

5. 秋田県で分離された非定型的な単相性サルモネラ菌の型別法の確立と発生動向の解明

○今野貴之（秋田県健康環境センター 保健衛生部）

【研究目的】

近年、秋田県では非定型的な単相性のサルモネラ菌の分離が散見され、従来の血清型別では菌型を決定できない事例が報告されている。そこで、血清型別に代わる新たな遺伝学的な手法を確立し、これらの菌型を決定する。さらに、分子疫学的手法を用いて、これらの系統解析を実施し、菌株間の関連性を解明する。これにより、非定型的な単相性サルモネラ菌の秋田県における発生動向を把握し、地域の食中毒及び感染症対策に寄与する。

【研究の必要性】

厚生労働省食中毒統計におけるサルモネラ菌に起因する食中毒の年間患者数は、毎年3,000人程度報告され、細菌性食中毒としてはカンピロバクターに次いで多い。また、大規模な集団感染事例も多く、サルモネラ菌により食中毒等が発生した場合は大きな社会問題となる。そのため、食中毒及び感染症のサーベイランスや予防対策が重要であり、血清型別による疫学的な解析がこれに役立っている。

サルモネラ菌の血清型は、主に菌体表面のO抗原と2つのべん毛(H)抗原の組み合わせで決定される。これまでに2,500以上の血清型が報告され、それぞれの菌型には血清型名が付けられている。しかしながら、まれに通常の子血清型に該当しない非定型的な単相菌が分離される場合がある。特に、単相菌O4:i-は1990年代ころには数例の報告のみであったが、現在では世界中で頻繁に分離されるようになり、大きな健康被害をもたらしている。従来の血清型別法で菌型の決定できない非定型的な単相性サルモネラ菌の存在は、公衆衛生上重視すべき深刻な問題であり、血清型別に代わる新たな型別法の導入が必要である。

特に、近年、秋田県ではこのような単相性のサルモネラ菌の分離が問題となっており、その発生動向が注目されていることから、本研究の実施が必要である。

【研究計画】

1. 単相性サルモネラ菌の分離実態の解明

秋田県で分離されたサルモネラ菌について、血清型別を行い非定型的な単相菌の分離状況を把握する。

2. 遺伝子解析による型別法の確立

PCR、DNA シークエンスなどの遺伝子工学的手法を用いて、血清型別に代わる単相性サ

ルモネラ菌の型別法を検討する。

3. 系統解析

単相性サルモネラ菌について、PFGE 法による詳細な分子疫学的解析を行い、系統解析する。これにより、菌株間の関連性について解明する。

【実施内容・結果及び考察】

2010年に秋田県内の医療機関等から収集したサルモネラ菌37株のうち、4株が抗血清を用いた血清型別法により O7:-:1,5 と判定され、血清型名が不明となった。本研究では、この非定型的な単相性サルモネラ菌である O7:-:1,5 の血清型を解明するため、サルモネラの H1 抗原遺伝子 (*fliC*) を検出する PCR 法を考案した。

まず、これまでの秋田県でのサルモネラ菌の分離状況から、O7:-:1,5 になりうる血清型として、Choleraesuis もしくは Paratyphi C (H1:c)、Infantis (H1:r)、Thompson (H1:k)、Bareilly (H1:y) を想定し、これらの H1 抗原の遺伝子の特異的に検出するプライマーを *fliC* の central variable region に設計し (表 1)、PCR を行った。O7:-:1,5 の 4 株はいずれも H1:k に特異的な PCR にのみ陽性を示し、その他の H1 抗原を対象とした PCR は陰性であった。この結果から、O7:-:1,5 の 4 株は血清型 Thompson の単相変異株と考えられた (図 1)。

次に、*NotI* 及び *XbaI* を用いた pulsed field gel electrophoresis (PFGE) による分子疫学的解析を行い、菌株間の関連性を調査した。*NotI* 及び *XbaI* のどちらの制限酵素を使用した場合でも O7:-:1,5 の 4 株は同一の PFGE パターンを示したことから、これらは同一由来の菌と考えられた (図 2)。また、同年に秋田県北部で分離された Thompson もこれらの単相変異株と同一の PFGE パターンを示したことから、O7:-:1,5 株は秋田県北部に侵淫する Thompson から生じたと考えられた。

