

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒菌等の遺伝特性及び制御に関する研究

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

### 分担研究報告書

#### サルモネラの疫学解析マーカーの検索、タイピング手法

研究分担者 泉谷 秀昌（国立感染症研究所 細菌第一部）

研究協力者 黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所）

研究協力者 古川 一郎（神奈川県衛生研究所）

研究協力者 齊藤志保子（秋田県健康環境センター）

研究協力者 八柳 潤（秋田県健康環境センター）

本研究班では、食中毒の予防・迅速な原因食品究明に役立つ、食品中の食中毒菌の情報、とくにその遺伝的特性に関する研究を行う。本研究ではサルモネラ属菌に着目し、そのサーベイランス体制を充実させるための遺伝特性の開発およびタイピング法の検討などを行う。本年度は近年欧米で報告の相次いでいる *Salmonella* 14:i:- について、昨年度改良を施したスクリーニング用 PCR に加えて MLST による検討を行った。

#### A. 研究目的

サルモネラは国内外を問わず主要な食中毒菌の一つであり、公衆衛生上非常に重要な位置を占めている。わが国では 1990 年代から 2000 年代にかけて *Salmonella* Enteritidis による食中毒事例が多発し大きな問題となった。2000 年代以後はサルモネラによる食中毒事例および患者数は減少したものの、主要な食中毒菌であることには変わりはない。

サルモネラには約 2,500 種の血清型が含まれ、近年では SE 以外の血清型でも食中毒が発生しており、今後は SE 以外のサルモネラへの対応が必要となってくる。

SE 以外にヒトからの分離頻度が高い血清型としては Typhimurium、Infantis などがあり、とくに Infantis は鶏肉から高頻度に分離される。また SE は鶏卵あるいは鶏肉などの食品（加工品）が主たる感染源となっている。

このように、サルモネラに関しては本菌感染と食品の結びつきが大変強い。したがって、本菌に関して、ヒトおよび食品でサーベイランスを実施することは重要な課題であり、その遺伝特性を解析し、そこから有用なマーカーなりタイピング法なりを開発・検討することが本研究の目的である。

## B. 研究方法

### PCR タイピング

*Salmonella* 14:i:-は近年欧米で報告の相次いでいる血清型であり、血清型 Typhimurium (14:i:1,2) の単相バリエーションであると考えられている。S. 14:-に関して、EFSA J. 8, 1826 (2010)に記載された *S. Typhimurium* 様の単相菌スクリーニング PCR について昨年改良を施した PCR 法を使い、*fliAB* intergenic region および *fliJ* 遺伝子について試験した。また、J. Clin. Microbiol. 47, 3546 (2009)に記載された PCR による *hin* 遺伝子の試験を行い、必要に応じて塩基配列の決定を行った。

### MLST

PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012) に記載の multilocus sequence typing (MLST) を用いて MLST 解析を行った。MLST データについては <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/> を参照し、ST の型番付けなどを行った。

### PFGE

Pulsenet プロトコール (Foodbourne Pathog Dis. 3(1): 20-31 (2006), <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/>) に従い、パルスフィールドゲル電気泳動法を実施した。XbaI 消化して得られた泳動パターンを Bionumerics に取り込み、クラスター解析を行った。

### MLVA

J. Microbiol. Methods 59(2): 163-172

(2004)に記載の 5 カ所の遺伝子座を用いた multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) を行った。得られた結果をリピート数に換算し、Bionumerics をもちいてクラスター解析を行った。

## C. 研究結果および考察

S. 14:i:-分離株 (河川水等非ヒト由来株 11 株およびヒト由来株 2 株) を供試し、試験を行った。

PCR タイピングについて、*fliAB* 領域については全ての株で約 1kb のバンドが生じ、いずれも血清型 Typhimurium から派生したものと考えられた。*fliJ* 遺伝子については、非ヒト由来株 11 株中 8 株が陽性であり、その他の 5 株は陰性であった。後者 5 株については、*fliJ* 遺伝子の変異が 2 相目の H 抗原が検出されない理由の一つと考えられた。

