

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
平成 15 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）型別法の  
施設間変動について —感染研新プロトコールの試用—

分担研究者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	石川和彦	滋賀県立衛生環境センター
	藤原恵子	京都府保健環境研究所
	竹上修平	京都市衛生公害研究所
	小笠原準	大阪市立環境科学研究所
	横田正春	堺市衛生研究所
	西海弘城	兵庫県立健康環境科学研究所
	黒川 学	神戸市環境保健研究所
	川西伸也	姫路市環境衛生研究所
	中山章文	奈良県保健環境研究センター
	金澤祐子	和歌山市衛生研究所
	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	小林一寛	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

パルスネット構築の問題点のひとつであった小さいサイズのパンド認識の有無を解決するため、従来法に替えて国立感染症研究所から提示のあった新プロトコールを試用し、同一菌株で PFGE 型別を実施して近畿支部 11 衛生研究所間の変動をみた。電気泳動用アガロースおよび泳動条件の変更により、小さいサイズのパンドが明瞭になり各施設におけるパンド認識の差異がある程度解消されたが、まだばらつきが大きく近似度の低い画像も見られた。これは、画像のコントラストに施設間差があることに起因すると考えられ、今後各施設で均質な画像を得るため、技術の向上とともに写真撮影あるいは画像取り込み条件の改善を計る必要がある。

A. 研究目的

パルスネット構築には施設による PFGE 型別法の差異を最小に抑える必要がある。

このため、近畿支部の衛生研究所において方法の統一と各施設の技術向上を計ってきたが、小さいサイズのパンド認識に

施設間変動が見られ、これが問題点のひとつであった。一方、国立感染症研究所（感染研）では、外国で実施されている PFGE 型別法との比較を可能にするため新しいプロトコールを作成し、従来のラムダラダーに代わり共通の標準株をサイズマーカーに使用するよう提案があった。この新プロトコールでは、使用アガロースと電気泳動条件の変更により、小さいサイズのバンドが明瞭に区別できると期待されることから、近畿支部 11ヶ所の衛生研究所で新プロトコールを試用し、標準化への有用性を検討した。また、同一の画像を 2ヶ所の施設で解析し、解析者による変動についても調べた。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157:H7 5株（No.1～5）および *Salmonella* Enteritidis 5株（No.6～10）の計 10株を用いた。

### 2. PFGE 法

感染研が CDC 法と比較可能な電気泳動画像が得られるよう従来法を改良した新プロトコールに準じ、表 1 に示した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した。制限酵素は EHEC には *Xba*I を、*S. Enteritidis* には *Bln*I を使用し、サイズマーカーは、ラムダラダーと *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain（標準株）の *Xba*I 切断を同時に使用した。

前培養に使用するトリプチケースソイ

ブロス（BBL）、SeaKem Gold Agarose（タカラ）、Pefabloc SC、制限酵素、制限酵素インキュベーションバッファーH（以上 Roche）は同一ロットを一括購入し協力研究者に配布した。

### 3. PFGE 画像の解析

EHEC、*S. Enteritidis* それぞれの PFGE 画像を電子メールで施設 X に集約し、施設 X（A 解析者）および施設 Y（B 解析者）で FingerprintingII バージョン 3（Bio-Rad）を用いて解析した。バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 3～20%、ショルダー感度 0 で行い、20.5kb～1135kb 間のバンドについて類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0.14%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

## C. 研究結果

### 1. マーカーの比較

従来法との比較のため、サイズマーカーとしてラムダラダーと標準株を同時に使用したが、施設によってはラムダラダーの画像が非常に薄い、見えないバンドがあるなど、マーカーとして使用できる画像ではなかった。ラムダラダーが一番下の 48.5kb から 14～15 本目まで明瞭に認識できる画像においても、バンドが太くピーク認識が困難であった。一方標準株の *Xba*I 切断は、小さいサイズのバンドが薄く手入力での補正が必要となった画像も見られたが、一番上の 1135kb（Band1）から 20.5kb（Band18）まで概ね良好に認

識できた。また、標準株と被検株と使用菌液濃度が同じであり、ラムダラダーに比べて輝度の均一な画像を得ることができた。これらのことから、以後の解析は標準株の *Xba*I 切断画像をマーカーとして使用した。

## 2. EHEC 0157 のデンドログラム

11 施設における画像についてデフォルトである最小ピーク高さ 5% でバンド検索したところ、目視判定と大きく異なる画像があったため、各画像について目視と一致する最小ピーク高さを設定した (表 2)。

菌株 No. 1-5 のデンドログラム (図 1、図 2) を作成したところ、A 解析者、B 解析者ともに各菌株で近似度は 90% 以上となった。A 解析者では、菌株 No. 1 で 6 画像、No. 4、No. 5 で 5 画像が 100% 一致と判定され、B 解析者では、全株でそれぞれ 5-9 画像が 100% 一致と判定された。

## 3. *S. Enteritidis* のデンドログラム

EHEC 0157 と同様に、最小ピーク高さを設定し (表 2)、菌株 No. 6-10 のデンドログラムを作成した (図 3、図 4)。A 解析者では、菌株 No. 7、No. 8、No. 10 の 3 株で 90% 以上の近似度を示し、特に No. 7 では 9 画像が 100% 一致と判定された。菌株 No. 6 は画像にキズの入った 1 つを除く 10 画像で近似度 90% 以上を示し、No. 9 は 84% であった。B 解析者では、菌株 No. 7 で 11 画像が 100% 一致、No. 6 (10 画像)、No. 10 で 90% 以上の近似度を示し、No. 9 は 85% であった。菌株 No. 8 は、10 画像で 90% 以上の

