

パルスフィールドゲル電気泳動法による豚および鶏由来monophasicなSalmonella enterica serovar O4、12 : d : - の解析

誌名	家畜衛生学雑誌
ISSN	13476602
著者名	木嶋,真人 内田,郁夫 高橋,紗野香 小野,雅章 田中,聖 青木,浩子 松浦,勝美 窪田,宜之 山本,孝史
発行元	日本家畜衛生学会
巻/号	36巻2号
掲載ページ	p. 37-39
発行年月	2010年10月

パルスフィールドゲル電気泳動法による豚および 鶏由来 monophasic な *Salmonella enterica* serovar O4,12:d:- の解析

木嶋真人¹⁾・内田郁夫²⁾・高橋紗野香³⁾・小野雅章³⁾・田中 聖²⁾・
青木浩子¹⁾・松浦勝美¹⁾・窪田宜之¹⁾・山本孝史¹⁾*

Characterization of monophasic *Salmonella enterica* serovar O4,12:d:- isolated from pigs and chickens in Japan by pulsed-field gel electrophoresis

Masato KISHIMA¹⁾, Ikuo UCHIDA²⁾, Sayaka TAKAHASHI³⁾, Masaaki ONO³⁾, Kiyoshi TANAKA²⁾, Hiroko AOKI¹⁾,
Katsumi MATSUURA¹⁾, Takayuki KUBOTA¹⁾ and Koshi YAMAMOTO¹⁾*

¹⁾ National Institute of Animal Health, Kannondai 3-1-5, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

²⁾ Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health,
Hitsujigaoka-4, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-0045, Japan

³⁾ Zen-noh Institute of Animal Health, 7 Ojamachi, Sakura, Chiba 285-0043, Japan

* Present address: Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,
Funako 1737, Atsugi, Kanagawa 243-0034, Japan)

(2010. 6. 3 受付 / 2010. 7. 15 受理)

Summary

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to characterize and determine possible genetic relationship between 57 monophasic *Salmonella enterica* serovar O4,12:d:- strains from pigs and chickens isolated in Japan. The PFGE profiles of 57 examined strains were classified into 22 profiles with XbaI. The 57 examined strains showed more than 87% genetic similarity according to analysis by Fingerprint II Software, indicating that these strains belong to the same genetic clone.

Keywords : monophasic salmonella, pigs, chickens, PFGE

家畜衛生学雑誌 36, 37~39 (2010)

サルモネラは、人をはじめとする哺乳類、鳥類、爬虫類などに広く分布し、人の重要な食中毒原因菌のひとつである。サルモネラ属菌は、2種6亜種に分類され、菌体抗原（O抗原）と鞭毛抗原（H抗原）の組み合わせに

よって約2,500種の血清型が存在することが報告されている。サルモネラの型別に当たっては、O抗原で群別し、H抗原によって血清型を決定している。サルモネラは、一部の例外を除いて基本的には1相、2相と呼ばれる2種のH抗原を持っている。近年、世界各地において、O4,12:i:-、O4,12:d:-、O9,12:l,v:-等のように、第2相のH抗原を欠く monophasic な株が人の食中毒事例、家畜のサルモネラ症例あるいは食肉等から分離されている^{1,2,4,6,8,10,11)}。我が国においては、Asaiら³⁾は豚の下痢便からサルモネラの分離を試み、*Salmonella* Typhimurium に次ぐ高い頻度でO4,12:d:-血清型を分離している。我々⁷⁾は、2003年7月から2005年6月に採取した5,393

