

過去10年に福岡市で検出された *Salmonella* Enteritidis 菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

池田嘉子¹・中村恵子²・藤代敏行²・石北隆一³

Analysis of *Salmonella* Enteritidis Isolates in Fukuoka City by Pulsed-Field Gel Electrophoresis(1990-1999)

Yoshiko IKEDA, Keiko NAKAMURA, Tosiya FUJISHIRO and Ryuichi ISHIKITA

要 旨

1990年から1999年の10年間に福岡市で発生した食中毒・有症苦情で *Salmonella* Enteritidis が検出された事例中、菌株が保管してあった51事例の175株について制限酵素 Avr IIによるDNA切断パターンをパルスフィールドゲル電気泳動法により比較（以下PFGEパターン）した。

Salmonella Enteritidis 菌株のPFGEパターンには一つの大きなグループ（Aグループ）があり、調査した51事例中32事例（複合感染の1事例を含む）からの分離株にみられた。さらに、このグループの菌株は、参考として実施した海外渡航が原因と考えられる事例、他自治体が考えられる事例および収去食品から分離菌株にもみられ、地理的にも期間的にも広く分布していることが明らかになった。他の20事例はすべて異なるパターンを示したが、分離時期に近いものの中には比較的類似したパターンを示すものがみられた。

Key Words : 福岡市 Fukuoka City , サルモネラ エンテリティディス *Salmonella* Enteritidis
パルスフィールドゲル電気泳動 PFGE

1 はじめに

サルモネラは食中毒起因菌として公衆衛生上注視されている細菌である。畜産食品を中心とした食生活の欧米化や食品の流通形態の大規模化に伴いサルモネラによる食中毒は年々増加しており、国内では食中毒の事件数・患者数においても原因菌の上位をしめ^{1) 2)}、死亡例も報

告されている^{3) 4)}。

特に *Salmonella* Enteritidis (以下SE) による食中毒は1980年代後半より、ヨーロッパや南北アメリカにおいての増加をうけ、わが国においても1989年ごろより急増している。これらの原因として鶏卵の汚染が指摘されており、鶏卵およびその加工品を原因食品としたSE食中毒事例が多数報告されている^{1) 2) 4) 5)}。

また、近年遺伝子技術の進歩はめざましく、感染症や食品衛生の分野でも分離菌の近似度を調べるために広く応用されている。その中でも、DNAを制限酵素切断し、パルスフィールド電気泳動法で切断パターン（以下PFGEパターン）を比べる方法は最も汎用されている方法の1つである^{6) ~ 9)}。

1. 福岡市保健環境研究所 微生物課
(現所属: 博多区 衛生課)
2. 福岡市保健環境研究所 微生物課
3. 福岡市保健環境研究所 微生物課
(現所属: 教育委員会学校給食課)

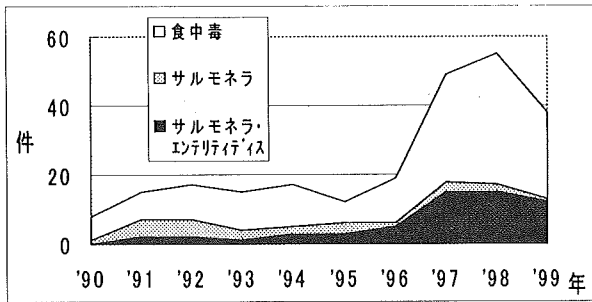


図1 福岡市内で発生した食中毒発生件数の年次推移

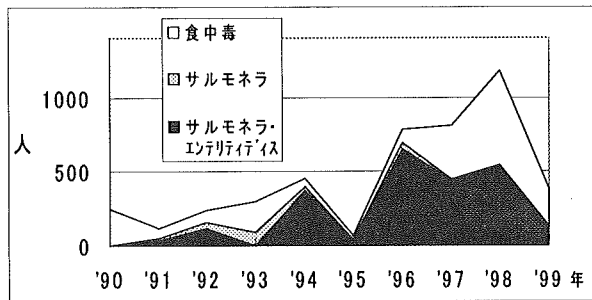


図2 福岡市内で発生した食中毒患者数の年次推移

そこで、1990年から1999年の10年間に福岡市で発生した食中毒・有症苦情等で分離され当所に保管してあったSE菌株について、制限酵素Avr IIによる消化後のPFGEパターンを比較した。さらに、海外渡航が原因と考えられる事例、他自治体が原因と考えられる事例および収去食品から分離された菌株のPFGEパターンと比較したのであわせて報告する。

