

## 同時期に発生したコアグララーゼ型黄色ブドウ球菌食中毒 2事例について

柴田 幹 良, 柳 川 義 勢, 新 井 輝 義, 甲 斐 明 美, 諸 角 聖

### Two outbreaks with coagulase type Staphylococcal Food Poisoning occurred at same period in Tokyo

Mikiyoshi SHIBATA, Yoshitoki YANAGAWA, Teruyoshi ARAI  
Akemi KAI and Satoshi MOROZUMI

**Keywords:** 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*, ブドウ球菌食中毒 Staphylococcal food poisoning, コアグララーゼ Coagulase, エンテロトキシン Enterotoxin, ポリメラーゼ連鎖反応 Polymerase Chain Reaction, パルスフィールドゲル電気泳動 Pulsed - Field Gel Electrophoresis

#### 緒 言

食中毒の原因となる黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型は、これまでの発生状況から 型, 型, 型, および 型であると考えられていた<sup>1-3)</sup>。その中でも特にコアグララーゼ 型, 型, 型の3型に起因する事例が多く、ブドウ球菌食中毒の90%を占めていた<sup>1)</sup>。しかしこれまで報告のなかったコアグララーゼ 型による食中毒事例が、1978年と1987年<sup>1)</sup>の両年に東京都内で発生し、以来本菌型による食中毒は毎年発生している。さらに2000年には、2事例のコアグララーゼ 型による食中毒事例が、ほぼ同時期に発生した。そこで、この2事例の関連性を明らかにすることを目的として、細菌学的疫学解析を行ったので、その成績について報告する。

#### 材料および方法

##### 1) 供試材料

供試材料は2000年に発生したブドウ球菌食中毒2事例の食品(104検体)、糞便(92検体)、吐物(2検体)、拭き取り材料(55検体)の計253検体、および検出された黄色ブドウ球菌112株である。

##### 2) ブドウ球菌の分離・同定

分離培養は常法に従い行った。すなわち、食品はリン酸緩衝食塩水(以下PBSと略す)にて10倍乳剤とし、検査に供した。分離培地には卵黄加マンニット食塩(MSEY)寒天培地を、また増菌培養には7.5%食塩加乾燥ブイオンを用い、35-48時間培養した。

##### 3) コアグララーゼ型別

分離菌株のコアグララーゼ型別は、潮田ら<sup>4)</sup>が報告した簡易型別法によって行った。すなわち、5%ウサギ血漿加ブレイン・ハート・インフュージョン(以下BHIと略す)ブ

イオンに供試菌を接種し、37-20時間静置培養して得た培養上清をコアグララーゼ抗原液とし、小試験管に分注した。これを ~ 型の抗コアグララーゼ血清で中和反応後、10%正常ウサギ血漿液を加え、血漿の凝集の有無により型別を行った。

##### 4) エンテロトキシン型別

分離菌株のエンテロトキシン産生性および型別は、BHIブイオンで37-20時間振とう培養した菌液を、15,000 rpm 15分間遠心分離し、その上清について市販のブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット(SET-RPLA「生研」:デンカ生研(株)、検出感度1~2 ng/mL)を用いて、逆受身ラテックス凝集反応(以下RPLAと略す)で行った。一方、食品および吐物からのエンテロトキシン検出は、食品をPBSで10倍乳剤にし、3,000 rpm 20分間遠心した後、その上清をクロロホルムで脱脂し、さらに遠心した上清を試料としてRPLA法、およびブドウ球菌エンテロトキシン検出用キット(RIDAスクリーン黄色ブドウ球菌エンテロトキシン:アヅマックス(株)、検出感度0.2~0.7 ng/mL)による酵素免疫測定法(以下ELISAと略す)で行った。

##### 5) ポリメラーゼ連鎖反応法(以下PCR法と略す)によるエンテロトキシン遺伝子の検出

PCR法は宝酒造から市販されている黄色ブドウ球菌エンテロトキシンA<sup>5)</sup>, B<sup>6)</sup>, C<sup>7)</sup>, D<sup>8)</sup>, E<sup>9)</sup> 遺伝子を標的とした5種類のプライマーセットを用い、表1に示す反応液組成で行った。方法は、標準寒天平板上の単一コロニーをNaOH(25 mmol/L)でアルカリ変性後、煮沸法によるDNA抽出を行い、熱変性95-30秒、アニーリング55-30秒、伸長反応72-30秒を1サイクルとし、28サイクルの反応条件でPCRを行った。反応終了後、2%アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後紫外線下で、写

