広島市域におけるイカ菓子を原因とした *Salmonella* Oranienburg および *Salmonella* Chester による Diffuse Outbreak への分子疫学的アプローチ

高垣 紀子・橋渡 佳子・伊藤 文明・児玉 実
石村 勝之・毛利 好江・河本 秀一
笠間 良雄・山岡 弘二・荻野 武雄

(広島市衛生研究所 生物科学部)

(受付 平成 12 月 8 月 14 日)

(受理 平成 12 月 9 月 18 日)

Molecular-Epidemiological Approach to a Diffuse Outbreak, Due to Cuttlefish Chips Contaminated by *Salmonella* Oranienburg and *Salmonella* Chester, in Hiroshima City

Noriko TAKAGAKI, Yoshiko HASHIWATA, Fumiaki ITOH, Minoru KODAMA,
Katsuyuki ISHIMURA, Yoshie MOHRI, Hidekazu KAWAMOTO,
Yoshio KASAMA, Koji YAMAOKA and Takeo OGINO

(Division of Biological Science, Hiroshima City Institute of Public Health,
4-1-2 Shoko-center, Nishi-ku, Hiroshima 733-8650)

In Hiroshima city, when medical facilities report the occurrence of a sporadic food poisoning case to the public health center, the center collects the bacterial isolate and the isolate is tested for serotype, antibiotics susceptibility and other attributes at the institute of public health to monitor trends in food poisoning. This surveillance system has noted the gradually increasing tendency toward *Salmonella* serogroup O7 isolates since the end of 1998 that were almost all serotyped as *Salmonella* Oranienburg, suggesting an epidemiological relation between these isolates. Therefore, we evaluated the availability of random amplified polymorphic DNA (RAPD) method as a molecular-epidemiological technique for comparison of them and investigated food poisoning cases by applying RAPD and other techniques, including pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), to the isolates. Most *Salmonella* isolates showed the same RAPD and PFGE patterns. Consequently, the investigation by these techniques and field-epidemiological data revealed that the sporadic food poisoning cases in Hiroshima city were a diffuse outbreak due to cuttlefish chips contaminated by not only *S. Oranienburg* but also *S. Chester*. The RAPD method was a rapid and useful tool for molecular-epidemiological approach to this outbreak.

Key words: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) method, Diffuse outbreak, *Salmonella* Oranienburg, *Salmonella* Chester, Cuttlefish chips

緒 言

近年、食品流通の広域化により、各地域で散発的な食

〒733-8650 広島市西区商工センター 4-1-2

中毒と考えられていた事例が、実は同一原因食品や食材による集団食中毒であったといった、いわゆる「diffuse outbreak」の形態をとる食中毒事例が増加している²⁴⁾。食品による健康被害を防ぐには、そのような危害をもた

らす食品の製造・流通において防止することが第一であるが、すでに流通している有害食品を探知し、市場から迅速に除去できる体制を構築することも一方では重要である。

そのためには、散発的に把握されてくる食中毒あるいは下痢症事例における分離菌株の疫学的な比較解析が詳細に行えるシステムが必要である^{5,8)}。それを可能とする技術的基盤として、血清型や薬剤感受性パターンなどの従来からの表現型による疫学解析手法に加えて、DNA 構造を解析することにより、より詳細に株間の異同を識別することができる Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法^{7, 11~13)} やパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法^{8,9)} などのいわゆる分子疫学的解析手法がある。

1998 年末より広島市域において散発性食中毒患者からのサルモネラ O7 群の漸増傾向が認められ、血清型別の結果、そのほとんどが *Salmonella* Oranienburg であったことから、本市ではこれらの事例間に関連性があるものと考えて検討を加えていた。1999 年 4 月に入り、川崎市でのイカ菓子を原因食品とした *S. Oranienburg* による食中毒¹⁸⁾ の発生情報に端を発して、全国的な青森県産イカ乾製品を原因とした *S. Oranienburg* および *S. Chester* による diffuse outbreak 事件へと展開した^{2, 6, 10, 14, 17, 19, 22, 23, 25)}。

