

資 料

広島県内で発生したコアグラゼIV型 *Staphylococcus aureus* による食中毒事例について

竹田 義弘 福田 伸治 門田 達尚

An Outbreak of Food Poisoning Caused by *Staphylococcus aureus* of Coagulase Type IV in Hiroshima Prefecture

Yoshihiro Takeda, Shinji Fukuda and Tatsuhisa Monden

(Received Sept. 29, 1995)

I はじめに

食中毒事件の病因物質のなかで *Staphylococcus aureus* (以下, *S. aureus* と略す.) は, サルモネラや腸炎ビブリオと同様常に上位を占めている. しかし, 原因菌となった *S. aureus* のコアグラゼ型 (以下, コ型と略す.) のなかでコIV型菌による食中毒事件は非常に珍しく, 国内では品川ら [1] が1974年に大阪で発生したにぎりめしによるコIV型 *S. aureus* 食中毒事例を初めて報告して以来, 若干見られる [2-5] のみである.

今回, 県内でコIV型 *S. aureus* による食中毒事件が発生したので, その概要を述べるとともに, 分離した菌株のエンテロトキシン型 (以下, Ent型と略す.), 生化学的性状, 生物型, 薬剤感受性, プラスミドプロファイルおよびRandom amplified polymorphic DNA (以下, RAPDと略す.) プロファイルについて検討したので, その成績を報告する.

II 事件の概要

1995年8月2日, 三原保健所尾道支所に, 尾道市内の高等学校から合宿中の生徒が食中毒様の症状を呈している旨の連絡があった.

1. 患者の発生状況

同支所の疫学調査により, 校内のセミナーハウスで生徒ら14名が合宿を行っており, このうち6名が8月1日午後10時30分頃から嘔吐, 腹痛等の症状を訴え, 市内の病院に受診し, うち1名が入院していることが判明した.

2. 主要症状

患者の主な症状は, 嘔吐6名 (発現率100%), 下痢

4名 (66.7%), 腹痛4名 (66.7%), 発熱3名 (50.0%) で, 嘔吐の回数は2~十数回, 腹痛部位はへその上部からへそのまわり, 下痢の回数は1~3回, 発熱は37~38.4℃であった.

3. 原因食品の推定

症状を訴えている生徒の共通した食事は, 生徒が購入した食材を自ら調理したものに限られていた. なお, 生徒らが喫食したものは, 朝食にサンドイッチ, コーンクリームシチュー, 焼きウインナー, フルーツゼリー, マカロニサラダ. 昼食におにぎり, 冷やしうどん. 夕食にバーベキュー, おにぎり, スイカであった. 特に, 夕食 (午後6時頃) のおにぎりは昼食時に作ったものを常温で放置していたもので, 発症者全員が喫食していたことから原因食品として最も疑われたが, 調査時には残っていなかった.

III 材料および方法

1. 材料

キャリーブレイ培地で搬送された患者便6検体と無症状の喫食者 (以下, 無症者と略す.) 便7検体および食材の残品など9検体 (肉3検体, スイカ1検体, 水2検体, うどんのだし1検体, 麦茶1検体, 氷1検体) の合計22検体であった.

2. 方法

1) 細菌検査

サルモネラや腸炎ビブリオなど既知食中毒起因菌13菌種の検索は, 常法 [6] に従った.

2) *S. aureus* の同定

*S.aureus*の同定は、常法 [6] に従った。

3) コ型別

ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清 (デンカ生研) を用い、潮田らの方法 [7] に準じて行なった。

4) Ent型別

Ent産生にはBrain Heart Infusion broth (Difco) を用い、37℃で24時間振盪培養した。Ent産生能および型別は、逆受身ラテックス凝集反応によるブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット (デンカ生研) を用いた。

