

2011年沖縄で発生した食中毒由来 *Salmonella* Enteritidis のファージ型と パルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析

久高潤・平良勝也・喜屋武向子・仁平稔・岡野祥・玉那覇康二・泉谷秀昌*

Phage Types and Pulsed Field Gel Electrophoresis Typing *Salmonella* Enteritidis Food-Borne Infections in Okinawa, 2011

Jun KUDAKA, Katsuya TAIRA, Hisako KYAN, Minoru NIDAIRA, Sho OKANO, Taketoshi TAKARA, Koji TAMANAHA and Hidemasa IZUMIYA*

要旨：2011年に沖縄県では13事例239名のサルモネラ食中毒が確認された。そのうち疑いを含む10事例について当所で検査を実施した結果、*S. Weltevreden* による1事例を除き9事例は*S. Enteritidis* (SE)によるものであった。これら9事例から分離された患者、環境及び従業員由来の代表株36株について、株間の関連性を比較するためファージ型別およびPFGE解析(*XbaI*及び*BlnI*)を行った。その結果、7事例はPT14c型であり、PFGEによる解析結果も遺伝的に近縁種であった。これらの事例間に疫学的な関連性はないことから、沖縄県ではPT14cで遺伝的にも近縁のSE株が広く分布していることが示唆された。PT14cは世界的にも報告は少なく、今後の動向が注目される。また、疫学的な関連性がない4つの事例でPFGEタイプが同一であったことから、このタイプが沖縄県におけるサルモネラ下痢症主要なタイプである可能性もある。下痢症患者の調査を継続するとともに、家畜やなどにおける感染源調査と対策が必要である。

Key words: サルモネラ *Salmonella*, 食中毒 Food-Borne Infection, ファージタイプ Phage type, パルスフィールド電気泳動法 Pulsed-Fields Gel Electrophoresis

I はじめに

サルモネラは、ヒトや動物の腸管内に生息する腸内細菌の一種で、その一部は、ヒトや動物に感染して病気を起こす人畜共通の感染症である。ヒトに病原性のあるサルモネラ属菌は、腸チフスあるいはパラチフスと呼ばれ重篤な全身感染症を起こすチフス性サルモネラと、下痢や腹痛などの胃腸炎を起こす食中毒性のサルモネラに大別される。また、生物学的には2500種類以上の血清型に分類され、血清型は病原性と関連するほか、食中毒等の疫学的調査に利用されている。

2011年に沖縄県で報告された食中毒は事件数31事例、患者数457名であった。そのうち最も多い原因物質はサルモネラによるもので13事例(41.9%)、患者数239名(52.3%)で全体の半数近くを占めていた。この年は、本県で初めてとなる食中毒での死者が2名確認され、*S. Weltevreden* 及び*S. Enteritidis* (SE)を原因とする食中毒で、それぞれ88歳女性と8歳男児が亡くなっている。サルモネラ食中毒は全国的に減少する傾向にあるが、沖縄県では依然として多く、なかでもSEによるものがほと

んどである。今回は2011年に県内で確認されたSE食中毒事例について、その生物学的特徴を把握するため各種解析を行った。

II 方法

1. 材料

2011年6月から12月、当所で検査を実施した有症苦情1事例を含む9事例のSE食中毒(疑)から分離された36株(患者便24、患者血液2株、食品6株、環境2株および従業員検便2株)を用いた。各事例と株の関係は表1に示した。

2. ファージ型別

国立感染症研究所の細菌第一部に依頼して実施した。

3. PFGE

制限酵素*XbaI*および*BlnI* (Roche)を用いた。泳動条件は6V/cm、スイッチングタイム2.2～63.8秒、泳動時間19時間で行った。得られたバンドの解析は、Tenovarらのカテゴリに従い目視判定するとともに、Fingerprinting II (Bio-Rad)を用いて解析を行った。解析

