

[症例報告]

血清型同定が臨床的に有用であった乳児期早期サルモネラ症の2例

大楠美佐子¹⁾・石和田稔彦¹⁾・瀬川俊介²⁾・宮部安規子²⁾
長澤耕男³⁾・神保智里⁴⁾・岡田 広⁴⁾・伊藤久美子⁵⁾

¹⁾ 千葉大学真菌医学研究センター感染症制御分野

²⁾ 千葉大学医学部附属病院検査部

³⁾ 千葉大学医学部附属病院小児科

⁴⁾ 松戸市立総合医療センター小児科

⁵⁾ 松戸市立総合医療センター検査部

(令和6年2月20日受付, 令和6年8月6日受理)

サルモネラ属菌による乳児期早期のサルモネラ症2例を経験した。1例は市販の抗血清キットでO抗原判定不能な稀な血清型であったが, Multi-locus sequence typing (MLST) 解析, O抗原, H抗原のPCR法および塩基配列による解析を行ったところ, 分離菌は *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pomona と同定され, 本菌による菌血症と診断した。もう1例は, 抗血清キットでO抗原18と判定し, さらにMLST解析, H抗原のPCR法および塩基配列解析により, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Fluntern による上部尿路感染症と最終診断した。サルモネラ属菌の血清型菌種同定は, 臨床に役立った。適合する抗血清が入手できない場合など, サルモネラ属菌の血清型を推測する手法として, 分子生物学的手法は有用である。

Key words: サルモネラ菌, 血清型, MLST 解析, 乳児

序 文

サルモネラは現在 *Salmonella enterica* と *Salmonella bongori*, *Salmonella subterranea* の3菌種, さらに *S. enterica* は6亜種に分類されている¹⁾。サルモネラ属菌には, 現在2,500以上の血清型があり, 血清型の決定は, O(菌体)抗原とH(鞭毛)抗原の組み合わせにより分類され, それぞれ固有な名が付けられている。このうち, ヒトのサルモネラ症は主に *S. enterica* subsp. *enterica* に含まれ, 約1,500の血清型がある²⁾。一般的に, サルモネラ属菌が分離された場合, 市販されている抗血清により血清型を決定するが, 血清型が決まらないことがあり, その場合には, サルモネラ属菌として, 臨床側に報告される。今回, 乳児期早期のサルモネラ症を2例経験した。1例は市販されているO抗原抗血清に反応がなく, 1例はO抗原のみ判明した症例であったが, multi-locus sequence typing (MLST) 解析, O抗原, H抗原のPCR法および塩基配列による解析を行ったところ, 最終的に血清型が同定され, 臨床に, 役立った。サルモネラ属菌の血清型同定の重要性を強く認識したので報告する。

症 例 1

患者: 3か月 女児

主訴: 無呼吸/多呼吸, 発熱, 哺乳不良

周産期歴: 特記すべきことなし

臨床経過

生後2か月時, 発熱, 下痢を主訴に入院。入院時の血液培養で, サルモネラ属菌が分離された。分離菌の薬剤感受性検査にて ampicillin (ABPC) 感性が確認されたため, ABPC (200 mg/kg/日 分4) 2週間静脈内投与にて治療を行い, 経過良好で軽快退院した。入院中に病巣検索のため実施した胸部造影CT, 心エコーでは特記すべき所見は認めなかった。同居家族にも消化器症状が認められた。また, 自宅で, 多数の魚類やクモ等を飼育しているとのことであった。

退院1週間後, 発熱と呼吸障害により再入院した。入院時血液培養から, 再びサルモネラ属菌が分離された。市販の抗血清でO抗原による判定はできず, 血清型および菌種を推定することができなかった。Cefotaxime (CTX) (200 mg/kg/日 分4) 投与を開始したところ, すみやかに解熱, 全身状態改善し, 抗菌薬2週間静脈内投与にて軽快, 退院とした。退院時の血液培養は陰性であった。乳児期早期の反復する菌血症症例であり, サルモネラ属菌の血清型同定の依頼を受け, 千葉大学真菌医学研究センターにて精査を行った。

