

25. 新規分子疫学的解析手法を用いた大阪府内で発生した ブドウ球菌食中毒の原因究明調査

○若林 友騎 (地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所)

【研究目的】

ブドウ球菌食中毒の予防には、エンテロトキシンを産生するブドウ球菌を食品に「つけない」ことが有効であり、予防啓発のためには汚染経路の解明が重要である。近年、Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis (MLVA) が食中毒汚染源解明に有用な分子疫学的解析手法として、特に腸管出血性大腸菌食中毒発生時の原因調査のために活用されている。細菌ゲノム上には tandem-repeat と呼ばれる、特定の塩基配列が繰り返し現れる領域が複数存在しており、その繰り返し数は菌株ごとに異なる。MLVA は複数の反復領域についてその繰り返し数を比較する解析法であり、短時間で簡便に型別できる。

黄色ブドウ球菌の MLVA に関する論文が 2012 年に報告されているが[1]、我が国ではこれまでにブドウ球菌食中毒発生時の分子疫学的解析手法として MLVA を利用した例は、我々が知る限り報告されていない。そこで本研究では、迅速かつ簡便なブドウ球菌の分子疫学的解析手法として、食中毒原因究明調査における MLVA の有用性を評価した。また、MLVA を用いて、大阪府内で過去に発生した食中毒事例について遡り調査を実施した。

【研究の必要性】

ブドウ球菌食中毒は年間数十件ほど報告されており、我が国における主要な細菌性食中毒の 1 つである。本菌食中毒は、しばしば大規模に発生し、低脂肪乳を原因とした大規模食中毒事例のように、社会的不安をあおる事例も過去には発生している。その予防啓発は公衆衛生上の重要な使命であり、本菌食中毒の発生時における積極的な原因究明調査が必要である。

【研究計画】

解析には、2011 年から 2020 年に発生した食中毒事例において分離した黄色ブドウ球菌

50 株および当所で保存している黄色ブドウ球菌 360 株を用いた。既報に基づいてプライマーを作成し[1]、PCR には Multiplex PCR Plus kit (QIAGEN) を使用した。Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) および Gene Mapper version 4.0 (Applied Biosystems) を使用してフラグメント解析を行った。16 遺伝子座におけるリピート数の組み合わせに基づき、当所で独自に MLVA 型名を付与した。クラスター解析は、既報に基づいて実施し[1]、Minimum spanning tree (MST) は Grape Tree[2] を用いて作図した。spa-typing およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) は既報に従い実施した[3, 4]。菌株の毒素遺伝子型別はマルチプレックス PCR 法で実施した[4]。

【実施内容・結果】

2011 年から 2020 年に発生したブドウ球菌食中毒事例において分離された菌株の MLVA 型別結果を表 1 に示す。同一事例において複数の検体から菌が分離された場合、保有する毒素遺伝子型に対応して、異なる MLVA 型に型別された。同じ毒素遺伝子型の菌株を比較すると、事例 3