今回、本市での散発性食中毒由来株とイカ菓子事例由来株を比較解析し、その関連性を究明することを目的に、RAPD 法および PFGE 法を使用した。その結果、他の疫学的成績と総合すると、本市の散発食中毒事例が、*S. Oranienburg* のみならず *S. Chester* も関与した diffuse outbreak 事例であることが明らかにされたので報告する。

材料および方法

1. 供試菌株

1997 年 9 月以降医療機関で分離され、保健所により散発性食中毒由来株として当所に搬入されたサルモネラ菌株のうち、*S. Oranienburg* 54 株および *S. Chester* 9 株を供試した。さらに、当所で分離したイカ菓子 9 検体およびイカ菓子喫食患者 5 名からの *S. Oranienburg* 14 株、*S. Chester* 7 株、非運動性の *Salmonella* O4 群 (O4:H-) 2 株を供試した。対照株として、1998 年 3 月以前に当所で分離した下痢症患者由来の *S. Oranienburg* 2 株、下痢症患者および河川水由来の *S. Chester* それぞれ 2 株と 1 株を用いた。また、川崎市、兵庫県および山形県衛生研究所からの分与株、*S. Oranienburg* 5 株、*S. Chester* 4 株も検討に加えた。

2. サルモネラの同定・血清型別・薬剤感受性試験

サルモネラの同定は、TSI, LIM で 1 次性状を確認後、API20E (バイオメリュウ製) で生化学的性状を確認・判定した。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。薬剤感受性試験は、Sensi-Disk (BBL) を用いて National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 法に準拠し、1 濃度ディスク法で行った。供試薬剤は、Chloramphenicol (CP), Tetracycline (TC), Streptomycin (SM), Kanamycin (KM), Ampicillin (ABPC), Nalidixic acid (NA) の 6 薬剤を用いた。

3. RAPD 解析

(1) RAPD 法の有効性検討菌株

各プライマーの有効性を検討するため、分離時期の異なる *S. Oranienburg* 5 株 (Table 3: Group No. 1~5 の各 1 株)、*S. Chester* 4 株 (Table 4: Group No. 1~3, 5 の各 1 株) を用いた。

(2) 鋳型 DNA の調製

鋳型 DNA の調製は Lin らの方法¹¹⁾ に準じて行った。普通寒天斜面 (日水製薬製) で 18 時間培養した菌を、蒸留水 200 μ l にマックファーランド 3 の濁度で浮遊し、10 分煮沸後、12,000 rpm で 3 分遠心した上清を鋳型 DNA とした。

(3) RAPD 法の条件

プライマー (Table 2) および試薬は、市販キット (Ready-To-Go RAPD Analysis Kit: ファルマシア製) を使用した。25 pmol のプライマー 5 μ l と超純水 15 μ l をあらかじめ混合し、試薬ビーズの入った各チューブに分注した後、加熱抽出した鋳型 DNA 溶液 5 μ l を加え合計 25 μ l とし、最後にミネラルオイルでシーリングし遠心した。

PCR 反応は、牧野¹²⁾ の条件で行った。Takara PCR Thermal Cycler MP を用い、はじめに 94°C で 1 分 denaturation した後、denaturation 94°C, 1 分, annealing 36°C, 1 分, extension 72°C, 1 分で 45 サイクル増幅後、4°C に保った。PCR 産物は、2% アガロースゲルで定電圧 100 V, 60 分電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下で写真撮影し、印画紙上の泳動像を比較観察した。必要に応じて、10% ポリアクリルアミドゲル (マルチゲル 10: 第一薬品製) で定電流 15 mA, 130 分電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、同様に写真撮影後に比較解析した。

