

2004年愛媛県内で分離された*Salmonella Virchow*の パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた疫学的解析

吉田紀美 林 正俊* 難波江芳子 青木紀子 田中 博 大瀬戸光明 井上博雄

The Epidemiological PFGE Analysis of *Salmonella Virchow* in Ehime Prefecture in 2004

Kimi YOSHIDA, Masatoshi HAYASHI*, Yoshiko NABAE, Noriko AOKI,
Hiroshi TANAKA, Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUYE

In 2004 in Ehime prefecture, seven isolates of *Salmonella* O7 were collected and tested by various biological methods including serotyping with polyclonal antibodies against O and H antigens and antibiotic susceptibility pattern assay against twelve antibiotics. As the results, all isolates were *Salmonella* Virchow, of which five were isolated from sporadic cases occurred independently and two were from a food poisoning.

And we conducted the genetic epidemiology of *Salmonella* Virchow strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *Xba* I or *Bln* I digestion of genomic DNA. By the PFGE analysis isolates from sporadic cases showed genetically identical with isolates from a food poisoning.

So it was suggested that all those cases were originated from the common source indicating a diffuse outbreak.

Keywords : *Salmonella* Virchow, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) , sporadic cases, food poisoning, diffuse outbreak

はじめに

*Salmonella*はヒトの感染性胃腸炎の病原菌として知られており、食中毒及び散発下痢症の原因菌として多数分離されている^{1, 2)}。集団発生等の原因究明に用いる疫学的手法としては、ファージ型、薬剤感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法などが用いられている。特にPFGE法は遺伝子型別によって菌の同一性を判定できることから、食中毒の原因究明等に汎用され、現時点で解析結果の有効性及び再現性において優れた方法であるといわれている^{3, 4)}。

Salmonella Virchow (S.Virchow) は日本全国で分離される*Salmonella* のなかで、比較的分離例の少ない血清型であるが^{5, 6)}、2004年本県において散発下痢症及び食中毒事例からS.Virchowが分離された。一定期間内に由来の異なる菌株が分離されたことから、その関連性を調査する目的でPFGE法を実施したので、その結果を報告する。

対象と方法

1) 供試菌株

2004年県内で分離されたS.Virchow 7株を表1に示す。当所において愛媛県感染症発生動向調査事業(以下、発生動向調査)病原体検査要領に基づき、感染性胃腸炎患者から分離された1株、市立宇和島病院の4株、松山市保健所管内で発生した食中毒事例由来2株の計7株を用いた。

2) 分離株の確認検査及び薬剤感受性検査

分離株については定法¹⁾に従い分離同定検査とサルモネラ免疫血清「生研」によるO、H抗原の血清型別を実施した。薬剤感受性試験はNCCLSの方法により、1濃度ディスク法で実施した。使用薬剤はアンピシリン (ABPC)、セフトキシム (CTX)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、オーグメンチン (AMPC/CVA)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、ホスホマイシン (FOM) の12薬剤とした。

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町234

* 市立宇和島病院

3) 分離株のPFGE

PFGE法は、国立感染症研究所のプロトコール⁴⁾により実施した(図1)。標準マーカーとして、*Salmonella* Braenderup H9812株を*Xba* I 酵素処理により使用した。

分離株の制限酵素として*Xba* I 及び*Bln* I を用いた。泳動条件は6.0V/cm, 2.2-63.8s (linear ramp), 泳動時間19時間, 泳動緩衝液14℃で実施した。

表1 分離株及び患者情報

| 菌株No. | 分離場所 | 発生状況 | 患者情報 | | | | | |
|-------|---------------|----------|------|----|------|----|---------|-----------------------------|
| | | | 年齢 | 性別 | 住所 | 入院 | 発病年月日 | 症状 |
| SV201 | 愛媛県立衛生環境研究所 | 散発 | 10 | 女 | 松前町 | 無 | 16.7.27 | 発熱(40.4℃), 腹痛 |
| SV205 | 市立宇和島病院 | 散発 | 75 | 男 | 宇和島市 | 有 | 16.8.17 | 発熱(37.8℃), 腸炎, 歩行障害, フラツキ |
| SV206 | 市立宇和島病院 | 散発 | 1 | 女 | 津島町 | 有 | 16.8.15 | 発熱(39.7℃), 上気道炎, 下痢, 腹痛 |
| SV207 | 市立宇和島病院 | 散発 | 6 | 女 | 西予市 | 有 | 16.8.24 | 発熱(39.0℃), 上気道炎, 下痢, 腹痛, 嘔吐 |
| SV208 | 市立宇和島病院 | 散発 | 1 | 男 | 宇和島市 | 有 | 16.8.17 | 発熱(37.9℃), 上気道炎, 下痢, 腹痛 |
| SV209 | 山口県環境保健研究センター | 食中毒 | 14 | 男 | 山口県 | 無 | 16.7.12 | 発熱, 腹痛, 下痢 |
| SV210 | 松山市保健所 | 食中毒(従業員) | 不明 | 女 | 不明 | 無 | 無 | 無症状 |



