

平成10年度厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

研究報告書

研究課題

大規模化する食中毒原因菌の疫学的指標としてのDNA型別、ファージ型別等の応用と新しい迅速型別の開発に関する研究

主任研究者 田村 和満  
(国立感染症研究所 細菌部)

大規模化する食中毒原因菌の疫学的指標としてのDNA型別、ファージ型別等の応用と新しい迅速型別の開発に関する研究

研究者氏名および所属施設一覧

平成10年度

	氏名	所属施設	職名
主任研究者名	田村 和満	国立感染症研究所	室長
分担研究者名	渡辺 治雄	国立感染症研究所	部長
	竹田 多恵	国立小児病院研究所	部長
	保科 定頼	慈恵医大学医学部	講師
	宮本 秀樹	静岡県環境衛生研究所	部長
	山井 志朗	神奈川県衛生研究所	部長
	寺島 淳	国立感染症研究所	研究員

## 平成10年度研究報告 目次

1. 平成10年度に分離された腸管出血性大腸菌(O157以外 のSTEC) 血清型	分担研究報告	田村和満.....1
2. わが国のSalmonella Typhimurium DT 104の実態調査	分担研究報告	田村和満.....2
3. 病院由来株の解析	分担研究報告	竹田多恵.....4
4. 分担研究報告		寺島 淳.....6
5. 分担研究報告		保科定頼.....9
6. VTEC感染の疫学的調査・解析と動物由来のファージ型	分担研究報告	宮本秀樹.....13
7. 分担研究報告 総括		山井志朗.....18
8. (1)Salmonella Infantisによる食中毒	分担研究報告	山井志朗.....31
9. (2)Salmonella Enteritidisによる食中毒	分担研究報告	山井志朗.....33
10. (3) 腸管出血性大腸菌O157による広域食中毒事例	分担研究報告	山井志朗.....35
11. 分担研究報告		渡辺治雄.....47

分担研究報告書： 田村和満（国立感染症研究所）

平成10年度に分離された腸管出血性大腸菌(O157以外のSTEC)血清型

目的：

1998年度に全国からO157として疫学解析のために送られてきた菌株は2,345株で、その他に血清型別依頼株として送金された菌株は394菌株であった。それらの菌株についてペロ毒素および病原性因子としてのeaeAをPCR法で確認し、血清型別はO1~173, H1~56の抗血清を用いた。

成績および考察：

分離菌394株は34種類の血清型に別れた（表参照）。それらの中で高頻度に分離される血清型はO26：H11, O26:HNM, O111:HNM, O121:H19であった。毒素産生性はStx1単独産生株が多かった。血清型は昨年より2種類増えており血清型の多様性を示している。これらの血清型には市販されていない抗血清が含まれており、今後このような抗血清の市販化にどう対処すべきか検討する必要がある。

表 O157以外のSTEC菌株血清型および毒素型（1998年度）

血清型		Stx			計	血清型		Stx			計
O	H	1	2	1+2		O	H	1	2	1+2	
26	11	172		6	178	44	40			3	3
26	-	28		2	30	45	UT			1	1
111	-	29		34	63	55	-	1		3	4
121	19	12	6		18	74	19			1	1
121	UT		3		3	114	19		3		3
81	8			9	9	119	-	1			1
91	14	5		2	7	144	-		1		1
91	49			1	1	145	-	1	1		2
91	7			1	1	146	21			1	1
5	-		1	10	11	156	-	3			3
128	-	1		7	8	160	28			1	1
165	52	8			8	161	-	1			1
103	2	6			6	162	-		1		1
1	7	1			1	166	19	3			3
6	49			1	1	R	-	2	2	2	6
8	15			1	1	UT	-	7	5	1	13
8	19		2		2	34血清型		281	25	88	394
18	-			1	1						

分担研究報告：田村和満（国立感染症研究所）

わが国の*Salmonella* Typhimurium DT 104 の実態調査

要約：*Salmonella* Typhimurium DT 104 (S.T.DT 104)とは抗生物質のアンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、ストレプトマイシン(SM)、スルファナマイド(STX)、テトラサイクリン(TC)の5剤薬剤またはさらにトリメトプリム(TMP)およびプロフロキサシン(CPFX)の7薬剤に耐性で、S.T.のファージ型別で104と型別されたものと定義付けられている。

