

## 資料

2005-2006年に県内で発生した食中毒に由来する*Salmonella* Enteritidisの  
パルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子解析と問題点

上野伸広 久保園祥子 松山茂樹  
御供田睦代<sup>1</sup> 石谷完二 藏元 強  
宮田義彦

## 1 はじめに

*Salmonella* Enteritidis (以下, SE) は, 1989年から検出数が激増し, その原因食品として, 鶏卵, 鶏肉の関与が疑われた。全国統計では, 2000年以降, SE検出の減少とともに, サルモネラによる食中毒の発生も顕著に減少傾向にある。しかし, 事件数は減少したものの, 未だに細菌性食中毒の中ではサルモネラによる患者数が最も多い。

本県(鹿児島市を除く)のサルモネラによる食中毒事件数は, ノロウイルスに次いで多く, 全事例の3割弱を占め, 近年においても横ばい傾向を示し, 細菌性食中毒の約半数がサルモネラを病因物質としている(表1)。また, 食中毒に起因したサルモネラの血清型は, 1998年6月以降, 当センターで確認した菌株すべてがSEであった。さらに, 2005年にはSEによる食中毒が原因と思

われる死者1名が報告されている。

今回, 2005年から2006年にかけて県内で発生したSEによる食中毒事例から分離された菌株について, パルスフィールドゲル電気泳動法(以下, PFGE)を実施し, 若干の知見を得たので, 考察を加え報告する。

## 2 対象と方法

本県(鹿児島市を除く)で発生した2005年のSEによる食中毒3事例, 2006年6事例(疫学調査の結果から食中毒事件扱いとならなかった1事例を含む), 計9事例から分離されたSE菌株を対象とした(表2)。

PFGEは『大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法-九州ブロックマニュアル-』に準じて実施し, 制限酵素*Xba*Iと*Bln*Iの2種類を使用した。分子量マーカーは, 国立感染症研究所より分与された*Salmonella* Braenderup

表1 本県の年度別食中毒病因物質(鹿児島市発生分を除く)

年度		1999 (H11)	2000 (H12)	2001* (H13)	2002 (H14)	2003* (H15)	2004 (H16)	2005 (H17)	2006 (H18)	合計	割合
細菌	サルモネラ	6	4	1	3	4	7	4	5	34	26.8%
	ビブリオ属		3	4	1	1			2	11	8.7%
	黄色ブドウ球菌	1	1	1		1	4		2	10	7.9%
	カンピロバクター	1		1		1	1	2	1	7	5.5%
	その他の細菌					3			2	5	3.9%
ウイルス	ノロウイルス	5	1	8	4	8	7	6	2	41	32.3%
	アストロウイルス								1	1	0.8%
	自然毒	1	2	2		3	1	1		10	7.9%
	不明	3	1		1	1	1	1		8	6.3%
	合計	17	12	17	9	22	21	16	13	127	100.0%

\* 2種類の病原体が検出された事例のため, 食中毒発件数とは異なる

1 鹿児島県立大島病院

〒894-0015

鹿児島県奄美市名瀬真名津町18-1

表2 2005-2006年に本県で発生したSEによる食中毒等の状況(鹿児島市を除く)

事例No.	発生日	発生地	摂食場所	摂食者数	患者数	原因及び推定食品	ファージ型*
1	2005. 7. 20	指宿市	家庭	14	11	手作り弁当 (推定)	RDNC
2	2005. 8. 7	枕崎市	法事	258	105	グラタン	47
3	2005. 8. 29	指宿市	家庭	5	4	生卵かけ納豆 (推定)	RDNC
4	2006. 6. 28	鹿屋市	保育園	80	69	パンブキンプリン (推定)	6a
5	2006. 7. 7	奄美市	屋外	不明	3	カツ丼 (推定)	4
6	2006. 7. 9	垂水市	葬儀	106	23	鶏のグラタン (推定)	6a
7	2006. 7. 30	大島郡	飲食店	24	17	調理従事者の手指 (推定)	4
8	2006. 8. 7	指宿IC管内	保育園	29	12	不明「疫学調査の結果、食中毒事件として取り扱わず」	6a
9	2006. 9. 19	指宿市	家庭	5	4	生卵かけ納豆 (推定)	RDNC