4. PFGE 解析

Izumiya ら⁹⁾ の方法に準じて行った。LB ブロス培地 (Gibco 社製) で 37°C, 18 時間培養した菌液 100 μ l を遠心し、その沈渣を低融点アガロース (Bio Rad 社製) に包埋した後、GenePath Reagent Kit (Bio Rad 社製) を使用して溶菌などの菌体処理を行った後、2 種類の制限酵素 *Bln*I (宝酒造製), *Xba*I (東洋紡製) 各々により染色体 DNA を切断した。泳動は、GenePath 電気泳動装置 (Bio Rad 社製) を用い、泳動バッファー 0.5×TBE (Tris-borate-EDTA) 下、1% アガロースゲル (Bio Rad 社製) で行った。泳動条件は既存プログラム No. 14 (電圧 V/cm, パルスタイム 5.3~34.9 秒, 泳動時間 19.7 時

間、ランプノリニアア)で泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下で写真撮影し、50 から 500 kb の範囲を比較解析した。

結 果

1. 散発性食中毒患者からのサルモネラ属菌の分離状況の推移

1997 年 9 月以降、当所に搬入された散発性食中毒患者由来サルモネラ菌株の血清型別を行った結果を年月別に Table 1 に示した。搬入された 849 菌株のうち、*Salmonella* Enteritidis が 693 株で 81.6% を占め、7 月から 11 月までの夏期および秋期に多く分離された。他の血清型は少数で推移していたが、*S. Oranienburg* (O7: m, t:-) は 1998 年 7, 8 月に 1 株ずつ検出され、1998 年 11 月から 1999 年 5 月までの、比較的サルモネラの検出率が低い冬期に、毎月連続かつ漸増的に認められ、これらの事例間に関連性が示唆された。一方、時期を同じくして、*S. Chester* (O4: e, h: e, n, x) の増加傾向が認められた。

Table 2. Primers* used in this study

Primer	Sequence	G+C content (%)
Primer 1	5'-GGTGC GGGA-3'	69.9
Primer 2	5'-GTTTCGCTCC-3'	60.8
Primer 3	5'-GTAGACCCGT-3'	61.4
Primer 4	5'-AAGAGCCCGT-3'	60.3
Primer 5	5'-AACGCGCAAC-3'	60.3
Primer 6	5'-CCCGTCAGCA-3'	69.6

* These primers are supplemented in a Ready-To-Go RAPD analysis kit.

(A) *S. Oranienburg*

2. 散発性食中毒患者由来 *S. Oranienburg* および *S. Chester* 分離株の性状と薬剤感受性

1998 年 7 月から 12 月に分離された *S. Oranienburg* 4 株 (Table 3: Group No. 3, 4) はイノシット発酵であったのに対し、1998 年 12 月以降の 55 株および 1998 年 7 月以前の 2 株はすべてイノシット非発酵であった。

薬剤感受性において、*S. Oranienburg* は由来 1 株が 3 剤耐性 (TC, CP, NA) であったが、他の株はすべて 6 薬剤感受性であった。一方、*S. Chester* はすべてリジン脱炭酸試験陰性の非定型なサルモネラ性状を示し、6 薬剤感受性であった (Table 1, 3, 4)。

3. イカ菓子由来およびイカ菓子事例関連患者分離株の性状と薬剤感受性

1999 年 4 月に青森県八戸市で製造された食中毒原因食品のイカ菓子が本市でも流通していることが確認された。その収去されたイカ菓子から *S. Oranienburg* だけでなく *S. Chester* も検出された。検出した両血清型菌は、生化学的性状、薬剤感受性とも散発性食中毒患者由来の株と同一であった。また、非運動性でリジン脱炭酸試験陰性の *Salmonella* O4 群菌株 (O4: H-) も分離され、生化学的性状、薬剤感受性とも *S. Chester* と同様であった。

一方、イカ菓子を喫食した患者や該品の喫食の記憶が不確かな患者からも *S. Oranienburg* 5 株が検出され、同時に *S. Chester* 2 株や非運動性の *Salmonella* O4 群菌 1 株が検出された (Table 3, 4)。

4. RAPD 法および PFGE 法による *S. Oranienburg*, *S. Chester* 分類の検討

S. Oranienburg および *S. Chester* のそれぞれ疫学的

(B) *S. Chester*

Fig. 1. Evaluation of RAPD profiles by using six primers.

a: primer 1, b: primer 2, c: primer 3, d: primer 4, e: primer 5, f: primer 6, lane M: 100 bp ladder marker.