本菌は最初(1984)イギリスでその発生が報告され、1994年以後急激に多発し、そのまん延はまたたくまにヨーロッパおよびアメリカ合衆国に波及した。非公式ではあるがアメリカのCDCの調査では患者から分離されるS.T.の50%はDT 104であったという報告を受けている。本菌の発生要因は動物の飼料に発育促進として配合された抗生物質が原因であったとされており、ウシ、ヤギ、ニワトリ、ブタ、ヒツジ、ヒチメンチョウから分離されている。このような多剤耐性菌の出現は各国とも公衆衛生の面で重要で、その予防対策に力を入れていると聞く。

我々は1997年のイギリスのCDR weeklyの報告が出るまではその情報がなかったのが現状である。それ以後果してわが国において本菌がどの程度汚染されているか、その実態調査に乗りだし今日に至っている。

供試菌株：過去10年(1989~1998)の分離菌株についてはサルモネラの血清型別依頼として国立感染症研究所のサルモネラセンターに送菌されていた散发事例のS.Tを用いた。各年次ごとのS.T.菌株の計150株、1998年度の分離菌株については全国の地方衛生研究所および病院の散发患者株、30株合計180株を用いた。集団事例は都衛生研究所由来の4事例また、家畜由来株は農水省、家畜衛生試験場のズーノーシス研究室で収集されたウシ糞便由来分離菌株76株についても共同研究として、その疫学的解析のために供試した。

方法：合計226株の供試菌株について、血清型別、薬剤感受性試験、ファージ型別試験をおこなった。薬剤感受性試験のための使用薬剤は国際的なデータの比較を配慮してユーロのENTER-NETサーベランスが推奨している薬剤を用いた。その薬剤の種類はAmpicillin, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulphonamides, Tetracyclines, Trimethoprim, Ciprofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Nalidixic acid, Cefotaximeの11薬剤である。その試験方法はセンシテスク(BBL)を用い、常法どおり行った。わが研究室に送付された菌株については検査の手順として、まず薬剤感受性テストをおこない、その成績で指定の薬剤3剤以上耐性菌株についてのみ、S.T.のファージ型別試験をおこなった。また、家畜由来株については指定薬剤5剤以上のものに対してS.T.のファージ型別試験をおこなった

成績：菌株供試菌株の各年次ごとの薬剤感受性（3剤以上耐性菌）成績はつぎのとおりである。

わが研究室に送付された供試菌180株中、3剤以上耐性菌は42株で、その中でS.T.ファージ型別でDT 104 に型別された菌株は1993年、1994年度の2株のみであった。家畜由来株の成績では1990年度以後の分離株45株がそれに該当したが、それ以前の分離株にはDT 104 は検出できなかった。

考察：以上の結果、わが国の分離菌株にも *S. Typhimurium* DT 104 が検出されていたことがわかった。このような多剤耐性株は治療困難をもたらすので確かに公衆衛生上問題であるが（1）わが国においてサルモネラ症の患者から分離されるサルモネラの85%は *S. Enteritidis* であり、*S. Typhimurium* は数%にすぎないこと、（2）小児、高齢者および基礎疾患以外の成人では排菌期間が長くなる傾向があるため、その治療は対照療法が一般的であり、治療により本菌を選択的に増やす要因にはなりにくい等のことも配慮すると、現時点でやみくもな好奇心をあおるような取り扱いは問題であろう。また本成績はわが国の本菌の汚染実態を把握するには不十分なデータで、今後も全国的な実態調査および観測が重要であろう。

分担研究報告：竹田多恵（国立小児病院小児医療研究センター）

研究テーマ：病院由来株の解析

目的：

腸管出血性大腸菌 (EHEC)によって引き起こされる感染症は、1996年の大流行以降、日本各地で頻発している。一見散発例に見える場合でも、生産や流通経路までさかのぼれば、共通の汚染食品が原因である場合も少なくなく、複雑化かつ大規模化してきている。また、EHECに感染した場合、小児では特に重症化傾向が強く、しばしば死に至ることもある。本研究では、患者の重症化の予防及び、汚染源の拡散の防止を目的として、病院から分離される EHEC および食中毒原因菌について疫学的解析を行う。

材料及び方法：

平成10年4月1日～11月17日の間に日本各地の病院から送られてきたEHEC 感染が疑われる23患者検体（発症は平成10年2月10日～11月3日：151便検体及び101血清）を用いた。