* 国立感染症研究所

表 1. 2011 年に沖縄県で発生した *S. Enteritidis* による食中毒と解析に用いた分離株

事件No	発生日	摂食者数	患者数	死者数	原因食品	原因施設	株名	由来	
1	J総菜店	6月18日	不明	32	ガーリックチキン	惣菜製造	11-044	厨房シンク	
							11-045	鶏肉原材料、他2株、計3株	
							11-046	チキン摂食残品(17日購入)	
							11-047	患者(17日購入)、他6名由来、計7株	
							11-050	患者便(24日購入)他由来、計3株	
2	Oレストラン	6月24日	50	28	不明 (6月24日の昼食)	飲食店	11-056	ハンドミキサー	
							11-059	患者便	
							11-060	従業員検便	
3	D弁当屋	7月10日	18	16	弁 当	惣菜製造	11-084	患者便	
							11-085	患者便	
4	家庭内1	7月30日	不明	2	不 明	不 明	11-091	患者便	
							11-097	患者便	
5	D弁当屋	9月24日	102	66	弁 当	惣菜製造	11-167	患者便	
							11-168	患者便	
							11-172	従業員検便	
							11-177	弁当(菜の花)	
6	保育園集団発生	10月11日	不明	66	不 明	不 明	11-179	患者便(3歳男児)	
							11-181	患者便(4歳女児)	
							11-185	患者便(2歳男児)	
							11-187	患者便(1歳女児)	
7	家庭内2	10月26日	不明	6	不 明	不 明	11-213	患者便	
							11-219	患者血液(8歳男児)	
8	8歳男児死亡事例	11月23日	3	3	1	不 明 (卵かけご飯疑い)	家庭	11-220	11-220の姉糞便
								11-221	11-220の弟糞便
								11-222	患者血液(7歳男児)
9	7歳男児重症事例	12月	不明	2	不 明	不 明	11-222	患者血液(7歳男児)	
合計		8事例		219	1		合計	36株	

はDice法(最適化1.5%, トレランス0.0%)による類似計数を算出し、平均距離法(UPGMA)による dendrogram を作成した。

4. 薬剤感受性試験

CLSIのディスク感受性試験実施基準に従い、センシディスク(BD)及びMueller Hinton II agar (BD)を用いて実施した。使用した薬剤は、ABPC, SM, TC, CTX, KM, OPFX, OFLX, CP, ST, GM, NA及びFOMの12薬剤である。

III 結果

1. ファージ型別

9事例は2種類のファージ型(PT) PT14c及びPT13に分類された。事件No. 5はPT13, それ以外の8事例はすべてPT14cであった。

2. PFGE

9事例のSE食中毒から分離された36株は、制限酵素XbaI及びBlnIを用いたタイピングにて、いずれも4つのパターンに分かれ、それぞれのPFGEタイプをX1a, X1b, X1c, X2a及びB1a, B1b, B1c, B2aとした(図1)。X1a, X1b, X1c及びB1a, B1b, B1cは、目視判定で近縁種(サブタイプ)と判定され、Fingerprinting IIによる解析結果

もX1a, X1b及びX1cは同一のクラスターに属していた(図2)。

各事例のPTとPFGEの結果を表2に示す。同一の事例から分離された株はすべて同じPT, PFGEタイプも一致していた。事件No. 5は、PT13, X2aB2aで他の事例とは唯一異なっていた。他の8事例はすべてPT14cでPFGEの解析結果からも遺伝的に近縁種によるものと判定された。特に、事件No. 2, 3, 4, 7及び9は、すべてX1aB1aで遺伝的にも同一株と見なされた。

解析した36株はすべて12薬剤に感受性株であった。

IV 考察

1. 2011年のSEを原因とした食中毒の分子疫学的特徴
9事例のSE食中毒のうち8事例はすべてPT14cであった。さらに、事件No. 2, 3, 4, 7及び9 (PT14c)は、同一のPFGEタイプ(X1aB1a)であったが、各事例に疫学的な関連性は無いことから、同一の感染源による食中毒であることは否定的である。従って、このタイプが沖縄県におけるサルモネラ下痢症主要なタイプである可能性が示唆された。特に、事件No. 1(ガーリックチキン事例)では鶏肉が、事件No. 8(8歳男児死亡事例)では鶏卵が感染源として疑われたことから、今後は食品

