

IV 報 文

秋田県で分離された *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis の プラスミドプロファイルについて (第1報)

八 柳 潤 齊 藤 志保子 遠 藤 守 保 佐 藤 宏 康 森 田 盛 大

キーワード: *Salmonella* Ser. Enteritidis, プラスミドプロファイル, ファージ型, Kado 法

I はじめに

サルモネラは、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌に次いで食中毒の代表的な原因菌であり、また、散发下痢症の原因菌としても重要視されている。われわれは、1975年から、河川水、下水処理場流入水、食肉などを対象として県内におけるサルモネラ菌の侵淫動向を調査すると共に¹⁾²⁾³⁾、感染症サーベイランス検査定点医療機関を中心に下痢症患者からの同菌の検出状況を調査してきたところ、1989年に入り、それまでは分離頻度の極めて小さかった *Salmonella* Ser. Enteritidis (SE) が食中毒や散发下痢症から多数分離されるようになった⁴⁾。SE感染症の原因を追求する際の疫学指標として、わが国では1990年3月からファージ型別が導入された⁵⁾。このSEのファージ型別は、国立予防衛生研究所においてのみ実施しており、1990年に発生した食中毒事例において、疫学指標として有効性が確認されている⁵⁾。

一方、プラスミドプロファイルの解析は、*Salmonella* Ser. typhimurium⁶⁾、Enterobacteriaceae⁷⁾、Enterohemorrhagic E.coli⁸⁾などの細菌について、疫学指標として有効であることが既に報告されている。このプラスミドプロファイルの解析は、ファージ型別と異なり、手技が比較的容易であることから、各地研においても実施可能な方法であり、実際にSEに対しても疫学指標としての有効性が示されている⁹⁾¹⁰⁾。

このため、当所においても、1987年以降、秋田県内において分離されたSEのプラスミドプロファイルを解析し、ファージ型の知見と合わせて県内におけるSEの疫学的情報を得ることを目的として、本調査研究を開始した。今年度は、プラスミドプロファイルの測定方法について検討した。

II 材料と方法

A. 材料

菌株: 1987年から1990年にかけて、散发的SE感染

者、鶏卵、SE集団食中毒患者などから分離され、当所に保存されていたSE (Sa-230~Sa-420) から、任意に選択した52株を実験に供した。

プラスミド標準株: プラスミド標準株として、以下に示す菌株を使用した。

Salmonella Ser. Enteritidis L-156 (1.4Kb, 60Kb, 200Kb)

E. coli K-12 W-677 NR-1¹¹⁾ (95Kb)

E. coli V-517¹²⁾ (2.2Kb, 2.8Kb, 3.1Kb, 4.0Kb, 5.2Kb, 5.7Kb, 7.4Kb, 60Kb)

E. coli K-12 J53 R-478¹³⁾ NCTC 50038 (250Kb)

なお、S. Ser. Enteritidis L-156, *E. coli* K-12 W-677, および *E. coli* V-517 は、東京医科歯科大学微生物学教室、堀内三吉先生から分与いただいた。

B. 方法

SEからのプラスミドの抽出は、Kado and Liuの方法¹³⁾の変法¹⁴⁾に準じて、図1の如く行った。すなわち、-20℃で保存しておいた、SEのスキムミルク懸濁液の1白金耳量を、DHL寒天板培地(日水製薬、粉末培地)に塗抹し、30℃、18時間培養した。生じたSEのコロニーを、5mlのLB Broth (Difco, pH7.0に調整)に接種し、30℃、15~20時間静置培養した。培養液1.5mlをエッペンドルフ遠心チューブに入れ、8,000 r.p.m x 2分、遠心

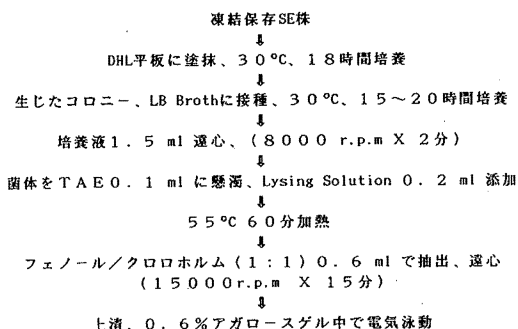


図 1 SEからのプラスミドの抽出方法

して集菌した。上澄みを除去した後、沈殿した菌体を0.1mlのTAE (40mM Tris-Acetate, 2mM EDTA pH 7.4) に懸濁し、0.2mlのLysing solution (SDS 3%, Tris 0.05M, NaOH 0.128M) を加え、混和した。混液を55℃、60分加熱した後、フェノール/クロロホルム1:1混液0.6mlを加えて転倒混和した。15,000 r.p.m x 15分遠心して、得られた上清を電気泳動用試料とした。電気泳動には0.6%アガロースゲル(宝酒造 LO-3)を使用し、TBEバッファー中、10V/cmで2時間泳動を行った。その後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線を照射してプラスミドを検出した。

