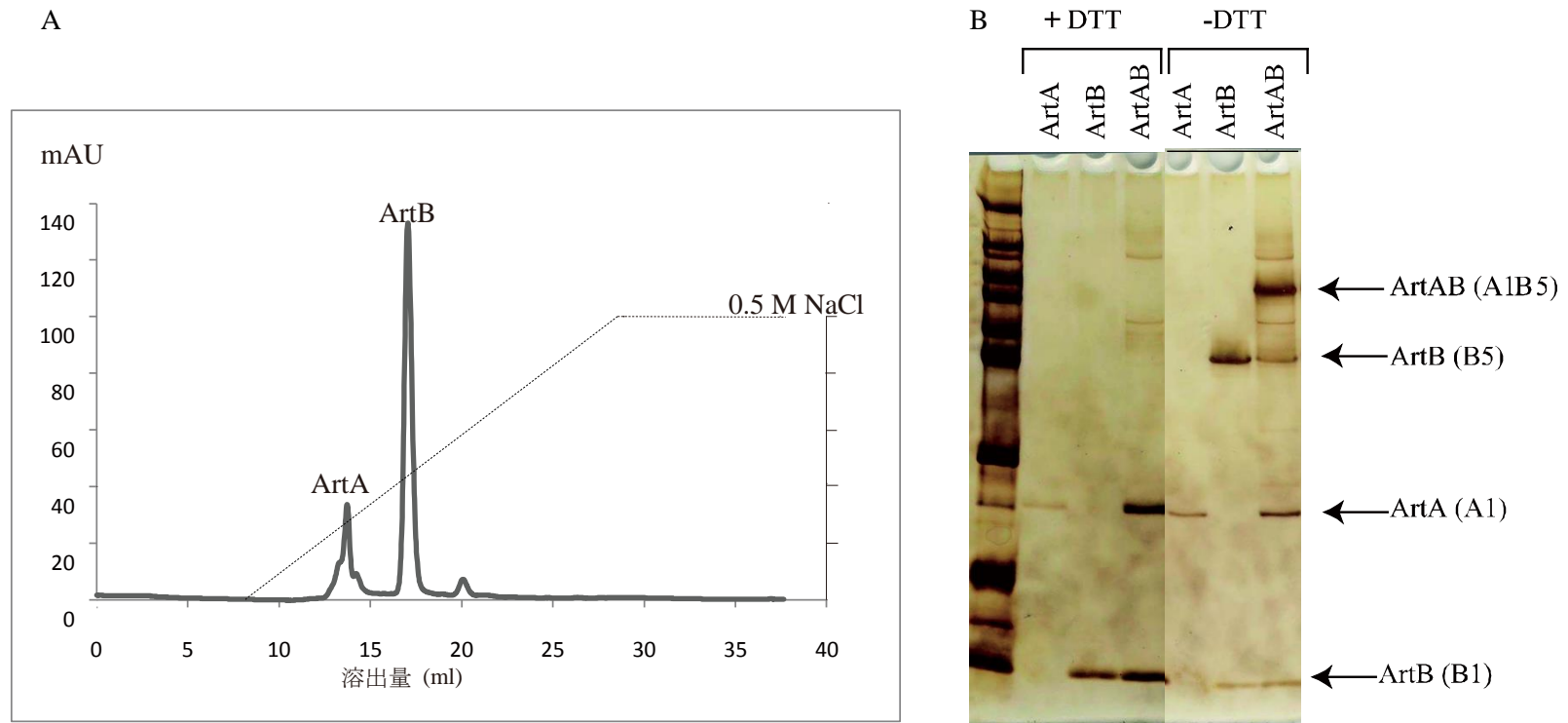


図8 イオン交換クロマトグラフィーによる ArtA および ArtB の分離 (A) と ArtA および ArtB の SDS-PAGE 泳動像 (B)

**A:** 0 M から 0.5 M までの NaCl を含む 30 mM Tris-HCl (pH 8.8) を用いたリニアグラジエント溶出法により ArtAB の A ユニットおよび B ユニートを溶出した。

**B:** イオン交換クロマトグラフィーにより得られたピークを DTT 添加(還元)および非添加(非還元)で SDS-PAGE で泳動した。バンドのサイズから想定されるユニット構造を右の括弧内に示した。

フラクション 14 に ArtA、フラクション 18 に ArtB が認められた (図 8B)。それぞれのフラクションの蛋白量を測定した結果、フラクション 14 は 29.8  $\mu\text{g}$ 、フラクション 18 は 75.1  $\mu\text{g}$  となった。A ユニットの分子量が 25 kDa、B ユニットの分子量 12.5 kDa であることから、A ユニットと B ユニットの分子数比は 1 : 5 と算出された。これらのフラクションをジチオトレイトール (DTT) 非添加で SDS-PAGE で泳動すると、ArtA では DTT 添加時と同じサイズのバンドが認められたが、ArtB では 5 個のサブユニットで構成されるペンタマー (B5) に相当する大きなサイズのバンドが観察された。精製 ArtAB を DTT 非添加で泳動すると、ArtA 1 個と ArtB5 個が結合したヘキサマー (A1B5) に相当するバンドが検出された。このバンドは B5 に相当するバンドよりさらに大きいサイズであった (図 8B)。

#### (4) マウスに対する致死活性

精製 ArtAB のマウスに腹腔内投与実験の結果、ArtAB の LD<sub>50</sub> 値は 0.2  $\mu\text{g}$ /匹となった。ArtAB を接種したマウスの生存曲線を図 9 に示した。0.125  $\mu\text{g}$ /匹接種群では死亡するマウスは認められなかった。一方で、0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ –1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  接種群では接種したマウス全てが死亡し、ArtAB の濃度依存的に死亡するまでの日数が短縮された。2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  接種群では 1 日後に 1 匹が死亡し、2 日後に 6 匹が死亡したが、1 匹が観察終了時まで生存した。ArtAB を抗 ArtAB 抗体で処理したサンプルを投与したマウスは全て生存し、対照群として非免疫ウサギ IgG で処理したサンプルを投与したマウスは全て死亡した。一方、ArtAB を 100  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間加熱したサンプルを投与したマウスは全て生存し、非加熱サンプルを投与したマウスは全て死亡した。

#### (5) ArtAB の赤血球凝集活性、インスリン分泌応答増強活性、白血球増多活性

精製した ArtAB は赤血球凝集能を示し、2  $\mu\text{g}$ /ウェル以上の濃度で凝集を示した (図 10)。血中インスリン濃度は、ArtAB の濃度に依存して上昇が認められ、ArtAB 0.3  $\mu\text{g}$



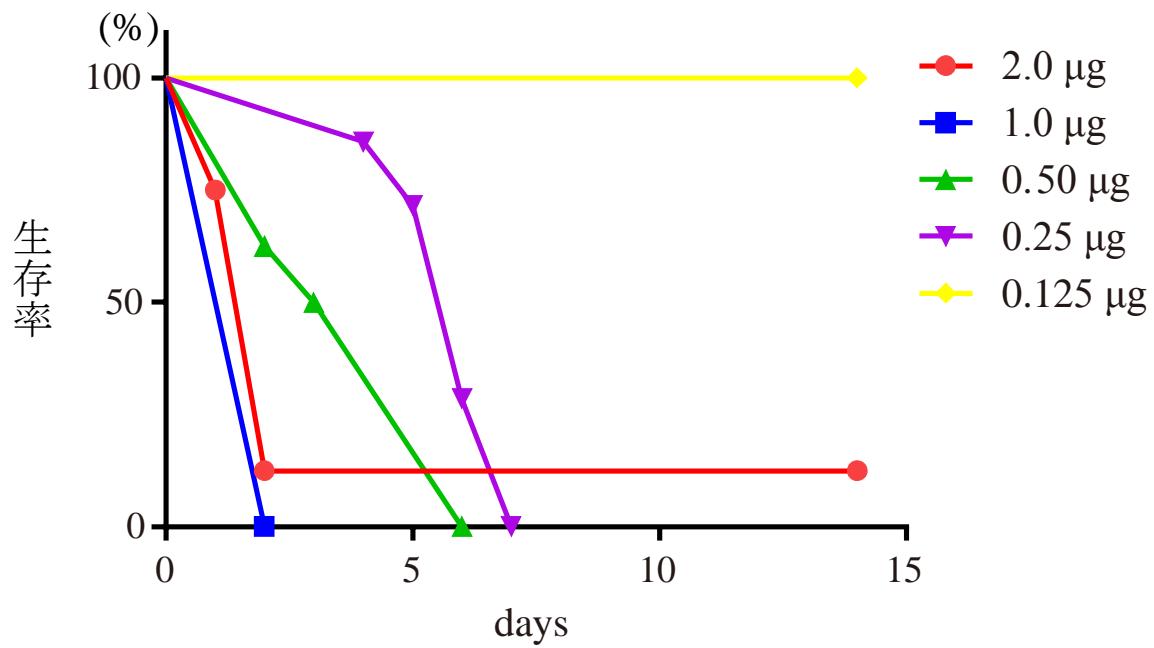


図9 ArtAB 接種群の生存曲線

精製した ArtAB 2 µg、1 µg、0.5 µg、0.25 µg、0.125 µg を、4 週齢のメスの Balb/c マウス 1 群 8 匹に腹腔内投与した。投与後マウスの生死を 2 週間観察し、生存率を図に示した。



