

単一集団下痢症から分離された *Salmonella* Saintpaul と 非運動性 O4 群サルモネラの解析

岐阜県保健環境研究所

山田万希子 古田 紀子 白木 豊 野田 伸司

(平成 19 年 7 月 30 日受付)

(平成 20 年 4 月 4 日受理)

Key words: *Salmonella*, serotype, nonmotile variant

序 文

多くの病原細菌において血清型は、病原性や宿主特異性と関連していることから最も基本的な疫学マーカーとなり得る¹⁾。サルモネラの血清型は O 及び H 抗原の組み合わせによって現在 2,500 以上の血清型に分類されており、亜種 I (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) に限って固有名によって表されている。しかしながら、まれに抗原構造に変異が生じ既知の Kauffmann-White の抗原構造表に該当しない型別不能の株が出現することがある²⁾。今回、単一集団下痢症事例から *Salmonella* serovar Saintpaul (以下, S. Saintpaul) と O4 群で非運動性の株が同時に分離され、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析と表層抗原 (O 抗原や H 抗原) に関与しない遺伝子を対象にした multiplex PCR-based method による血清型推測法によって、これらの O4 群非運動性株が S. Saintpaul の運動性欠損株であることを示唆する結果を得たので、その概要を報告する。

材料と方法

1. 事例の概要

岐阜県内の児童福祉施設 (2~17 歳の児童 39 名, 職員数 25 名) で平成 18 年 9 月 11 日~10 月 6 日にかけ、入所者 16 名 (2 歳児~高校 2 年生), 職員 2 名の延べ 18 名が下痢・発熱などを発症した。当初は食中毒を疑い調査を開始したが、発症状況が長期に渡っていること、施設で調理された給食検食, 給食施設の拭き取り, 福祉施設で飼育されていたカメの表面及び直腸拭き取り, 飼育水からは既知食中毒菌は検出されなかったことから、食品による単一暴露ではなくヒト→ヒト感染によるものと考えられた。

2. 患者菌株分離状況

保健所の検査により有症者 14 名の検便の増菌培養のうち 1 名からサルモネラを検出し純培養菌 2 株が当所に搬入された。また、病院を受診した 8 名の検便中 6 名からサルモネラが検出され、その純培養菌各 1 株が当所に搬入された。当所でサルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)により血清型別を実施した結果、保健所から搬入された 1 名由来 2 株と病院から搬入された 6 株のうち 4 株は S. Saintpaul, 残りの病院株 2 株は S. Saintpaul と同じ O4 群であったが運動性がなく, H 型別不能であった。そこで、分離された S. Saintpaul 5 名由来 5 株 (菌株 No. 1-S~5-S) と *Salmonella* O4 群非運動性株 2 株 (菌株 No. 6-NM, 7-NM; 以下, 非運動性株と略す) の関連性を調べるため、以下の疫学解析を行った。比較対照として岐阜県下で分離された O4 群主要血清型 19 株を供試した。

3. PFGE 解析

寺嶋ら³⁾の方法に準じ DNA を抽出し、制限酵素 *Xba*I または *Bln*I で処理した後、パルスフィールドゲル電気泳動装置 DR-III (BIO-RAD) を用いて泳動した。泳動条件は電圧 6V/cm, パルスタイム 5~50 秒, 14℃ で 22 時間行い、泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色し紫外線下で DNA パターンを確認した。さらに、電気泳動中に DNA が分解されることを防ぐため、制限酵素処理をした DNA 包埋ゲルブロックを、チオ尿素を 200μM の濃度になるように添加した泳動バッファー (0.5×TBE) 中で電気泳動する方法 (沼田ら⁴⁾の方法を一部改変) と並行して実施した。

4. multiplex PCR-based method による血清型推測法

Kim ら⁵⁾の方法に従い、Table 1 に示す 11 組のプライマーのうち、STM 系 5 組と STY 系 5 組をそれぞれ

別刷請求先: (〒504-0838) 岐阜県各務原市那加不動丘 1-1
岐阜県保健環境研究所 山田万希子

Table 1 Primers used in this study (reference 5)

Assay	Primer	Primer sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)
1	STM0716F	AACCGCTGCTTAATCCTGATGG	187
	STM0716R	TGGCCCTGAGCCAGCTTTT	
2	STM1350F	TCAAAATTACCGGGCGCA	171
	STM1350R	TTTTAAGACTACATACGCGCATGAA	
STM 3	STM0839F	TCCAGTATGAAACAGGCAACGTGT	137
	STM0839R	GCGACGCATTGTTGCGATTGAT	
4	STM4525F	TGGCGGCAGAAGCGATG	114
	STM4525R	CTTCATTACGCAACTGACGCTGAG	
5	STM4538F	TGGTCACCGCGCGTGAT	93
	STM4538R	CGAACGCCAGGTTCAATTTGT	
1	STY0311F	TGGTATGGTTAAGCGGAGAATGG	301
	STY0312R	GAGAGTCATAGCCCACACCAAAG	
2	STY0346F	GGCTGGAGCAGCCTTACAAAA	262
	STY0347R	AAGAGTTGCTGGCTGGTAAAA	
STY 3	STY2299F	AATCCCCCCCCCTCAAAAA	220
	STY2300R	GGTACACGTTTACTGTTTGTGGA	
4	STM3845F	ATATCTCATCGTCTCCTTTTCGTGT	181
	STM3845R	GAAGGTCCGATAGGCATTCT	
5	STY2349F	AATTACGGAGCAGCAGATCGAGG	124
	STY2349R	TGCGGCCAGCTGTTCAAAA	
STM 7	STM2150F	CATAACCGCCTCGACCTCAT	101
	STM2150R	AGATGTCGTGAGAAGCGGTGG	