近似度を示したが、目視では同一型と考えられる 1 画像は菌株 No. 6 のクラスターに含まれ近似度は大きく異なっていた。

## D. 考察

過去 3 年間の研究結果より、ラムダラダーは前処理のわずかな加熱時間の差が結果に影響し、バンドの太さや濃淡の差が問題となっていた。今回標準株の *Xba*I 処理をマーカーとして使用したが、ラムダラダーよりも広い範囲に分散してバンドが見られ、各バンドが被検株と同等の太さでシングルピークとして認識されることから、毎回制限酵素処理を実施する手間がかかるもののマーカーとして適切であると考えられた。

EHEC 0157 のデンドログラムは両解析者ともに全株で高い近似度を示し、100% 一致した画像も見られるなど良好な結果であった。プロトコールが異なるため単純には比較できないが、EHEC 0157 である菌株 No. 3、No. 4、No. 5 は昨年度も施設間変動をみており、近似度は各々 87%、84%、90% であったことから、新プロトコールによりサイズの小さいバンドが明瞭になり、近似度が上昇したものと推察された。

*S. Enteritidis* については、菌株 No. 7 のように 9 画像あるいは全画像が 100% 一致したのも見られたが、No. 9 では両解析者とも近似度 80% 台であった。これは、No. 7 はバンド数が 10 本と少ないうえ 50kb 以下のバンドが見られなかったのに対し、No. 9 は 100-170kb にバンドが多く

画像により4〜7本とバンド認識に差があり、50kb以下にも数本のバンドが見られたことが影響していると考えられた。B解析者の菌株No. 8で1画像が別の株のクラスターに含まれたことについて原因は不明であるが、以前から目視では同一型と判断されるのにデンドログラムでは近似度が低くなる例が知られており、このような株では目視による補正が必要であると考えられる。

デンドログラム作成に当たって、各施設で画像のコントラストが異なることから最小ピーク高さを画像ごとに変更した。今回解析者による結果の相違も調べたが、最小ピーク高さには同じ値を使用したため、菌株No. 8を除いて同等の結果が得られた。バンド認識に解析者の主観を入れないためには、どの画像もデフォルト値で解析できることが望ましく、そのためには各施設の画像のコントラストの統一が必要である。また、菌種にかかわらず、近似度90%以上を示した株でも100%一致した画像とそれ以外を比較すると小さいサイズのバンド認識の有無にばらつきが見られ、これも各画像のコントラストの差に起因すると考えられた。今後各施設で均質な画像を得るため、技術の向上はもちろんのこと、トランスイルミネーターの紫外線波長や強度の統一、写真撮影あるいは画像取り込み条件の改善を計る必要がある。

本研究で用いたプロトコールは従来法に比べ鮮明な電気泳動像が得られるが、それ以外にリゾチーム処理が省略され、所要時間が短くなったことも利点である。一方、ディスプレイザブルプラグモールドに替えて使用したサンプルプラグキャスターは高価で多検体処理に難点があり、消毒洗浄を繰り返すことにより電気泳動像に悪影響が出る可能性について今後考慮しなければならない。

#### E. 結論

感染研新プロトコールの試用により、EHEC 0157、*S. Enteritidis*ともにサイズの小さいバンドが明瞭になり、各施設におけるバンド認識の差異がある程度解消された。また、従来法に比べ簡便で所要時間が短いことから、行政ニーズにも役立つものと考えられる。今後は、各施設の画像のコントラストを均質化することが課題である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

