

広島市で分離されたサルモネラのパルスフィールドゲル電気泳動解析結果

千神 彩香 青田 達明 田内 敦子* 坂本 綾
 松室 信宏 石村 勝之

はじめに

サルモネラ症(食中毒・感染症)において、事例間の疫学的関連性を追究するための分子疫学的手法として、現時点では主にパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析が利用されている。そこで、市内で発生するサルモネラ症からの同一血清型分離株間の評価への本法の適用性を検討した。

方 法

1 材料

2015年に広島市内で分離されたサルモネラのうち、複数株が分離された血清型株27株を用いた。内訳は、食中毒等事例4株、収去2株、散发事例21株である。

2 血清型別試験

サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)及びサルモネラ相誘導用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別試験を実施し、Kauffmann-Whiteの様式により血清型を決定した。

3 薬剤感受性試験

感受性ディスク(BD)を用い、アンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、ナリジクス酸(NA)、カナマイシン(KM)、クロラムフェニコール(CP)の6剤について、CLSIの抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき実施した。

4 PFGE

制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I を用いて、国立感染症研究所(感染研)で示された方法に準拠し実施した。なお、電気泳動はスメアバンド発生を防止するためチオ尿素を加えた 0.5×TBE で行った。系統樹は、Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いて解析を行い、Dice 法(最適化: 0.0%, トレランス: 1.0%)による相似係数を算出し、平均距離法(UPGMA)により作成した。

結 果

1 血清型分布

分離株27株の血清型別試験結果を表1に示した。最も多い血清型は *S. Schwarzengrund* の7株であった。次いで *S. Thompson* 5株, *S. Braenderup* 4株, *S. Saintpaul* 4株, *S. Pakistan* 3株, *S. Typhimurium* 2株, *Salmonella* 04:i:- 2株の順であった。

2 薬剤感受性

同一血清型ごとの分離株の薬剤感受性試験結果を表2に示した。

3 PFGE 解析結果

(1) *S. Schwarzengrund*

*Xba*I 処理によるバンドパターンを図1に, *Bln*I 処理によるものを図2に示した。

*Xba*I 処理では2つのクラスターを形成し, その類似度は90.8%と高かった。15019及び15022と, 15001, 15002 及び 15003 は, それぞれバンドが100%一致した。

*Bln*I 処理では, *Xba*I 処理とは異なるクラスターを形成し, 全体の類似度は93.6%と高かった。15005, 15019 及び 15022 と, 15001, 15002 及び 15003 とで100%一致した。

(2) *S. Thompson*

*Xba*I 処理を図3に, *Bln*I 処理を図4に示した。

*Xba*I 処理では, 10月発生 of 散发事例由来株15034 及び 15035 が100%一致した。その他は類似度が異なり, 最も異なる15026で55.8%であった。

*Bln*I 処理でも同様に, 15034 及び 15035 は100%一致した。その他の株の類似度は, 15030 が85.7%

表1 2015年サルモネラ分離菌株の血清型別結果

血清型	株数
<i>S. Schwarzengrund</i>	7株
<i>S. Thompson</i>	5株
<i>S. Braenderup</i>	4株
<i>S. Saintpaul</i>	4株
<i>S. Pakistan</i>	3株
<i>S. Typhimurium</i>	2株
<i>Salmonella</i> 04:i:-	2株
計	27株

*: 現 健康福祉局保健部食品指導課

表 2 2015 年サルモネラ分離菌株情報と薬剤感受性結果(血清型ごと)

菌株番号	分離年月	事例, 区分	由来	耐性薬剤	血清型
15001	2015. 1	有症事例 1	食品(鶏肉)	SM, TC	
15002	2015. 1	有症事例 1	食品(鶏肉)	SM, TC	
15003	2015. 5	食中毒事例 2	食品(鶏肉)	SM, KM, TC	
15005	2015. 5	食中毒事例 2	ヒト(患者)	SM, KM, TC	<i>S. Schwarzengrund</i>
15019	2015. 8	収去	食品(鶏肉)	SM, KM, TC	
15021	2015. 8	収去	食品(鶏肉)	-	
15022	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	SM, KM, TC, NA	
15017	2015. 8	散発事例(医療機関 B)	ヒト(患者)	-	
15026	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15030	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	<i>S. Thompson</i>
15034	2015. 10	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15035	2015. 10	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15016	2015. 8	散発事例(医療機関 B)	ヒト(患者)	-	
15018	2015. 8	散発事例(医療機関 B)	ヒト(患者)	-	<i>S. Braenderup</i>
15027	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15031	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15009	2015. 5	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15012	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	<i>S. Saintpaul</i>
15024	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	SM, TC	
15028	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	TC	
15013	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15014	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	<i>S. Pakistan</i>
15029	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15007	2015. 5	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	TC	<i>S. Typhimurium</i>
15033	2015. 9	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	-	
15011	2015. 7	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	SM, TC, ABPC, CP	<i>Salmonella</i> 04:i:-
15023	2015. 8	散発事例(医療機関 A)	ヒト(患者)	SM, TC, ABPC, CP	

