

機関番号：84407

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890317

研究課題名(和文) 日本で分離頻度が比較的高いサルモネラ属菌 3 血清型を対象とする分子疫学解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a new molecular typing method to characterize *Salmonella enterica* serotype Montevideo, Infantis, and Schwarzengrund isolated in Osaka, Japan.

研究代表者

原田 哲也 (HARADA TETSUYA)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・研究員

研究者番号：70516723

研究成果の概要(和文)：大阪府内で分離された *Salmonella enterica* serotype Montevideo、*S. Infantis* および *S. Schwarzengrund* を供試株として新たな分子疫学解析法の検討を行ない、*S. Montevideo* で 3 領域を標的とした MLVA 法を確立した。本方法は、特別な装置を必要としない簡便な方法であるため、国内外の様々な施設で Montevideo の分子疫学解析が実施可能となり、diffuse outbreak の早期探知に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a new molecular analysis method for differentiating *Salmonella enterica* serovar Montevideo, *Salmonella* Infantis and *Salmonella* Schwarzengrund isolates in Osaka Prefecture, Japan. We described a multiple-locus variable-number tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA) method based on agarose gel electrophoresis separation of polymerase chain reaction products of three simple VNTR loci in *Salmonella* Montevideo. We believe that the MLVA method can facilitate assessment of the molecular epidemiology of *Salmonella* Montevideo isolates in light of its present utility in laboratories without a PFGE apparatus or capillary array electrophoresis devices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
2010 年度	750,000 円	225,000 円	975,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	1,750,000 円	525,000 円	2,275,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：公衆衛生学・健康科学

キーワード：公衆衛生・分子疫学解析法・サルモネラ

1. 研究開始当初の背景

Salmonella 属菌はヒト腸管感染症起因

菌で主要な食中毒原因菌の一つであり、近年、汚染食品が広域に流通したため大規模な集

団感染を引き起こし、長期間にわたって患者の発生がみられた事例が国内外で多発している。また、本菌は乾燥や浸透圧の変化に強く環境中あるいは食品中で高い生残性を示すため、同一汚染源による感染事例でありながら、二次汚染、三次汚染により患者の発生時期や発生場所に共通性がみられない、いわゆる diffuse outbreak の原因となることでも重要な菌である。そのため、*Salmonella* 集団感染事例では、感染拡大防止を主目的とした迅速かつ的確な行政対応が必要であり、原因食品、感染源、または感染経路を特定するため、患者および食品から分離された菌に対しては分子生物学的手法を用い、疫学的に解析することが必須条件となる。

Salmonella 属菌の分子疫学解析法では染色体 DNA の多様性を指標とした Pulse-Field Gel electrophoresis (PFGE) 法が gold-standard とされ、制限酵素 *Xba*I を用いた方法が広く行われている。しかし、*Salmonella* 属菌は、染色体 DNA の多様性が低いことから、疫学的に関連性がないと考えられる株間でも相同性の高い PFGE パターンが示される例が多く、PFGE 法だけでは十分妥当性のある結果を得ることができない。また、PFGE はデジタルデータとしての共有が難しく、様々な地域で分離された数多くの株を比較するとき多大な労力を必要とする。このような理由から、最近 PFGE 法に代わる分子疫学解析法が研究され *Salmonella* 属菌疫学調査に利用されはじめている。特に、*Salmonella enterica* serotype Enteritidis (SE) および *S. Typhimurium* (ST) は世界中で分離され公衆衛生上の重要性も高いことから、Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) を含む様々な分子疫学解析法の研究が進んでいる。しかし、他の血清型は下痢症患者からの分離頻度が低いという理由で PFGE に代わる分子疫学解析法の検討はほとんど行われておらず、また、疫学情報も少ない。一方、日本では毎年 *Salmonella* 感染症患者から *S. Montevideo*、*S. Infantis*、*S. Saintpaul* ならびに *S. Schwarzengrund* がそれぞれ数から十数%の割合で分離されており (<https://hasseidoko.mhlw.go.jp/>