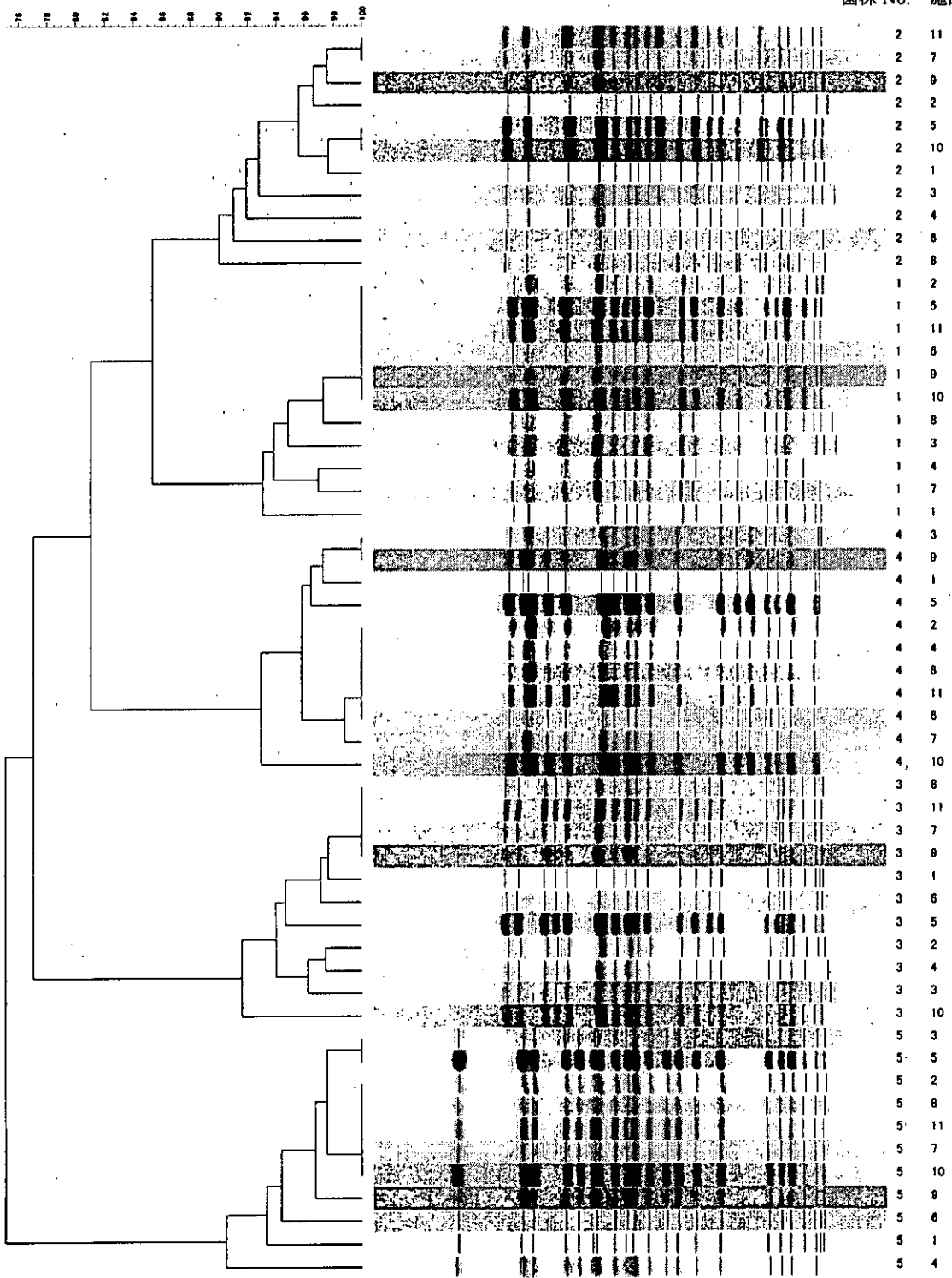


図1 A解析者作成 EHEC O157 のデンドログラム

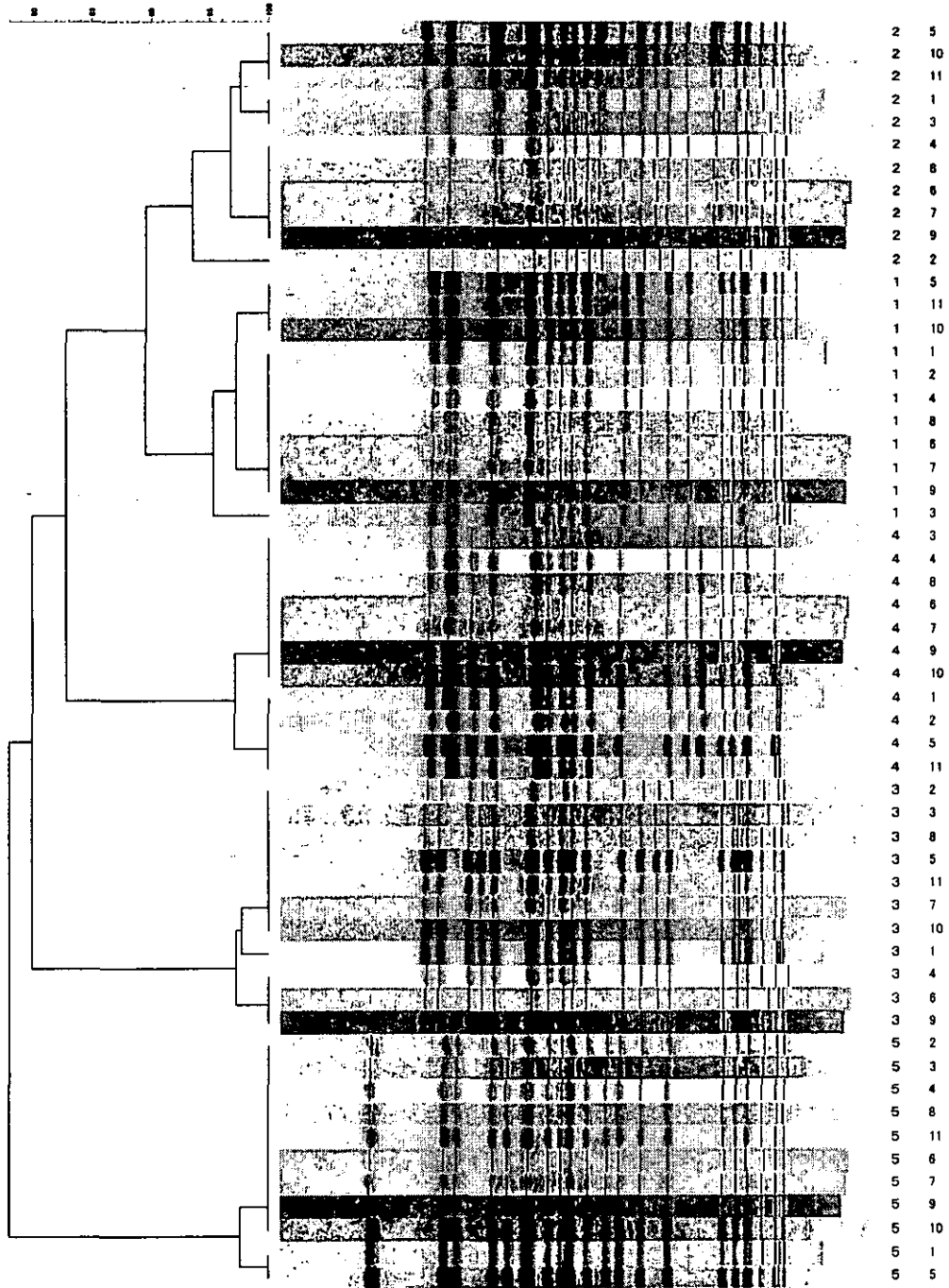


図2 B解析者作成 EHEC O157 のデンドログラム

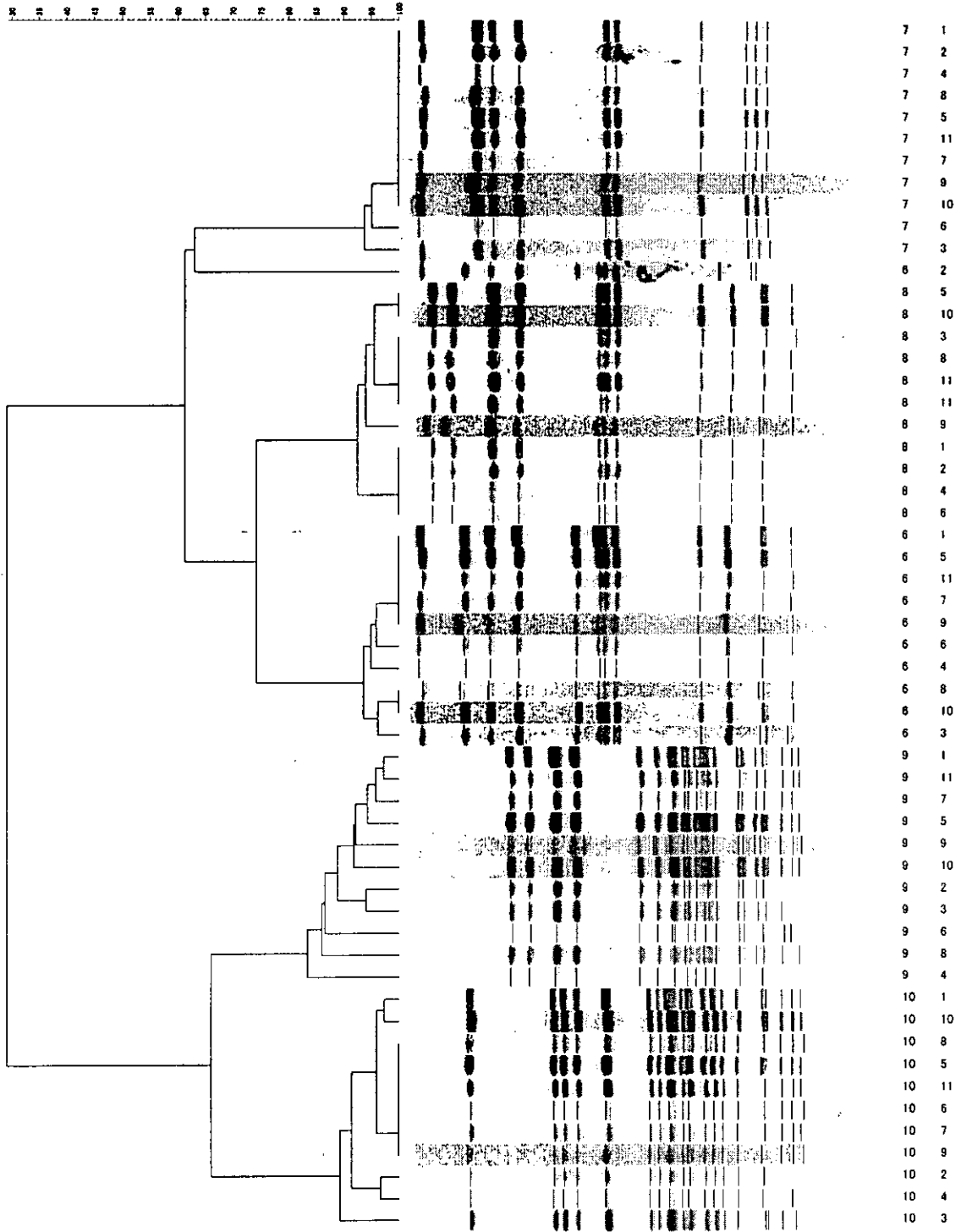


図3 A 解析者作成 *S. Enteritidis* のデンドログラム





表1 プロトコールの比較

	PFGE New Protocol - Kinki (EHEC, <i>Salmonella</i> Enteritidis)	感染症研 New Protocol (EHEC, <i>Shigella</i> )	CDC Protocol (EHEC, <i>Shigella</i> , non-typhoidal <i>Salmonella</i> )
Cell suspension buffer	DW TSB 一夜培養液	DW OD610nm=0.5-0.6	100mM Tris:100mM EDTA, pH8.0 OD610nm=1.3 - 1.4
Plug agarose	1% SeaKem Gold agarose in DW Cell suspension 200 $\mu$ l + 1% agarose 200 $\mu$ l	1% SeaKem Gold agarose in DW Cell suspension 200 $\mu$ l + 1% agarose 200 $\mu$ l	1% SeaKem Gold:1%SDS agarose in TE buffer (10mM Tris:1mM EDTA, pH8.0) Cell suspension 400 $\mu$ l + Proteinase K(20mg/ml) 20 $\mu$ l + 1% agarose 400 $\mu$ l
Lysis buffer	1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl- sarcosine in 0.5M EDTA 1ml 50°C, over night	1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl- sarcosine in 0.5M EDTA 1ml 50°C, 2h - over night	Cell Lysis Buffer (50mM Tris:50mM EDTA, pH8.0+1%Sarcosyl) 5ml + Proteinase K(20mg/ml) 25 $\mu$ l 54°C, 1.5 - 2h with vigorous agitation
Washes	4mM Pafabloc SC in TE 500 $\mu$ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min 1xH buffer 200 $\mu$ l on ice, 20min	4mM Pafabloc SC in TE 500 $\mu$ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min Enzyme buffer 200 $\mu$ l on ice, 20min	Sterile water 10 - 15ml 50°C, 10 - 15min, twice TE 10 - 15ml 50°C, 10 - 15min, 4 times 1xH buffer 200 $\mu$ l 37°C, 5 - 10min/RT, 10 - 15min