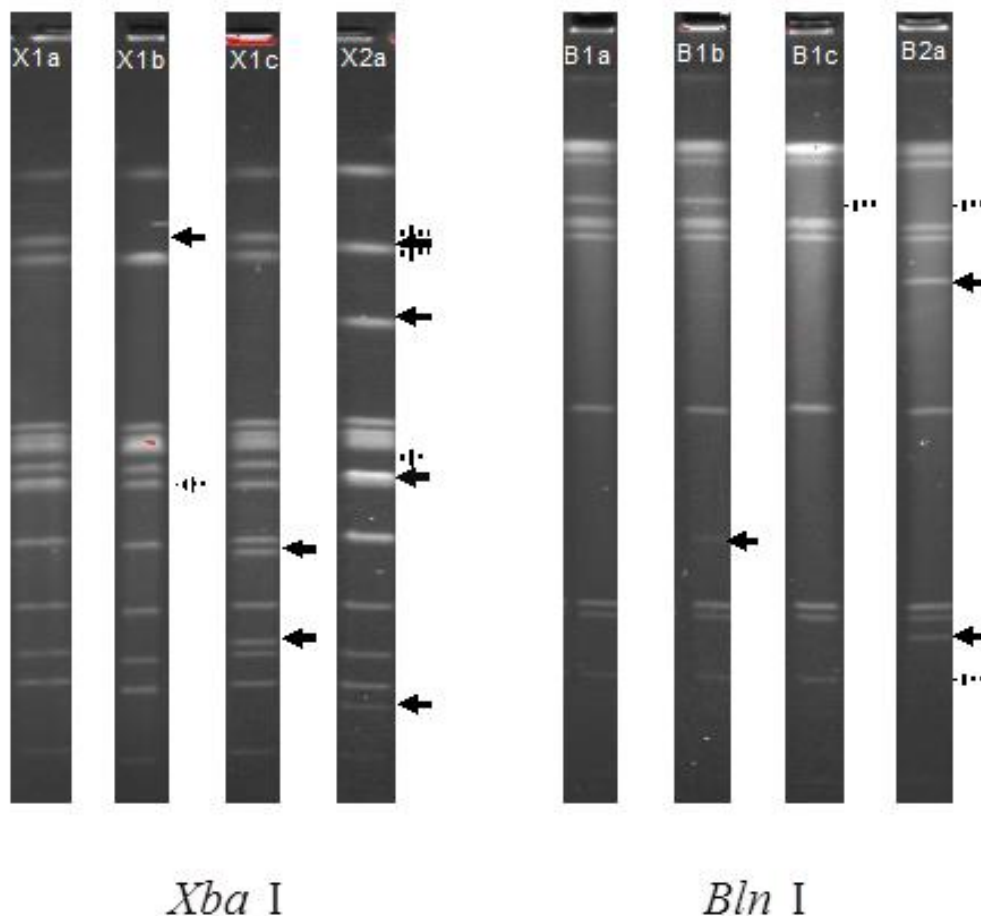


図1 制限酵素 *Xba*I および *Bln*I で消化した *S. Enteritidis* の PFGE パターン
 はバンドの消失、 ← はバンドの挿入部位を示した

や家畜等について詳細に調査する必要がある。

我が国における SE の主要なフェージ型は、PT 1, 4, 6 a, 21, 47, RDNC 型等であるが^{9,10,11,12,13}、今回沖縄で分離された PT13 や PT14c の報告はない。しかし、PT13 は、カナダ¹⁵、米国で下痢症患者²やプロイラー³から高頻度に検出され、台湾⁴の下痢症患者からも頻度は低いものの検出されている。一方、PT14c は、近年 PT14b から新しく派生した型で、国内の他の地域でも検出されているが頻度は高くない。PT14c は米国²、台湾⁴、カナダ¹⁵、オランダ⁵、ブラジル^{6,7}の調査でも検出されていなかった。しかし、2009 年にイングランド・ウェルズ及び北アイルランドで実施された海外旅行者の調査では、エジプト旅行者から分離された SE の 34.6% (62/179) が PT14c であり、さらに、エジプト旅行者以外からは殆ど検出されていなかった¹⁴。今回、試験した事例のほぼすべてが PT14c であったことから、PT14c は、ある地域に限局し、沖縄県内における SE 下痢症の主要なタイプとして広くまん延している可能性が示唆された。今後、過