5) 生化学的性状試験

フィブリノリジン産生能、色素産生能、ヒトおよびウシ血漿凝固能、 α および β 溶血素産生能、クリスタル紫 (以下、CVと略す。) 加寒天平板上の増殖型試験をHájekの方法 [8] に準じて行なった。なお、ヒトおよびウシ血漿は自家調整したものを用いた。

6) 薬剤感受性試験

Sensi-Disk (BBL) を用い、一濃度ディスク法によって試験した。薬剤にはペニシリン (P10)、メチシリン (DP5)、ゲンタマイシン (GM10)、ノボピオシン (NB30)、セファロチン (CF30)、コリスチン (CL10)、ストレプトマイシン (S10)、エリスロマイシン (E15)、ナリジクス酸 (NA30)、クロラムフェニコール (C30)、テトラサイクリン (Te30) の11種類を使用した。判定は仕様書に従った。

7) プラスミドプロファイル

グリシン (和光) を0.05%加えたLプロス培地 [9] 5 mlに菌株を接種して37℃、24時間振盪培養後、マイクロチューブに1.5ml分取して遠心 (12,000rpm, 5分間) し、沈査にPlasmid Mini Prep Kit (和光) のSolution I 100 μ lと1mg/mlリソスタフィン (シグマ) を10 μ l添加して混和し37℃に30~60分間放置した。次いで10mg/mlリゾチーム (シグマ) を10 μ l添加して混和し4℃に30分間放置し、その後はPlasmid Mini Prep Kitのプロトコールに従ってプラスミドを抽出した。

抽出したプラスミドはTAE Bufferで調製した0.7%ゲルでMupid-2電気泳動装置 (コスモ・バイオ) を用い100V、30分間電気泳動後、ゲルをEthidium bromide (0.5 μ g/ml) で染色し、トランスイルミネーターで紫外線を照射して写真撮影した。

8) RAPDプロファイル

Williamsら [10] の報告したRAPD法により染色体DNAパターンをみた。染色体DNAはセバジーン (三光純薬) を用いて抽出した。プライマーにはTakara Amplification Kit (宝酒造) のControl primer# 2を用いた。反応液組成は滅菌蒸留水19 μ l、プライマー1 μ l、10×Buffer 3 μ l、dNTPmix2.5 μ l、耐熱性TagDNAポリメラーゼ (0.5u/ μ l) 1.5 μ l、エテンペレートDNA 3 μ l

とし、遺伝子増幅条件はLawrenceら [11] の条件に準じた。増幅後DNAはTBE Bufferで調製した1.0%ゲルでBP-550電気泳動装置 (バイオクラフト) を用い100V、1.5時間電気泳動後、ゲルをEthidium bromide (0.5 μ g/ml) で染色し、トランスイルミネーターで紫外線を照射して写真撮影した。なお、サーマルサイクラーにはPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700 (アステック) を用いた。

IV 結果および考察

1. 細菌検査

細菌検査を実施した糞便、食材などのうち糞便13検体中7検体 (53.8%) から*S.aureus*を検出した以外には、他の食中毒起因菌は検出しなかった。

*S.aureus*を検出した糞便の内訳は、患者便6検体中3検体 (50.0%) と無症者便7検体中4検体 (57.1%) からであった。

2. *S.aureus*の型別

分離した*S.aureus*のコ型とEnt産生能を調べたところ、コ型にはIV型とV型の2タイプが認められた。コIV型株は7検体中4検体 (57.1%) から分離された。その内訳は、患者便3検体のすべてと、無症者便4検体中1検体からであった。他の3検体はすべてコV型であった。また、コIV型株はすべてA型のEntを産生した。このEnt型はこれまで報告されているコIV型事例 [1-5] のものと同一型であった。一方、コV型株はいずれもEntを産生しなかった。この2タイプのコ型とEnt産生性について善養寺 [12, 16]、増子 [13]、平崎 [14]、平沢 [15]、後藤 [17]、野村 [18]、寺山 [19, 23]、金子 [20]、今野 [21]、谷口 [22] らの報告をみると、食品や調理器具、健康人、病的材料などから検出した*S.aureus*のコ型はI~VIII型のいずれかに型別され、また、コ型とEnt産生性には特定の関係は認められていない。しかし、食中毒事件から検出した*S.aureus*のコ型はII, III, VI, VII型にほぼ限定され、最近ではコVII型菌による食中毒に増加傾向がみられる [24] など、食中毒の原因菌となった*S.aureus*のコ型は特定の型に偏る傾向がみられている。そのため、本事例から分離した*S.aureus*のコ型は非常に珍しい型であった。

