

パルスフィールド核酸電気泳動法による サルモネラ食中毒の分子疫学調査

¹兵庫県立大学環境人間学部, ²堺市衛生研究所

北元 憲利¹⁾ 加藤 陽二¹⁾ 濱田加奈子¹⁾ 甘庶志帆乃¹⁾
 大中 隆史²⁾ 横田 正春²⁾ 田中 智之²⁾

(平成 16 年 8 月 17 日受付)

(平成 16 年 12 月 3 日受理)

Key words : *Salmonella* Enteritidis, pulse-field gel electrophoresis (PFGE)
 molecular epidemiology, food poisoning

要 旨

1983 年から 1999 年の 17 年間に、大阪府堺市内で発生した 61 件の集団あるいは散发食中毒事例において分離された *Salmonella* Enteritidis (SE 菌) 120 検体の DNA を、制限酵素 *Xba* I あるいは *Not* I で切断したのち、パルスフィールド核酸電気泳動法 (PFGE) を行った。それぞれの DNA 切断パターンを比較し、遺伝型の分類を行うとともに、分子疫学的解析を試みた。その結果、制限酵素 *Xba* I を用いた場合は、X1 (115 株) および X2 (1 株) の 2 種類のタイプに、*Not* I を用いた場合は、N1 (91 株)、N2 (3 株) および N3 (1 株) の 3 種類のタイプに分類することができた。タイプ X1 については、さらに 8 つ (X1a~X1h) のサブタイプに、N1 については 6 つ (N1a~N1f) のサブタイプに細分化することができた。しかし、これらサブタイプの菌株は、いずれもバンドの相違数が 0~4 本で、一致率 (類似度) が少なくとも 0.75 以上であることから、同一か近縁種、あるいはきわめて関連の深い SE 菌であることが分った。特に、各集団食中毒事例からの分離菌株は、ほぼ同一のパターンを示したため、感染源あるいは感染経路を推定することができた。これらの長期間にわたる疫学調査から、堺市内において、同一か近縁種、あるいはきわめて関連の深い SE 菌が、わずかの部分変異を起こしながら常在していることが示唆された。

[感染症誌 79 : 122~128, 2005]

序 文

サルモネラ属菌はグラム陰性の通性嫌気性桿菌で腸内細菌科に属し、現在 2,500 種類以上もの血清型が知られている。サルモネラ属菌は、鶏、豚、牛などの動物の腸管や河川、下水など自然界に広く分布している。わが国では、1989 年頃から食中毒事例が多発するようになり、1992 年には事件数

にして第 1 位の発生を示すようになった。また、サルモネラ食中毒の中でも卵および卵加工品による *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (以下 SE とする) の食中毒患者が増加している。

感染症の疫学は、感染症や病原菌保菌者の存在、感染経路あるいは流行様式などを調査し、病原微生物の同定と株間の違いを明らかにして、疾病の予防に役立てることを目的としている。従来からの微生物の生物学的な表現型にもとづく同定識別

別刷請求先 : (〒670 0092) 姫路市新在家本町 1 丁目

1 12

兵庫県立大学環境人間学部 北元 憲利

方法のほかに、最近では分子生物学的な手法を導入し、より詳細な疫学的解析ができるようになった。分子疫学の解析において、現時点で最も信頼のおける技術はパルスフィールド核酸電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis, 以下 PFGE とする) といわれており¹⁾⁻⁴⁾、近年この PFGE が院内感染や食中毒の原因食材の特定に威力を発揮している^{5,6)}。この方法では細菌のゲノムを制限酵素にて切断することにより、遺伝学的に類似しているかどうかを比較し、決定することが可能である^{1,7)}。通常のアガロースゲル電気泳動では巨大分子サイズの DNA の分離は困難であるとされてきたが、この PFGE ではそのような巨大な DNA の分離も可能である。

1 食中毒事例において食材や患者から分離された複数の菌について相互の関連性を識別、確定させることは疫学調査における重要なステップの一つである。一方で、同一事例の中だけにとどまらず、長期にわたりその地域でどのような菌株あるいはタイプの菌が蔓延しているかを調べることも重要である。1 事例あるいは短期間内の発症事例について、サルモネラの動態をみた報告はあるが⁸⁾⁻¹¹⁾、長期間にわたり追求した調査研究はあまり行われていない。