図 10 ArtAB の赤血球凝集活性の測定

ArtAB をそれぞれ 16  $\mu\text{g}$ /ウェルから PBS で 2 倍階段希釈し、各希釈液 50  $\mu\text{l}$  と赤血球浮遊液 50  $\mu\text{l}$  を混合し、室温で 1 時間静置した。

接種群で、PBS 接種群と比較して有意な上昇が認められた ( $p<0.05$ ) (表 10)。総白血球に関しては、全群で有意差は認められなかった ( $p>0.05$ ) (表 10)。

表 10 ArtAB 接種群の末梢血中の白血球数およびインスリン濃度

毒素接種量 ( $\mu\text{g}/\text{匹}$ )	総白血球数 ( $10^3/\mu\text{l}$ ) $\pm$ SD	血中インスリン濃度 (ng/ml)
DT104-ArtAB		
0.3	4.91 $\pm$ 4.53	1.46 $\pm$ 0.3 *
0.2	5.83 $\pm$ 1.86	0.49 $\pm$ 0.11
0.1	8.42 $\pm$ 4.03	0.65 $\pm$ 0.18
0.02	6.22 $\pm$ 2.41	0.46 $\pm$ 0.11
PBS		
	6.74 $\pm$ 3.66	0.33 $\pm$ 0.05

\*p<0.05

#### 4. 考察

第 I 章で、1992 年以降成牛のサルモネラ症増加とともに牛からの分離数が増加した PFGE I 型が、DT104 に型別される株およびその近縁株で構成されることを明らかにした。本章では、DT104 が産生することが報告されている *ArtAB* の性状を解析した。PFGE I 型において *artAB* は、98 % (242/248) の株が保有しており、II 型においては 14 % (5/35) で、その他の型では検出されなかった。これらのことから、*artAB* は、I 型菌に特徴的な遺伝子であることが示唆された。I 型に属する DT104 が特異的に保持する 162-bp amplicon と *artAB* の保有状況と比較すると、162-bp amplicon 保有株であっても *artAB* を保有しない株 (243 株中 6 株) が存在し、一方で、162-bp amplicon 非保有株であっても *artAB* を保有する株 (302 株中 10 株) が存在し、162-bp amplicon と *artAB* の分布は完全には一致しなかった。また、II 型の一部の株でも *artAB* の保有が認められることから、*artAB* 保有株のほとんどが DT104 であるが、DT104 以外の株でも *artAB* を保有し得ることが示された。これらのことから、*artAB* は溶原ファージ上にあることが報告されている [61] が、ファージを介した水平伝播により II 型菌が *artAB* を獲得した可能性が考えられる。しかし、一方では、1917 年にフランスにおいて食中毒の原因菌として分離された NCTC73 株が当該遺伝子を保有することも報告されている [61]。この株の PFGE プロファイルは PFGE I 型には分類されない。DT104 は前述のように 1986 年に初めて英国で分離された菌である。これらのことから、古くから一定の割合で *artAB* を保有する *S. Typhimurium* が存在していたことが考えられ、DT104 は *artAB* をこの時期に水平伝播により新たに獲得して出現したものである可能性も考えられる。これらのことは、DT104 の由来を推測する上で興味深い。

DT104 U1 株の MMC 処理で得られた培養上清についてブルーゲルカラムクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーを実施することにより *ArtAB* を精製することができた。精製後の *ArtAB* は G 蛋白質の ADP-リボシル化能および CHO 細胞クラスター形成活性が

認められ、MMC を添加した DT104 培養上清に認められる活性 [79] は、ArtAB によるものであることが証明された。本章で実施したカラムクロマトグラフィーは、百日咳毒素の精製方法で報告されている方法とほぼ同様のものであり [65, 69, 83]、ArtAB も百日咳毒素と同様に、アフィゲルブルーおよびヒドロキシアパタイトに吸着する性質を持つことが示された。しかし、本章で実施した精製方法では培養上清からの回収率がわずかに 2%であったことから、今後、より効率的な精製方法を検討する必要がある。

イオン交換カラムクロマトグラフィーにより、ArtA および ArtB を分離することが可能となった。溶出した ArtA および ArtB のモル比が 1:5 となったことから、ArtAB は ArtA 1 分子対 ArtB 5 分子で構成されるヘキサマーであることが明らかになった。このことは、DTT による処理を行わない非還元処理条件で調整した精製 ArtAB の SDS-PAGE を実施した結果によっても確認された。すなわち、ArtB 分画の泳動では、ArtB 5 分子に相当するバンドが見られ、分画前の精製 ArtAB では ArtA 1 分子と ArtB 5 分子が結合した蛋白に相当するバンドが認められた。細胞の中に入って作用を発揮する細菌毒素には AB 毒素と呼ばれるものが多く、毒素活性を示す A ユニットと細胞のレセプターに結合する B ユニットで構成される [38]。百日咳毒素は A ユニットに相当する ADP-リボシル化毒素 (S1) と 5 分子 {S2、S3、S4 (2 分子)、S5} の B ユニットからなるヘキサマーで構成される [71]。コレラ毒素や大腸菌の易熱性毒素の場合、A ユニットと一種類の B ユニット 5 個が結合したヘキサマーであり、これらの毒素は A1B5 型毒素ファミリーと呼ばれている [38]。本章における実験結果から、ArtAB も A1B5 型毒素であることが明らかとなった。百日咳毒素には A ユニットに相当する S1 に 1 つ、B ユニットの構成する S4 および S5 に 2 個、S2 および S3 に 3 個のジスルフィド結合が含まれている [71]。一方、ArtAB においては ArtA に 2 個、ArtB に 5 個のシステインが存在しており、百日咳毒素と同様にジスルフィド結合を形成し、毒素複合体を構成している可能性が考えられる。

精製後の毒素をマウスに接種した結果、致死活性を示し、LD<sub>50</sub>は0.21 µg/匹となった。致死活性は、特異抗体による中和および100°C、30分間の加熱で失活したことから、この活性はArtABによる作用であることが確認された。4週齢のBalb/cマウスの体重を約15gとすると、百日咳毒素のマウスに対するLD<sub>50</sub>値は、腹腔内投与で0.23~0.32 µg/匹であることが報告されており [13]、ArtABはこれとほぼ同等の致死活性を示しているものと考えられる。百日咳毒素は、インスリン分泌応答増強活性、赤血球凝集活性、白血球増多活性等の生物活性を有していることが知られており [36, 83]、本章ではArtABにおけるこれらの活性について解析した。その結果、ArtABはインスリン分泌応答増強活性を示した。ラットを用いた実験では、百日咳毒素接種後に血中インスリン濃度が約3.8倍に上昇することが報告されており [84]、ArtABにおける結果とほぼ一致した。また、*Bordetella pertussis* 全菌体ワクチンを接種したマウスでも、同様の結果が報告されている [25]。赤血球凝集活性は2 µg/ウェル以上の濃度でArtABにおいても認められたが、百日咳毒素の場合 (125 ng/ウェル以上 [55]) と比較すると低活性であった。また、百日咳毒素と異なりArtABには白血球増多活性が認められなかった。以上のことから、ArtABは百日咳毒素と類似した活性を有するが、活性の強さは異なっており、また、百日咳毒素と比較して、ArtABにおいては欠如している活性もあることが明らかとなった。CHO細胞においては、百日咳毒素はGai-2およびGai-3をADP-リボシル化の基質とし、Gai-2をより強くADP-リボシル化する。一方でArtABを含む培養上清では、Gai-3をより強くADP-リボシル化することが明らかにされている [79]。このような標的となるG蛋白質の違いが、百日咳毒素とArtABの生物活性の違いを反映している可能性が考えられる。また、赤血球凝集活性は、百日咳毒素のBユニットに起因した活性であると考えられており [63]、ArtABにおいても同様であることが推測される。ArtABのBユニットと、百日咳毒素のBオリゴマーを形成する分子のアミノ酸配列の相同性は低く、このことが赤血球凝集活性の強さに影響している可能性が考えられる。

以上、本章では、I型菌のほとんどが *artAB* を保有していることを明らかにし、その遺伝子産物である ArtAB の精製方法を確立した。ArtAB が精製されたことにより、その構造および活性を解析することが可能となり、ArtAB が他の多くの ADP-リボシル化毒素と同様に A1B5 の構造を成していること、および ArtAB のマウスに対する致死活性等いくつかの生物活性を明らかにした。百日咳毒素の生物活性についてはよく知られているが、百日咳症における百日咳毒素の病原性因子としての役割については必ずしも明らかにされていない。マウスに百日咳毒素欠損変異株を感染させると、感染成立後、変異株は野生株よりもすみやかに肺から消失する [14]。このことから、百日咳毒素は百日咳菌の感染後期において、感染維持に関与する因子であることが推測されている [14]。成牛型サルモネラ症から高頻度で分離される多くの PFGE I 型菌において、*artAB* が検出されることから、ArtAB が本菌の病原因子となっている可能性が考えられる。しかし ArtAB の病原因子としての役割を解明するためには、*artAB* 欠損株の作成等、更なる遺伝学的解析が必要である。本章の調査で、I 型菌のみならず、II 型菌においても *artAB* の保有が認められた。他の PFGE 型や他の血清型にもこの遺伝子が伝達する可能性も懸念され、今後、分離菌における *artAB* の保有状況をモニタリングする必要がある。



