

黄色ブドウ球菌食中毒への RAPD 法の適用

徳島県保健環境センター

清水 俊夫*・立石ひとみ

Application of the RAPD method to *Staphylococcus aureus* food poisoning

Toshio SHIMIZU and Hitomi TATEISHI

Tokushima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences

要 旨

黄色ブドウ球菌の分子疫学的手法としての Random amplified polymorphic DNA finger printing (RAPD 法) の有効性について検討した。同一食中毒事件由来のコアグララーゼ型とエンテロトキシン型が同じ黄色ブドウ球菌株は同じ RAPD パターンを示し、コアグララーゼ型やエンテロトキシン型の違う菌株や、これらが同じであっても由来の違う菌株の RAPD パターンは異なっていた。また、RAPD 法はコアグララーゼ型別やエンテロトキシン型別などよりも迅速かつ容易に実施できるため、食中毒事件などにおける汚染原因追及時に菌株のスクリーニングに用いることもできることが分かった。

Key words : 黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*
分子疫学 molecular epidemiology
RAPD 法 Random amplified polymorphic DNA
PFGE Pulsed Field Gel Electrophoresis

I はじめに

黄色ブドウ球菌 (以下、「ブ菌」という。) はヒトの皮膚や上部気道、腸管内の常在菌であり、調理環境や食品を汚染する機会も多い。常在菌であるために、食中毒事件などで検便や食品等からブ菌が分離されても、必ずしも事件と関連があるとはいえず、従来から生物型、コアグララーゼ、エンテロトキシンなどの表現型による型別が行われており、最近では Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) やリボタイピングなどの分子疫学的方法も使用されている。今回、PFGE と比較して迅速かつ容易に実施できる RAPD 法の食中毒事件における分子疫学的有効性について検討したので報告する。

II 材料と方法

1992年から2002年の間に県内で発生したコアグララーゼVII型、エンテロトキシン A, B 産生 (以下、「VII AB」と表記す

*現 徳島県食肉衛生検査所

る。)のブ菌を原因とする4件の食中毒事件で分離されたブ菌株40株及びその他の表現型の食中毒由来株23株を供試した (表-1)。

検便、食品及び食材のブ菌は定法に従って当所で分離、同定した菌株であり、調理場及び従業員の手指の拭き取り由来株は保健所で分離、同定した菌株である。

コアグララーゼ型別はブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用い、エンテロトキシン型別は SET-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いてそれぞれ説明書に従って実施した (図-1)。

RAPD 法は Arbitrary Primer として当所の保有する30種の10塩基対のプライマーから選び出したものを用いて J.G.K.Williams ら (1990) の方法で実施した。方法については図-2に示したが、略述すると以下の通りである。上述のブ菌株をトリプティックケース・ソイ寒天培地で一夜培養した後、EXTRAGEN (東ソー株)を用いて DNA を抽出した。抽出し

表-1 供試験菌株

標準菌株	VII A, B			その他			
	年, 月	菌株数	No. ※	年, 月	型別	菌株数	No. ※
				1992. 7	VII A,B	1	FP154
ATCC25923	1990. 9	8	FP75 ①-81	1992. 8	VII A	3	FP161-163
ATCC29213	1992. 7	8	FP152-159	1993. 8	VII A VII B	3	FP180-182
ATCC43300	1993. 9	8	FP218-225	1995. 7	VII A	3	PF309etc.
	2002. 5	16	FP677-694 (FP681,684 を除く)	1996. 9	III A	3	FP374-376
				1997. 3	VII A	3	FP380-382
				1998. 8	I A VII A	2	FP472,473
				2001.11	VII A	3	FP662-664
				2002. 5	VII A	1	FP681
				2002. 5	VII A	1	FP684
3株	40株			23株			

※ FPNo.: 当所の保存菌株番号

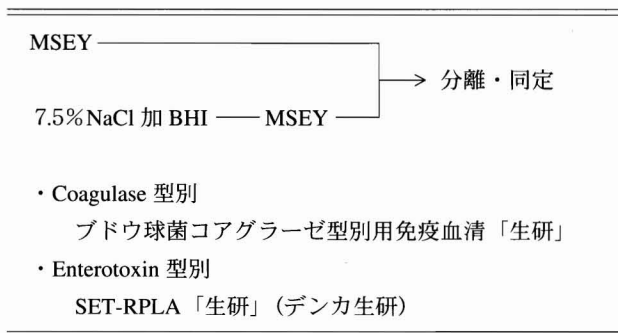


図-1 ブドウ球菌検査法

- DNA 抽出 EXTRAGEN (東ソー)
- RAPD J.G.K.Williams (1990) の方法
Primer AP - 609 5'-CGT-CGT-TAC-C-3'
94°C 3分
94°C 1分
36°C 1分
72°C 1分
72°C 7分
45回
- 泳動 1.5% LO3 in TAE

図-2 RAPD 法

た DNA を鋳型 DNA として AP-609 (5'-CGTCGTTACC-3') を用いて図-2 の条件で PCR を実施した。PCR 産物を 1.5% LO3 ゲルにアプライし、100V・30 分電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色した後、紫外線下で撮影した。

また、RAPD 法に要する時間をコアグラーゼ型別、エンテロトキシン型別などの所要時間との比較も行った。

III 結果及び考察

由来の違う「VII AB」株はそれぞれ異なった RAPD パターンを示し、同じ食中毒事件由来の VII AB 株の RAPD パターンは 1 例を除いて一致した (図-3, 図-4)。図-4 は 1992

