

食中毒調査におけるDNAフィンガープリント法の重要性

横山 栄二, 岸田 一則, 小岩井健司

The significance of DNA fingerprinting for determination of food poisoning

Eiji YOKOYAMA, Kazunori KISHIDA and Kenji KOIWAI

I はじめに

DNAフィンガープリント法とは、ヒトの識別法として伝統的に行われているフィンガープリント（指紋）法から作られた新造語であり、DNAの型別により遺伝情報を直接解析して微生物の識別を行う方法である¹⁾。細菌の型別としては、リボタイピング、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)、PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動)、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)などが知られているが、中でもPFGEは再現性に優れていることから²⁾感染症や食中毒調査時に感染源の特定などの目的で用いられることが多い。

今回我々は、食中毒調査においてDNAフィンガープリント法を実施することの重要性を再認識する事例に遭遇したのでその概要を報告する。

II 概要

1 事例1 (*Clostridium perfringens*による事例)

社会福祉施設で下痢症患者が発生し、患者便および食品残品の細菌学的検査を検査センターに依頼して実施したが、食中毒の原因菌は検出されなかった。検査センターでは*Clostridium perfringens*の検査を実施していなかったため、管轄保健所で19名分の患者便および食品残品について*C. perfringens*の検査を実施したところ患者便12名分および食品残品から*C. perfringens*が検出され、菌株が当所に搬入された。

2 事例2 (*Aeromonas* spp.による事例)

*Vibrio parahaemolyticus*による食中毒調査の過程で、7名から*Aeromonas* sp.が検出され、菌株が当所に搬入された。

III 材料および方法

1 事例1 (*Clostridium perfringens*による事例)

搬入された*C. perfringens*菌株については、耐熱性A型ウェルシュ菌型免疫血清（デンカ生研）を用いてHobbsの血清型別を実施した。毒素産生性については、変法DS培地³⁾で被検菌を培養後、ウェルシュ菌エンテロトキシン検出キットPET-RPLA（デンカ生研）を用いて毒素産生の有無を調査するとともに、ウェルシュ菌検出用primer set CPE-1 & 2 (TaKaRa)を用いてエ

ンテロトキシン産生遺伝子の有無をPCRで調査した。

DNAフィンガープリント法としては、PFGEを実施した。DNAの抽出はGene Path kit (Bio-Rad)のプロトコルに準じて実施し、制限酵素*Sma* Iおよび*Ksp* Iにより処理した後、パルスタイム5~20秒で20時間泳動した。泳動パターンをDiversity Data Base (PDI)を用いて、ダイス法によりUPGMAクラスター解析を行い、系統樹を作成した。

2 事例2 (*Aeromonas* spp.による事例)

搬入された菌株については、簡易同定キットのBBL CRYSTAL Enteric/Nonfermenter ID Kit (BECTON DECKINSON)を用いて生化学性状を調査した。また、*A. hydrophila*に特有なヘモリジンである*ahh* I⁴⁾および*A. sobria*に特有なヘモリジンであるASA I⁵⁾の保有状況をPCRにより調査した。

DNAフィンガープリント法としては、事例1と同様にPFGEを実施した。制限酵素*Xba* Iにより処理し、パルスタイム20秒で12時間およびパルスタイム5~15秒で17時間泳動し⁶⁾、事例1と同様にUPGMAクラスター解析を行い、系統樹を作成した。

IV 成績

1 事例1 (*C. perfringens*による事例)

搬入された*C. perfringens*菌株は、患者由来12株および食品残品由来1株ともにHobbs 13型であった。

エンテロトキシン産生性は、RPLA法およびPCR法ともに全ての株が陰性であった。

制限酵素*Sma* Iを用いて行ったPFGEでは、食品由来株と患者由来株では若干のバンドの違いが認められた株もあった（図1）が、UPGMAクラスター解析では食品由来株と患者由来株の類似度が90%以上であった（図2）。一方、制限酵素*Ksp* Iを用いて行ったPFGEでは、患者由来株は泳動パターンが類似していたが、食品由来株は泳動パターンが異なっており（図3）、UPGMAクラスター解析による類似度も、食品由来株では低かった（図4）。