## 5. . 小括

牛由来 545 株について *artAB* 遺伝子保有状況を解析した結果、DT104 に型別される株を含む I 型菌の 98% (242/248) と、II 型に属する 14% の分離株 (5/37) が当該遺伝子を保有しており、他の PFGE 型菌においては検出されなかった。遺伝子産物である ArtAB はカラムクロマトグラフィーを実施することにより精製することができた。精製 ArtAB を用いて解析した結果、ArtAB は百日咳毒素と同様に A ユニット 1 つと B ユニット 5 つで構成されることを明らかにした。精製 ArtAB をマウスに腹腔内接種すると致死活性が認められ、その LD<sub>50</sub> は 0.21 µg/匹であった。また、ArtAB は百日咳毒素と同様に、赤血球凝集活性およびインスリン分泌亢進活性を示したが、白血球増多活性が欠如している点が異なっていた。以上の結果から、ArtAB は百日咳毒素に類似した毒素であり、DT104 における病原因子の一つである可能性が示唆された。

第IV章 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium PFGE VII型菌が保有する薬剤耐性病原性プラスミドの性状解析

## 1. 序文

第 I 章で、北海道内の牛由来 *S. Typhimurium* の PFGE 型の経年変化を解析し、1992 年以降に I 型菌、2000 年以降に VII 型菌の分離数が増加したことを明らかにした。VII 型は現在最も多く分離される遺伝子型であり、DT104 に型別されず、*artAB* を保有しない。多くの株が多剤耐性であり、それらの株は複数の薬剤耐性遺伝子を含んだ 95-130kb の血清型特異的病原性プラスミド (薬剤耐性病原性プラスミド) を共通に保有している。このうち 1 株は、第 3 世代セファロスポリンである CTX に耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドの他に、*bla<sub>CMY-2</sub>* を含むプラスミドを保有する。2000 年以降、北米においても VII 型と類似した PFGE、MLVA および薬剤耐性プロファイルを示す株が牛および人から分離されている [9]。それらの株の多くは第 3 世代セファロスポリンである CAZ に耐性を示しており、*bla<sub>CMY-2</sub>* を含むプラスミドを保有することが報告されている [2]。このことから、我が国でも北米での分離株と同様に、第 3 世代セファロスポリン耐性株の増加が危惧される。

本章では、2000 年以降の流行株である VII 型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミドおよび CTX 耐性株が保有する *bla<sub>CMY-2</sub>* プラスミドの構造を解析し、VII 型菌の遺伝学的性状を明らかにするとともに、VII 型菌の薬剤耐性獲得のメカニズムを検討した。

## 2. 材料および方法

### (1) 使用菌株

薬剤耐性病原性プラスミド保有VII型菌である *S. Typhimurium* KST161、KST262、および TST207 (CTX 耐性)を用いた。

### (2) プラスミドの抽出と全塩基配列決定

第 I 章で得られた薬剤耐性プラスミドで形質転換された大腸菌 TF-KST161、TF-KST262、TF-TST207-1、TF-TST207-4 からアルカリ-SDS 法によりプラスミド DNA を分離し、それらのドラフトシーケンスを外部委託 (北海道システムサイエンス)し、作成した。シーケンスは Roche FLX System (ロシュダイアグノスティックス) により実施した。塩基配列のアセンブリには GS De Novo Assembler (Roche Applied Science) を用いた。コンティグ間のギャップは Takara LA Taq polymerase (タカラバイオ) を用いて PCR で増幅した。塩基配列データに対するアノテーションは DDBJ Microbial Genome Annotation Pipeline ver.1.06 (<https://migap.lifesciencedb.jp/mgap/jsp/index.jsp>) を用いて実施した。ゲノム配列の比較に Artemis Comparison Tool (ACT) (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/act/>) を用いた。

### (3) プラスミド接合伝達試験

供与株として KST161、KST262、および TST207 を用いた。受容株として *E. coli* C600 NA 耐性 (Nal<sup>r</sup>) を用いて実施した。供与株および受容株を LB 液体培地により 37°C でそれぞれ一晩静置培養した後、供与株培養液 0.5 ml と受容株培養液 4.5 ml を混合した菌液を 37°C で 8 時間静置培養し、薬剤含有 (NA 30 µg/ml と ABPC 10 µg/ml、または NA 30 µg/ml と CEZ 30 µg/ml) Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose (DHL) 培地 (栄研、東京) に接種し、37°C 24 時間培養後、接合伝達株を選択した。

### 3. 結果

#### (1) 薬剤耐性病原性プラスミドの解析

KST161 および KST262 の保有する薬剤耐性病原性プラスミドをそれぞれ pYT1 および pYT2 とし、全塩基配列を決定した (pYT1: GenBank accession no. AB576781、pYT2: GenBank accession no. AB605179)。シーケンスの結果、pYT1 の大きさは 112,670 bp で pYT2 は 132,842 bp であった。pYT1 および pYT2 の形質転換株は ABPC、SM、SUL、TC、KM に耐性を示した。pYT1 および pYT2 は、*S. Typhimurium* LT2 株の血清型特異的病原性プラスミド pSLT (GenBank accession no. AE006471) と高い相同性を示す領域と薬剤耐性遺伝子を含む挿入領域 (pYT1: 32,495 bp、pYT2: 52,666 bp) で構成されており、挿入領域の両端には *IS1294* が存在していた (図 9)。挿入領域は、pYT1 および pYT2 とともに補体抵抗性に関与する外膜蛋白遺伝子 *srgB* の 3'末端と、プラスミドの維持に関連する遺伝子 (toxin-antitoxin system) *ccdA* の上流に存在するノンコーディング領域の間に存在していた (図 9)。*srgB* から *ccdA* 上流ノンコーディング領域の間に存在していた *srgB* の一部、*srgB* とともに補体抵抗性に関連するジスルフィド酸化還元酵素遺伝子 *srgA*、線毛形成に関連する *pef* オペロン (*pefIDCAB*)、プラスミド複製関連遺伝子 *IncFIB/repA2* を含む 14 kb の領域が欠失し、挿入領域に置き換わっていた。pYT1 および pYT2 はほぼ同一の薬剤耐性領域 (Right region) を有しており、当該領域は pYT1 では 32,495 bp (position 3,129–35,623)、pYT2 では 31,651 bp (position 24,140–55,790) であった (図 9)。pYT2 ではさらにその上流に、Left region (21,015 bp; position 3,125–24,139) が存在していた (図 9)。

pYT1 および pYT2 の Right region は、*S. Dublin* 由来薬剤耐性プラスミド pSD88 (GenBank accession no. JF267652) の一部と高い相同性を示すが、pSD88 においては、*aadA1*、*qacEA1*、*sul1* は存在しない (図 10)。pYT1 および pYT2 において、右端の *IS1294* の下流に 648-bp の配列が存在し、*S. Typhimurium* pU302L (GenBank accession