本研究は、十数年間にわたり、堺市内において、環境や食材、食中毒患者の下痢便など様々なものから分離された SE 菌の DNA について、PFGE の型別を行うことにより、相互間の関連性、遺伝子多様性を解析し、SE 菌の存在様式、感染経路を解明するとともに、感染予防に役立つことを目的とした。

材料と方法

1. 菌体と培養方法

大阪府堺市内で 1983~1999 年の 17 年間に発生した 61 件の集団あるいは散发食中毒事例において分離された SE 菌 120 検体を用いた。衛生研究所において、患者便、食品、ふきとり、タワシなどの食中毒由来、あるいは河川水などの環境物質由来の菌株が分離された。菌の増殖には一般細菌用ハートインヒュージョンブイヨン液体培地 (日水製薬) を使用した。

2. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

PFGE 法は CHEF 法 (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) を基本とした^{2,4,7)}。試薬は GenePath Group 2 および 6 (BIO-RAD 社) を使用した。培養したサンプルを適切な細胞数に調整後、Cell Suspension Buffer を加えて、再懸濁した。Lysozym (25mg/ml) および Embedding Agarose を加え固めたあと、Lysis Buffer および Lysozyme 溶液中で 37℃, 1 時間反応した。Wash Buffer で洗浄後、Proteinase K Buffer および Proteinase K (>600units/ml) を加え、50℃ で 16~20 時間反応した。最終的に *Xba I* Buffer あるいは *Not I* Buffer にて洗浄し、制限酵素 *Xba I* (25units/ml) あるいは *Not I* (25units/ml) を加え、37℃ で 16~20 時間反応した。電気泳動は 6V/cm, 18.5 時間, Initial 1.0 sec, Final 23.0 sec (BIO-RAD, Genepath 電気泳動プログラム 13, 16 あるいは 17) の条件で行った。対照として、DNA size standard である Lambda ladder を泳動した。ゲルは SYBER Green I 液 (Molecular Probes 社, 10,000 倍希釈) にて染色した。蒸留水で洗浄後、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000plus, FUJIFILM 社) にて観察した。

3. 分類基準と一致率

Tenover らの分類基準に従い、菌株の PFGE パターンを分類した¹⁾。また、菌株間においてバンドパターンが似ているものは Dice Coefficient を計算することにより、2 つの分離菌株において共有される DNA 断片の割合を表した¹⁾。この係数 F を求める公式は $F = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$ に従って計算した¹⁾。N_x は分離菌株 X からの DNA 断片総数、N_y は分離菌株 Y からの DNA 断片総数、N_{xy} は 2 つの分離菌株で同一のものである DNA 断片数を示す。この F 値が 1.0 に近いほど、それら 2 つの分離株は近縁種であることを示す。

成績

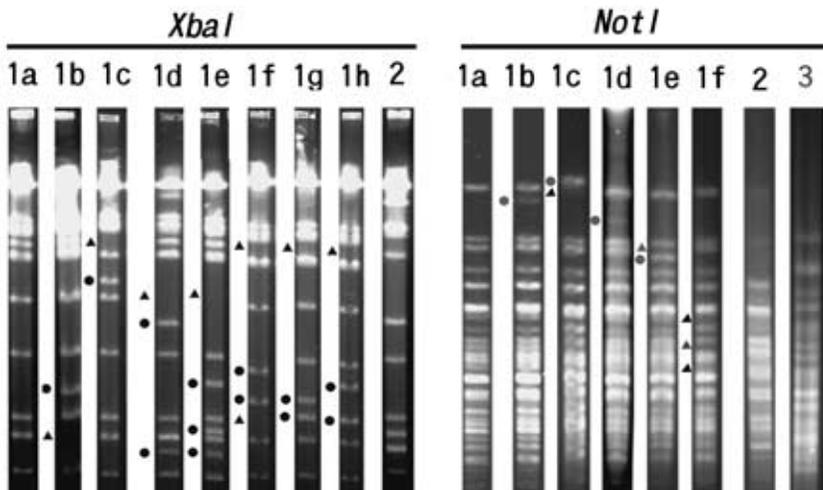
1. PFGE パターンの相関および分類

分離 SE 菌株の PFGE パターンの相違および Tenover らの一致率に従い、Table 1 のようにいくつかのタイプに分類することができた。*Xba I* および *Not I* を用いた PFGE 泳動図のタイプの代