¹⁾ 動物衛生研究所

〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5

²⁾ 動物衛生研究所北海道支所

〒062-0045 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘4

³⁾ 全農家畜衛生研究所

〒285-0043 千葉県佐倉市大蛇町7

* 現所属：東京農業大学農学部畜産学科

〒243-0034 神奈川県厚木市船子1737

頭の健康豚の糞便のうち、169頭 (3.1%) から172株のサルモネラを分離し、O4,12:d:-の抗原構造を持つmonophasicな血清型が最も分離頻度が高いこと (50/172) を報告した。しかし、我が国におけるその血清型の病態的役割あるいは遺伝子情報については解明されていない。近年、病原微生物の遺伝子情報を解析する疫学的手法のひとつとして、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が種々の菌について用いられるようになり、菌の同定や菌の遺伝子型と病態との関係の解析が行われている。今回、制限酵素としてXbaIを用いたPFGEにより、我々が豚と鶏から分離したmonophasicなO4,12:d:-の血清型がどのような遺伝子型に群別されるかについて解析した。

健康豚の糞便由来株50株 (分離年2003-2005)、健康豚の盲腸内容由来株2株 (分離年2008)、鶏の糞便由来株3株 (分離年2008) および鶏舎の塵埃由来株2株 (分離年2008)、計57株を供試した。分離株は生化学的性状を検査した後、サルモネラ血清型別用免疫血清 (デンカ生研、東京) を用いて血清型別を行った。

PFGEは、制限酵素としてXbaI (タカラバイオ、東京) を使用し、米国CDC PulseNet protocol⁹⁾ に従って行った。*Salmonella* Braenderup H9812株 (American Type Culture Collection BAA-664) を分子量の標準として使用した。電気泳動にはPulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) を使用し、CHEF DRII System (Bio-Rad-Laboratories) によって行った。なお、電気泳動アガロースゲルと泳動用バッファーには、チオ尿素を100 μ M添加した。泳動条件は、電圧: 6.0v/cm、パルスタイム: 2.2-63.8秒、泳動時間: 22時間で行った。各株のPFGEプロファイルは、Fingerprinting II Software (Bio-Rad Laboratories) を用いて系統樹解析した。

豚および鶏由来のmonophasicなO4,12:d:-血清型57株について、XbaIを用いたPFGEにより染色体DNAの切断パターンを解析した (図1)。その結果、22種類のプロファイルに分けられ、系統樹解析により、類似値87%以上ですべての株が同一の群に分類された (図1)。なお、プロファイル5には鶏糞便由来株が1株、プロファイル8には鶏糞便由来株が1株、プロファイル11には豚盲腸便由来株が2株、鶏糞便由来株が1株、鶏舎の塵埃由来株が2株含まれる。由来家畜・家禽あるいは分離地域 (13都道府県) の違いによるPFGEプロファイルの違いは認められなかった。

近年、ドイツ、デンマーク、英国において、monophasicなO4,12:d:-血清型が、鶏、七面鳥、鶏用飼料、豚、牛および人から分離されている⁶⁾。Asai³⁾ らは、