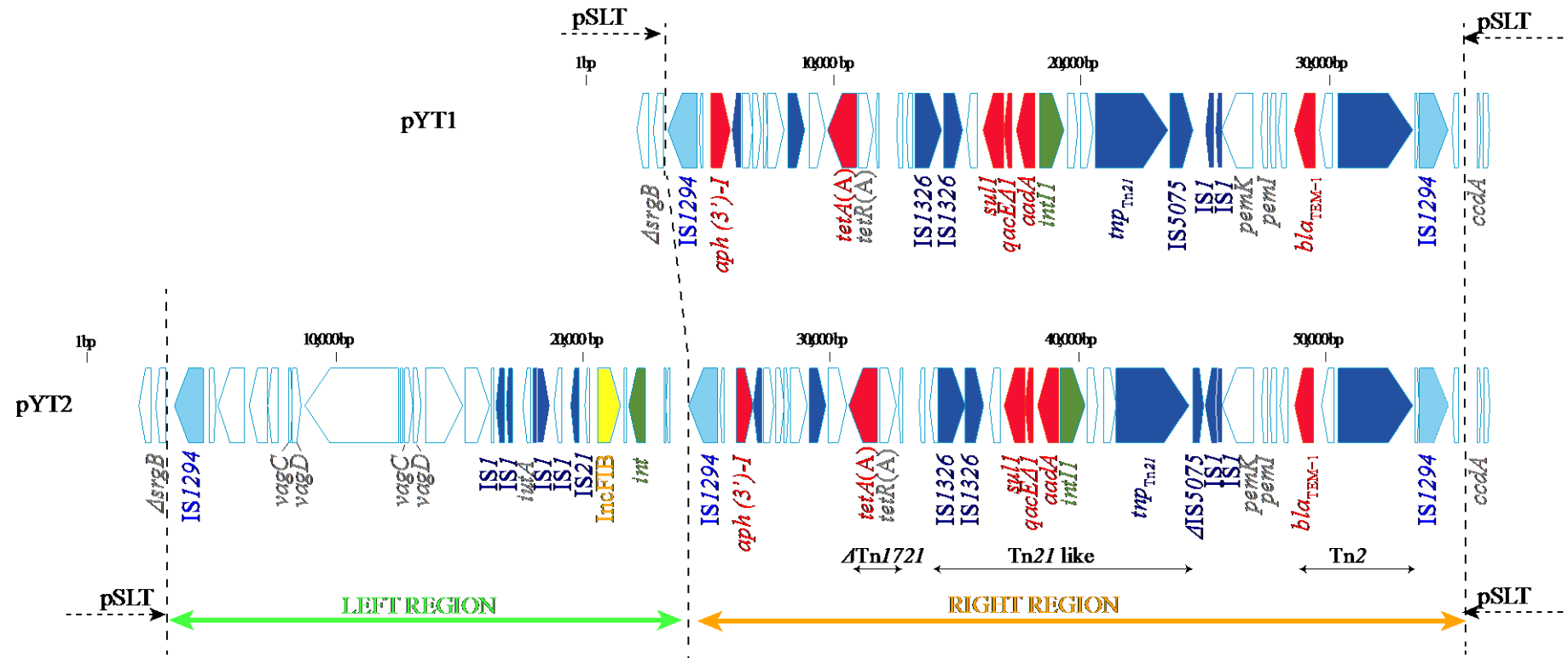


図 11 pYT1 および pYT2 の挿入領域のマップ

薬剤耐性遺伝子を赤、IS1294 トランスポザーゼを水色、その他のトランスポザーゼを紺色、プラスミド複製遺伝子を黄色、インテグラーゼを緑色で示した。黒い矢印はモバイルエレメントを表し、マップの下部の緑色および橙色の矢印はそれぞれ Left region および Right region を示す。破線矢印は pSLT 由来と考えられる領域を示し、挿入領域との境界をマップに垂直な破線で示した。

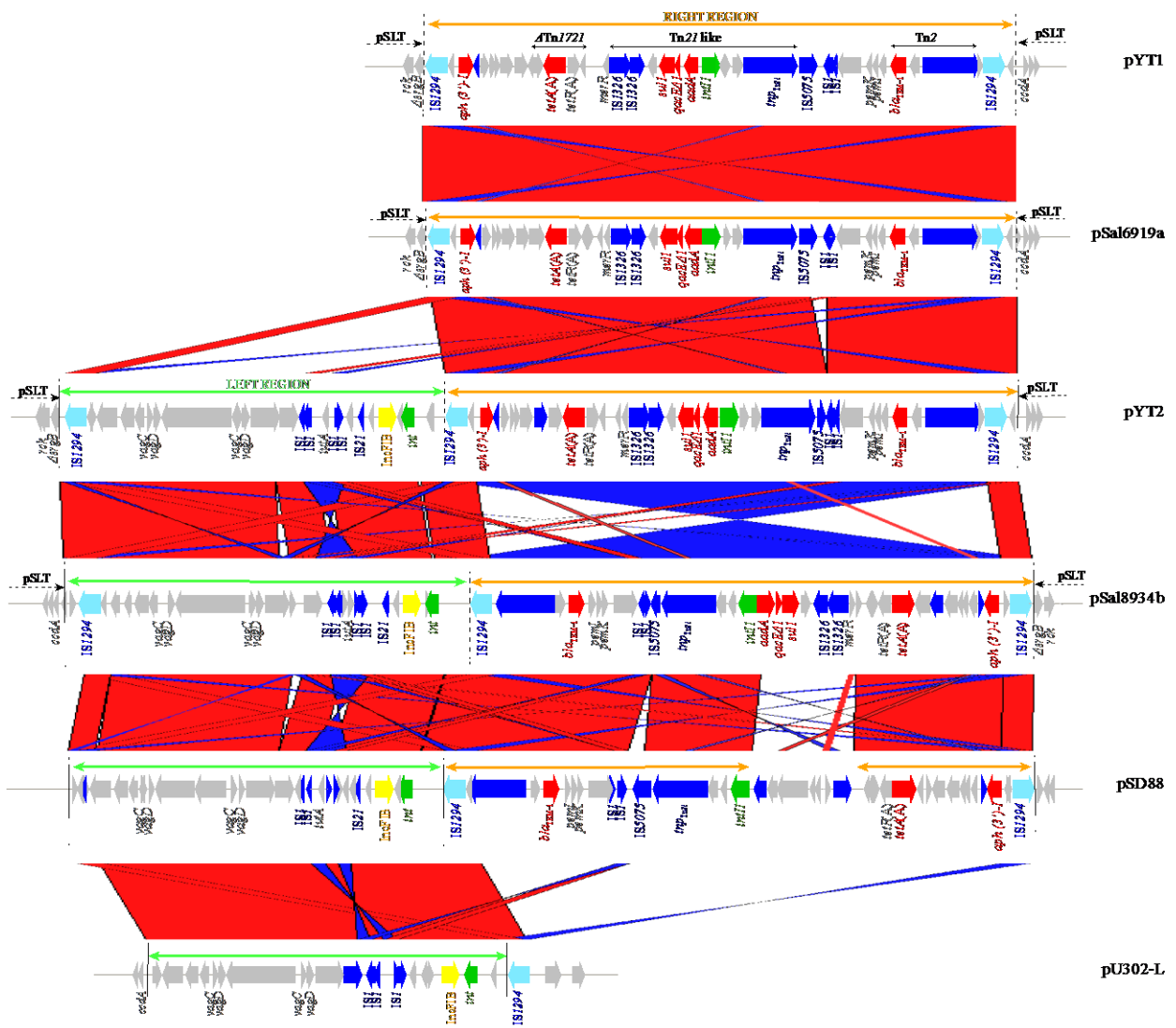


図 12 pYT1 および pYT2 と関連するプラスミド (pSal6919a, pSal8934b, pSD88, pU302-L) における相同性領域の比較

blastn による比較を ACT により作図した。薬剤耐性遺伝子を赤, IS1294 トランスポザーゼを水色, その他のトランスポザーゼを紺色, プラスミド複製遺伝子を黄色, インテグラーゼを緑色で示した。各プラスミドのマップの直上の黒い矢印はモバイルエレメントを示し、さらに上部の緑色と橙色の矢印はそれぞれ Left region および Right region を示す。破線矢印は pSLT 由来と考えられる領域を示し、挿入領域との境界をマップに垂直な破線で示した。それぞれのマップの間の赤色のバーは塩基配列の一致を示し、青色のバーは逆方向に一致していることを示す。

no. NC 006816) および pSD88 が保有する IS1294 の下流に存在する配列とそれぞれ 100% および 99% (1 塩基不一致) の相同性を示した。

Left region は pYT2 にのみ存在し、pU302L、pSD88 の一部の配列と高い相同性を示した。Left region にはプラスミドのメンテナンスに関わる遺伝子 (*vagC*, *vagD*)、IncFIB レプリコン、IS1 に挟まれた鉄取り込み能関連遺伝子 (*iutA*) が存在していた。挿入領域内の IncFIB レプリコンは allele B1 (GenBank accession no. AJ851089) と 100% 一致し、pSLT が保有する IncFIB/*repA2* (allele B17; GenBank accession no. AE006471) [81] とは異なっていた。

## (2) *bla*<sub>CMY-2</sub> プラスミドの解析

TST207 は *bla*<sub>CMY-2</sub> プラスミド (pYT3) と薬剤耐性病原性プラスミド (pYT4) を保有していた。pYT4 の大きさは約 110 kb であり、pYT1 とほぼ同一の薬剤耐性領域を保有していた (GenBank accession no. AB723628)。pYT3 (GenBank accession no. AB591424) は 121,723 bp であり、*bla*<sub>CMY-2</sub> の他に 5 つの薬剤耐性遺伝子を *floR* 領域および *bla*<sub>CMY-2</sub> 領域の 2 カ所の薬剤耐性領域上に保有していた (図 11)。*floR* 領域には、フロルフェニコール耐性遺伝子 (*floR*)、*tetA(A)*、STR 耐性遺伝子 (*strA*, *strB*)、SUL 耐性遺伝子 (*sul2*) が含まれていた (図 11)。*bla*<sub>CMY-2</sub> は、トランスポサーゼ遺伝子 (*ISEcp1*)-*bla*<sub>CMY-2</sub>-外膜リポタン遺伝子 (*blc1*)-薬剤排出システム関連遺伝子 (*sugE1*) で構成されるトランスポゾン様構造に含まれていた (図 11)。

pYT3 の大部分は大腸菌由来 *bla*<sub>CMY-2</sub> 保有 IncA/C プラスミド pAR060302 (166,530 bp)、*S. Newport* 由来 *bla*<sub>CMY-2</sub> 保有 IncA/C プラスミド pSN254 (176,473 bp)、および Shahada ら [67] により報告された、VII型菌の染色体上の薬剤耐性領域 genomic island GI-VII-6 (125,122 bp) と高い相同性を示した。GI-VII-6 はVII型菌の CEZ 耐性株 26 株のうち 22 株が保有することが報告されており、pAR060302 と高い相同性を示す [67]。pYT3 の 77.2% の領域が pAR060302 の一部と 99% の相同性 (7 bp の不一致) を示し