\* 東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1. PCR反応液組成

TaKaRa <i>Taq</i> <sup>TM</sup> (5U/μL)	0.12 μL
10×PCR buffer	2.5 μL
dNTP Mixture (2.5mM each)	2 μL
Template DNA	2 μL
Sense primer	0.25 μL
Antisense primer	0.25 μL
Distilled water	up to 25 μL

真撮影して各遺伝子の検出を行った。

### 6) パルスフィールドゲル電気泳動法(以下PFGEと略す)によるDNA解析

供試菌のBHIブイヨン培養液について、Lysozyme, およびLysostaphin処理を行ったのち、PFGE用アガロースブロックを作成した。そしてブロックを制限酵素*Sma* I (TaKaRa) で25-4時間消化処理を行い、1%アガロースゲル (PFC Agarose Bio-Rad), 0.5×TBE bufferを用い、CHEF Mapper System (Bio-Rad) でPFGEを行った。なお泳動は6V/cm, パルス角度120度, スイッチングタイム0.47秒~63.80秒, リニアで, 20時間行った。

## 成 績

### 1) コアグラージェ型黄色ブドウ球菌による食中毒事例

2000年に発生したコアグラージェ型黄色ブドウ球菌による食中毒2事例の概要を表2に示した。

#### (1) 事例1

2000年4月22日に開催された老人会の会合において、同日13時に惣菜店で購入したオードブルを15時頃から参加者183名が喫食し、その1~2時間後から84名が嘔吐を主症

表2. コアグラージェ型黄色ブドウ球菌食中毒事例概要

	事例1	事例2
発 生 日	2000年4月22日	2000年4月29日
原 因 施 設	惣菜店	仕出し屋
喫 食 者 数	183名	不明
患 者 数	84名(1名死亡)	21名
発 症 率	45.9%	
喫 食 時 間	4月22日15時頃	4月29日0~1時頃
発 症 時 間	4月22日16~17時頃	4月29日3時頃
推 定 原 因 食 品	仕出し料理	仕出し弁当
原 因 菌	黄色ブドウ球菌 コアグラージェ型 エンテロトキシンA型	黄色ブドウ球菌 コアグラージェ型 エンテロトキシンA型

表4. 食品中のエンテロトキシンと黄色ブドウ球菌数(事例1)

検 体	食品中の エンテロトキシン*	黄色ブドウ球菌数 (個/g)	コアグラージェ型
K宅残品(18品目)	-	10 <sup>1</sup> ~10 <sup>9</sup>	
M宅残品(8品目)	-	10 <sup>4</sup> ~10 <sup>8</sup>	
Y宅残品(1品目)	-	10 <sup>7</sup>	
その他残品(3品目)	-	10 <sup>1</sup>	

\*PRLA法, ELISA法で検査

状とする食中毒症状を呈した。そのうち73歳の男性(基礎疾患無し)が4月23日午後9時に死亡した。常法による検査の結果、食品35検体中30件(86%)からコアグラージェ型エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌が検出されたため、原因食品は惣菜店で製造販売された仕出し料理と推定された。同様に拭き取り材料18検体中11件(61%), 患者便66検体中25件(38%), そして従業者便5検体中2件(40%)からも同一菌が検出された(表3)。患者宅別に残っていた仕出し料理中のエンテロトキシンと黄色ブドウ球菌検出状況について、表4にまとめた。RPLA法およびELISA法によるエンテロトキシン検査では、食品中のエンテロトキシンはすべて陰性であった。黄色ブドウ球菌数は仕出し料理1折中でも、品目によってばらつきが見られた。黄色ブドウ球菌数が多いものは厚揚げ(10<sup>9</sup>個/g), 人参(10<sup>8</sup>個/g), こんにゃく煮付け(10<sup>8</sup>個/g)等であった。

#### (2) 事例2

本事例は事例1とほぼ同時期の4月29日に運送業社員の夜間作業中に発生した事例である。この事例では運送業社員の夜食用として28日の18時に配達された仕出し弁当が喫食時まで室温状態で約6時間放置されたのち、29日午前0時頃に喫食、2~3時間後に21名が嘔吐を主症状とする食

表3. 黄色ブドウ球菌検出状況(事例1)

検 体	検査数	黄色ブドウ球菌陽性数(%)	
		/A*	その他の菌型
食 品	35	30(86)	0
拭き取り	18	11(61)	1(6)
患 者 便	66	25(38)	4(6)
従事者便	5	2(40)	0