分離培養は定法により行った。患者血清中の抗LPS抗体価は、LPS O2、O18、O26、O111、O118、O128、O143、O145、O157、O165 を固相としてELISA法により測定した。カットオフ値は0.4とした。これらのLPS血清型は国内で分離されたEHECの血清型である。LPS O2、O18、O143、O145、O157、O165はWestphalの方法に準じて自家調整した。その他のLPSは市販品(Difco)を用いた。検体中の志賀毒素(Stx)測定にはオーソVT1/VT2検出キットを用いて測定した。

成績及び考察：

患者の臨床症状は、下痢10、血便10、HUS 2、不明1であった。便培養を行った21例のうち分離された株の血清型は、O157が最も多く15例(71.4%)、O26、O111、O164が各1例ずつあり、3例は同定できなかった(表1)。EHECによる下痢症は年間を通して発生するが、他の食中毒と同様に夏期に多発する傾向があり、6月から8月の間に14例起こっていた。このうち、O157が検出されたのは10例であった。発生地域は、富山(1例)、静岡(1例)、三重(6例)、大阪(1例)、奈良(1例)、和歌山(1例)、島根(3例)、岡山(2例)、山口(1例)、香川(1例)、福岡(1例)、佐賀(1例)、鹿児島(2例)と関西地方を中心として広がっている。地域別の臨床症状は、ほとんどの地方で下痢と血便がほぼ半数ずつを占めていたが、九州地方では、血便患者はなく、下痢(3例)とHUS(1例)であった。罹患年齢は1歳9ヶ月から11歳6ヶ月までで、1歳1例、2歳5例、3歳4例、4歳4例、5歳1例、6歳1例、7歳1例、8歳1例、9歳2例、11歳2例と4歳以下の小児が全体の60.9%を占めていた(図1)。年齢別の臨床症状は、下痢は1歳から11歳までほぼ全年齢に均一に見られたが、血便は2歳3例、3歳1例、4歳4例、9歳1例、11歳1例と4歳以下が80%を占めていた。HUSは2歳と5歳に各1例と低年齢がEHECにより重症とな

る傾向が確認された。

患者血清中の LPS に対する抗体価は、11例が O157 陽性であり、6例が陰性であった。O157 抗体陽性の患者のうち、10例 (90.9%) から O157 が分離されていた。第 5～7 病日に抗体価のピークを示し、以後緩やかに減少していった (図 2)。一ヶ月後の血清が入手できた 8 例全てが、依然高い抗体価 (0.6以上) を示していた。患者血清中の抗 LPS 抗体の検査は、便培養に比較して判定が容易であり、効率が良い。便培養で複数の細菌が検出されても、多くの場合疾患の原因となった菌に対する抗体だけが上昇する傾向があり、原因菌の判定も容易である。抗体価の上昇には、感染後少なくとも 3 日、特に確実に判定するためには、1 週間くらいの経過が必要である。我々は EHEC 感染初期 (第 3 病日前) の fosfomycin の投与が重症化を防ぐために有効であることを既に報告しているが、抗体検査はこの目的には無効である。しかし、原因菌が分離されない場合などの補助的な診断手段としては大変有用である。

早期診断の手段として、患者便検体から直接原因菌を検出する方法として、免疫学的手法を用いて毒素蛋白を検出する方法、PCR などにより病原性遺伝子を検出する方法、菌そのものを検出する方法などがある。今回、我々はオーソ VT1/VT2 検出キットを用いて患者便検体から直接 Stx を検出することを検討した。便検体の入手できた 22 例のうち、陽性であったものは 10 例、陰性であったものは 12 例であった。陽性となった検体のうち、7 株が分離培養により O157 が検出された。1 例から O26 が検出され、2 例は病原菌を分離することはできなかった。陰性となった検体のうち、11 例は分離培養を行っており、そのうち 8 例は O157 が検出されていた。O111 と O164 が各 1 例から検出されていた。残りの 1 例からは病原菌は検出されなかった。志賀毒素が検出されている検体のうち、5 検体についてはさらに Stx タイピングを行った。Stx1 は一検体しか産生していなかったが、Stx2 は全ての株から検出された。この結果は以前から報告されているように Stx2 が病原因子としてより重要であることを示唆している。第 2 病日 (1 例)、第 3 病日 (2 例)、第 4-5 病日 (2 例)、第 5 病日 (2 例)、第 5-10 病日 (1 例)、第 5-9 病日 (1 例)、第 6 病日 (1 例) の便検体が Stx 陽性であった。いずれの検体もこれ以外の病日では陰性であった。つまり、Stx は感染初期の短期間 (通常 1-2 日間) にのみ検出することが可能である。これは化学療法により病原菌が除去され、Stx を検出することができないためであろう。Stx が検出された症例の場合、第 1 病日では陰性 1 例、第 2 病日では陽性 1 例、陰性 1 例、第 3 病日では陽性 2 例、陰性 1 例 (ただし前日は陽性) であった。検体の数が限られているが、この検出法により早期診断が可能であると考えられ、高感度化などの検討を引き続き行っている。



