

# Salmonella Weltevredenのcytolethal distending toxin遺伝子保有状況

誌名	家畜衛生学雑誌
ISSN	13476602
著者名	木嶋,真人 内田,郁夫 又吉,正直 田中,聖 青木,浩子 松浦,勝美 窪田,宜之
発行元	日本家畜衛生学会
巻/号	36巻2号
掲載ページ	p. 41-44
発行年月	2010年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## *Salmonella* Weltevreden の cytolethal distending toxin 遺伝子保有状況

木嶋真人<sup>1)</sup>・内田郁夫<sup>2)</sup>・又吉正直<sup>3)</sup>・田中 聖<sup>2)</sup>・青木浩子<sup>1)</sup>・松浦勝美<sup>1)</sup>・窪田宜之<sup>1)</sup>

### Prevalence of cytolethal distending toxin gene among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden

Masato KISHIMA<sup>1)</sup>, Ikuo UCHIDA<sup>2)</sup>, Masanao MATAYOSHI<sup>3)</sup>, Kiyoshi TANAKA<sup>2)</sup>, Hiroko AOKI<sup>1)</sup>, Katsumi MATSUURA<sup>1)</sup> and Takayuki KUBOTA<sup>1)</sup>

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

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

<sup>3)</sup> Yaeyama Livestock Hygiene Service Center, Ookawa 99, Ishigaki, Okinawa 907-0022, Japan)

(2010. 6. 22 受付 / 2010. 7. 31 受理)

#### Summary

Cytolethal distending toxin (CDT) is a newly identified virulence factor produced by several pathogenic bacteria. The prevalence of *cdtB* gene among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden isolated from domestic animals and feed in Okinawa, Japan was investigated by means of polymerase chain reaction (PCR). Among 27 strains of *Salmonella* Weltevreden examined, *cdtB* gene was found in 19 strains isolated from chicken, pig, cattle and horse.

Keywords : *Salmonella* Weltevreden, cytolethal distending toxin, PCR

家畜衛生学雑誌 36, 41~44 (2010)

サルモネラは、食品を介する人獣共通感染症の病原体として重要なもののひとつである。*Salmonella enterica* の病原因子として、蛋白転写調節、付着、線毛の生成、代謝調節、毒素産生、宿主細胞内への進入と生残などがあり、それらの現象には60以上の遺伝子が関与していることが知られている<sup>3)</sup>。

Cytolethal distending toxin (CDT) は、ある種の *Campylobacter* spp.<sup>8)</sup>、*Escherichia coli*<sup>7)</sup>、*Shigella dysenteriae*<sup>13)</sup>、*Haemophilus ducreyi*<sup>18)</sup>、*Actinobacillus actinomycetemcomitans*<sup>22)</sup>、*Helicobacter hepaticus*<sup>24)</sup> および *Salmonella enterica* serovar Typhi<sup>4)</sup> が保有していることが知られている。更に、CDTは、*Campylobacter jejuni*<sup>6)</sup>、*Haemophilus ducreyi*<sup>24)</sup>、*Helicobacter hepaticus*<sup>26)</sup>、

*Shigella dysenteriae*<sup>14)</sup> の病原性に関与していることが明らかにされている。

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2500種の血清型が存在することが報告されている。そのうち、*Salmonella* Weltevreden は東南アジアを中心に、人の下痢便、家畜・家禽の糞便、と畜場で採取した家畜・家禽の体表スワブ、枝肉のスワブ、市販されている肉類 (牛、豚、鶏、カモ)、魚介類、生野菜等から高頻度に分離されるが<sup>1, 2, 15, 16, 23)</sup>、米国内に輸入される魚介類からも高頻度に分離され<sup>5, 17)</sup>、我が国では沖縄県での分離報告がある<sup>10, 11, 12)</sup>。サルモネラの病原性における CDT の役割についてはよく分かっていないが、*S. Typhi* を始めとする数種類の血清型が *cdtB* 遺伝子を保有しており<sup>4, 20)</sup>、*S. Weltevreden* の病原性の違いを考える基礎データを得るために、沖縄県において家畜および飼料から分離した *S. Weltevreden* の *cdtB* 遺伝子保有状況を polymerase chain reaction (PCR) で調べたので報告する。

