

(2) 調査・事例

- 1) 天然化学物質による食中毒事例について……………29
- 2) 2004/2005年シーズンに流行したノロウイルスについて……………33
- 3) A群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討……………36

天然化学物質による食中毒事例について

森崎澄江、曾根聡子、荒金真理子、溝腰利男、野尻敏博、立花敏弘

Food poisoning case with Natural compounds

Sumie Morisaki, Satoko Sone, Mariko Arakane, Toshio Mizokoshi,
Toshihiro Nojiri, Toshihiro Tachibana

Key words : 天然化学物質 Natural compounds、ヒスタミン Histamine、
フグ毒 Puffer-fish poison、植物性自然毒 Vegetable natural poison

要旨

2000年度から現在までに行った天然化学物質に関連する検査事例は、不揮発性アミン類3例、フグ毒6例、植物性自然毒が1例で、ふぐ中毒の1例を除き、中毒発症に必要と思われる濃度レベルの天然化学物質を検出した。

はじめに

天然化学物質による食中毒は、ヒスタミンなどの不揮発性アミン類、フグ毒や麻痺性貝毒などの魚貝毒、きのこ毒等の植物毒などに起因するものが代表的なものとしてあげられるが、これらの原因物質を特定する場合、的確な初動調査による情報入手や標準物質等の検査試薬の迅速な入手などの条件が整うことで、良好な結果が得られる。

本県でも、毎年数例の天然化学物質による食中毒事例がみられ、その場合には原因物質を特定するための化学的検査を行っており、2000年度から現在までに行った検査事例について報告する。

試料及び検査方法

当該保健所及び食品衛生監視機動班が搬入した検体について、不揮発性アミン類及びフグ毒は大分県検査実施標準作業書等又植物毒は「食品衛生検査指針」に準拠した方法で実施した。

事例及び検査結果

表1に食中毒事例の概要及び検査結果を示した。
2000年度から現在までに天然化学物質に関連する

検査事例は、ヒスタミン等の不揮発性アミン類の検査が3例、フグ毒検査が6例、植物毒検査が1例あった。

1 不揮発性アミン類による中毒事例

ヒスタミンに代表される不揮発性アミン類による中毒3事例では、表2のとおりヒスタミンがそれぞれ430mg%、270～440mg%、331mg%で、各事例ともアレルギー発症のおそれがあると考えられているヒスタミン濃度100mg%^{1, 2)}を超え、カタベリンなどのアミン類も検出された。

ウルメイワシから270～440mg%のヒスタミンを検出した事例では、イワシ1尾が80g以上あり、1尾でもヒスタミン中毒を起こし得ると考えられることから、販売店に残っていた商品5串についても検査を実施した。1串(3尾)ずつを1検体として検査を実施した結果、すべての検体からほぼ同じ濃度のヒスタミンが検出された。

この事例では、商品は販売前には冷凍保存されていたとのことであったが、朝市での販売ということから店頭での温度管理などに問題があったものと考えられた。

不揮発性アミン類の中毒では、どの事例においても摂食から発症までの時間は早く、30分程度で発疹、しびれ、頭痛、吐き気などの症状が現れる傾向がみられた。

表3に示したように県産の魚介類乾製品不揮発性アミン類の取去検査において、12検体のうち8検体からヒスタミンを検出し、さらに、アレルギー発症のおそれのあるとされる濃度 100 mg%を超えるもの