「大規模化する食中毒原因菌の疫学的指標としての DNA 型別、ファージ型別等の応用と新しい迅速型別法の開発に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者

寺嶋 淳

国立感染症研究所 細菌部

研究要旨 *Salmonella* Enteritidis(SE)と腸管出血性大腸菌 EHEC O157:H7 については、ファージ型 (PT) 及び DNA 型による解析を併用し食中毒由来菌における多様性、あるいは SE の PT4 に属する分離菌の類似性を明らかにした。また、*Shigella sonnei* による集団食中毒等に対して DNA 型別による疫学的解析を行い、同一感染源の事例を特定した。さらに、*Listeria monocytogenes* や *Salmonella* Typhimurium の DT104 等においても、それぞれ PFGE による DNA 型別、ファージ型別により感染源等の究明に応用した。

## 1. サルモネラ

地研・保健所を通じて集められたサルモネラの検出数は、病原微生物検出情報〔Infectious Agents Surveillance Report〕(IASR)で集計される病原菌のうちで最も多く、1986～1995 年のヒト由来のサルモネラ検出数の推移をみると、1986～1989 年で増加した後、多少の変動があるもののその検出総数はほぼ横ばい状態が続いている。1998 年分の食中毒速報値〔厚生省食品保健課〕によると、細菌性食中毒患者 39,705 のうち、サルモネラによるものは 11,035 名 (26.8%) で腸炎ビブリオ 12,149 名 (29.5%) について 2 位であった。1997 年までのサルモネラの菌型分布をみると、やはり *S. Enteritidis* が最も多い (IASR)。

*S. Enteritidis* のうち集団発生事件由来の菌株のファージ型別 (PT) 結果は以下のとおりである (表 1)。1990 年から 1998 年の全体的な傾向としては、PT1 が 1992 年に 32% (35/110) に増加してから平均で 41% の検出率を示し、PT4 は 1990 年に 57% (26/46) に急増してから平均で 40% を示す一方で、PT34 は 1990 年に 26.1% (12/46) であったものが次第に減少し 1996 年には検出されず、その後もわずかな検出数にとどまっている。したがって、PT1 および PT4 の合計の検出率は平均で 77% に達し、両者のファージ型の菌株が蔓延している状態が推察される。しかしながら、散发事例および環境由来株のファージ型は多種類におよび今後それらのファージ型の菌株検出率が増加してくる可能性も否定できない。*S. Enteritidis* のうち PT1 および PT4 の菌株に対する DNA 型の解析結果は 1997 年度と同様、PT4 の類似性と PT1 の多様性を示すものとなった。1, 2, 3)。

*Salmonella* Typhimurium の多剤耐性菌による食中毒事例が東京都で 4 事例発生し、すべてがファージ型 DT104 であった。

## 2. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 および *Shigella sonnei*

腸管出血性大腸菌については、1997 年の O157 の動向からも、集団事例としては保育園・幼稚

園での発生が主体であるとともに、複数の都府県にまたがる同時多発型の事例の発生が明らかになっている。この傾向は 1998 年も続いている。1998 年 6 月には、O157 に汚染された北海道産のイクラの醤油漬けによる患者が 7 都府県において発生している。