II 福岡市内におけるサルモネラ食中毒の現状

過去10年の福岡市内で発生した食中毒の事件数および患者数は図1・2に示すとおりである。サルモネラによる食中毒は増加しており、そのほとんどがSEによるものである。また、SEが分離された食中毒・有症苦情事例を表1に示すとおり、レタス巻き(No.4)・卵とじ(No.8・23・26・40)・カツ丼(No.15・23)・ケーキ類(No.18・27・33・44)・納豆巻き(No.30)・卵料理(No.34)・生卵(No.41)等卵を原因としたと思われる事例が多数みられる。中でも、事例No.33は原料として使用された未殺菌液卵からSEが検出されている。

III 材料および方法

1. 調査対象

1990年から1999年の10年間に福岡市で発生した食中毒有症苦情でSEが検出された事例の中で菌株が保管

されていた51事例175株(有症者由来122株、調理従事者由来22株、その他人由来5株、食品由来21株、環境等由来5株)を対象とした。

また、参考株として同期間に当研究所で分離された海外渡航が原因と考えられる3事例3株(香港・マカオ1事例、タイ1事例、マレーシア・シンガポール1事例)、他自治体が原因と考えられる12事例12株および収去食品から分離された21株(液卵18株、鶏卵1株、豚ミンチ肉1株、砂ずり1株)についても検査した。

なお、菌株については、ドルセット卵培地(ニッスイ)で冷蔵保管されていたものを使用した。

2. SEの分離・同定・血清型別

常法^{10) 11)}に従ってサルモネラを分離、生化学的性状検査を実施し同定した。血清型別は市販のサルモネラ診断用免疫血清(デンカ生研)を用いた。

3. パルスフィールドゲル電気泳動

菌体からのDNA抽出、制限酵素Avr IIによるDNAの消化、およびパルスフィールドゲル電気泳動は寺嶋らの方法⁹⁾を参考に以下の方法で実施した。

- 1) 感受性測定用ブイヨン(ニッスイ)400 μ lに菌を接種し、37 $^{\circ}$ C、18時間培養した。
- 2) 培養液をPett IV溶液(10mM Tris-HCl pH8.0, 1M NaCl)で2回洗浄、300 μ lのPett IV溶液に再浮遊させ、同量の1.5% Chromosomal Grade Agarose(Bio-Rad) in Pett IV溶液と65 $^{\circ}$ C下で混合し、プラグを作成した。プラグの作成にはPlugMold(Bio-Rad)を使用した。
- 3) Cell strainer(FALCON 2360)をセットした組織培養用6well dishにプラグを移し、0.1% ProteinaseK in lysis buffer(10mM Tris-HCl pH8.0, 1M NaCl, 100M EDTA, 0.5% Sarkosil, 0.2% Deoxycholic Acid, 0.5% Brij58)5mlで56 $^{\circ}$ C、18時間振とうして菌体からDNAを抽出した。
- 4) プラグをTE buffer(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)で洗浄した。
- 5) 制限酵素Avr II(NEB)で37 $^{\circ}$ C、18時間処理しDNAを消化した。Avr IIはプラグ50 μ lあたり25 Uを使用した。反応bufferは制限酵素添付のものを使用した。
- 6) プラグを0.5 \times TBEで洗浄後、電気泳動を実施した。泳動装置はCHEF-DR III(Bio-Rad)を使用した。