が3検体あったことから、日常的にヒスタミン中毒が起こる可能性を示唆しており、魚介干物の製造や保存段階での製品管理の指導が求められる。

表1 食中毒とされた事例概要及び検査結果

種別	発生時場所	患者数/摂食者数	概要	検査の結果
ヒスタミン等	2004年9月 日田市	3/3	16日の20時ごろスーパーで購入したサバのピリ辛煮、家族3人で摂食、すぐに2歳の子どもに発疹が現れ、他の2名も味の異常、口の痺れを感じたとのことで、残品の検査を実施した。	ヒスタミン430mg%を検出
	2005年3月 別府市	2/2	朝市でウルメイワシ一夜干し2串(各3尾)を購入し、そのうちの1串を11時ごろ調理して2名が1尾または2尾を摂食、約30分後から2名とも発疹や頭部のしびれなどの症状が現れた。	残り3尾のウルメイワシ 270~440mg%のヒスタミンを検出
	2005年6月 竹田市	9/9	事業所給食施設において集団食中毒の発生の疑いがある旨、管轄保健所に連絡があった。摂食者9名全員が発症、症状は顔面の紅潮、頭痛、吐き気などで、最も早い人は摂食後15分で発症していることから検査を実施した。	当日のメニュー4品目及び吐物 ・サンマ南蛮漬け 331mg%のヒスタミン検出 ・その他は検出しない
ふぐ毒	2001年2月 大分市	1/12	市内飲食店でトラフグ肝を処理し試食したところ、体調不良を訴え病院に搬送された。同飲食店で摂食した11人は異常なかった。	摂食翌日の胃液、胃洗浄液、飲食店の未処理フグ肝、処理済みフグ肝 すべて5MU/g以下
	2001年9月 大分市	1/3	鮮魚店が調理販売したトラフグ肝を家庭で食した男性1名が手・足・口のしびれ症状を提示した。	・患者宅の調理済み肝臓 450MU/g ・患者宅の調理済み筋肉、皮 5MU/g以下 ・鮮魚店の天然トラフグ肝臓、筋肉、皮 5MU/g以下
	2002年10月 佐伯市	1/1	釣ったふぐ1匹(クサフグ 推定)を調理して食したところ、口のしびれなどを呈し救急車で搬送された。	吐物 摂食後3時間後 191MU/g 翌日 6.2MU/g
	2003年8月 大分市	1/1	釣ったふぐ1匹(種別 コモンフグ)を自宅で身と肝臓を煮付け調理して食したところ、30分後ぐらいから唇、舌のしびれ等を呈し入院した。	・調理済み皮残品 860MU/g ・患者宅に廃棄されていた未処理フグ肝 1,600MU/g、筋肉 13MU/g
	2004年3月 佐伯市	1/1	佐伯市内の飲食店で調理提供されたフグ(ヒガンフグ 推定)の肝及び身を食べた男性が全身のしびれ、歩行困難等の症状を呈して入院	・吐物 3MU/g ・調理済み残肝 2,570MU/g ・調理済み残身 65MU/g
	2004年5月 宇佐市	1/1	釣ったふぐ(ショウサイフグ 推定)を自宅で皮一分と筋肉1/5程度をみそ汁に調理して食したところ、おう吐、口唇、手の麻痺等を呈し入院した。	・みそ汁中の身 7.6MU/g ・吐物 3.5MU/g
植物毒	2001年11月 日田市	5/7	ごぼうに混在していたチョウセンアサガオの根を調理して食した家族7名中5名が意識障害、運動障害、散瞳、尿閉、頻脈の症状で受診、うち1名は入院	きんぴらごぼう ・スコポラミン 80μg/g ・ヒヨスチアミン 28μg/g (再分析値)

表2 ヒスタミン中毒事例の関連調査

発生日	摂食者数	患者数	発生場所	検 査 結 果					
				検 体 名	ヒスタミン	カダベリン	チラミン	プトレシン	スベルミジン
2004.9.17	3	1	家庭	サバのピリ辛煮	430	13	1.6	1.9	0.7
2005.3.13	2	2	家庭	ウルメイワシ1尾	440	61	8	3	N.D.
				ウルメイワシ1尾	270	57	7	N.D.	N.D.
				ウルメイワシ1尾	330	72	12	3	N.D.
				ウルメイワシ1串	310	44	4	2	N.D.
				ウルメイワシ1串	270	44	4	3	2
				ウルメイワシ1串	260	34	4	3	2
				ウルメイワシ1串	360	46	4	2	2
				ウルメイワシ1串	290	42	4	3	2
2005.6.3	9	9	事業所給食施設	サンマ南蛮漬け	331	22.1	15.6	9.8	0.7
				検出下限値	5	0.4	2	0.4	0.4

表3 魚介類干物不揮発性アミン類調査

検査日	検 体 名	検 査 結 果			
		ヒスタミン	チラミン	プトレシン	スベルミジン
2003.8.19	真イワシ丸干し	211	21.4	5.1	4.8
	真イワシ丸干し	N.D.	N.D.	N.D.	1.2
	ウルメイワシ丸干し	250	15.3	9.4	4.4
	片口イワシ丸干し	38.6	13.2	8	6.1
	アジ開き	N.D.	N.D.	N.D.	1.2
	甘造り干魚	45.1	6.4	10.7	5.4
	片口イワシ丸干し	104	20.1	13.4	6.2
	タレ干し	35.3	9.8	4.6	4.8
	ウルメ丸干し	32	N.D.	2.4	4.7
	甘造りイワシ丸干し	17.5	2.5	0.83	4.4
		検 出 下 限 値	5	2	0.4

2 フグ中毒事例

フグ中毒は、全国的にみて毎年どこかで食中毒が発生し、死亡率が高いことが知られており、本県でもほぼ毎年発生しているものの、1989年から死者は出ていない³⁾。

今回の事例では、6例中3例が飲食店及び鮮魚店に関連するものであったが、1例は毒の検出ができなかった。また、3例が自家中毒で、調理済み食品から860MU/gと高い毒力を有する例もみられ、フグ毒の最少致死量10,000MU⁴⁾からみると、十数グラム程度でも死亡する危険はあると推測できた。また、6事例のうち4事例はフグの肝を摂食したことによるものである。