3. 生化学的性状

分離した菌株の生化学的性状成績を表1に示した。フィブリノリジン産生能、色素産生能、ヒト血漿凝固能、 α および β 溶血素産生能はコIV, V型株ともすべて同一性状であった。また、ウシ血漿凝固能はコV型

表1 生化学的性状と生物型

性 状	S. aureus株*						
	1	2	3	4	5	6	7
コアグラゼ型	IV	IV	V	V	V	IV	IV
エンテロトキシン型	A	A	—	—	—	A	A
フィブリノリジン産生	+	+	+	+	+	+	+
色素産生	+	+	+	+	+	+	+
ヒト血漿凝固性	+	+	+	+	+	+	+
ウシ血漿凝固性	—	—	—	+	—	—	—
α -溶血素	+	+	+	+	+	+	+
β -溶血素	—	—	—	—	—	—	—
クリスタル紫加寒天平板上の増殖型	+	+	—	—	—	+	+
生 物 型**	U	U	A	G	A	U	U

備考 *) 1, 2, 7: 患者便由来株 3, 4, 5, 6: 無症者便由来株

***) U: Untypable (型別不能)

表2 薬剤感受性

薬 剤 名	S. aureus株*						
	1	2	3	4	5	6	7
ペニシリン	R	R	S	R	R	R	R**
メチシリン	S	S	S	S	S	S	S
セファロチン	S	S	S	S	S	S	S
ゲンタマイシン	S	S	S	S	S	S	S
ストレプトマイシン	I	I	I	I	I	I	I
エリスロマイシン	I	I	I	I	I	I	I
コリスチン	R	R	R	R	R	R	R
テトラサイクリン	S	S	S	S	S	S	S
ノボピオシン	S	S	S	S	S	S	S
クロラムフェニコール	S	S	S	S	S	S	S
ナリジクス酸	R	R	R	R	I	R	R

備考 *) 1, 2, 6, 7: コIV型株 3, 4, 5: コV型株

***) S: 感受性 I: 中間 R: 耐性

株のうち1株が陽性を示したが、それ以外はすべて陰性でコIV、V型株の性状は類似していた。しかし、CV加寒天平板上の増殖型はコIV型株がすべてPositive typeであったのに対し、コV型株はすべてNegative typeで明確に性状が相違していた。

4. 生物型

*S. aureus*の性状は保有動物種によって特徴がみられ、Hájek and Maršálek [25] は、生化学的性状とファージ型別によってA～Fの6生物型に分類している。また、清水 [26, 27] は、その分類に生物型AとCの中間的性状を示す、新しい生物型Gを加えて7生物型に分類している。この生物型と保有動物種とは、次の関係がみられている。生物型Aはヒト、B型はニワトリ、ブタ、C型はウシ、ヒツジ、D型は野ウサギ、E型はイ

ヌ、ウマ、ミンク、F型はハト、キツネ、そしてG型は人家ネズミなどげっ歯類に優勢的に分布している。本事例では、原因食品と推定された食品が調査時に無く、また、細菌検査を実施した食材などからは*S. aureus*が分離されず、原因食品の特定ができなかった。そのため、今回分離した*S. aureus*の生物型をファージ型別を除いた性状で型別し、汚染源を推定してみた。しかし、コIV型株は表1に示すようにいずれの生物型にも合致せず型別不能 (Untypable) で、汚染源となった動物種は推定できなかった。一方、コV型株は生物型AとG型に型別された。