\* ファージ型は国立感染症研究所 細菌第一部で実施

RDNC: 現行の判定基準に該当しない

H9812株 (以下, SB9812株) を用いた。

PFGEパターンの解析は目視判定の後, Fingerprinting II 解析ソフト (BIO-RAD) を使用し, 比較の設定は「バンドからDice」の方法で行った。

PFGEパターンと国立感染症研究所で実施したファージ型別との整合性についても検討した。

### 3 結果

#### 3. 1 目視による判定

図1に制限酵素 *Xba* I と *Bln* I によるPFGEの遺伝子パターンを示した。

*Xba* I は X-a, X-b, X-c の3種類のパターンに分類され, *Bln* I でも B-a, B-b, B-c の3種類に分類された。

*Xba* I, *Bln* I とも目視によるPFGE解析の結果, 各事例のSE菌株は X-a=B-a (以下, Type-A), X-b=B-b (以下, Type-B), X-c=B-c (以下, Type-C) となり, 2種類の制限酵素において同じ結果が得られた。

#### 3. 2 Fingerprinting II による解析

図2に制限酵素 *Xba* I のデンドログラムを示した。

類似性99%以上を示すグループ, 5種類に分類された。事例No. 2, 5, 7由来のSEは, それぞれ類似性100%の同じクラスターに分類され, 目視でのType-B, Type-Cと一致する解析結果を得た。しかし, Type-Aとしたグループは, 3種類に分類され, 同一事例由来のSEであっても類似性64.03%となった。

図3に制限酵素 *Bln* I のデンドログラムを示した。

類似性100%を示すグループ, 4種類に分類された。目視判定でType-B, Type-Cと判定されたグループ (事例No. 2, 5, 7) は, *Xba* I 同様, それぞれ類似性100%の同じクラスターに分類された。しかし, Type-Aのグループは, 2種類に分類され, 類似性92.55%であった。

制限酵素 *Xba* I, *Bln* I ともにPFGE解析において, 目視判定とFingerprinting II による解析では, 異なる結果となった。

一方, 分子量マーカーとして使用したSB9812株は図2, 図3のとおり, 泳動したすべてのレーンで類似性100%を示した。

#### 3. 3 ファージ型別との整合性

表2に示した各事例のファージ型とPFGE解析結果との整合性を調べた。

ファージ型 (PT) はPT4, 6a, 47, RDNCの4種類に分類された。PT4は目視判定 Type-Cに, PT47は Type-Bとそれぞれ一致した。しかし, PT6aとRDNCは Type-Aと一致したものの, PFGEパターンに両者の違いを認めなかった。

また, Fingerprinting II による解析ではPT6aとRDNCは混在する傾向にあり, 同じファージ型でも類似性 *Xba* I で92.55%, *Bln* I で64.03%となった。

### 4 考察

今回, PFGEの目視判定とFingerprinting II による解析結果には, 一部で乖離を認めた。その大きな要因として, 分子量マーカーSB9812株の泳動レーンに問題があったと考えられた。結果の乖離を認めたPFGEパターンは, すべて両端のみにSB9812株を使用した泳動に限られていた。このため, 目視判定では泳動の湾曲状況を一つの条件として見て取れるが, Fingerprinting II 解析ソフトでは, 両端にのみ分子量マーカーを使用した場合, 中央位置の泳動パターンの補正ができないため, 誤った分子量算出を行ったことが, 乖離の原因と思われた。これは, 両端の分子量マーカー付近で泳動した目視判定 Type-AのPT6aとRDNCは100%の類似性を示したことで分かる。

このことから本事例のSEについては, PT6aとRDNCは制限酵素 *Xba* I と *Bln* I のPFGEパターンが同一である

と考えられた。

さらに、制限酵素 *Xba* I と *Bln* I による SE の PFGE パターンは出現バンドも少なく、大腸菌に比べ多様性に欠ける。サルモネラの PFGE には、制限酵素 *Xba* I や *Bln* I を使用する文献を多く見受けるが、別の制限酵素についても検討する必要性を感じた。

一方、表 2 の原因及び推定食品から鶏卵、鶏肉の関与が示唆される事例が多い。指宿市で 2005 年 7 月から 2006 年 9 月にかけて発生した 3 事例の SE は、いずれも目視判定: Type-A, フェージ型: RDNC であったことから、何らかの関連が示唆された。

