

広島市において流行したファージ型別不能な RDNC-A 型 , SM・ABPC 耐性 Salmonella Enteritidis の疫学的解析

下村 佳 橋渡 佳子*
河本 秀一* 国井 悦子
吉野谷 進 伊藤 文明
松本 勝 荻野 武雄

古田 喜美 石村 勝之
山本美和子 佐々木敏之*
谷口 正昭 萱島 隆之

はじめに

Salmonella Enteritidis(S. Enteritidis)食中毒の発生防止は依然としてわが国の食品衛生上の大きな課題である¹⁾⁻⁴⁾。一方、広島市においても過去に数多くの S. Enteritidis 集団食中毒事例の発生を経験し、行政的な諸施策を講じてきたが、サルモネラ対策は今日でも主要課題のひとつである。

当所では、原因菌株の疫学的動向をモニターし、行政施策に還元することを目的として、集団および散发発生事例などに由来する S. Enteritidis 菌株について、薬剤感受性試験やパルスフィールド電気泳動(PFGE)等による解析、国立感染症研でのファージ型別試験等の疫学マーカー解析を行ってきた。その中で 1999 年から、以前にはほとんど分離されていなかった SM・ABPC 耐性株による集団および散发事例の増加が認められ、それらのファージ型が、現行のファージに感受性はあるものの既知のファージ溶菌パターンにあてはまらない型別不能(Reacted but did not conform: RDNC)な株であることが明らかとなった⁵⁾⁶⁾。このファージ型の S. Enteritidis による感染事例は、1998 年に滋賀県において散发型集団事例(diffuse outbreak)の発生が報告されている⁷⁾が、その疫学については不明な部分が多い。そこで今回、本市において分離された本菌の特徴を菌学的・疫学的な観点から検討するため、その発生状況と分離菌株の解析を行ったので報告する。

方 法

1 供試菌株

1994 年から 2004 年までの 11 年間に広島市における集団食中毒事例、散发食中毒事例、および食品等から分離された S. Enteritidis 分離菌株 1654 株を薬剤感受性試験に供試した。そのうち、1999 年から 2002 年までの集団・散发事例患者由来および食品由来の SM・ABPC 耐性株

31 株について、ファージ型別、プラスミドプロファイル、PFGE 解析および -ラクタマーゼ遺伝子の検索に供試した。

2 サルモネラの同定・血清型別

サルモネラの同定は、TSI および LIM 培地における生化学的性状を確認したのち、api20E(ピオメリュー)を用いて行った。血清型別はサルモネラ免疫血清(デンカ生研)を用いて行った。

3 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は、薬剤ディスクの Sensi-disk(BBL)を使用して National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)法の規格に準じて行った⁹⁾。薬剤はアンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、カナマイシン(KM)、ナリジクス酸(NA)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)の 6 剤を用いた。

4 ファージ型別

ファージ型は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼し型別を行った。

5 プラスミドプロファイル

Kado らの方法¹⁰⁾に準じてプラスミド DNA を抽出した。電気泳動は 1×TAE(ニッポンジーン)下、0.7% SeaKem[®] Gold agarose(TaKaRa)で 100V、40 分間行った。泳動後、0.5 μg/ml エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で写真撮影を行った。

6 -ラクタマーゼ遺伝子の PCR 検出

ABPC 耐性の要因を探るため、-ラクタマーゼ遺伝子(bla)の確認を PCR 法により行った。

菌を滅菌蒸留水に懸濁し、煮沸(100℃, 10 分加熱)した菌液について、Izumiyama ら¹¹⁾の報告した bla をコードする塩基配列を基に作成したプライマー(5'-ATGAGTATTCAACATTTTCG-3', 5'-TTACC AATGCTTAATCAGTG-3')を用い、(94℃, 1 分, 55℃, 1 分, 72℃, 1 分, 25 サイクル)の温度条件で増幅した。泳動は 0.5×TBE(ニッポンジーン)下、2% SeaKem[®] GTG[®] agarose で 100V、40 分間行い、0.5 μg/ml エチジウムブロマイドで染色し紫外線照射下で写真撮影を行い、増幅産物を確認した。