去の患者分離株や家畜、食品由来の SE についても調査する必要があるとともに、PT14c の今後の動向が注目される。

SE の PFGE 解析は、一般的に制限酵素 *Xba* I や *Bln* I が用いられている。*Xba* I 及び *Bln* I の多様性指数 (Simpson's diversity Index: SI) は、それぞれ 0.83 及び 0.76 で、株を識別する能力は、腸管出血性大腸菌 O157 等と比べ低い。2 種類を組み合わせた解析でも 0.92 であるが、*Sfi*IV/*Pac*I/*Not*I の 3 種類の制限酵素を組み合わせることで SI が 0.98 に高まることが報告されている⁸。そのため、集団発生や散発事例の関連性を調べるための分子疫学的解析は、これらの 3 種類の制限酵素を組み合わせ、詳細に解析する必要があると考えられた。

2. 各事例の概要と考察

(1) 事件 No. 1 (J 総菜店事例)

中部保健所は、6 月 22 日に患者からの情報を受け調査を開始した。調査の結果、患者は 4 名でガーリックチキン (G チキン) が共通食であった。

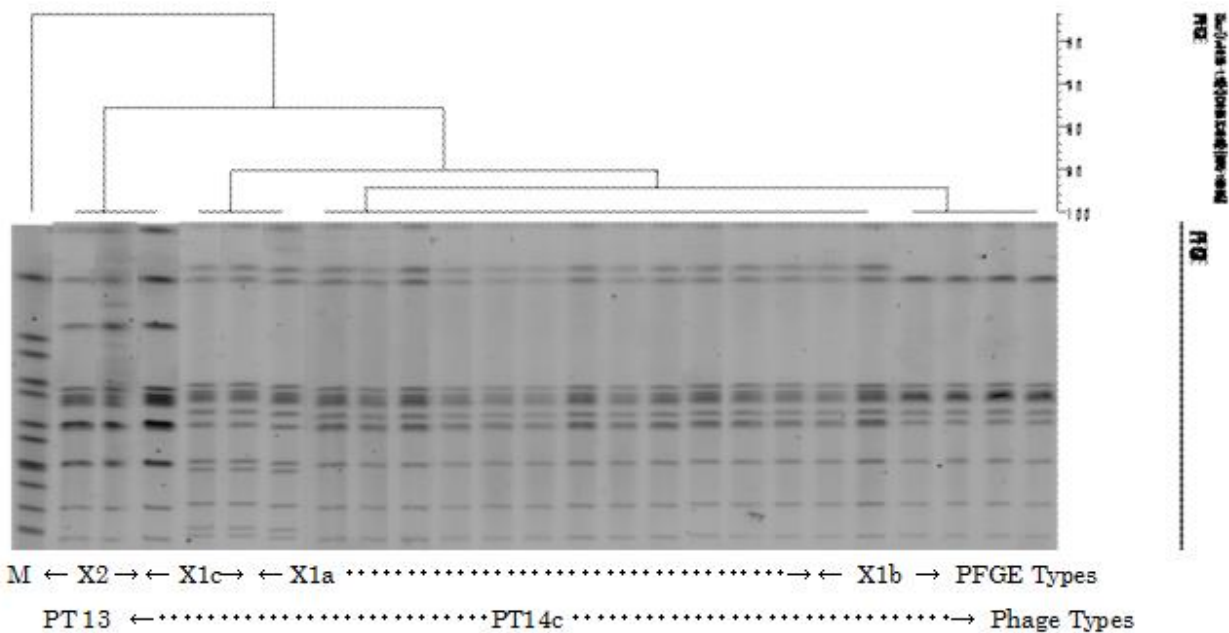


図2 *Salmonella* Enteritidis の PFGE デンドログラムとファージ型

表2 2011年に発生した *Salmonella* Enteritidis 食中毒と分離株の解析結果

事件 No.	事例	S. Enteritidis 由来 (38株)					ファージタイプ	PFGEタイプ	
		患者	食品	原材料	環境	従業		Xba I	Blu I
1	J惣菜店	11-047、他9株	11-046	11-045、他2株	11-044		PT14c	X1b	B1c
2	Oレストラン	11-059			11-056	11-160	PT14c	X1a	B1a
3	D飲食店弁当(那覇店)	11-085、他2株					PT14c	X1a	B1a
4	家庭内1	11-097					PT14c	X1a	B1a
5	D飲食店弁当(浦添店)	11-167、他1株	11-177			11-172	PT13	X2a	B2a
6	保育園	11-179、他3株					PT14c	X1c	B1a
7	家庭内2	11-213					PT14c	X1a	B1a
8	8歳男児死亡	11-219、他2名					PT14c	X1a	B1b
9	7歳男児重症(食中毒疑)	11-222					PT14c	X1a	B1a