Restriction digestion	30unit/sample enzyme buffer 100 $\mu$ l 37°C, 2h	20~30unit/sample enzyme buffer 100 $\mu$ l 37°C, 2h - over night	Restriction enzyme mixture 200 $\mu$ l (50U/sample) 37°C, 1.5 - 2h
Electrophoresis conditions	•STEC 2.2 - 54.2s, 19h 200V, 0.5xTBE, 14°C •non-typhoidal <i>Salmonella</i> 2.2 - 63.8s, 19h 200V, 0.5xTBE, 14°C	•STEC, <i>Shigella</i> 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 19h 14°C, 0.5xTBE	•STEC, <i>Shigella</i> 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 21h 14°C, 0.5xTBE •non-typhoidal <i>Salmonella</i> 6V/cm, 2.2 - 63.8s, 21h 14°C, 0.5xTBE
Marker	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812 (digested by <i>Xba</i> I)	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812 (digested by <i>Xba</i> I)	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812 (digested by <i>Xba</i> I)

表 2 各画像の最小ピーク高さの設定値

施設番号	EHEC O157	S . Enteritidis
1	7%	10%
2	5%	5%
3	20%	10%
4	5%	3%
5	10%	10%
6	8%	15%
7	5%	5%
8	10%	12%
9	8%	10%
10	20%	20%
11	5%	5%

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
平成 15 年度分担研究報告書

市販のスモークサーモンから分離された *Listeria monocytogenes* の  
パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析

協力研究者 中村寛海 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課  
小笠原準 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課  
長谷 篤 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課

研究要旨