(A): lanes 1-5, representative isolate within each group No. 1-5 in Table 3.

(B): lanes 1-4, representative isolate within each group No. 1-3, 5 in Table 4.

Table 3. Epidemiological analysis results of *Salmonella* Oranienburg isolates

Group No.	Date of onset	Source	No. of strains ¹⁾	Drug-resistance patterns	Inositol ²⁾	RAPD patterns ³⁾ with:					PFGE patterns with:			Remarks
						Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 5	Pr. 6	BlnI	XbaI	
1	1995.10	Patient	1 (1)	SM	—	a	a	a	a'	a	a	A'	C'	
2	1997.8	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a'	a	a	A'	C'	
3	1998.7–12	Patients	3 (3)	Sensitive	+	b	b	b	b	b	b	B	D	
4	1998.11	Patient	1 (1)	Sensitive	+	c	b	c	b	b'	b	B	D	
5	1998.12–99.4	Patients ⁵⁾	23 (3)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	S. Chester was isolated (a patient).
6	1999.1–4	Patients ⁶⁾	21 (8)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	S. Chester and O4 : H– were isolated (a patient).
7	1999.2	Patient ⁶⁾	1 (1)	TC, CP, NA	—	a	a	a	a	a	c	A	C	
8	1999.2–4	Patients ⁷⁾	10 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	
9		“Oyatu-Chinmi”	7 (6)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	S. Chester was isolated (4 samples).
10		“Okonomi-IKA-Sohmen”	2 (2)	Sensitive.	—	a	a	a	a	a	c	A	C	S. Chester (2 samples) and O4 : H– (1 sample) were isolated.
11		“Baribari-Ika”	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	an isolate in Kawasaki city 12
12	1999.2	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	an isolate (tuna 3) in Hyogo prefec.
13		“Oyatu-Chinmi”	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	an isolate (hyoei O1) in Hyogo prefec.
14	1999.4 ⁴⁾	Patient ⁵⁾	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	an isolate (99–87) in Yamagata prefec.
15		“Ganso-Oyatu-Chinmi”	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	c	A	C	an isolate (99–111) in Yamagata prefec.

¹⁾ The number in parenthesis indicate No. of strains used for PFGE. ²⁾ Inositol fermentation.

³⁾ Pr. 1; primer 1, Pr. 2; primer 2, Pr. 3; primer 3, Pr. 4; primer 4, Pr. 5; primer 5, Pr. 6; primer 6. ⁴⁾ Date isolated.

⁵⁾ Reported that they ingested cuttlefish chips. ⁶⁾ Reported that they could not remember whether they had eaten cuttlefish chips.

⁷⁾ Reported that they had not eaten cuttlefish chips.

Table 4. Epidemiological analysis results of *Salmonella* Chester and *Salmonella* serogroup O4 isolates

Group No.	Date of onset	Source	No. of strains ¹⁾	Drug-resistance patterns	Lys ²⁾	RAPD patterns ³⁾ with:						PFGE patterns with:		Remarks
						Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	Pr. 4	Pr. 5	Pr. 6	B ⁿ I	XbaI	
1	1994.2	Patient	1 (1)	Sensitive	+	a	a	a	a'	a	a	E	G'	
2	1996.8	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	b	b	a	b	F'	G	
3	1998.2 ⁴⁾	Environment	1 (1)	Sensitive	+	b	a	c	c	b	c	—	—	obtained no PFGE band.
4	1998.11	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a'	a''	a'	a	F	G	
5	1999.1-4	Patients	7 (6)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	S. Oranienburg was isolated (2 patients).
6	1999.2	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F''	G	
7	1999.3	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F'''	G''	
8	1999.3	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	O4 : H- and S. Oranienburg were isolated.
9		"Oyatu-Chinmi"	5 (2)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	S. Oranienburg was isolated (4 samples).
10		"Okonomi-IKA-Sohmen"	1	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	S. Oranienburg was isolated.
11		"Okonomi-IKA-Sohmen"	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	O4 : H- and S. Oranienburg were isolated.
12		"Oyatu-Chinmi"	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	an isolate (hyoei C9) in Hyogo prefec.
13	1998.12	Patient	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	an isolate (98-S.076) in Hyogo prefec.
14		"Oyatu-Chinmi"	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	an isolate (99-85) in Yamagata prefec.
15	1999.4 ⁴⁾	Patient ⁵⁾	1 (1)	Sensitive	—	a	a	a	a	a	a	F	G	an isolate (99-126) in Yamagata prefec.

