

食中毒由来A群溶血性レンサ球菌の細菌学的検討

林 恵子 松本純子 山下育孝 服部昌志 大倉敏裕 四宮博人
伊藤樹里^{*1} 大内かづさ^{*1} 山内宏美^{*1} 大西利恵^{*1} 豊嶋千俊^{*1}
山本真司^{*1} 井上 智^{*1} 越智幸枝^{*1} 吉江里美^{*1} 岡本哲也^{*1} 上満祐子^{*1}
伊藤弘子^{*1} 川村直美^{*1} 青木紀子^{*1} 佐伯裕子^{*1} 桑原広子^{*1} 新山徹二^{*1}

Bacteriological study on the group A *Streptococcus* strains derived from a food-borne outbreak occurring in Ehime in 2012

Keiko HAYASHI, Junko MATSUMOTO, Yasutaka YAMASHITA,
Masashi HATTORI, Toshihiro OHKURA, Hiroto SHINOMIYA, Juri ITOH,
Kazusa OUCHI, Hiromi YAMAUCHI, Rie ONISHI, Chitoshi TOYOSHIMA,
Masashi YAMAMOTO, Satoshi INOUYE, Yukie OCHI, Satomi YOSHIE,
Tetsuya OKAMOTO, Yuko UEMITSU, Hiroko ITOH, Naomi KAWAMURA,
Noriko AOKI, Hiroko SAIKI, Hiroko KUWABARA, Tetsuji NIYYAMA

In August 2012, we were notified of cases suggestive of a food-borne outbreak of Group A *Streptococcus* (GAS) pharyngitis occurring among attendees of a summer festival in the Ehime prefecture. Epidemiological investigation revealed that among 89 persons who consumed foods served at the summer festival, 46 primary illnesses occurred. Major symptoms in patients were fever (93%), sore throat (83%), and chills (46%). Rice balls were the only food item that was significantly associated with illness and must have been the vehicle of infection although no rice balls were left for cultivation. GAS colonies were isolated from an eating-house where rice balls were prepared (1 strain), hands of a food worker (1 strain), and pharyngeal swabs of patients (3 strains) and the food worker (1 strain). These 6 strains exhibited the same serotype (TB3264) and *emm* genotype (*emm* 89) and indistinguishable pulsed-field gel electrophoresis patterns, and it was also found that they had the same set of streptococcal pyrogenic exotoxin genes(*speB*, *speC* and *speF*), indicating that all the strains were derived from the same strain, the causative agent of the outbreak. We further examined the growth of the GAS strain in cooked rice, and found that the bacteria grew well at 20 to 30°C but not at 10°C. Taking the above into consideration, it has been concluded that in this food-borne outbreak of GAS illness, rice balls that were prepared by a GAS carrier and left in a temperature-uncontrolled room were implicated as the vehicle.

Keywords : Group A *Streptococcus*, food-borne outbreak, pharyngitis

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

*1 西条保健所

はじめに

A群溶血性レンサ球菌(以下A群溶レン菌)は、上気道

炎や化膿性皮膚感染症などの原因菌で、続発症として急性糸球体腎炎やリウマチ熱など様々な臨床症状を引き起こすことが知られている。劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、手足の筋膜・筋肉等の軟部組織に壊死性の炎症を伴う、致死率の高い疾患である。

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)」では、A群溶血性レンサ球菌咽頭炎が小児科定点報告の五類感染症に、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は全数届出義務のある五類感染症に、位置付けられている。

A群溶レン菌による咽頭炎の感染経路は、主として保菌者のくしゃみや咳による飛沫感染や接触感染である。一方、食品を介した集団感染事例も報告されているが、わが国での食中毒の届出はきわめて少ない。患者の多くは、初期症状が発熱、咽頭痛、頭痛、倦怠感等で、嘔吐や下痢などの消化器症状を伴う患者が少ないため、食中毒として診断することが難しいと推定される¹⁾。

2012年8月に、愛媛県内で初めて発生した、A群溶レン菌による集団食中毒事例の概要と分離菌株の細菌学的検討について報告する。

材料と方法

1 検査対象

食中毒の病因物質を特定するため、A群溶レン菌については当所で、食中毒起因菌10菌種(サルモネラ属菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、ウェルシュ菌、カンピロバクター、病原大腸菌、赤痢菌、セレウス菌、コレラ菌、エルシニア・エンテロコリチカ)については保健所で、それぞれ検査を実施した。