Table 1 Classification of types in isolated *Salmonella* Enteritidis based on PFGE patterns with restriction enzymes, *XbaI* and *NotI*

	<i>XbaI</i>										No. of strains	
	X1a	X1b	X1c	X1d	X1e	X1f	X1g	X1h	X2	*		
<i>Not I</i>	N1a	24		1	3	4	11	6	1		3	53
	N1b	20	7				2				1	30
	N1c	1					1					2
	N1d						3					3
	N1e							1			1	2
	N1f						1					1
	N2						3					3
	N3									1		1
	*	17				4	4					25
	No. of strains	62	7	1	3	8	25	7	1	1	5	120

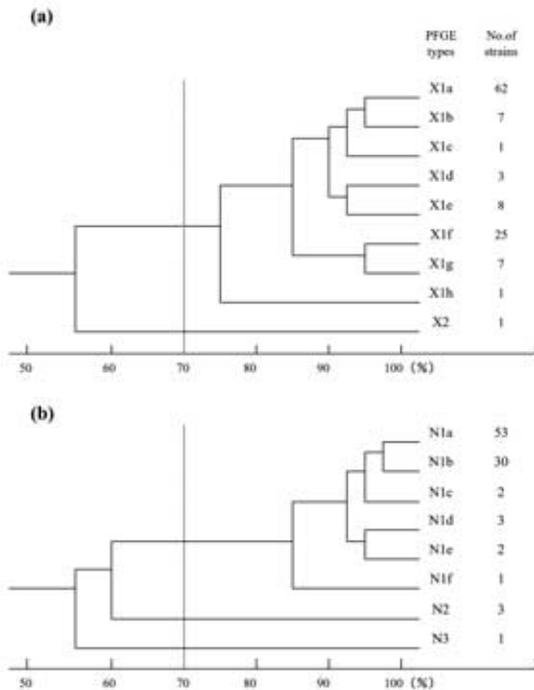
* not tested

Fig. 1 Main types of PFGE pattern of *Salmonella* Enteritidis strains cleaved with restriction enzyme *XbaI* and *NotI*. Marked "▲" and "●" on the side indicate the appeared bands and disappeared bands, respectively, compared with bands of X1a type and N1a type.

表例を Fig. 1 に、また、DNA 断片の一致率をもとに菌株の近縁関係を示す系統樹を Fig. 2 に示した。Xba I を使用した場合、タイプ X1 については小さなバンドの変動がみられたため、さらにタイプ X1a~X1h のサブタイプとして分類した。特に、タイプ X1a~X1c は、1~2 本のバンドの違いによるもので、その一致率は 0.9 以上であった。X1a と X1d~X1h との間では、3~4 本のバンドの違いがみられ、その一致率は 0.75 以上であった。一方、

X1a および X2 の間では、バンドの数も 5 本以上異なり、一致率も 0.55 と低い値を示した。Xba I を用いた場合、菌株 115 検体中、タイプ X1 が 114 検体で、タイプ X2 はわずか 1 検体であった。タイプ X1 のうち、X1a が最も多く、62 検体 (53.9%) を占めていた。次いで、X1f が 25 検体 (21.7%) であった。一方、制限酵素 Not I による PFGE パターンを比較すると、分離株 95 検体中、タイプ N1 (91 検体)、N2 (3 検体) および N3 (1 検体) の 3 つの

Fig. 2 Dendrogram of the cluster analysis of *Xba*I (a) and *Not*I (b) digested DNA from main types of *Salmonella* Enteritidis strains.



タイプに分類された (Table 1). タイプ N1 はさらに N1a ~ N1f に細分された. このうち, タイプ N1a が 53 検体 (55.8%), N1b が 30 検体 (31.6%) を占めていた. 細分化されたサブタイプ N1a ~ N1f については, おたがいにすべて一致率 0.85 以上の数値となり, 高い相関を示した. しかし, タイプ N2 あるいはタイプ N3 との一致率は 0.59 ~ 0.53 と低い数値であった. 2つの制限酵素 *Xba*I および *Not*I により細分化されたタイプは, その組み合わせにより 17 種類となった (Table 1).