今後、食中毒事件発生後これらの結果を速やかに報告し遡り調査に反映できるよう、検査体制の整備及び過去の情報整理等を行うことが重要と考える。

## 5 まとめ

Fingerprinting II 解析ソフトを使用することは、PFGE の遺伝子解析結果を客観的数値として合理的に報告することが可能となり、有用な手段である。しかし、分子量マーカーを常に最適なレーンに最良な状態で泳動しなければ、確かな結果は得られない。

PFGE を実施する際は、SB9812 株を少なくとも両端と中央の 3 カ所に泳動することが重要であることを確認した。

SE の特徴として、①大腸菌に比べ PFGE の出現バンド数が少ない、②フェージ型が違って同一遺伝子パターンが存在する、③サルモネラは変異が少ない、等の理由から分子疫学的調査として限界があることが確認された。また、フェージ型が同じでも、PFGE パターンが異なる SE の存在も多く報告されている。

これらのことから、SE による食中毒事例の疫学調査では、実地疫学、PFGE、フェージ型を総合的に判断することが望まれる。

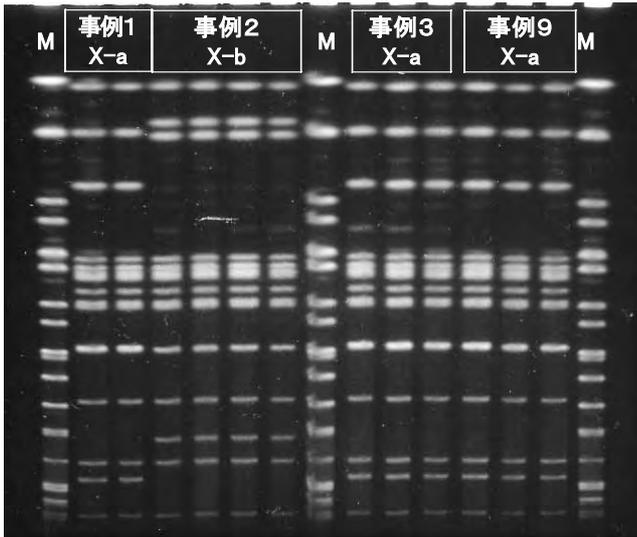
## 謝辞

本誌へのフェージ型別の掲載を快諾して頂きました、国立感染症研究所 細菌第一部 泉谷秀昌先生に深謝いたします。