1999 年から 2000 年の間に、大阪市内で販売されている ready-to-eat（加熱調理せずにそのまま食べる）水産加工品 95 検体について *Listeria monocytogenes* (LM) の汚染実態調査を行った結果、12 検体（13%）から LM が検出された。これらは全てスモークサーモン等の冷燻製品であった。分離された 13 株（血清型 1/2a が 8 株、4b が 2 株、3a が 1 株と型別不能が 2 株）の LM について、PCR 法による病原遺伝子の検出とパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による解析を行った。その結果、これら 13 株の LM は全て 5 つの病原遺伝子（*prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl* および *plcB*）を保有しており、ヒトへの感染源となる可能性が示された。製品から LM が検出された 4 製造元において、同一製造元からは同一の血清型と PFGE パターンを示す菌株が分離される傾向が認められた。

A. 研究目的

食品を介してヒトに感染症を引き起こす *Listeria monocytogenes* (LM) は環境中に広く存在するため、様々な食品が本菌により汚染されている可能性がある。リステリア症は、これまで主にナチュラルチーズ等の乳製品や食肉製品を原因とする事例の報告が多かったが、近年、水産加工品における本菌の汚染が問題となっている。中でも ready-to-eat（加熱調理せずにそのまま食べる）水産加工品を原因とするリステリア症が北欧などで実際に発生している。

Ready-to-eat 水産加工品はわが国においても市販されているが、このような食品についての LM の汚染状況はあまり調べられていない。そこで、我々は 1999 年から 2000 年の間に大阪市内で販売されている 95 検体の ready-to-eat 水産加工品について LM の汚染実態調査を行った。その結果、12 検体（13%）から LM が分離された。これらは全てスモークサーモン等の冷燻製品であった。

本研究では、分離されたこれらの LM の病原因子の保有と製品の LM 汚染源の究明を目的として、PCR 法による病原遺伝子の検出と

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株

1999年から2000年の間に大阪市内で販売されている ready-to-eat 水産加工品の汚染実態調査において分離された 13 株の LM を使用した (表 1)。

### 2. 病原遺伝子の検出

分離された LM について、5 つの病原遺伝子 (*prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl* および *plcB*) の保有状況を調べた。これらの病原遺伝子は、LM が宿主細胞へ侵入した後、マクロファージによる殺菌機構から逃れるために必要な一連の病原因子をコードするもので、宿主細胞内での病原性の発揮に必須である。これらの病原遺伝子の検出は PCR 法により行った。すなわち、菌体からの DNA 抽出には市販のキット (ISOPLANT; ニッポンジーン) を使用し、Nishibori ら (Microbiol. Immunol., 1995) の報告したプライマーを用いた PCR 法を行った。PCR 増幅産物は、3% NuSieve 3:1 Agarose (Cambrex) で泳動後、0.5  $\mu\text{g/ml}$  のエチジウムブロマイド溶液で染色し、各サイズのバンドの有無を確認した。