Byogentai/Pdf/data48j.pdf)、その分離率は欧米諸国に比べ高い。

2. 研究の目的

大阪府内で分離された *S. Montevideo*、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund* について MLVA 法を検討し、薬剤感受性試験および PFGE 法と識別能を比較することで、新たな分子疫学解析法の確立を目指す。また、高額な機器や試薬を必要としない迅速簡便な MLVA スクリーニング法の開発を行うことで、様々な検査機関での *Salmonella* 属菌の分子疫学解析を可能にし、diffuse outbreak の早期探知を図る。

3. 研究の方法

(1) 供試株

2004 年から 2008 年に下痢症患者、保菌者ならびに食品から分離された *S. Montevideo* 計 56 株、*S. Infantis* 計 68 株および *S. Schwarzengrund* 62 株を供試株とした。これらに加え、*S. Montevideo* については 1991 年から 1998 年に散発下痢症患者および保菌者から分離された 14 株を加え、疫学解析を行った。

(2) MLVA

S. Montevideo、*Infantis*、*Schwarzengrund* の VNTR 領域を選定するため、現在公開されている ST LT2 (GenBank accession no. NC_003197)、Newport SL254 (GenBank accession no. NC_011080)、*Schwarzengrund* CVM19633 (GenBank accession no. NC_011094)、Heidelberg SL476 (GenBank accession no. NC_011083) の染色体 DNA シーケンスを Tandem Repeat Finder software により解析し、各 VNTR 候補領域について PCR primer を設計した。さらに、SE および ST の既報論文より VNTR 領域候補を選定した。

供試株のうち疫学的関連性のない *S. Montevideo* 13 株、*S. Infantis* 10 株、*S.*

Schwarzengrund 13株を対象とし、各 primer を用いて PCR を行った。反応液は puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) を用い、各 primer 0.2 μ M を含む 25 μ l とした。PCR 条件は 94°C 5 分後、94°C、55°C、72°C 各 30 秒を 30 サイクル行い、最終伸長反応を 72°C 5 分で行った。得られた PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動法(文献 1)またはキャピラリー電気泳動法 (QIACEL)により比較した。

(3)ダイレクトシーケンス

供試株間の PCR 増幅産物で分子量の違いあるいは産物の有無が確認された VNTR 領域候補についてシーケンス用 primer を設計し、BigDye Terminator v3.1 (ABI)を用いたダイレクトシーケンス解析を実施した。

(4)薬剤感受性試験

CLSI のディスク感受性試験実施基準に基づき、センシディスク (BD) を用いて実施した。供試薬剤はアンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ST 合剤 (ST)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、セフォタキシム (CTX)、セフポドキシム (CPDX) の 11 剤を使用した。

(5)PFGE

国立感染症研究所標準プロトコールに基づき、制限酵素 *Xba* I および *Bln* I (ロシュ社)を用いて実施した。サイズマーカーには、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断バンドを使用した。デンドログラム作成は BioNumerics ver. 6.1 (Applied Maths) を使用し、類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.0%で行った。