5. 薬剤感受性

分離した菌株の薬剤感受性成績を表2に示した。コIV型株はいずれもペニシリン、コリスチンおよびナリ

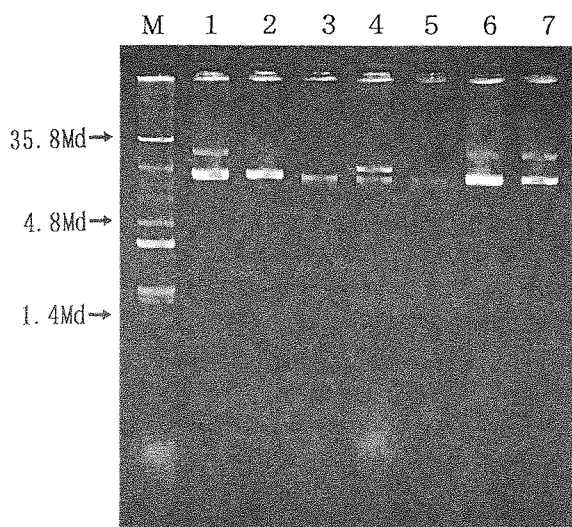


図1 プラスミドプロファイル
Lanes 1, 2, 6, 7: コIV型株
Lanes 3, 4, 5: コV型株
M: *E. coli* V517
Md: megadalton

ジクス酸に耐性を示した。一方、コV型株にはペニシリンとナリジクス酸に感受性を示すものが認められたが、その他の薬剤にはすべてコIV型株と同じ感受性を示した。そのため、薬剤感受性パターンではコIV型株の同一性は判断できなかった。

6. プラスミドプロファイルとRAPDプロファイル

分離した菌株のプラスミドプロファイルを図1に示した。泳動パターンは3グループに型別された。コIV型株のプロファイルはすべて共通のパターンを示した。一方、コV型株のプロファイルは2つのパターンに分かれたが、いずれもコIV型株とは相違していた。

次いで、RAPDプロファイルを図2に示した。泳動パターンは4グループに型別された。コIV型株のプロファイルはすべて共通のパターンを示した。一方、コV型株のプロファイルはすべてパターンが異なり、いずれもコIV型株とは相違していた。そのため、コIV型株は単一クローンに由来すると推察された。また、今回実施した生化学的性状試験、コ型別試験、薬剤感受性試験のような従来からの細菌学的疫学マーカーよりも、分離株の同一性についてより信頼性の高い疫学的解析ができたことから、両プロファイルとも食中毒の病因物質の検索には、極めて有用な分子生物学的疫学マーカーになると考えられた。

以上の事から、本事件の病因物質は、疫学調査による患者の主症状も、鈴木 [28] が報告している

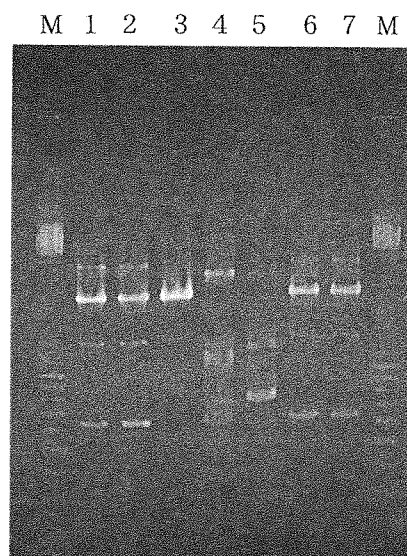


図2 RAPDプロファイル
Lanes 1, 2, 6, 7: コIV型株
Lanes 3, 4, 5: コV型株
M: 100-Base-Pair Ladder

*S. aureus*による典型的事例とほぼ一致することから、コIV型EntA型*S. aureus*と断定した。また、同型菌による食中毒事件は県内において初めてであった。

