

Ⅲ 調查研究報告

サルモネラ菌の迅速な同定のための検出法及び血清型別法の確立（平成 25～26 年度）

サルモネラの Multiplex PCR 法による血清型別法の確立

今野貴之 高橋志保 樫尾拓子 熊谷優子

平成 25 年度からの調査研究事業では、サルモネラによる食中毒、感染症発生の際の迅速な検査体制の構築を目的に、サルモネラの遺伝子解析法による検出法及び血清型別法の検討を行った。本研究により、血清型別については Multiplex PCR 法を用いて、主要な抗原の遺伝子の検出が可能となり、迅速かつ正確な血清型の同定が可能となった。

1. はじめに

サルモネラは、細菌性の食中毒及び感染性胃腸炎の主要な原因菌のひとつである。サルモネラには、菌体表面の O 抗原と 2 つのべん毛抗原の組み合わせ（O:H1:H2）によって 2,500 種類以上の血清型が存在する。中でも、ヒトに病原性を示す *S. enterica* の亜種 I には固有の名称が付与されている。そのため、サルモネラにおける血清型は、重要な疫学的指標となっており、食中毒対策や感染症のサーベイランスに役立っている。

当センターにおいても、食中毒の早期発見や感染症の発生動向を調査するため、サルモネラの血清型別による疫学解析を実施している。しかしながら、複数回の培養を伴う従来の血清型別法は時間を要し、近年、従来法では血清型を特定できない菌株も散見されるようになってきた。そこで、平成 25 年度からの調査研究事業では、より迅速かつ正確なサルモネラ検査体制の構築を目的に、遺伝子解析法によるサルモネラの血清型別法の検討を行ってきた。

本報では、サルモネラの血清型を決定している 3 つの抗原の合成に関与する遺伝子を対象にした Multiplex PCR 法による血清型別法の検討結果とその有用性について報告する。

2. 方法

2.1 血清型別

O 群別は、血液寒天培地上の菌を掻き取り、スライドガラス上で各 O 群血清と混和し、特異的な凝集反応を確認した。

H 型別は、増菌した BHI 培養液に 3%ホルマリン加生理食塩水を加えた抗原液と各 H 型血清

を混和し、特異的な凝集反応を確認した。2 つ目の H 抗原を誘導するため、陽性となった H 型の血清を含む相誘導培地に菌を接種し、菌の運動性を確認した。相誘導培地上の菌を BHI 培地に接種し、同様にして 2 相目の H 抗原を特定した。

2.2 PCR 法による抗原遺伝子の解析

菌株からの DNA 抽出は、アルカリ加熱抽出法により行った。

O 抗原の特定、Franklin ら¹⁾及び Hong ら²⁾の報告をもとに、Ex-taq HS (Takara) を用いて行った。O9 群の特定には Hirose ら³⁾、O3 群の特定は、Herrera-León ら (2007)⁴⁾の primer も使用した。

H1 抗原の特定は、Hong ら²⁾、Herrera-León ら (2004)⁵⁾、Levy ら⁶⁾、今野⁷⁾の報告をもとに Ex-taq HS (Takara) を用いて行った。

H2 抗原の特定は、Hong ら²⁾及び Echeita ら⁸⁾の報告をもとに Ex-taq HS (Takara) を用いて行った。H2 の 1 complex 及び e,n complex の詳細解析は Echeita ら⁸⁾の報告をもとに Standard taq (グライナー) を用いて行った。

本研究で設計・使用したプライマーは、表 1 のとおり。

3. 結果と考察

3.1 PCR 法による O 群別

Multiplex PCR 法により主要な O 抗原である O2 群、O3 群、O4 群、O7 群、O8 群、O9 群、O13 群について、同時検出が可能であった (図 1A)。ただし、O2 群と O9 群は共通の遺伝子を対象にしており、両者の分類には Hirose ら³⁾の O9 群を検出する PCR 法が有効と考えられた。