(6) *S. Montevideo* MLVA スクリーニング法

S. Montevideo 供試株で高い識別能を示した 3 つの VNTR 領域について Multiplex PCR を行った。反応液および反応条件は上述した方法に従い、アガロースゲル電気泳動は川森らの方法を用いた(文献 1)。

4. 研究成果

(1) *S. Montevideo*、*S. Infantis*、*S. Schwarzengrund* における VNTR 領域の選定

Tandem Repeat Finder software を用い 4 つの参照株の解析を行った結果、597 の VNTR 領域が選出された。これらのうち、2 つ以上の参照株に認められた 100% 相同の繰り返し配列領域を 33 選出し、VNTR 領域候補とした。さらに、SE および ST の既報論文より 9 領域を VNTR 領域候補として加えた。供試株より選出した代表株について、これら 42 の領域候補を標的とした PCR を実施し、増幅産物を比較した。その結果、*S. Montevideo* 株間では 9 つの PCR 増幅産物で分子量の違いあるいは産物の有無が確認され、*S. Schwarzengrund* では 4 つの PCR 増幅産物で株間の差異が確認された。*S. Montevideo* 株では他の 29 株についても PCR を実施し、それぞれの領域で増幅産物分子量の違いを確認した。一方、*S. Infantis* では、株間で差異がみられたのは 1 領域のみであった。

(2) *S. Montevideo* における VNTR 領域の精査

S. Montevideo 株間で認められた 9 つの VNTR 領域候補すべてについて、シーケンス用 primer を用い、ダイレクトシーケンス法で増幅産物の塩基配列を比較した。その結果、最終的に 3 つの VNTR 領域が特定された(表 1)(文献 2)。

表 1. *S. Montevideo* の MLVA 解析に用いた VNTR 配列および PCR primer

Locus 名	参照株 (GenBank Accession No.)	Tandem repeat 塩基配列	参照株配列 ^a	泳動用 primer	参照株 PCR 増幅産物分子量 (bp)	シーケンス用 primer
M-1	<i>S. Schwarzengrund str.</i> CVM19633 (NC_011094)	cgagtcac	8×3	(F) catgcgcctatgtgatgtaga (R) ttggtggctttaccatttt	148	(F) aaccccaaacaccaacaag (R) actgcaaccgataacaaa
M-2	<i>S. Newport str.</i> SL254 (NC_011080)	cacgac	6×6.3	(F) atgttcttggcggacatgg (R) ccttcgggatgtatgtgacc	116	(F) cgcttttatcattgccatt (R) ggtcaggccgaatagcaggat
M-3	<i>S. Heidelberg str.</i> SL476 (NC_011083)	ctg	3×5.3	(F) gtacgtggttctgtaacagg (R) cagaacaacgccagcaaac	91	(F) ccagcagcttcatctttt (R) aatccgaatcagctcaccag

^a 配列サイズ (bp) × 反復数

(3) *S. Montevideo* の分子疫学解析

S. Montevideo における 3 つの VNTR 領域を標的とした MLVA 法の分離能を評価し、その有効性を検証するため薬剤感受性試験、PFGE 解析および MLVA 解析による *S. Montevideo* 株の疫学解析を行った。供試株より疫学的関連性のないと考えられる 14 株を選出し、さらに、1991 年から 2003 年に分離された *S. Montevideo* 15 株を加え、計 29 株について解析を行った。11 薬剤について行った感受性試験では、29 株中 1 株(16A78)のみがナリジクス酸に耐性を示した。また、制限酵素 *Xba*I

および *Bln*I を用いた PFGE では、29 株は 17 (PFGE type a-q) のパターン (相同性 90%) に分けられた (図 1) (文献 2)。

MLVA 解析では、6A118 を除くすべての株で 3 つの VNTR 領域の PCR 増幅産物が確認されたが、6A118 では locus M-1 で増幅産物が認められなかった。すべての PCR 産物のダイレクトシーケンス解析により供試株は、locus M-1 で反復数 1.0-3.5 の 4 タイプに、locus M-2 で反復数 8.3-21.3 の 6 タイプに、locus M-3 で反復数 5.3-16.3 の 6 タイプに分けられた。3 領域すべてを比較した結果、29 株は 11 タイプ (MLVA type A-K) に分類された (図 1)。