と高かったが, 15017 は 51.1%を示した。

(3) *S. Braenderup*

Xba I 処理を図5に, *Bln* I 処理を図6に示した。*Xba* I 処理では 4 株全てのバンドが 99.9%一致した。*Bln* I 処理では 15016, 15018 及び 15027 でバンドが 100%一致し, これら 3 株と 15031 との類似度も 88.9%と高かった。

(4) *S. Saintpaul*

Xba I 処理を図7に, *Bln* I 処理を図8に示した。*Xba* I 処理及び *Bln* I 処理において, 類似したクラスターを形成した。どちらも 15009 及び 15012 と, 15024 及び 15028 のクラスターに分けられ, 両クラスター間の類似度は *Xba* I 処理では 51.1%, *Bln* I 処理では 51.5%と共に低い値を示した。なお, *Bln* I 処理での 15024 及び 15028 は 100%一致

した。

(5) *S. Pakistan*

Xba I 処理を図9に, *Bln* I 処理を図10に示した。*Xba* I 処理及び *Bln* I 処理において類似のクラスターを形成した。どちらも 15013 及び 15014 が 100%一致した。この 2 株と 15029 との類似度は, *Xba* I 処理では 70.4%, *Bln* I 処理では 66.7%を示した。

(6) *S. Typhimurium*

Xba I 処理を図11に, *Bln* I 処理を図12に示した。2 株の類似度は *Xba* I 処理では 81.3%, *Bln* I 処理では 37.5%と異なった。