本研究により、血清型名不明であった O7:-:1,5 の 4 株が Thompson であったことが明らかになったことで、Thompson は 2010 年に当方で確認したサルモネラ菌の中では最も検出数が多くなり、同年に秋田県内で最も流行した菌型であったことが明らかとなった。

従来の血清型別法で型別できない非定型的な単相性サルモネラ菌の存在は、食中毒及び感染症の正確なサーベイランスに支障となることから、公衆衛生上の重要な問題である。PCR による抗原遺伝子の検出は、従来の血清型別法で抗原を検出できないような場合でも有効であり、サルモネラ菌の正確な血清型別に役立つと考えられた。

表1 本研究で使用した菌株

抗原構造	血清型	菌株番号	分離日	地域
O7:c:1,5	Choleraesuis	Sa2201	2008.8.26	(ブタ由来)
O7:r:1,5	Infantis	Sa2514	2010.8.19	大館
O7:k:1,5	Thompson	Sa2497	2010.4.29	北秋田
	Thompson	Sa2498	2010.5.27	大館
	Thompson	Sa2500	2010.6.28	大館
	Thompson	Sa2517	2010.7.10	湯沢
	Thompson	Sa2528	2010.12.6	秋田市
O7:y:1,5	Bareilly	Sa2550	2011.5.30	秋田市
O7:-:1,5	-	Sa2495	2010.5.29	大館
	-	Sa2508	2010.8.2	秋田市
	-	Sa2513	2010.8.11	大館
	-	Sa2527	2010.10.21	大館

表2 本研究で使用したプライマー

Primer Name	Target	Sequence (5'-3')	Amplicon Size (bp)	Reference
H-F		ACT CAG GCT TCC CRT AAC GC		Levy <i>et al.</i> (2008)
H:c-R		ATT CTG TTT CGA GTC GGA AT	405	本研究
H:r-R	<i>fliC</i>	GAT CAC CAG TAA TAG CAG G	475	本研究
H:k-R		GTC AGT CGC ATC AGC AAA GCT T	529	本研究
H:y-R		GAG CAT CTT TAA CGC TGG CA	720	本研究