た (図 11)。pAR060302 と相同性を示さない領域 (24,207 bp; position: 92,306 bp - 116,512 bp) は、IncFIB レプリコン (allele B1) を含み、両端に IS1294 を保有していた。この領域は pYT2 の Left region と高い相同性を示した。pYT3 は上述の様に IncA/C プラスミドと高い相同性を示すが、IncFIB 以外の複製関連遺伝子は認められなかった。

### (3) 接合伝達試験

pYT1 および pYT2 の接合伝達性は認められなかった。pSLT は接合伝達性を有していることが報告されており [3]、pYT1 および pYT2 も pSLT と同一の接合伝達関連遺伝子の保有が認められるが、接合伝達関連遺伝子のうちのひとつである *traD* の一部が欠失していた (データ示さず)。

pYT3 は接合伝達に必要なとされる *tra* 遺伝子群の多くを保有していたが、他の *bla<sub>CMY-2</sub>* 保有 IncA/C プラスミド上に認められる *trhF*、*traW*、*traU* を欠失しており、*E. coli* C600 への接合伝達性は認められなかった (図 11)。

#### 4. 考察

PFGE VII型菌のほとんどが多剤耐性を示し、薬剤耐性病原性プラスミドを共通に保有している。VII型菌の薬剤耐性病原性プラスミドの多くが、110 kb または 130 kb であるため、本章では、これらの 110 kb および 130 kb のプラスミドの全塩基配列を決定し、構造を明らかにした。110 kb のプラスミド pYT1 および 130 kb のプラスミド pYT2 は、大部分が *S. Typhimurium* 血清型特異的病原性プラスミド pSLT と高い相同性を示した。しかし、pYT1 および pYT2 では、pSLT に存在する *IncFIB/repA2* を含む約 14 kb の領域が欠損しており、外来の遺伝子領域に置き換わっていた。同様の構造を成すプラスミドがいくつか報告されており、pUO-StVR2 [23]、pSTMDT12 [33]、pSLT-BT [37] は、pSLT 由来と思われる領域とそれぞれ由来の異なる遺伝子領域で構成されている。pUO-StVR2 保有株はスペインで 1993 年に同定され、その後イギリスでも分離されている [24]。pUO-StVR2 は *vagCD* 領域および薬剤耐性領域を含む 46,066 bp の配列を保有する [23]。pUO-StVR2 における外来遺伝子領域の挿入部位は *pefI* と *ccdA* の間であり、pYT1 および pYT2 とほぼ同位置である。pUO-StVR2 において *pefI-ccdA* 間の配列は失われており、この領域に存在するプラスミド複製に関わる遺伝子 *IncFIB/repA2* も脱落している [23]。pYT1 および pYT2 もこれと同様に *IncFIB/repA2* を欠失しているが、pYT2 は *IncFIB* レプリコンを *Left region* に新たに獲得している。pSLT には本来 2 つの複製関連遺伝子が存在し [60]、pYT1 ではもう一方の *IncFIIA/repA* が存在するために、プラスミドの複製が可能となっていると考えられる。pUO-StVR2、pSTMDT12、pSLT-BT では、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子を含む領域が *IS26* を介して挿入されている [23, 33, 37]。pYT1 および pYT2 においては外来遺伝子領域の両端に *IS1294* が認められたことから、*IS1294* を介した遺伝子領域の獲得が起こったことが推測される。pYT2 の *Left region* は pSD88 および pU302-L に存在する配列と高い相同性を示し、さらに *Right region* は pSD88 の薬剤耐性領域と類似していることから、pYT1 および pYT2 の挿入領域が pSD88 および pU302-L に由来することが考えられ

る。また、pSD88 および pU302-L は *IS1294* を保有しており、その下流の塩基配列も pYT1 および pYT2 の塩基配列と相同性を示したことから、*IS1294* を介した遺伝子領域の挿入とともに、逆位や組み換えが生じたことが考えられた。pSLT は接合伝達能を有するが [3]、pYT1 および pYT2 では認められなかった。接合伝達能の認められない病原性プラスミドとしては、*S. Typhimurium* SL1344 株が保有するプラスミド pSLT\_SL1344 (GenBank accession no. HE654724) が報告されている [3]。pSLT\_SL1344 においては、*traD* の一部に欠失が認められるが、それ以外の全塩基配列が pSLT と 100%一致しており、*traD* の一部の欠失が接合伝達能の欠如の原因であることが推測される。pYT1 および pYT2 が保有する *traD* の配列は、pSLT\_SL1344 の当該配列と 100%一致していたことから、pYT1 および pYT2 においても *traD* の一部の配列の欠失により、接合伝達能が欠落したものと考えられた。pYT2 では、薬剤耐性遺伝子群に加え、鉄取り込みに関連した病原性遺伝子 *iutA* が含まれていた。pSLT は遺伝子交換のプラットフォームとしての機能を持ち、環境中の他の菌からの遺伝子獲得を促進すると考えられている [60]。薬剤耐性と病原因子が同一のプラスミド上に存在することで共選択され、より病原性の強い薬剤耐性菌が選択されたために、VII型菌が流行した可能性も考えられる。

BLAST 解析により、pYT1 は pSal6919a (GenBank accession no. JF274991) と 99% の相同性を示し (3 bp の不一致)、pYT2 は一部の配列に逆位が生じているものの、pSal8934b (GenBank accession no. JF274992) と 99% の相同性を示した (218 bp の不一致) (図 10)。pSal6919a および pSal8934b は海外の研究者により登録された *S. Typhimurium* 由来のプラスミドであり、pYT1 および pYT2 と類似した薬剤耐性病原性プラスミドが海外でも分離されていることが判明した。120 kb のプラスミド pYT3 は、pYT1 とほぼ同じ構造を持つと考えられる薬剤耐性病原性プラスミド pYT4 とともに共存していた。pYT3 の大部分が IncA/C プラスミドである pAR060302 と高い相同性を示していたが、pYT3 においては IncA/C レプリコンは認められなかった。pYT3 に

は pYT2 の Left region と高い相同性を示す領域が存在し、IncFIB レプリコンを含んでいた。このことから、pYT3 は IncA/C プラスミドの複製関連遺伝子を含む領域が欠失し、pYT2 様プラスミド由来の IncFIB レプリコンを含んだ領域が挿入されて生じたものと推測された。一方で、pYT3 は染色体上の薬剤耐性領域 GI-VII-6 とも高い相同性を示す。GI-VII-6 保有株は CTX を含む培養条件下で CTX 耐性を獲得し、CTX 耐性を獲得した株においては、GI-VII-6 全体または *bla<sub>CMY-2</sub>* を含む部分的な配列の増幅が認められる [41]。このような増幅は染色体上のみならず、プラスミド上にも認められる [41]。これらのことから、pYT3 が染色体上の GI-VII-6 に由来している可能性も考えられた。

以上、本章では VII 型菌に特徴的な薬剤耐性病原性プラスミドの構造を明らかにし、VII 型菌の薬剤耐性獲得のメカニズムの一端が解明された。近年、福島県で牛から第 3 世代セファロスポリン耐性 *S. Typhimurium* が分離され、*bla<sub>CMY-2</sub>* を含む伝達性の IncA/C プラスミドの保有が認められた [72, 73]。このプラスミドは非伝達性の pYT3 とは明らかに異なるものであるが、pYT3 と同様に *bla<sub>CMY-2</sub>* を含むことから、*bla<sub>CMY-2</sub>* プラスミド保有 *S. Typhimurium* の全国的な拡散が懸念される。

## 5. 小括

PFGEⅦ型菌が保有するプラスミドの構造を解析した。Ⅶ型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミド pYT1 および pYT2 の全塩基配列を決定した結果、これらは *S. Typhimurium* 血清型特異的病原性プラスミドに、ABPC、SM、SUL、TC、KM 耐性遺伝子を含む領域が挿入されて構成されていた。pYT2 では薬剤耐性遺伝子領域に加え、プラスミドの複製や維持に関わる遺伝子を含む領域が挿入されていた。これらの外来遺伝子領域は、*S. Dublin* 由来のプラスミド pSD88 と高い相同性を示した。CTX 耐性株が保有する *bla*<sub>CMY-2</sub> プラスミド pYT3 は、大部分が大腸菌由来プラスミド pAR060302 と高い相同性を示し、一部は pYT2 と高い相同性を示した。いずれのプラスミドも伝達性は認められなかった。以上のことから、Ⅶ型菌の特徴および薬剤獲得機構の一端が明らかとなった。

## 総括

*S. Typhimurium* による牛サルモネラ症は世界各国で発生がみられ、北海道内でも毎年数百頭の発生がある。本症は、これまで子牛を中心に発生が認められていたが、近年では成牛における発生数が増加し経済的損失が甚大となっている。成牛のサルモネラ症増加の一因として飼養環境の変化が挙げられているが、一方では分離される菌株の性状に変化があったことも報告されている。本研究では、北海道で分離された牛由来 *S. Typhimurium* の遺伝学的性状とその変遷を明らかにすることを目的とし、過去 33 年間に分離された *S. Typhimurium* について分子疫学的手法を用いて解析した。さらに、一発生事例の疫学調査に本研究で得られた遺伝子型等の細菌学的疫学マーカーを集積したデータベースを利用し、その有用性についての検証を試みた。また、北海道内の牛由来株の分子疫学的解析により検出された、近年分離される主な流行型株の性状を検討した。