<sup>1)</sup> 動物衛生研究所

〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5

<sup>2)</sup> 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

<sup>3)</sup> 沖縄県八重山家畜保健衛生所

〒907-0022 沖縄県石垣市大川99

鶏由来株16株（健康鶏のクロアカ、鶏舎の塵埃等、分離年1996-2005）、豚由来株5株（健康豚、分離年1992-2001）、牛由来株4株（健康牛、分離年1994-2003）、馬由来株1株（敗血症例、分離年1999）および飼料由来株1株（分離年2002）、計27株を供試した。なお、1978年に分離した *Salmonella* Schwarzengrund を *cdtB* の陽性対照として供試した。供試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。

*cdtB* 遺伝子を検出するためのPCRのプライマーは、*cdtB*-F (5'-ACAACTGTCGCATCTCGCCCCGTCATT-3') と *cdtB*-R (5'-CAATTTGCGTGGGTTCTGTAGGTGCGAGT-3') を使用した<sup>20)</sup>。サルモネラの侵襲性遺伝子である *invA* は、殆どすべてのサルモネラが保有しており<sup>19)</sup>、PCR反応系の陽性対照として使用した。供試株から加熱抽出したDNAをテンプレートとし、電気泳動により268bpの増幅産物が確認された場合を *cdtB* 遺伝子陽性と判定した。PCRの反応系は20 $\mu$ lとし、その中に下記のものが含まれるよう調製した<sup>9)</sup>。PCR反応系：1X PCR buffer、0.2mM dNTP mixture (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)、forward と reverse プライマー各0.1 $\mu$ M、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5U Ampli Taq Gold DNAポリメラーゼ (Applied Biosystems) およびテンプレートDNA 1 $\mu$ l。増幅にはiCyclerサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.) を使用し、増幅の条件は：プレ熱変性95 $^{\circ}$ C、9分、[熱変性94 $^{\circ}$ C、30秒、アニーリング55 $^{\circ}$ C、30秒、伸長反応72 $^{\circ}$ C、1分]×32サイクル、最終伸長72 $^{\circ}$ C、3分で実施した。1.5%アガロース (Agarose LO3 [TAKARA]、タカラバイオ、大津) で電気泳動後エチジウムブロマイドで染色し、紫外線下で観察した。分子量マーカーとして、DNA混合溶液 (1kb Plus DNA Ladder, 100-12000bp, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) を使用した。

供試した27株の *S. Weltevreden* のうち、19株が *cdtB* 遺伝子を保有していた (図1、鶏由来株13/16、豚由来株2/5、牛由来株3/4、馬由来株1/1、飼料由来株0/1)。カイ2乗検定の結果、供試株の由来の違いによる *cdtB* 遺伝子保有状況の違いは認められなかった。

Skybergら<sup>20)</sup> は、PCRにより、*S. Typhi* 以外のサルモネラのうち、鶏由来の *Salmonella* Brandenburg、*Salmonella* Bredeney、*S. Schwarzengrund* が *cdtB* 遺伝子を保有していることを明らかにしている。今回の結果から、*S. Weltevreden* も *cdtB* 遺伝子を保有していることが明らかとなった。

CDTは、マウスの *Campylobacter jejuni* 感染において胃腸病変形成に関与していること<sup>6)</sup>、*Haemophilus*