泳動条件 buffer : 0.5 \times TBE
 temperature : 14 $^{\circ}$ C
 volt : 6 V / cm
 pulse time : 5sec ~ 50sec, 22hour

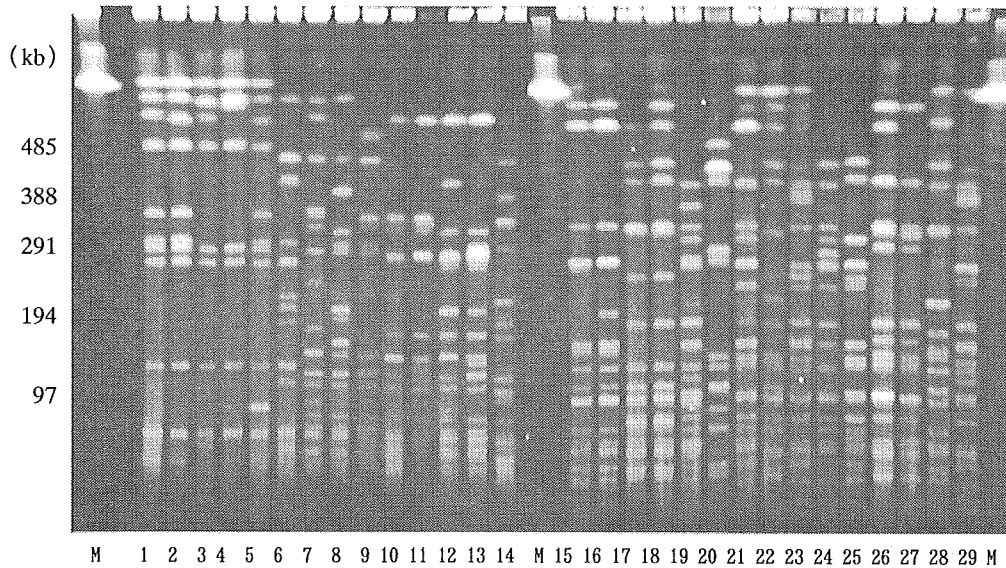


図3 食中毒・有症苦情事例から分離されたSE菌株のPFGEパターン
M: molecular weight marker (Lambda ladder),

Lane1: typeA1, Lane2: typeA2, Lane3: typeA3, Lane4: typeA4, Lane5: typeA5, Lane6: typeB,
Lane7: typeC, Lane8: typeD, Lane9: typeE, Lane10: typeF, Lane11: typeF', Lane12: typeG,
Lane13: typeH, Lane14: typeI, Lane15: typeJ, Lane16: typeJ', Lane17: typeK, Lane18: typeK',
Lane19: typeL, Lane20: typeM, Lane21: typeN, Lane22: typeO, Lane23: typeP, Lane24: typeQ,
Lane25: typeR, Lane26: typeS, Lane27: typeS', Lane28: typeT, Lane29: typeU

IV 結果

食中毒有症・苦情事例から分離されたSE菌株の制限酵素 Avr IIによるDNA切断後のPFGEパターンには、1つの大きなグループ(Aグループ)があった。このグループの5つのパターンをtypeA1～typeA5、他のパターンを分離された順にtypeB～typeUとした。なお、同一事例から分離された菌株でPFGEパターンが1～2バンド違うものは変異株とみなし、typeF', typeJ', typeK', typeS'とした。

各事例のPFGEパターンのtypeは表1、PFGE像は図3に、PFGEパターンの年次変化は図7に示すとおりである。

typeA1は12事例(No.4, 6, 10, 24, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 43)あり、期間も1992年から1999年まで今回解析した全期間においてみられた。typeA1と620kb付近のバンドがわずかに大きいtypeA2は1996年頃から出現しており、15事例(No.15, 16, 19, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 40, 43)みられた。また、これらと似たパターンtypeA3が3事例(No.1, 3, 48)、typeA4が1事例(No.2)、TypeA5が1事例(No.18)みられた。

typeB～typeUは複数事例から分離されたものはなかったが、typeGとtypeHは5バンドが違う比較的近いものと考えられた。また、近い時期に発生した事例から分離された菌株のPFGEパターン(typeB, typeC, typeD)や(typeF, typeG, typeH), (typeJ, typeK), (typeN, typeO, typeP)間には1部に似た部分がみられた。