第 I 章では北海道内で 1977 年から 2009 年の間に分離された牛由来 *S. Typhimurium* 545 株を PFGE および MLVA により解析した。PFGE により、545 株は 116 種類のプロファイルを示し、9 つの遺伝子型 (I ~ IX 型) に分類された。多くの株が I 型および VII 型に分類され、2 つの優勢な遺伝子型が存在することが示唆された。さらに MLVA により代表株を解析した結果、4 つの MLVA クラスタ (A~D) が形成され、MLVA クラスタ A は PFGE I 型、MLVA クラスタ C は PFGE VII 型で構成された。PFGE I 型および VII 型は、異なる型別手法を用いてもそれぞれ同じグループに分類されることから、それぞれ遺伝学的に近縁な株で構成されていることが示唆された。I 型菌の多くが 1992 年から 2004 年の間に分離されており、1990 年代に世界的に流行した DT104 が含まれていた。VII 型菌は全て 2000 年以降に分離されており、薬剤耐性病原性プラスミドを保有することを特徴としていた。以上のことから、1992 年以降、DT104 を含む I 型菌が増加したが、2004 年以降減少し、それに代わり 2000 年以降、新型の多剤耐性 VII 型菌が出現し、これによるサルモネラ症が増加したことが明らかとなった。

第Ⅱ章では、北海道内の一酪農場において発生した牛サルモネラ症の分子疫学調査を実施した。2008年2月から2009年2月まで当該農場の乳用牛の糞便および環境材料を採取し、増菌培養によるサルモネラの検出、分離菌のPFGE、MLVA、ファージ型別による解析を行った。各種材料から25株が分離され、そのうち代表的な9株を解析した結果、最後に分離された1株(RG08-5)を除き全株が同一のPFGEプロファイルおよび類似したMLVAプロファイルを示し、2種類のクローン由来株による流行が示唆された。RG08-5以外の株は道内のスズメ由来株と同一あるいは類似したPFGEおよびMLVAプロファイルを示しており、ファージ型もスズメ由来株と同様のDT40であった。以上のことから、当該農場で発生したサルモネラ症の原因菌のうちRG08-5以外の株は、スズメ由来株と同一であると考えられ、放牧時におけるスズメとの接触が感染経路である可能性が示された。また、これらの菌株と同一のMLVAプロファイルを示す菌が、道央地域の他の農場においても分離されており、当該タイプの菌による限局的な流行が示唆された。

DT104 U1株は百日咳毒素様蛋白 ArtA/ArtB (ArtAB) を産生することが明らかにされている。第Ⅲ章では、DT104を含むPFGE I型と、他のPFGE型における*artAB* 遺伝子保有状況を解析し、遺伝子産物の性状を明らかにした。I型菌の98% (242/248) と、II型に属する14%の分離株(5/37)において、当該遺伝子が検出され、その他のPFGE型からは検出されなかった。遺伝子産物であるArtABは、複数のカラムクロマトグラフィーを実施することにより精製し、百日咳毒素と同様にAユニット1つとBユニット5つで構成されることが明らかとなった。精製したArtABをマウスに腹腔内接種すると致死活性が認められ、LD<sub>50</sub>は0.21 μg/匹となった。ArtABは百日咳毒素と同様に、CHO細胞集塊形成活性、赤血球凝集活性およびインスリン分泌亢進活性を示したが、白血球増多活性が欠如している点が異なっていた。以上のことから、ArtABがI型菌における病原性因子の一つである可能性が示されたが、牛サルモネラ症発症における役割を解明するためには、さらなる解析が必要であると考えられた。



第IV章では、PFGE VII型菌が保有するプラスミドの特徴を明らかにした。VII型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミド pYT1 および pYT2 は、*S. Typhimurium* 血清型特異的病原性プラスミドに、ABPC、SM、SUL、TC、KM に対する耐性遺伝子を含む領域が IS1294 を介して挿入されて構成されていた。さらに、pYT2 においてはプラスミド複製や維持に関連する遺伝子を含む領域も挿入されていた。これらの挿入された遺伝子領域は、*S. Dublin* 由来のプラスミド pSD88 と高い相同性を示した。また、CTX 耐性株が保有する *bla*<sub>CMY2</sub> を含む薬剤耐性プラスミド pYT3 は、大部分が大腸菌由来のプラスミド pAR060302 と高い相同性を示し、一部は pYT2 と高い相同性を示した。これらの解析により、VII型菌の薬剤耐性獲得機構の一端が解明された。

以上、本研究により、北海道の牛サルモネラ症から分離された株について遺伝子型における経年的変遷が確認され、さらに分子疫学的解析手法を用いることにより異なる農場で分離された菌株間の比較や牛由来株と野生動物由来株との関連性を科学的に解析することが可能となることが検証された。また、近年分離される牛由来 *S. Typhimurium* の病原性関連因子や薬剤耐性因子に関する特徴が明らかとなった。これらの成果は、今後、牛サルモネラ症の防疫対策に活用することが可能となるばかりでなく、牛サルモネラ症における発病機構の解明に役立つものと思われる。

## 謝辞

本研究の遂行およびまとめにあたり、本論文の御校閲および御指導と御助言を賜りました酪農学園大学獣医学群 菊池直哉教授をはじめ、田村豊教授、永幡肇教授、小岩政照教授、御助言を賜りました元酪農学園大学獣医学群 高橋樹史博士の各位に深謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、終始御指導および御助言を賜りました動物衛生研究所 内田郁夫博士をはじめ、恒光裕博士ならびに林智人博士、御支援を賜りました田中聖氏の各位に心から感謝致します。

さらに、本研究への御理解、御協力を賜りました動物衛生研究所の職員の皆様、北海道内各地の家畜保健衛生所の皆様、採材に御協力頂きました酪農場の皆様の各位に、感謝の意を表します。

最後に、私を見守り、支え続けてくれた家族に心から感謝します。

## 引用文献

1. Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S.; *S. enterica* MLST study group. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* **8**: e1002776.
2. Adhikari, B., Besser, T.E., Gay, J.M., Fox, L.K., Hancock, D.D. and Davis, M.A. 2010. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and plasmid profiling to study the occurrence of *bla*<sub>CMY-2</sub> within a pulsed-field gel electrophoresis-defined clade of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 69-74.
3. Ahmer, B.M., Tran, M. and Heffron, F. 1999. The virulence plasmid of *Salmonella typhimurium* is self-transmissible. *J. Bacteriol.* **181**: 1364-1368.
4. Allen, C.A., Fedorka-Cray, P.J., Vazquez-Torres, A., Suyemoto, M., Altier, C., Ryder, L.R., Fang, F.C. and Libby, S.J. 2001. In vitro and in vivo assessment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 virulence. *Infect. Immun.* **69**: 4673-4677.
5. Anderson, E.S., Ward, L.R., Saxe, M.J. and de Sa, J.D. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg.* **78**: 297-300.
6. Bolton, L.F., Kelley, L.C., Lee, M.D., Fedorka-Cray, P.J. and Maurer, J.J. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1348-1351.

7. Boyd, D.A., Peters, G.A., Ng, L. and Mulvey, M.R. 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**: 285-291.
8. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
9. Davis, M.A., Besser, T.E., Eckmann, K., MacDonald, K., Green, D., Hancock, D.D., Baker, K.N., Warnick, L.D., Soyer, Y., Wiedmann, M. and Call DR. 2007. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium, Pacific Northwest, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **13**: 1583-1586.
10. Dimovski, K., Cao, H., Wijburg, O.L., Strugnell, R.A., Mantena, R.K., Whipp, M., Hogg, G. and Holt, K.E. 2014. Analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variable-number tandem-repeat data for public health investigation based on measured mutation rates and whole-genome sequence comparisons. *J. Bacteriol.* **196**: 3036-3044.
11. Finkelstein, R.A., Atthasampunna, P., Chulasamaya, M. and Charunmethee, P. 1966. Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera toxin A. *J. Immunol.* **96**: 440-449.
12. Fukui, D., Takahashi, K., Kubo, M., Une, Y., Kato, Y., Izumiya, H., Teraoka, H., Asakawa, M., Yanagida, K. and Bando, G. 2014. Mass mortality of eurasian tree sparrows (*Passer montanus*) from *Salmonella* Typhimurium DT40 in Japan, winter 2008-09. *J. Wildl. Dis.* **50**: 484-495.

13. Gill, D.M. 1982. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* **46**: 86-94.
14. Goodwin, M.S. and Weiss, A.A. 1990. Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect. Immun.* **58**: 3445-3447.
15. Grimont, P.A.D.W., F-X. 2007. Antigenic Formulae of *Salmonella* serovars, Ninth Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris.
16. Groisman, E.A. and Ochman, H. 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* **5**: 343-349.
17. Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R. and Mendoza, M.C. 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2977-2981.
18. Guerra, B., Soto, S.M., Arguelles, J.M. and Mendoza, M.C. 2001. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1305-1308.
19. Haghjoo, E. and Galan, J.E. 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 4614-4619.