微生物学的検査

入院時に提出された静脈血(小児用レズンボトル使用)をBACTEC-FX(日本ベクトン・ディッキンソン)にて培養を行ったところ, 翌日に陽性判定となった。培養液の染色・鏡検で, グラム陰性桿菌を認めた。MALDI Sepsityper Kitを

著者連絡先: (〒260-8673) 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
千葉大学真菌医学研究センター感染症制御分野
大楠美佐子
TEL: 043-226-2799
E-mail: misako@office.chiba-u.jp

表1. 生化学性状試験結果

	症例 1 (S. Pomona)	症例 2 (S. Fluntern)
VP 反応	—	—
硫化水素	+	+
ブドウ糖	+	+
ガス産生	+	+
乳糖	—	—
白糖	—	—
インドール	—	—
運動性	+	+
リジン	+	+
オルニチン	+	+
クエン酸	+	+
マロン酸	—	—

使用し、培養液を直接質量分析装置 (MALDI バイオタイパー: ブルカーダルトニクス) で同定した結果、サルモネラ属菌と判定された。同時に、5% 羊血液寒天培地 (日水)・ドリガルスキー改良培地 (栄研)・チョコレート寒天培地 (極東)・ブルセラ HK 寒天培地 (極東) にて分離培養を行った。翌日、各培地に純培養状にコロニーが発育し、生化学的性状 (表1) の確認・薬剤感受性測定 (表2) を MicroScan Walk-Away96 (ベックマンコールター) で実施した。生化学性状 (表1) からサルモネラ属菌であることを確認した。サルモネラ免疫血清「生研」によるサルモネラ O 群型別試験を実施したが、O 多価血清・O1 多価血清・Vi 血清全て陰性的のため、型別不能と判断した。

その後、千葉大学にて血液培養分離株を用いて *Salmonella* 検出用特異プライマー (*ompC*) による PCR³⁾ を行ったところ陽性となった。つぎに、MLST 解析を行い、7つの遺伝子 (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA*, *thrA*) の塩基配列から sequence type (ST) を決定した⁴⁾。ST は 536 であった (表3)。PubMLST サイト (<https://pubmlst.org/>) に登録されている菌株は全て *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pomona (S. Pomona) であった (表3)。文献²⁾によると、S. Pomona の O 抗原は 28 であり、市販の免疫血清では、O 抗原型の特定は困難であった。

O 抗原について、特異プライマー⁵⁾を用いた PCR で、O28 であることを確認した。また、サルモネラ属菌の H 抗原は通常、第1相および第2相があり、それぞれ第1相は *fljC* 遺伝子が、第2相は *fljB* 遺伝子がコードしている。これら *fljC* および *fljB* の塩基配列解析⁶⁾⁷⁾により、それぞれ第1相が y, 第2相が 1, 7 であった (表4)。この結果は、S. Pomona の H 抗原と一致した²⁾。以上の結果から、血液培養から分離されたサルモネラ属菌は S. Pomona である可能性が極めて高いと判断した。

菌種同定後の臨床経過

詳細に病歴を確認したところ患者の自宅では、ミシシipp アカミミガメ、イグアナ、金魚、タランチュラなど、様々な爬虫類、魚類、クモを飼育していた (初回入院後、譲渡するなど処分済)。2 回目の入院中に家族の便培養を実施したと

表2. 薬剤感受性試験結果

抗菌薬	MIC (μg/mL)	
	症例 1 (S. Pomona)	症例 2 (S. Fluntern)
ABPC	≤4	≤4
SBT/ABPC	≤4	≤4
CTM	≤8	≤8
CTX	≤1	≤1
CTRX	≤1	≤1
CFPM	≤2	≤2
CCL	≤8	≤8
MEPM	≤1	≤1
GM	≤2	≤2
CPFX	≤0.25	≤0.25
MINO	≤2	≤2
ST	≤2	≤2

