

食中毒事例でのパルスフィールドゲル電気泳動法による 遺伝子解析の有用性について

須釜久美子 平澤恭子 長沢正秋 渡部啓司
微生物部 細菌科

Usability of the PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) Gene Analysis in Cases of Outbreaks of Food Borne Infectious Diseases

Kumiko SUGAMA, Kyoko HIRASAWA, Masaaki NAGASAWA and Keishi WATANABE

Division of Bacteriology, Department of Microbiology, Fukushima Institute of Public Health

要 旨

今年度県内で発生した食中毒事例において、パルスフィールドゲル電気泳動法による解析を実施した。食中毒事例 1 については 2 カ所の保健所から分離された 5 株の *S. Enteritidis* は同一パターンを示し、また、事例 2 についても、2 グループの患者と調理従事者から分離された *C. jejuni* が同一パターンを示したことから、どちらも疫学調査を裏付ける科学的根拠の一つとなり、パルスフィールドゲル電気泳動法の有用性が確認された。

今後さらに有用性を得るためには、データの蓄積が重要であり、パルスフィールドゲル電気泳動法の実施が事業化される必要があると考える。

はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis : PFGE) 法は、制限酵素を用いて細菌の染色体やプラスミド DNA を切断後、生じた大きな DNA 断片を特殊な電気泳動装置にかけて分離し、その泳動後の多型性を比較する方法である。

従来、食中毒および感染症の集団発生の原因究明には、喫食調査などの疫学調査の情報を統計学的に解析する手法が用いられており、この疫学的手法を補うために種々の分子疫学的手法が開発されてきた。その分子疫学的手法のなかで PFGE 法は、現時点において感度的にもまた再現性においても最も優れた菌株比較方法といわれている^{1), 2)}。

そこで、今年度県内で発生し、PFGE 法による

解析によってその有用性が得られた 2 つの食中毒事例について報告する。

事例の概要

(事例 1) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) による食中毒事例

平成 15 年 7 月 8 日に県内のゴルフクラブのレストランで昼食を摂った者が、腹痛・下痢等の食中毒様症状を呈している旨の連絡が A 保健所に入り、疫学調査が開始された。調査対象者は 76 名であり、そのうち発症者は 10 名であった。調査および検査は 3 カ所の保健所で実施され、食品、ふきとり、従事者便、患者便の検査を実施した結果、患者便 5 件からサルモネラ 09 群が検出された。このサルモネラ 09 群は、当所で検査の結果すべて *S. Enteritidis* となった。これ

らの患者は2カ所の保健所(B・C)管内からで、それぞれ所属するグループが異なっており、患者に共通する食事が当該施設で提供されたオムライスと推定され、26名が摂取し、そのうち10名が発症していた。また、使用された卵は前日に割卵され冷蔵保管されたことから、細菌の汚染と増殖の機会があったことも推定された。

以上のことから、本事例はサルモネラによる食中毒と断定された。

(事例2)カンピロバクターによる食中毒事例

平成15年7月30日にK市内の医療機関より、飲食店で食事をし、下痢、腹痛等の食中毒症状を呈した患者を9名診察した旨の通報が保健所にあり、直ちに調査が開始された。

調査の結果、患者は2グループ(D・E)19名のほり、喫食調査の結果から患者の共通食品は7月24日の夜に飲食店で提供された宴会料理に限定されていること、患者5名の便、従事者2名の便および施設にあった包丁のふき取り検査からカンピロバクターが検出されたことから、当該施設を原因とするカンピロバクターによる食中毒と断定された。

材料および方法

1. 材料(使用菌株)

事例1については、分離された5株の*S. Enteritidis*と、昨年の県内での食中毒2事例からの*S. Enteritidis*4株との計9株についてPFGE法を実施した。

事例2については、患者便由来の*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*(*C. jejuni*)4株と*Campylobacter coli*(*C. coli*)1株、従事者便由来の*C. jejuni*2株、食肉用包丁ふきとり由来の*C. coli*1株を用い、昭和60年食中毒由来株と昭和63年食中毒由来株のそれぞれ2株ずつとの計12株についてPFGE法を実施した。

2. 方法

PFGE法により、染色体DNAを制限酵素で切断し、その断片を電気泳動し、パターン解析を行った。

事例1の*S. Enteritidis*については、制限酵素*Bln*を用い、泳動条件は電圧6V/cm、パルスタイム5~50秒、泳動時間21時間、バッファの温度14とした。

事例2の*C. jejuni*と*C. coli*については、制限酵素*Sma*を用い、泳動条件は電圧6V/cm、パルスタイム0.5~25秒、泳動時間20時間、バッファの温度14とした。