\*コアグラージェ型, エンテロトキシンA産生菌

中毒症状を呈した。なお、喫食者数は不明、仕出し弁当の内容は鶏肉竜田揚げ、ニラ玉、春雨野菜炒め、八宝菜、ひじきメンマ炒め等であった。検査の結果、食品69検体中26件(38%)からコアグラゼ型エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌が検出されたため、原因食品は仕出し弁当と推定された。同様に拭き取り材料37検体中3件(8%)、患者便10検体中1件(10%)、従業者便11検体中3件(27%)、及び吐物2検体中1件(50%)からもコアグラゼ型エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌が検出された(表5)。表6はコアグラゼ型エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の検出状況を食品(各弁当残品, 検食)ごとに示したものである。RPLA法およびELISA法によるエンテロトキシン検査で、弁当残品BおよびDが陽性、その他の弁当残品A, Cや検食A, Bは陰性であった。エンテロトキシンが陽性であった弁当残品Bでは、6品目のうち「ニラ玉」からエンテロトキシンA, 8ng/gが検出された。また、弁当残品Dでは、6品目のうち「ニラ玉」と「鶏肉竜田揚げ」からエンテロトキシンAを検出し、その量はそれぞれ16 ng/g, 2 ng/gであった。黄色ブドウ球菌数は、検体によってばらつきが見られ、弁当残品では $10^3 \sim 10^8$ 個/g, 検食では $10^1 \sim 10^3$ 個/gであった。エンテロトキシンが検出された「ニラ玉」では $10^8$ 個/g, 「鶏肉竜田揚げ」では $10^7$ 個/gの菌数であった。

2) PCR法によるエンテロトキシン遺伝子検出成績

両事例の食品、拭き取り材料、吐物、および患者便から分離されたコアグラゼ型の黄色ブドウ球菌13株について、PCR法でエンテロトキシン遺伝子保有を確認した結果、13株すべてがエンテロトキシンA遺伝子のみを保有してお

表5. 黄色ブドウ球菌検出状況(事例2)

検体	検査数	黄色ブドウ球菌陽性数(%)	
		/A*	その他の菌型
食品	69	26(38)	0
拭き取り	37	3(8)	2(5)
患者便	10	1(10)	2(20)
従業者便	11	3(27)	1(9)
吐物	2	1(50)	0

\* コアグラゼ型, エンテロトキシンA産生菌

表6. 食品中のエンテロトキシンと黄色ブドウ球菌数(事例2)

検体	食品中の		黄色ブドウ球菌数 (個/g)	コアグラゼ型
	エンテロトキシン*			
弁当残品A(5品目)	-		$10^3 \sim 10^7$	
弁当残品B(6品目)	+		$10^3 \sim 10^8$	
ニラ玉		A(8ng/g)	$10^8$	
弁当残品C(6品目)	-		$10^3 \sim 10^7$	
弁当残品D(6品目)	+		$10^4 \sim 10^8$	
ニラ玉		A(16ng/g)	$10^8$	
鶏肉竜田揚げ		A(2ng/g)	$10^7$	
検食A(1品目)	-		$10^2$	
検食B(2品目)	-		$10^1 \sim 10^3$	

\* RPLA法, ELISA法で検査

り, B, C, D, E遺伝子は検出されなかった。

3) PFGEによるDNA解析

PCR法に供試した13株についてPFGE解析を行った結果、分離株のDNAパターンは各事例間ではそれぞれ同一であったが、2つの事例由来株の間では明らかにそのパターンは異なっていた(図1)。

考 察

過去30年間(1971年から2000年)の全国における黄色ブドウ球菌による食中毒事件数をみると、1990年以前までは1975年の275件をピークに、年間100件以上の発生が認められていたのに対し、その後は事件数が減少し、1991年以降は年間50~100件の発生で推移している。同様に最近の東京都におけるブドウ球菌食中毒の発生も減少傾向を示し、1991年以降は年間10件以下の発生にとどまっている。