ABPC: ampicillin, SBT/ABPC: sulbactam/ampicillin, CTM: cefotiam, CTX: cefotaxime, CTRX: ceftriaxone, CFPM: cefepime, CCL: cefaclor, MEPM: meropenem, GM: gentamicin, CPFX: ciprofloxacin, MINO: Minocycline, ST: sulfamethoxazole trimethoprim

ころ、母と兄からサルモネラ属菌が分離され、除菌を行った。2 回目退院後は、症状の再燃なく経過している。

症 例 2

患者: 3 か月 女児

主訴: 嘔吐, 発熱

周産期歴: 在胎 37 週 5 日, 体重 3675 g, 経膈分娩

既往歴: 胎児期に両側重複腎盂尿管・右尿管瘤を指摘された。生後 1 か月時、*Klebsiella pneumoniae* による尿路感染症で入院し、抗菌薬静注治療で治癒した。退院後、cefaclor (CCL) 予防内服を継続していた。

家族歴: 4 人兄弟の第 4 子。家族に胃腸炎症状なし。兄弟のうち 2 人が 1 週間前に咳嗽と鼻汁を認めていた。入院時の保護者への問診上、ペット飼育歴はなし、動物接触歴もなしとのことであった。

臨床経過

入院 15 日前に外来で排尿時膀胱造影検査を実施したところ、膀胱尿管逆流現象はなく、CCL 予防内服を終了した。入院前日、夜間、嘔吐あり。翌朝、発熱したため救急外来受診。乳児期早期の発熱のため、精査加療目的で入院した。入院時、体温 38.6℃。バイタルサインは正常。意識障害はないが、不機嫌であった。その他、身体所見は異常なし。血液検査で白血球数は 27,400/μl と増多していたが、貧血や血小板低下は認めず、CRP 値も 0.8 mg/dl であった。尿検査を実施したところ、尿混濁を認め、尿沈渣で白血球を多数認めた。尿の塗抹検査ではグラム陰性桿菌を多数認めたことから、尿路感染症と診断し、CTX 100 mg/kg/日にて治療を開始した。尿培養からは、サルモネラ属菌が 1×10⁴/ml 純培養状に分離された。CTX 投与開始後、すみやかに解熱した。入院時の血液培養は陰性であった。のべ 10 日間の抗菌薬治療を行い、そ

表 3. 各症例の MLST 解析結果

症例	遺伝子							ST	登録血清型
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>		
1	111	109	17	149	161	13	23	536	S. Pomona (5/5*)
2	84	342	256	435	378	182	362	1456	S. Fluntern (10/10*)

*MLST データベースに登録されている同 ST の当該血清型菌株数/血清型が記載されている全菌株数

表 4. 各症例の抗原解析結果

症例	O 抗原	H 抗原		血清型***
		第 1 相**	第 2 相**	
1	O : 28 (PCR)	y	1, 7	S. Pomona
2	O : 18 (抗血清)	B	1, 5	S. Fluntern

** : 塩基配列解析により決定した

*** : O 抗原と H 抗原の組み合わせにより決定した

の後、CCL 予防内服に変更、退院 1 か月後に尿管瘤切開術を施行し、以後、尿路感染症の反復は認めていない。

微生物学的検査

5% 羊血液寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン）とドリガルスキー改良培地（栄研化学）にそれぞれ純培養で発育したコロニーに対し、MALDI バイオタイパー（ブルカー・ダルトニクス）で同定したところ、サルモネラ属菌と判定された。サルモネラ免疫血清「生研」（デンカ生研）によるサルモネラ O 群型別試験を添付文書に従い実施した。O 抗原は O18 であった。同定確認のため、生化学的性状による同定検査も実施し（表 1）、サルモネラ属菌と再確認された。薬剤感受性測定（表 2）は MicroScan WalkAway96（ベックマンコールター）で実施した。*Salmonella* 検出用特異プライマー（*ompC*）による PCR は陽性となった。MLST 解析により ST は 1456 であった（表 3）。PubMLST サイトに登録されている菌株は全て *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Fluntern (S. Fluntern) であった（表 3）。