A群溶レン菌の分離同定検査は、患者の咽頭拭い液5件、調理従事者の咽頭拭い液・手指のふき取り検体各2件、調理施設・調理器具のふき取り検体13件について実施した。食中毒菌10菌種については、患者便19件、調理従事者便・手指のふき取り検体各2件、調理施設・調理器具のふき取り検体13件を対象とした。

A群溶レン菌のパルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)解析は、本事例の分離菌株(以下、食中毒事例株)の他に、県内の感染症発生動向調査で分離されたA群溶レン菌5株(以下、感染症由来株(TB3264型3株、T4型1株、T13型1株))を対象に実施した。

2 検査方法

食中毒起因菌10菌種の分離同定検査は常法²⁾に準拠して実施した。A群溶レン菌の検査は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル³⁾に準じて行った。

(1) A群溶レン菌の分離同定検査

検体を採取した綿棒をSEB培地(日本製薬)に入れ、37°Cで24時間培養した。培養液を羊血液寒天培地(栄研化学)に画線塗抹し、37°Cで分離培養後、β溶血が認められるコロニーについて、同定検査を行った。Lancefieldの血清群別は、プロレックス「イワキ」連鎖球菌(イワキ)を用い、A群と判定された菌株について、A群溶血レンサ球菌T型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)によりT型別を実施した。生化学的性状試験は、アピストレップ20(システムズ・バイメリュー)を用いた。

(2) 発赤毒素型別

A群溶レン菌が保有している発赤毒素遺伝子の検出はPCR法で行った。

羊血液寒天培地上のコロニーを釣菌し、キレックス液(5%Chelex-100, TE Buffer)に懸濁後、10分間加熱処理し、遠心上清をDNAテンプレートとした。speA, speB, speC, speF遺伝子検出用プライマー^{4,5)}と増幅産物の大きさは表1に示した。

PCRの条件は、前熱変性を94°C20秒1サイクル行い、熱変性94°C10秒、アニーリング50°C30秒、伸長反応72°C30秒を30サイクル、最終伸長反応72°C7分で行った。その増幅産物を2%アガロースを用いて電気泳動後、エチジウムプロマイドで染色し、UV照射により確認した。

(3) emm型別

菌体表層に存在するM蛋白をコードするemm遺伝子を表1のプライマーを用いてPCRで増幅した⁶⁾。その増幅産物の5'末端側の塩基配列の決定には、EMMSeq-2プライマーとBigDye Terminator Cycle Sequencing kit version 3.1を用いた。得られた塩基配列について、CDCの*Streptococcus pyogenes* emm sequence database(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>)を利用し、型別を決定した。

(4) PFGE解析^{7,8)}

Todd Hewitt broth(日本ベクトンディッキンソン)に菌を接種し、37°Cで一夜培養した。培養液を遠心し、その沈渣を精製水500μlに懸濁後、63°C、10分間加温して菌を不活化し、等量の1%Seakem Gold Agaroseを加え、アガロースブロックを作成した。アガロースブロックに、溶菌処理液(1mg/ml Lysozyme, Mutanolysin 50 unit/ブロック、0.5M EDTA(pH8.0))を加え、37°Cで一夜反応後、Proteinase K溶液(1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine, 0.5M EDTA(pH8.0))に置

表1 本研究で用いたSPE遺伝子及び*emm*遺伝子增幅用プライマー

Target gene	Primer	Sequence	Amplicon size (bp)
<i>speA</i>	SPE-A1	5'-GCTCAACAAGACCCCGATCC-3'	393
	SPE-A2	5'-TGATAGCTTGGATACCATCG-3'	
<i>speB</i>	SPE-B1	5'-GATCAAAACTTGCTCGTAACG-3'	1113
	SPE-B2	5'-AGGTTTGATGCCTAACACAGC-3'	
<i>speC</i>	SPE-C1	5'-GAECTAAGAAAGACATTG-3'	540
	SPE-C2	5'-AGTCCTTCATTGGTGAGTC-3'	
<i>speF</i>	SPE-F1	5'-GGATGGACTGGAAACCTAA-3'	238
	SPE-F2	5'-CATCACGATTGCTTCTAAC-3'	
<i>emm</i>	EMM-2	5'-GCAAGTTCTTCAGCTTGT-3'	—
	EMMSeq-2	5'-TATTCGCTTAGAAAATTAAAAACAGG-3'	