V まとめ

1995年8月に尾道市内の高等学校で、県内において初めての、国内での事例報告も少ないコIV型*S. aureus*による食中毒事件が発生した。その検査成績は以下のとおりであった。

1. 患者および無症者便13検体と食材の残品など9検体の細菌検査の結果、糞便7検体（患者便3検体、無症者便4検体）から*S. aureus*を検出した以外には、他の食中毒起因菌は検出されなかった。
2. 分離した*S. aureus*のコ型は7検体中4検体（57.1%：患者便3検体、無症者便1検体）がコIV型であった。他はすべてコV型であった。また、コIV型株はすべてA型のEntを産生したが、コV型株はいずれもEntを産生しなかった。
3. コIV、V型株の生化学的性状は類似していたが、CV加寒天平板上の増殖型はコIV型株がすべてPositive typeであったのに対し、コV型株はすべてNegative typeと明確に性状が相違していた。
4. コIV型株の生物型は型別不能（Untypable）で、汚染源となった動物種の推定はできなかった。一方、コV型株は生物型AとG型に型別された。

5. コIV, V型株の薬剤感受性は類似し, 感受性パターンではコIV型株の同一性は判断できなかった.
6. コIV型株のプラスミドプロファイルとRAPDプロファイルはそれぞれすべて一致していた. また, コV型株のプロファイルとは明確にパターンが相違していた. そのため, コIV型株は単一クローンに由来すると推察された.

また, 従来からの細菌学的疫学マーカーよりも分離株の同一性についてより信頼性の高い疫学的解析ができたことから, 両プロファイルとも食中毒における病因物質の検索には極めて有用な分子生物学的疫学マーカーになると考えられた.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 疫学データの収集についてご協力をいただいた福祉保健部環境衛生課食品衛生係, 三原保健所尾道支所環境課食品衛生係の方々には深謝いたします.