*：現 社会局保健部食品保健課

表 1 1994～2004 年に本市で分離された *S. Enteritidis* の薬剤耐性パターン

耐性パターン	年次別分離株数											計
	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	
感受性	15	40	63	151	237	173	36	23	70	61	33	902
SM	20	20	23	19	31	29	4	7	4	0	1	158
ABPC	0	1	2	1	9	4	2	7	47	209	24	306
TC	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	4
KM	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NA	0	0	1	0	1	3	2	0	1	6	3	17
SM,TC	6	34	0	32	1	4	0	0	0	0	0	77
SM,ABPC	1	0	0	0	0	64	8	51	26	5	1	156
その他	5	0	6	3	2	1	1	0	1	13	1	33
計	47	95	96	209	282	278	53	88	149	294	63	1,654

陽性結果が得られた場合は、電気泳動により分離されたプラスミドバンドをゲルより切り出し、Invisorb Spin Plasmid Mini Kit(Invitex)で抽出精製後、同様の PCR で遺伝子の増幅を行った。

7 インテグロンの PCR 検出およびシーケンス

インテグロンは class1 および class2 インテグロンの存在と組み込み遺伝子の塩基配列について広島大学大学院生物圏科学研究科食品衛生学研究室へ依頼し、検討した。

8 PFGE 解析

国立感染症研究所の示した新プロトコールに準じて行った。すなわち、TSB(DIFCO)で一晩静置培養した菌液 200 μ l の遠心沈渣を滅菌蒸留水 200 μ l に懸濁させ、等量の 1% SeaKem^R Gold agarose を加え、プラグキャスターを用いて 0.7mm 厚のプラグを作成した。

固化したプラグを、1ml の 1mg/ml Proteinase K 1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA(pH8.0)溶液に移し、50℃で 4 時間処理を行ったのちプラグをカットし 500 μ l の 4mM Pefabloc SC in TE に移し、50℃, 30 分間の洗浄を 2 回行った。1ml の TE , 次いで 200 μ l の制限酵素 buffer で氷上 30 分間平衡化したのち、制限酵素 Bln I(30U/sample)による処理を 37℃で 18 時間行った。電気泳動は GenePath (Bio-Rad)を使用し、泳動は 2.2～63.8sec ,6V/cm で 20 時間行った。ゲルは 1% SeaKem^R Gold agarose , Buffer は 12 に設定した 0.5×TBE を使用した。泳動後、0.5 μ g/ml エチジウムブロマイドで染色し紫外線照射下で写真撮影を行った。

また、これらの株の類似度を比較するために、得られた画像を基に画像解析ソフト Fingerprinting (Bio-Rad)により、類似性係数 dice、系統樹解析

として UPGMA 法によりクラスター解析を行った。

結 果

1 *S. Enteritidis* の分離状況および薬剤耐性

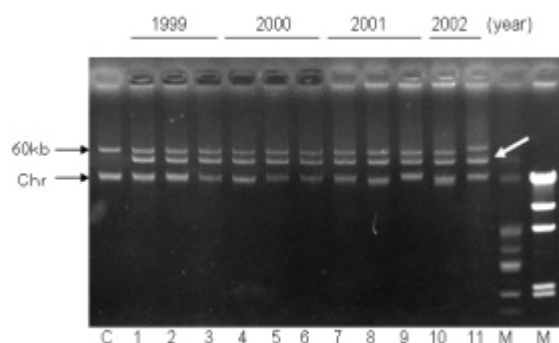
1994 年から 2004 年までに本市で分離され、薬剤感受性試験に供試した *S. Enteritidis* 1654 株の試験結果を表 1 に示した。*S. Enteritidis* の分離状況は、1999 年まで漸増傾向を示した。特に 1997 年から 1999 年にかけては約 200 から 300 株が分離され、それまでの 2 倍から 3 倍の分離株数が認められた。その後 2000 年 2001 年は減少したものの、2002 年、2003 年と再び増加傾向がみられた。