き換え、50°Cで一夜処理した。次いで、Pefabloc SCで不活化し、TE Bufferで洗浄後、制限酵素*Sma* I, *Sfi* I処理し、PFGEを行った。電気泳動バッファーは0.5×TBE、ゲルは1%Seakem Gold Agaroseを用いた。*Sma* Iを加えたサンプルの電気泳動は、6 V/cm、パルスタイム5 to 15 sec、10時間後、パルスタイム15 to 45 sec、12時間の条件で、*Sfi* Iを加えたサンプルは、6 V/cm、パルスタイム15 to 45 sec、21時間の条件で行った。PFGEで得られたDNA切断パターンは、画像解析ソフト(BioNumerics Ver6.5, Applied Maths)を用いて解析を行い、類似係数Dice(トレランス 0.5%)、デンドログラムタイプUPGMAで系統樹を作成した。

(5) 米飯中の菌数の経時変化

分離菌株をTodd Hewitt Brothで3代継代し、菌濃度が約 1×10^5 /mlの凍結保存菌液を調製した。この菌液を滅菌生理食塩水で希釈し、添加菌液とした。添加菌量は、1997年に福岡市で発生した食中毒事例で、原因食品であるだし巻き卵から、1g当たり5900 cfuのA群溶血性レンサ球菌が検出されていることから¹⁾、1g当たり1000 cfuとした。

保存時間による米飯中の菌数変化を調べるために、保存温度は、食中毒発生当日の最高気温が32.2°Cであったことから、30°Cとし、1.5, 3, 6, 12, 18, 24時間保存後の菌数測定を行った。米飯25 gに菌液(1.2×10^3 /g)を添加し、経時的に保存試料にリン酸緩衝液225 mlを加え、ストマッカーで懸濁後、10倍段階希釈液を調製した。希釈液100 µlを羊血液寒天培地2枚に入れ、37°Cで24

時間培養した。β溶血を示したコロニーについては、プロレックス「イワキ」連鎖球菌でA群溶レン菌であることを確認し、2枚のコロニー数の平均値から1 g当たりの菌数を算出した。また、保存温度の影響を調べるため、同様に米飯に菌液(1.4×10^3 /g)を添加後、10°C, 20°C, 30°C, 37°Cの条件で保存し、3, 6, 12, 24時間後の菌数を測定した。

結果

1 事例の概要及び疫学調査

2012年8月18日、西条保健所管内の医療機関から同保健所へ「8月13日～18日の間、発熱、咽頭痛等の症状を呈している15名の患者を診察した。」との届出があった。患者は8月12日に行われた自治会主催の夏祭りで提供された食事を喫食しており、保健所は夏祭りの参加者及び運営者等に対して、集団食中毒または感染症の発生を疑い、疫学調査等を実施した。

調査の結果、喫食者89名のうち発症者は46名(男性17名、女性29名)で、発症者の年齢は7～70歳であった。症状別発症者数を表2に示した。主症状は、発熱、咽頭痛、悪寒であり、腹痛、吐き気などの消化器症状を訴えた患者は少なかった。発症者のうち、医療機関の受診者は31名で、入院患者は0名であった。潜伏時間は、6.5～112時間であり、流行曲線は24～36時間を中心とするほぼ一峰性の患者発生パターンを示した。夏祭りで提供された10食品(おにぎり、フランクフルト、かき氷、焼き鳥、からあげ、ポップコーン、わらび餅、缶ビール、生ビ

ール, 缶ジュース)のうち, 発症者全員に共通する食品は飲食店が調理し, 夏祭りで販売されたおにぎりのみであることが判明した. 本事例は, おにぎりを原因食品とする集団食中毒であると断定し原因施設に対し, 食品衛生法に基づき 5 日間の営業停止処分を行った.