表1 使用した Primer の一覧

Mix	Target	Primer Sequence (5' to 3')	PCR conditions	Fragment size (bp)	Reference		
O群	O2/O9	F atgggagcgttgggttc	2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 2 min at 72°C	624	2)		
		R cgctctccactaccaacttc					
	O4	F tgaagaatatgtaattgtcagtg		789	1)		
		R ttccattatctcttggctctatcg					
	O7	F attgcccagtcgggttg		341	2)		
		R ccataaccgacttccatttcc					
	O8	F cgtctataaaccgagccaac		397	2)		
		R ctgctttatccctctcaccg					
	O3	F gatagcaacgttcggaatc		281	2)		
		R cccaatagcaataaaccaagc					
O13	F ctgaaaaatggtttagattg	502	1)				
	R accattggatactgtaactg						
H1-1	a/b/d	F actcaggctcccgtaacgc	2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C	423	6)		
		R gagccagcaccatcaagtgc					
		R gcttcatacagaccatctttagttg					
		R ggctagtattgtccttatcgg					
H1-2	e,h/i/l,y/z10	F gcagatcaactctcagaccctggg	2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C	200	5)		
		R aacgaaagcgtagcagacaag					
	e,h	F tagccatcttaccagttccc		272	2)		
		R cctgtcacttctcgtggtat					
	l,v	F gcaactggcgttactcaatctc		422	2)		
		R gtgatctgaaatccagctcaag					
G	F aagtttcgcaactctcgttttgg	532	5)				
	R						
H1-3	c/r/k/y	F actcaggctcccgtaacgc	2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C	405	same as a/b/d		
		R attctgttcgagtcggaat					
		R gatcaccagtaataagcagg				475	7)
		R gtcagtcgcatcagcaaagett					
		R gagcatcttaccgctggca					
H2c	z6	F agaaaagcgtatgatgtagtaag	2 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C	399	This study		
		R cagcaatttctggctctgtaa					
	1-complex	F agaaaagcgtatgatgtaaa		294		2)	
		R attgtggttttagttgcgcc					
l,w	F gtggggcaacmctcaataactg	241	8)				
	R cctgccactttcgtggttgc						
e,n-complex	F taactggcgatacattgactg	152	2)				
	R tagcaccgaatgatacagcc						
H2	1,2/5/6/7	F cttatgccrtaaatggtactactg	1 min at 94°C/ 30 cycles (30 sec at 94°C, 20 sec at 58°C, 1 min at 72°C)/ 5 min at 72°C	390	8)		
		R ttgaccaaykymcgsatt					
	1,2	F ggttacagvaccgtaccag		99	modified from 8)		
		R ctctgtactctgttttgggtgta					
	1,5	F taatcgccattttgtcgag		291	191		
		R gtggggcaacmctcaataactg					
	1,6	F gttggggcaacmctcaataactg		241	8)		
		R cctgccactttcgtggttgc					
	1,7	F taatcgccattttgtcgag		241	8)		
		R gttggggcaacmctcaataactg					
l,w	F cctgccactttcgtggttgc	241	8)				
	R						
e,n,x/e,n,z15	e,n,x	F ggcaacccgacagtaactggcgatac	55	135			
		R ccatcctaaaggatacggc					
		R atcaacggtaactcatattg					
O9 group	O9/O9,46	F gaggaagggaatgaagctttt	2 min at 94°C/ 25 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C)/ 2 min at 72°C	614	3)		
		R tagcaaaactgtctcccaccatac					
	O9,46	F gaktataaattgyagatattcttcttc		234	This study		
		R ctragctatggcaatcacgc					
O3 group	O3,10/O1,3,19	F taaagtatatggctgatttaacc	2 min at 94°C/ 25 cycles (30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C)/ 2 min at 72°C	345	4)		
		R gttaaaatgacagattgagcagag					
	O3,10	F agccacgaacattcctaactatg		492	This study		
		R gttattaataactaactatcggccac					