20. Heir, E., Lindstedt, B.A., Nygard, I., Vardund, T., Hasseltvedt, V. and Kapperud, G. 2002. Molecular epidemiology of *Salmonella* Typhimurium isolates from human sporadic and outbreak cases. *Epidemiol. Infect.* **128**: 373-382.
21. Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P. and Molbak, K. 2002. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 490-495.
22. Hermans, A.P., Abee, T., Zwietering, M.H. and Aarts, H.J. 2005. Identification of novel *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-specific prophage and nonprophage chromosomal sequences among serovar Typhimurium isolates by genomic subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4979-4985.
23. Herrero, A., Mendoza, M.C., Rodicio, R. and Rodicio, M.R. 2008. Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 4514-4517.
24. Herrero, A., Mendoza, M.C., Threlfall, E.J. and Rodicio, M.R. 2009. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with pUO-StVR2-like virulence-resistance hybrid plasmids in the United Kingdom. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**: 1087-1093.
25. Hewlett, E.L., Roberts, C.O., Wolff, J. and Manclark, C.R. 1983. Biphasic effect of pertussis vaccine on serum insulin in mice. *Infect. Immun.* **41**: 137-144.
26. Hewlett, E.L., Sauer, K.T., Myers, G.A., Cowell, J.L. and Guerrant, R.L. 1983. Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect.*

*Immun.* **40**: 1198-1203.

27. Hiroi, M., Harada, T., Kawamori, F., Takahashi, N., Kanda, T., Sugiyama, K., Masuda, T., Yoshikawa, Y. and Ohashi, N. 2011. A survey of beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **64**: 153-155.

28. Holmberg, S.D., Wachsmuth, I.K., Hickman-Brenner, F.W. and Cohen, M.L. 1984. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 100-104.

29. Hughes, L.A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A.H., Williams, N.J., Bennett, M., de Pinna, E., Lawson, B., Cunningham, A.A. and Chantrey, J. 2008. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 - 2006. *BMC Vet. Res.* **4**: 4.

30. Ishihara, K., Takahashi, T., Morioka, A., Kojima, A., Kijima, M., Asai, T. and Tamura, Y. 2009. National surveillance of *Salmonella enterica* in food-producing animals in Japan. *Acta Vet. Scand.* **51**: 35.

31. 伊藤史恵, 石井洋子, 中野良宣, 中岡祐司, 山田裕也, 大野和道, 内田郁夫 2010. 黒毛和種繁殖牛に発生した *Salmonella* Typhimurium DT40 によるサルモネラ症の疫学的検討. 北獣会誌 **54**: 56-58.

32. 伊藤史恵, 小澤みどり, 中野良宣 2007. 黒毛和種繁殖牛で発生したサルモネラ症. 北獣会誌 **51**: 132-134.
33. Izumiya, H., Sekizuka, T., Nakaya, H., Taguchi, M., Oguchi, A., Ichikawa, N., Nishiko, R., Yamazaki, S., Fujita, N., Watanabe, H., Ohnishi, M. and Kuroda, M. 2011. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via *IS1* derivatives on the chromosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 623-630.
34. Kado, C.I. and Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365-1373.
35. Kawagoe, K., Mine, H., Asai, T., Kojima, A., Ishihara, K., Harada, K., Ozawa, M., Izumiya, H., Terajima, J., Watanabe, H., Honda, E., Takahashi, T. and Sameshima, T. 2007. Changes of multi-drug resistance pattern in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolates from food-producing animals in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **69**: 1211-1213.
36. Keogh, E.V. and North, E.A. 1948. The haemagglutinin of *Haemophilus pertussis*; haemagglutinin as a protective antigen in experimental murine pertussis. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **26**: 315-322.
37. Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., Kariuki, S., Holt, K.E., Gordon, M.A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, ME., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, CA., Heyderman, RS. and Dougan, G. 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan



Africa have a distinct genotype. *Genome Res.* **19**: 2279-2287.

38. Krueger, K.M. and Barbieri, J.T. 1995. The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 34-47.

39. Kurosawa, A., Imamura, T., Tanaka, K., Tamamura, Y., Uchida, I., Kobayashi, A., Hata, E., Kanno, T., Akiba, M., Yukawa, S. and Tamura Y. 2012. Molecular typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 4,5,12:i:- isolates from cattle by multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis. *Vet. Microbiol.* **160**: 264-268.

40. Lawson, B., Hughes, L.A., Peters, T., de Pinna, E., John, S.K., Macgregor, S.K. and Cunningham, A.A. 2011. Pulsed-field gel electrophoresis supports the presence of host-adapted *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strains in the British garden bird population. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8139-8144.

41. Lee, K., Kusumoto, M., Sekizuka, T., Kuroda, M., Uchida, I., Iwata, T., Okamoto, S., Yabe, K., Inaoka, T. and Akiba, M. 2015. Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Front. Microbiol.* **6**: 78.

42. Levesque, C., Piche, L., Larose, C. and Roy, P.H. 1995. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 185-191.

43. Lindstedt, B.A., Heir, E., Gjernes, E. and Kapperud, G. 2003. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium with emphasis on phage type DT104

based on variable number of tandem repeat loci. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1469-1479.

44. Lindstedt, B.A., Vardund, T., Aas, L. and Kapperud, G. 2004. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **59**: 163-172.

45. Mezal, E.H., Bae, D. and Khan, A.A. 2014. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. *Pathog. dis.* **72**: 95-103.

46. 中村政幸. 2000. 生体側の要因から見た搾乳牛のサルモネラ症. *臨床獣医* **18**: 24-27.

47. 中村政幸. 2012. 牛のサルモネラ症～子牛から搾乳牛へ～. *臨床獣医* **30**: 10-14.

48. Nakamura, M., Sato, S., Ohya, T., Suzuki, S. and Ikeda, S. 1986. Plasmid profile analysis in epidemiological studies of animal *Salmonella typhimurium* infection in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 360-365.

49. 中岡祐司. 2000. 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策. *臨床獣医* **18**: 36-45.

50. 中岡祐司. 2012. 衛生管理でサルモネラ症から牛群を守る. *臨床獣医* **30**: 15-20.

51. 中岡祐司、立花智. 2010. 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策. *家畜診療*

**57:** 279-285.

52. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals second edition: Approved standard M31-A2, Wayne, PA, USA.

53. Pennycott, T.W., Mather, H.A., Bennett, G. and Foster, G. 2010. Salmonellosis in garden birds in Scotland, 1995 to 2008: geographic region, *Salmonella enterica* phage type and bird species. *Vet. Rec.* **166:** 419-421.

54. Pennycott, T.W., Park, A. and Mather, H.A. 2006. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. *Vet. Rec.* **158:** 817-820.

55. Pootong, A., Budhirakkul, P., Tongtawe, P., Tapchaisri, P., Chongsa-nguan, M. and Chaicumpa, W. 2007. Monoclonal antibody that neutralizes pertussis toxin activities. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **25:** 37-45.

56. Pritchett, L.C., Konkel, M.E., Gay, J.M. and Besser, T.E. 2000. Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38:** 3484-3488.

57. Raymond, M.J., Wohrle, R.D. and Call, D.R. 2006. Assessment and promotion of judicious antibiotic use on dairy farms in Washington State. *J. Dairy Sci.* **89:** 3228-3240.

58. Reed, L.J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* **27**: 493-497.
59. Riano, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Saenz, Y., Dominguez, L. and Torres, C. 2006. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**: 844-847.
60. Rodicio, M.R., Herrero, A., Rodríguez, I., Garcia, P., Montero, I., Beutlich, J. Rodicio, R., Guerra, B. and Mendoza, M. C. 2011. Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. *Rev. Med. Microbiol.* **22**: 55-65.
61. Saitoh, M., Tanaka, K., Nishimori, K., Makino, S., Kanno, T., Ishihara, R., Hatama, S., Kitano, R., Kishima, M., Sameshima, T., Akiba, M., Nakazawa, M., Yokomizo, Y., Uchida, I. 2005. The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology* **151**: 3089-3096.
62. Sameshima, T., Akiba, M., Izumiya, H., Terajima, J., Tamura, K., Watanabe, H. and Nakazawa, M. 2000. *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **53**: 15-16.
63. Sato, H., Ito, A., Chiba, J. and Sato, Y. 1984. Monoclonal antibody against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect. Immun.* **46**: 422-428.
64. 佐藤静夫. 2000. 国内外における牛サルモネラ症の発生状況. *臨床獣医* **18**: 18-23.

65. Sekura, R.D., Fish, F., Manclark, C.R., Meade, B. and Zhang, Y.L. 1983. Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **258**: 14647-14651.
66. Shahada, F., Chuma, T., Dahshan, H., Akiba, M., Sueyoshi, M. and Okamoto, K. 2010. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (TEM-52)-producing *Salmonella* serotype Infantis from broilers in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**: 515-521.
67. 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. and 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**: 4114-4121.
68. Shiraki, Y., Shibata, N., Doi, Y. and Arakawa, Y. 2004. *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 69-75.
69. Skelton, S.K. and Wong, K.H. 1990. Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from *Bordetella pertussis* by hydrophobic and affinity interaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1062-1065.
70. Spano, S., Ugalde, J.E. and Galan, J.E. 2008. Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* **3**: 30-38.
71. Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H. and Read, R.J. 1994.