原因食品であるおにぎりの調理工程や取り扱いについて調査した結果、調理従事者が手指に化膿創があるにもかかわらず、使い捨て手袋を着用していないかったこと、午前中に調理されたおにぎりは、冷房による温度管理が不十分な部屋で、提供される夕方まで保管されていたことが判明した。

2 食中毒起因菌の検索

食中毒起因菌の検査結果は表3に示した。A群溶レン菌は、検査対象13件のうち、患者の咽頭拭い液3件、調理従事者の咽頭拭い液・手指のふき取り検体各1件、調理器具のふき取り検体1件から分離された。また、食中毒起因菌10菌種のうち、黄色ブドウ球菌が調理従事者便・手指のふき取り検体各1件、施設のふき取り検体1件から分離された。

3 A群溶レン菌の性状

分離された A 群溶レン菌 6 株の T 血清型は TB3264 型で、同定キットによる生化学的性状試験の結果、*Streptococcus pyogenes* と判定された。発赤毒素型別は、spe 遺伝子の検出を PCR で行った。その結果、6 株

表 2 本食中毒事例の症状別発症者数

症 状	発症者数(人)	有症比率(%)
発熱	43	93
咽頭痛	38	83
悪寒	21	46
頭痛	17	37
臥床	15	33
腹痛	8	17
下痢	7	15
嘔吐	5	11
吐き気	4	9

表3 木食中毒起因菌の検査結果

*1 シンク1取っ手、シンク2取っ手、トレイ、おにぎり型、炊飯器取っ手、台下冷蔵庫取っ手1、台下冷蔵庫取っ手2、台下冷蔵庫取っ手3、木製まな板、プラスチックまな板、包丁、トイレ蛇口、トイレドアノブ

*2 A群溶血性レンサ球菌(TB3264型)

すべて $speB$, $speC$ 及び $speF$ の3種類の遺伝子を保有していることが分かった。M蛋白をコードする emm 遺伝子型別により、6株は $emm89$ 型で一致した。

PFGE解析は、制限酵素 Sma I および Sfi I を用い、DNA切断パターンの比較を行った。解析結果を図1に示す。食中毒事例株6株は、制限酵素 Sma I および Sfi I によるPFGEパターンがそれぞれ一致し、同一由来株であると考えられた。一方、感染症由来株とは異なるグループに分けられた。

4 米飯中の菌数の経時変化

保存時間による米飯中の菌数変化を調べるために、30°Cで保存後、菌数測定を行い、その結果を図2に示す。

菌液添加直後の菌数は、1回目 $1.1 \times 10^3/g$ 、2回目 $1.4 \times 10^3/g$ であり、回収率はそれぞれ、91.7%, 116.7% で、良好な結果が得られた。

1, 2回目とも、菌数は添加直後と比べて、3時間後に10倍、6時間後に100倍、12時間後には10000倍まで増加しており、 10^7 cfu/g に達した。

次に、保存温度の影響を調べるために、10°C, 20°C, 30°C, 37°Cの条件で保存後、菌数を測定し、図3にその結果を示す。菌液添加直後の菌数は、 $1.4 \times 10^3/g$ であり、回収率は100%で良好な結果であった。

30°C, 37°Cでは、菌数測定を行った3時間後には増殖しており、12時間後以降は、同じ挙動を示している。

20°Cの場合は、菌添加後6時間以降に著しい増殖が見られ、24時間後の菌数は $6.3 \times 10^5/g$ に達し、添加直後と比べて100倍まで増加した。

一方、10°Cでは、24時間後まではほとんど菌数の変化は認められなかった。

考 察

本事例では、分離されたA群溶レン菌6株は、生化学的性状やT血清型、 emm 遺伝子型、検出された spe 遺伝子は同じ結果であり、 Sma I および Sfi I のPFGEパターンがそれぞれ一致したことから、同一由来株であると考えられた。原因食品は残品がなかったので、検査は実施できなかったが、調理従事者の咽頭拭い液、手指のふき取り検体からA群溶レン菌が分離されたことから、原因食品は調理従事者により汚染されたと推察される。また、調理器具のふき取り検体からもA群溶レン菌が分離されたが、調理従事者による汚染が原因と考えられる。

