

# 集団下痢症から分離されたセレウス菌、ウエルシュ菌及び黄色ブドウ球菌の パルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析について

江下 倉重、岸田 一則、依田 清江

Molecular epidemiological analysis of *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and  
*Staphylococcus aureus* isolates from three outbreaks of diarrheal disease

Kurasige ESITA, Kazunori KISHIDA, Kiyoe YODA

## 要 旨

3つの集団下痢症で、それぞれセレウス菌、ウエルシュ菌及び黄色ブドウ球菌が食品や患者から分離された事例についてパルスフィールドゲル電気泳動法により分子疫学的解析を実施した。事例1ではセレウス菌食中毒の原因食品の特定、事例2では食品以外のウエルシュ菌伝播経路の推定、事例3では黄色ブドウ球菌の食品への汚染経路の推定が可能となった。

キーワード：集団下痢症、セレウス菌、ウエルシュ菌、黄色ブドウ球菌、パルスフィールドゲル電気泳動法

Key Word : diarrheal disease, outbreaks, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, Pulsed-field gel electrophoresis.

## はじめに

セレウス菌、ウエルシュ菌及び黄色ブドウ球菌は食中毒菌に指定されているが、自然環境に広く分布するため、集団下痢症において食品や患者等から、これらの菌が分離されても直ちに原因菌と決定することが困難である。原因菌と特定するには、患者の症状や発生状況等の疫学調査結果を考慮するとともに、食品や患者から分離された菌株の毒素産生能の確認や遺伝子の共通性の確認が必要である。今回われわれは、集団下痢症事例から分離されたセレウス菌、ウエルシュ菌及び黄色ブドウ球菌について毒素産生能の確認とパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による分子疫学的解析を行い、若干の知見を得たので報告する。

## 2. 集団下痢症事例の概要

### 事例1 (セレウス菌が分離された事例)

2006年6月29日、事業所内の食堂で昼食を喫食した職員151名中23名が約1時間後に吐き気、嘔吐、下痢の症状を呈した。拭き取り13検体中1件、検食13検体中2件(おから煮、うどん)及び患者便4検体中4件からセレウス菌が分離された。

### 事例2 (ウエルシュ菌が分離された事例)

2008年5月6日特別養護老人ホームにおいて「入所者に嘔吐、下痢を呈するものがある」との通報が保健所にあった。患者の発生状況は、4月25日に1名発症後、5月3日から連日4～6名の発症が続き、6日には延べ32名となった。患者の便を検査したところ9名中8名からノロウイルス及び6名からウエルシュ菌が検出された。

### 事例3 (黄色ブドウ球菌が分離された事例)

2008年5月19日から20日にかけて、A中学校の校外学習としてS民宿に宿泊していた16名中9名(学生8名

及び教員1名)が帰宅後、嘔吐を主症状とする食中毒症状を呈した。当該保健所の調査でS民宿を原因施設と判断し、19日の夜食から20日の昼食までの食品残品の検査と調理従事者及び患者検便を実施した。食品残品8検体中7件、従業者便3検体中2件及び患者便6検体中3件から黄色ブドウ球菌が分離された。

## 材料及び方法

### 1. 供試菌株

事例1はセレウス菌7株(拭き取り由来1株、食品由来2株及び患者由来4株)。事例2は患者由来ウエルシュ菌6株。事例3は黄色ブドウ球菌12株(食品残品由来7株、調理従事者便由来2株及び患者便由来2株)。

### 2. PCRによるセレウス菌嘔吐毒素遺伝子検出

Schulz<sup>1)</sup>らの報告した嘔吐毒素産生に関わるnonribosomal peptide synthetaseのEM1領域を増幅するprimerを用いて行った。

### 3. ウエルシュ菌のHobbs型別試験及びエンテロトキシン産生試験

Hobbs型別試験は耐熱性A型ウエルシュ菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて実施した。エンテロトキシン産生試験は供試菌を変法DS培地<sup>2)</sup>に24時間培養し、その上清をPET-RPLA「生研」(デンカ生研)で調べた。

### 4. 黄色ブドウ球菌エンテロトキシン産生性試験及びコアグララーゼ型別試験

エンテロトキシン産生性はエンテロトキシン検出用キットSET-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いて検査した。コアグララーゼ型別試験は、潮田<sup>3)</sup>らの方法でおこなった。