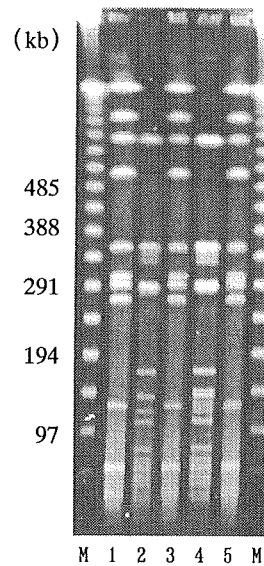


図4 事例No.10から分離されたSE菌株のPFGEパターン

M: molecular weight marker (Lambda ladder) Lane1: 有症者 typeA1, Lane2: 有症者 typeF, Lane3: 有症者 typeA1, Lane4: 調理従事者 typeA1, Lane5: 調理従事者 typeF'

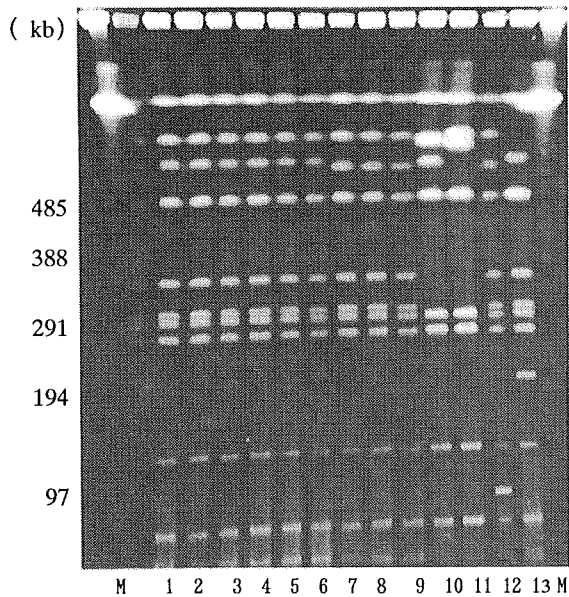


図5 AグループのPFGEパターン
 M : molecular weight marker (Lambda ladder)
 Lane1 : typeA1 事例 No.4 有症者,
 Lane2 : typeA1 マカオ渡航者
 Lane3 : typeA1 タイ渡航者
 Lane4 : typeA1 マレーシア・シンガポール渡航者
 Lane5 : typeA1 液卵
 Lane6 : typeA1 豚肉
 Lane7 : typeA2 事例 No.35 有症者
 Lane8 : typeA2 液卵
 Lane9 : typeA2 液卵
 Lane10: typeA3 事例 No.1 有症者
 Lane11: typeA4 事例 No.2 有症者
 Lane12: typeA5 事例 No.35 有症者
 Lane13: typeA6 液卵

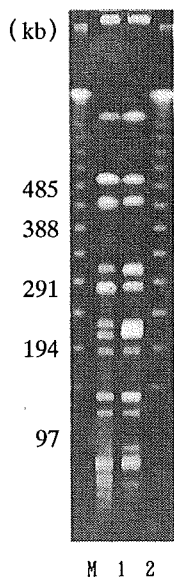


図6 typeB・typeB'のPFGEパターン
 M : molecular weight marker (Lambda ladder)
 Lane1 : typeB 事例 No.5 有症者
 Lane2 : typeB'液卵