2. 年代別にみた PFGE パターン

1983 年 ~ 1989 年の間, 河川水を中心に分離された菌株は, *Not*I での成績をみると, ほとんどが同一パターン (N1a) を示した. *Xba*I を用いた場合でも, 一致率 (0.8 ~ 0.9 以上) の高い菌株が分離された. 1990 年以降は, 患者便, 食材および調理器具などから分離された菌株を中心に検討を行った. *Xba*I を用いた場合, 1990 年 ~ 1994 年では,

X1a に比べ X1f タイプの菌株が多く分離されたが, 1995 年以降は X1a が優位を占めるようになり, 1998 年 ~ 1999 年においては X1a のみが分離された. *Not*I を用いた場合, 1997 年までは N1a が優位を占めていたが, 1998 年以降は N1b が多く分離されるようになった. この間, タイプ内での微少の変化や異なるタイプの混在もみられたが, 基本的には一致率の高い近縁種が検出された.

3. 食中毒事例での比較

Table 2 に示すように, 10 件 (A ~ J) の集団発症例において, 同一発症例内での検体パターンの相違をみたところ, 9 件において, 食材, 調理器具および患者便などの検体が全く同一のタイプを示した. 残り 1 件 (G 例) も全く同一ではないものの, 一致率 0.9 以上の菌株が分離された. 次に, 10 件の集団食中毒事例間で, *Xba*I によるそれぞれのパターンの経時的变化を比較した. A ~ C 事例 (1992 ~ 1994 年) では X1f が, D (1995 年) および E (1997 年) 事例では X1a が分離された. H ~ J 事例 (1998 ~ 1999 年) では, X1a および X1b が分離されるようになった. 時期や場所が異なるにもかかわらず, 5 例において, 全く同一か 1 本のバンドの違い (一致率 0.9 以上) が認められた.

4. 検体別にみた比較

河川水, 卵 (蛋白, 卵黄), 調理器具あるいは患者便など材料・検体の種類により, タイプの相違がみられるかどうかを検討した (Table 3). 患者便 65 検体からは, X1a が半数以上の 38 検体 (58.5%), X1f が 15 検体 (23.1%) 分離された. このうち, X1a でかつ N1a の菌株が最も多く (13 検体), 次いで, X1a でかつ N1b の菌株 (11 検体), X1f でかつ N1a の菌株 (6 検体) であった. 卵 20 検体中について調べたところ, 15 検体 (75.0%) が X1a であった. X1a でかつ N1a は 8 検体であった. 河川水からは, ほとんど N1a を示す菌株が分離された. *Xba*I による場合をみても, X1a と一致率の高い (0.8 以上の) X1e および X1d タイプが多く分離された. さらに, 河川水から分離された菌株と患者便から分離された菌株のタイプが一致するケースもみられた.

Table 2 Summary of cases of mass outbreak of food poisoning

Case	Year	month. day	Estimated roots or sources	PFGE type	
				<i>Xba I</i>	<i>Not I</i>
A	1992	7.12	unknown	X1f	N1b
B	1993	8.29	egg	X1f	N2
C	1994	9.27	cook	X1f	N1a
D	1995	7.11	unknown	X1a	N1b
E	1997	7.1	coating butter	X1a	N1a
F	1997	7.13	boiled food	X1g	N1a
G	1997	7.19	cook wear	X1f (X1g) ^a	N1d (N1e) ^a
H	1998	7.14	soup stock	X1b	N1b
I	1999	11.22	scrubbing brush	X1a	N1b
J	1999	11.30	fried rice	X1a	N1b

^a different type was isolated from patient's stool.

Table 3 PFGE types in isolated *Salmonella* Enteritidis based on the different sources

Sources	No. of strains							
	Examined strains	<i>XbaI</i>			<i>NotI</i>			
		X1a	X1f	others	Examined strains	N1a	N1b	others
Stool	65	38	15	12	53	28	19	6
Egg	20	15	4	1	15	10	4	1
Other foods	7	2	3	2	6	3	2	1
Cook wear	13	7	3	3	13	5	5	3
River water	10	0	0	10	8	7	0	1
Total	115	62	25	28	95	53	30	12