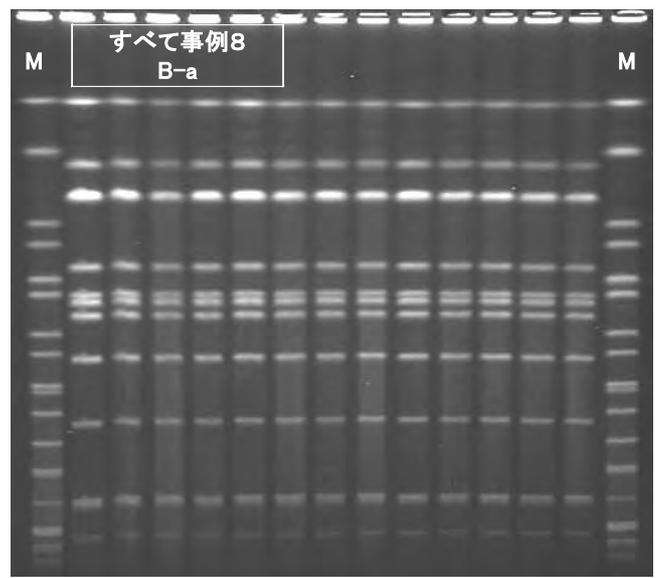
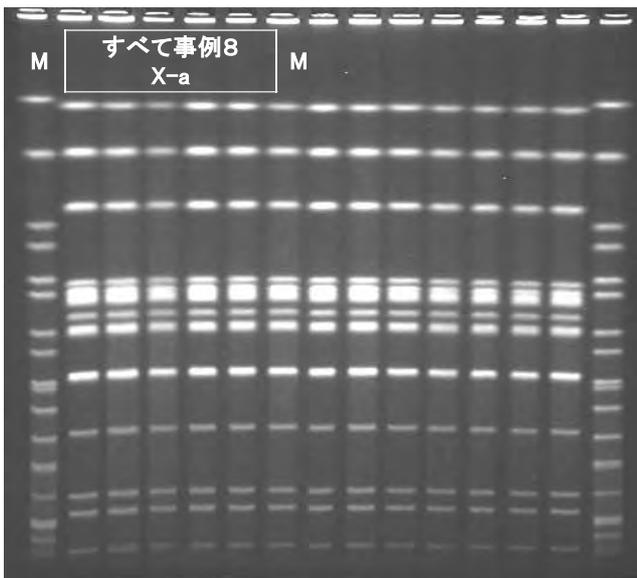
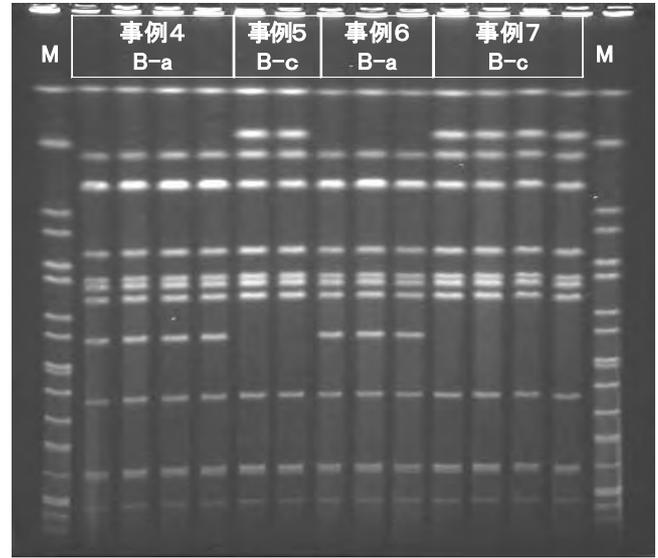
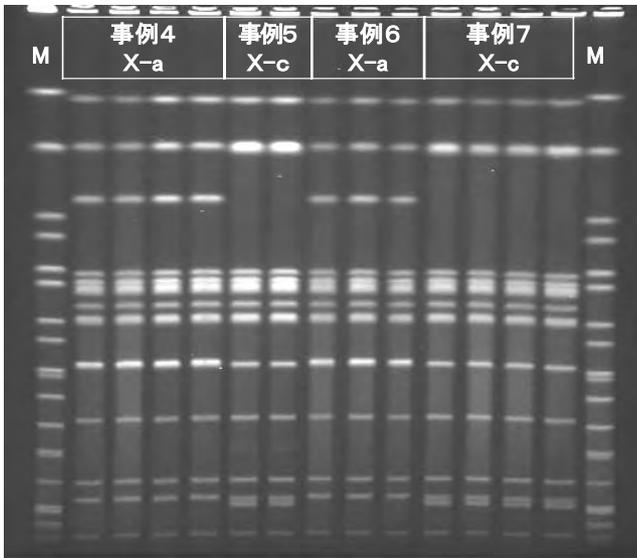
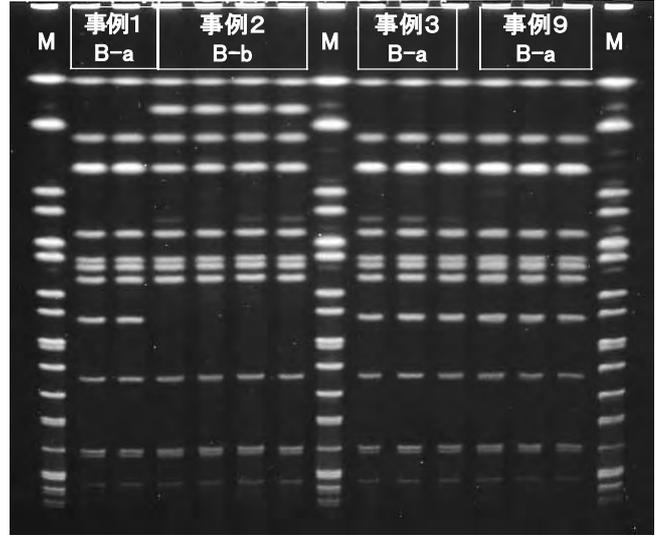
## 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 感染症情報センター；サルモネラ症、病原微生物検出情報 月報, Vol. 27 No. 8 (2006)
- 2) 鹿児島県保健福祉部 生活衛生課；食品衛生・乳肉衛生業務概要, 平成 17 年度
- 3) 堀川和美, 河野喜美子, 他；九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み II, 平成 16 年度総括・分担研究報告書 (厚生労働科学研究費補助金新興再興感染症研究事業). 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究, 172-177
- 4) 中嶋洋, 大森恒子, 他；岡山県における感染性胃腸炎起因菌の流行疫学調査, 岡山県環境保健センター年報, 24, 37-41 (1999)

