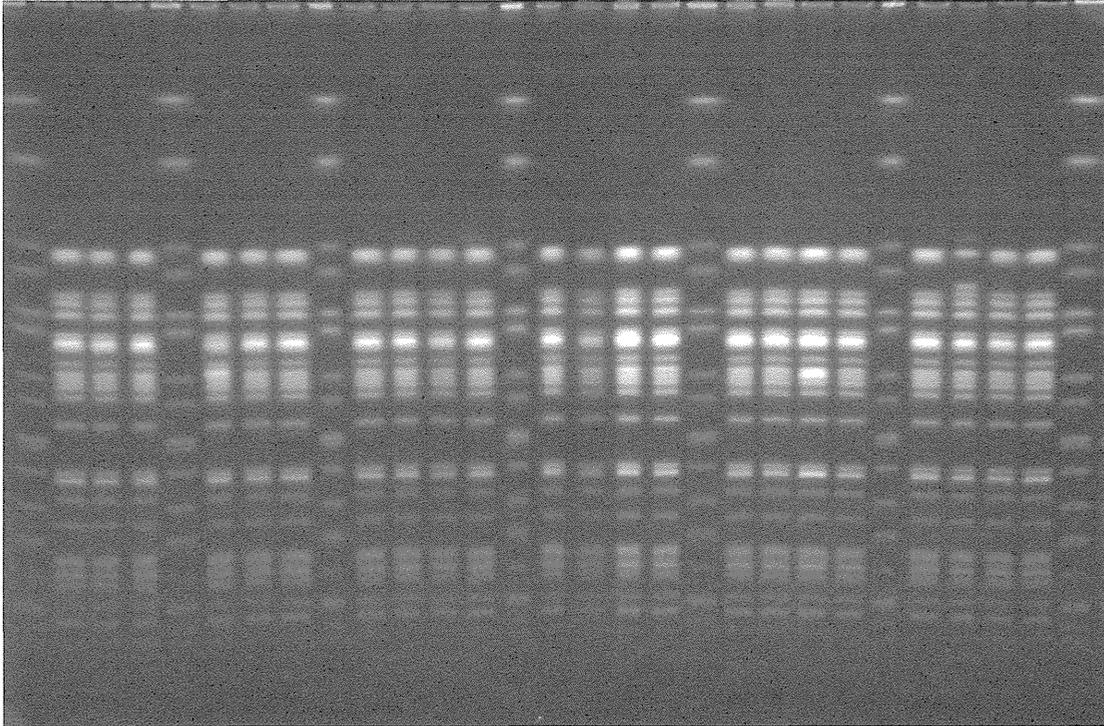


M 1 2 3 M 4 5 6 M 7 8 9 10 M 11 12 13 14 M 15 16 17 18 M 19 20 21 22 M



M	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812	11	初回分離株
1	初回分離株	12	再感染分離株
2	再感染分離株	13	11, 12の家族
3	1, 2の家族	14	11, 12の家族
4	初回分離株	15	初回分離株
5	再感染分離株	16	再感染分離株
6	4, 5の家族	17	15, 16の家族
7	初回分離株	18	15, 16の家族
8	再感染分離株	19	初回分離株
9	7, 8の家族	20	再感染分離株
10	7, 8の家族	21	19, 20の家族
		22	19, 20の家族

図 再感染者とその家族から分離された株の PFGE パターン

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 25 年度分担研究報告書

Staphylococcus aureus による食中毒事例

研究協力者 横山北斗、黒田久美子 姫路市環境衛生研究所
井上香織、瀧泰明 姫路市環境衛生研究所
辻安由美 姫路市保健所衛生課

研究要旨

2012 年 9 月に姫路市にて *S. aureus* の産生したエンテロトキシンによる食中毒が発生した。有症者の便、嘔吐物、食品残品、調理従事者の手指から *S. aureus* が分離され、コアグラージェ型、エンテロトキシン型が一致した。さらにパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った結果、同一の PFGE パターンを示したため、*S. aureus* が本事例の原因であることが強く示唆された。