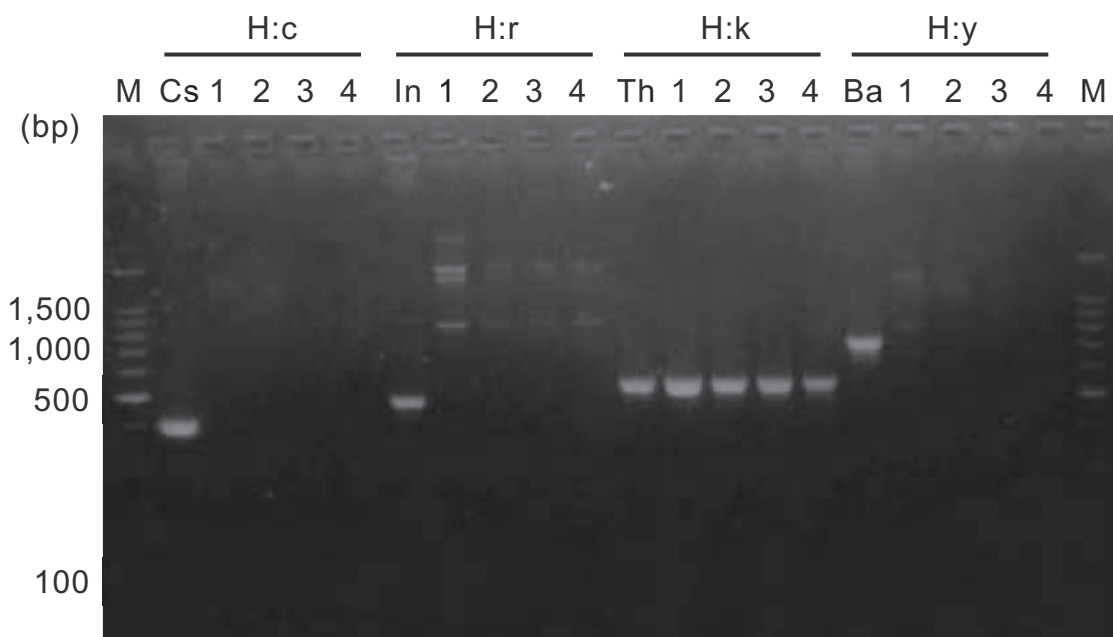


図 1 H1 抗原遺伝子の検出

M: 100 bp DNA size ladder, Cs: Sa2201, In: Sa2514, Th: S2497, Ba: Sa2550, 1: Sa2495, 2: Sa2508, 3: Sa2513, 4: Sa2527

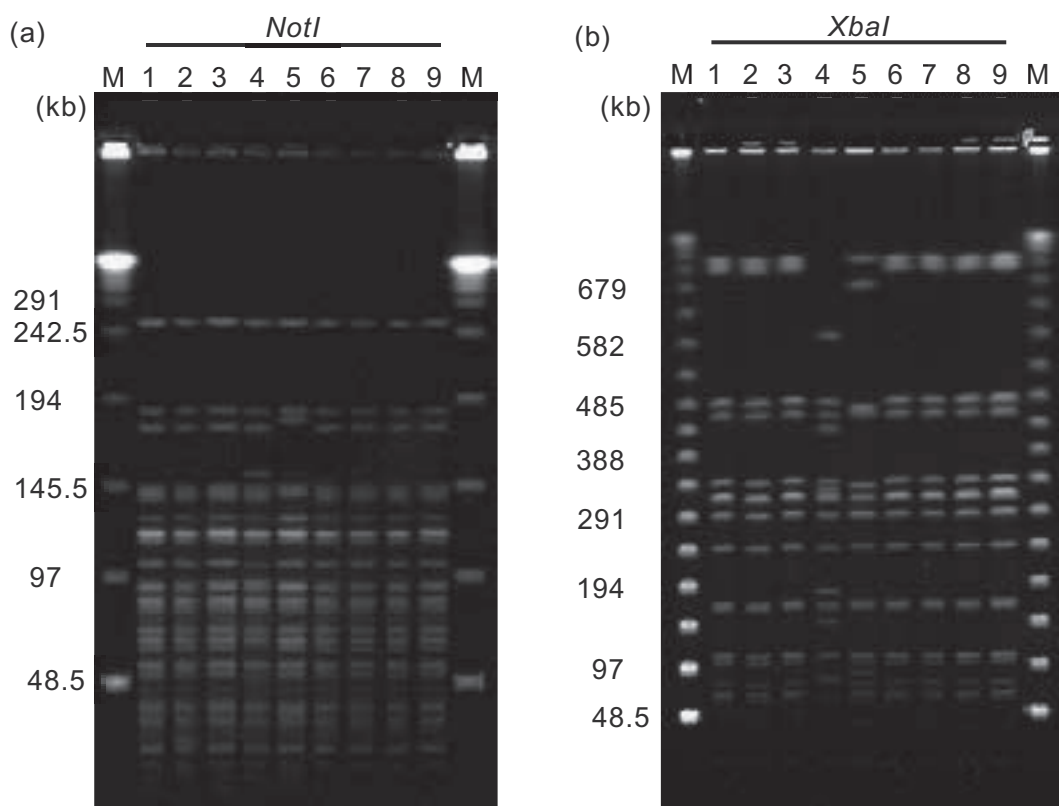


図 2 Thompson 及び O7::1,5 分離株の PFGE パターン

M: DNA size standard λ ladder, 1: Sa2497, 2: Sa2498, 3: S2500, 4: Sa2517, 5: Sa2528, 6: Sa2495, 7: Sa2508, 8: Sa2513, 9: Sa2527

【発表実績】

第 67 回日本細菌学会東北支部総会（口頭発表）

【経費使用明細】

用途	金額
試薬（合成DNA、細菌同定キット、培地）	¥184,863
消耗品・器具（ピペット）	¥81,900
事務費（インク、用紙、論文・資料、実験ノート、英文校正代）	¥36,494
その他（振込手数料）	¥2,045
総計	¥305,302