薬剤感受性試験の結果は、6 薬剤すべてに感受性な株が 902 株(54.5%)を占め、最も優勢であった。次いで ABPC 耐性株が 306 株(18.5%)、SM 耐性株が 158 株(9.6%)認められた。ABPC 耐性株は近年急増している。一方、SM 耐性株は、1994 年には 42.6%を占めたが、以後は減少傾向にあり、2003 年には分離されなかった。

4 番目に多く認められたのは、SM・ABPC 2 剤に耐性を示す株で、156 株(9.4%)認められた。この耐性型を示す菌株は 1999 年から優位に分離され始め、以後 2002 年まで優勢な分離が認められ、それ以降も分離されている。

2 SM・ABPC 耐性 *S. Enteritidis* のファージ型別

表 1 に示した SM・ABPC 耐性株のファージ型は、現行のファージに感受性はあるものの既知のファージ溶菌パターンにあてはまらない型別不能(RDNC)な株であった。しかも、それらは同一の溶菌パターンを示した(以下、RDNC-A 型)。



C: 感受性株, 1-3: 1999 年分離株,
4-6: 2000 年分離株, 7-9: 2001 年分離株,
10-11: 2002 年分離株, M: サイズマーカー

図1 SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型 *S. Enteritidis* 株のプラスミドプロファイル

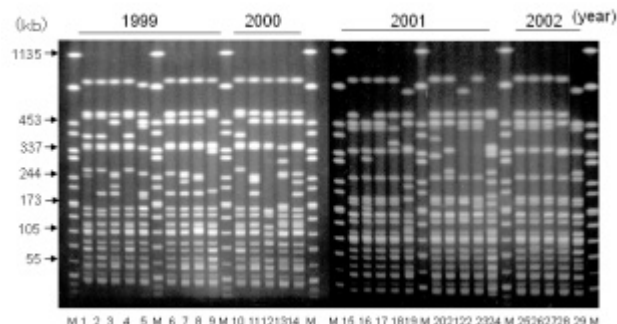
この SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型株は集団事例からも分離されており, 99 年は 5 事例, 2001 年は 4 事例, 2002 年は 2 事例がこの株によるものであった。

3 SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型 *S. Enteritidis* のプラスミドプロファイルおよび bla 遺伝子検索, インテグロン解析

SM・ABPC 耐性, ファージ RDNC-A 型 *S. Enteritidis* 株のプラスミドプロファイルを図 1 に示した。これらの株は, 通常 *S. Enteritidis* が保有する約 60kb に加え, 約 50kb のプラスミドを共通して保有した。PCR 法により, このプラスミドについて bla 遺伝子の有無を確認したところ, いずれの株も増幅が認められ, 約 50kb のプラスミド上に bla 遺伝子が存在することが示された(データ示さず)。また, 全ての株に class2 インテグロンが存在し, シーケンス解析により sat-sat1-aadA1 遺伝子を保有することが示された(データ示さず)。

4 SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型 *S. Enteritidis* の PFGE および系統樹解析

1999 年から 2002 年までの SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型 *S. Enteritidis* 分離株の一部代表株 29 株の PFGE によるパターンを図 2 に示した。これらの 29 株は, 200kb 以下の領域ではいずれの株も類似したパターンを示したが, 200kb 以上の領域においてはさまざまな違いが認められた。これらの泳動像を UPGMA 法により系統樹に表した結果を図 3 に示した。4 年間に分離された SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型 *S. Enteritidis* 代表株は全体とし



1-9: 1999 年分離株, 10-14: 2000 年分離株,
15-24: 2001 年分離株, 25-29: 2002 年分離株,
M: サイズマーカー

図2 SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型 *S. Enteritidis* 株の PFGE プロファイル

類似度(%)