The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**: 45-57.

72. Sugawara, M., Komori, J., Kawakami, M., Izumiya, H., Watanabe, H. and Akiba, M. 2011. Molecular and phenotypic characteristics of CMY-2  $\beta$ -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **73**: 345-349.

73. Sugawara, M., Shahada, F., Izumiya, H., Watanabe, H., Uchida, I., Tamamura, Y., Kusumoto, M., Iwata, T. and Akiba, M. 2012. Change in antimicrobial resistance pattern in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates detected in a beef cattle farm. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 93-97.

74. Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V. and CDC PulseNet Task Force. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 382-389.

75. Swamy, S.C., Barnhart, H.M., Lee, M.D. and Dreesen, D.W. 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3768-3771.

76. Tanaka, T., Tanoue, G., Yamasaki, M., Takashima, I., Sakoda, Y., Ochiai, K., Umemura, T. 2008. Chemical deicer poisoning was suspected as a cause of the 2005-2006 wintertime mortality of small wild birds in Hokkaido. *J. Vet. Med. Sci.* **70**: 607-610.

77. Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R. and Rowe, B. 1996. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium*. *Lancet* **347**: 1053-1054.

78. Tsolis, R.M., Adams, L.G., Ficht, T.A. and Baumler, A.J. 1999. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* **67**: 4879-4885.
79. Uchida, I., Ishihara, R., Tanaka, K., Hata, E., Makino, S., Kanno, T., Hatama, S., Kishima, M., Akiba, M., Watanabe, A. and Kubota, T. 2009. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [<sup>32</sup>P]NAD. *Microbiology* **155**: 3710-3718.
80. Une, Y., Sanbe, A., Suzuki, S., Niwa, T., Kawakami, K., Kurosawa, R., Izumiya, H., Watanabe, H. and Kato, Y. 2008. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection causing mortality in eurasian tree sparrows (*Passer montanus*) in Hokkaido. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**: 166-167.
81. Villa, L., Garcia-Fernandez, A., Fortini, D. and Carattoli, A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**: 2518-2529.
82. Wuyts, V., Mattheus, W., De Laminne de Bex, G., Wildemauwe, C., Roosens, N.H., Marchal, K., De Keersmaecker, S.C. and Bertrand, S. 2013. MLVA as a tool for public health surveillance of human *Salmonella* Typhimurium: prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci stability. *PLoS ONE* **8**: e84055.
83. Yajima, M., Hosoda, K., Kanbayashi, Y., Nakamura, T., Nogimori, K., Mizushima, Y., Nakase, Y. and Ui, M. 1978. Islets-activating protein (IAP) in *Bordetella pertussis* that

potentiates insulin secretory responses of rats. Purification and characterization. *J. Biochem.* **83**: 295-303.

84. Yajima, M., Hosoda, K., Kanbayashi, Y., Nakamura, T., Takahashi, I. and Ui, M. 1978. Biological properties of islets-activating protein (IAP) purified from the culture medium of *Bordetella pertussis*. *J. Biochem.* **83**: 305-312.



## 付図説明

図 1-1、1-2 *S. Typhimurium* 545 株の制限酵素 *Xba* I を用いた PFGE プロファイルの系統樹解析結果

類似度 74%以上となるプロファイルを同一 PFGE 型とした。

図 2 PFGE 代表株 116 株の MLVA プロファイルに基づく系統樹

Minimum Spanning Tree による系統樹。円の大きさは同じプロファイルを示した菌株数を反映する。円の中は、PFGE 型で色分けした。MLVA プロファイルの違いが 1 遺伝子座位以内のプロファイルを太線で連結し、2 遺伝子座位異なるプロファイルを細線で、3 遺伝子座位以上異なるプロファイルを点線で連結した。太線で連結されたプロファイルを囲い、4つのクラスターとした (A:緑、B:ピンク、C:紫、D:黄色)

図 3 VII型代表株およびその他の PFGE 型代表株のプラスミドプロファイル (A) とザンハイブダイゼーション (B)

M: BAC-Tracker supercoiled DNA ladder, 1: KT20 (I-1), 2: IS18-33 (II-15), 3: TST49 (III-1), 4: N48 (IV-15), 5: TST161 (V-3), 6: TST178 (VI-3), 7: TST205 (VII-1), 8: KT261 (VII-2), 9: R18-1 (VII-3), 10: 07SY9 (VII-4), 11: TST228 (VII-5), 12: KT262 (VII-6), 13: KT291 (VII-7), 14: KT302 (VII-8), 15: TST207 (VII-9), 16: KT165 (VII-10), 17: NST78 (VII-11), 18: KT158 (VII-12), 19: KT161 (VII-13), 20: NST110 (VII-14), 21: TST233 (VII-15), 22: 07IB1 (VII-16), 23: NST95 (VII-17), 24: HD (VII-18), 25: TST31 (VII-19), 26: KT271 (VII-20), 27: ISI19-6 (VII-21), 28: TST181 (VIII-1), 29: TST164 (IX-1), 30: LT2.

使用したマーカーのサイズおよびプローブを左に示した。

図 4 北海道内の一酪農場で分離された *S. Typhimurium* および旭川で採取したスズメ由来株の PFGE および MLVA 解析

a) UT: 型別不能

図 5 MLVA プロファイルに基づく *S. Typhimurium* 116 株および一酪農場分離株の系統樹

第一章で示した 116 株の Minimum Spanning Tree に、一酪農場由来株 (RG08-1、RG08-5、RG08-10) が示した MLVA タイプ 1~3 を加え、系統樹を作成した。

図 6 カラムクロマトグラフィー実施後の ArtAB SDS-PAGE 泳動像 (A) およびウエスタンブロットティング (B)

M: サイズマーカー, 1: DT104 培養上清, 2: ブルーゲルカラムクロマトグラフィー実施後, 3: ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー実施後, 4: 疎水性カラムクロマトグラフィー実施後

図 7 精製後の ArtAB による牛脳由来 G 蛋白質の ADP-リボシル化 (A) と CHO 細胞のクラスター形成 (B)

図 A: 1: 百日咳毒素, 2: ArtAB

図 8 イオン交換クロマトグラフィーによる ArtA および ArtB の分離 (A) と ArtA および ArtB の SDS-PAGE 泳動像 (B)

A: 0 M から 0.5 M までの NaCl を含む 30mM Tris-HCl (pH8.8) を用いたリニアグラジエント溶出法により ArtAB の A ユニットおよび B ユニートを溶出した。

B: イオン交換クロマトグラフィーにより得られたピークを DTT 添加(還元)および非添加(非還元)で SDS-PAGE で泳動した。バンドのサイズから想定されるユ

ニット構造を右に示した。

図 9 ArtAB 接種群の生存曲線

精製した ArtAB 2  $\mu\text{g}$ 、1  $\mu\text{g}$ 、0.5  $\mu\text{g}$ 、0.25  $\mu\text{g}$ 、0.125  $\mu\text{g}$  を、4 週齢のメスの Balb/c マウス 1 群 8 匹に腹腔内投与した。投与後マウスの生死を 2 週間観察し、生存率を図に示した。

図 10 ArtAB の赤血球凝集活性の測定

ArtAB をそれぞれ 16  $\mu\text{g}$ /ウェルから PBS で 2 倍階段希釈し、各希釈液 50  $\mu\text{l}$  と赤血球浮遊液 50  $\mu\text{l}$  を混合し、室温で 1 時間静置した

図 11 pYT1 および pYT2 の挿入領域のマップ

薬剤耐性遺伝子を赤、IS1294 トランスポザーゼを水色、その他のトランスポザーゼを紺色、プラスミド複製遺伝子を黄色、インテグラーゼを緑色で示した。黒い矢印はモバイルエレメントを表し、マップの下部の緑色および橙色の矢印はそれぞれ Left region および Right region を示す。破線矢印は pSLT 由来と考えられる領域を示し、挿入領域との境界をマップに垂直な破線で示した。

図 12 pYT1 および pYT2 と関連するプラスミド (pSal6919a, pSal8934b, pSD88, pU302-L) における相同性領域の比較

blastn による比較を ACT により作図した。薬剤耐性遺伝子を赤、IS1294 トランスポザーゼを水色、その他のトランスポザーゼを紺色、プラスミド複製遺伝子を黄色、インテグラーゼを緑色で示した。各プラスミドのマップの直上の黒い矢印はモバイルエレメントを示し、さらに上部の緑色と橙色の矢印はそれぞれ Left region および Right region を示す。破線矢印は pSLT 由来と考えられる領域

を示し、挿入領域との境界をマップに垂直な破線で示した。それぞれのマップの間の赤色のバーは塩基配列の一致を示し、青色のバーは逆方向に一致していることを示す。

図 13 pYT3 のマップ

内側の円はコーディング領域を示す。薬剤耐性遺伝子を赤、*IS1294* トランスポザーゼを水色、プラスミド複製遺伝子を黄色で示した。外側の円は pAR060302、GI-VII-6、および pYT2 と相同な領域を示す。