検査の結果、患者4名から SE が検出され、患者宅に残されていた G チキンの残品からも SE が検出された。その結果、J 惣菜店の G チキンによる食中毒と判断され、6月30日から3日間の営業停止処分となった。一方、6月29日に別の医療機関からも食中毒疑いの届出があり、中部保健所が調査したところ、同店で製造した G チキンを喫食していた。さらに、この事例に関する新聞報道を受けて、購入者から製造者に寄せられた有症苦情を調査

したところ、6月13日～25日にかけて同店で製造された G チキンを食べて下痢、腹痛等を呈している者がいることが判明し、最終的には患者数32名の食中毒となった。

患者由来株8株(17日購入者5名、24日購入者3名由来)、患者宅残品(17日購入)由来株1株、原材料由来株3株(22日収去品)及び原因施設のシンク由来株1株(22日採取)の13株について、PFGEによる分子疫学的解析を実施したところ、13株はすべて X1bB1c であった。

この結果、食中毒発生の要因は、加熱不足による SE の生存も考えられる。しかし、チキンを購入した日や検体を採取した日が異なるにもかかわらず、患者や原材料及び環境由来株の遺伝子型が一致したことから、調理済み製品が、調理器具等を介して SE の二次汚染を受けた可能性が示唆された。

(2) 事件 No. 3 及び事件 No. 5 (D 飲食店の弁当食中毒事例)

事件 No. 3 は那覇市内の会社で社員 18 名が、D 飲食店(那覇店)で製造された弁当を摂食し、うち 16 名が食中毒症状を呈した。患者 9 名の検便を実施したところ 4 名から SE が検出された。患者の症状、潜伏期間や共通食が当該弁当以外にないこと等から、同施設の弁当を原因とする食中毒と断定し 3 日間の営業停止処分となった。PFGE 解析の結果、患者由来株はすべて X1aB1a であった。

事件 No. 5 は 9 月 24, 25 日の両日に実施された講習会において、弁当を摂食した 102 名のうち 66 名が発症した。調査の結果、弁当を提供した施設は事件 No. 3 と同じ系列の D 飲食店(浦添店)が製造した弁当であった。有症者 27 名、無症者 3 名、調理従事者 1 名および弁当の残品(菜の花)から SE が検出された。この結果、D 飲食店を原因とする食中毒であると断定され、5 日間の営業停止処分となった。分離株の PFGE 解析の結果、患者、調理従事者および弁当由来株はすべて X2aB2a 型であり、2011 年に沖縄で発生した他の 7 事例の SE 食中毒由来株とはクラスターが大きく異なっていた。なお、弁当中の一品で SE が検出された「菜の花」は、油で調理されたもので、その原材料は中国製の冷凍食品であった。そのため、流通食品を介した広域的食中毒の可能性も示唆されたことから、国立感染症研究所へ分離株を送付し PT を依頼した。その結果 PT13 型によるものであったが、沖縄以外の他の地域で同型による SE の検出は無かった。