### 3. PFGE 法

BHI 寒天平板培地 (ニッスイ) に発育させた LM を 100  $\mu\text{l}$  の滅菌水に懸濁し、300  $\mu\text{l}$  の 1% Low Melting Preparative Agarose (Bio-Rad) と混和してプラグを作製した。プラグを 1.5 mg/ml Lysozyme (Sigma)、2

mg/ml デオキシコール酸 (Sigma) および 1 mg/ml N-lauroylsarcosine (Sigma) を含む 0.1 M EDTA, pH 8.0 により 37°C で 16-18 時間処理した後、2 mg/ml proteinase K (Roche)、5 mg/ml N-lauroylsarcosine を含む 0.5 M EDTA, pH 8.0 により 50°C で 48 時間処理した。4 mM Pefabloc SC (Roche) で proteinase K を不活化し、TE バッファーで洗浄後、10 U の *AscI* (NEB) および 50 U の *ApaI* (TaKaRa) により 37°C で 18-20 時間、添付の方法に従い処理を行った。電気泳動には CHEF DRIII (Bio-Rad) を使用し、1% Pulsed-field certified agarose (Bio-Rad)、0.5X TBE バッファーにより、電圧 6 V/cm、パルスタイム 0.5-40 秒、バッファー温度 14°C で 22 時間泳動を行った。泳動後 0.5  $\mu\text{g/ml}$  のエチジウムブロマイド溶液で染色し、バンドを可視化した。

## C. 研究結果

表 1 にスモークサーモン等の冷燻製品から分離された LM の血清型、病原遺伝子保有状況および PFGE パターンを示した。LM が分離された 12 検体のうち A 社の 1 検体 (スモークサーモンマリネ用) から 2 種類の血清型 (1/2a および 3a) の LM が分離された。血清型は 1/2a が 8 株で最も多く、次いで 4b が 2 株、3a が 1 株で型別不能 (UT) が 2 株あった。PCR 法の結果、13 株は全て 5 つの病原遺伝子を保有していた。PFGE 法の結果、13 株の LM は任意に A-E の 5 グループに分類された。C と C1 は、バンド 1 本の差異しか認められなかったため、同一グループに

分類した (図 1)。同一製造元からは同一の血清型と PFGE パターンを示す菌株が分離される傾向が認められた。また、A 社および D 社の製品から分離された血清型 1/2a の LM の PFGE パターンは互いに異なっていた。

#### D. 考察

大阪市内で販売されているスモークサーモン等の冷燻製品から分離された LM の血清型には、ヒトの臨床例に多い 4b, 1/2a が含まれていた。特に、13 株のうち 8 株が血清型 1/2a であり、最も多かった。これらの菌株は全て宿主細胞内で病原性を発揮するために必須の遺伝子を保有していたことから、ヒトへの感染源となる可能性があると考えられた。

13 株の LM について PFGE 法による解析を行った結果、同一製造元からは同一の血清型と PFGE パターンを示す菌株が分離される傾向が認められた。特に、他の製造元に比べて製品の汚染率が顕著に高かった A 社においては、サンプルやサンプルの採取時期が異なる場合でも同一の血清型と PFGE パターンを示す菌株が分離された。また、A 社および D 社の製品から分離された血清型 1/2a の LM の PFGE パターンは互いに異なっていた。このことから、A 社においては、製造元に特有のクローンが存在し、継続的に製品を汚染している可能性が示唆された。

#### E. 結論

大阪市内で販売されているスモークサーモン 12 検体から分離された 13 株の LM につ

いて PCR 法による病原遺伝子の検出と PFGE 法による解析を行った。その結果、13 株の LM はすべて 5 つの病原遺伝子を保有しており、ヒトへの感染源となる可能性が示された。製品から LM が検出された 4 製造元において、同一の製造元からは同一の血清型と PFGE パターンを示す菌株が分離される傾向が認められた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

H. Nakamura, M. Hatanaka, K. Ochi, M. Nagao, J. Ogasawara, A. Hase, T. Kitase, K. Haruki, Y. Nishikawa:

*Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan, and their molecular typing. International Journal of Food Microbiology. (in press) (2004)

##### 2. 学会発表

中村寛海、畑中美穂、越智桂子、長谷 篤、小笠原準、北瀬照代、春木孝祐、西川禎一：市販の水産加工品から分離された *Listeria monocytogenes* について。第 22 回日本食品微生物学会 (平成 13 年 10 月、大阪)

畑中美穂、長尾美登理、植中詠子、中村寛海、北瀬照代、小笠原準、長谷 篤、春木孝祐、西川禎一：

スモークサーモンを中心とした水産加工

品の *Listeria monocytogenes* 汚染実態調査と検出方法の検討. 第 22 回日本食品微生物学会 (平成 13 年 10 月、大阪)

畑中美穂、越智桂子、長尾美登理、中村寛海、小笠原準、長谷 篤、北瀬照代、春木孝祐、西川禎一：

水産加工品の *Listeria monocytogenes* 汚染実態調査と分離菌株の分子疫学的検討. 第 75 回日本細菌学会 (平成 14 年 4 月、横浜)