れ multiplex PCR で, STM7 を singleplex PCR で実施した. *Taq* は *Ex Taq Hot Start Version* (タカラバイオ) を用いた. 増幅産物はアガロースゲルで泳動後, エチジウムブロマイドで染色して紫外線下で観察した. STM 系と STY 系は該当サイズのバンドが有る場合にはその系の番号 1~5 を, ない場合は 0 とし, STM7 ではバンドの有無によって + または - と表現し (STM 1, 2, 3, 4, 5 STY 0 STM7+) のようにスコアリングした.

結果及び考察

PFGE 解析の結果, *S. Saintpaul* 10 株と *S. Schleissheim* では DNA パターンが得られなかったのに対し, それ以外の O4 群血清型 13 株は DNA パターンが得られた. Baggesen ら⁶⁾ も *S. Saintpaul* の PFGE 解析では泳動中に DNA 断片が分解されバンドを観察できなかったと報告しており, この特徴は *S. Saintpaul* 独特の特徴であると考えられた. また, 非運動性株は *S. Saintpaul* と同様に DNA パターンが得られなかった (Table 2). そこで, バッファーにチオ尿素を加えて再度電気泳動を行ったところ, *S. Schleissheim* 以外の血清型ではバンドが得られ, そのパターンは制限酵素 *Xba*I, *Bln*I 処理ともに *S. Saintpaul* と非運動性株は 1 つのクラスターを形成したが, 他の O4 群血清型の株とは大きく異なっていた (Fig. 1).

multiplex PCR-based method を実施した結果, *S. Saintpaul* 分離株 10 株のうち 9 株は Kim ら⁵⁾ が示した *S. Saintpaul* のバンドパターン (STM 1, 2, 3, 4, 5

STY 0 STM7+) を示し, 非運動性株も同様のパターンとなった (Fig. 2, Table 2). また, 他の O4 群血清型の株も Kim ら⁵⁾ が示した各血清型のバンドパターンと一致した. この multiplex PCR-based method は, 全ゲノムのマイクロアレイ解析などで表層抗原 (O 抗原や H 抗原) に関与しない遺伝子を対象として, サルモネラの主要な血清型を迅速かつ簡便に推測する方法として報告されたものであり, 本菌株のように抗原性の失われた株の血清型を推測する際にも有用であることが示された.

以上の結果により, 2 株の非運動性株は *S. Saintpaul* の変異株である可能性が高く, 本事例は集団下痢症事例から既知の血清型の株とその非運動性変異株が同時に分離された極めて稀な事例であった. 海外では, スペインで 1997 年に流行した多剤耐性非定型サルモネラ血清型 4, 5, 12:i:- が *S. Typhimurium* (4, 5, 12:i:1, 2) の H2 相抗原欠損株であったとの報告がある⁷⁾. このように, 既知の血清型に該当しない株は久高ら²⁾ の報告以外にも存在していると考えられ, 今後病原性及び発生動向について詳細に調査する必要がある.

文 献

- 1) 坂崎利一, 田村和満: 腸内細菌<上巻>概論, *Salmonella* 属. 近代出版, 東京, 1992.
- 2) 久高 潤, 糸数清正, 中村正治, 平良勝也, 安里龍二, 古謝幸恵, 他: 沖縄県における散发下痢症及び食中毒由来サルモネラの血清型. 沖縄県衛生環境研究所報 2002; 36: 43-8.