### 5. PFGE用プラグの作製と酵素処理

セレウス菌はトリプトソイブロスに36°C約8時間振と

う培養、ウエルシュ菌は BHI ブロスで36°C 1 晩嫌気培養及び黄色ブドウ球菌は BHI ブロスで36°C 1 晩培養した。各菌液200  $\mu$ l を遠心して集菌し、50  $\mu$ l の75mM NaCl, 25mM EDTA (pH8.4) に懸濁後5  $\mu$ l の30mg/ml Lysozyme 及び15  $\mu$ l の100  $\mu$ g/ml Lysostaphin を加えよく混合し、100  $\mu$ l の1%低融点アガロース (Bio-Rad) を混和してアガロースブロックを作製した。ブロックの小片に100  $\mu$ l の1M NaCl, 0.1M EDTA (pH8.0), 0.5% Brij-58 (w/v), 0.2%deoxycholate (w/v), 1% Sarkosyl (w/v), 1 mg/ml Lysozyme, 10  $\mu$ g/ml Lysostaphin を加え、37°C 18時間反応させた。ブロックをTE buffer で洗浄後、100  $\mu$ l の1% Sarkosyl (w/v), 0.25M EDTA (pH8.0), 1 mg/ml Proteinase K を加えて50°C 18時間反応させた。100 mM Pefabloc<sup>4)</sup> で Proteinase K を不活化した後、30U/sample の制限酵素 Sma I で25°C、18時間消化した。

## 6. PFGE

PFGE の条件は0.5×TBE Buffer, 1%アガロースゲルを用い、CHEF Mapper System (Bio-Rad) で電圧200V、液温14°Cで20時間泳動した。パルスタイムはセレウス菌は Yuk-Fong Liu らの方法<sup>5)</sup> に準じ1.0~25秒、ウエルシュ菌は Maslanka らの方法<sup>6)</sup> に準じ0.5~40秒及び黄色ブドウ球菌は、柴田らの方法<sup>7)</sup> に準じ0.5~60秒とした。分子量マーカーは *Salmonella* Braenderup (H9812) 由来 DNA の Xba I 消化産物を使用した。<sup>8)</sup>

### 結果および考察

#### 事例1 (セレウス菌による事例)

分離されたセレウス菌7株は、すべて嘔吐毒素産生遺伝子を保有していた。患者の症状や発症状況等を検討し、本事例は嘔吐型セレウス菌食中毒と断定された。患者全員が「おから煮」を喫食していたこと、「うどん」のみ

喫食した者に患者がいなかったことから、「おから煮」が原因食品と推定された。しかし、検食の検査では「おから煮」のみならず「うどん」からも菌が検出され、これらの株と患者由来株及びふき取り由来株の PFGE パターンが全て一致した (図1) ことから原因食品の調理の際に、本菌による汚染が拡大したことが示唆された。セレウス菌の型別血清は市販されていないため、食品や拭き取り材料と患者から分離された菌の PFGE による分子疫学的解析は有用な方法であった。

#### 事例2 (ウエルシュ菌による事例)

患者から分離されたウエルシュ菌6株を検査したところ4株がエンテロトキシン産生性であった。4株は、Hobbs 型別血清で型別不能であったが、PFGE パターンは全て同一であった (図2)。

本事例は、患者からノロウイルスが高率に分離されたこと、患者の発生状況等からノロウイルスによる感染性胃腸炎の集団発生と断定された。一般にウエルシュ菌は高齢者から高頻度に分離されること、ウエルシュ菌食中毒の特徴である患者発生の一峰性のピークがないこと等から本事例では原因から除外された。

患者から分離されたウエルシュ菌のうち4株がエンテロトキシン産生性であったが、下痢症の一因であったかは、多くの患者がノロウイルスによる下痢を呈したため解析できなかった。しかし PFGE で共通性が認められたこと、患者の発生状況から特定の原因食品の存在が考えにくいこと等から、施設内の環境等の糞便汚染により4人がウエルシュ菌を保菌した可能性が示唆された。

ノロウイルス感染症の集団発生で、下痢症との関連が不明であるが同一型のウエルシュ菌が多数分離された事例が報告<sup>9)</sup> されている。また、環境汚染など食中毒とは

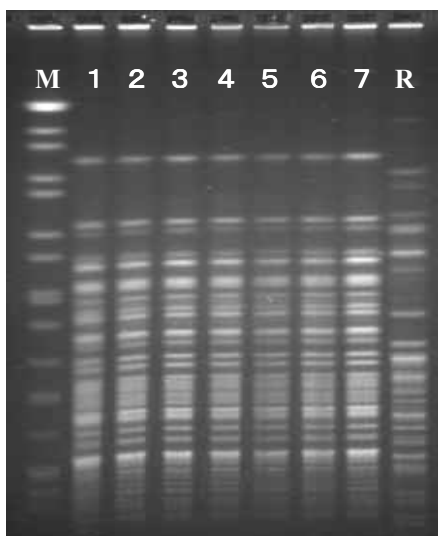


図1 事例1 由来セレウス菌の制限酵素 Sma I による PFGE パターン

M : 分子量マーカー 1 : ふき取り由来株  
2-3 : 食品由来株 4-7 : 患者便由来株  
R : 毒素非産生株

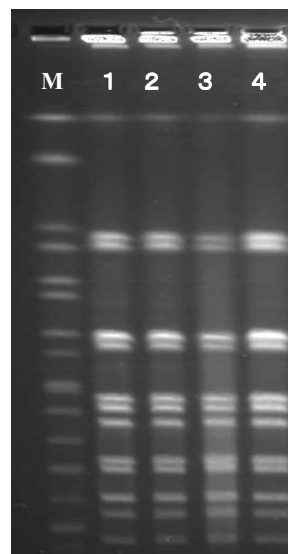


図2 事例2 由来ウエルシュ菌の制限酵素 Sma I による PFGE パターン

M : 分子量マーカー 1-4 : 患者便由来株

異なる経路で発生するウェルシュ菌の集団下痢症も報告されている<sup>10)</sup>。今後老人施設等高齢者の集団から分離されたウェルシュ菌についてはPFGEによる解析と共に、感染源については食品由来あるいは環境由来の両面から検討することが必要と考えられた。

