

資料

広島県内の散発下痢症患者より分離されたリジン脱炭酸能陰性 *Salmonella* Enteritidisの分子疫学的検討

山田 裕子, 竹田 義弘, 東久保 靖, 高尾 信一, 松尾 健

Molecular Epidemiological Study of Lysine Decarboxylase-Negative *Salmonella* Enteritidis Isolated from Patients with Sporadic Diarrhea in Hiroshima Prefecture

HIROKO YAMADA, YOSHIHIRO TAKEDA,

YASUSHI TOUKUBO, SHINICHI TAKAO and TAKESHI MATSUO

(Received November 7, 2012)

広島県におけるリジン脱炭酸能陰性*Salmonella* Enteritidisの分離状況を把握し、分離された菌株間の疫学的な関連性等を検討するため、県内の散発下痢症患者から分離された菌株を解析した。その結果、2002年から2011年に分離された*Salmonella* Enteritidis 854株のうち56株(6.6%)がリジン脱炭酸能陰性株であり、県内の広い地域から毎年分離されていることが明らかとなった。また、リジン脱炭酸能陰性を示した56株をパルスフィールドゲル電気泳動法により解析したところ、13タイプに型別され、これらのうち5タイプ46株(82.1%)は、90%以上の高い類似度を示したことから、遺伝学的に関連を有する可能性が考えられた。

Key words : サルモネラ属菌, *Salmonella* Enteritidis, リジン脱炭酸能陰性, パルスフィールドゲル電気泳動法

緒 言

サルモネラ属菌は、腹痛、下痢、発熱を主症状とする感染性胃腸炎の起因菌である。また、厚生労働省の食中毒統計[1]において病因物質別事件数、患者数ともに毎年上位に位置しており、代表的な食中毒起因菌である。サルモネラ属菌には2,500以上の血清型があるが、食中毒の原因となるサルモネラ属菌の多くを*Salmonella* Enteritidis (SE) が占めている[2, 3]。また、地研・保健所で分離されたヒト由来サルモネラ検出数では、1989年以来SEが第1位であり[4, 5]、本県においても同様の傾向を示している[6]。

サルモネラ属菌の同定において、リジン脱炭酸能(LDC)は鑑別に重要な生化学的性状の一つであり、通常は陽性を示す。ところが、近年、サルモネラ属菌において例外的な生化学的性状であるLDC陰性を示すSEの増加が山口県や長崎県で報告されており[7-9]、これらを原因とする集団食中毒事例も発生している[10, 11]。しかし、これまでに全国的なLDC陰性SEの疫学調査は実施されておらず、検出が報告されているのは西日本の一部地域のみである。そこで、本県におけるLDC陰性SEの分離状況を把握するとともに、菌株間の疫学的な関連性等を検討するため、県内の散発下痢症患者から分離され

た菌株を解析したので報告する。

材料および方法

1 供試菌株

2002年4月から2011年3月までに県内の医療・検査機関(2002年4月から2006年3月までは10ヶ所、2006年4月以降15ヶ所)から分与された散発下痢症患者由来サルモネラ属菌のうち、SEと同定された854株を用いた。

2 LDC試験

供試菌株すべてについて、LIM培地(日水製薬)を用いて検査した。

3 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法

菌体の包埋、溶菌処理および制限酵素処理は、国立感染症研究所の方法[12]に準拠した。制限酵素は*Bln* I (TaKaRa)を用い、電気泳動はBIO-RAD CHEF MAPPER (BioRad)を用いて6 V/cm、パルスタイム2.16-63.8秒、14℃の条件で19時間行った。PFGEパターン解析にはFingerprinting II (BioRad)を用いた。

結 果

1 広島県内の散発下痢症患者由来LDC陰性SEの分離状況

2002年から2011年に県内の医療・検査機関で分離されたSEについて、LDCを検査したところ、854株のうち56株(6.6%)が陰性を示した。年次別のLDC陰性株の分離状況を表1に示した。2002年から2011年までLDC陰性SEが毎年分離されていた。年次ごとのSE供試株数に差はあるが、LDC陰性株の占める割合は2.4%から20.8%であり、2005年、2008年、2009年および2011年は10%以上で、2009年は20%を超えていた。しかし、本県では、LDC陰性株の増加傾向は認められなかった。