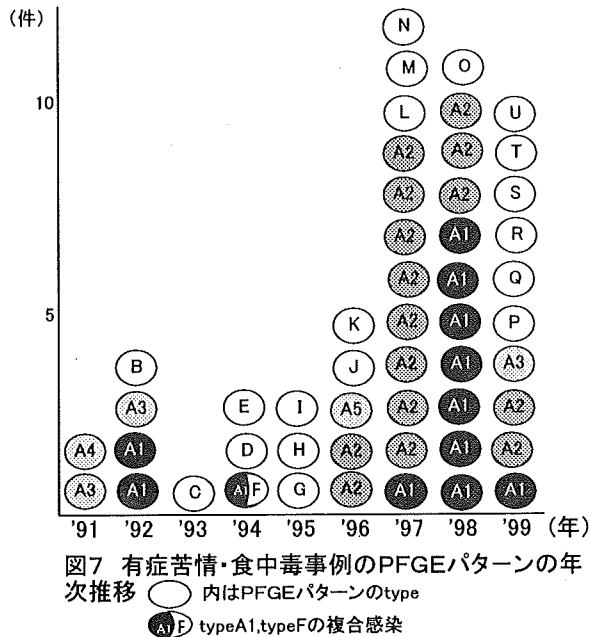


図7 有症苦情・食中毒事例のPFGEパターンの年次推移 ○内はPFGEパターンのtype
 (A1)F typeA1,typeFの複合感染

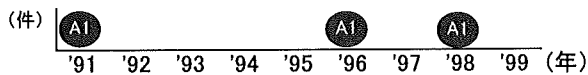


図8 海外が原因と考えられる事例のPFGEパターンの年次推移 ○内はPFGEパターンのtype

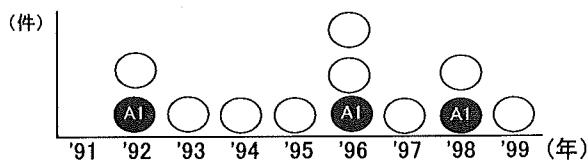


図9 他自治体が原因と考えられる事例のPFGEパターンの年次推移 ○内はPFGEパターンのtype
 無印は食中毒・有症苦情から検出されていないパターン

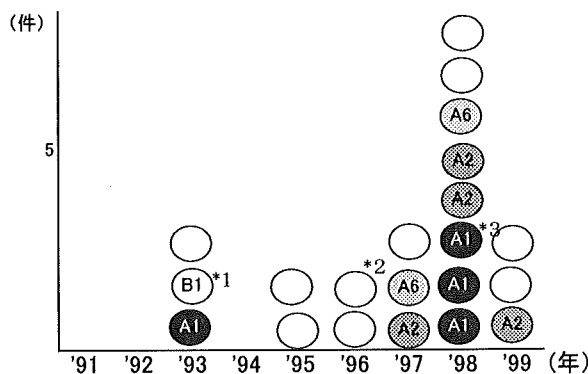


図10 収去食品から分離されたSE菌株のPFGEパターンの年次推移
 *1鶏卵由来, *2砂ずり由来 *3豚ミンチ由来 他は液卵由来
 ○内はPFGEパターンのtype
 無印は食中毒有症苦情から検出されていないパターン