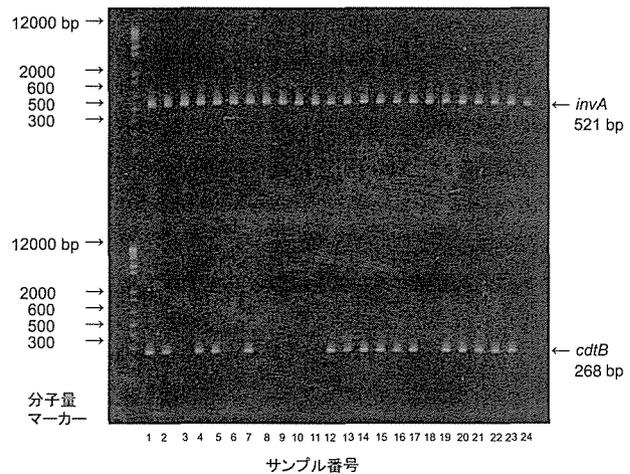


図1. PCRによる *cdtB* 遺伝子の検出

1: 陽性対照	2: 豚 1992	3: 牛 1994
4: 牛 1994	5: 牛 1994	6: 豚 1994
7: 豚 1995	8: 鶏 1997	9: 豚 2002
10: 飼料 2002	11: 鶏 2002	12: 鶏 1998
13: 馬 1999	14: 鶏 1999	15: 鶏 1999
16: 鶏 1999	17: 鶏 2000	18: 鶏 2000
19: 鶏 2000	20: 鶏 2000	21: 鶏 2000
22: 鶏 2001	23: 鶏 2001	24: 豚 2001

*ducreyi* は、軟性下疳のモデルとして、ウサギの皮膚にT細胞とマクロファージの集積による慢性炎症を起こすが、それに大腸菌由来のCDTを組み合わせると潰瘍を形成すること<sup>21)</sup>、CDTは *Helicobacter hepaticus* によるマウスの消化管病変を増強すること<sup>26)</sup>、*Shigella dysenteriae* のCDTは乳飲みマウスに下痢を起こすこと<sup>14)</sup> が明らかにされている。サルモネラ症におけるCDTの役割はよく分かっていないが、HaghjooとGalán<sup>4)</sup> は、*S. Typhi* のCDTは培養上澄中には発現されず、宿主細胞内でのみ発現されることを報告しており、*cdtB* 遺伝子を保有する *S. Weltevreden* がどのような条件下でCDTを発現するかについて検討する必要がある。また、今回の実験で、*cdtB* 遺伝子を保有する株としない株が存在したことから、*cdtB* の有無と動物に対する *S. Weltevreden* の病原性との関連性、あるいは *cdtB* の有無とパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) プロファイルとの関連性について調べる必要がある。

CDTは細胞レベルで作用して細胞を死に至らしめることから<sup>4, 7, 8, 22, 25)</sup>、人と動物に共通の病原性を持っていると考えられるが、その病態は動物種により多少異なっており、発病のメカニズムは不明な部分が多い。CDTは易熱性で、DNA分解酵素としての作用を有する新しいタイプの蛋白毒素であり<sup>21)</sup>、種々の菌の病原因子としての役割が解明されつつある。今後、他の血清型のサル

モネラに関しても *cdtB* 遺伝子の分布を調べ、病原性における役割を解明する必要がある。

*S. Weltevreden* は、我が国においては沖縄県以外では希な血清型であるが、米国内に輸入される魚介類から高頻度に分離されること<sup>5,17)</sup> から、世界的に食品の流通が盛んになってきている現在、注目すべき血清型と思われる。また、マレーシアにおいて、人、牛肉、野菜から分離した *S. Weltevreden* の PFGE プロファイルが類似しているために野菜と牛肉の汚染から人が感染した可能性が示唆される事例<sup>23)</sup> があり、輸入食品の流通過程にも注意を払う必要があると思われる。