また、県内を東部、西部、北部の3つの地域に分け、菌株が分離された医療・検査機関の所在する地域別の分離状況を表2に示した。地域ごとのSE供試株数に差はあるが、LDC陰性株の分離割合は2.4%から8.3%で、県内3地域すべてから分離されていた。

表1 広島県内の散発下痢症患者由来リジン脱炭酸能(LDC)陰性*Salmonella* Enteritidisの分離状況(年次別)

| 年 | 供試株数 | LDC陰性株数 | LDC陰性株の割合(%) |
|------|------|---------|--------------|
| 2002 | 179 | 7 | 3.9 |
| 2003 | 229 | 11 | 4.8 |
| 2004 | 152 | 6 | 3.9 |
| 2005 | 55 | 9 | 16.4 |
| 2006 | 29 | 2 | 6.9 |
| 2007 | 69 | 4 | 5.8 |
| 2008 | 49 | 8 | 16.3 |
| 2009 | 24 | 5 | 20.8 |
| 2010 | 41 | 1 | 2.4 |
| 2011 | 27 | 3 | 11.1 |
| 計 | 854 | 56 | 6.6 |

表2 広島県内の散発下痢症患者由来リジン脱炭酸能(LDC)陰性*Salmonella* Enteritidisの分離状況(地域別)

| 地域 | 供試株数 | LDC陰性株数 | LDC陰性株の割合(%) |
|----|------|---------|--------------|
| 東部 | 254 | 21 | 8.3 |
| 西部 | 558 | 34 | 6.1 |
| 北部 | 42 | 1 | 2.4 |
| 計 | 854 | 56 | 6.6 |

2 PFGE法によるLDC陰性SEの解析

LDC陰性を示したSE56株について、*Bln* Iを用いたPFGE法による解析を行った。各菌株のPFGEパターンを

図1、年次別の解析結果を表3、地域別の解析結果を表4に示した。SE56株は13タイプに型別され、B型が最も多く23株(41.1%)を占め、次いでD型が17株(30.4%)であった。上位を占めたB型とD型のPFGEパターンは1バンドのみ異なっていた。また、型別された13タイプのうち、A～Eの5タイプ46株のPFGEパターンは90%以上の高い類似度を示した。年次別にみると、B型は毎年、D型は2006年、2007年および2010年を除いて分離されており、年次ごとに特定の型の流行等は認められなかった。地域別では、東部地域はD型が21株中9株(42.9%)で最も多く、次いでB型が6株(28.6%)であり、西部地域はB型が34株中17株(50.0%)で最も多く、次いでD型が7株(20.6%)であり、北部地域の1株はD型であった。

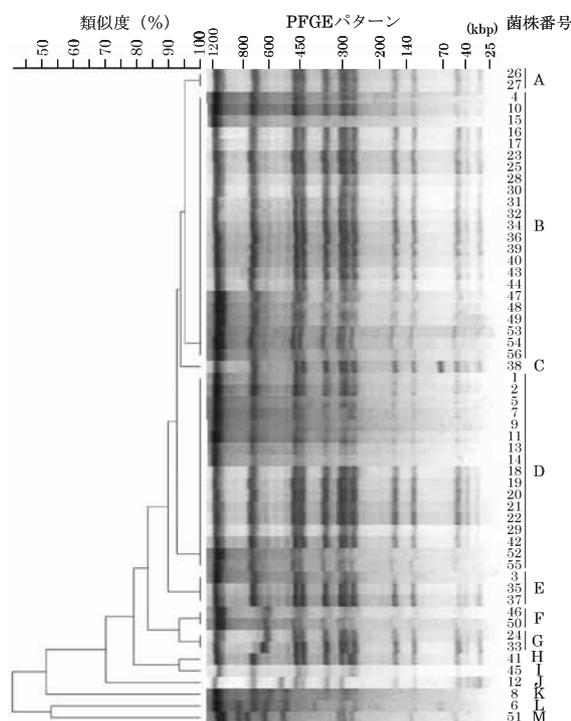


図1 リジン脱炭酸能陰性*Salmonella* Enteritidisのパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)パターン。菌株番号は、分離された順に1～56とした。

考 察

わが国におけるサルモネラ属菌に起因する食中毒は、SEの減少に伴い、事件数、患者数ともに2000年以降減少傾向を示し[3]、地研・保健所からのサルモネラ検出報告数も、サルモネラ食中毒の減少とともに減少している[4]。これらは、1998年の食品衛生法施行規則の一部改正、ガイドラインの策定など、鶏卵のSE食中毒予防対策によるものと考えられる。本県における散発下痢症患者からのSEの分離数も2005年以降急激に減少したが、依