図1 *Salmonella*のPFGE法プロトコール

結 果

1) S.Virchow分離状況

今回供試した分離株は散発下痢症由来5件及び食中毒由来2件であった(表1)。散発例のうちSV201は中予地域病原体定点の感染性胃腸炎患者由来であった。SV205～208の4株は南予地域市立宇和島病院(病院定点)の入院患者から分離された*Salmonella* O7で、当所において血清型別を実施したところ、全てS.Virchowであった。散発下痢症5例の発病時期は7月から8月に集中しており、特に南予地域の4例は8月15日から24日の間に連続して発生した。

一方、7月に松山市内で発生した食中毒は旅館の夕食が原因と考えられた事例で、喫食者30名中22名が発症し、無症状者を含む29名の検便の結果、16名からS.Virchowが分離された。原因食(疑)を喫食した従業員(無症状)からも同菌が検出されたが、食材残品等からは分離されなかった。患者が山口県在住であったため、患者由来株は山口県環境保健研究センターから、また従業員株は松山市保健所からそれぞれ分与を受けた。

以上供試したS.Virchow7株は12薬剤に対する薬剤感受性試験の結果、全てが全薬剤に対して感受性を示した。

2) PFGE解析

7株の分離株について、制限酵素Bln I及びXba Iを用いてPFGEを行った。切断されたDNA断片の数は泳動像を肉眼で観察した結果、これらの分離株はどちらの制限酵素を用いた場合も同一のPFGEパターンを示した(図2)。

考 察

2004年、国立感染症研究所感染症情報センター病原細菌検出状況(地研・保健所集計)によると、全国のS.Virchow分離数は24例でサルモネラ菌総数1367例に占める割合は1.8%程度であった⁵⁾。1993年以降ほぼ毎年上位15位以内にあがる血清型であるが、S.Enteritidis等の分離率が47～62%と非常に高いのに比べ、1%代の頻度で推移している⁶⁾。一方、食中毒事例では2003年岐阜県⁷⁾及び京都市⁷⁾で発生しているが、食中毒原因としては比較的報告が稀な血清型である。

現在県内で感染性胃腸炎の原因菌を把握する手段は発生動向調査の各定点における活発かつ柔軟な病原体検査に委ねられている。県内で発生する*Salmonella*の分離状況については詳細に把握しきれない状況であり、従って、当所で得られる情報は限定されている。そのなかでも食中毒関連情報を含め、可能な限り*Salmonella*に関して病原体の収集解析を継続している。

1997年以降本県における*Salmonella* O7群の分離は、1999年イカ菓子食中毒事件に関与したS.Oranienburgが主であり⁹⁾、S.Virchowは発生動向調査において分離例のない血清型であった¹⁰⁾。しかし、2004年は異なった地域の散発下痢症からS.Virchowが相次いで分離され、また同時期食中毒事例からも同菌が分離される状況となった。そのため関係機関の協力を得て分離株を収集し、微生物学的検査及びPFGE法による遺伝子解析を実施した。*Salmonella*のPFGE法⁴⁾で汎用されている2種類の制限酵素を用いた結果、供試した菌株は全て同一の切断

