

香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例

Case Report of *Staphylococcus aureus* Food Poisoning in Kagawa Prefecture

内田 順子 安藤 友美 岩下 陽子 福田 千恵美
Junko UCHIDA Tomomi ANDO Yoko IWASHITA Chiemi FUKUDA

要 旨

2015年7月に香川県内で発生した給食弁当の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例についてコアグララーゼ型別及びエンテロトキシン型別、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行った。調査結果より有症者、従事者A、複数の食品が同一由来と推測された。疫学調査において今回はPFGEと血清型は一致したが、型別が同じだけでは遺伝子解析が異なることもあるので由来の推定にはPFGEによる遺伝子解析が必要である。

キーワード：黄色ブドウ球菌 コアグララーゼ型 エンテロトキシン型 遺伝子解析 食中毒

I はじめに

ヒトや動物の皮膚や消化管などに常在する黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシンという毒素を産生し食中毒の起原菌となる。このエンテロトキシンに汚染された食品を喫食し、嘔気、嘔吐、腹痛などの食中毒症状を起こす。

2015年7月、香川県内で発生した給食弁当の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例が発生した。有症者、弁当製造業従業員、食品より検出された黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型、エンテロトキシン型とPFGEによる遺伝子解析を行い、関連性を調査した。

II 方法

1 供試菌株

有症者便2検体、従事者便5検体、ふき取り10検体、使用水1検体及び食品51検体計69検体について食中毒菌検査を実施した。便検体以外は一般生菌数も測定した。その結果、有症者便2検体、従事者便3検体、食品24検体から分離された黄色ブドウ球菌29株を対象とした。

2 方法

(1) コアグララーゼ型はブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて分類した。

(2) エンテロトキシン型はブドウ球菌エンテロトックス-F「生研」(SET-RPLA)(デンカ生研)を用いて分類した。

(3) また同時に、コアグララーゼ型とエンテロトキシン産生遺伝子についてPCR法を実施した。コアグララーゼ型別

はHiroseら¹⁾、SE遺伝子はOmoeら²⁾のプライマーを用いた。コアグララーゼ型遺伝子(I, II, III, IVa, IVb, Va, Vb, VI, VII, VIII, IX, X)とSE遺伝子(*sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei*)検出用プライマーを用い、反応条件は角田らの方法³⁾を参考にし、初期変性94°C2分、増幅反応94°C30秒、55°C30秒、72°C1分を30サイクル、最終伸長72°C5分で実施した。

(4) PFGEは滋賀県立衛生環境センターの方法⁴⁾を参考に実施した⁵⁾。

Trypticase Soy Brothで37°C一夜静置培養後、培養液を400 μ l採り12000rpm2分遠心。上清を捨て200 μ lの水に再浮遊させ、56°Cに加温後、1%SeaKem Gold Agarose(LONZA)200 μ lを混和しサンプラーキャスター0.7mmに流し込み固化。ブロックを5mg/ml Lysozyme(和光)・20 μ g/ml Lysostaphine(和光)in 0.5M EDTA(pH8.0)1mlで37°C一晚振盪。その後、1mg/ml Proteinase K(Roche)、1%N-Lauroylsarcosine(SIGMA)in 0.5M EDTA1mlに交換し50°C一晚振盪。ブロックを4mm×4.5mmにカットし、4mM Pefabloc SC(Roche)in TE Buffer(pH8.0)500 μ lでProteinase Kを不活化。TE Buffer1mlで氷上30分振盪洗浄を2回繰り返し、A buffer200 μ lに交換後、氷上30分振盪。制限酵素20U *Sma* I(Roche)in A buffer100 μ lを加え37°C一晚振盪を行った。プラグを取り出し、SeaKem Gold Agaroseでゲルを作成し、CHEF DRIII(Bio Rad)にて0.5×TBE Buffer14°C、電圧6V/cm、パルスタイム5.3~34.9秒の条件で、18時間泳動。解析はFingerprinting II(Bio Rad)で行った。

(5) 一般生菌数は、標準寒天培地を用いスパイラル法で測定した。

Ⅲ 結果

コアグララーゼ型別及びエンテロトキシン型別の結果を表1に示す。

1 コアグララーゼ型

免疫血清を用いたコアグララーゼ型は菌株 No. 26 はV、No. 27 はIIとなり、この2株を除く27株は全てIVであった。

2 エンテロトキシン型

SET-RPLA法でのエンテロトキシン型は菌株 No. 9, 26, 27, 29の4株が検出できず、残り25株はAが検出

された。

3 PCR法

コアグララーゼ型は免疫血清と同じ結果となった。エンテロトキシン型は菌株No. 26, 27よりG, Iが検出され、その他27株はAが検出された。

4 PFGE

結果を図1に示す。コアグララーゼ型IV、エンテロトキシン型Aの27菌株は6パターンを示したが、1本バンド違いで95%、あとは86%以上の類似度であった。従業員B, Cはそれぞれ違うパターンを示した。