表3 広島県内の散発下痢症患者由来リジン脱炭酸 (LDC) 能陰性*Salmonella* Enteritidisのパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析結果 (年次別)

| 年 | PFGEタイプ (株数) | | | | | | | | | | | | | 計 |
|------|--------------|----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | |
| 2002 | | 1 | | 4 | 1 | | | | | | | 1 | | 7 |
| 2003 | | 4 | | 5 | | | | | | 1 | 1 | | | 11 |
| 2004 | | 1 | | 4 | | | 1 | | | | | | | 6 |
| 2005 | 2 | 5 | | 1 | | | 1 | | | | | | | 9 |
| 2006 | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | 2 |
| 2007 | | 2 | 1 | | 1 | | | | | | | | | 4 |
| 2008 | | 4 | | 1 | | 1 | | 1 | 1 | | | | | 8 |
| 2009 | | 2 | | 1 | | 1 | | | | | | | 1 | 5 |
| 2010 | | 1 | | | | | | | | | | | | 1 |
| 2011 | | 2 | | 1 | | | | | | | | | | 3 |
| 計 | 2 | 23 | 1 | 17 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 56 |

表4 広島県内の散発下痢症患者由来リジン脱炭酸能 (LDC) 陰性*Salmonella* Enteritidisのパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析結果 (地域別)

| 地域 | PFGEタイプ (株数) | | | | | | | | | | | | | 計 |
|----|--------------|----|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | |
| 東部 | 2 | 6 | 1 | 9 | 1 | | 1 | | | | | | 1 | 21 |
| 西部 | | 17 | | 7 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 34 |
| 北部 | | | | 1 | | | | | | | | | | 1 |
| 計 | 2 | 23 | 1 | 17 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 56 |

然として最も多い血清型であり [6], 予防対策が必要である。

一方, 近年, 例外的な生化学的性状であるLDC陰性を示すSEの検出が西日本で報告されている [7-11]. 特に, 本県に隣接する山口県では, 2003年にLDC陰性SEによる食中毒事例が多発し, その後, 2004年から2009年まで, 山口県内感染のSEによる食中毒事例のすべてをLDC陰性株が占めている。また, 2003年を境に, 医療機関由来株においてもLDC陰性株が優勢に転じたことが報告されている [7].

本研究では, 広島県におけるLDC陰性SEの分離状況を把握するとともに, 菌株間の疫学的な関連性等を検討するため, 2002年から2011年に県内の散発下痢症患者から分離された菌株を解析した。その結果, 県内で分離されたSEのうち6.6%がLDC陰性を示し, 県内3地域すべてから毎年継続的に分離されていた。このことから, LDC陰性のSEが県内に広く分布していることが明らかとなった。本県では山口県のようなLDC陰性SEの急激な増加は認められなかったが, 20%を超える割合で分離された年もあったことから, 今後の動向を注視する必要がある。また, LDCはサルモネラ属菌の同定に重要な生化学的性状の一つであり, 典型的な性状でない陰性株は誤同定される可能性があるため, その他の性状等も併せて, 慎重に検査をする必要がある。

PFGE法によるLDC陰性SE56株の解析を行ったとこ

ろ, 13タイプに型別された。年次別や地域別に特徴的な傾向等は認められず, B型とD型の株が, ほぼ毎年分離されており, これらは全体の70%以上を占めた。地域別でも, B型とD型の分離割合が高かった。B型とD型はPFGEパターンが1バンド違いであり, 画像解析により90%以上の高い類似度を示した。Tenoverらの基準 [13]によると, PFGEパターンの3バンド以内の違いは密接に関連しているとされている。これらの菌株については, 感染経路等の詳細な疫学情報は不明であるが, 遺伝学的に関連している可能性がある。また, 型別された13タイプのうち, 5タイプ46株 (82.1%) は, PFGEにおいて90%以上の高い類似度を示しており, 分離されたLDC陰性SEの多くが, 遺伝学的に関連を有する可能性が考えられた。さらに, B型とD型は他県で分離されたLDC陰性SEのPFGEパターンと類似しており [14], 遺伝学的に近縁のLDC陰性SEが広域に分布している可能性が考えられた。