III 結果及び考察

図2に今回われわれが得た、SEのプラスミドプロフィールの1例を示した。ここに示したSa-232~Sa-246は全てファージ型34のSEであるが、大半の株は約60Kbと約200Kbのプラスミドを保有していた。しかし、約200Kbのプラスミドのみを保有するもの、ここには示していないが、約60Kbのプラスミドのみを保有するもの、約60Kb、約90Kb、約200Kbの3種類のプラス

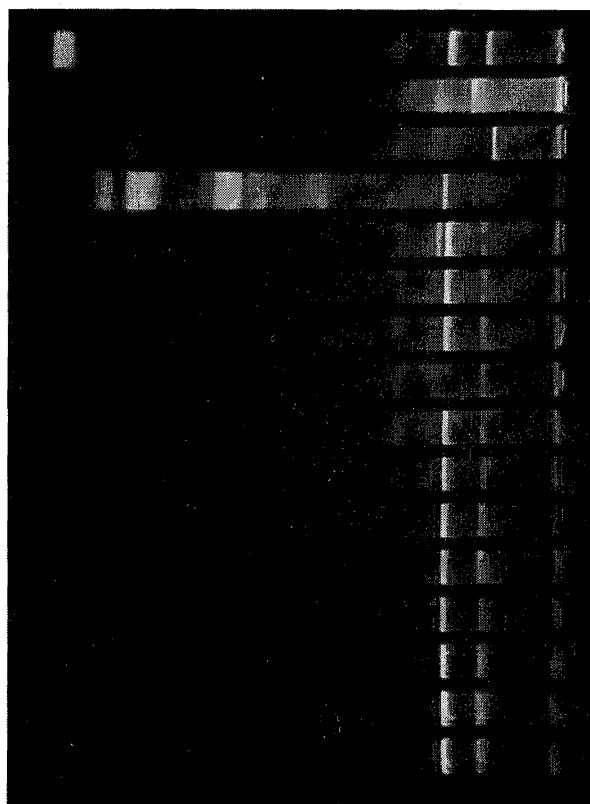
ミドを保有しているものも認められた。

表1に、今回調査したSEのプラスミド保有状況を示した。ファージ型34のSEは、プラスミドプロフィールの違いから、更に4種類に分類可能であった。また同様にファージ型4のSEも、2種類に分類可能であった。

以上の結果は、同一ファージ型のSEの中に、起源の異なるものがあることを示しており、従って、ファージ型とプラスミドプロフィールの解析を組み合わせることにより、一段と詳細な疫学的解析が可能であると考えられた。このように、プラスミドプロフィールの解析は、SEの疫学指標として有効であったが、SEのプラスミド

表1 *Salmonella enteritidis*のプラスミド保有状況

ファージ型	保有プラスミド	株数
34	≒ 200 Kb, ≒ 60 Kb	39
	≒ 200 Kb, ≒ 95Kb, ≒ 60 Kb	1
	≒ 200 Kb	1
	≒ 60 Kb	1
4	≒ 200 Kb, ≒ 60 Kb	2
	≒ 60 Kb	6
9a	≒ 60 Kb	1



S. enteritidis L-156
E. coli K-12 W-677 NR-1
E. coli K-12 J53 R-478 NCTC 50038
E. coli V-517
S. enteritidis Sa-232
S. enteritidis Sa-234
S. enteritidis Sa-235
S. enteritidis Sa-236
S. enteritidis Sa-237
S. enteritidis Sa-238
S. enteritidis Sa-239
S. enteritidis Sa-241
S. enteritidis Sa-243
S. enteritidis Sa-244
S. enteritidis Sa-245
S. enteritidis Sa-246

図2 SEのプラスミドプロフィールの例。ここに示した*S. enteritidis* Sa-232~Sa-246は1989年6月から7月に散発患者から分離されたファージ型34の株である。