文 献

- [1] 品川邦汎, 中原正良, 国田信治 (1975) : コアグラゼタイプIV型によるブドウ球菌食中毒例について. 大阪府立公衛研所報食品衛生編, 6, 13-16.
- [2] 中藺加奈, 安形則雄, 森正司, 金田誠一 (1988) : コアグラゼタイプIV型によるブドウ球菌食中毒例について. 名古屋市衛研所報, 34, 88-90.
- [3] 加野成明, 坂田和歌子, 杉嶋伸祿 (1992) : ブドウ球菌コアグラゼIV型による食中毒. 食衛誌, 33, 5, 482-483.
- [4] 潮田弘, 橋本由美, 平井昭彦, 柳川義勢, 楠淳, 甲斐明美, 新垣正夫, 門間千枝, 尾畑浩魁, 太田建兩 (1993) : コアグラゼIV型黄色ブドウ球菌による食中毒事例. 第14回食品微生物学会 学術総会講演要旨集, 56.
- [5] 松崎静枝, 富田正章, 片山淳, 遠藤隆二, 宮村恵宣 (1994) : コアグラゼIV型黄色ブドウ球菌による食中毒. 日食微誌, 11, 2, 137-139.
- [6] 厚生省生活衛生局監修 (1990) : 食品衛生検査指針微生物編. (社)日本食品衛生協会, 東京.
- [7] 潮田弘, 寺山武, 坂井千三, 善養寺浩 (1975) : 黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別簡易法とその応用. 東京衛研年報, 26, 1-6.
- [8] Hájek V. (1976) : *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. Int. J. Syst. Bacteriol., 26, 4, 401-408.
- [9] 中谷林太郎他 (1986) : Rプラスミドの分子遺伝学的実験法. 日本細菌学会教育委員会編, 74-75, 菜根出版, 東京.
- [10] Williams, J. G., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers, Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.
- [11] Lawrence, L. M., Harvey, J. and Gilmore, A. (1993) : Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*, Appl. Environ. Microbiol., 59, 3117-3119.
- [12] 善養寺浩, 寺山武, 潮田弘, 五十嵐英夫, 丸山務 (1971) : ブドウ球菌食中毒に関する研究 (第2報) 食品, 調理器具等および健康人における黄色ブドウ球菌の分布とそのコアグラゼ型について. 食衛誌, 12, 6, 501-505.
- [13] 増子光子, 小黒美舎子, 大友真弓, 今野純夫, 大堀均, 角田行 (1988) : 各種食品からの黄色ブドウ球菌検出状況および分離菌株のコアグラゼ型とエンテロトキシン産生性について. 仙台市衛研所報, 18, 92-96.
- [14] 平崎和孝, 石村勝之, 木戸照明, 佐伯幸三, 河本秀一, 岡新, 荻野武雄 (1989) : 各種食品における黄色ブドウ球菌の検出状況と分離株のコアグラゼ型およびエンテロトキシン型について. 広島市衛研年報, 8, 48-50.
- [15] 平沢恭子, 小黒祐子, 広瀬昌子, 樋口博, 小柳潔, 内堀会津子, 増子栄子 (1985) : 各種材料より分離された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型とエンテロトキシン産生性について. 福島県衛公研所年報, 3, 46-49.
- [16] 善養寺浩, 寺山武, 潮田弘, 五十嵐英夫, 丸山務, 坂井千三 (1971) : ブドウ球菌食中毒に関する研究 (第1報) 東京都において発生した本食中毒の原因食品の種類と原因菌のコアグラゼ型について. 食衛誌, 12, 4, 311-314.
- [17] 後藤喜一, 山田不二造 (1973) : ブドウ球菌食中毒ならびにブドウ球菌感染症から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型について. 岐衛研所報, 18, 7-10.
- [18] 野村寛, 森正司, 山内善博, 本多忠善, 川口とみ子 (1975) : ブドウ球菌食中毒株および各種食品由来株における黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型別について. 名古屋市衛研所報, 22, 17-19.
- [19] 寺山武, 潮田弘, 新垣正夫, 稲葉美佐子, 甲斐

- 明美, 坂井千三 (1977) : 最近10年間に東京都で発生したブドウ球菌食中毒原因菌のコアグララーゼ型と原因食品. 東京衛研年報, 28-1, 1-4.
- [20] 金子通治 (1978) : 1971年から1978年に山形県で分離されたブドウ球菌のコアグララーゼ型について. 山梨県衛公研所年報, 22, 37-39.
- [21] 今野純夫, 増子光子, 角田行 (1979) : 昭和54年度に分離せるブドウ球菌のコアグララーゼ型別について. 仙台市衛試所報, 9, 45-46.
- [22] 谷口悦子, 千野根純子, 矢沢嗣夫 (1985) : 黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型とエンテロトキシン産生性. 栃木衛研所報, 15, 41-43.
- [23] 寺山武 (1988) : 黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別. 臨床と微生物, 15, 1, 10-15.
- [24] 潮田弘, 新垣正夫, 五十嵐英夫, 藤川浩, 寺山武 (1985) : ブドウ球菌食中毒原因菌のコアグララーゼ型の推移, 日本細菌学雑誌, 40, 1, 365.
- [25] Hájek, V. and Maršálek, E. (1971) : The differentiation of pathogenic staphylococci and suggestion for their taxonomic classification. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., A217, 176-182.
- [26] 清水晃 (1989) : 動物におけるブドウ球菌の生態. 日獣会誌, 42, 77-89.
- [27] 清水晃, 尾崎潤一郎, 河野潤一, 木村重 (1991) : 魚介類および食肉からの黄色ブドウ球菌の分離と性状. 食品と微生物, 8, 3, 135-141.
- [28] 鈴木昭 (1964) : シンポジウム: 集団給食における食品衛生上の諸問題 主としてブドウ球菌による集団中毒, 食衛誌, 5, 1, 1-8.