表1 食中毒事例分離株の遺伝子型別結果

事例区分	菌株番号	毒素型	MLVA型名	spa-type	PFGEパターン
事例1	SFP1-01	<i>sea</i>	SaMLVA00055	t127	I-1
	SFP1-02	<i>sea</i>	SaMLVA00055	t127	I-1
	SFP1-03	<i>sea</i>	SaMLVA00055	t127	I-1
	SFP1-04	<i>sea</i>	SaMLVA00055	t127	I-1
	SFP1-05	<i>sea</i>	SaMLVA00055	t127	I-1
事例2	SFP2-01	<i>sea</i>	SaMLVA00290	t701	II-1
事例3	SFP3-01	<i>sea, sec</i>	SaMLVA00286	t304	III-1
	SFP3-02	<i>sea, sec</i>	SaMLVA00286	t304	III-1
	SFP3-03	<i>sea, sec</i>	SaMLVA00287	t304	III-1
事例4	SFP4-01	<i>sea</i>	SaMLVA00092	t008	IV-1
	SFP4-02	<i>sea</i>	SaMLVA00092	t008	IV-1
	SFP4-03	<i>sea</i>	SaMLVA00092	t008	IV-1
	SFP4-04	<i>sea</i>	SaMLVA00092	t008	IV-1
	SFP4-05	ND*	SaMLVA00209	t002	IV-2
事例5	SFP5-01	<i>sea</i>	SaMLVA00285	t4285	V-1
	SFP5-02	<i>sea</i>	SaMLVA00285	t4285	V-1
事例6	SFP6-01	<i>sea</i>	SaMLVA00159	t095	VI-1
	SFP6-02	<i>sea</i>	SaMLVA00159	t095	VI-1
	SFP6-03	<i>sea</i>	SaMLVA00159	t095	VI-1
	SFP6-04	ND	SaMLVA00301	t5072	VI-2
	SFP6-05	<i>sea</i>	SaMLVA00159	t095	VI-1
	SFP6-06	<i>sea</i>	SaMLVA00159	t095	VI-1
事例7	SFP7-01	ND	SaMLVA00328	t359	VII-1
	SFP7-02	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00047	t127	VII-2
	SFP7-03	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00047	t127	VII-2
	SFP7-04	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00047	t127	VII-2
	SFP7-05	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00047	t127	VII-2
	SFP7-06	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00047	t127	VII-2
事例8	SFP8-01	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-02	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-03	<i>sec</i>	SaMLVA00268	t537	VIII-2
	SFP8-04	ND	SaMLVA00112	new type	VIII-3
	SFP8-05	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-06	<i>sec</i>	SaMLVA00268	t537	VIII-2
	SFP8-07	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-08	<i>seb</i>	SaMLVA00016	t189	VIII-4
	SFP8-09	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-10	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-11	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-12	<i>sec</i>	SaMLVA00268	t537	VIII-2
	SFP8-13	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
	SFP8-14	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1
SFP8-15	<i>sec</i>	SaMLVA00268	t537	VIII-2	
SFP8-16	<i>sec</i>	SaMLVA00100	t1767	VIII-5	
SFP8-17	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1	
SFP8-18	ND	SaMLVA00180	t065	VIII-6	
SFP8-19	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1	
SFP8-20	<i>sea, seb</i>	SaMLVA00040	t127	VIII-1	
SFP8-21	ND	SaMLVA00021	t189	VIII-7	
SFP8-22	<i>sec</i>	SaMLVA00268	t537	VIII-2	

*ND；検出されず

(SFP3-01 から SFP3-03) と事例 8 (SFP8-06、SFP8-12、SFP8-15、SFP8-22 と SFP8-16) を除いて、同一事例で分離された菌株はすべて同一の MLVA 型であった。事例 3 の分離菌株のうち、SFP3-03 は SFP3-01 および SFP3-02 に対して、1 遺伝子座のみリピート数に差が見られる single locus variant (SLV) であった。また事例間で MLVA 型を比較したところ、異なる事例の分離株は、すべて異なる MLVA 型であった。

次に、既存の分子疫学的解析手法である *spa*-typing および PFGE と MLVA の結果を比較した。事例 1, 7, 8 の原因菌株は、*spa*-typing ですべて t127 に型別された。また事例 8 で分離された菌株 SFP8-08 と SFP8-21 はいずれも t189 と型別された。これらの菌株は MLVA および PFGE では異なる遺伝子型に型別された。SFP3-01 および SFP3-02 と SFP3-03 は、MLVA による遺伝子型別では SLV であったが、*spa*-typing および PFGE では同一遺伝子型であった。

食中毒由来株 50 株を含む、黄色ブドウ球菌保存株 410 株のクラスター解析結果を図 1 に示す。保存株 410 株は 22 のクラスターに型別され、食中毒の原因菌株は 4 つのクラスターに分類された (クラスター b, d, h および t)。クラスター d および t は、複数事例の原因菌株が属していた。クラスター b および d は、それぞれ 32 株および 82 株が属しており、多様な検体由来株から構成されていた。クラスター h および t は、それぞれ 21 株および 17 株で構成されており、食中毒事例株を除くと、ヒト手指由来株と鶏肉由来株が大半を占めていた。