A. 研究目的

2012 年 9 月に姫路市で発生した食中毒事例において、有症者便 4 検体、嘔吐物 2 検体、食品 4 検体および調理従事者の手指 1 検体から黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）が検出された。喫食状況などの初期の統計学調査により原因食品と疑われた食品が、真に原因菌に汚染されていたか、またその原因菌の由来が調理従事者の手指であるかを確認するため、PFGE による分子疫学解析を行った。

B. 研究方法

事例の概要

2012 年 9 月市内事業所での研修で、夕食として仕出し料理を食べた 157 名中 24 名が嘔吐、吐き気、下痢等の症状を呈し

ているとの通報があり事件を探知した。オードブル（おにぎり、鶏唐揚げなど）と現地での加熱調理品（焼きそば、焼き鳥など）があり、オードブルは前日夜より一人で作り、またおにぎりは昼過ぎに完成後、13 時に現地に配送し、現地では夕食時まで常温にて保管されていたことが調査で分かった。

1. 統計学的調査

共通食である食材 43 品目について、有症者および無症者に聞き取り調査を行い、各品目について相対危険度、オッズ比およびそれぞれの 95%信頼区間を求めた。

2. 食品中の *S. aureus* の菌数の測定

当所に搬入された食品残品 14 検体（オードブル 7 品目 8 検体、現地調理品 5 品目 6 検体）のうち、おにぎり以外の食品（12 検体）については、ペプトン加生理

食塩水で 10 倍希釈し、その希釈液 0.1ml を、またおにぎり (2 検体) については 10 倍階段希釈にて 1000 倍まで希釈し、その希釈液それぞれ 0.1ml を、卵黄加マンニット食塩培地に塗抹し、35℃ 約 48 時間培養後、マンニット分解陽性かつ卵黄反応陽性のコロニーを *S. aureus* として菌数を測定し、定法により同定した。また、デンカ生研製の市販品を用いて、コアグララーゼ型別およびエンテロトキシン型別試験を行った。

3. おにぎりからのエンテロトキシンの型別と定量

デンカ生研製のエンテロトックス F 「生研」を用いた RPLA 法にて、おにぎり (2 検体) 中のエンテロトキシンを型別および推定定量した。

4. 有症者の便、嘔吐物、調理従事者の便・手指および拭き取り検体からの *S. aureus* の分離

便 (5 検体)、嘔吐物 (2 検体)、従事者の便 (3 検体) およびその手指 (1 検体) からの分離には直接法および増菌法を、拭き取り検体 (5 検体) には直接法を用いた。以下食品と同様にコアグララーゼ型別およびエンテロトキシン型別を同定した。

5. PFGE 法

既報¹⁾に概ね、従った。すなわち、トリプトソイブイオン (TSB) 2ml に接種後、36~37℃ 18 時間静置培養した。培養液 500 μ l を 12,000rpm、5 分遠心し、上清除去後、PBS (-) 500 μ l に懸濁した。この操作を 2 回行い、500 μ l の滅菌蒸留水に再懸濁した。その 100 μ l に、25mg/ml Lysozyme、2mg/ml Lysostaphin をそれぞ

れ 4 μ l ずつ添加後、約 50℃ に保温した 100 μ l の 1%SeaKem Gold Agarose と混和し、プラグを作成した (アガロース最終濃度 0.5%)。25mg/ml Lysozyme、2mg/ml Lysostaphin をそれぞれ 40 μ l ずつ添加した 0.5M EDTA (pH 8.0) 1ml にプラグを浸漬し、37℃ で 1 時間処理した。処理後、溶液を除去し、TE 緩衝液で 2 回洗浄した。1mg/ml Protinase K (0.5M EDTA (pH8.0)、1%N-Lauroyl sarcosine) 1ml に換え、50℃、2 時間から一夜振盪培養した。プラグを適当な大きさに切り出し 4mM の Pefabloc SC を含む TE 緩衝液 500 μ l に浸漬し 50℃ 20 分以上振盪処理した。同様の操作をもう 1 回行った。その後 1ml の TE 緩衝液に浸漬し、氷上にて 20 分以上振盪処理した。新しい TE 緩衝液に換え、同様の操作を行った。TE 緩衝液を制限酵素用バッファー 200 μ l に換え、氷上で 20 分以上振盪処理した。制限酵素 *Sma* I 30U を加えた制限酵素用バッファー 100 μ l に換え、25℃ 4 時間振盪処理した。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 を制限酵素 *Xba* I (30U) で 37℃ 2 時間振盪処理した。制限酵素処理後、0.5 \times TBE 緩衝液 400 μ l を加え氷上で冷まし、プラグをコームに貼り付け、1%SeaKem Gold Agarose 100ml で固化した。0.5 \times TBE 緩衝液を用い、泳動条件は 6V/cm、5.3~34.9 秒、泳動時間 19 時間、14℃ にて泳動した。泳動後、0.5 μ g/ml エチジウムブロマイドにより 30 分間染色し、イオン交換水で 30 分 3 回洗浄した。