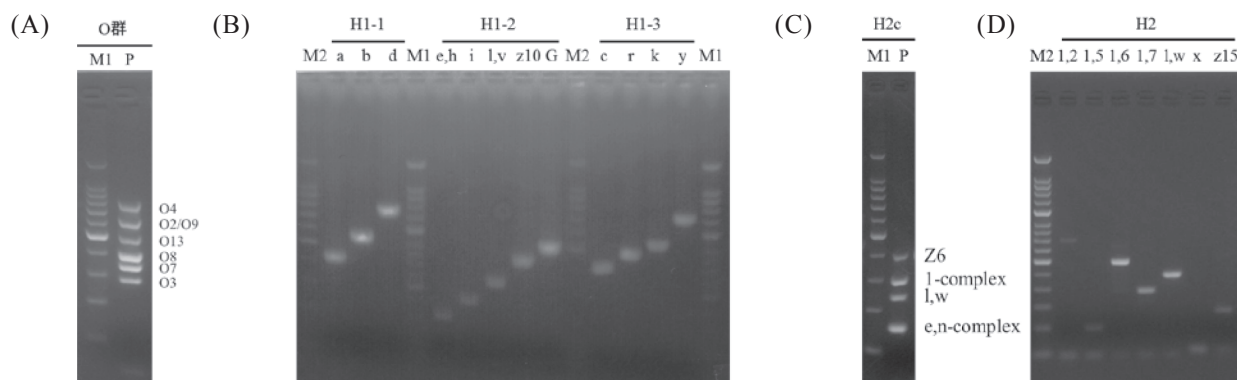


図1 Multiplex PCR法によるサルモネラの血清型別法

(A) lane M1: 100 bp DNA size ladder, P: Typhimurium (O4), Enteritidis (O9), Agbeni (O13), Hadar (O8), Infantis (O7), Anatum (O3). (B) lane M2: 50 bp DNA size ladder, a: Narashino, b: Paratyphi B, d: Livingstone, e,h: Newport, i: Typhimurium, l,v: Litchfield, z10: Mbandaka, G: Enteritidis, c: Choleraesuis, r: Infantis, k: Thompson, y: Bareilly. (C) P: Weltevreden (z6), Typhimurium (1-complex), Livingstone (l,w), Braenderup (e,n-complex). (D) 1,2: Typhimurium, 1,5: Infantis, 1,6: Anatum, 1,7: Bredeney, l,w: Livingstone, x: Hadar, z15: Braenderup.

O9群の中には、O9とO9,46及びO9,46,27が存在する。O9ではO抗原合成遺伝子群中のH-rpt遺伝子が欠損していることから⁹⁾、この領域を対象にPCR法を行い、両者の鑑別が可能であることを確認した(図2)。

O3群の中にも、O3,10とO1,3,19が存在する。本研究では、wbaK遺伝子を対象にしたPCR法により両者の鑑別が可能であることを確認した(図2)。

O抗原が不明であった4株についてPCR法によるO群別を行ったところ、2株でO群が特定できた(表2)。サルモネラでは培養条件等に

よりR型変異し、O抗原の特異性を失うことがある¹⁰⁾。PCR法によりO群別が可能であった2株のうち、Sa2730はAbony(O4:b:e,n,x)の培養中に出現したR型菌であるが、PCR法では元の血清型と同一であることが確認できた。

サルモネラの血清型の中には、TyphiやParatyphi Aのようにチフス症やパラチフス症の原因となり重症化しやすい血清型も存在する。Typhiでは、vi抗原と呼ばれる莢膜様抗原の影響によりO群別が難しい場合もあり、PCR法によるO群別は重要な血清型を迅速に推定するのに役立つと考えられる。

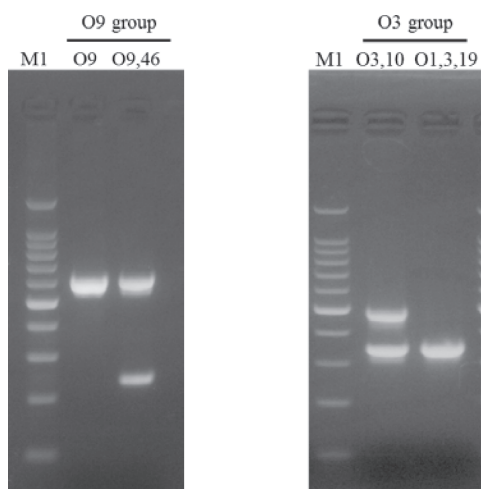


図2 O9及びO3 groupの鑑別

lane M1: 100 bp DNA size ladder, O9: Enteritidis, O9,46: Hillington (神奈川県衛生研究所より分与), O3,10: Anatum, O1,3,19: Senftenberg.