H 抗原については *fljC* および *fljB* の塩基配列解析により、それぞれ第 1 相が B、第 2 相が 1, 5 であった（表 4）。この結果は、S. Fluntern の H 抗原と一致した²⁾。以上の結果から、血液培養から分離されたサルモネラ属菌は S. Fluntern である可能性が極めて高いと判断した。

考 察

サルモネラ菌の自然宿主は、哺乳類、爬虫類、鳥類、昆虫とされる。サルモネラ症は、非チフス性サルモネラによる食中毒・その他感染症と定義され、感染経路としては、汚染した食物・水の摂取、爬虫類との接触などから、菌を経口摂取して、腸管上皮細胞から侵入、発症すると考えられている⁸⁾。今回経験した症例は 2 例とも生後 3 か月の乳児であり、自ら摂食や行動することができない月齢で発症したサルモネラ症であった。また、症例は発熱を伴う菌血症と発熱を伴う上部尿路感染症であったこと、菌血症症例は反復例であったことから、菌株の詳細な解析が必要と考え、積極的に血清型同定を行った。

症例 1 から分離されたサルモネラ属菌は、最終的に S. Pomona と同定した。米国での 2006 年～2014 年の期間におけるカメが関係したサルモネラ症に関する報告によると S. Pomona は複数の州にわたる 15 回のアウトブレイクのうち、3 回に関与しており、いずれも 1 歳未満の症例を含んでいた⁹⁾。小児を主体としたアウトブレイクも報告されている¹⁰⁾。国内でのペットショップでの調査によると S. Pomona はカメから分離されており、症例 1 が飼育していたミシシippia カミガメからの分離報告も認められた¹¹⁾¹²⁾。

2 例目は、O 抗原が 18 の S. Fluntern による上部尿路感染症であった。非チフス性サルモネラによる尿路感染の頻度はサルモネラ症の 0.63% とされ¹³⁾、稀ではあるが尿路奇形、免疫抑制があれば起こりやすいとされる¹⁴⁾。本症例は、胎児期から尿路奇形を指摘されており、感染のリスク因子になったと思われる。感染経路に関しては、血液培養陰性であることから、尿道の糞便汚染により、逆行性に上部尿路感染症を起こしたことが推測された¹⁵⁾。サルモネラ症のうち、S. Fluntern が占める割合は、サルモネラ分離株の 0.012% とされる¹⁶⁾。米国での報告では、1 年間で S. Fluntern が 12 例検出され、うち 10 例に爬虫類との接触が認められていた¹⁶⁾。また、爬虫類を飼育している飼育場や環境から S. Fluntern が分離されたとの報告もある¹⁷⁾。日本では、1 歳の S. Fluntern による胃腸炎患者の報告があり、家庭内で複数の爬虫類との接触歴を認め、飼育していたヒョウモントカゲモドキとフトアゴヒゲトカゲから同菌が分離された¹⁸⁾。症例 2 に関しては、当初の保護者への問診上ペット飼育歴はないとのことであったが、菌種同定後改めて、爬虫類の飼育について確認したところ、ヒョウモントカゲモドキを飼育していることが判明し、感染源となったことが推測された。なお、検索した限り S. Fluntern による尿路感染症の報告はない。

サルモネラ属菌の同定に関して、従来から生化学的性状による同定がされてきたが、近年では質量分析装置の普及により、MALDI バイオタイパーによる同定も多くの施設で実施されている。しかし、MALDI バイオタイパーではチフス菌やパラチフス菌と、その他のサルモネラ属菌の鑑別が出来ないため、生化学的性状による同定確認が必要である。