*hin* 遺伝子については、ヒト由来 2 株が陰性であったが、非ヒト由来株 11 株は何らかの増幅産物が得られた。このうち、10 株は予想される大きさ (約 0.6kb) の増幅産物が得られた。1 株は約 1.3kb の増幅産物を生じたので、部分的に塩基配列を決定したところ、IS26 の挿入が推定された。

*fliAB*、*fliJ* および *hin* 各 PCR の結果をまとめたものを表 1 に示す。非ヒト由来株 11 株の中で *fliJ* 陽性の 8 株は *hin* も陽性であった。そこで *hin* 遺伝子増幅産物の塩基配列を決定したところ、140 番目のアミ

ノ酸においてアルギニンからロイシンへの置換 (R140L) が見出された。本変異によって 2 相目への相変換が阻害されることが示唆されており、したがって 1 相目の H 抗原しか検出されないものと推測された。

MLST 解析の結果、今回供試した 13 株は 3 つの ST から成ることが明らかとなった。すなわち、ST34、ST19 および ST99 であった。

ヒト由来株は 2 株とも ST34 であった。非ヒト由来株は 3 株が ST19、8 株が ST99 であった。ST34 株はいずれも *fliJ*B 陰性、*hin* 陰性であった。ST19 および ST99 はいずれも *hin* 陽性 (IS26 挿入株も含む) であり、前者は *fliJ*B 陽性、後者は *fliJ*B 陰性であった。上記 PCR タイピングの結果と MLST の結果には相関がみられることが示唆された。

PFGE および MLVA によるクラスター解析の結果を図 1 および図 2 に示す。いずれの方法でも 3-4 つほどのクラスターが形成され、これらは、ほとんど各 ST に対応した。

既報 ( PLoS Pathog. 8(6): e10027776 (2012) ) では、ST19 は血清型 Typhimurium の主要な ST を占めており、ST34 は Typhimurium 単相菌の主要な ST となっている。ST99 は Typhimurium のマイナーな ST の一つである。上記のことからも本研究で供試した菌株が Typhimurium から派生する単相菌であることが示唆され、かつ、*fliAB* によるスクリーニングが妥当であることを示している。

本研究では今回ヒト由来株と非ヒト由来

株とで遺伝的特性が分かれる結果となった。今後供試菌株数を増やすことで、由来と菌型との間の傾向、関連性などが明らかになってくることが期待される。

#### D. 結論

*fliAB* による S. 14:i:- の PCR の結果から、供試菌株は Typhimurium 由来であることが示唆され、本結果は MLST の結果によっても支持された。

*fliJ*B、*hin* 遺伝子による PCR タイピングは MLST の結果と相関し、また、PFGE および MLVA の結果ともある程度の相関性が観察された。

#### E. 研究発表等

1. Matsumoto Y, Izumiya H, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M. Characterization of *bla*<sub>TEM-52</sub>-carrying plasmids of extended-spectrum-lactamase-producing *Salmonella enterica* isolates from chicken meat with a common supplier in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Dec;58(12):7545-7.
2. 泉谷秀昌：食品を介した抗生物質耐性菌の世界的感染拡大について。日本食品微生物学会、第 31 巻第 2 号、57-62、2014 年 6 月。
3. 泉谷秀昌：サルモネラ症。公衆衛生情報、第 44 巻第 5 号、20-21、2014 年 8 月。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

			ヒト	非ヒト
<i>fliAB</i> (1kb)			2	11
<i>fliB</i> 陰性	<i>hin</i> 陰性	ST34	2	0
	<i>hin</i> 陽性	ST19	0	3*
<i>fliB</i> 陰性	<i>hin</i> 陰性		0	0
	<i>hin</i> 陽性	ST99	0	8**