5 一般生菌数

No. 3, 15, 16, 18, 22, 24のスパゲティーステーが1gあたり $10^6 \sim 10^7$ 個と多かった。

表1 分離された黄色ブドウ球菌の型別

菌株 No.		食品	生菌数 個/g	コアグララーゼ型別	エンテロトキシン型別
1	7/30朝	オムレツ	1,200	IV	A
2	7/30朝	シュウマイ	16,000	IV	A
3	7/30朝	スパゲティーステー	5,000,000	IV	A
4	7/30朝	もやし炒め	8,300	IV	A
5	7/30朝	ポテトサラダ	2,000	IV	A
6	7/30昼	豚キムチ	12,000	IV	A
7	7/30昼	スパゲティーステー	54,000	IV	A
8	7/30昼	キャベツのゆかり和え	660,000	IV	A
9	7/30夕	カニクリームコロッケ	300未満	IV	A*
10	7/30夕	ゆで卵	13,000	IV	A
11	7/30夕	スパゲティーステー	110,000	IV	A
12	7/30夕	南瓜そばろ煮	320,000	IV	A
13	7/30夕	コロッケ	410	IV	A
14	7/30	ぴり辛わかめ	810	IV	A
15	7/30	スパゲティーステー	4,200,000	IV	A
16	7/29朝	スパゲティーステー	1,900,000	IV	A
17	7/29昼	竜田揚げカレー風味	4,100	IV	A
18	7/29昼	スパゲティーステー	2,800,000	IV	A
19	7/29昼	キャベツソース炒め	300未満	IV	A
20	7/29昼	ブロッコリー梅肉和え	4,100	IV	A
21	7/29夕	竹輪と野菜の煮物	1,800	IV	A
22	7/29夕	スパゲティーステー	3,300,000	IV	A
23	7/29夕	ちんげんソテー	1,200	IV	A
24	7/29	スパゲティーステー	13,000,000	IV	A
25		従事者検便A		IV	A
26		従事者検便B		V	G,I*
27		従事者検便C		II	G,I*
28		有症者検便A		IV	A
29		有症者検便B		IV	A*