1), 3), 4) see Table 3.

2) Lysine decarboxylase. 5) Reported that they ingested cuttlefish chips.

に関連のない分離株各々5株および4株について、各プライマーを用いたPCR産物の泳動像をFig. 1に示した。なお、分類パターン（アルファベット表示）については、他の疫学的解析結果とともにTable 3, 4に示した。

S. Oranienburg は、各プライマーで泳動像に差がみられ、Primer 1, 3, 6で3群に、Primer 2, 4, 5は2群に分類された。各プライマーのパターンの組合せにより、使用したS. Oranienburg 5株は、4群に分類可能であった。

S. Chester は、Primer 2を除き、各プライマーで泳動像に差がみられ、Primer 3, 4, 6で3群に、Primer 1, 5では2群に分類された。その結果、各パターンの組合せで、供試4株は3群に分類できた。なお、3回行った再現性試験の結果は同様であった。

一方、同じS. Oranienburg およびS. Chester 対照株を用いて検討したPFGE法では、*BlnI*, *XbaI*による泳動パターンの違いからS. Oranienburg およびS. Chester が明瞭に識別され、両血清型とも2群に分類された（未発表データ）。

5. RAPD法とPFGE法による散発性食中毒患者およびイカ菓子事例由来株の解析

散発性食中毒患者およびイカ菓子事例由来株に対し、RAPD法およびPFGE法を適応した（Table 3, 4）。S. Oranienburg は、イカ菓子の喫食の有無に関わらず1998年12月以降の患者由来株およびイカ菓子由来株は、各primerとも各々同一のRAPDパターンを示し、同一群に分類された。PFGEによる解析でも同じ群を示した。一方、S. Chester は、1998年11月発症（Table 4: Group No. 4）の1株はRAPDパターンに若干の違いがみられたが、1999年1月以降の分離株は、PFGEで1, 2本のバンドの差がみられた2株（Table 4: Group No. 6, 7）を除いて、RAPD法およびPFGE法とも同一群に分類された。また、他都市由来のS. Oranienburg およびS. Chester も、本市分離株と同一の群であった（Fig. 2, Table 3: Group No. 11~15; Table 4: Group No. 12~15）。さらに、患者便およびイカ菓子各1検体から検出された非運動性 *Salmonella* O4:H-2 株もイカ菓子由来のS. Chester と同じパターンを示した（Table 4: Group No. 8, 11）。これらの結果から、本事例のイカ菓子は1998年12月末には、すでに本市域に流通し、それにより長期にわたってS. Oranienburg およびS. Chester による散発的な食中毒患者が発生したものと考えられた。

考 察

広域的な集団発生（diffuse outbreak）を探知し、感染源を追究するためには、分離菌株の異同比較情報が必要であるが、その比較レベルは従来の疫学マーカーでの解析では十分でなく、より詳細な比較を可能とする分子疫学的な解析が必須である⁸⁾。米国では、すでに、Centers

for Disease Control and Prevention (CDC) を中心とした、PFGE解析による腸管出血性大腸菌のコンピュータネットワーク（Pulse Net）⁵⁾が稼動しており、今後、全米をカバーする複数の病原体の監視体制を目指している。わが国でも、現在、国立感染症研究所により同様のシステムが検討されている。