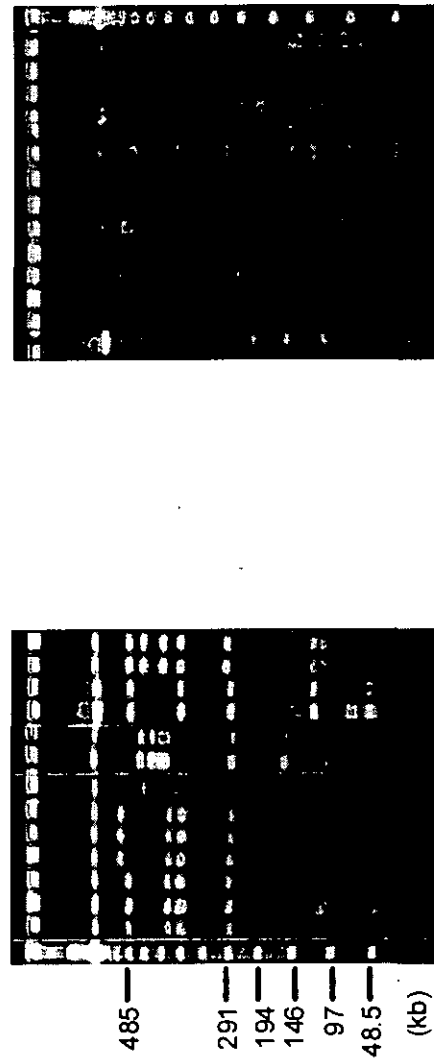
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 スモークサーモン等の冷燻製品から分離された *Listeria monocytogenes* の血清型、病原遺伝子保有状況および PFGE パターン

Strain No.	製造元	検体名	採取日	血清型	病原遺伝子保有状況				PFGEパターン		
					<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>hlyA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcB</i>	<i>AscI</i>	<i>ApaI</i>
1	A社	スモークサーモンマリネ用	1999.9	1/2a	+	+	+	+	+	C	C
2		スモークサーモン	1999.10	1/2a	+	+	+	+	+	C	C
3		スモークサーモントラウト	2000.6	1/2a	+	+	+	+	+	C	C
4		スモークサーモンマリネ用	2000.6	1/2a	+	+	+	+	+	C1	C1
5		スモークサーモントラウト	2000.9	1/2a	+	+	+	+	+	C1	C1
6		スモークサーモンマリネ用	2000.9	3a	+	+	+	+	+	C1	C1
7		スモークサーモンマリネ用	2000.9	1/2a	+	+	+	+	+	D	D
8	B社	スモークサーモンマリネ用	1999.8	UT	+	+	+	+	+	E	E
9		スモークサーモンマリネ用	1999.9	UT	+	+	+	+	+	E	E
10	C社	スモークサーモン	1999.10	4b	+	+	+	+	+	A	A
11		スモークサーモン	2000.1	4b	+	+	+	+	+	A	A
12	D社	スモークサーモン	1999.8	1/2a	+	+	+	+	+	B	B
13		スモークサーモントラウト	1999.9	1/2a	+	+	+	+	+	B	B

図1 *Listeria monocytogenes* の PFGE パターン



Lanes 1~3: PFGEパターンC, lanes 4~6: PFGEパターンC1, lane 7: PFGEパターンD, lanes 8~9: PFGEパターンE, lanes 10~11: PFGEパターンA, lanes 12~13: PFGEパターンB  
 Lane No. は表1のStrain No. を表す。  
 M: Marker (Lambda ladder)



厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）  
平成 15 年度分担研究報告書

卵サラダを原因とした *S. Enteritidis* による集団食中毒事例

協力研究者	西海弘城	兵庫県立健康環境科学研究所	研究員
	辻 英高	兵庫県立健康環境科学研究所	主任研究員
	押部智宏	兵庫県立健康環境科学研究所	研究員
	池野まり子	兵庫県立健康環境科学研究所	研究員

研究要旨

2003 年 7 月に兵庫県下で発生した *S. Enteritidis* による集団食中毒について、その感染源および感染経路の解明を目的として、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析を実施した。その結果、患者由来株がすべて同一のパターンを示したことから同一菌株による集団感染であることがわかった。また、卵サラダから分離された食材由来株も同一の泳動パターンを示したことから、卵サラダが原因食品であると推定された。

A. 研究目的

2003 年 7 月に兵庫県下の保育所で *S. Enteritidis*(SE) による集団食中毒が発生した。健康福祉事務所の喫食調査により、その保育所の給食が原因食品として疑われ、保存食のうち卵サラダから SE が検出された。患者由来株および食品由来株の関連性を調べるためパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

保育園児および教職員の検便から分離された SE 63 株および卵サラダから分離された 1 株、合計 64 株を用いた。

SE を LB broth で一晩培養し、和田らの方法に準じてプラグを作成した。プラグは 50U の *Bln* I、*Xba* I で一晩処理し、電気泳動に供した。電気泳動は CHEF DR II (BIO-RAD)により 0.5×TBE buffer、1%ア

ガロースゲルを用い、泳動条件は、14℃で既存プログラム No.5 で泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で写真撮影し、切断パターンを比較した。

C. 研究結果

1. 集団発生の概要

2003 年 7 月 28 日、7 月 22 日から 23 日にかけて診察した保育園児 4 名からサルモネラが検出されたとの通報が医療機関から健康福祉事務所にあった。調査を実施したところ他の医療機関で受診した同保育園児 4 名からもサルモネラが検出されていることがわかった。患者が同一の保育園児であり、発熱、下痢、腹痛が主症状であること、共通する食事は、同保育園で提供された給食であることから同保育園を原因施設と判断し、3 日間の業務停止とした。保存食お

よび施設ふき取り検査を実施した結果、卵サラダからサルモネラが検出された。

なし

## 2.結果

G.研究発表

患者由来株 63 検体および食品由来株 1 検体について制限酵素 *Bln* I、*Xba* I を用いて PFGE を実施した。*Bln* I での切断パターンを図 1 に、*Xba* I での切断パターンを図 2 に示した。患者由来株の PFGE パターンは *Bln* I、*Xba* I のどちらの制限酵素で切断しても切断パターンはすべて一致した。また食品由来株のパターンは *Bln* I、*Xba* I のどちらの制限酵素で切断しても患者由来株と同一の切断パターンを示した。