(7) *Salmonella* 04:i:-

Xba I 処理を図13に, *Bln* I 処理を図14に示した。2 株の類似度は *Xba* I 処理では 74.3%, *Bln* I

処理では 64.3%を示した。

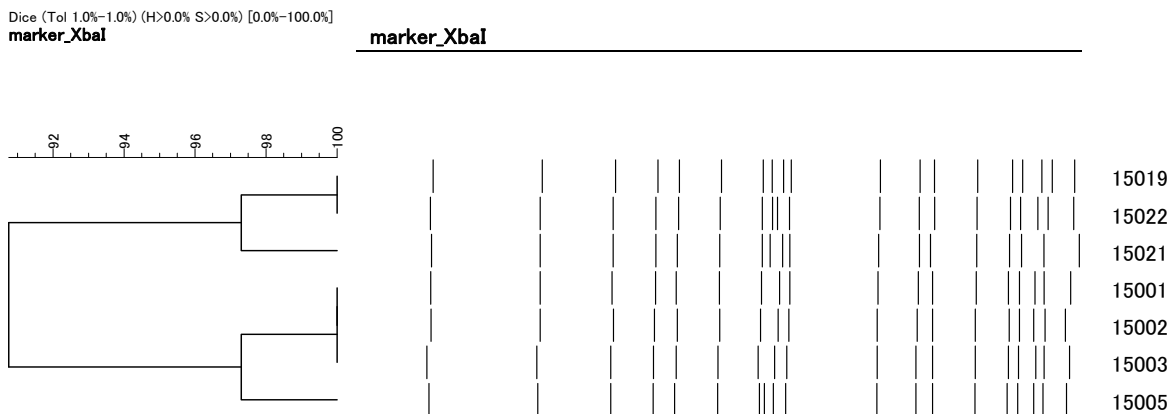


図 1 2015 年 *S. Schwarzengrund* 分離菌株の *Xba* I 処理による PFGE クラスタ

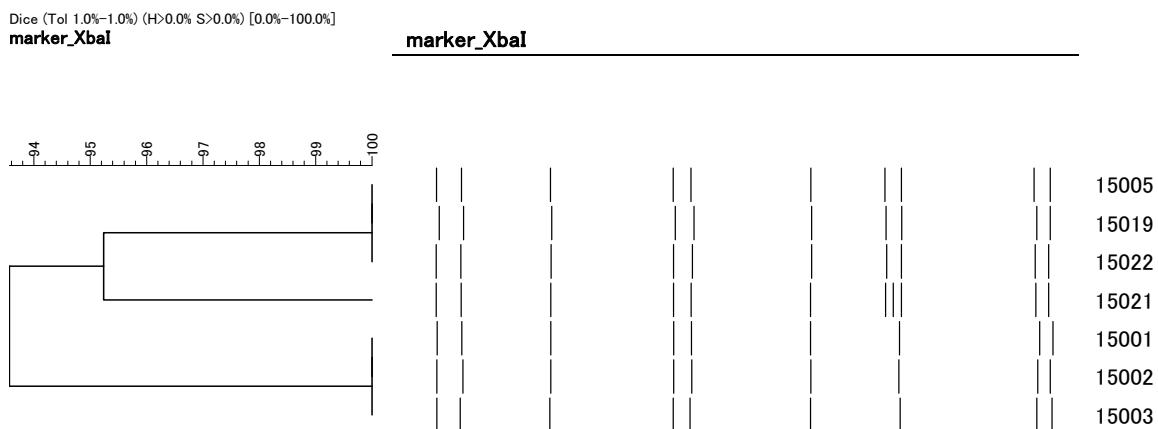


図 2 2015 年 *S. Schwarzengrund* 分離菌株の *Bln* I 処理による PFGE クラスタ

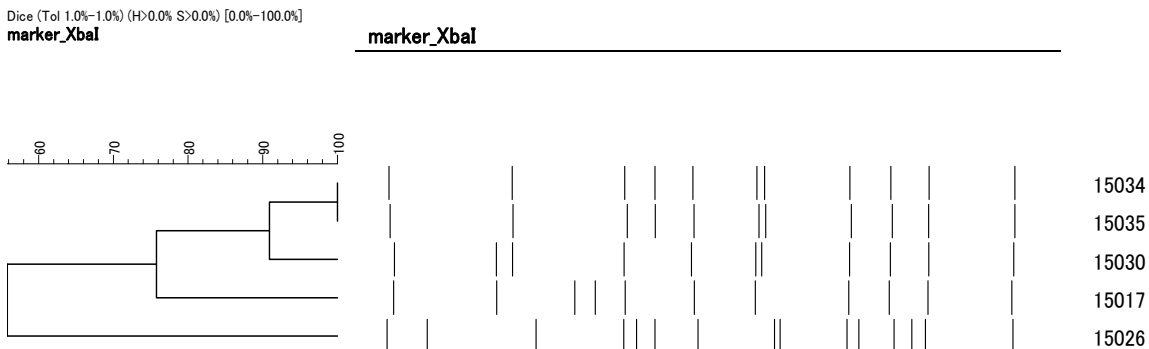


図 3 2015 年 *S. Thompson* 分離菌株の *Xba* I 処理による PFGE クラスタ

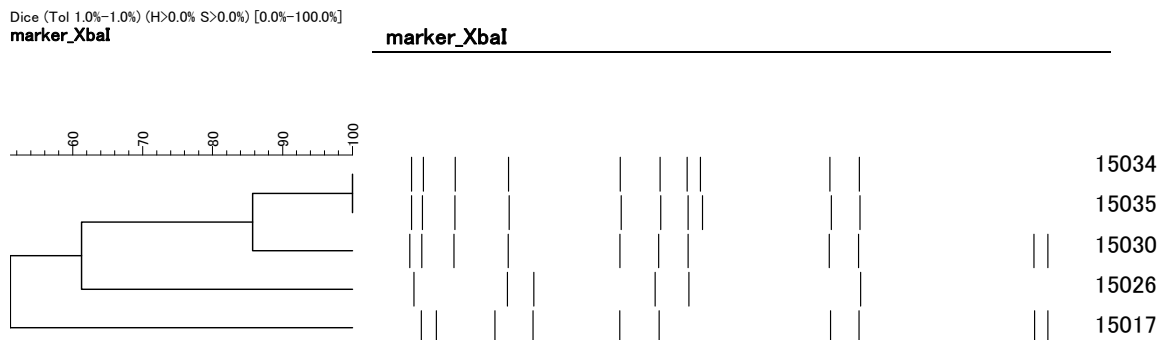


図 4 2015 年 *S. Thompson* 分離菌株の *Bln* I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI **marker_XbaI**