一方、原因菌のコアグラゼ型は依然として型、型、及び型が主流である傾向に変わりはないが、これらに加

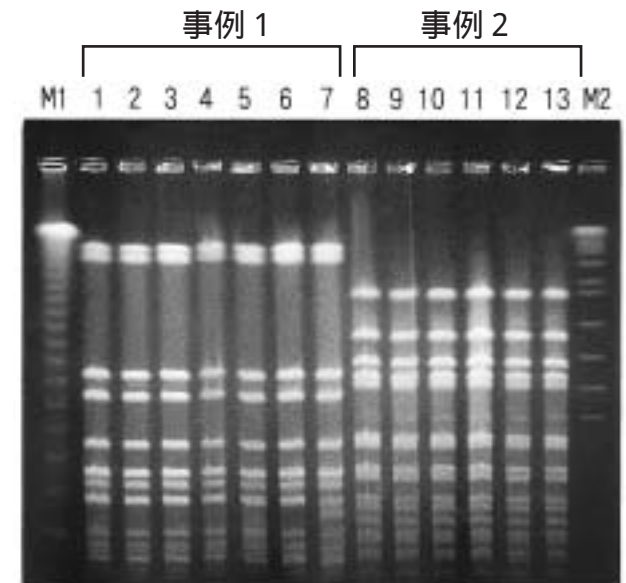


図1. 事例1, 事例2から分離された黄色ブドウ球菌株のSmaI切断パターン

M1 Lambda Ladder, 1-2 食品, 3-5 拭き取り, 6-7 患者便, 8-9 食品, 10-11 拭き取り, 12 吐物, 13 患者便, M2 *S.cerevisiae*

えて新たに型による食中毒事件が1992年以降ほぼ毎年みられ、増加傾向にある。我々は2000年の4月にコアグラゼ型による食中毒事件2事例の発生を経験したが、本菌による食中毒の発生が稀であることに加え、発生時期が同じであったことから、原因食品に共通性のある散在的集団発生(diffuse outbreak)の可能性を考慮し、検出された原因菌について通常の細菌検査に加え、PCR法によるエンテロトキシン遺伝子の解析や、PFGEによる解析を行い疫学的関連性について検討した。

PCR法による検討では、2事例由来の13株すべてがエンテロトキシンA型遺伝子のみを保有し、B~E型のサイレント毒素遺伝子は検出されず、表現型と遺伝子型が一致し、2事例間に相違は認められなかった。しかし、制限酵素 *Sma* I を用いたPFGEによる疫学的解析を行った結果、各事例毎では供試した株のDNAパターンは全て同一であったのに対し、2つの事例由来株の間では、明らかにそのパターンは異なっていた。このことから、今回の両事例は、同時期に発生した非常に稀なコアグラゼ型菌によるものではあったが、起源を異にする黄色ブドウ球菌によって発生した食中毒事例であることが明らかとなり、diffuse outbreakの可能性は否定された。

次に、食品のエンテロトキシン検査の結果、事例1では食品中からエンテロトキシンをRPLA法、そしてELISA法のいずれの方法においても検出することはできなかった。

RPLA法やELISA法によるエンテロトキシン検出は操作が簡易という利点がある一方で、エンテロトキシンが産生されているにもかかわらず、検出感度以下の量の場合は陰性となるといった欠点があること、また事例1においては搬入された検体量が少なかったため、十分な濃縮操作ができなかったことが、食品からエンテロトキシンが検出されなかった理由として考えられた。

一方、事例2では同様の方法で「ニラ玉」、および「鶏肉竜田揚げ」からエンテロトキシンAを検出することがで

きた。検出されたエンテロトキシン量は2~16 ng/gであり、人に対する黄色ブドウ球菌エンテロトキシン発症量が100~200 ng/人<sup>9)</sup>であることから、エンテロトキシンが検出されたニラ玉、及び鶏肉竜田揚げのいずれか、または合計で50 g喫食すれば十分に発症する量に達することとなる。

最近、何故コアグラゼ型菌による食中毒が増加傾向にあるのか、その理由は現在のところ不明であり、今後も注目していく必要がある。

## 付 記

(本研究の概要は日本食品衛生学会第81回学術講演会平成13年5月で発表した。)

## 文 献

- 1) 五十嵐英夫：食品衛生研究，43, 31-45, 1993.
- 2) 寺山武：食衛誌，18, 142-148, 1977.
- 3) 寺山武，潮田弘，新垣正夫，他：東京衛生年報，28-1, 1-4, 1977.
- 4) 潮田弘，寺山武，坂井千三，他：東京衛生年報，26-1, 1-6, 1975.
- 5) Betly, M.J. and Mekalanos, J.J. : *J.Bact.*, 170, 34-41, 1988.
- 6) Jones, C.L. and Khan, S.A. : *J.Bact.*, 168, 29-33, 1986.
- 7) Bohach, G.A. and Schlievert, P.M. : *Mol. Gen. Gent.*, 209, 15-20, 1987.
- 8) Bayeles, K.W. and Iandolo, J.J. : *J.Bact.*, 171, 4799-4806.
- 9) Couch, J.L., Soltis, M.T. and Betley, M.J. : *J.Bact.*, 170, 2954-2960, 1988.
- 10) 尾上洋一，寺山武，品川邦汎：黄色ブドウ球菌・食中毒菌の制御 - データと文献録，14-26, 1988，中央法規出版，東京。