表 1 . PCR タイピングおよび MLST の結果。

\*、IS26 挿入型を 1 株含む。 \*\*、いずれも R140L 変異を持つ。

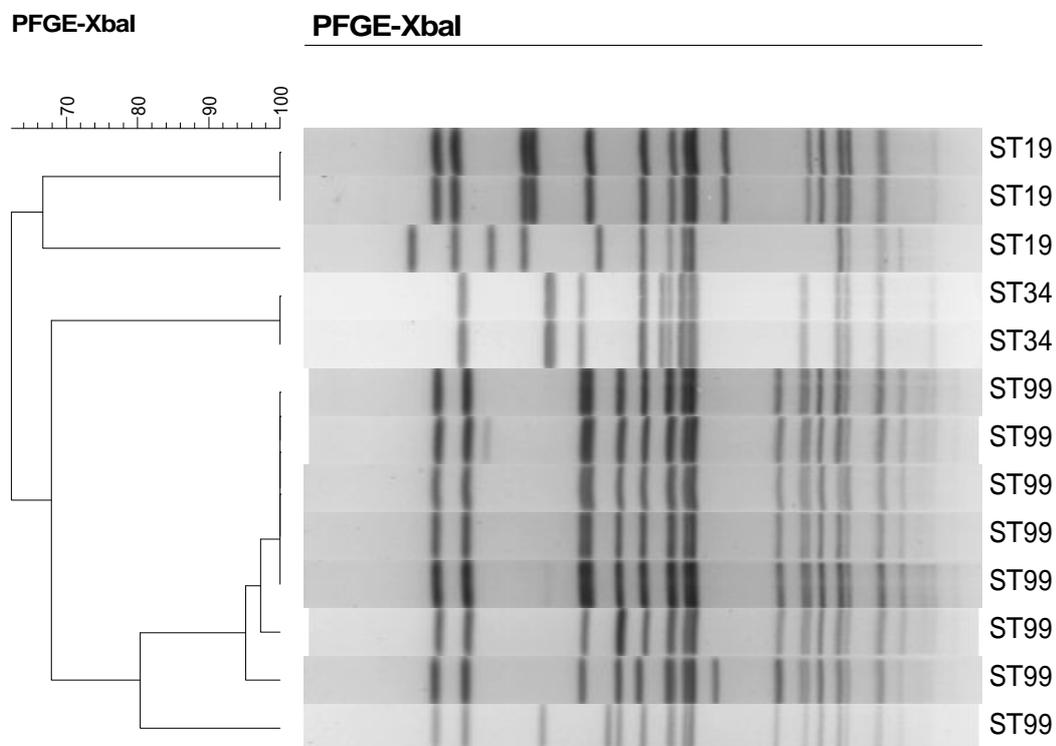


図 1 . S. I 4:i:-株 XbaI 消化 PFGE パターンのクラスター解析

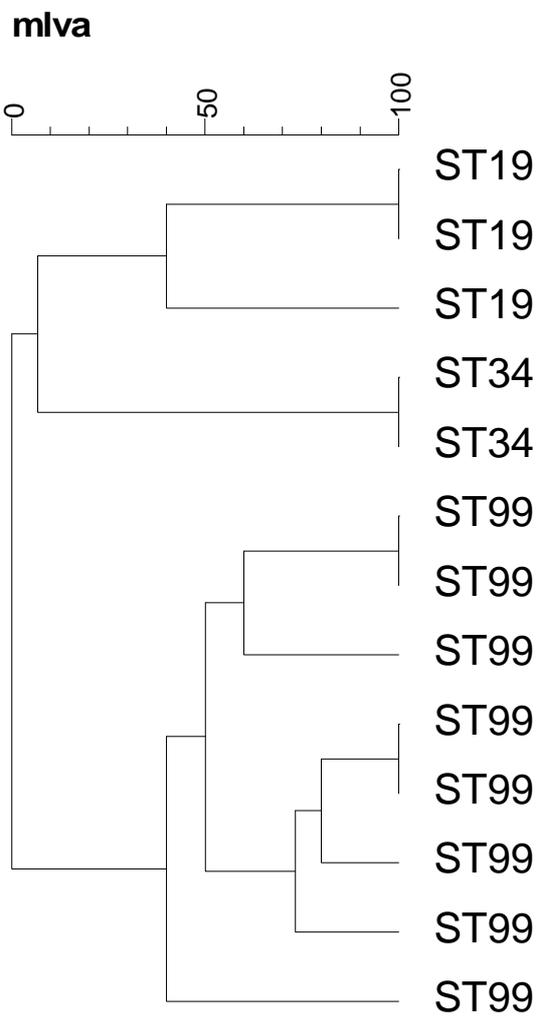


図2. S. I 4:i-株 MLVA クラスタ解析