当センターでフグの研究を長年行ってきた淵は、フグによる食中毒を防ぐために①素人が料理をしない、②肝臓などの内臓を食べないことを提唱してい

る⁵⁾。フグの内臓は厚生労働省の通知⁶⁾では可食部位に含まれないことから、食することによるリスクは当然大きいと考えられ、フグ肝に代表される内臓を食する習慣を無くすための一層の周知が必要と思われる。

3 植物毒による中毒事例

既報⁷⁾のとおり、原因がはっきりしないが、外因性の中毒の疑いがあるということで始まった事例は、調査の結果、きんぴらごぼうからスコポラミン及びヒヨスチアミンが検出され、自家菜園でごぼうを採取した際にチョウセンアサガオの根が混入していたことが原因とされる、植物性自然毒トロパンアルカロイドによる食中毒と判明した。

届け出を受けた保健所で、迅速且つ的確な初動調査が行われ、チョウセンアサガオの誤食による可能

性が高いという絞り込みができたことが、検査法や原因物質の予測につながり、初動調査の情報の質がいかに重要であるかを示す例となった。

きんぴらごぼうから検出されたスコポラミン及びヒヨスチアミンは、それぞれ80 μ g/g、28 μ g/gで、過去の中毒事例などから成人の中毒量が5mg前後であるといわれている^{8), 9), 10)}ことから、きんぴらごぼう約50g程度の摂取で中毒量に達したものと推定された。

ま と め

2000年度から現在までに行った化学的検査で、食中毒原因物質の調査を行った事例は、不揮発性アミン類によるものが3例、フグ毒によるものが6例、植物性自然毒によるものが1例あり、ふぐ中毒の1例を除き、中毒発症に必要な濃度レベルを検出しており、魚介干物については、保存や販売段階での製品管理の指導、フグについては、肝に代表される内臓の危険性についての一層の周知が必要と思われた。

参 考 文 献

- 1) 江頭勝 他：魚のヒスタミンによるアレルギー様食中毒に関する研究Ⅱ—うるめいわし丸干しの塩分濃度及び保存温度とヒスタミン生成の関係—, 福岡市保環研報, 25, 60-63 (2000)
- 2) 日本薬学会編：「衛生試験法・注解」, 176-179 (2000), 金原出版
- 3) 大分県生活環境部食品安全・衛生課編：「平成16年大分県食中毒事件録」, 12 (2005, 3)
- 4) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針（理化学編）, 日本食品衛生協会, 296-300 (1991)
- 5) 淵祐一：フグ毒について一食中毒を防止するために—, 大分市医師会医学雑誌, 25 (1), 2-21 (2000)
- 6) 厚生省環境衛生局長通知：フグの衛生確保について, 昭和58年12月2日, 環乳第59号
- 7) 立花敏弘 他：チョウセンアサガオによる食中毒事例, 大分県衛生環境研究センター年報, 第29号, 48-50, (2001)
- 8) 大住優子、池田憲廣、山本雅世他：医薬品製剤 安田和男他 他：食品衛生学雑誌 Vol. 22, No. 5
- 9) 伊勢田堯、伊勢田成子：精神医学, 15, 627~634 (1973)
- 10) 米国国立職業安全衛生研究所編：化学物質毒性データ総覧、第2版 (1977)

2004/2005年シーズンに流行したノロウイルスについて

田代潔子、小河正雄、吉用省三

Norovirus disease in Oita Prefecture at 2004/2005 season

Kiyoko Tashiro, Masao Ogawa, Shozo Yoshimochi

Key words : ノロウイルス Norovirus、胃腸炎 gastroenteritis

要旨

2004年度に大分県で発生した集団胃腸炎、散発性のウイルス性感染性胃腸炎及びカキから検出したノロウイルスの遺伝子型を調査した。結果、遺伝子群はG IよりもG IIが多く、遺伝子型ではG II/4が最も多く検出され、次いでG I/8、G II/6、G II/1、G I/12が多く検出された。

はじめに

ノロウイルスは、1968年アメリカ合衆国のオハイオ州ノーウォークの小学校で発生した集団胃腸炎の患者から検出されたウイルスで、当時はノーウォークウイルスと呼ばれていた。その後、小型球形ウイルス、SRV、SRSV、ノーウォーク様ウイルス、NLVなど、様々な呼ばれ方をしていたが、2002年8月の国際ウイルス命名委員会で「ノロウイルス」と命名され、この委員会の決定により、2003年8月の食品衛生法改正により名称変更された。

ノロウイルスは、冬季胃腸炎の主な病因であり、感染経路は主に経口感染であり、汚染された貝類等の食材を調理する事による食物-ヒト感染や、患者の吐物、便などから直接感染するヒト-ヒト感染が考えられる。2004年末から2005年初めにかけて広島県福山市の特別養護老人ホームでノロウイルスによる死亡事故が発生し、介護老人施設や児童施設、病院等からノロウイルスの検査依頼が増加した。