(3) 事件 No. 6 (保育園集団発生)

0 歳から 10 歳での保育園児 66 名が胃腸炎を発症した。11 名の保育園児から分離された 11 株のうち、年齢、クラスが異なる 4 株を解析したが、いずれも PT14c, X1cB1a 型であった。そのため、同一の食品を介した集団食中毒の可能性が示唆されたものの、原因食品は不明であり、発症の時期は、1 峰性の流行曲線とはならず、人ヒト感染症による広がりも否定できなかった。

(4) 事件 No. 8 (8 歳男児死亡事例)

11 月 24 日に 8 歳男児が食中毒様症状で救急搬送され、姉(10 歳)、弟(5 歳)も症状を訴え医療機関を受診した。救急搬送された 1 名は、同日に別の総合病院へ搬送

されたが 27 日に死亡した。他の 2 名は 30 日に退院した。3 人に共通する食事は、家庭の食事と市販の調理パンであった。調理パンは 205℃の加工工程があり、県内の販売店に 200 個ほど販売されているが、他に同様の苦情はなかった。家庭の食事では、発症前に姉弟 3 名で納豆に生卵を入れて食していたこともあり、感染源として生卵が疑われたが、特定には至らなかった。分離株の解析の結果は PT14c, X1aB1b で、県内で発生した他の食中毒と同じ系統の SE であり、また、薬剤感受性株であったことから、特に強毒株など特別な株による感染ではないことが示唆された。また、感染源が生卵であることが疑われたことから、PT14c 型による SE 食中毒と鶏卵由来 SE 株の関連性について、今後、調査する必要がある。

V まとめ

2011 年沖縄県では 13 事例のサルモネラ食中毒が発生し、その内 9 事例(1 事例は疑い)から分離された SE について各種解析を行った。その結果、8 事例は PT14c 型で PFGE 解析の結果も近縁種であった。この 8 事例に疫学的な関連性は無いことから、PT14c は、本県に特徴的な株である可能性が高く、今後の動向が注目される。

VI 参考文献

- 1) F C Tenovar, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33: 2233-2239. 1995.
- 2) F W Hickman-Brenner, et al. Phage typing of *Salmonella* in the United State. *Clin Microbiol.* 1991 ; 29: 2817-2823.
- 3) K Lthong, et al. Morecular Analysis of *Salmonella* enteritidis by Pulsed-Fiekd Gel Electrophoresis and Ribotyping. *J Clin. Microbiol,* 1070-1074, 1995.
- 4) S F Altekruise, et al. *Salmonella* Enteritidis in Broiler Chikens, United States, 2000-2005. *Emer Infect Dis.* 12: 1848-1852, 2006.
- 5) J C Pang et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. *J Appl Microbiol:* 99, 1472-1483. 2005.

- 6) E Duijkeren, et al. Serotype and Phage type Distribution of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol*, 40: 3980-3985, 2002.
- 7) L R Santos, et al. Phage Types of *Salmonella* Enteritidis Isolates from Clinical and Food Samples, and from Broiler Carcasses in Southern Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 45: 1-4, 2003.
- 8) S A Fernades, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* Enteritidis Strains Isolated in Sao Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 45: 59-63, 2003.
- 9) J Zheng et al. Enhanced Subtyping Scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Emer Infect Dis*. 13: 1932-1935, 2006.
- 10) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 18; 51-52, 1996.
- 11) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 21; 162-163, 2000.
- 12) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 24; 179-180, 2003.
- 13) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 27 191-192, 2006.
- 14) 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所. 30; 203-204; 2009.
- 15) Health Protection Agency. *Salmonella* (non typhoid/paratyphoid) - 2009 update. *Travel and Migrant Health*, HPA, 2011. Available from http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317131650560.
- 16) R Khakhria, et al. Distribution of *Salmonella* Enteritidis phage types in Canada. *Epidemiol. Infect.* 106; 25-32, 1991.