表1 福岡市内で発生した食中毒・有症苦情事例およびP F G Eパターンのtype

事例 No	発 生 年月日	原因食品	喫食者数	患者数	菌株の由来	(供試株数)	P F G E t y p e
1	1991. 6.15	牛肉のたたき 若鶏のマリネ	5	4	有症者 調理従事者	(1)	A3
						(1)	A3
2	1991. 7. 4	不明	不明	3	有症者	(3)	A4
3	1992. 7.23	不明	4	4	有症者 調理従事者	(1)	A3
						(1)	A3
4	1992. 8.23	寿司 (ワス巻き)	1 2 3 以上	1 1 6	有症者 食品・ワス巻き	(2)	A1
						(1)	A1
5	1992.10.29	不明	5	3	有症者	(1)	B
6	1992.11. 2	不明	不明	1	有症者	(1)	A1
7	1993.12. 2	不明	不明	2	調理従事者	(1)	C
8	1994. 8.15	法事料理	1 7	1 2	有症者 食品・卵とじぐち	(2)	D
						(1)	D
9	1994. 8.27	集団給食	2 2 以上	2 2	有症者 無症者	(2)	E
						(1)	E
1 0	1994.11.25	集団給食	5 4 1	3 3 6	有症者 調理従事者 有症者 調理従事者	(2)	A1
						(1)	A1
						(1)	F
						(1)	F'
1 1	1995. 7.28	家庭料理	5	4	有症者	(1)	G
1 2	1995. 9. 4	家庭料理	2	2	有症者	(1)	H
1 3	1995.10. 6	不明	不明	7	有症者	(6)	I
1 4	1996. 5.31	仕出し弁当	不明	4 2 7	有症者 食品・きぬさや 有症者	(4)	J
						(1)	J
						(1)	J'
1 5	1996. 6.27	カツ丼	2 7 0	1 9	有症者	(2)	A2
1 6	1996. 9.13	病院給食 (野菜類加工品)	2 5 0	1 0 7	有症者 食品・大根甘酢和え 食品・青葉I和え	(2)	A2
						(1)	A2
						(1)	A2
1 7	1966. 9.21	中華料理	1 8 0	8 9	有症者 調理従事者	(1)	K
						(1)	K'
1 8	1996. 9.24	生菓子 (ケーキ)	1 3	1 1	有症者 調理従事者 食品・ケーキ	(1)	A5
						(1)	A5
						(1)	A5
1 9	1997. 5.21	弁当 (牛カルビ焼き肉)	不明	9 3	有症者 調理従事者	(3)	A2
						(1)	A2
2 0	1997. 6.12	不明	不明	1	有症者 無症家族	(1)	L
						(1)	L

事例 No	発 生 年月日	原因食品	喫食者数	患者数	菌株の由来	(供試株数)	P F G E t y p e
2 1	1997. 8.4	洋食バイキング	1 5 4	7	有症者	(3)	A2
2 2	1997. 8.21	中華料理 洋食料理	1 4 0	7 6	有症者 調理従事者	(1) (3)	A2 A2
2 3	1997. 8.26	かき揚げ いかの卵とじ カツ丼	8 1	7 3	有症者	(3)	A2
2 4	1997. 8.27	不明	1 7	9	有症者	(1)	A1
2 5	1997. 9.3	幕の内弁当	1 3 0	7	有症者	(1)	M
2 6	1997. 9.20	ビーフカツの卵とじ	約 1 1 0	3 4	有症者 調理従事者	(2) (1)	A2 A2
2 7	1997. 8.23	洋生菓子 (ティラミス)	約 1 7 0 0	1 1 4	有症者 調理従事者 食品・ティラミス	(6) (1) (1)	A2 A2 A2
2 8	1997.10. 7	不明	4	4	有症者 調理従事者	(3) (1)	A2 A2
2 9	1997.10. 8	不明	6	6	有症者	(1)	N
3 0	1997.10.20	寿司 (納豆巻き)	1 2 6	1 8	有症者	(6)	A2
3 1	1998. 3.22	結婚披露宴料理	2 4 6	5 0	有症者	(3)	A2
3 2	1998. 4.13	保育園給食 (マゼンソン)	1 5 6	4 2	有症者 保母 調理従事者 食品・マゼンソン 原材料・豚肉	(3) (3) (2) (1) (1)	A2 A2 A2 A2 A2
3 3	1998. 4.29	チーズケーキ ティラミス	不明	6 6	有症者 食品・チーズケーキ 原材料・凍結卵白 工場内トレー水	(2) (1) (2) (1)	A1 A1 A1 A1
3 4	1998. 6.19	卵料理	7 4	5 4	有症者 調理従事者 調理場排水	(3) (2) (1)	A1 A1 A1
3 5	1998. 9.20	懐石料理	1 5	8	有症者	(3)	A1
3 6	1998. 9.26	不明	6	5	有症者	(2)	A1
3 7	1998. 9.30	懐石料理 (くらげのマゼンソン和え)	1 1 2	8	有症者 調理従事者 食品・くらげマゼンソン和え	(3) (1) (1)	A1 A1 A1
3 8	1998.10. 3	披露宴料理	3 7 0	1 7 6	有症者 食品・車比アモン和え	(3) (1)	A1 A1