また、1997 年の 8 月、9 月に兵庫県、滋賀県、福井県、大阪府、京都府において発生した散発例において分離された O157 と同じ PFGE タイプの菌株が 1998 年においても関西地方で 7 月以降分離される傾向が見られる。ファージ型(PT)については、PT14 が約 20%、PT21 が約 10%あるものの、多様な種類が検出されており、PFGE の結果とよく一致している。さらに、1997 年の家庭内発生事例の増加とともに有症者の家族における無症者の検出例が目立って来ている。1997 年の 1412 株のヒト由来株については、10 歳以下の子供では 80%が何らかの症状を示したのに対して、30-49 歳の成人では 68-75%が無症状であった。また、これらの菌株については、特定の Stx 型や PFGE 型との関連性は見られなかった。したがって、成人が carrier としての役割を担う可能性が示唆された。1997 年 8 月から 9 月にかけて、関西地方において type Ia による散発事例が多発したが、いわゆる diffuse outbreak を示唆する疫学的解析結果などは得られていない。疫学的解析結果と分離菌の細菌学的検査結果が時間的なずれのないうちに揃うような体制を整えて行くことも今後の課題であろう。

*Shigella sonnei* による集団感染事例においては、長崎市の井戸水を原因とした集団事例と本州および九州から北海道のツアー客で発生した集団事例にたいして、DNA 型による解析を行い、それぞれの事例が異なる DNA 型の赤痢菌によるものであることを明らかにした。

表 Salmonella Enteritidis ファージ型分布 (件数)

年	1	3	4	5	5a	6	6a	7	8	9	9a	12	13a	14b	18	21	22	34	RDNC	UT	Mix	検査事件数
1990	2	0	26	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	12	0	0	3	46
1991	1	2	25	0	1	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	17	0	2	6	58
1992	35	1	48	0	0	1	0	0	6	9	1	0	0	0	0	0	0	6	0	1	2	110
1993	43	2	31	0	0	0	0	0	2	0	2	1	0	1	0	0	0	11	0	0	1	94
1994	41	0	31	1	1	0	0	0	2	4	0	0	2	0	0	0	3	3	0	4	3	95
1995	30	4	27	13	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	5	85
1996	26	2	30	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	67
1997	74	3	99	1	0	9	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	9	4	0	207
1998	48	0	55	6	1	7	0	0	1	0	0	0	0	0	1	4	0	1	10	1	0	135
合計	300	14	372	22	3	19	4	1	19	14	5	1	2	1	1	4	3	54	22	16	20	897

\* 1999年3月11日現在

(予研細菌部外来性細菌室)

RDNC: ファージに対し感受性はあるが、既知の型に該当しないもの

UT : 既知のすべてのファージに感受性のないもの

#### 今年度以降の計画

S. Enteritidis のファージ型別と PFGE の解析に関して、1998 年以降の分離株を中心とした解析を進める。また、今後検出数の増加が予想される S. Typhimurium の Definitive type 104 に関して、PFGE を用いた解析を行う予定である。

#### 参考文献

1. Prolonged incubation period of Salmonellosis in an outbreak of Salmonella enteritidis infection. Microbiol. Immunol. 1999, 43, 69-71, K. Nagai, T. Mori, S. Tsuda, H. Izumiya, J. Terajima, H. Watanabe
2. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* Enteritidis isolates in Japan by phage-typing and pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiology and Infection. 1998, 120, 223-229, J. Terajima, A. Nakamura, H. Watanabe
3. Epidemiological analysis of Salmonella Enteritidis in human and broiler chicken isolates in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 971-974, Sumalee Boonmar, Aroon Bangtrakulnonth, Srirat Pornrunangwong, Jun Terajima, Haruo Watanabe, Ken-ichi Kaneko, and Masuo Ogawa
4. Combined use of Bacteriophage typing and pulsed-field gel electrophoresis in the epidemiological analysis of Japanese isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiol. Immunol. 1998, 42, 515-519, H. Izumiya, T. Masuda, R. Ahmed, R. Khakhria, A. Wada, J. Terajima, K. Itoh, WM. Johnson, H. Konuma, K. Shinagawa, K. Tamura, and H. Watanabe
5. Molecular epidemiology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using PFGE. Jpn. J. Food Microbiol., 1998, 15, 141-146, S. Iyoda, J. Terajima, A. Wada, H. Izumiya, K. Tamura, and H. Watanabe