今回、広島市域におけるS. Oranienburg およびS. Chester の増加の原因を追究するにあたって、両血清型菌の情報は少なく^{1, 4, 16)}、異同識別が行える具体的な方法論に関する文献なども見当たらなかった。そこで、菌株間の疫学的解析のために、PCR技術の応用で菌株処理ならびに解析操作が簡便であり、測定時間も短いRAPD法^{3, 12, 13, 15)}を適用して、まず両血清型菌株の識別・分類使用の可否を検討した。RAPD法は使用するプライマーによってその識別能力に大きな差が生じるので^{12, 13)}、菌株間の識別能力の高いプライマーを選定することが望ましいが、同一血清型内のサルモネラ菌株を多岐に識別できる単一プライマーの選定は難しいと報告されている²¹⁾。そこでS. Oranienburg およびS. Chester でも複数プライマーの使用が必要と考えられ、6種類のプライマーによりS. Oranienburg は4群に、S. Chester は3群に分類された。この結果から、本法は両血清型菌を、さらに群別レベルで分類できる分子疫学的方法としてスクリーニング的に使用可能と判断した。RAPD法の欠点としては、再現性の問題が指摘されており、その要因として反応液組成^{11, 12)}、鋳型DNA量^{3, 26)}などがあるが、今回、キットを使用した結果では再現性のある結果が得られた。

散発性食中毒患者由来のサルモネラの血清型の推移から同一感染源が疑われ、検討したS. Oranienburg, S. Chester 菌株の多くは、生化学的性状、薬剤感受性試験などで同じ表現型を示した。さらに、遺伝子レベルで比較するため、RAPD法およびPFGE法で異同の判別を行った結果でも差異を認めなかった。この分子疫学的解析結果は、これらの菌株が同一由来であることを強く示唆するものであった。そこで、1999年3月、本市としても、厚生省や近県に情報提供ならびに照会を行ったが、川崎市でのイカ菓子食中毒事例が明らかになるまで、市内での発生原因（原因食品）をつきとめることはできなかった。その後、保健所による再度の喫食調査の結果、当該イカ菓子を喫食した者が多く認められた。イカ菓子およびその喫食者からの分離株の疫学的解析結果も散発性食中毒患者由来株と差異が認められなかったことから、この解析結果と疫学調査結果を総合すると、本市におけるS. Oranienburg およびS. Chester による散発性食中毒事例の増加も、イカ菓子による全国的なdiffuse outbreak^{20, 22, 23)}が原因であったと考えられた。なお、青森県では、血清型O7:H-のS. Oranienburg 非運動性変異株と推定される株の分離が報告されている²⁰⁾。広島市では、イカ菓子およびイカ菓子喫食患者からRAPD

Fig. 2. Representative results of RAPD and PFGE.

a: RAPD patterns obtained with primer 3, b: PFGE patterns obtained with *BlnI*. lane M: 100bp ladder marker, lane λ: λ ladder (48.5–533.5 kb).

(A): lanes 1–7, representative isolate within each group No. 5, 9, 11–15 in Table 3.

(B): lanes 1–6, representative isolate within each group No. 5, 9, 12–15 in Table 4.

法ならびに PFGE 法の泳動パターンが *S. Chester* と同じであることから、本菌の非運動性株と推定される *Salmonella* O4:H-株が検出された。今回のような長期にわたる汚染による広域的な拡散事例では、菌検索において留意する必要がある興味深い点と考えられる。

本事例は、兵庫県²⁾や広島市などから *S. Oranienburg* の増加とその解析結果の情報提供がなされ、川崎市での集団食中毒により、原因食としてイカ菓子が浮かび上がった。その結果、全国的な調査に発展して、下痢症以外の重篤症例^{6, 19)}も含む 1,500 名以上の発生をみた事件

像が明らかになった。しかし、これらの解析情報がより迅速に分析され、適切な疫学調査がなされれば、これほどの発生には至らなかったかもしれない。散発事例菌株の収集解析が、広域的な食中毒 (diffuse outbreak) を探り出す重要な情報になること、一方、その情報を早期に集約し、原因を突き止めることの現状での難しさを実感する事例であった。このように、分子疫学的解析は、適切な疫学調査と統合されて威力を発揮する手段である。今後、菌株収集解析のシステムとしての整備と全国的な情報網の構築、ならびにフィールドでの疫学調査機能の質的向上が望まれる。