*) SET-RPLA法では陰性

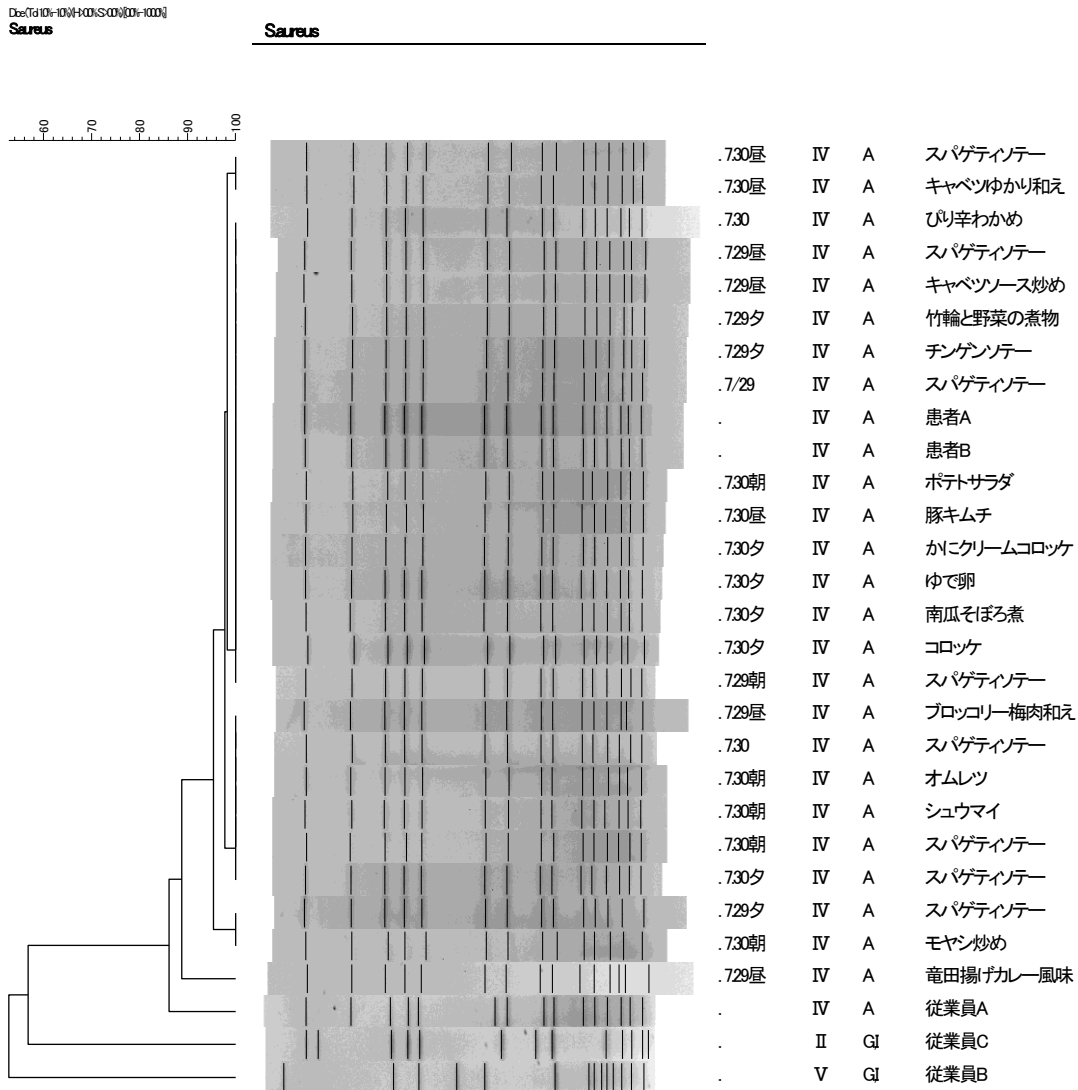


図1 分離された黄色ブドウ球菌のデンドログラム

IV 考察

複数施設において提供された共通の弁当の食品 24 品と有症者 A・B、従事者 A より黄色ブドウ球菌コアグラーゼ型 IV、エンテロトキシン型 A が検出された。従事者 B よりコアグラーゼ型 V・エンテロトキシン型 G, I が、従事者 C よりコアグラーゼ型 II・エンテロトキシン型 G, I が検出された。エンテロトキシン型は SET-RPLA 法では従来型の A~E のみ検出可能であり、PCR 法では新型 G, H, I も検出できるため、より詳細に短時間で分類でき疫学調査に有用であった。

PFGE を実施した結果、型別が同じであった弁当の食品と有症者 A・B と従事者 A は類似度 86% で同じ由来と推

測された。型別が同じだけでは遺伝子解析 (PFGE) が異なることもあるので PFGE による遺伝子解析が必要である。

7 月 29 日と 30 日の各種弁当にスパゲティンテーが入っており一般細菌数も 54,000~13,000,000 個/g と多かったが、食品広範囲で黄色ブドウ球菌に汚染されており、検査結果より原因食品を特定することはできなかった。

V まとめ

1 コアグラーゼ型 IV、エンテロトキシン型 A であった弁当の食品と有症者 A・B と従事者 A は類似度 86% で同じ由来と推測された。

2 黄色ブドウ球菌食中毒事例において、エンテロトキ

シン検出PCR法は8種類の遺伝子型が分類できるため疫学調査に役立つと思われる。

3 疫学調査において、今回は PFGE と血清型は一致したが、型別が同じだけでは遺伝子解析が異なることもあるので由来の推定には PFGE による遺伝子解析が必要である。

文献

- 1) Hirose M et al. ; Identification of Staphylococagulase Genotypes I-X and Discrimination of type IV and V subtypes by Multiplex PCR assay for Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* : Jpn. J. Infect. Dis.、63、257-263、257、2010
- 2) Omoe K et al ; Detection of seg, seh and sei genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S. aureus* Isolates Harboring seg, she or sei Genes : J. Clin. Microbiol.、40、857-862、2002
- 3) 角田由紀子ら ; MultiplexPCR 法による黄色ブドウ球菌のコアグラーゼ型別とエンテロトキシン産生遺伝子の検出 : 新潟県保健環境科学研究所年報、28、68 - 72、2013
- 4) 研究代表者 渡辺治雄 : 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 16 年度 総括・分担研究報告書 125-129 (2005)
- 5) 福田千恵美ら ; 香川県内で発生した黄色ブドウ球菌有症苦情事例 : 香川県環境保健研究センター所報、13、67 - 69、2014