Table 2 Characterization of serogroup O4 *Salmonella* strains isolated in Gifu

Strain No.	Serovar	Multiplex PCR-based method			Bands of <i>Xba</i> I-digested PFGE analysis		Notes
		STM	STY	STM7	without thiourea	with thiourea	
1-S	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	— a)	+	Outbreak, 2006
2-S	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	
3-S	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	
4-S	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	
5-S	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	
6-NM	serogroup O4, HNM	1,2,3,4,5	0	+	—	+	
7-NM	serogroup O4, HNM	1,2,3,4,5	0	+	—	+	
06-19	Saintpaul	1,2,3,4,5	2	+	—	+	Healthy carrier, 2006
EF-60	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	Sporadic, 2003
EK-9	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	Sporadic, 2003
FP-77	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	Sporadic, 2002
DE-29	Saintpaul	1,2,3,4,5	0	+	—	+	Sporadic, 2000
06-31	Paratyphi B	1,2,4,5	0	NT ^{b)}	+	+	Food poisoning, 2006
BS-228	Schleissheim	1,5	NT	NT	—	—	Chicken, 2004
AS-247	Schwarzengrund	1,2,5	NT	NT	+	+	Pork, 2004
06-173	Stanley	1,2,5	2	+	+	+	Healthy carrier, 2006
FP-21	Chester	1,2	0	NT	+	+	Sporadic, 2000
FP-31	Chester	1,2	1,2	NT	+	+	Sporadic, 2001
BS-225	Abortusequi	1,5	NT	NT	+	+	Horseflesh, 2004
BS-300	Derby	1,2,3,5	5	NT	+	+	Pork, 2005
FP-85	Agona	2,3	5	NT	+	+	Sporadic, 2003
FG-10	Agona	2,3	NT	NT	+	+	Sporadic, 2001
06-194	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	+	+	+	Food poisoning, 2006
FP-81	Typhimurium	1,2,3,4,5	4	NT	+	+	Sporadic, 2003
BC-22	Brandenburg	1,2	2	NT	+	+	Sporadic, 2004
FP-88	Heidelberg	1,2,4,5	2	NT	+	+	Sporadic, 2004

a) Only a DNA smear was observed in the gel and no DNA fragment pattern was generated.

b) NT: not tested.

Fig. 1 Dendrogram of strains by *Xba*I-digested PFGE analysis

Dendrogram generated by Fingerprinting II software showing the relationship of 24 serogroup O4 isolates. The scale indicates percentage of similarity.

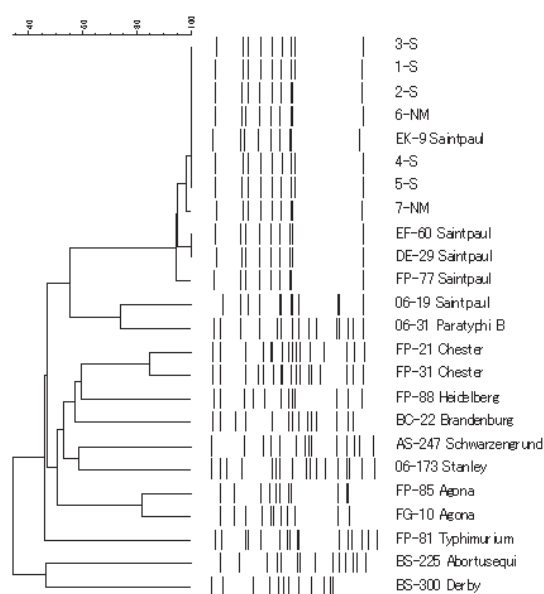
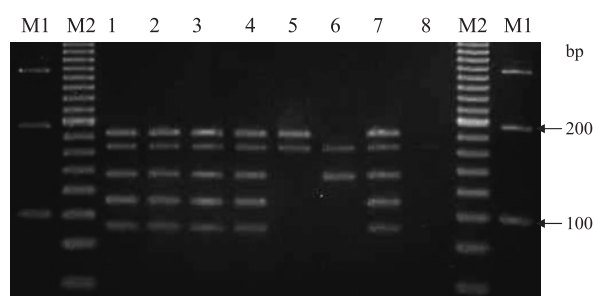


Fig. 2 Agarose gel analysis of STM assay results

Lane: 1, strain No. 3-S; Lane: 2, strain No. 6-NM; Lane: 3, strain No. 7-NM; Lane: 4, strain No. 06-19; Lane: 5, strain No. FP-21; Lane: 6, strain No. FP-85; Lane: 7, strain No. 06-194; Lane: 8, negative control; Lane M1, 100-bp DNA ladder; Lane M2, 20-bp DNA ladder.



- 寺嶋 淳, 渡辺治雄, 中村明子: パルスフィールドゲル電気泳動法 *Salmonella* Enteritidis. 臨床と微生物 1996; 23: 641—4.
- 沼田 昇, 齋藤卓哉, 小黑美香子, 早川安彦, 吉田菊善: パルスフィールド・ゲル電気泳動におけるスメア発生の防止. 病原微生物検出情報月報 2002; 23: 66—7.
- Kim S, Frye JG, Hu J, Fedorka-Cray PJ, Gautom R, Boyle DS: Multiplex PCR-based method for

- identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. J Clin Microbiol 2006 ; 44 : 3608—15.
- 6) Baggesen DL, Wegener HC, Christensen JP : Typing of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul : an outbreak investigation. APMIS 1996 ; 104 : 411—8.
- 7) Echeita MA, Herrera S, Usera MA : Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serotype 4,5,12:i : - appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 2981—3.

Analysis of *Salmonella* Saintpaul and Nonmotile *Salmonella* Serogroup O4 Isolates from an Outbreak

Makiko YAMADA, Noriko FURUTA, Yutaka SHIRAKI & Nobuji NODA
Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences

[J.J.A. Inf. D. 82 : 347~350, 2008]