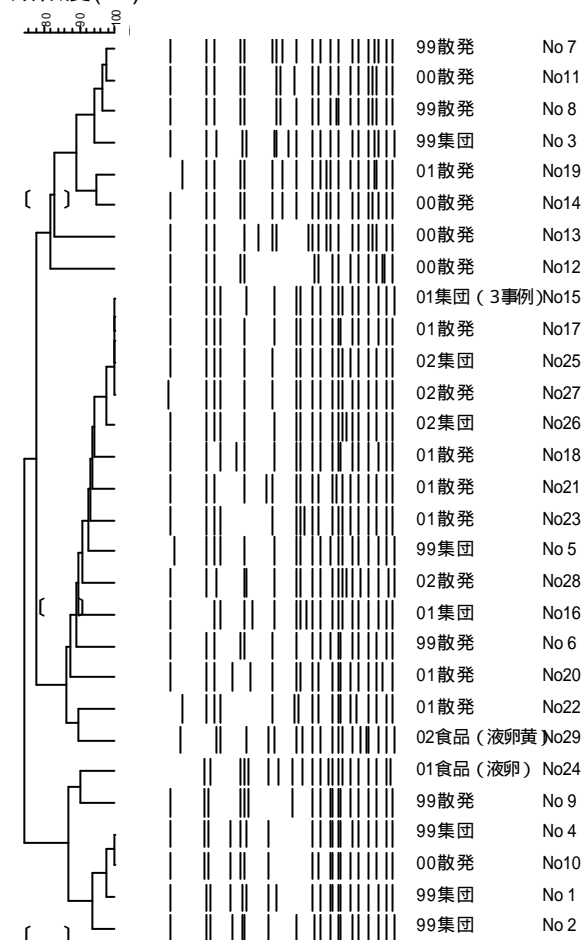


図3 SM・ABPC 耐性, RDNC-A 型株のクラスター解析

て75～100%の相同性を示し、3つのクラスターを形成した。クラスター内は82～98%、は87～100%の類似性を示し、これらには主に1999年および2000年の株が認められた。一方、クラスターは86～100%の類似性を示し、2001年および2002年株と1999年株の一部により構成された。

クラスターの2001および2002年株は、高分子領域において違いをもつ多種の切断パターンがみられたが、一方で同一の切断パターンを示す株も認められた。2001年は、集団4事例のうち7月に連続して発生した3事例の切断パターンが同一のNo.15であり、引き続き2002年にも集団事例No.25および散発事例No.27もこのパターンを示した。ここから2001年以降、この同一PFGE型のS. Enteritidisが集団発生において関与してきたことが認められた。

一方、事件とは関連のない液卵から分離された株であるクラスターのNo.29およびクラスターのNo.24の株と、同じパターンを示すヒト由来株は認められなかった。

謝 辞

ファージ型別を実施していただいた国立感染症研究所細菌第一部の諸先生方、インテグロンの検出およびシーケンス解析を実施していただいた広島大学大学院生物圏科学研究科食品衛生学研究室の島本整先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 国立予防衛生研究所：病原微生物検出情報，14(10)，1～2(1993)
- 2) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報，21(8)，1～2(2000)
- 3) 小沼博隆：卵のサルモネラ汚染とその制御，防菌防黴，30(5)，329～340(2002)
- 4) 相楽裕子：サルモネラ・エンテリティディス感染症．臨床と微生物，25，57～62(1998)
- 5) 橋渡佳子 他：広島市のSalmonella Enteritidisの疫学的検討(1997～1999)．広島市衛生研究所年報，19，74～76(2000)
- 6) 佐々木敏之 他：広島市のSalmonella Enteritidisの疫学的解析(1998～2000)．広島市衛生研究所年報，20，82～84(2001)
- 7) 松根 渉 他：Salmonella Enteritidisによる食中毒事例の細菌学的検討．日食微誌，16，237～243(1999)
- 8) 厚生省監修：微生物検査必携細菌・真菌検査，第3版，D43～D54，日本公衆衛生協会，東京(1987)
- 9) 小栗豊子：ディスク法(拡散法)3．NCCLS ディスク標準法，臨床検査，37，842～846(1993)
- 10) Kado CI et al: Rapid procedure for detection and isolation and small plasmids, J Bacteriol, 145, 1, 365-1, 373(1981)
- 11) Izumiya H: Salmonella enterica Serovar Enteritidis, Japan, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, 19(12), 1650～1651(2003)