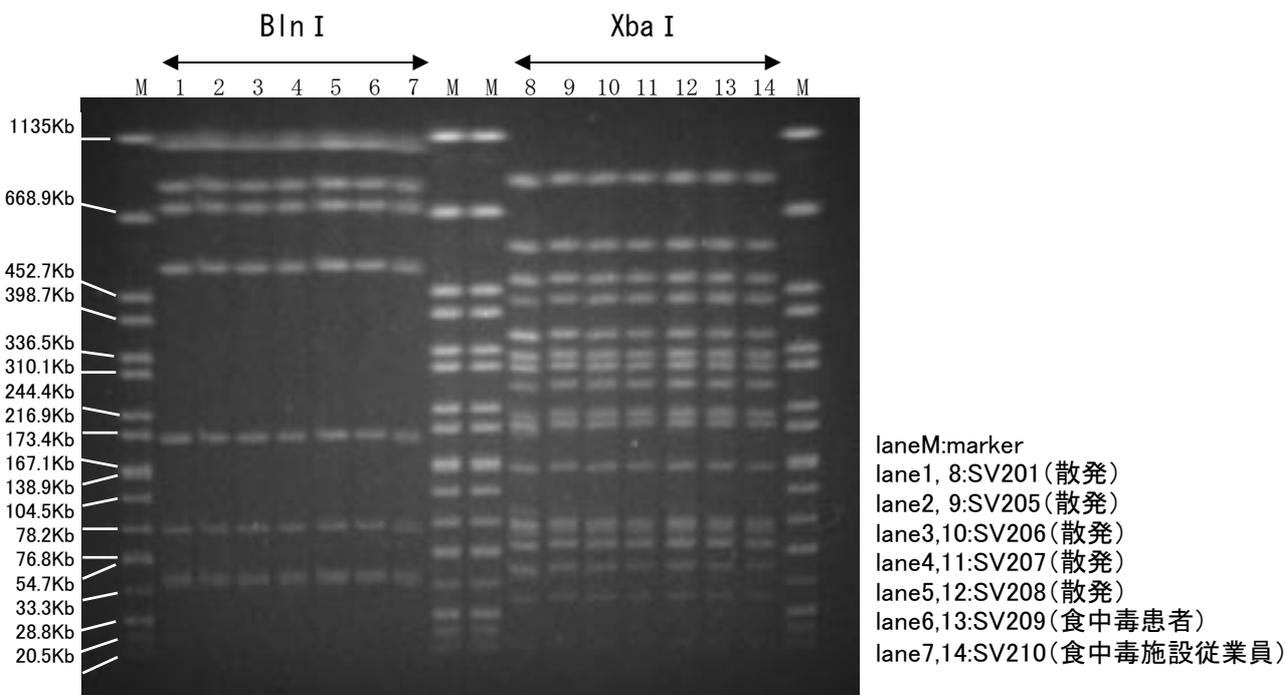


図2 S.VirchowのPFGE泳動像

パターンを示した。このことから2004年7月から8月にかけて相次いで発生した散発例は食中毒事例と同一起源の病原体によることが推察され、散在性集団発生の可能性が示唆された。各々の散発例に関する疫学調査は未実施のため感染原因は不明であるが、この時期県内において比較的稀な血清型S.Virchowの侵淫が確認された。

ヒトの*Salmonella*胃腸炎のほとんどすべては汚染食品の摂取に原因し、食肉、鶏肉及び鶏卵が重要な媒介物といわれている¹⁾。今回の事例の発生時期が7～8月の細菌性食中毒の好発時期であることと併せて何らかの共通媒介物の存在が示唆された。矢野らによると¹¹⁾愛媛県内の採卵鶏及び鶏舎内の塵埃からのS.Virchow検出率が高いことから、県内の環境由来株と患者由来株との関連性の有無についてPFGE法による検証が必要と考えられる。

今回PFGE法を実施するにあたって2種類の制限酵素を用いた。S.Enteritidisの場合は通常*Bln* I が用いられるが、S.Virchowに関しては*Xba* I を用いた方が切断パターンがより細分化され、遺伝子の識別能が優れていた。S. Enteritidisは液卵による食中毒事例をうけて、ファージ型別やPFGE解析等が実施されている⁴⁾が、S.Virchowは分離数が少なく、分子疫学的情報が十分に把握されていない。今回得られたPFGEパターンを評価するには、他の経年的広域的な分離株との間でPFGEパターンによるDNA類似度を比較し、菌株相互の特徴を明らかにすることが必要となる。そのため今後は*Salmonella*に関する積極的な疫学調査を行うとともにPFGE型の多様性に関するデータを集積することが必要と考えられる。

ま と め

1. 2004年愛媛県において、感染性胃腸炎散発例5例及び食中毒事例1例から計7株のS.Virchowが分離された。
2. PFGEによる遺伝子解析の結果、全て同一の泳動パターンを示し、分離株のDNA相同性が認められたことから、散在性集団発生が示唆された。

愛媛県感染症発生動向調査事業に御協力いただきました各医療機関の先生、山口県環境保健研究センター及び関係保健所の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 坂崎利一編：新訂食水系感染症と細菌性食中毒，90～138
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター：病原微生物検出情報，24，179～180（2003）
- 3) 渡辺治雄ほか：感染症学雑誌，76，842～848（2002）
- 4) 厚生労働科学研究事業 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平成15年度研究報告書
- 5) <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/virus/graph/salm2003.gif>
- 6) <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/virus/graph/salm9600.gif>
- 7) 板垣道代ほか：病原微生物検出情報，25，10～11（2004）
- 8) 山野親逸ほか：病原微生物検出情報，25，155～156（2004）
- 9) 田中博ほか：愛媛衛研年報，2，1～5（1999）
- 10) 青木紀子ほか：愛媛衛研年報，4，1～5（2001）
- 11) 矢野克也：平成15年度家畜病性鑑定事業成績 5（2003）