ノロウイルス遺伝子は、G I、G IIの群に大別され、さらにG Iは14種、G IIは17種に型分類される¹⁾。我々は、ノロウイルスについて、以前からG IとG IIの分類を行っており、大分県においては、G IIが多く分離されることが明らかとなってきた。しかし、遺伝子型については不明であったため、2003年度より発生した集団胃腸炎、感染症発生動向調査で依頼された散発性のウイルス性感染性胃腸炎及び、

取去したカキ等の二枚貝から検出されたノロウイルスについて、その流行状況を知るため遺伝子型を調査している²⁾。今回、2004年度における調査状況を報告する。

材料及び方法

検査材料は、2004年4月から2005年3月の間に発生した食中毒や感染症の集団胃腸炎30事例に関連した便163検体、吐物18検体、食品23検体、及び散発性のウイルス性感染性胃腸炎として感染症発生動向調査で検査依頼のあった便21検体を用いた。また、2004年12月と1月に取去したカキ等の二枚貝24検体を用いた。

ノロウイルスの検出は、平成15年11月5日付け食安監発第1105001号厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知「ノロウイルスの検出法について」に基づいて、RT-PCR法でウイルス遺伝子を検出し、シーケンスによる遺伝子配列はClustal Xでアラインメントを行い、TreeViewで系統樹を作成し、遺伝子型を決定した。

結果及び考察

1 集団事例

30事例中20事例からノロウイルスを検出した。ノロウイルスが検出されなかった10事例中4事例から病原性細菌が検出され、残りの6事例からは病原体

は検出されなかった。(表1)。患者からノロウイルスG IIが単独で検出されたのは13事例(検出事例の65%)、ノロウイルスG Iが単独で検出されたのは2事例(10%)、ノロウイルスG IとG IIの混合が5事例(25%)あった。G IIの遺伝子型は、G II/4が最も多く16事例から検出され、次いでG II/1が2事例、G II/6が1事例、G II/3が1事例から検出された。G Iの遺伝子型は、G I/8が最も多く4事例から検出され、次いでG I/12が2事例、G I/1が1事例から検出された。

ウイルスの検出状況を月別に見ると、G Iでは、G I/8が12月に1事例、1月に3事例、G I/12が1月に2事例、G I/1が1月に1事例検出された(図1)。G IIでは、G II/4が5月に1事例、12月に2事例、1月に13事例検出され、G II/1が1月に2事例、G II/6が1月に1事例、G II/3が2月に1事例検出された(図2)。

事例8、9、10は飲食店関係の事例であるが、患者と従業員から同じ型(G I/8、G II/4)が検出された。また、事例12、13は病院や介護老人施設であるが、患者と従業員から同じ型(G II/4)が検出された。ノロウイルスは10~100個程度の極微量で感染することから、飲食や介護に従事する場合は、充分注意することが重要である。

2 散発事例

便21検体中、10検体からノロウイルスを検出した。その内、G Iを3検体、G IIを7検体から検出した。遺伝子型別に見ると、G II/4を5検体、G II/6を2検体、G I/8を2検体、G I/11を1検体から検出し、G II/4が散発事例でも主流であった(表2)。

表1 ノロウイルス感染症集団発生事例

事例番号	発生月	検体数			検出されたノロウイルスの遺伝子型(検出数)				備考
		便	吐物	食品	合計	患者	従業員	食品	
事例1	5	1			1				C. jejuni (黄色ブドウ球菌)
事例2	5	2			2	G II/4(1)			
事例3	7	2			2				
事例4	8	1			1				腸炎ビブリオ (01:K25)
事例5	8	10			10				EPEC, C. jejuni、黄色ブドウ球菌
事例6	11	7	2	6	15				黄色ブドウ球菌
事例7	11	6		2	8				
事例8	12	10	3		13	G I/8(6)		G I/8(3)	
事例9	12	12	1		13	G II/4(4)		G II/4(1)	
事例10	12	11			11	G II/4(4)		G II/4(2)	
事例11	1	11	8		19	G II/4(16)			
事例12	1	12			12	G II/4(10)		G II/4(2)	
事例13	1	18			18	G II/4(9)	G I/8(5)	G II/4(1)	
事例14	1	4			4	G I/8(4)	G II/4(1)		
事例15	1	4			4	G II/4(4)			
事例16	1	6			6	G II/4(6)			
事例17	1	1			1				
事例18	1	6			6	G II/1(5)	G II/4(1)	G I/8(1)	
事例19	1	4			4	G II/1(1)	G I/12(1)		
事例20	1	8		6	14	G I/1(2)			
事例21	1	2			2	G II/4(1)			
事例22	1	10	3		13	G II/4(3)	G I/12(1)		
事例23	1		1		1				
事例24	1	4			4	G II/6(3)	G II/4(1)		
事例25	1	3			3	G II/4(3)			
事例26	1	4			4	G II/4(4)			
事例27	1	1			1	G II/4(1)			
事例28	2			9	9				
事例29	2	1			1				
事例30	2	2			2	G II/3(2)			
合計		163	18	23	204				