LDC陰性化のメカニズムの一つは, LDCの活性に関与している*CadC*遺伝子の1塩基欠失によりフレームシフトが生じ, 活性の消失が起こるためであることが報告されている [14], LDC陰性SEの感染経路や山口県においてLDC陰性株が優勢に転じた理由等は明らかにされていない。また, *CadC*遺伝子の1塩基欠失が認められず, 由来が異なることが推察されるLDC陰性SEも検出されている [8, 14]. 現時点では, LDC陰性SEの病原性等は

明らかにされていないが、典型的な性状を示すSEと同様に感染症や食中毒の原因菌として予防対策が必要である。感染経路の究明や感染拡大防止のため、今後も本県におけるLDC陰性SEの動向を注視するとともに、食品由来株との比較等も含め、広域的なLDC陰性SEの調査が必要であると考えらる。

謝 辞

本研究のため、貴重な菌株を提供していただいた県立広島病院、広島市立舟入病院、社団法人広島市医師会臨床検査センター、JA広島厚生連広島総合病院、マツダ株式会社マツダ病院、呉市医師会病院臨床検査センター、国家公務員共済組合連合会呉共済病院、三原市医師会病院、総合病院三原赤十字病院、尾道市立市民病院、独立行政法人国立病院機構福山医療センター、社団法人福山市医師会臨床検査センター、市立三次中央病院、三次地区医師会臨床検査センター、総合病院庄原赤十字病院の諸先生方に深謝致します。

文 献

- [1] 厚生労働省, 食中毒統計資料, [Internet], [cited 2011 Sep 14]. Available from: <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- [2] 山口真澄, 泉谷秀昌. *Salmonella*. 仲西寿男, 丸山務監修. 食品由来感染症と食品微生物. 中央法規出版; 2009. p.154-191.
- [3] 厚生労働省医薬食品局食品安全部 監視安全課・食中毒被害情報管理室. サルモネラ食中毒の現状と対策について. 病原微生物検出情報. 2009;30:206-207.
- [4] 国立感染症研究所. サルモネラ症 2009年6月現在. 病原微生物検出情報. 2009;30(8):203-204.
- [5] 病原微生物検出情報, 最新の細菌検出状況・グラフ1 (地研・保健所からの報告) [Internet], [cited 2011 Sep 14]. Available from: <https://nesid3g.mhlw.go.jp/Byogentai/Pdf/data48j.pdf>
- [6] 竹田義弘, 福田伸治. 広島県における散发下痢症患者由来サルモネラ属菌の分離状況 (2002年4月

～2010年12月). 広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告. 2011;19:7-14

- [7] 矢端順子, 亀山光博, 富永潔, 富田正章. 平成14年度～平成22年度の山口県における *Salmonella* Enteritidisによる食中毒の発生動向. 山口県環境保健センター所報. 2010;53:45-48.
- [8] Yamasaki S, Hara K, Izumiya H, Watanabe H, Misawa N, Okamoto K, Takase K. Lysine Decarboxylase-Negative *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis: Antibiotic Susceptibility, Phage and PFGE Typing. J Vet Med Sci. 2007;69(8):813-818.
- [9] 富永潔, 工藤恵美, 富田正章, 松村健道, 矢端順子. 山口県における医療機関および食中毒事例由来 *Salmonella* の血清型ならびに生化学的性状とフェージ型の変化. 病原微生物検出情報. 2005;26(4):93-94.
- [10] 山野親逸, 辻尚信, 竹上修平, 原田保, 伊藤千恵, 小石智和, 丸岡捷治. リジン脱炭酸試験陰性の *Salmonella* Enteritidisによる集団食中毒事例ー京都市. 病原微生物検出情報. 2004;25(6):154-155.
- [11] 石村勝之, 児玉実, 笠間良雄, 山岡弘二, 荻野武雄. リジン脱炭酸陰性の *Salmonella* Enteritidisによる食中毒事例ー広島市. 病原微生物検出情報. 1997;18(12).
- [12] 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 三戸部治郎. 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15年度総括・分担研究報告書 (厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業); 2004. p.10-21.
- [13] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233-2239.
- [14] Morita M, Mori K, Tominaga K, Terajima J, Hirose K, Watanabe H, Izumiya H. Characterization of lysine decarboxylase-negative strains of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis disseminated in Japan. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;46:381-385.