

Polymerase Chain Reaction (PCR) による Salmonella typhi の同定

鈴木 陽子 八柳 潤 木内 雄 佐藤 宏康

チフス菌 (*Salmonella typhi*) の同定を目的とした PCR 法について検討した。プライマーには Song たちが報告した *S. typhi* の flagellin gene の343bp 断片を増幅する ST-3、および ST-4 を使用した。*S. typhi* 5 株、*S. paratyphi* A 5 株、*S. paratyphi* B 2 株、および *S. Enteritidis* 5 株を使用して PCR の反応条件と特異性について検討した結果、annealing 温度を68℃とすることで *S. typhi* が特異的に同定可能であることが確認された。また、20回のヒートサイクルで *S. typhi* の同定が可能であり、その場合 PCR がおよそ1時間で終了することから迅速同定が可能であった。

キーワード：PCR、*Salmonella typhi*、flagellin gene

I はじめに

腸チフスはチフス菌 (*Salmonella typhi*) により惹起され、階段状上昇、弛緩など特異な熱型、バラ疹、脾腫などを特徴とする全身性感染症である。国内での腸チフス患者年間発生数は終戦直後まで40,000人前後であったが、1987年以降は100人台に減少した。一方、輸入例は次第に増加し、発生数の40%前後となっている¹⁾。

我々は、法定伝染病や発生が稀となった感染症の原因細菌の同定技術の確保と迅速診断を目的として、昨年度までにジフテリア菌²⁾、百日咳菌³⁾、および髄膜炎菌³⁾ 同定用のPCRを導入した。今年度はPCRによるチフス菌の迅速同定について検討したのでその成績を報告する。

II 材料と方法

1. 菌株

特異性の検討には *S. typhi* 5 株、*S. paratyphi* A 5 株、*S. paratyphi* B 2 株、および *S. Enteritidis* 4 株を使用した。これらの供試株はいずれも県内で分離された臨床分離株である。

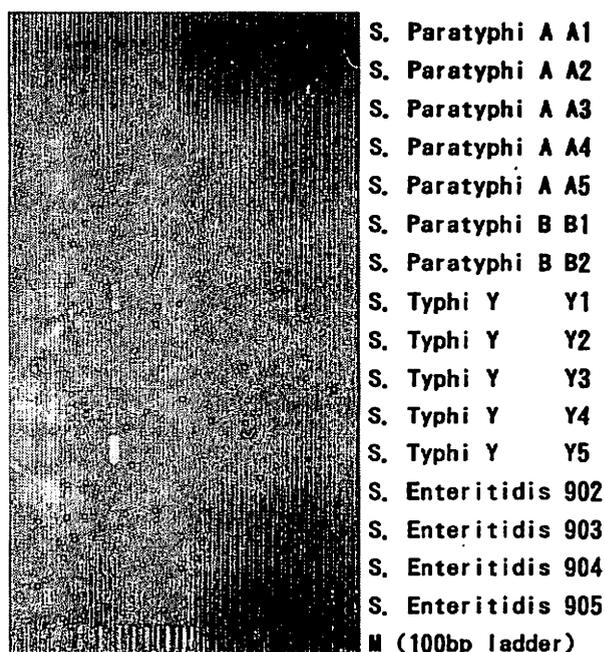
2. PCR

S. typhi の flagellin gene の343bp 断片を増幅するプライマーとして、Song ら⁴⁾ が報告した ST-3 : 5'-AGA-TGG-TAC-TGG-CGT-TGC-TC-3'、および ST-4 : 5'-TGG-AGA-CTT-CGG-TCG-CGT-AG-3' を使用した。反応液の組成は既報⁵⁾ のとおりとした。ヒートサイクルは94℃ 30秒、68℃ 30秒、72℃ 30秒20回とし、増幅断片の検出には3%アガロースゲルを使用した。なお、テンプレートには100℃ 10分間加熱した後、氷冷した被検菌の生理食塩液懸濁液を使用した。

III 結果および考察

プライマー ST-3、および ST-4 を使用した PCR による *S. typhi* flagellin gene 検出の特異性について検討した結果を図1に示した。供試した *S. typhi* 臨床分離株5株すべてから予測された343 bp の増幅断片が得られた。一方、*S. paratyphi* A、*S. paratyphi* B、*S. Enteritidis* のいずれからも増幅断片は得られず、特異性が認められた。また、ヒートサイクルを20回とした場合、PCR に要する時間は約1時間であり迅速な同定が可能であった。なお、データは示さないが、annealing 温度を57℃とし、ヒートサイクルを25回とした場合、

図1 PCR による *S. Typhi* flagellin 遺伝子検出の特異性



多数のエキストラバンドが観察され、同定は困難であった。

S. typhi は感染初期に末梢血、発病2週日以降は糞便中に証明される¹⁾。Song たちは腸チフス発病初期の迅速診断を目的として血液中の S. typhi を検出するための Nested-PCR について検討し、当該検出系の S. typhi 検出感度が約10個であることを示した⁴⁾。Song たちの Nested-PCR によると、患者の血液を検体として腸チフスの迅速同定が可能である反面、Nested-PCR では原因菌が分離されないためにフェージ型別などの疫学解析が実施できないという問題も生じる。そのため、我々は分離培養を実施して得られた分離株の同定を目的とした PCR について検討した。今回の成績からプライマー ST-3 および ST-4 を使用した PCR により S. typhi が特異的に同定可能であることが示された。加えて、分離平板上のコロニーからテンプレートを調製することが可能であること、さらに PCR が約1時間で終了することから、今回我々が検討した PCR 系は分離平板上に生じた S. typhi が疑われるコロニーを対象とした迅速同定

法として有用であるものと考えられた。

IV 文 献

- 1) 伝染病予防必携 第4版, (財)日本公衆衛生協会, 重松逸造 他 編, 1992, 194-197p.
- 2) 八柳 潤, 他. Polymerase Chain Reaction によるジフテリア毒素遺伝子の検出. 秋田県衛生科学研究所報, 1995 ; 39 : 29-30.
- 3) 八柳 潤, 他. Polymerase Chain Reaction (PCR) による百日咳菌および髄膜炎菌の同定. 秋田県衛生科学研究所報, 1996 ; 40 : 39-42.
- 4) Jae-Hoon Song et. al., Detection of Salmonella typhi in the Blood of Patients with Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction., J. Clin. Microbiol., 1993 ; 31 : 1439-1443.
- 5) 八柳 潤, 他. 平成3年に秋田県で分離された腸管出血性大腸菌について. 秋田県衛生科学研究所報, 1992 ; 36 : 43-47.