表2 ノロウイルス感染症散発事例

No.	検体採取月	遺伝子型
1	12	G II/6
2	12	G II/4
3	1	G II/4
4	1	G II/4
5	1	G I/11
6	1	G II/4
7	1	G II/4
8	1	G I/8
9	2	G I/8
10	2	G II/6

表3 2枚貝のノロウイルス検出状況

No.	検体採取月	検体数	検出ウイルス (検出数)	備考
1	12	12		
2	1	12	G II/4(2)	カキ

表4 集団事例、散発事例、食品におけるノロウイルスの検出状況

遺伝子型	集団事例	散発事例	食品
G I/1	1		
G I/8	4	2	
G I/11		1	
G I/12	2		
G II/1	2		
G II/3	1		
G II/4	16	5	2
G II/6	1	2	

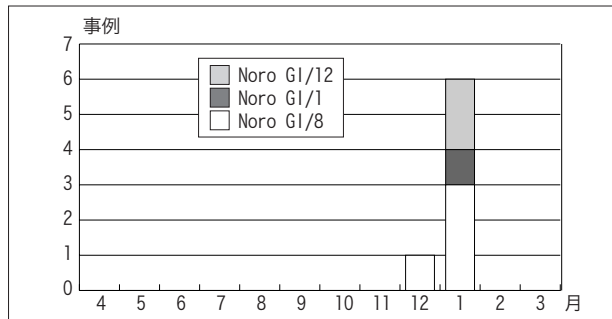


図1 ノロウイルスG Iの流行状況 (集団事例)

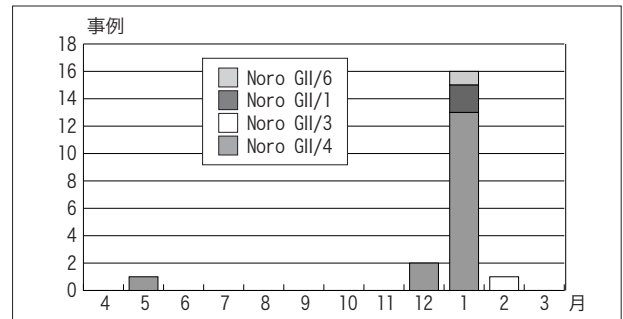


図2 ノロウイルスG IIの流行状況 (集団事例)

3 食品検査

12月に収去したカキからは検出されなかったが、1月に収去したカキ2検体からG II/4を検出した。12月に検出がなく、1月に検出された理由として、カキの体内(中腸腺)にノロウイルスを濃縮することが挙げられる。(表3)

が、今回検出されたのは8種であった。昨年より遺伝子型の調査を行っているが、昨年検出された7遺伝子中、4遺伝子(G II/4、G I/8、G I/1、G II/3)が同じであった。年によりどのような遺伝子型のノロウイルスが流行しているのか、今後、データをさらに積み重ねて明らかにしていきたい。

ま と め

参 考 文 献

今回集団事例について、食材からは検出されず、患者の吐物、便などから直接感染するヒト-ヒト感染が示唆された。

また、検出された遺伝子型で最も多いのがG II/4であり、次いでG I/8、G II/6、G II/1、G I/12であった(表4)。G II/4が、全体の59%と多い傾向にありこれは、世界的傾向と同じであった³⁾。また、G I型の事例が2004年以前はG I/1がほとんどであったが、今年度は、G I/8が6事例発生しており、今後の動向が注目される。

G IとG IIの遺伝子型が現在合わせて31種ある

- 1) IDWR 2004年第11週 第6巻 第11号 14-19 感染症の話 ノロウイルス感染症
- 2) 小河正雄、田代潔子、吉用省三：2003-2004シーズンに流行したノロウイルスについて、大分県衛生環境研究センター年報, 31, 23 - 25 (2003)
- 3) Gallimore CI, Green J, Lewis D, Richards AF, Lopman BA, Hale AD, Eglin R, Gray JJ, Brown DW: Diversity of norovirus cocirculating in the north of England from 1998 to 2001., J. Clin. Microbiol., 42, 1396-1401, 2004

A群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討

緒方喜久代、鷺見悦子、長谷川昭生、内山静夫、久高潤^{*1}、岸川恭子^{*2}、
尾崎延芳^{*3}、瓜生佳世^{*3}、丸住美都里^{*4}、松岡由美子^{*4}