今回の事例では、冷房による温度管理が不十分な部屋で汚染されたおにぎりを長時間放置したことにより、菌が増殖したと考えられる。疫学調査とともに、患

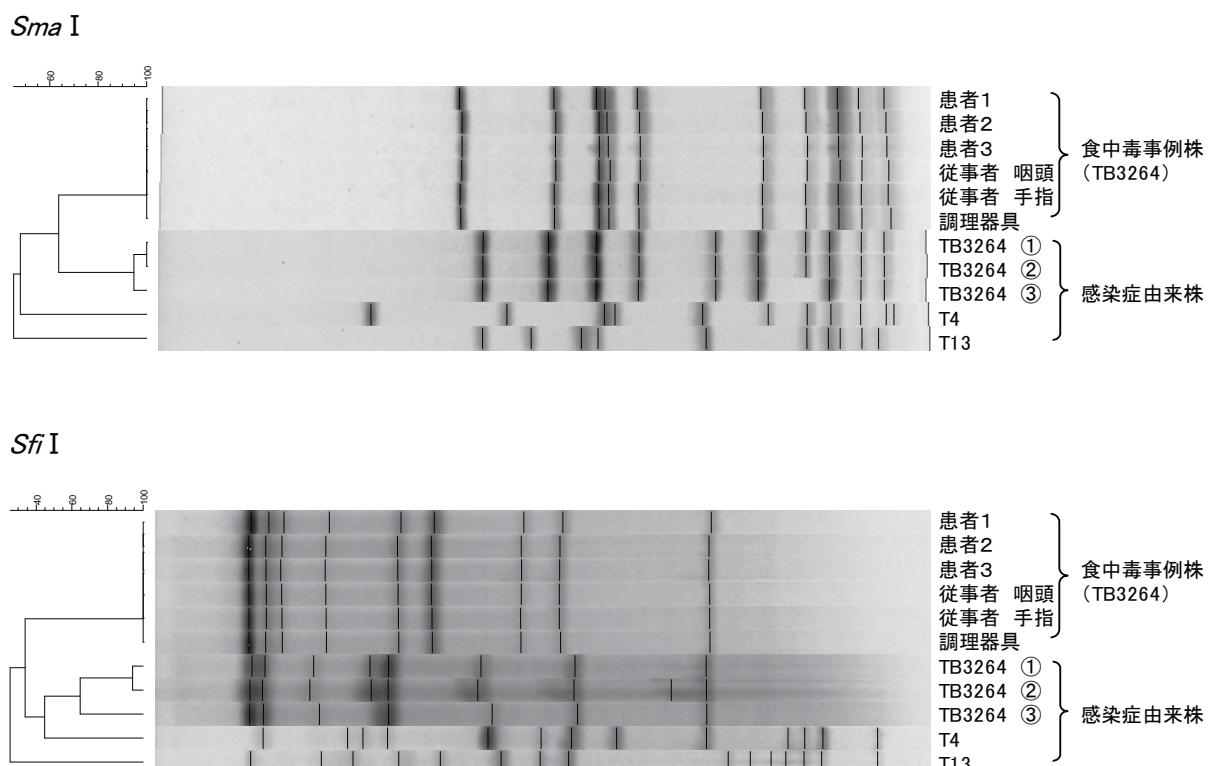


図1 A群溶レン菌のPFGE解析結果

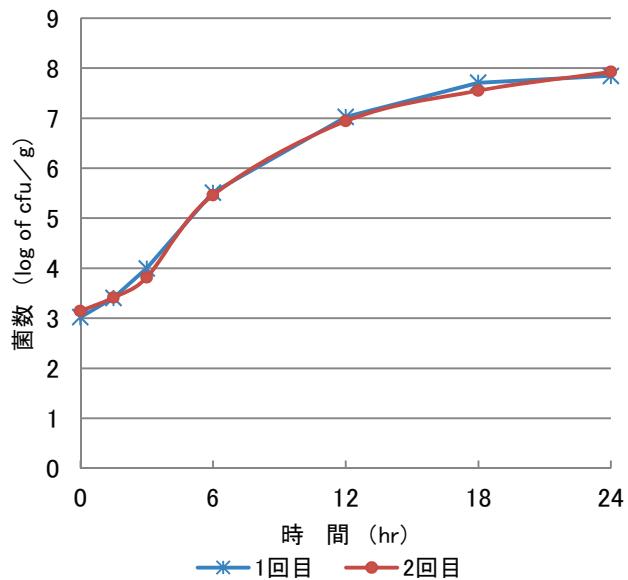


図2 A群溶レン菌の米飯中での増殖
保存時間による菌数変化(30°C)