サルモネラ属菌の血清型同定は、O抗原およびH抗原の抗血清による反応から、O抗原とH抗原の組み合わせにより決定するのがゴールドスタンダードである。しかし、検査室で通常使用する市販の抗血清に含まれていない血清型については個々に抗血清を入手し、実施するのは時間、経費を考慮すると困難である。今回は、分子生物学的解析法として、まず、MLST解析を行った。決定したST型は、MLSTデータベースに登録されている菌株が複数あり、それらがほぼ共通の血清型であったことで、血清型の推測が可能であった。MLST解析は、血清型の推定に有用な手法であった。しかし、実際にはデータベースに登録されていない血清型もある。今回、さらにO抗原特異プライマーによるPCR、また、H抗原の塩基配列解析を行い、O抗原、H抗原の型を決定した。分子生物学的手法を用いたO抗原とH抗原の型の組み合わせにより、血清型を推定できることが確認できた。適合する抗血清が入手できない場合、血清型を推測する手法として、分子生物学的手法が有用であると考ええる。今回の報告で用いた手法を行うために必要な機器は、PCRを行うサーマルサイクラー、PCR産物確認のための電気泳動装置、ゲル撮影装置である。シークエンスは、外注で比較的安価に依頼することができる。これらの機器が備わっていれば、この方法で血清型の推定が可能である。

なお、2症例とも兄弟のいる乳児であった。患者家族はいずれも、ペット飼育が乳児のサルモネラ症のリスクになることを認識していなかった。症例1では、患者の自宅で、ミシシippアカミミガメ、イグアナ、金魚、タランチュラなど、様々な爬虫類、魚類、クモを飼育しており、患者家族も保菌していたことから、ペット類を譲渡するなど処分を行い、家族の除菌を行うことで3回目の感染を予防することができた。また、症例2では、当初ペット飼育や動物との接触はないとの話であったが、血清型同定後改めて、爬虫類との接触について病歴を聴取したところ、ヒョウモントカゲモドキを飼育していたことが判明した。症例1では、患者の母、兄からサルモネラ属菌が分離されているが、菌株の解析は実施していない。また、症例1および症例2でペットからの菌の分離は行っていないが、様々な文献^{(9)~(12)(16)~(18)}から、感染源は飼育していたペットであろうと推察した。今回、抗菌薬治療が奏功し、後遺症を残さず治癒したが、爬虫類や両生類の飼育がサルモネラ症のリスクになること、感染予防対策について、一般市民にも啓発することの重要性を再認識した。そのためには、サルモネラ症の血清型同定は重要である。

結 語

サルモネラ属菌の血清型決定は、O抗原とH抗原の組み合わせにより決定することが基準となっている。しかし、市販のO抗原免疫血清キットで判定不能な稀な血清型や、H抗原判定を行わない場合にMLST解析が血清型推定に有用であった。サルモネラ属菌の血清型同定は、臨床的に有用であり、重症例などでは、積極的な血清型解析を行うことが勧められる。