C. 研究結果

1. 統計学的調査

43 品目中 1 品目（おにぎり）のみ、相対危険度の 95%信頼区間の下限が 1 以上であり、オッズ比の 95%信頼区間の下限についても、おにぎりのみが 1 以上であった（表 1）。

2. 食品中の *S. aureus* の菌数およびエンテロトキシンの型別、定量値

食品残品 14 検体中 4 検体で *S. aureus* が分離され、その菌数は、おにぎり 2 検体は 3.0×10^6 CFU/g 以上、焼き鯖は 3.0×10^4 CFU/g 以上、すじ肉の煮込みは 2.2×10^4 CFU/g であった。すべての分離株でコアグラマーゼ型は IV 型、エンテロトキシン型は A 型であった。残り 10 検体については *S. aureus* 陰性であった。

また、おにぎり（2 検体）中のエンテロトキシン型はともに A 型で、RPLA 法での検出感度が 0.1ng/ml であることより、エンテロトキシン量は両検体ともに、8ng/g と推定した。

3. 有症者の便、嘔吐物、調理従事者の便・手指および拭き取り検体からの *S. aureus* の分離

有症者便 5 検体のうち 4 検体、嘔吐物 2 検体、調理従事者の手指（1 検体）から *S. aureus* が分離され、全株ともコアグラマーゼ型は IV 型、エンテロトキシン型は A 型であった。従事者便と拭き取り検体からは *S. aureus* が分離されなかった。

4. PFGE 解析

図 1 のように 1 株を除いて（No.11）、バンドパターンが一致していた。レーン番号については表 2 に記載した。

D. 考察

本事例は、統計学的におにぎりの関与

が強く疑われる事例であった。また、現地で加熱調理された焼き鳥等以外は、前日の夜から調理しており、さらにおにぎりは調理終了から 6 時間程度、常温に保存されていたことが調査で明らかになった。

有症者、調理従事者の手指および食品残品から分離された *S. aureus* のコアグラマーゼ型、エンテロトキシン型および PFGE パターンが一致していたことから、調理従事者の手指から食材に汚染が広がったと考えられる。

また、統計学的には有意ではなかった焼き鯖、すじ肉煮込みから *S. aureus* が分離されたが、これらの食材には、提供時あるいは保存・廃棄時におにぎりに接触したことにより菌が伝播したと考えられる。

人に対する黄色ブドウ球菌エンテロトキシン発症量が数 100ng~数 μ g/人と言われており²⁾、今回のおにぎり中のエンテロトキシンは 8ng/g と大量であった。市販のおにぎりの重量が、120~130g であること考慮すると、おにぎりを一口程度食べれば発症する可能性があった。しかし一方で、喫食者のうちの有症者数が少ない（20 人/86 人）が、これは喫食時以降、食品衛生担当課が採材するまでの間、食品が常温にさらされていたために、*S. aureus* が増殖し、さらにエンテロトキシンを産生したためと考えられる。

E. 結論

本事例では、統計学的に原因食品がおにぎりであることが強く疑われるなか、分離された *S. aureus* の PFGE パターンが

一致し、統計学的調査を裏付けることができた。

より迅速に PFGE の結果を出すことで、行政処分の裏付けとなるよう努力してゆきたい。

F.研究発表

なし

G.参考文献

1) 右田雄二他 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成 20 年度総括・分任研究報告書 185-187