要 約

広島市域において、1997年9月以降、サルモネラ属菌による散発的な食中毒事例の疫学的解析を行い、食中毒の発生と起因菌株の動向把握を試みた。1998年末よりサルモネラ O7 群の *S. Oranienburg* の漸増傾向が認められ、同時期にサルモネラ O4 群の *S. Chester* の増加もみられた。その発生は、全国的な青森県産イカ乾製品を起因とした *S. Oranienburg* による diffuse outbreak の発生時期と一致していた。

今回、本市での散発性食中毒とイカ菓子事例との関連性を究明するため、生化学的性状、血清型および薬剤感受性などの表現型別と分子疫学的解析手法である RAPD 法および PFGE 法による遺伝子型別を併用して検討した。RAPD 法ではキット付属の6種類のプライマーの各パターンの組合せにより、由来の異なる *S. Oranienburg* は4群に分類され、*S. Chester* は3群に分類された。本市の散発性食中毒事例株およびイカ菓子関連株にこの方法を適用した結果、それらの多くは同一パターンを示し、PFGE 法を含む他の疫学的解析の結果と総合すると、本市の散発性食中毒事例が、*S. Oranienburg* のみならず *S. Chester* も関与した diffuse outbreak 事例であったと考えられた。検討した RAPD 法は *S. Oranienburg* および *S. Chester* の迅速なスクリーニング法として実用的であった。

謝 辞

地域間の比較解析のために貴重な菌株を分与いただきました川崎市衛生研究所、兵庫県衛生研究所、山形県衛生研究所の諸先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Gustavsen, S. and Breen, O.: Investigation of an outbreak of *Salmonella* Oranienburg infections in Norway, caused by contaminated black pepper. *Am. J. Epidemiol.*, **199**, 806-812, (1984).
- 2) 浜田耕吉, 辻 英高, 増田邦義: *Salmonella* Oranienburg による広域集団感染症 兵庫県. 病原微生物検出情報, **20**, 87 (1999).
- 3) 吐崎 修, 森野吉晴, 金澤裕子, 上野美知, 松川陽子, 山本幾也, 旅田一衛: Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) 法による *Salmonella enterica* serovar Enteritidis の疫学的検討. 感染症誌, **71**, 745-750 (1998).
- 4) Hedberg, C. W., Korlath, J. A., D'Aoust, J. Y., White, K. E., Schell, W. L., Miller, M. R., Cameron, D. N., MacDonald, K. L. and Osterholm, M. T.: A multistate outbreak of *Salmonella* Javiana and *Salmonella* Oranienburg infections due to consumption of contaminated cheese. *JAMA*, **268**, 3203-3207 (1992).
- 5) Centers for Disease Control and Prevention: Pulsenet (2000). (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbnd/pulsenet/pulsenet.html>)
- 6) 飯沼由嗣, 安藤久寛, 安形則雄: 後腹膜膿瘍を形成した *Salmonella* Oranienburg 重症感染症の一例. 病原微生物検出情報, **20**, 139-140 (1999).
- 7) 稲垣善茂, 泉谷秀昌, 渡辺治雄: RAPD-PCR の分子疫学への応用—腸管出血性大腸菌 O157 の集団発生の解析. 実験医学, **15**, 119-122 (1997).
- 8) 伊豫田 淳, 寺嶋 淳, 和田昭仁, 泉谷秀昌, 田村和満, 渡辺治雄: PFGE を用いた腸管出血性大腸菌 EHEC O157:H7 の分子疫学. 日食微誌, **15**, 141-146 (1998).
- 9) Izumiya, H., Terajima, J., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K., Tamura, K. and Watanabe, H.: Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan using pulsed-field gelelectrophoresis and phage typing. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1675-1680 (1997).
- 10) 倉園貴至, 近真理奈, 山口正則, 正木宏幸, 大関瑤子, 宮川三平: *Salmonella* Oranienburg 検出数の急増について 埼玉県. 病原微生物検出情報, **20**, 139 (1999).
- 11) Lin, A. W., Usera, M. A., Barrett, T. J. and Goldsby, R. A.: Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 870-876 (1996).
- 12) 牧野壮一: ランダムプライムド PCR 法原理と方法. 臨床と微生物, **23**, 658-666 (1996).
- 13) 牧野壮一: RAPD-DNA フィンガープリンティング法—その原理と細菌学への応用—. モダンメディア, **41**, 186-194 (1995).
- 14) 正木宏幸, 斎藤章暢, 大塚佳代子, 小野一晃, 濱田佳子, 山口正則, 平井 茂: 魚介類 (イカ) 乾製品の *Salmonella* 汚染 埼玉県. 病原微生物検出情報, **20**, 140-141 (1999).
- 15) 松井則夫, 油納義久, 芳川伸治, 喜多英二, 坂谷光則: 結核菌のフィンガープリンティングにおける AP-PCR 法の最適条件の設定及びその臨床応用. 感染症誌, **72**, 890-896 (1998).
- 16) Metha, G., Prakash, K. and Sharma, K. B.: *Salmonella* Oranienburg infection in a neonatal unit in New Delhi. *Indian J. Med. Res.*, **75**, 480-484 (1982).
- 17) 森野吉晴, 山下晃司, 金澤祐子, 上野美知, 太田裕元, 北口三知世, 岩崎恵子, 辻澤恵都子, 旅田一衛: イカ菓子が原因とみられるサルモネラ食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動による解析 和歌山市. 病原微生物検出情報, **20**, 138-139 (1999).
- 18) 小川正之, 佐野達哉, 殿岡弘敏, 松尾千秋, 小嶋由香, 本間幸子, 吉田 學, 佐藤欣彌: 川崎市で発生した「バリバ