【考察と今後の課題】

黄色ブドウ球菌は、健康な人の約 40% が保菌しており [5]、食中毒調査時には摂食者以外からも本菌が検出される場合がある。そのため、ブドウ球菌食中毒の原因究明調査においては、検体から分離された菌株を型別し、その同一性を評価することが重要である。本研究で解析対象とした食中毒事例においても、半数の事例 (8 事例中 4 事例) で異なる遺伝子型の菌株が分離されており、分子疫学的解析の必要性を示している。

spa-typing は、黄色ブドウ球菌が保有する Protein A 遺伝子の塩基配列の多様性に基づく分子疫学的解析手法で、1 遺伝子の塩基配列解析のみで型別できることから、迅速かつ簡便な型別法である。しかし、その型別能は他の解析法に劣る。PFGE は、現在様々な菌種における分子疫学的解析の標準法に位置づけられており、非常に高精度な型別結果が得られる。しかし、その手技は非常に煩雑であり、加えて、解析結果が得られるまで数日を要することから、迅速性、簡便性の面で課題がある。

本研究においても、*spa*-typing で同一遺伝子型に型別されるが、MLVA および PFGE では異なる遺伝子型となる菌株が見られたことから、*spa*-typing は型別能において、MLVA や PFGE に劣ることが確認された。一方、我々が比較した限りでは、MLVA は PFGE と同程度の型別能を有していた。MLVA は、PCR とキャピラリー電気泳動のみで結果を得られるため、手技が簡便で、かつ迅速な型別法である。また、MLVA は多検体処理も容易であることから、食中毒の原因究明調査において、有用な型別法になり得ると考えられた。