3.2 PCR法によるH1, H2型別

H1抗原については、3つのMultiplex PCR法により12種類の型別が可能であった(図1B)。ただし、G-complexについては、PCR法による亜型の分類は困難であった。

H2抗原については、1, w, z6, 1-complex及びe,n-complexの4種類に大別するMultiplex PCR法に加え、1-complexの亜型4種類とe,n-complexの亜型2種類も型別可能なMultiplex PCR法により、合計8種類の型別が可能であった(図1C,D)。

サルモネラは、多くの場合2相性を示し、血清型の同定においても2種類のH抗原を特定する必要がある。2つの相の切り替えは、fljAB operonによって制御されており¹¹⁾、培養した菌

では通常、どちらか一方が発現している。2相目を検出するためには、1相目で検出されたH抗原に対する抗血清を含む培地に一度接種し、2相目の発現を誘導する必要がある。従って、2つのH抗原の型を決めるには合計3回の培養を行う必要があり、数日を要する。PCR法では、H抗原を発現させるための培養を行う必要がないため、迅速な同定が可能である。

秋田県でこれまでに分離された非定型的な血清型のPCR法による型別結果を表2に示す。単相変異やH抗原の発現が確認できない7株の内、5株においてPCR法が有効であり、血清型を推定することが可能であった。我々は、平成22年に複数分離されたO7:-:1,5がPCR法により血清型Thompsonと同定できたことを報告している⁷⁾。PCR法による血清型別は、従来法で型別できない菌株についても有効であり、正確な食中毒及び感染症のサーベイランスへの有用性が示唆された。

表2 非定型血清型のPCR型別結果

No. Sa	Antigenic Formulas			PCR型別			血清型
	O群	H1	H2	O群	H1	H2	
1440	O4	i	-	NT	NT	-	不明
1558	-	r	1,5	-	NT	NT	不明
1584	O13	y	-	NT	NT	-	不明
1600	-	y	1,7	O13	NT	NT	Yarrabah
1669	O4	i	-	NT	NT	1,2	Typhimurium
1671	O4	-	-	NT	b	1,2	Paratyphi B
1684	O7	k	-	NT	NT	1,5	Thompson
1924	O3,10	lv	-	NT	NT	1,6	London
2165	O7	c	-	NT	NT	-	不明
2605	-	k	1,5	-	NT	NT	不明
2730	-	b	e,n,x	O4	NT	NT	Abony

— : 検出せず, NT : 検査せず

参考文献

1) Franklin K, Lingohr EJ, Yoshida C, Anjum M, Bodrossy L, Clark CG, Kropinski AM, Karmali MA: Rapid genoserotyping tool for classification of *Salmonella* serovars, *J Clin Microbiol*, **49**, 2011, 2954–2965.

2) Hong Y, Liu T, Lee MD, Hofacre CL, Maier M, White DG, Ayers S, Wang L, Berghaus R, Maurer JJ: Rapid screening of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Hadar, Heidelberg and Typhimurium using a serologically-correlative allelotyping PCR targeting the O and H antigen alleles. *BMC Microbiol*, **8**, 2008, 178.

3) Hirose K, Itoh K, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, Ezaki T, Kawamura Y, Tamura K, Watanabe H: Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB*, and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A, *J Clin Microbiol*, **40**, 2002, 633–636.

4) Herrera-León S, Ramiro R, Arroyo M, Diez R, Usera MA, Echeita MA: Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes, *Res Microbiol*, **158**, 2007, 122–127.

5) Herrera-León S, McQuiston JR, Usera MA, Fields PI, Garaizar J, Echeita MA. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp., *J Clin Microbiol*, **42**, 2004, 2581–2586.

6) Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, Fields PI, Mikoleit M, Tamboura B, Kotloff KL, Lagos R, Nataro JP, Galen JE, Levine MM: PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* isolates from the blood of patients with clinical enteric fever, *J Clin Microbiol*, **46**, 2008, 1861–1866.

7) 今野貴之: 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, 平成24年度大同生命厚生事業団「地域保健福祉研究助成」報告集, 2014, 20–24.

8) Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, Usera MA: Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens, *Res Microbiol*, **153**, 2002, 107–113.

9) Curd H, Liu D, Reeves PR: Relationships among the O-antigen gene clusters of *Salmonella enterica* groups B, D1, D2, and D3, *J Bacteriol*, **180**, 1998, 1002–1007.

10) 坂崎利一, 田村和満: 腸内細菌, 近代出版, 上巻, 1992, 18–58.

11) Bonifield HR, Hughes KT: Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism, *J Bacteriol*, **188**, 2006, 950–957.