### 引用文献

- 1) AARESTRUP, F., LERTWORAPREECHA, M., EVANS, M.C., et al. (2003) Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52, 715-718.
- 2) BANGTRAKULNONTH, A., PORNREONWONG, S., PALSRUKARN, C., et al. (2004) *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. *Emerging Infectious Diseases*. 10, 131-136.
- 3) GROISMAN, E.A., and OCHMAN, H. (1997) How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiology*. 5, 343-349.
- 4) HAGHJOO, E., and GALÁN, E. (2004) *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.* 101, 4614-4619.
- 5) HEINITZ, M.L., RUBLE, R.D., WAGNER, D.E., et al. (2000) Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *Journal of Food Protection*. 63, 579-592.
- 6) JAIN, D., PRASAD, K.N., SINHA, S. et al. (2008) Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *Journal of Medical Microbiology*. 57, 267-272.
- 7) JOHNSON, W.M., and LIOR, H. (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolated from clinical material. *Microbial Pathogenesis*. 4, 103-113.
- 8) JOHNSON, W.M., and LIOR, H. (1988) A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microbial Pathogenesis*. 4, 115-126.
- 9) 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.
- 10) KUDAKA, J., ITOKAZU, K., TAIRA, K., et al. (2006) Characterization of *Salmonella* isolated in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 59, 15-19.
- 11) 又吉正直・大城聡・新田芳樹ら (2006) 1992年から2005年に沖縄県の動物および環境から分離された *Salmonella* の血清型と薬剤耐性. *日本獣医師会雑誌*. 59, 259-265.
- 12) 又吉正直・久高潤 (2010) 1992年～2007年に沖縄県の人、動物および環境から分離された *Salmonella Weltevreden* の薬剤感受性と耐性遺伝子. *感染症学雑誌*. 84, 24-27.
- 13) OKUDA, J., KURAZONO, H., and TAKEDA Y. (1995) Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microbial Pathogenesis*. 18, 167-172.
- 14) OKUDA, J., FUKUMOTO, M., TAKEDA, Y., et al. (1997) Examination of diarrheagenicity of cytolethal distending toxin: Suckling mouse response to the products of the *cdtABC* gene of *Shigella dysenteriae*. *Infection and Immunity*. 65, 428-433.
- 15) PADUNGTO, P., and KANEENE, J.B. (2006) *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology*. 108, 346-354.
- 16) PHAN, T.T., KHAI, L.T.L., OGASAWARA, N., et al. (2005) Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Food Protection*. 68, 1077-1080.
- 17) PONCE, E., KHAN, A.A., CHENG, C.-M., et al. (2008) Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from imported seafood. *Food Microbiology*. 25, 29-35.
- 18) PUVÉN, M., and LAGERGÅRD, T. (1992) *Haemophilus ducreyi*, a cytotoxin-producing bacterium. *Infection and Immunity*. 60, 1156-1162.
- 19) RAHN, K., DE GRANDIS, S.A., CLARKE, R.C., et al. (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. 6, 271-279.

- 20) SKYBERG, J.A., LOGUE, C.M., and NOLAN, L.K. (2006) Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases*. 50, 77-81.
- 21) SMITH, J.L., and BAYLES, D.O. (2006) The contribution of cytolethal distending toxin to bacterial pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*. 32, 227-248.
- 22) SUGAI, M., KAWAMOTO, T., PÉRÈS, S.Y., et al. (1998) The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity*. 66, 5008-5019.
- 23) THONG, K.L., GOH, Y.L., RADA, S., et al. (2002) Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 2498-2503.
- 24) WISING, C., MÖLNE, L., JONSSON, I.-M., et al. (2005) The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* aggravates dermal lesions in a rabbit model of chancroid. *Microbes and Infection*. 7, 867-874.
- 25) YOUNG, V.B., KNOX, K.A., and SCHAUER, D.B. (2000) Cytolethal distending toxin sequence and activity in the enterohepatic pathogen *Helicobacter hepaticus*. *Infection and Immunity*. 68, 184-191.
- 26) YOUNG, V.B., KNOX, K.A., PRATT, J.S., et al. (2004) In vitro and in vivo characterization of *Helicobacter hepaticus* cytolethal distending toxin mutants. *Infection and Immunity*. 72, 2521-2527.

キーワード : *Salmonella* Weltevreden、毒素、cytolethal distending toxin、PCR