2 事例2 (*Aeromonas* spp.による事例)

簡易同定キットによる同定の結果、*A. hydrophila* 4株、*A. sobria* 1株、*A. veronii* 1株、同定不能1株と同定された。

PCRによるヘモリジン遺伝子の保有状況は、7株中5株が*A. sobria*に特異的なASA Iを保有していた（図5）。

制限酵素*Xba* Iを用いたPFGEの結果、分離された*Aeromonas* spp.はヘモリジン保有の有無に関係なく泳動パターンが異なり（図6）、UPGMAクラスター解析による類似度は低かった（図7）。

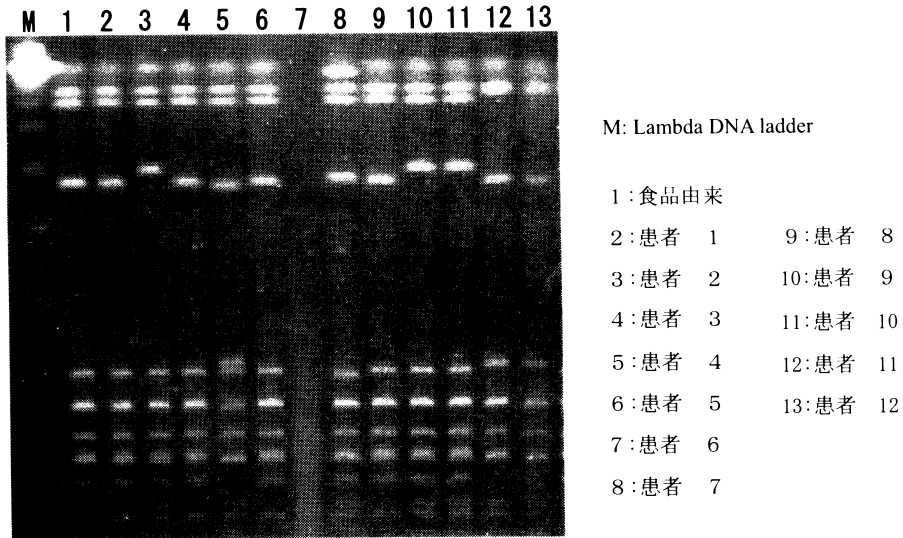


図1 制限酵素 *Sma* I による *C. perfringens* の PFGE 像