考 察

Tenover ら¹⁾によると、異なるバンド数が3本以内である場合には、理論的に、部分変異による一つの遺伝的変異で説明できるとされ、分離菌株はきわめて近縁度が高く(近縁種)、その感染が集団感染の一部である可能性を強く示唆するものとしている。3本以内のバンドの差異は、繰り返して培養したり、あるいは患者の体内や環境の違いによりわずかに変異することに起因するともいわれている。本実験において、タイプX1a~X1c, X1f~X1gあるいはN1a~N1fに分類された菌株どうしは、同一かあるいは1~3本のバンドの差異を示したもので、一致率が0.85~0.95であった。採取場所、採取年月日が異なるものの、同一市内で分離した菌株であるという点で極めて近縁度が高く、同一感染源由来である可能性が示唆された。

一方、7本以上のバンドが異なっている場合であれば、3つもしくはそれ以上の独立した遺伝子の変化によるものとして、集団感染とは関連性がないと考えられている。由来が全く違ったものから発生した食中毒であったと推測される。本実験では、タイプX2(1株)、N2(3株)およびN3(1株)のタイプを示すわずかな数株が散発的に認められるだけであった。

総検体中、タイプX1aが半数以上を占めた。患者便では約60%が、卵検体では75%がX1aであった。このように、多少パターンの変化や時局的変動があるものの、いずれもX1a(あるいはN1a)を中心に、高一致率の菌株が分離され、堺市内では、比較的安定した状態で、関連性の強いSE菌が繰り返し常在していたことが示唆された。また、これらの近縁種あるいは関連のある菌株により食

中毒が発生していた可能性が考えられた。これまで報告されている、ペロ毒素産生性大腸菌¹²⁾¹³⁾や MRSA¹⁴⁾は変異を起こしやすく、極めて多様性を示すのに対し、サルモネラの場合は、比較的変異も少なく安定していることが示唆された。

今回実験に用いた全分離菌株 120 検体中約半数の検体が集団食中毒事例からの分離菌株であった。集団食中毒 10 事例ごとにその感染経路や関連性が推測された。すなわち、E, F, H および I の事例では、てんぷら衣や人参の煮物などの食材、タワシやスポンジなどの台所用品、調理人の便および患者便のすべての検体から同一タイプの菌株が検出された。菌に汚染した食材から感染が広まったか、あるいは台所や台所器具が汚染されており、そこで調理を行ったために感染したものと考えられた。また、C の事例(保育園)においては、SE に感染した調理人から幼児に感染が広まったか、あるいは調理過程で汚染された給食などにより感染したと考えられた。一方、G の事例では、台所のゴミ受け、たわし、フキンなどの台所器具から分離された菌株のタイプと患者便のそれとは異なるタイプ示したが、一致率は 0.9 以上であるため、感染株が体内に侵入することで、多少の変異を起こしたことが考えられる。河川水からは、タイプ X1e および X1d が分離されたが、おそらく X1a が何らかの原因で河川に流入し、多少の変異を起こしたのかもしれない。また、詳細は不明だが、河川分離時期とほぼ同じころに発症した患者の下痢便からほとんど同一タイプの菌株が分離されたことは、両者の間になんらかのかかわりがあったことが示唆された。

感染源の同一性やその由来を調べるだけであれば、簡便さや迅速性を考えて、1 種類の制限酵素で充分かもしれない。しかし、正確な区別・同定をするためには複数の制限酵素で調べることも必要であろう。サルモネラ菌株を PFGE で分類するには、当初、制限酵素として、*Not I* がよく使用されていたが¹⁾¹⁰⁾¹⁵⁾、最近では *Xba I* および *Bln I* が適しているという報告もある⁸⁾¹⁰⁾。菌株間の関連性を調べる方法として、plasmid analysis¹⁰⁾、phage-typing⁸⁾、antibiotic resistance⁵⁾⁹⁾などがあるが、菌

株だけでなくクローンの関連性を特定するには PFGE が最も有効とされていることから¹⁾⁹⁾、今回、その他のタイピング法については検討しなかった。

特に近年、都道府県や国境を超えて人の移動、および食品等の流通が行われるようになっており、それらを通して感染症が伝播したり、拡大したりする危険性が増している。このような状況においては、感染症の拡大を未然に防ぐために、感染源の迅速なる把握、および、それに対する適切な対策が要求されており、そのためには原因となる病原体の検出・同定、および分離された病原体間の関連性等に関する科学的データを迅速にそして組織的に収集し、それに基づいた分子疫学的解析を行うシステムづくりを構築することことが不可欠であろう¹⁶⁾。