は極めて不安定であり、例えば、われわれは同一菌株のプロファイルが実験条件の違いにより、①約 60Kb、約 200Kb となる場合、②約 60Kb、約 54Kb となる場合、③約 60Kb、250Kb 以上となる場合があることを経験した。実際、現在までに報告されている SE のプラスミドプロファイルについても、プロファイルは研究者により全て異なっており、楠らはフェージ型 34 の SE に 60Kb、250Kb 以上のプラスミドを保有しているものがあることを⁹⁾、樋口らは 32Md、36Md、(約 54Kb、約 60Kb)、および 32Md、36Md、65Md、(約 54Kb、約 60Kb、約 95Kb) のプラスミドをそれぞれ保有する SE について¹⁰⁾、また堀内らは 54Kb、94Kb、150Kb などのプラスミドを保有する SE について¹¹⁾それぞれ報告している。われわれは今回、LB Broth で培養した際に約 60Kb、約 200Kb のプラスミドプロファイルを示した SE が、ハートインフュージョン寒天平板培地、ハートインフュージョンブロス、ミューラーヒントン寒天平板培地などの、LB Broth 以外の培地を使用して培養した場合に、約 60Kb、約 54Kb のプラスミドプロファイルを示すようになることを見いだした(未発表データ)。このことは、SE のプラスミドプロファイルを測定する場合、得られる結果が培養条件により大きく左右されることを示すものと考えられた。このため、我々は LB Broth の pH をリン酸バッファーを加えることにより安定化させ、培養時間、方法を一定にするなどの方法を試みところ、結果の再現性が改善される傾向が認められた。以上述べてきたように、プラスミドプロファイルは、SE の疫学指標として有効である一方、再現性のある成績を得るためには、実験条件、特に被検 SE の培養条件を再検討、改良する必要性のあることが示された。

IV 謝 辞

プラスミド標準株を分与下さいました、東京医科歯科大学、微生物学教室の堀内三吉先生、及び Kado の変法についてご教示下さいました東京都立衛生研究所の楠淳先生に深謝します。

文 献

- 1) 森田盛大たち：県内におけるサルモネラ菌の生活環境内侵襲実態調査について(第 1 報)、秋田県衛生科学研究所報, 20, 37-39 (1976)
- 2) 齋藤志保子たち：サルモネラ菌の生活環境汚染実態に関する調査研究(第 6 報)、秋田県衛生科学研究所報, 25, 63-66 (1981)
- 3) 山脇徳美たち：環境からのサルモネラ菌分離成績について、秋田県衛生科学研究所報, 30, 57-61 (1986)

- 4) 森田盛大たち：秋田県における Salmonella Serovar Enteritidis の動向、病原微生物検出情報, 12, 72 (1991)
- 5) 中村明子：わが国の S. Enteritidis フェージ型分布 1989, 1990, 病原微生物検出情報, 12, 118 (1991)
- 6) P. L. McDonough et. al. : Clonal Groups of Salmonella typhimurium in New York State., J. Clin. Microbiol., 27, 622-627 (1989)
- 7) F. Orskov et. al. : Summary of a Workshop on the Clone Concept in the Epidemiology, Taxonomy and evolution of the Enterobacteriaceae and other Bacteria., J. Infect. Dis., 148, 346-357 (1983)
- 8) J. G. Wells et. al. : Isolation of Escherichia coli Serotype 0157 : H7 and Other Shiga-Like-Toxin Producing E. coli from Daily Cattle., J. Clin. Microbiol., 29, 985-989 (1991)
- 9) 楠淳たち：集団発生由来 Salmonella Ser. Enteritidis の保有プラスミドとそのプロファイル、感染症学雑誌, 64(8), 1074 (1990)
- 10) 樋口淑美たち：群馬県における Salmonella Ser. Enteritidis について、群馬県衛公研年報, 22, 33-39 (1990)
- 11) 中谷林太郎たち：R プラスミドの分子遺伝学的実験法、菜根出版, 14 (1983)
- 12) F. L. Macrina et. al. : A Multiple Plasmid-Containing Escherichia coli Strain : Convenient Source of Size Reference Plasmid Molecules., Plasmid, 1, 417-420 (1978)
- 13) C. I. Kado et. al. : Rapid Procedure for detection and Isolation of Large and Small Plasmids., J. Bacteriol., 145, 1365-1373 (1981)
- 14) 堀内三吉たち：ヒト由来 Salmonella typhimurium, S. enteritidis, S. braenderup のプラスミドと薬剤耐性、感染症学雑誌, 62, 167-176 (1987)