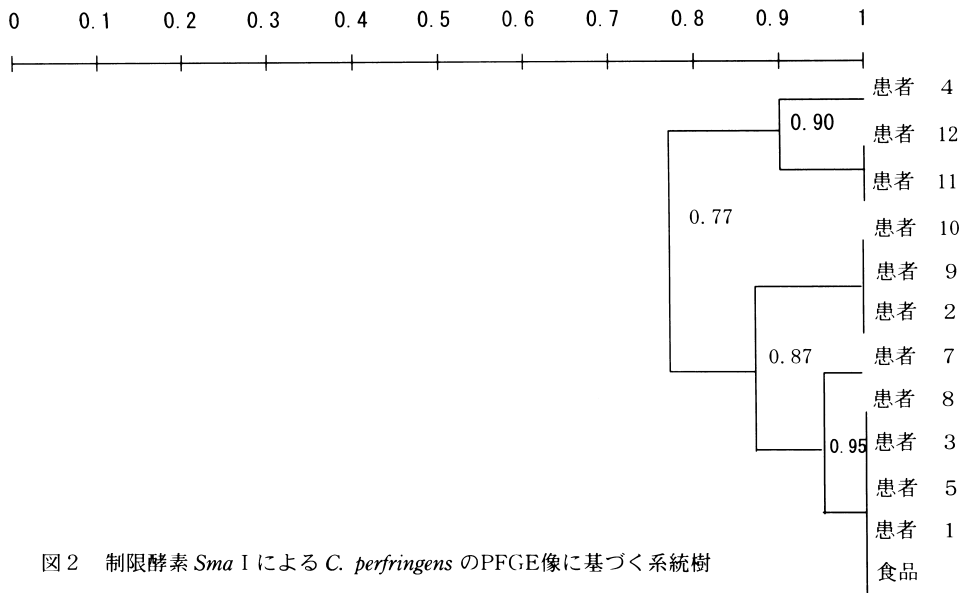


図2 制限酵素 *Sma* I による *C. perfringens* の PFGE 像に基づく系統樹

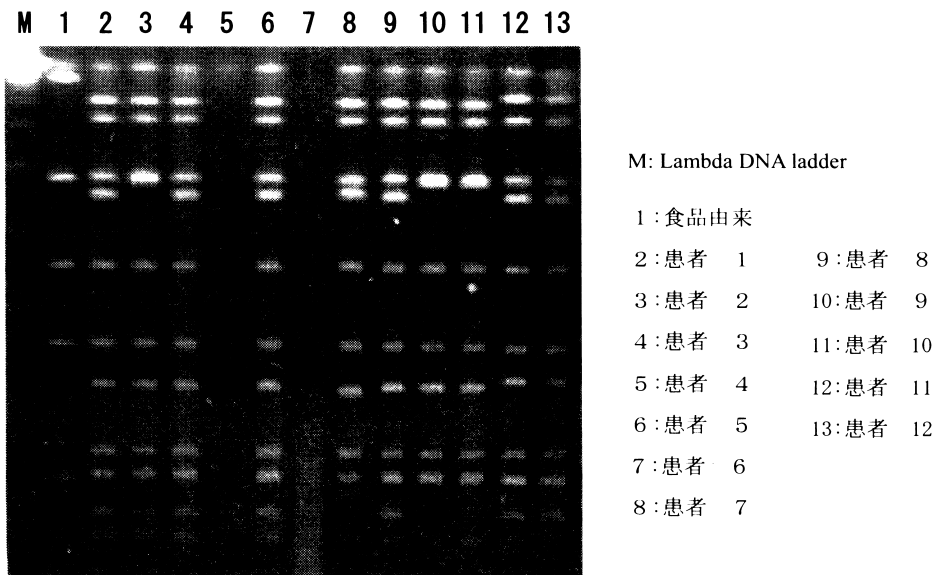


図3 制限酵素 *Ksp* I による *C. perfringens* の PFGE 像

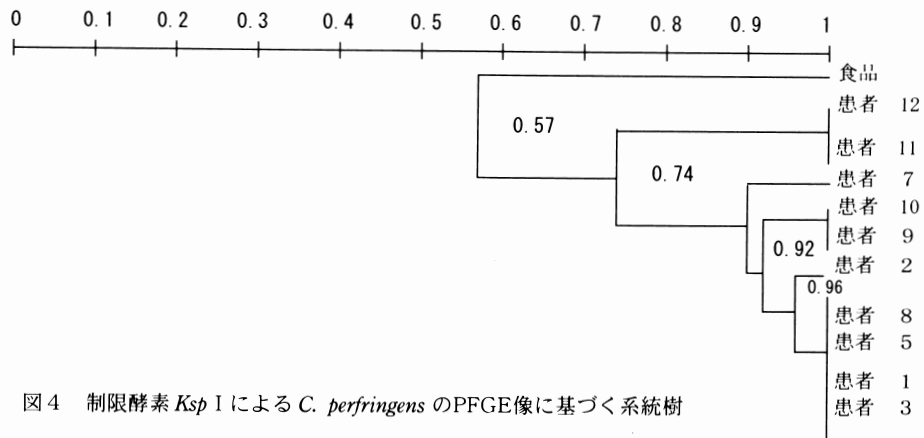


図4 制限酵素 *Ksp* I による *C. perfringens* のPFGE像に基づく系統樹

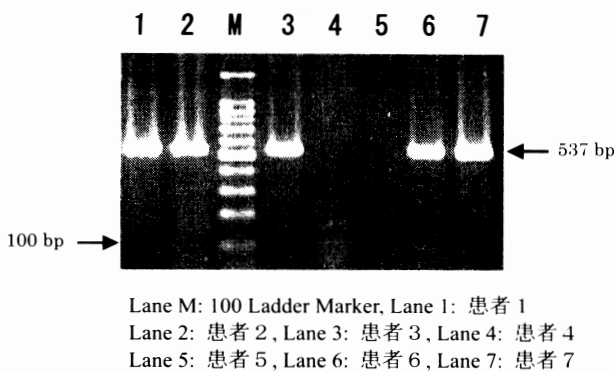


図5 PCR法によるASA1の検出

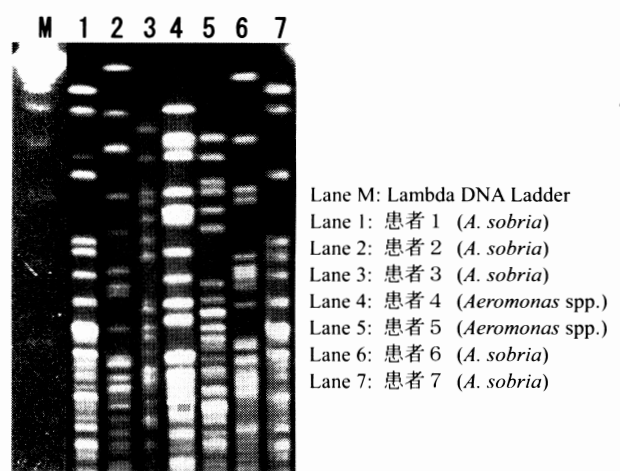