なお、DNAサイズマーカーとしてLambda Ladderを用いた。

結果

事例1の*S. Enteritidis*のPFGEパターンを図1に、事例2の*C. jejuni*と*C. coli*のPFGEパターンを図2に示した。

事例1については、分離された5株の*S. Enteritidis*は同一パターンを示し、昨年度の食中毒事例とは異なるパターンを示した。

事例2については、2グループの患者便と従事者便から分離された6株の*C. jejuni*は同一パターンを示し、昭和60年および昭和63年の食中毒事例からの分離株とは異なるパターンを示した。また、患者便と食肉用包丁ふき取りから分離された*C. coli*はそれぞれ異なるパターンを示した。

考察

疫学調査による食中毒の原因究明には、喫食調査等の基礎疫学的調査手法が最も重要なものはいまでもないが、その関連調査の過程で病原微生物が検出された場合は重要な証拠としての価値があるといわれている³⁾。また、その病原微生物間の関連性についての科学的データを集約し、その結果に基づいて疫学的解析を行うことが不可欠であるともいわれている¹⁾。

細菌の場合、疫学的に型別する解析法は大き

く2種類にわけられ、一つは表現型別法であり生化学的性状やファージ型別、薬剤感受性パターンなどが含まれる。もう一つは遺伝子型別法でありプラスミドプロファイルやPFGE法などが含まれる。表現型は菌の増殖過程で変化が起こるが、遺伝子型の変化は表現型に比べると自然な変化は少ないといわれ⁴⁾、現時点においてはPFGE法が菌株間のDNA構成の差を検出するのに最も優れた方法であると認識されている⁵⁾。

今回PFGE法を実施した食中毒事例1については2カ所の保健所から分離された5株の*S. Enteritidis*は同一パターンを示し、また、事例2についても、2グループの患者と調理従事者から分離された*C. jejuni*が同一パターンを示したことから、どちらも疫学調査を裏付ける科学的根拠の一つとなり、その有用性が示された。

PFGE法が有用であった事例報告はいくつもなされているが、その中で問題提起もなされている。たとえば、*S. Enteritidis*は食中毒事例が明らかに違っても同じPFGEパターンを示したり、同一家族内でPFGEパターンの相違がみられたりするという報告もある^{6), 7)}。また、*C. jejuni*による食中毒事例では食品中で菌が増殖する可能性が低く、患者から複数のタイプが検出されることがあるともいわれており、一事例中でのPFGE法によるDNAパターンでどこまで識別できるか、また他の事例との関係を明らかにすることができるかなど、さらに多くの事例でのPFGEパターンを検討する必要があるといわれている⁸⁾。

多くの食品が工業製品化している現状では、共通の原因による集団発生が離れた地域で時間的な差をもって、いわゆる“diffuse outbreak”として起こる可能性がある。その探知を迅速に把握するためには病原体のサーベイランスが重要であり、食中毒や感染症の拡大を未然に防ぐためには適切な衛生対策が必要となる。

食中毒事例の原因菌株についてはできる限りPFGE法を実施し、それらの菌株はその情報とと

もに適切な保存をする必要がある。そのためにも食中毒事例におけるPFGE法の実施は事業化される必要があり、PFGE法がより有用であるためにはさらなるデータの蓄積が重要である。

まとめ

今回PFGE法を実施した食中毒事例1については2カ所の保健所から分離された5株の*S. Enteritidis*は同一パターンを示し、また、事例2についても、2グループの患者と調理従事者から分離された*C. jejuni*が同一パターンを示したことから、どちらも疫学調査を裏付ける科学的根拠の一つとなり、PFGE法の有用性が確認された。

今後さらに有用性を得るためには、データの蓄積が重要であり、PFGE法の実施が事業化される必要があると考える。

引用文献

1. 渡辺治雄, 寺嶋 淳, 他: 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. 感染症学雑誌, 76, 842~848, 2002.
2. Tenover CF, et al.: Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. Journal of Clinical Microbiology, 33, 2233~2239, 1995.
3. 柳川 洋: 疫学解析による食中毒の原因究明. 食品衛生研究, 52, 15~27, 2002.
4. 満田年宏: 分子疫学的解析の基礎. 感染対策のための分子疫学入門 第1版, メディカ出版, 大阪(2002) pp.2~11.
5. 渡辺治雄, 寺嶋 淳, 他: パルスネットの構築: 細菌のDNA解析に基づいた分子疫学的ネットワークシステム. 食品衛生研究, 52, 7~13, 2002.
6. 青木喜也, 吉田 哲, 他: *Salmonella* Enteritidisによる食中毒事例のパルスフィ

ールドゲル電気泳動による遺伝学的解析．平成12年度厚生科学研究費補助金振興・再興感染症研究事業総括・分担研究報告書,110～112,2001.