^{*1} 沖縄県衛生環境研究所、^{*2} 佐賀県衛生薬業センター、^{*3} 福岡市保健環境研究所、^{*4} 熊本市環境総合研究所

Genotypes and Bacteriological Character of Group A Streptococcal Strains

Kikuyo Ogata, Etsuko Washimi, Akio Hasegawa, Shizuo Uthiyama,
Jun Kudaka^{*1}, Kyoko Kishikawa^{*2}, Nobuyoshi Ozaki^{*3}, Kayo Uryu^{*3},
Midori Maruzumi^{*4}, Yumiko Matsuoka^{*4}

Key words : A群溶レン菌 Group A Streptococcal Strains、遺伝子型 Genotype

はじめに

A群溶血レンサ球菌（以下、A群溶レン菌）が関与する感染症は多種多様で、小児の咽頭炎や扁桃炎などの気道感染症や猩紅熱の原因菌として知られているとともに、多臓器不全や手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を起し、急激な病態を惹起する劇症型溶血レンサ球菌の原因菌としても知られている。

一方、本菌で汚染された飲食物を喫食した人が咽頭痛、発熱等の臨床症状を呈する、いわゆる食品を介した集団感染事例が埼玉県、東京都、高知県、茨城県などで報告されており、九州地区においては1997年に福岡市（TB3264）、1998年に熊本市（T28）において、その報告がある。

今回、食品を介した集団感染事例（2事例）由来株と同一のT型を有する溶レン菌感染症と診断された小児の咽頭ぬぐい液由来株について、パルスフィールド電気泳動法（以下、PFGE法）の分子疫学的解析の有用性を検討し、発赤毒遺伝子型（以下、spe型）についても併せて検討したので報告する。

材料及び方法

1. 材料

1997年5月に福岡市、1998年9月に熊本市で発生

した集団感染由来株、計18株と溶レン菌感染症と診断された小児の咽頭ぬぐい液由来株、計6株について検討した。同定方法¹⁾は、馬血液寒天培地上で明らかなβ溶血を示し、カタラーゼ陰性、グラム陽性球菌であることを確認後、血清群別キットを用いてA群抗原を保有することおよびピロリドニルアルリアミダーゼ活性試験（以下、PYR試験）陽性であることで行った。

2. PFGE法

PFGE法は、図1に示す方法で実施した。「我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究（A群溶レンサ球菌）」等^{2)、3)、4)}を参照に、①溶菌液の工夫、②使用する制限酵素、③泳動条件について検討した。

3. 発赤毒遺伝子型別法

A群溶レン菌が保有するspeA、speBおよびspeC遺伝子の検出をPCR法で行った。つまり、被検菌をTodd-Hewittプロスで36℃、16-20時間培養した菌液1,000 μlを1.5 mlの滅菌チューブに分取する。12,000rpm5分遠心後、沈渣に滅菌蒸留水を1,000 μl加えよく混和後、12,000rpm5分遠心する。沈渣に滅菌蒸留水を100 μl加えよく混和後、100℃、10分加熱して溶菌し、遠心後その上清をPCRサンプルとした。プライマー、PCR条件は国立感染症研究所より示された「A群溶血レンサ球菌」¹⁾に従って行った。