図6 制限酵素 *Xba* I による *Aeromonas* spp. のPFGE像

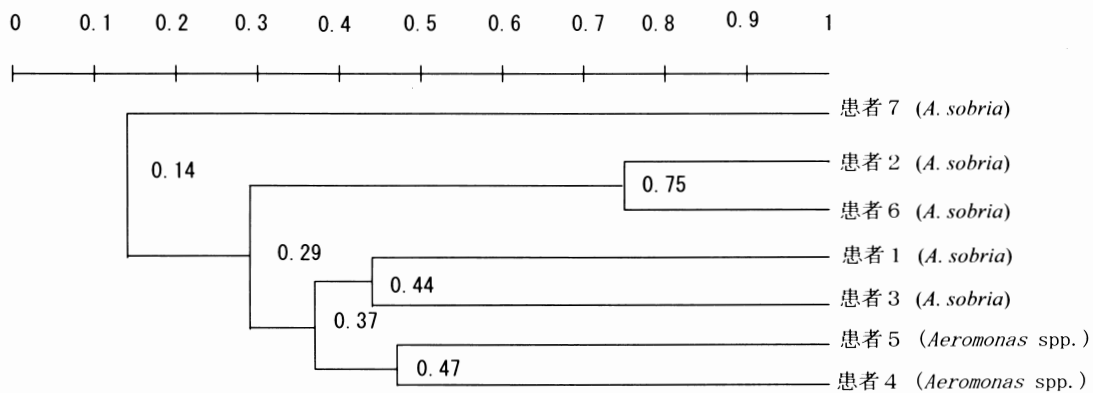


図7 制限酵素 *Xba* I による *Aeromonas* spp. のPFGE像に基づく系統樹

IV 考察

1 事例1 (*C. perfringens*による事例)

C. perfringens はヒトの腸管の常在細菌であるため、食中毒事患者から検出された *C. perfringens* が食中毒に関与していたかどうかを決定するためには、同一血清型の *C. perfringens* が高率に検出されることが必要である⁷⁾。今回の事例では、検体のごく一部ののみが保健所で検査されたに過ぎないが、Hobbs13型の *C. perfringens* が患者便19検体中12検体 (63.2%) から検出され、さ