研究費の名称 = 厚生科学研究費

研究事業名 = 新興・再興感染症研究事業

研究課題名 = 大規模化する食中毒原因菌の疫学的指標としてのDNA型別、ファージ型別等の応用と新しい迅速型別の開発に関する研究

研究期間（年度） = 1998

主任研究者名 = 田村和満（国立感染症研究所）

分担研究者名 = 保科定頼（東京慈恵会医科大学）

#### 研究目的

グラム陰性桿菌にはpromiscuous（雑多な）プラスミドが存在し、それらのIncP $\alpha$ プラスミド内のPK2、R18、R68、RP1、RP4は菌種間には伝達され、宿主のDNA複製などを調節して、ビルレンスプラスミドと考えられている。Dr. Figurskiのグループらは分子生物学的にRK2プラスミド（62kbp）の調節機構を研究しており、およそ6万塩基の全塩基配列を決定している。これを共同研究としてRK2プラスミド複製を制御するKorA（Kill gene over ride）とtrfA1（trans acting factor）、ssB（single strand DNA binding）*kil C* フランキング領域の各遺伝子内の重複配列をとらえて、フィンガープリントとして型別に利用することを試みた。

#### 結果と考察

1. 菌株は慈恵医大附属病院中央検査部で1982年から1997年間に分離された*S. enteritidis* 38株、*S. typhimurium* 22株を用いた。また、当該研究組織の静岡県県境衛生科学研究所*S. enteritidis* 10株、*S. typhimurium* 10株を用いた。このうち*S. enteritidis*では1991年（6株）、1994年7月～8月（12株）に発生した食中毒事例を含み、特に1994年7月～8月は当大学職員食堂の鶏卵を介した集団発生例である。

2. 血清型別では*S. enteritidis*は全てO9を示し1相がg,m、2相は陰性であった。*S. typhimurium*はO4、1相i、2相1.2であった。

3. 薬剤感受性成績では、ABPC、GM、MINOに注目すると*S. typhimurium*でABPC、MINOにやや耐性傾向が保持されている他は、おおむね感受性傾向が得られた。おそらく継代を繰り返した結果、プラスミドコピー数を相当減らしたものと推測した。しかし後に述べるようにRK2プラスミドDNAのkorA、trfA1、ssB遺伝子の部分的増幅が可能であることから、RK2プラスミドを維持しているものと考えられる。また、korA遺伝子は

宿主遺伝子の複製にかかわり、宿主の維持に重要な役割を果たすことから、RK2プラスミドは維持されるものと考えている。

#### 4. バイオタイプ

*S. enteritidis*、*S. typhimurium*とも同一患者由来で生化学性状成績が一部異なるものがみられたが、転写変異によるものと考え、同一株とみなした。

#### 5. korA、trf1、ssB 遺伝子各PCRプライマーの設定

korA 領域はRK2遺伝子の59322～59341番目 korA I : tcg gta agc cgt ttc ttc at と59048～59068番目 korA II : ttc ctg ttt ttt ctt ggc gtc とを用いた。

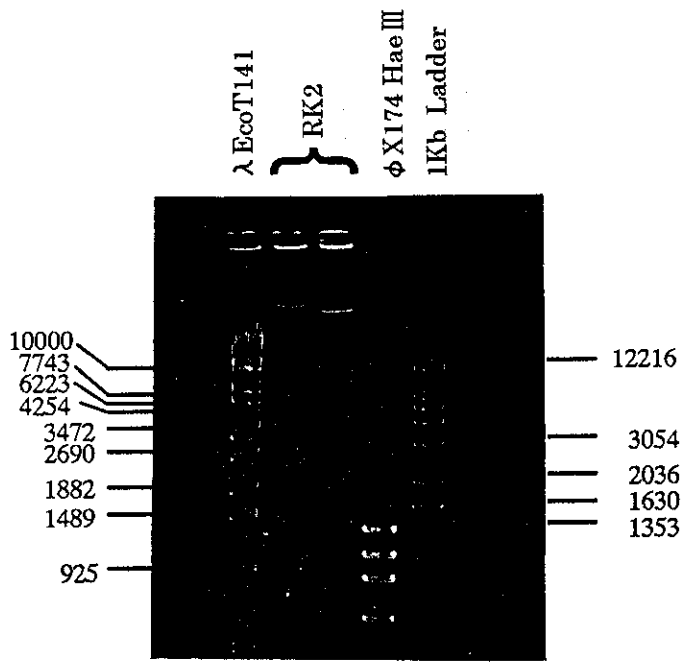
trfA 領域はRK2遺伝子の16744～16765番目 trfA I : tac ttc tcc cat atg aat ttc g と16525～16543番目 trfA II : cgt ttg caa tgc acc agg tc を用いた。

ssB 領域はRK2遺伝子の17985～18004番目 ssB I : tgc ttg cgg ctt gtt aga at と17842～17859番目 ssB II : acg aat acc agc gac ccd を用いた。