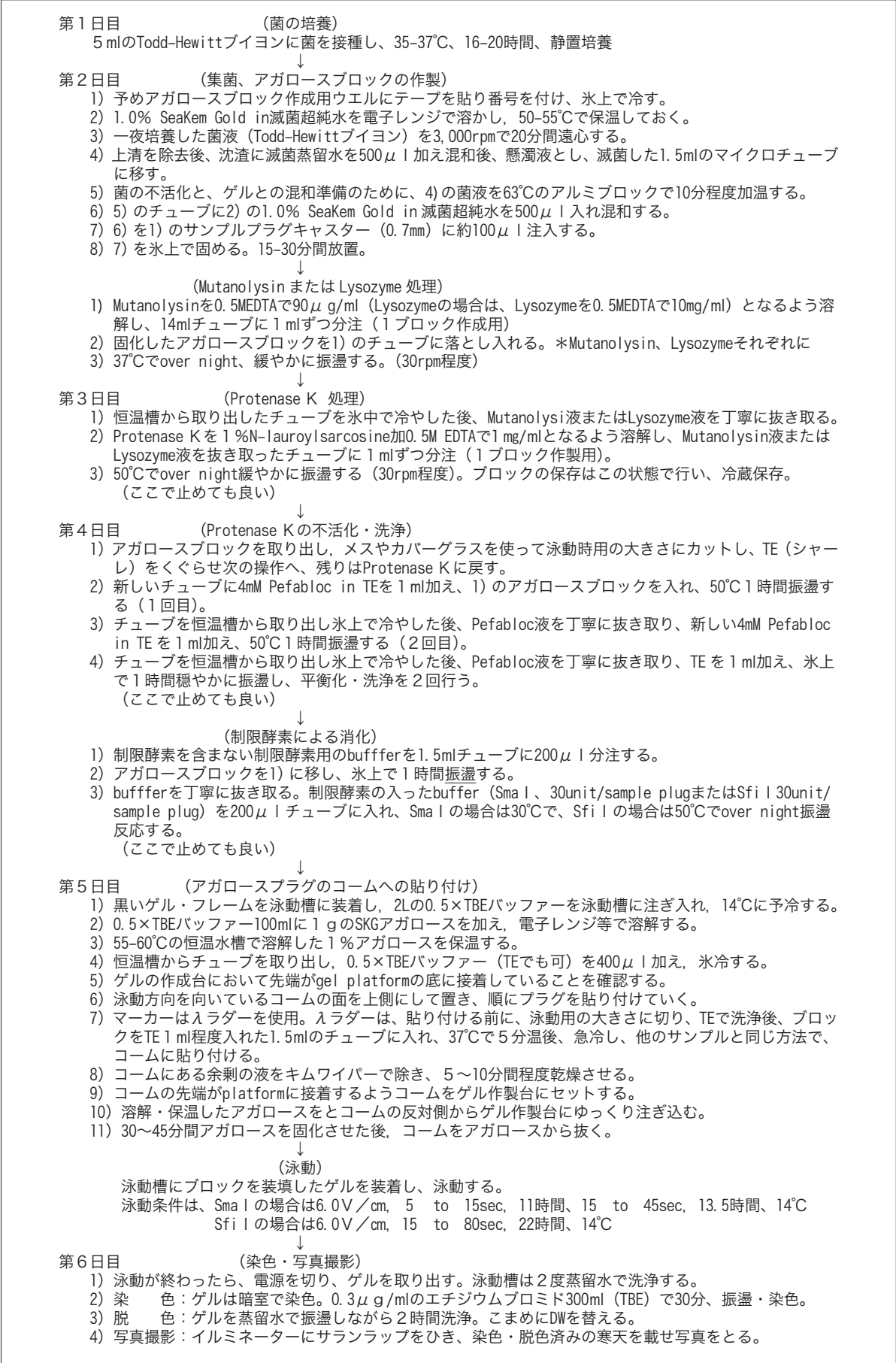


図1 溶レン菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

結 果

1. 各事例由来株の*Sma* I および*Sfi* I による切断パターン

福岡市事例由来14株中、代表4株（レーン2, 3, 4, 5）とT型別が同一の咽頭ぬぐい液由来株3株（レーン6, 7, 9）（T-B3264）と熊本市事例由来株4株中、代表2株（レーン10, 11）とT型別が同一の咽頭ぬぐい液由来株3株（レーン12, 13, 14）（T-28）の泳動パターンを図2, 3, 4, 5に示した。

Sma I および*Sfi* I ともに福岡市事例由来4株はいずれも同一パターンを示し、同じT-B3264でも咽頭ぬぐい液由来の3株とは異なるパターンを示した。

一方、熊本市事例由来2株とT型別がT-28と同一の咽頭ぬぐい液由来の3株は、*Sma* I では同一パターンを示したが、*Sfi* I では集団事例由来株と咽頭ぬぐい液由来株との間で異なるパターンを示した。