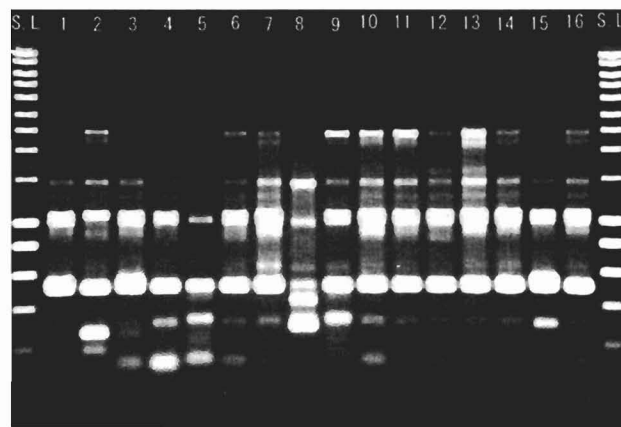


図-3 RAPD Pattern
1990.9 食中毒 VII AB (No.1 ~ No.8)
1993.9 食中毒 VII AB (No.9 ~ No.16)

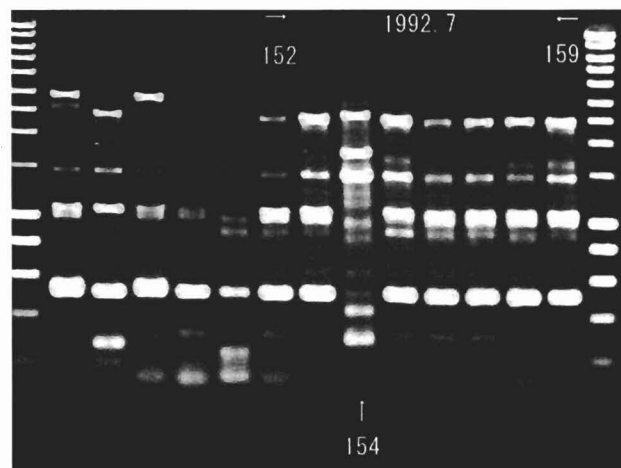


図-4 1992.7 食中毒 VII A, B (No.152 ~ No.159)

年 7 月の VII AB 型による食中毒由来株を RAPD パターンを示したが、全て VII AB であるにもかかわらず、FP154 のパターンだけが異なっており、事件と無関係のものを拾い上げた可能性が考えられる。

図-5 に 2002 年 5 月に発生した食中毒に由来する菌株の RAPD パターンを示した。この中で一人の患者から VII AB

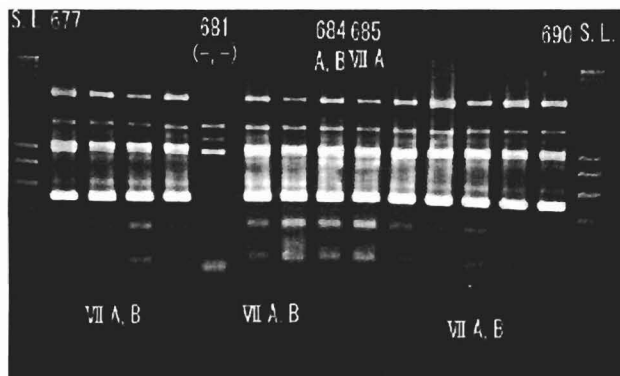


図-5 2002.5 食中毒 RAPD

(FP684) と VII A (FP685) の二つの表現型の菌株を検出したが、これらの RAPD パターンは全く同じであり、この VII A 株は VII AB の B 毒素産生能が欠落した変異株であることが推測された。今回供試した VII AB 以外の菌株では、この菌株を除いて VII AB と同じ RAPD パターンを示した菌株はなかった。また、FP681 は医療機関からこの食中毒事件の患者由来の菌株として提供されたものであるが、コアグララーゼもエンテロトキシンも陰性であり、事件とは無関係であると推測されていたが、RAPD パターンによりそのことが確認された。

表-2 に RAPD の所要時間をコアグララーゼ型別、エンテロ

表-2 純培養からの所要日数

	day 0	day 1	day 2	day 3	day 4
Coagulase 型別	液体培地 (O / N)	凝集阻止 反応	・・(6-72hrs.)・→		
Enterotoxin 型別	振盪培養 (O / N)	RPLA (18hrs.)	判 定		
PFGE	lysozyme (O / N)	Proteinase K	SmaI (O / N)	PFGE (20hrs.)	染色・撮 影
RAPD	6-8hrs.				

トキシン型別及び PFGE と比較した。RAPD に要する時間は DNA 抽出を含めて 8 時間程度と、コアグララーゼ型別 24-48 時間、エンテロトキシン型別 48 時間、PFGE 5 日間と比較して格段に短い時間で実施できた。このことから、RAPD 法は分子疫学的手法として有用なだけでなく、比較的短時間で実施できることから、多数の菌株の中から関連する菌株をスクリーニングするために用いることにより検査そのものの迅速化に役立つことが示唆された。

文 献

- 1) J.G.K.Williams et.al. Nucleic Acids Research, Vol. 18. No.22. 531-535 (1990)