2) 品川邦汎 2 黄色ブドウ球菌. 食中毒予防必携 第 2 版. P.63-71

表 1 おにぎりの喫食状況調査

	喫食あり	喫食なし
有症者	20	3
無症者	66	45

相対危険度 : 3.79 [1.16, 11.88]

オッズ比 : 4.55 [1.27, 16.21]

表 2

No.		検体	菌数 (CFU/g)	コアグラ ーゼ型	エンテロトキシ ン型 (定量値)
1	有 症 者	便 1 (9/21 搬入)	—	IV	A
2		便 2 (同上)	—	IV	A
3		便 3 (同上)	—	IV	A
4		便 4 (9/22 搬入)	—	IV	A
5		嘔吐物 1	—	IV	A
6		嘔吐物 2	—	IV	A
7		調理従事者手指	—	IV	A
8	食 品 残 品	おにぎり ①	3.0×10^6 以上	IV	A (8ng/g)
9		②	3.0×10^6 以上	IV	A (8ng/g)
10		焼き鯖	3.0×10^4 以上	IV	A
11		すじ肉煮込み	2.2×10^4	IV	A

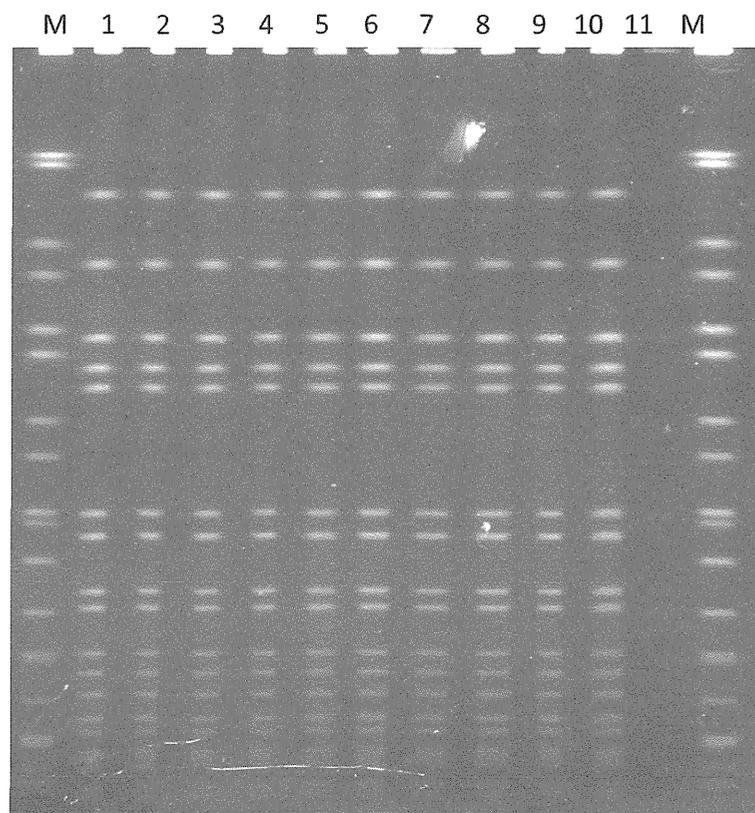


図1 M : サイズマーカー (*Salmonella* Braenderup H9812、制限酵素 *Xba*I 処理)

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成 25 年度 分担研究報告書

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	檜本 孝史	島根県保健環境科学研究所
	黒崎 守人	〃
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	河合 央博	〃
	山田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	今井 佳積	〃
	東久保 靖	〃
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	児玉 実	〃
	築地 裕美	〃
	佐多 俊子	〃
	石村 勝之	〃
	野村 恭晴	山口県環境保健センター
	矢端 順子	〃
	亀山 光博	〃
	富永 潔	〃
	石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
	下野 生世	〃
	嶋田 啓司	〃
	福田 千恵美	香川県環境保健研究センター
	岩下 陽子	〃
	有塚 真弓	〃
	内田 順子	〃
	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	木村 千鶴子	〃
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	金山 知代	〃