謝辞：本研究を行うにあたり、ご協力をいただいた本学部の藤本和子さんおよび関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2233 - 9.
- 2) Chu G, Vollrath D, Davis RW : Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986 ; 234 : 1582 - 5.
- 3) 一山 智 : 感染症の分子疫学 パルスフィールドゲル電気泳動法による病原細菌の型別 . *細菌学誌* 2000 ; 55 : 21 - 7.
- 4) 和田昭仁, 寺嶋 淳, 渡辺治雄 : パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的同定法 . *細菌学誌* 1997 ; 52 : 763 - 75.
- 5) Schlichting C, Branger C, Fournier JM, Witte W, Boutonnier A, Wolz C, *et al.* : Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing : resolution of clonal relationships. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 227 - 32.
- 6) Goering RV, Winters MA : Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 577 - 80.
- 7) Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD : Application

- of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In : Persing DH, Smith TC, Tenover FC, White TJ, ed. Diagnostic molecular microbiology : principles and applications. American Society for Microbiology, Washington DC, 1993 ; p. 536 - 72.
- 8) Murakami K, Horikawa K, Otsuki K : Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* from human outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J Vet Met Sci 1999 ; 61 : 439 - 42.
- 9) Matumoto M, Miwa Y, Hiramatsu R, Yamazaki M, Saito M, Suzuki Y : *Salmonella* partyphy A is more genetically homogenous than *Salmonella typhi*, as indicated by pulsed-field gel electrophoresis. 感染症誌 2000 ; 74 : 143 - 9.
- 10) Nauerby B, Pedersen K, Dietz H, Madsen M : Comparison of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT9a and PT11 from hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 3631 - 5.
- 11) Hoszowski A, Wasyl D : Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates. Vet Microbiol 2001 ; 80 : 139 - 48.
- 12) 坂田慎治, 福山正文, 古畑勝則, 松田基夫, 鈴木潤, 山本静雄, 他 : 人下痢症および乳牛から分離された Vero 毒素産生性大腸菌 (VTEC) の分子疫学的検討. 感染症誌 2002 ; 76 : 96 - 101.
- 13) 田中 博, 谷尾進司, 保科 健, 富田正章, 中島洋, 榊美代子, 他 : 中・四国地区における腸管出血性大腸菌感染症の疫学的解析と分離菌株の細菌学的検討. 感染症誌 2002 ; 76 : 439 - 49.
- 14) 近藤典子, 伊藤輝代, 平松啓一 : MRSA の分子疫学の遺伝学的基礎. 細菌学誌 1997 ; 52 : 417 - 34.
- 15) Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ : Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype enteritidis documented by IS200 -, ribo -, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. J Med Microbiol 1994 ; 40 : 15 - 22.
- 16) 渡辺治雄, 寺島 淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 田村和満 : 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制 ; パルスネットの構築. 感染症誌 2002 ; 76 : 842 - 8.

Molecular Epidemiology of *Salmonella* Enteritidis Food Poisoning by Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Noritoshi KITAMOTO¹, Yoji KATO¹, Kanako HAMADA¹, Shihono KANZYA¹, Takashi ONAKA², Masaharu YOKOTA² & Tomoyuki TANAKA²

¹School of Human Science and Environment, University of Hyogo,

²Sakai City Institute of Public Health

During the years 1983 to 1999, a total of 120 *Salmonella* Enteritidis (SE) isolates from various sources, patient's stool, foods, kitchen wear, river water etc., in 61 cases of food poisoning in the Sakai City, were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *XbaI* or *NotI* digestion of chromosomal DNA. *XbaI* and *NotI* restriction produced 2(X1 and X2) and 3(N1, N2 and N3) pulse-field profiles, respectively. The X1 and N1 types were further divided into 8(X1a X1h) and 6(N1a N1f) subtypes, respectively. However, these strains of subtypes showed only 0 - 4 fragment changes in PFGE patterns and the index of discrimination of over 0.75, indicating that SE isolates belong to the same clonal lineage, or are revealing closely clonal relationships. These results suggested a possible strain transmission in case of food poisoning, and epidemiologically related SE isolates were spread in the Sakai City district during a long period.