事例 No	発 生 年月日	原因食品	喫食者数	患者数	菌株の由来	(供試株数)	P F G E t y p e
3 9	1998.10.13	不明	不明	2	有症者	(2)	O
4 0	1998.10.14	従業員食堂 (カレー ^カ 豚肉卵炒め)	3 2 0	2 7	有症者 調理従事者 食品・鶏肉 ^カ 食品・フライド ^{ポテト} 食品・豚肉卵炒め 食品・炒 ^マ 草ひたし	(3) (2) (1) (1) (1) (1)	A2 A2 A2 A2 A2
4 1	1998.11. 6	おでん, 生卵	4	4	有症者 食品・おでん	(3) (1)	A1 A1
4 2	1999. 2.16	不明	不明	1	有症者	(1)	A2
4 3	1999. 5.17	不明	5	4	有症者	(4)	A1
4 4	1999. 6. 7	チョコレート ビスケット	7	4	有症者 食品・チョコレート	(2) (1)	A2 A2
4 5	1999. 6.11	駅弁	4 0	3 7	有症者 食品・竹の子ご飯 弁当容器	(4) (2) (1)	P P P
4 6	1999. 7. 5	不明	4	4	有症者	(3)	Q
4 7	1999. 7.13	不明	2	2	有症者	(1)	R
4 8	1999. 9. 4	居酒屋料理	8	7	有症者	(1)	A3
4 9	1999. 9.25	不明	7	5	有症者 有症者	(2) (1)	S S'
5 0	1999.10.18	和牛レバー	3	3	有症者 食品・和牛レバー	(1) (1)	T T
5 1	1999.10.18	仕出し弁当	9 9	5 7	有症者 調理従事者	(6) (1)	U U

同一事例から分離した複数の株を解析した事例が40事例あったが、この中の4事例(No.10, 14, 17, 49)において同一パターンを示さなかった。そのうち3事例(No.14, 17, 49)は、1~2バンド違う変異株と考えられた。一方、事例No.10は有症者由来2株と調理従事者由来1株がtypeA1を有症者由来1株がtypeF、調理従事者由来1株がtypeFの変異株と考えられるtypeF'を示し(図5)、複合感染と考えられた。

参考として実施した海外渡航が原因と考えられる事例のPFGEパターンの年次推移は図8に示すとおり3事例ともtypeA1だった。

国内の他の自治体が原因と考えられた事例のPFGEパターンの年次推移は図9に示すとおり3事例がtypeA1だった。他の9事例は福岡市内で発生したものと同一パターンを示すものはなかった。

収去食品からの分離株のPFGEパターンの年次推移は図10に示すとおり、液卵から分離された3株、豚ミンチから分離された1株がtypeA1、液卵から分離された4株がtypeA2だった。液卵から分離された2株は、Aグループに属するが有症者からの検出はみられていないtypeA6であった。また、液卵から分離された1株はtypeBと3バンド違うパターンtypeB'(図6)だった。他の10株は福岡市内で発生したものと同一パターンを示すものはなかった。

V 考察

SE菌株の制限酵素Avr IIによる切断後のPFGEパターンを比較したところ、1つの大きなグループ(Aグループ)があることがわかった。このグループの菌株

は、1992年から1999年まで今回調査したほぼ全期間に分離されており、東南アジアへの渡航が原因と考えられる3事例からも分離されていることから、期間的にも地理的にも広く流行していたものと考えられる。また、液卵9検体からも分離されており、多くの研究者が述べているとおり^{6) 7)}このクローンが卵との関係が指摘されている現在の大流行の原因の1つと考えられた。