研究要旨

中四国ブロックの分子疫学解析手法の維持・向上と、より精度の高いデータベースの構築を目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 菌株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)及び IS-printing System による精度管理を実施した。その結果、PFGE 法による解析では、目視による泳動パターンはどの施設の結果もほぼ一致していたが、デンドログラム解析におけるバンド位置の認識の差により、解析結果が多少異なっていた。IS-printing system による解析では、2nd set primer による 4 本目の増幅産物の扱いで、解析結果が 2 グループに分かれたが、それ以外の結果は一致しており、両解析方法とも概ね良好な結果を示した。中四国地域の EHEC O157 による感染事例について、IS-printing system による解析データを収集し解析した結果、9 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。広域発生事例の疫学解析に重要な分子疫学情報等のデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になってくるものと思われる。

A. 研究目的

本研究班は、感染症や食中毒事例の広域あるいは同時多発的な発生において、それらの事例由来株の疫学解析を迅速に行うことを可能にするため、遺伝子による分子疫学的な解析結果を統合・集積し、必要時にアクセスできるデータベースの構築を目指している。一方で、データベース構築にはデータの高い精度が要求され、データの精度を向上し維持するために、遺伝子解析法の精度管理が重要である。過去の研究班で検討した結果から、遺伝子解析法としてパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法と言う)や、IS-printing System による腸管出血性大腸菌(以下、EHEC とする) O157 菌株の遺伝子解析法が、有用な分子疫学解析ツールであることが確認されている。データベースの構築と事例対応への実用化に向けた試行の成果について、報告する。

B. 研究方法

1. 使用菌株

精度管理：岡山県で平成 25 年度にヒトから分離された EHEC O157 : H7 VT1,2 菌株 5 株(No.1758、1760、1766、1779、1781)を使用した。

事例解析：岡山県で平成 25 年度に分離された EHEC O157 株 39 株と、中四国地域で発生した事例の解析結果を収集し、解析した。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) PFGE 法及び型別

PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、画像解析ソフト(BioNumerics)を使用して泳動像の解析を行った。

PFGE 型別は、菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(2) IS-printing System

IS-printing System (Version2 :

TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従

って実施した。なお、岡山県環境保健センターでは、PCR 反応に供する DNA 量を最適化するため、菌のアルカリ熱抽出液の遠心上清を 5 倍希釈して用いた。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット (Api) の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を各区分毎に足してコード化し、コードによる解析を行った。

(3) 精度管理

本年度精度管理に参加した施設は、PFGE法は 8 施設(C~J)、IS-printing Systemは 9 施設(B~J)であった。精度管理用に送付した菌株 5 株について、各施設で PFGE法及び IS-printing Systemにより解析した。PFGE法は、解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを、IS-printing Systemは、1st及び 2nd set primerごとに増幅産物のバンドをコード化した表を、いずれも泳動像と共に岡山県環境保健センターにメールで送付してもらって、比較検討した。

3. 疫学情報の収集と解析

データベース構築に向けた試行として、中四国地域で発生した患者由来 EHEC O157 菌株の IS-printing system 結果を、疫学情報とともに収集し、解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) PFGE 法による解析

中四国ブロックの 10 施設中 8 施設が参

加して、PFGE 法の精度管理を実施した。その泳動像とデンドログラムを、図 1 に示した。また、それらの結果をまとめて、表 1 に示した。本年度はどの施設も PFGE の泳動像は良好で、目視によりほぼ同一の泳動パターンを示した。デンドログラム解析の結果を大まかに数値化すると、遺伝子パターンの類似度は、最大値 92.7%~最小値 68.0%で、最大値と最小値の平均値はそれぞれ 89.2%と 80.0%であった。多くの施設では同じような類似度を示したが、一部の施設で類似度がやや低い傾向が見られた。なお、国立感染症研究所で実施した PFGE 型別結果は、No1758 (i399)、No1760 (i446)、No1766 (i440)、No1779 (i442)、No 1781 (i441)となり、それぞれ異なっていた。