2症例とも、論文公表にあたり患者保護者の承諾を得た。

利益相反：本症例報告に関して、開示すべきCOIはあり

ません。

文 献

- 1) Su, L.H., C.H. Chiu. 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med. J. 30: 210-219.
- 2) Grimont, P.A.D., F.X. Weill. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, France: Pasteur Institute. https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf 2023年12月現在.
- 3) Alvarez, J., M. Sota, A. B. Vivanco, et al. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. J. Clin. Microbiol. 42 (4): 1734-1738.
- 4) Kidgell, C., U. Reichard, J. Wain, et al. 2002. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. Infect. Genet. Evol. 2: 39-45.
- 5) Franklin, K., E.J. Lingohr, C. Yoshida, et al. 2011. Rapid genosero typing tool for classification of *Salmonella* serovars. J. Clin. Microbiol. 49 (8): 2954-2965.
- 6) McQuiston, J.R., R. Parrenas, M. Ortiz-Rivera, et al. 2004. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. J. Clin. Microbiol. 42: 1923-1932.
- 7) Yoshida, C., K. Franklin, P. Konczyk, et al. 2007. Methodologies towards the development of an oligonucleotide microarray for determination of *Salmonella* serotypes. J. Microbiol. Methods 70: 261-271.
- 8) Pegues, D.A., S.I. Miller. 2015. iv. Gam-Negative Bacilli *Salmonella* Species. p. 2559-2568. In: Mandell, Douglas, & Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases, 8th ed., in 2 vols. Elsevier, PA.
- 9) Bosch, S., R.V. Tauxe, C.B. Behraves. 2016. Turtle-Associated Salmonellosis, United States, 2006-2014. Emerg. Infect. Dis. 22: 1149-1155.
- 10) Walters, M.S., L. Simmons, T.C. Anderson, et al. 2016. Outbreaks of salmonellosis from small turtles. Pediatrics. 137 (1): e20151735.
- 11) 亀山光博, 矢端順子, 富永 潔, 他. 2013. 山口県内のペットショップで販売されている爬虫類のサルモネラ保有状況及び薬剤感受性. 日本獣医師会雑誌 66: 331-336.
- 12) Kuroki, T., T. Ishihara, N. Nakajima, et al. 2019. Prevalence of *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* in red-eared sliders *Trachemys scripta elegans* retailed in pet shops in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 72: 38-43.
- 13) Seligmann, E., I. Saphra, M. Wassermann. 1946. *Salmonella* infections in the U.S.A.; a second series of 2,000 human infections recorded by the N.Y. *Salmonella* Center. J. Immunol. 54 (1): 69-87.
- 14) Ramos, J. M., J. M. Aguado, P. García-Corbeira, et al. 1996. Clinical spectrum of urinary tract infections due on nontyphoidal *Salmonella* species. Clin. Infect. Dis. 23 (2): 388-390.
- 15) Altaf, A., N. Tunio, S. Tunio, et al. 2020. *Salmonella* urinary

- tract infection and bacteremia following non-typhoidal salmonella gastroenteritis: An unusual presentation. *Cureus*. 12 (12): e12194.
- 16) Koski, L., E. DeBess, H.E. Rosen, et al. 2019. An investigation of *Salmonella* Fluntern illnesses linked to leopard geckos—United States, 2018. *Zoonoses Public Health*. 66: 974-977.
- 17) Wikström, V.O., L. Fernström, L. Melin, et al. 2014. *Salmonella* isolated from individual reptiles and environmental samples from terraria in private households in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 56: 7.
- 18) 黒木真理子, 吉野修司, 大浦裕子. 2013. 下痢症患者から分離された *Salmonella* Fluntern の感染源調査. 衛生環境研究所宮崎県衛生環境研究所年報 62-65.

Two cases of early infantile salmonellosis. Clinically usefulness of serotype identification

Misako Ohkusu¹⁾, Naruhiko Ishiwada¹⁾, Shunsuke Segawa²⁾, Akiko Miyabe²⁾, Koo Nagasawa³⁾, Chisato Jimbo⁴⁾, Hiroshi Okada⁴⁾, Kumiko Ito⁵⁾

¹⁾Department of Infectious Diseases, Medical Mycology Research Center, Chiba University

²⁾Division of Laboratory Medicine, Chiba University Hospital

³⁾Department of Pediatrics, Chiba University Hospital

⁴⁾Department of Pediatrics, Children's Medical Centre, Matsudo City General Hospital

⁵⁾Division of Laboratory Medicine, Matsudo City General Hospital

We experienced two cases of salmonellosis (bacteremia and urinary tract infection) caused by rare *Salmonella* spp. during early infancy. In the bacteremia case, serotype could not be determined using commercially available O antigens. Multi-locus sequence typing analysis, and O antigen and H antigen based on PCR and nucleotide sequence analysis were useful for determining specific serotype. The final diagnosis of these salmonellosis was bacteremia caused by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pomona and upper urinary tract infection caused by *Salmonella* Fluntern, respectively. Identification of *Salmonella* serotypes was clinically useful. Molecular biological techniques are useful for estimating the serotype of *Salmonella* spp. when matching antisera are not available.