一方、Aグループ以外の多数のP F G Eパターンの菌株も分離されており、多数のクローンのS E汚染が広がっているものと考えられた。これらAグループ以外のP F G Eパターンの菌株も液卵から分離されており、鶏卵汚染に関連しているのはAグループのクローンだけではないものと推察された。その中で、Aグループの菌株のみが検出率が高いのは、このクローンの大きな供給源がある、このクローンが環境等に強く汚染が広がっている、あるいは、遺伝子的に安定性が高く変異が少ないため高頻度に検出されている等の可能性が考えられ、今後さらなる究明が必要と考えられる。

P F G Eパターンを比較した場合、どこまでを同一と判断できるかは難しいものと考えられる。特に今回のように長期間冷蔵庫で保存されていた菌株を使用した場合、保存中の変異も考慮する必要がある。今回、同一事例から分離された菌株で1~2バンド違うものについては変異株と判断し、同一事例から分離された複数株を解析した40事例中39事例までが同一クローンと判断できた。一方、事例No.10は全く違った2種類のP F G Eパターン (typeA, typeF) が分離されており、複合感染と考えられた。食中毒においては、喫食調査やさかのぼり調査などを中心とした疫学調査が重要であることはいまでもない。しかし、原因施設・原因食品・汚染経路等の追求においては、有症者から分離された菌株と食品・環境材料から分離された菌株や他の事例から分離された菌株との同一性を調べることも必要となるものである。特に、同一食品を原因とする広域的な食中毒、いわゆるdiffuse outbreak においては、P F G Eパターンの比較が原因究明に効果をあげている^{8) 9)}。また、事例No.10はP F G Eパターンを比較することで複合感染が判明し

ており、これまでの喫食調査や菌の血清型別等を中心とした調査だけでは不十分であり、今後P F G Eパターンの解析の必要性が強く示唆されたものである。しかし、Aグループの菌株のように検出率の高いP F G Eパターンの菌株の場合、他の疫学マーカーを併用するなど菌の同一性の判断は慎重に行う必要があり、今後、P F G Eパターンを蓄積し、流行パターンをデータ化しておくことも重要と考えられた。

文 献

- 1)厚生省監修：食中毒予防必携，初版，P73-79，日本食品衛生協会，1990
- 2)相楽裕子：サルモネラ・エンテリティディス感染症，臨床と微生物，Vol.25No.2:173-178,1993
- 3)岡部信彦：Salmonella Enteritidis による死亡例の報告，病原微生物検出情報 19 32-33,1998
- 4)金子通治 他：山梨県で発生したサルモネラ・エンテリティディスによる家庭内食中毒での死亡例とサルモネラ症 日食微誌 16,51-56,1999
- 5)小沼博隆 他：サルモネラ食中毒と鶏卵，モダンメディア，41:230-244,1995
- 6)寺嶋純 他：パルスフィールド・ゲル電気泳動法 Salmonella Enteritidis，臨床と微生物，Vol.23No.6:641-644,1996
- 7)仲西寿男：わが国におけるパルスネット構築のための緊急研究<サルモネラ>，厚生科学研究補助金（厚生科学特別研究事業）分担研究報告書 p64-67
- 8)Hamada,K et al:Outbreaks of Salmonellosis Caused by Ingestion of Cuttlefish Chips:Epidemiological Analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Jpn. J.Infect.Dis.,52,53-54,1999
- 9)Terajima,J. et al :Detection of Multi-Prefectural E. coli O157:H7 Outbreak Caused by Contaminated Ikura-Susi Ingestion. Jpn. J. Infect. Dis., 52,52-53 1999
- 10)厚生省監修：微生物検査必携細菌・真菌，第3版，pD43-54，日本公衆衛生協会 1987
- 11)厚生省監修：食品衛生検査指針微生物編，p.67-126，日本食品衛生協会，1990