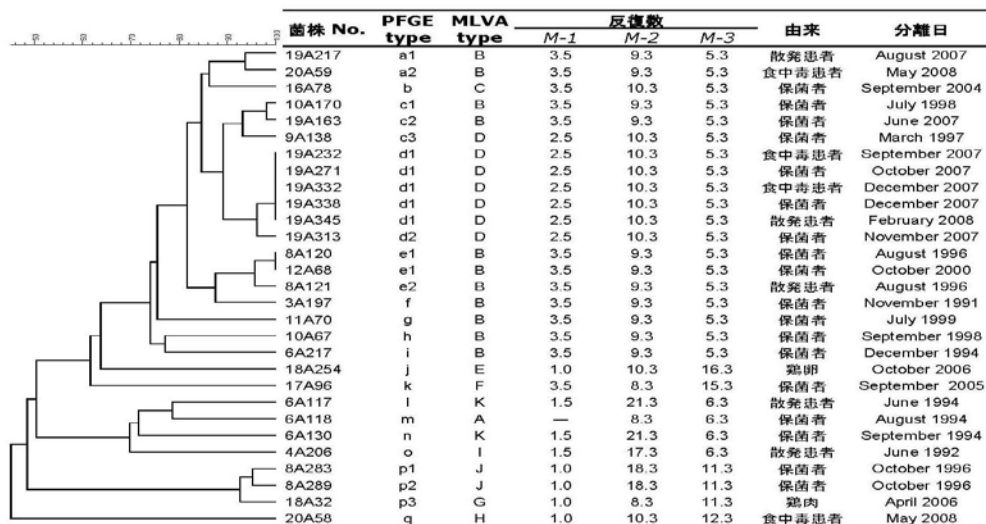


図 1. *S. Montevideo* 29 株の PFGE および MLVA 解析結果
相同性を%で表示

11のMLVAタイプを示したそれぞれの株について MLVA スクリーニング法を実施したところ、3時間のアガロースゲル電気泳動で各タイプの識別が可能であり、純培養菌から6時間程度でMLVA解析を行うことができた(図2)。

本方法は PFGE にやや分離能が劣るものの特別な装置や高額の試薬を必要としないため、本方法を用いることで PFGE よりも安価で簡便かつ迅速に *S. Montevideo* の分子疫学解析を行うことが可能となる。



図2. *S. Montevideo* の MLVA 解析における 11 タイプ (MLVA type A-K) のアガロースゲル電気泳動像

Lane M; 10 bp ladder

今回の *S. Montevideo* 分子疫学解析では、2007年から2008年の間に大阪府で分離された6株(19A232、19A271、19A313、19A332、19A338、19A345)が、疫学的関連性がないにもかかわらず、同一の薬剤感受性パターン(感受性)、PFGEパターン(PFGE type d)、MLVAパターン(MLVA type D)を示すことが明らかとなった。このパターンを示す株は1991年から2008年の間でこの時期にのみ出現が確認されたため、特定の *S. Montevideo* による diffuse outbreak がこの期間に発生した可能性が強く示唆された。また、今回検討した MLVA 法でもこの diffuse outbreak 株を特定することが可能であったことから、分子疫学解析における本方法の有効性が示されたと考える。

引用文献

文献1. Kawamori, F., Hiroi, M., Harada, T., Ohata, K., Sugiyama, K., Masuda, T., and Ohashi, N. Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157: H7 isolates from

variable-number tandem repeat analysis and PFGE. 2008; *J Med Microbiol* 57: 58-63.

文献2. Harada, T., Sakata, J., Kanki, M., Seto, K., Taguchi, M., and Kumeda, Y. Molecular Epidemiological Investigation of a Diffuse Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Montevideo Isolates in Osaka Prefecture, Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* (in press)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Harada, T., Sakata, J., Kanki, M., Seto, K., Taguchi, M., and Kumeda, Y. Molecular Epidemiological Investigation of a Diffuse Outbreak Caused by *Salmonella enterica* Serotype Montevideo Isolates in Osaka Prefecture, Japan. *Foodborne Pathog.*

Dis. 査読有. (in press)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 哲也 (HARADA TETSUYA)

大阪府立公衆衛生研究所.

感染症部・研究員

研究者番号：70516723