事例3 (黄色ブドウ球菌による事例)

分離された黄色ブドウ球菌12株中10株 (食品残品由来7株、調理従事者便由来1株及び患者便由来2株) はA型エンテロトキシン産生性であった。10株はコアグララーゼ型別不能であったが、PFGEパターンは全て同一であった (図3)。

本事例は、発症状況及び患者6名中2名からA型毒素産生性黄色ブドウ球菌が分離されたことから黄色ブドウ球菌による食中毒と断定された。発症時期から20日の昼食が原因と考えられたが、患者の喫食調査から原因食品の特定はできなかった。しかし、「おにぎり」が素手で調理されたこと、昼食に提供されるまで保温されていたこと等の要因から、原因食品と疑われたが、残品がなく検査できなかった。食品残品8検体中7件と高率に同一菌が分離されたことから、PFGEを行ったところすべて同一の泳動パターンを示した。食品7件中4件は20日昼食残品であったが、3件はそれ以前に調理された食品であった。以上のことから調理作業中に調理従事者の手指を介して複数食品に汚染が拡大したことが推測された。調理従事者1名から同じパターンの黄色ブドウ球菌が分離されたが、患者らと同じ昼食を喫食したためと考えられた。

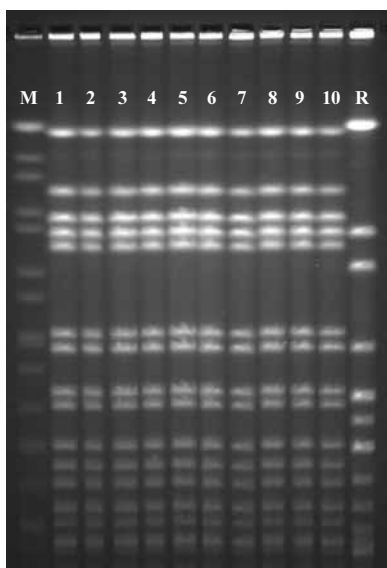


図3 事例3 由来黄色ブドウ球菌の制限酵素 *Sma* I によるPFGEパターン

M: 分子量マーカー 1-7: 残品由来株  
8: 調理従事者便由来株 9-10: 患者便由来株  
R: エンテロトキシン非産生株

まとめ

セレウス菌、ウェルシュ菌あるいは黄色ブドウ球菌が関与する集団下痢症において、分離菌の血清型やコアグララーゼ型等が不明であっても、PFGEによる分子疫学的解析により原因食品の特定や感染経路の推定等の詳細な検討が可能であった。

文献

- 1) Ehling-Schulz M, Fricker M, Schere S. (2004) : Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FMES Microbiology letters*. 232 : 189-195.
- 2) 大谷仁己, 氏家淳雄 他 (1987) : 変法 DS 培地におけるウェルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性、*食衛誌*、28:281-285.
- 3) 潮田弘, 寺山武, 坂井千三 (1977) : 黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別簡易法とその応用、*東京衛研年報*、26 : 1-6.
- 4) Matumoto M, Suzuki Y, Nagano H, Yatsuyanagi J, Kurosawa H, Kobayashi K, et al. (2005) : Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis analysis performed at selected prefectural institutes of public health for use in PulseNet Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.* 58,180-183.
- 5) Peter Yuk-Fong Liu, Se-Chinke, Shun-Liang Chen. (1997) : Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus Cereus* in a pediatric unit. *J.Clin. Microbiol.* 15 : 1533-1535.
- 6) Susan E. Maslanka, Jaredg. Keer, Glen Williams, et al. (1999) : Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigation. *J.Clin. Microbiol.* 37 : 2209-2214.
- 7) 柴田幹良, 柳川善勢, 他 (2001) : 同時期に発生したコアグララーゼIV型黄色ブドウ球菌食中毒2事例について、*東京衛研年報*、52 : 3-6.
- 8) Susan B. Hunter, Paul Vauterin, Mary Ann Lambert-Fair, et al (2005) : Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the nation databases to the new size standard. *J.Clin. Microbiol.* 3 : 1045-1050
- 9) 門間千枝 柳川義勢 (2006) : ウェルシュ菌感染症、*感染症週報*、8 : 20-22.
- 10) 深尾敏夫, 佐藤 恵, 田中保知 他 (2004) : 特別養護老人ホームにおける環境由来と思われるエンテロトキシン産生 *Clostridium perfringens* による集団下痢症、*感染症学雑誌*、78 : 32~39.