このことからA群溶レン菌のPFGEには少なくとも2種類の制限酵素を用いて比較することが有用と思われた。

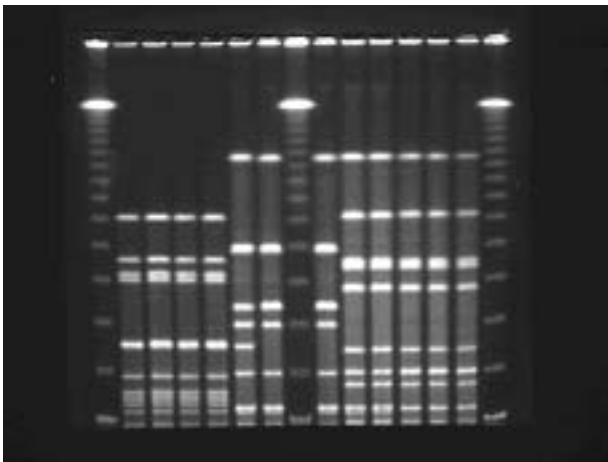


図2 Mutanolysin処理 : *Sma* I

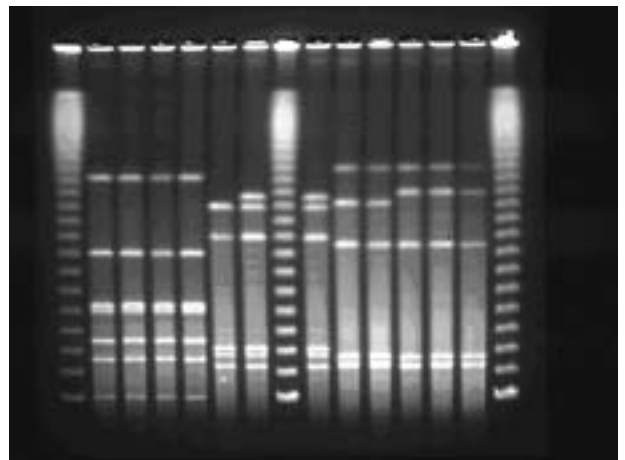


図3 Mutanolysin処理 : *Sfi* I

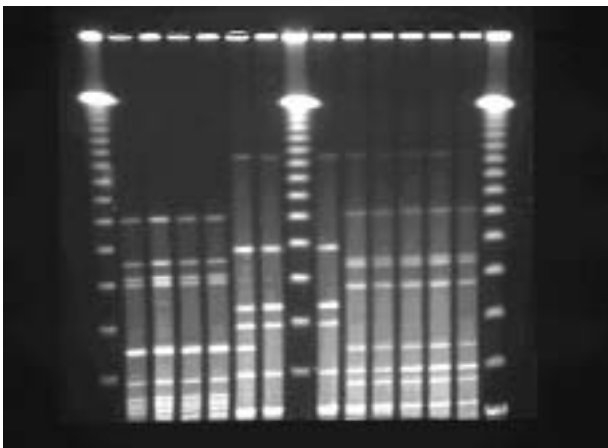


図4 Lysozyme処理 : *Sma* I

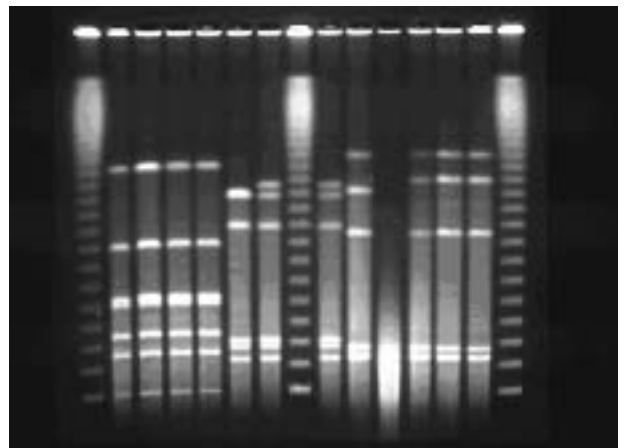


図5 Lysozyme処理 : *Sfi* I

2. Mutanolysin処理とLysozyme処理の比較

各々の泳動パターンを図2, 3, 4, 5に示した。Lysozyme 処理に比べ Mutanolysin で処理をした方が明瞭なバンドを得ることができ、より正確な解析が可能と考えられた。

3. PCR法によるspe遺伝子保有状況

T-B3264 の福岡市事例由来4株と咽頭ぬぐい液由来の3株はspeB遺伝子を保有し、T-28の熊本市事例由来2株と咽頭ぬぐい液由来の3株はspeB,C遺伝子を保有しており、由来による差は認められなかった。

考 察

疫学的解析方法の手段として、PFGE法のほか、T型別やspe遺伝子型などがあるが、同じT型やspe遺伝子型を有する株においてもPFGE法が異なることが確認され、その分子疫学的解析の有用性が示された。A群溶血レン菌のPFGE法でよく使用される制限酵素はSma Iであり、今回も明瞭なバンドが得られたが、Sfi Iを併用し比較することにより、より正確な解析が可能となった。しかし、Sma Iについては、今回の泳動条件では小さいサイズの解析が困難であり改良の余地がある。また、制限酵素を作用させる前の

溶菌処理は明瞭なバンドを得るために重要であり、Lysozyme 処理に比べて Mutanolysin 処理をした方が明瞭なバンドが得られることが示されたが、Mutanolysinは高価であり、その適切な使用量について検討する必要がある。

本内容は、平成16年度総括・分担研究報告書「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」に発表した。

参 考 文 献

- 1) A群溶血レンサ球菌検査マニュアル, 1-31
- 2) 水口康雄、小岩井健司、内村眞佐子、小倉誠、三瓶憲一、市村博：我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究（A群レンサ球菌）、厚生科学研究費補助金 分担研究報告書, 73-81
- 3) 清水俊夫、立石ひとみ、Ahmed SHERIN、太田房雄：1991年と2001年～2002年に分離されたA群溶血性レンサ球菌の血清型、遺伝子型および薬剤耐性の比較, 感染症学雑誌, 78, 1006-1015
- 4) 田中大祐、刑部陽宅、児玉博英：パルスフィールド電気泳動像によるB群溶血レンサ球菌の型別、感染症学雑誌, 69, 455-460