らに食品からも同一血清型の *C. perfringens* が検出されたため、当初 *C. perfringens* による食中毒が疑われた。しかし、既知のエンテロトキシン産生能は全ての株で陰性であったため、*C. perfringens* が未知のエンテロトキシンを産生すること⁸⁾を考慮すると、食品から分離された *C. perfringens* の病原的意義を決定することが出来なかった。そこで制限酵素 *Ksp* I によるPFGEを行ったところ、患者由来株間ではPFGE像が類似している株も認められたが、食品由来株では明らかにPFGE像の類似度は低く (図3、4)、食品由来株と患者由来株の関連性を否定することが出来た。

ところで、*C. perfringens* のPFGEを行う場合、*Sma* Iを用いると分解能がよいことが報告されているが⁹⁾、今回の食品分離株は*Sma* IによるPFGE像は患者由来株と類似しており(図1, 2)、PFGEを行う場合に複数の制限酵素を用いることの必要性を再認識した。

2 事例2 (*Aeromonas* spp.による事例)

Aeromonas spp.の分類は、従来は生化学性状によって分類されていたが、DNA hybridizationによる分類が提唱されて以降混乱しているため¹⁰⁾、今回の事例で分離された*Aeromonas* spp.についてはPCRにより7株中5株が*A. sobria*に特異的なASA1を保有していた(図5)ため*A. sobria*と同定した。*A. sobria*の病原因子はまだ解明されておらず分離された*A. sobria*が食中毒に関与していたかどうかの決定が出来なかったため、制限酵素*Xba* Iを用いてPFGEを行ったところ、分離された*Aeromonas* spp.はASA1保有の有無に関係なくPFGE像の類似度は低く(図6, 7)、*A. sobria*に汚染された食品による食中毒ではないことが示唆された。

V まとめ

以上のように、DNAフィンガープリント法は、自然界に広く分布し、病原因子などがまだはっきりとわかっていない食中毒細菌が分離された場合に、その病原的な意義の有無を判断する一助となると思われる。

参考文献

- 1) 清水信義 監訳 (1993) DNAサイエンス David A. Micklos and Greg A. Fryer 著 医学書院
- 2) Olive, D. M. and Bean P. (1999) Principles and applic

ations of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol. 37: 1661-1669.

- 3) 大谷仁己, 氏家淳雄 (1987) 変法DS培地におけるウェルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性 食衛誌 28:281-285.
- 4) 沖津忠行 (1996) PCR法によるβ溶血性*Aeromonas hydrophila*のヘモリシン遺伝子型別に関する研究 十全医会誌 105:230-238.
- 5) 柴田幹良, 森田耕司, 渡辺登, 和田博志, 沖津忠行, 山井志朗, 伊藤健一郎, 島田俊雄, 渡辺治雄, 金森政人 (1996) PCR法による*Aeromonas sobria*のヘモリシン遺伝子の検出 感染症誌 70:1266-1270.
- 6) Talon, D., Dupont, M. J., Lesne, J., Thouverez, M. and Briand, Y. M. (1996) Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clinical identification of *Aeromonas hydrophila*. J. Appl. Bacteriol. 80:277-282.
- 7) 善養寺浩, 坂井千三, 寺山武, 工藤泰雄, 伊藤武 (1985) 腸管病原性ウェルシュ菌 腸管系病原菌の検査法 p227-240 医学書院
- 8) 門間千枝, 柳川義勢, 畠山薫, 尾畑浩魅, 横山敬子, 新垣正夫, 甲斐明美, 諸角聖, 五十嵐英夫, 伊藤武 (1999) 新型エンテロトキシンを産生すると推定されたウェルシュ菌とその下痢原性毒素について 第72回日本細菌学会総会抄録 p120
- 9) Maslanka, S., Kerr, J. G., Williams, G., Barbaree, J. M., Carson, L. A., Miller, J. M. and Swaminathan, B. 1999. Molecular subtyping of *Clotridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. J. Clin. Microbiol. 37: 2209-2214.
- 10) 浅尾努 (1998) *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* 防菌防黴誌 26:25-31