- 7．小林一寛：腸管出血性大腸菌とサルモネラにおけるパルスフィールド電気泳動（PFGE）法による解析の利用に関する研究．平成12年

- 度厚生科学研究費補助金振興・再興感染症研究事業総括・分担研究報告書,107～109,2001.
8．伊藤喜久治：我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究．平成10年度厚生科学研究費補助金《振興・再興感染症研究事業》分担研究報告書,51～56,1999.

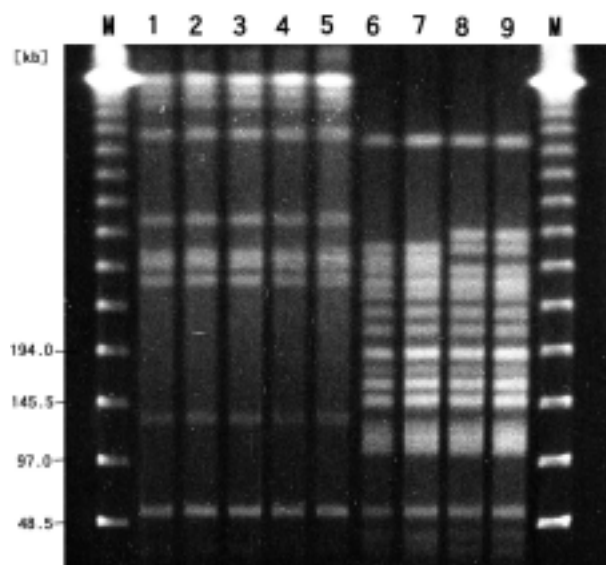


図1 *S. Enteritidis* の *Bln* による PFGE パターン

レ-ソM : DNA マーカー (Lambda Ladder)

1 : B 保健所管内, 糞便由来, 52 歳, 男

2 : C 保健所管内, 糞便由来, 34 歳, 男

3 : C 保健所管内, 糞便由来, 20 歳, 男

4 : C 保健所管内, 糞便由来, 42 歳, 男

5 : C 保健所管内, 糞便由来, 31 歳, 男

6,7 : 平成 14 年 6 月食中毒事例 1 , 糞便由来

8,9 : 平成 14 年 6 月食中毒事例 2 , 糞便由来

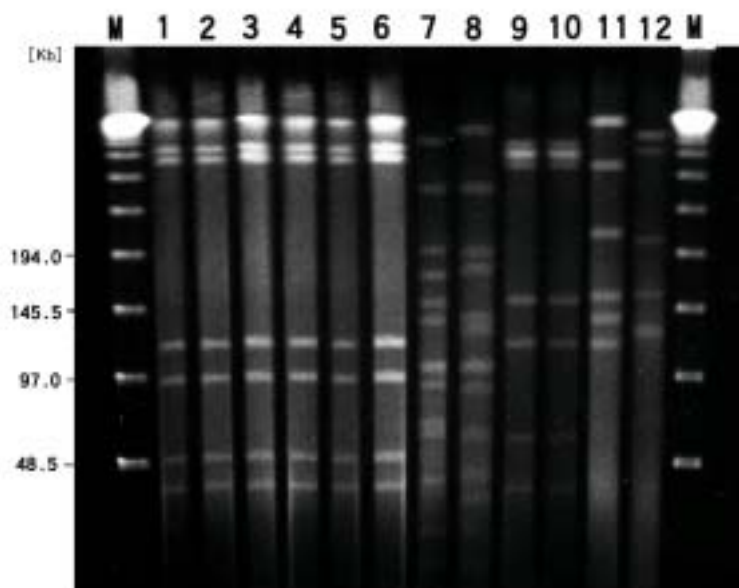


図 2 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* および *Campylobacter coli* の *Sma* による PFGE パターン

レーン M : DNA マーカー (Lambda Ladder)

- 1 : D グループ患者便由来, *C. jejuni*
- 2 : D グループ患者便由来, *C. jejuni*
- 3 : D グループ患者便由来, *C. jejuni*
- 4 : E グループ患者便由来, *C. jejuni*
- 5 : 調理従事者便由来, *C. jejuni*
- 6 : 調理従事者便由来, *C. jejuni*
- 7 : 食肉用包丁ふきとり由来, *C. coli*
- 8 : C グループ患者便由来, *C. coli*
- 9 : 昭和 60 年食中毒由来株 F1069, *C. jejuni*
- 10 : 昭和 60 年食中毒由来株 F1070, *C. jejuni*
- 11 : 昭和 63 年食中毒由来株 F1071, *C. jejuni*
- 12 : 昭和 63 年食中毒由来株 F1071, *C. jejuni*

* 9・10 と 11・12 はそれぞれ同一事例