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

## D.考察

PFGE による解析の結果、患者由来株はすべて同一のパターンを示したことから、すべて同一起源の株を原因とする食中毒であることが示唆された。また、患者由来株および卵サラダから分離された食品由来株の PFGE パターンが一致したことから、卵サラダが原因食品であると推定され、汚染源として鶏卵が疑われた。

## E.結論

PFGE による疫学解析の結果、患者由来株と食材由来株が同一の泳動パターンを示したことから、汚染源として鶏卵が疑われた。

## 参考文献

和田昭仁ら：腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会テキスト，17-31 (1997)

## F.健康危機情報

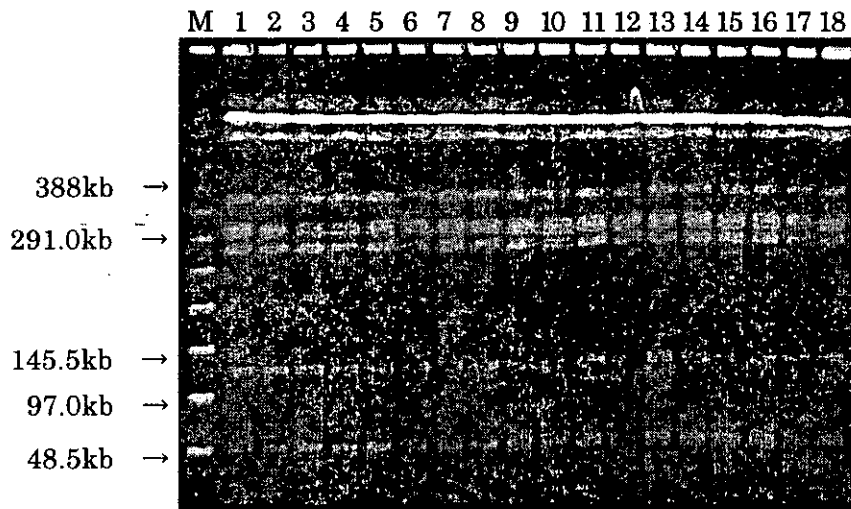


図 1. *S. Enteritidis* 分離株の PFGE パターン(*Bln I*)

1~17 : 患者分離株

18 : 食材分離株

M : マーカー

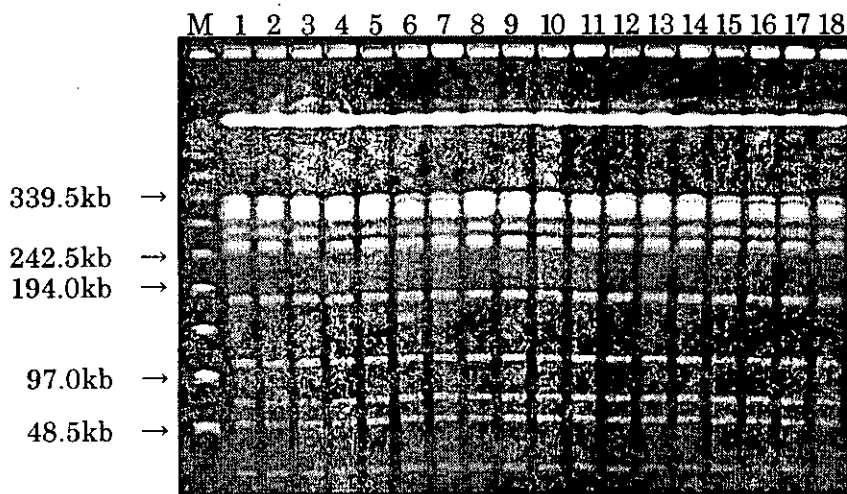


図 2. *S. Enteritidis* 分離株の PFGE パターン(*Xba I*)

1~17 : 患者分離株

18 : 食材分離株

M : マーカー

別紙5 研究成果に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
H. Nakamura, M. Hatanaka, K. Ochi, M. Nagao, J. Ogasawara, A. Hase, T. Kitase, K. Haruki, Y. Nishikawa	<i>Listeria monocytogenes</i> isolates from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan, and their molecular typing.	International Journal of Food Microbiology.		(in press)	2004
Hiromi Nakamura, Jun Ogasawara, Cie Monma, Atsushi Hase, Hiroshi Suzuki, Akemi Kai, Kosuke Haruki and Yoshikazu Nishikawa	Usefulness of a combination of pulsed-field gel electrophoresis and enrichment culture in laboratory investigation of a foodborn outbreak due to <i>Clostridium perfringens</i>	Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	47	471-475	2003
辻 英高、池野まり子、押部智宏、西海弘城ほか	腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例—兵庫県	病原微生物 検出情報	24	326	2003
上野美和、金澤祐子、山下晃司、太田裕元、北口三知世、川上忠明、岩崎恵子、辻澤恵都子、森野吉晴	保育園給食による <i>Salmonella</i> Newport 食中毒事例—和歌山市	病原微生物 検出情報	23	65-66	2002
丸岡捷治、山野親逸、原田 保、伊藤千恵、小石智和、竹上修平	<i>Salmonella</i> Enteritidis 集団食中毒事例—京都市	病原微生物 検出情報	24	214-215	2003