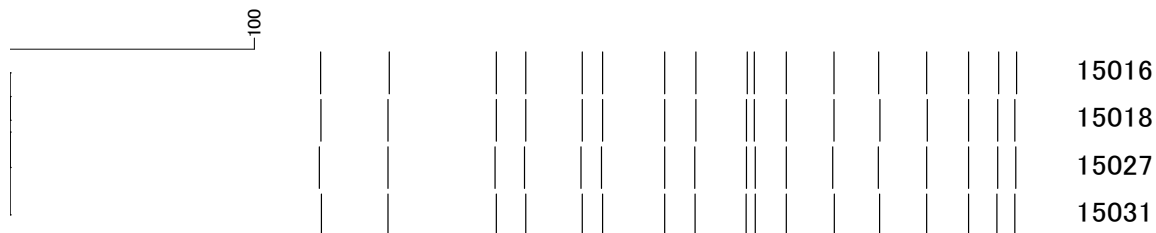


図 5 2015 年 *S. Braenderup* 分離菌株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI **marker_XbaI**

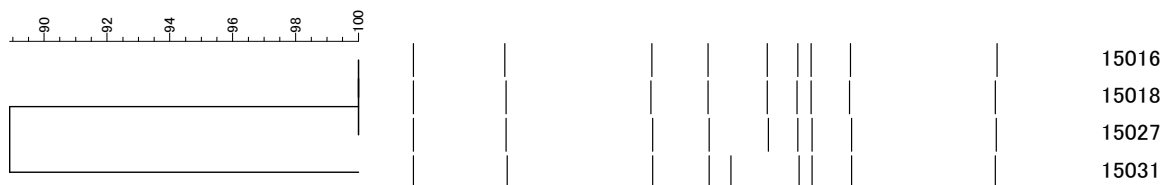


図 6 2015 年 *S. Braenderup* 分離菌株の *Bln*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI **marker_XbaI**

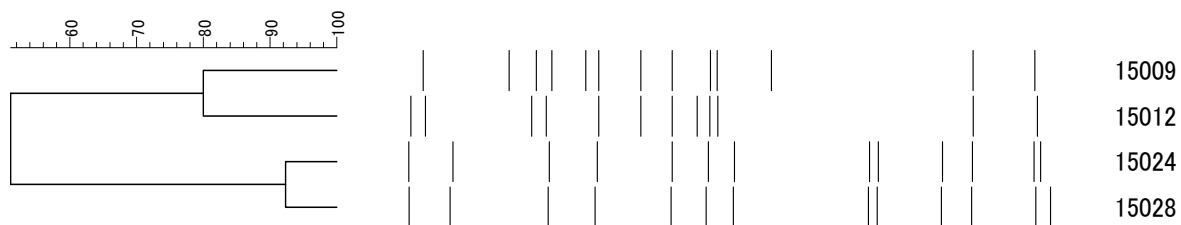


図 7 2015 年 *S. Saintpaul* 分離菌株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI **marker_XbaI**

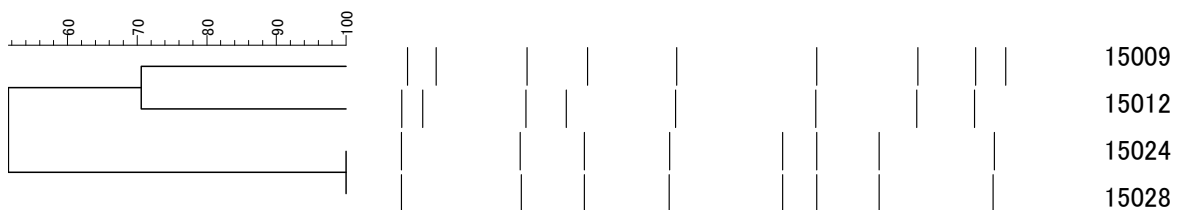


図 8 2015 年 *S. Saintpaul* 分離菌株の *Bln*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI

marker_XbaI

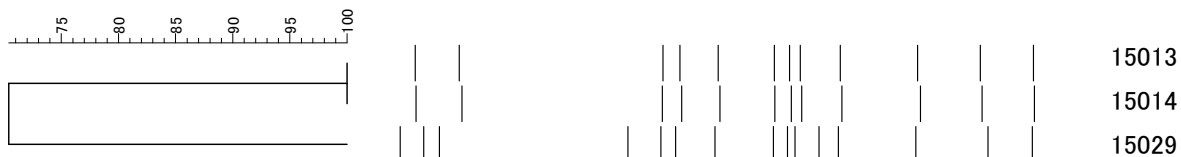


図 9 2015 年 *S. Pakistan* 分離菌株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI

marker_XbaI

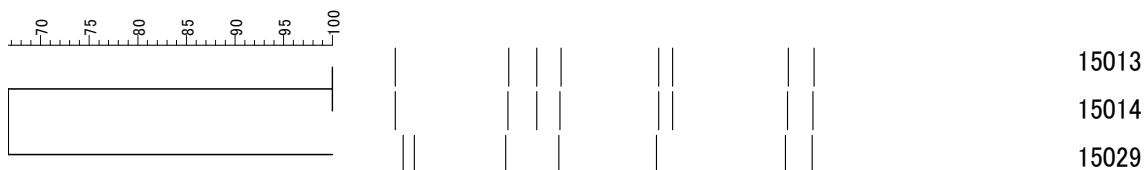


図 10 2015 年 *S. Pakistan* 分離菌株の *Bln*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI

marker_XbaI

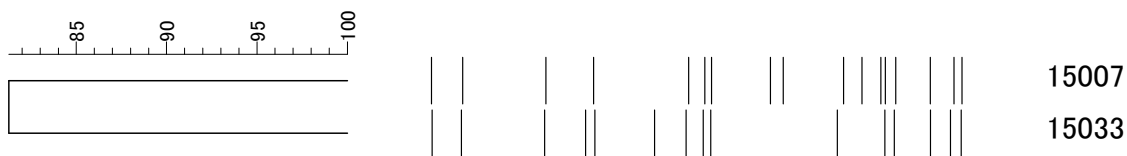


図 11 2015 年 *S. Typhimurium* 分離菌株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI

marker_XbaI



図 12 2015 年 *S. Typhimurium* 分離菌株の *Bln*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI

marker_XbaI

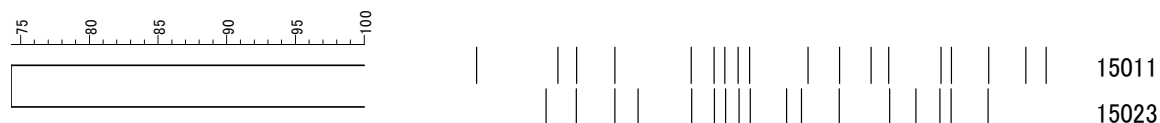


図 13 2015 年 *Salmonella* 04:i:- 分離菌株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタ

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI

marker_XbaI

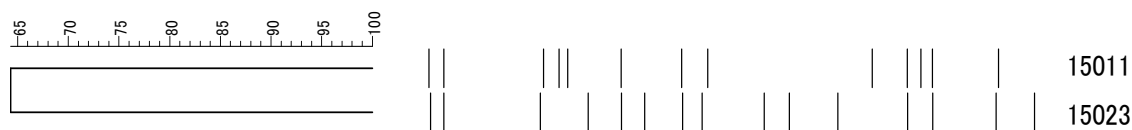


図 14 2015 年 *Salmonella* 04 : i : - 分離菌株の *Bln*I 処理による PFGE クラスター

考 察

現在、本邦でも細菌性食中毒等の疫学的解析手法として、次世代シーケンサーによる網羅的解析手法の開発が進みつつあるが、現在のところ細菌性の食中毒や感染症の発生時の分離菌株の分子疫学解析には、PFGE 法が最も広く普及し、応用範囲の広い解析手法となっている。

サルモネラにおいても、これまでサルモネラ・エンテリティディス食中毒の解析等において広く使用されてきた。しかし、腸管出血性大腸菌 O157 や O26, O111 等に比較すると、本邦におけるその有用性の評価はあまり報告されていない。そこで、本法の型別能の基礎的な把握を目的として、2015 年に広島市で分離された同一血清型株を用いて検討した。

S. Schwarzengrund では、*Xba*I 処理及び *Bln*I 処理において同一事例関連株である 15001 と 15002 株は一致し、関連性を示唆する結果であったが、

異なる食中毒事例からの 15003 株もバンドが一致した。また、全体の類似度も約 90% と高かった。

このように *S. Schwarzengrund*, *S. Thompson*, *S. Braenderup*, *S. Saintpaul*, *S. Pakistan* など、多くの血清型で PFGE バンドが一致した株がみられた。また、今回、*S. Schwarzengrund*, *S. Braenderup* は、類似度の高い株で構成された。

PFGE の有効性について、今回の検討結果では、類似度の高いバンドが出現したのは株間に関連性があるためなのか、あるいは同一血清型サルモネラの PFGE 法の識別限界によるものなのか、明確にはできなかった。疫学情報のある菌株を追加するなど、さらに検討が必要であるが、結果の解釈は慎重を要する。

謝 辞

この調査にご協力いただきました医療機関及び保健所の関係各位に対し、深謝いたします。