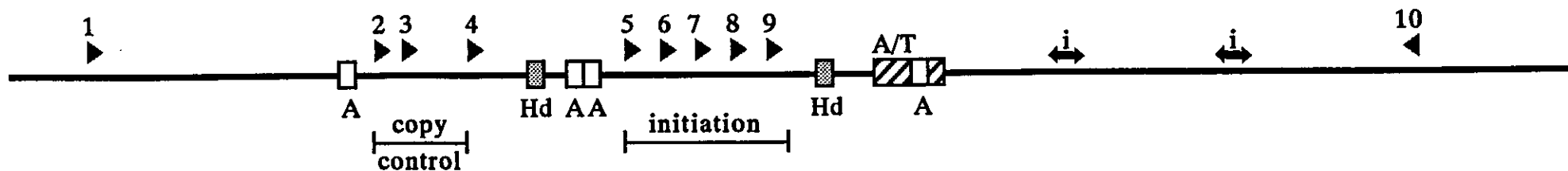
これらのプライマーによってkorA、trfA1、ssBの各遺伝子を増幅し、重複配列によるバンド形成パターンを観察すると、korA は期待される増幅バンド294bpに対して200bp、600bpのバンドが得られ、trfA は期待される増幅バンド241bpに対し240bpのバンドが得られた。またssB は期待される増幅バンド163bpに対して160bpのバンドが得られた。korA はRK2プラスミド維持に関与する領域で反復配列領域から遠隔である。trfA、ssB はそれぞれDNA結合蛋白として働く遺伝子であり、その領域に反復配列がみられる。trfA とssB の中間領域のバンド形成を行いフィンガープリントの作成を試みた。

#### 6. *Kil C* フランキング領域、アイテロンを用いたPCRプライマーの設定

RK2プラスミドのOri領域で*Kil C* フランキング領域に相当する部分にdna A結合部位にはさまれたIte ronが10ヶ所にみられる。Ite ronは株間で数が異なり、プラスミドのコピー数を制御し、薬剤感受性が左右される。Ite ronの塩基配列はIte ron 1とIte ron 10が逆向きに存在していることから5' TTT CAT TGA CAC TTG AGG GGC 3'をPCRプライマーとして作成し検討中である。



1.5% agarose gel  
(bp)



*Bgl* II 4  
*Fse* I 118  
*Hae* II 179

*Hpa* II 419

*Hpa* II 811  
*Hae* II 889

*Bsi*Y I 1047

*Bgl* I 1194

iteron 1

inverted repeats

iteron 10

ori - 10

ori - 8

*Iteron 10* TTTCAT TGACA CT TGAGGGGC

*Iteron 1* TTTCAT TGACA CT TGAGGGGC

*Iteron 2-9* NRNYRY TGACA GA TGAGGGGC  
 CT  
 T

*i repeat*

AGGGGC TGC GCCCCT

A=dna A birding site

分担課題：「VTEC感染の疫学的調査・解析と動物由来株のフェージ型」

分担研究者：宮本秀樹（静岡県環境衛生科学研究所・微生物部）

(I) 研究背景（疫学的背景）：

(1) 1998年の全国の食中毒発生件数は計3018件、患者総数は46041人を占め、病原大腸菌O157による食中毒が全国多発した1996年よりも件数、患者数共に上回っている。これは、広島県、山梨県でその件数、患者数が異常に増えたためである。他方、静岡県内では、昨年1～12月までの食中毒の発生件数は計34件、患者合計は1668人で、共に最近10年間に増加傾向にある。静岡県は昨年、発生件数では全国13位、患者数では全国8位を占めている。

(2) 昨年の全国の食中毒統計（1～9月まで）で、発生件数3018件、患者総数46041人のうち、1位は腸炎ビブリオ（713件、11102人）の食中毒が魚介類により急上昇した。O3・K6型菌が249件（35%）占め、1996年よりO4・K8型菌にとって代った。2位はサルモネラ〔544件、8618人（そのうちS.E.は326件60%、卵・加工品によるもの6%）〕の食中毒が横ばい状態で、3位にはカンピロバクター（414件、1762人）が2年前より増加している。また、SRSV（平9. 5/30食中毒追加指定）も（魚）介類（32%）により増加傾向にある。