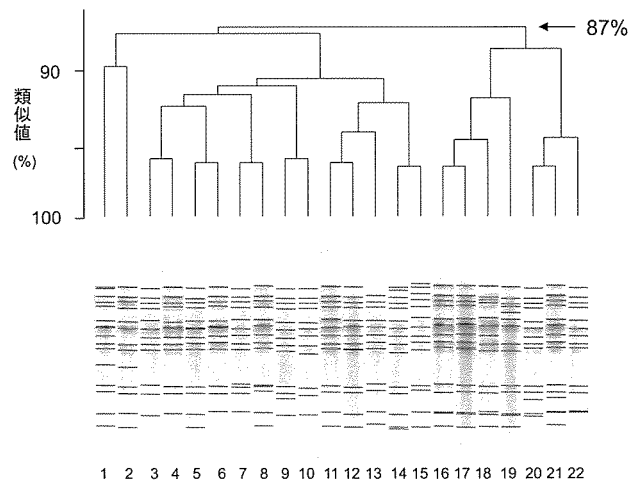


図1. 制限酵素XbaIを用いたPFGEプロファイルの系統樹解析

O4,12:d:-の血清型を我が国の豚の下痢便から *S. Typhimurium* に次ぐ高い頻度で分離しており、疾病との関連性は高いと思われる。諸外国においてはmonophasicなO4,12:i:-血清型が米国、スペイン、タイにおける人および豚のサルモネラ症から分離されている^{1,2,10)}。また、monophasicなO9,12:l,v:-血清型がイスラエル、イタリア、スイス、デンマーク、ブルガリア、米国において、人、仔牛、豚のサルモネラ症から分離されている^{4,8,11)}。それらの株の中には、遺伝子配列の解析により、O4,12:i:-が *S. Typhimurium* の変異株、O9,12:l,v:-が *Salmonella* Goettingen の変異株であることが証明された例もある^{4,5,8)}。現在のところ、我が国におけるO4,12:d:-血清型による人の食中毒事例は報告されていないが、一般に分離されるdiphasicな血清型のサルモネラと同じ衛生対策を講じる必要があると思われる。

Huehnら⁶⁾ はmonophasicなO4,12:d:-血清型について、PFGEとDNA microarrayで比較し、その血清型は極めてclonalであり、病原性に関与する既知の遺伝子の一部を欠いていること、その血清型のPFGEプロファイルと同じO4群に属する *Salmonella* Schwarzengrund、*Salmonella* Derby、*Salmonella* Stanley、*Salmonella* Duisburg のPFGEプロファイルとの類似度は低かったと報告している。今回我々が供試した57株についても、類似値87%以上ですべての株が同一の群に分類され、遺伝的均一性は高いと考えられた。また、今回得られた22のPFGEプロファイルとHuehnら⁶⁾ が報告したPFGEプロファイルでFingerprinting IIで系統樹解析した結果、我々が供試した株とHuehnらが供試した株は、類似値73%で別のクラスターを形成した。

引用文献

- 1) AGASAN, A., KORNBLUM, J., WILLIAMS, G., et al. (2002) Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Subspecies I) serotype 4,5,12:i:- strains causing foodborne infections in New York City. *Journal Clinical Microbiology*. 40, 1924-1929.
- 2) AMAVISIT, P., BOONYAWIWAT, W., and BANGTRAKULNONT. A. (2005) Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 2736-2740.
- 3) ASAI, T., OTAGIRI, Y., OSUMI, T., et al. (2002) Isolation of *Salmonella* from diarrheic feces of pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64, 159-160.
- 4) BURNENS, A.P., STANLEY, J., SECHTER, I., et al. (1996) Evolutionary origin of a monophasic *Salmonella* serovar, 9,12:l,v:-, revealed by IS200 profiles and restriction fragment polymorphisms of the *fljB* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 34, 1641-1645.
- 5) ECHEITA, M.A., HERRERA, S., and USERA, M.A. (2001) Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 2981-2983.
- 6) HUEHN, S., BUNGE, C., JUNKER, E., et al. (2009) Poultry-associated *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,12:d:- reveals high clonality and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 1011-1020.
- 7) KISHIMA, M., UCHIDA, I., NAMIMATSU, T., et al. (2008) Nationwide surveillance of salmonella in the faeces of pigs in Japan. *Zoonoses and Public Health*. 55, 139-144.
- 8) PETROV, P., HENDRIKSEN, R.S., KANTARDJIEV, T., et al. (2009) Occurrence and characterization of *Salmonella* from Bulgaria, Denmark, and the United States. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 28, 473-479.
- 9) SWAMINATHAN, B., BARRETT, T.J., HUNTER, S.B., et al. (2001) PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 7, 382-389.
- 10) TORRE, E. de la, ZAPATA, D., TELLO, M. et al. (2003) Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine samples originate from serotype Typhimurium DT U302. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 2395-2400.
- 11) YERUHAM, I., ELAD, D., MECHANI, M., et al. (2005) Outbreaks of salmonellosis in calves in a dairy herd caused by monophasic *Salmonella* serovar 9, 12:l,v:-. *Veterinary Record*. 157, 778-779.

キーワード：サルモネラ、monophasic な血清型、豚、鶏、PFGE