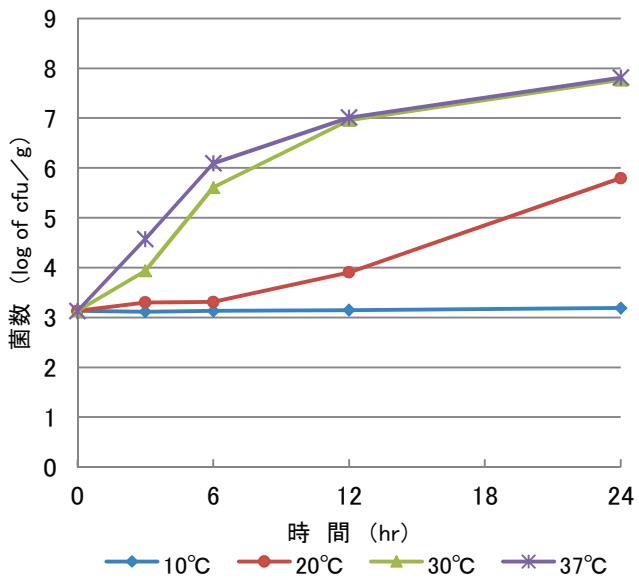


図3 A群溶レン菌の米飯中での増殖
保存温度による菌数変化

者・調理従事者からの菌の分離、菌株のPFGEパターンの比較により、感染経路を推測することが可能となった。

日本で発生した食品を介したA群溶レン菌による集団感染事例として報告されているのは13例で⁹⁾、非常に希少な事例である。

このうち、原因菌のT血清型がTB3264型である事例は、今回の事例の他に、1997年5月福岡市¹⁰⁾、2003年9月千葉県¹¹⁾、2010年6月埼玉県、2013年6月岐阜市¹²⁾で発生しており、13例のうち5例で、最も多い。TB3264型による事例が多い理由は不明であるが、2010年以降はTB3264型が流行株の一つであり、調理従事者を介した食中毒の原因菌となる可能性も増加していると思われる。全国で分離されるA群溶レン菌のT血清型割合は、2012年の報告では、T1が31.5%、T12が29.7%で、TB3264は3番目に多く、12.2%であった¹³⁾。TB3264型の分離割合は、2010年以降10%以上で、2009年以前に比べて増加している。

一方、emm型別が判明している事例では、1997年5月福岡市はemm104型で、2003年9月千葉県はemm68型であり、今回の事例とは異なっていた¹⁴⁾。

spe遺伝子の保有状況については、原因菌がTB3264型である1997年5月福岡市、2003年9月千葉県、2010年6月埼玉県の3事例は、speB遺伝子単独保有株であったが、今回の分離株は、speB, speC, speF遺伝子の3種類を保有していた。この他、speB, speC遺伝子保有株が原因となった事例は、1998年9月熊本県(T28型)¹⁵⁾、茨城県(T22型)¹⁶⁾、2005年7月に神奈川県で発生した事例

は、speB遺伝子単独保有株でT25型であり¹⁷⁾、speA遺伝子保有株による事例は発生していない。奥野らは、咽頭炎等の患者分離株(1995年～2001年)の発熱性毒素産生性は、A産生株が9.5%、B産生株が88.8%、C産生株が76.3%であり、劇症型患者由来株に比べてA産生株の割合が低かったことを報告している¹⁸⁾。

米飯中の菌数の経時変化の検討を行った結果、A群溶レン菌を添加後、30°Cで保存したところ、分離同定検査の培養温度である37°C条件下と同様に増殖した。A群溶レン菌の培養には、血液成分を含む培地を用いるが、米飯中でも菌の増殖が認められた。過去の事例の原因食品は、弁当やサンドイッチ、卵を使った料理やサラダ等の調理食品が多い⁹⁾。2013年6月に岐阜県で発生した事例は弁当、7月に福岡県で発生した事例はサンドイッチであった。本田らは、サンドイッチの具材とA群溶レン菌の増殖について検討した結果、卵サラダでの増殖が著しいことを報告している¹⁵⁾。