同一の感染源に由来する病原細菌は原則的に同一の遺伝子型になるが、一部、異なる遺

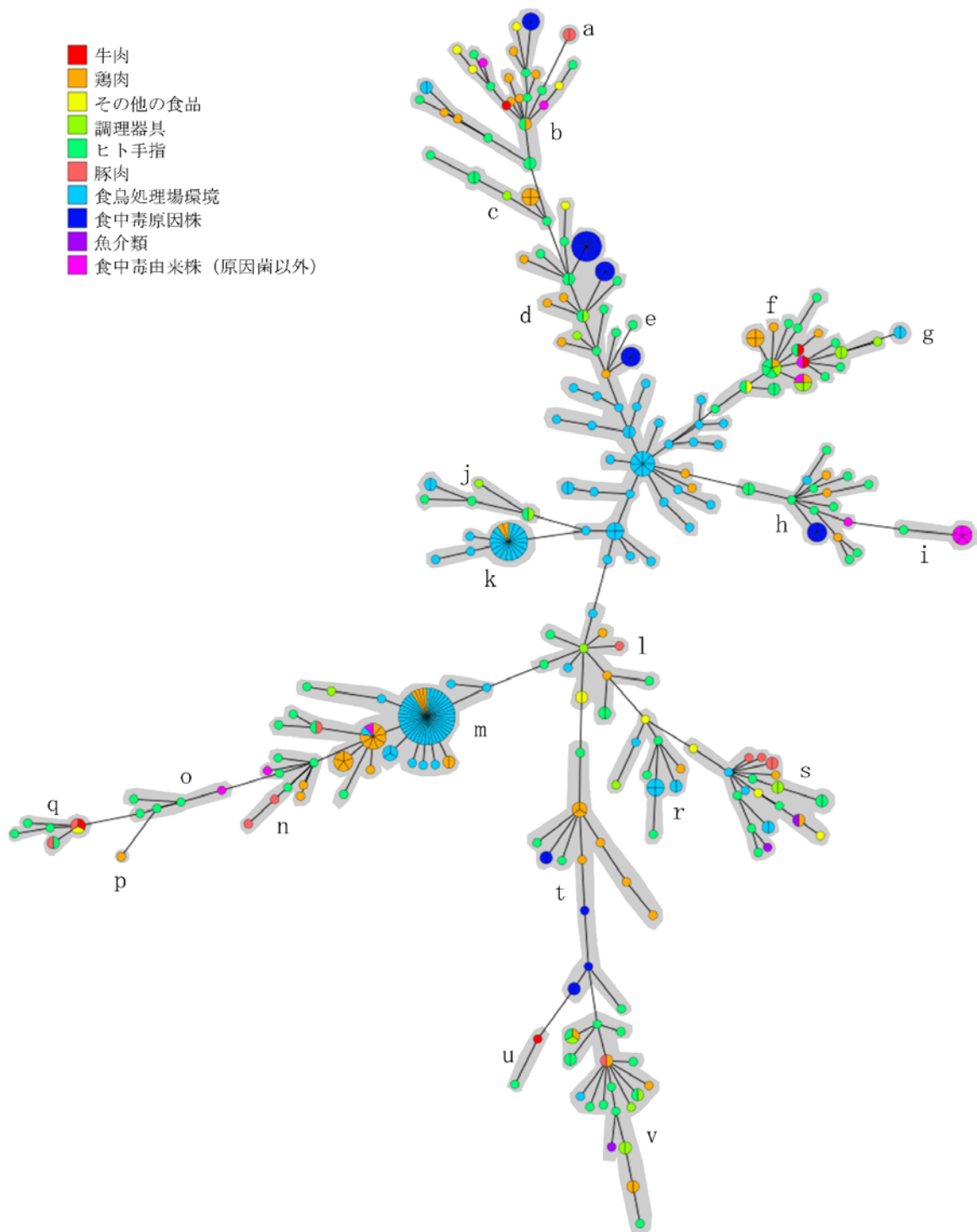


図1. 黄色ブドウ球菌保存株のMLVAプロファイルに基づくMST。各円はそれぞれのMLVA型を表し、円の大きさおよび円の分割数はそのMLVA型に含まれる菌株数を表している。円の色は、菌株由来を表す。クラスター解析で同一となったMLVA型を灰色背景で囲った。

伝子型の菌株が検出される場合がある。腸管出血性大腸菌の MLVA の場合は、同一の集団感染事例で分離された菌株を比較した際に、最大 2 遺伝子座の変異が検出されたことが報告されている [6]。本研究で解析した事例 3 の分離菌株を比較すると、SFP3-03 は SFP3-01 および SFP3-02 に対して SLV であったことから、腸管出血性大腸菌の場合と同様に、同一の

感染源に由来するケースであっても、異なる遺伝子座の菌株が検出される場合があると考えられる。MLVA を用いて黄色ブドウ球菌の集団感染事例を解析した報告はほとんどないため[7]、集団感染事例における黄色ブドウ球菌株の遺伝的多様性について、解析事例の集積が必要である。

ブドウ球菌保存菌株を用いたクラスター解析では、8 事例の食中毒原因菌株は 4 つのクラスターに分類された。このことは、特定の遺伝子型の菌株が食中毒を引き起こしている可能性を示唆している。食中毒事例株とヒト手指由来株あるいは鶏肉由来株は遺伝的に近縁であると考えられ、これらが食中毒発生時の汚染源になる可能性が考えられた。しかし、本研究で使用した菌株は、鶏肉由来株やヒト手指由来株に比べてそれ以外の由来菌株の割合が少ないため、より正確な結果を得るためには、多様性に富んだ菌株セットを用いてクラスター解析を実施する必要がある。

近年、黄色ブドウ球菌の近縁菌である *Staphylococcus argenteus* が食中毒を引き起こす例がしばしば報告されており、新たなブドウ球菌食中毒の原因菌として注目されている[4]。今回、*S. argenteus* についても、同じプライマーセットを用いて MLVA 型別を試みたが、PCR で増幅される遺伝子座が少なく、十分な型別能が得られなかった（データは示さない）。*S. argenteus* の分子疫学的解析手法については、今後の更なる検討が必要であると考えられた。

【参考文献】

1. Sobral *et al.* (2012) PLoS ONE 7:e33967
2. Zhou *et al.* (2018) Genome Res 28:1395-404
3. Ruppitsch *et al.* (2006) J Clin Microbiol 44:2442-8
4. Wakabayashi *et al.* (2018) Int J Food Microbiol 265:23-9
5. Nakano *et al.* (2008) Jpn J Food Microbiol 25:83-8
6. Izumiya *et al.* (2010) Microbiol Immunol 54:569-77
7. Roussel *et al.* (2015) Front Microbiol 6:882

【経費使途明細】

使 途	金 額
蛍光および非蛍光プライマー (各 16 本)	289,234 円
PCR 用消耗品	3,220 円
DNA 抽出試薬	7,546 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円