【制限酵素: *Xba* I】



【制限酵素: *Bln* I】



M : 分子量マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812株)

図1 PFGE遺伝子パターン

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
**Salmonella Xba1**

**Salmonella Xba1**

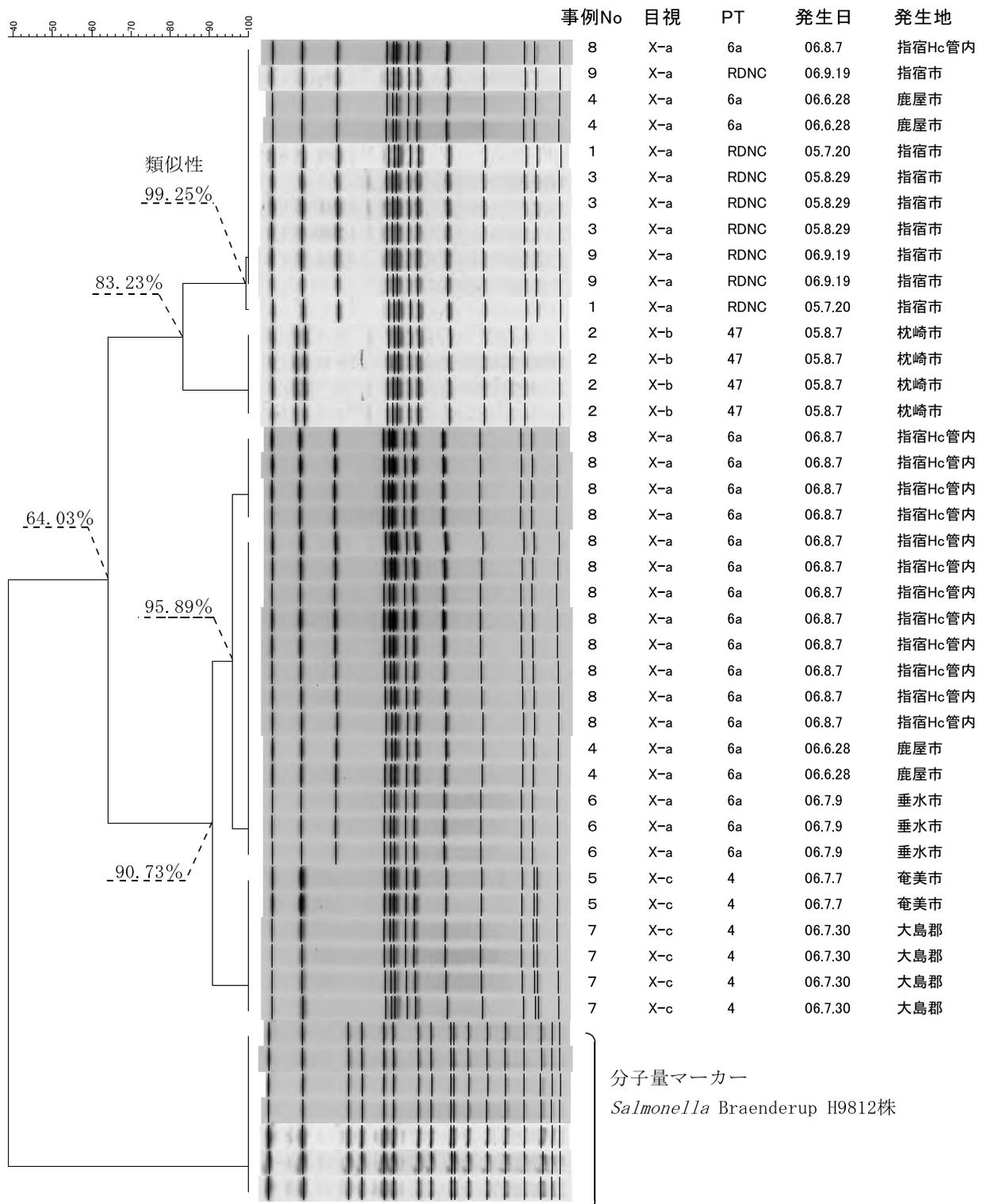