今回の事例では、原因食品の検査はできなかったが、おにぎりはパック詰めの後、室温で5時間放置されていたことが判明しており、付着したA群溶レン菌が少量の場合でも、著しい菌数の増加があったと考えられる。過去の事例の発生時期はすべて、気温が高くなる5月～9月で、菌が増殖しやすい環境下で食中毒が発生している。

一方、20°Cで保存した場合は、著しい菌数の増加は6時間以降であり、10°Cでは、24時間後までほとんど菌数の変化がなかったことから、食中毒防止のため、調理後、喫食するまでの時間はできる限り短くすること、低温で管

理することの重要性を示す結果となった。

A群溶レン菌による食中毒事例の発生要因は、調理従事者により汚染された食品を喫食することである。海外でも2006年6月にデンマークで集団発生事例が報告されている¹⁹⁾。過去の事例では、調理従事者の咽頭拭い液からA群溶レン菌が分離されており、くしゃみや咳の飛沫による汚染、または汚染された手指を介する汚染が考えられる。今回の事例のように、手指に化膿性疾患部がある場合は、食品が直接汚染される。これらのことから、予防には、マスクや使い捨て手袋の使用が重要である。また、食中毒防止のため、調理施設の清掃・消毒等の基本的な衛生管理の他、調理従事者の健康管理についても十分に周知することが必要であると考えられた。

まとめ

1 A群溶レン菌について、患者の咽頭拭い液5件、調理従事者の咽頭拭い液・手指のふき取り検体各2件、調理施設・調理器具のふき取り検体13件を対象に検査を実施した。その結果、患者の咽頭拭い液3件、調理従事者の咽頭拭い液・手指のふき取り検体各1件、調理器具のふき取り検体1件が陽性であった。

2 分離株6株はすべて、*speB*, *speC*, *speF* 発赤毒素遺伝子を保有しており、*emm* 遺伝子型は89型であった。PFGE解析は、制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I を用い、DNA切断パターンの比較を行ったところ、分離株6株は制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I による PFGE パターンがそれぞれ一致し、同一由来株であることが考えられた。

3 米飯中でのA群溶レン菌の増殖について調べた結果、30℃保存では、分離同定検査の培養温度である37℃と同じ挙動を示し、著しい菌数の増加が認められた。一方、10℃保存では24時間後まで菌数の変化は見られなかつた。食中毒防止のため、調理後の食品の低温管理が重要であることが示された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、検査法についてご助言いただきました山口県環境保健センター 富永潔先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 食中毒予防必携 第3版,日本食品衛生協会(2013)
- 2) 食品衛生検査指針 微生物編,日本食品衛生協会(2004)
- 3) 病原体検出マニュアル:国立感染症研究所,
<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/streptococcusA.pdf>
- 4) 岸下雅道ほか:日本臨床,50,326-332(1992)
- 5) 稲垣善重ほか:劇症型A群レンサ球菌感染症—ヒト喰いバクテリアの出現—,近代出版(1997)
- 6) Beal B.et al.:J. Clin. Microbiol., 34,953-958 (1996)
- 7) 厚生労働科学研究費補助金平成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データベース化に関する研究」
- 8) 緒方喜久代ほか:大分県衛生環境研究センタ一年報,32,36-39 (2004)
- 9) 仲西寿男ほか:食品由来感染症と食品微生物,中央法規出版(2009)
- 10) 池田嘉子ほか:病原微生物検出情報,18,264 (1997)
- 11) 岸田一則ほか:病原微生物検出情報,25,100-101 (2004)
- 12) 土屋美智代ほか:病原微生物検出情報,34,268-269 (2013)
- 13) A群溶血性レンサ球菌T血清型:病原微生物検出情報,<http://www.nih.nih.go.jp/niid/ja/iasr/510-surveillance/iasr/graphs/3054-iasrgb2012.html>
- 14) Tanaka D.et al.:Jpn.j.Infect.Dis.,59,202-203 (2006)
- 15) 本田れい子ほか:病原微生物検出情報,20,115-116 (1999)
- 16) 山口克枝ほか:病原微生物検出情報,19,279(1998)
- 17) 鈴木理恵子ほか:神奈川衛研報,36,12-13 (2006)
- 18) 奥野ルミほか:感染症誌,78,10-17 (2004)
- 19) Falkenhorst G.et al.:Epidemiol. Infect.,136, 1165-1171 (2008)