- りいか」による *Salmonella* Oranienburg 食中毒の概要. 病原微生物検出情報, **20**, 112-113 (1999).
- 19) 奥村 徹, 鈴木幸一郎, 三井 浩, 木村文彦, 伊藤 淳, 熊田恵介, 小林良三, 二木芳人, 小濱啓次, 藤井千穂: *Salmonella* Oranienburg による敗血症の1例. 感染症誌, **73**, 787-790 (1999).
- 20) サルモネラ・オラニエンブルグ食中毒事件原因究明検討委員会: サルモネラ・オラニエンブルグ食中毒事件原因究明検討委員会報告書 (1999).
- 21) Soto, S. M., Guerra, B., Gonzalez-hevia, M. A. and Mendoza, M. C.: Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as typing method for twelve *Salmonella* serotypes. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 4830-4836 (1999).
- 22) 高垣紀子, 高杉佳子, 児玉 実, 石村勝之, 毛利好江, 伊藤文明, 河本秀一, 笠間良雄, 山岡弘二, 荻野武雄: *S. Oranienburg* に汚染されたイカ菓子から検出されたリジン脱炭酸陰性 *S. Chester* と散発食中毒由来株の比較 広島市. 病原微生物検出情報, **20**, 114 (1999).
- 23) 高杉佳子, 高垣紀子, 児玉 実, 石村勝之, 毛利好江, 伊藤文明, 河本秀一, 笠間良雄, 山岡弘二, 荻野武雄: 広島市における *Salmonella* Oranienburg による散発食中毒事例の増加と diffuse outbreak への展開. 病原微生物検出情報, **20**, 113-114 (1999).
- 24) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K. and Watanabe, H.: Detection of multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated ikura-sushi ingestion. Jpn. J. Infect. Dis., **52**, 52-53 (1999).
- 25) 辻 英高, 浜田耕吉, 増田邦義: イカ菓子による全国的サルモネラ流行が *Salmonella* Oranienburg と *Salmonella* Chester との混合汚染である証拠 兵庫県. 病原微生物検出情報, **20**, 167-168 (1999).
- 26) Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D. and Johnson, W. M.: Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based fingerprinting of representative bacterial pathogens. J. Clin. Microbiol., **35**, 339-346 (1997).