(2) IS-printing System による解析結果

IS-printing System の精度管理は、中四国ブロックの 9 施設が参加して実施した。各施設の泳動像及び IS コードによる解析結果は、図 2 及び表 2 に示した。PFGE 法の結果と同様に、本年度はすべての施設が見やすい泳動像を示し、コード化された結果もほぼ一致して良好であった。ただ、泳動像の中で、2nd set primer により増幅される高分子量側から 4 本目のバンドについて、6 施設の泳動像は増幅産物のバンドが見られないか増幅の弱いごく薄いバンドが観察された。他の 2 施設は比較的是っきりした増幅産物のバンドが確認でき、これにより結果が異なっていた。バンドが確認された 2 施設の泳動像では、当該バンドが 2nd set primer で増幅された他のバンドに比べてやや薄く、泳動位置もやや高分子量側にあるように見えた。

2. 中四国地域の発生状況と解析結果

中四国地域で平成 25 年度に発生した EHEC O157 による感染事例について、各県の施設で実施した患者由来株の IS-printing System による解析結果と、PFGE 型を含む疫学情報を収集して、表 3 にまとめた。

収集・解析した EHEC O157 株は、山口県 42 株、岡山県 39 株、広島県 20 株、愛媛県 17 株、香川県 9 株、高知県 1 株の計 128 株であった。IS-printing System による解析結果から、これらの株は 44 種類の IS コードに分類された。本年度発生した集団事例から分離された株の IS コード[IS コード(1st)－IS コード(2nd)]は、305057-311457 (愛媛県)、717557-611657 (山口県)、717577-611657 (山口県)であった。同一 IS コードの株が複数の県から分離されたケースは、これら集団事例由来株を含めて 9 種類であった。それらの IS コードは、3 県から分離された IS コードが、317577-211757、717577-611657 の 2 種類、2 県から分離された IS コードが、317477-611756 、 317577-611557 、 317577-611756 、 341057-310652 、 615457-311656 、 717555-611657 、 717557-611657 の 7 種類であった。これらの多くの株では、PFGE 型が異なっていたが、岡山県と広島県で分離された IS コード 341057-310652 (PFGE 型 g501) と 717555-611657 (PFGE 型 i399)は、IS コード及び PFGE 型が同じ株であった。

D 考 察

本年度実施した PFGE 法及び IS-printing System による精度管理の結果は、両法とも良好な結果が得られたが、それぞれの方法で、多少の問題点が見いださ

れた。PFGE 法では、泳動パターンは各施設とも目視においてほぼ同様の結果が示されていたことから、各地域内での発生事例について、各々の検査者が解析・判定する場合は、何ら問題は無いと思われた。ただ、デンドログラム解析の類似度には各施設の結果に差が見られた。このことから、泳動像の各バンド位置の認識が施設間あるいは検査者間で微妙に異なることが原因と思われた。したがって、データベース化された泳動像と検査結果の泳動像と比較では、目視による比較が重要であり、類似度の数字は参考と解釈すべきものと思われた。IS-printing System による解析結果は、泳動写真及び IS コードとも良好な結果が示された。しかし、2施設において非特異的と思われる増幅の弱いバンドが確認され、その扱い方により他施設と異なった結果が示された。この点については、キットに付属の取扱説明書の中でエキストラバンドの扱いについて触れられているが、特に 2nd set primer で増幅される高分子量の増幅産物は、バンド間の泳動距離が短く、判定が難しい場合が出てくる。このため、泳動距離の長いゲルを使用して、判定を容易にすることも一つの方法である。また、岡山県では、過剰な増幅によるエキストラバンドの産生を無くし、より鮮明な泳動像を得るため、検査に使用するテンプレート DNA 溶液は、通常濃度の 5 倍希釈液を使用している。しかし、今回の株のようにバンドの位置や増幅の強弱による判定が微妙な菌株の場合には、泳動距離の長いゲルを使用しても、異なった結果になる可能性があるため、注意が必要である。一方、感染事例対応時の分子疫学解析においては、エキストラバンドは過去の経験から菌株の異同判定において、一つの指標として使用するこ