図2 制限酵素 Xba I によるデンドログラム

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
**Salmonella (Bln1)**

**Salmonella (Bln1)**

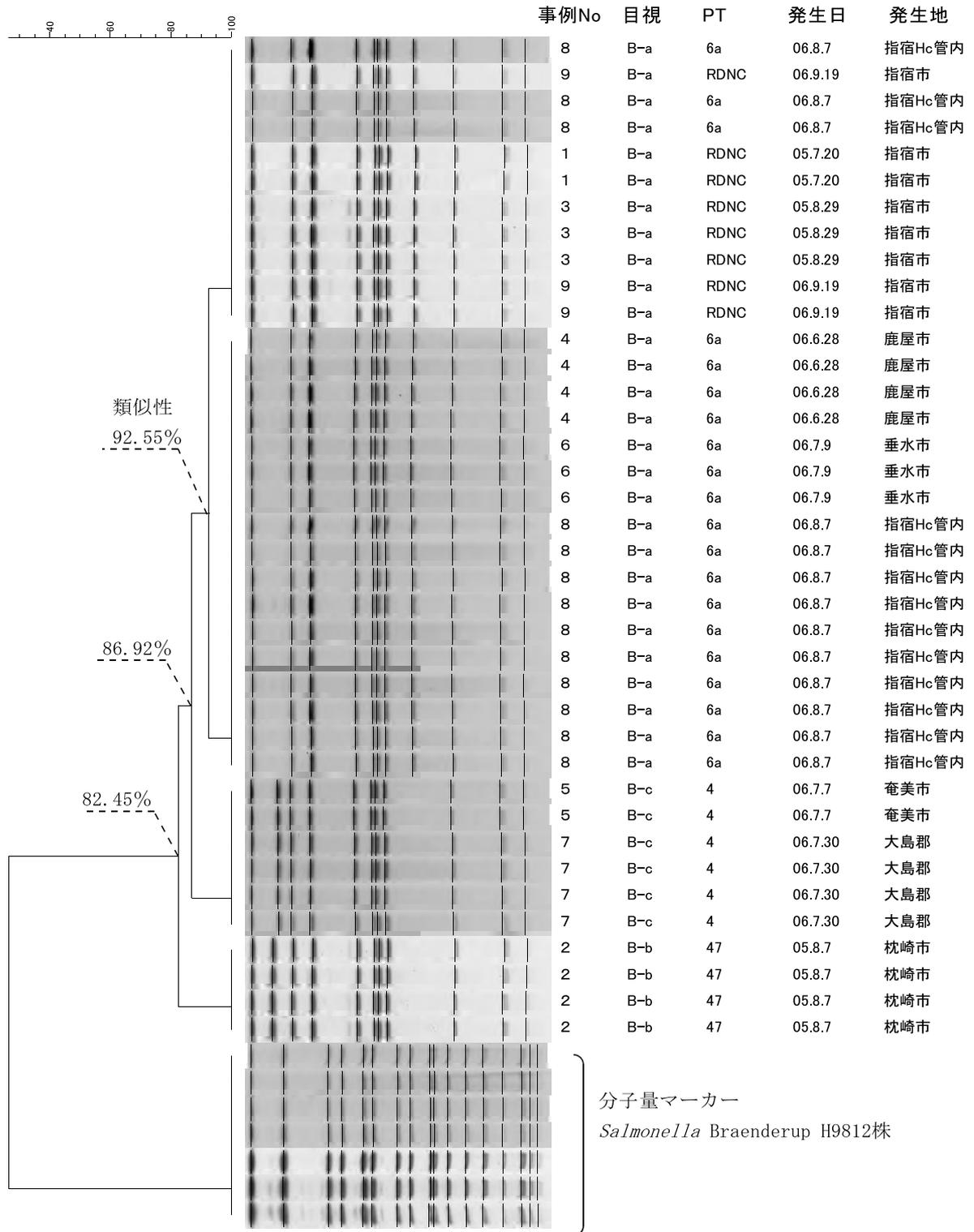


図3 制限酵素 Bln I によるデンドログラム