他方、病原大腸菌は197件、3374人で減少傾向にある。VTEC（O157）は昨年5月、北海道産のイクラしょう油漬けによるDiffuse Outbreak（富山、東京、神奈川、山梨、千葉など49人）と、牛生レバー（名古屋、3人）や、保育園給食（宮崎、8人）の事例がある。有症者は1～3歳（207人、21%）と22歳前後にピークがあり、30～49歳では無症者が多いという。

(II) 研究目的：

厚生省食品衛生調査会食中毒部会（平10. 11/12）と静岡県食中毒防止対策専門委員会（平11. 2/2）のまとめによると、①腸炎ビブリオ（O3・K6型菌による海産魚類）、②サルモネラ（S.E.による生卵・液卵）③カンピロバクター（食鳥肉によるHS-19、1、2、4型菌、ギラン・バレー症候群との関連）、④EHEC O157（2次汚染）、⑤SRSV（生食用カキによる）が分析・評価・対策として重要視されている。

(1) そこで、1996年～1997年のVTEC（O157）大型食中毒事例の全国的多発、1998年の腸炎ビブリオの夏期集中多発以来、大規模化・広域化している細菌性（VTEC、S.E.）及びウイルス性（SRSV）食中毒と感染症事例に即応するため、迅速、簡便且つ高精度の検査法を求めて、①分子疫学的解析方法（VTECとS.E.の疫学マーカーとして、O・H血清型、毒素VT型、フェージ型PT型別など）及び②微生物学的解析方法（増菌、培養、分離、確認、同定、各種培地等の併用、Nested PCR、PFGE等の遺伝型別など）の改良・開発を研究目的とする。



(2) また一般県民・国民ばかりでなく、行政、保健・医療・福祉、教育、検査機関等に緊急且つ迅速的・効果的に感染症食中毒情報を周知させるためには、Internet FAX、公報誌等による情報公開、情報網（本庁のLANなど）の整備、充実化を図りたい。

(Ⅲ) 研究結果（現在までの進捗状況）と考察：

(1) 過去約12年間（1987年以来）の静岡県下の人及び動物（牛、鶏など）、食品（食肉、カイワレ大根・種子、野菜、卵、アサリ、カキ等）、環境水由来の食中毒菌の主なもの（VTEC、サルモネラ、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、ウェルシュ菌、SRSVなど）の（A）疫学的・統計的解析と（B）微生物学的解析を行ない、次の結果（まとめ）を得た（別添データ参照）

(A) 静岡県内及び全国の食中毒・感染症の疫学的調査と解析：

①静岡県では昨年の食中毒計34件、患者合計1668人のうち、腸炎ビブリオによる食中毒が計18件（75%）、患者合計で615人（37%）発生し、約10年ぶりに夏期（7月半ば～10月初め、特に8月のみで11件）に集中多発し、首位を占めた。また10/18件（56%）はO3・K6型菌が新しく1位を占め、O4・K8の4件、O4・K68の5件と交代した。

これはエルニーニョ現象と地球の温暖化により海水温が異常上昇し、近海沿岸部で腸炎ビブリオが異常増殖し、これに強く汚染した海産魚介類が市場に流通したためと考えられた。なぜならば、静岡県気象協会の気象データを見ると、静岡市で本年7～10月の間、年間平均気温16.1+0.5～2.3℃、平均湿度68+3～9%、平均降水量193+38～210mlと異常高値を示していた。全国的にも1992～93年激減した腸炎ビブリオが1997～98年より再増加し（特に7～9月）、O3・K6型菌がO4・K8型菌に代って最も多く、本県のO3・K6型菌は全国のその割合より1.3～2.0倍高かった。

②次いで、小型球形ウイルスSRSVによる食中毒が計7件（21%）、患者合計765人（46%）が、冬期（1～3月）に多発し、2位を占めた。特に、昨年2月14日に、その大型集団食中毒が浜北・天竜一帯で発生し、患者は644人（国内歴代5位）に達した。しかし原因食の仕出し給食（8000食）にはカキは含まれていなかった。

③更に、ウェルシュ菌による食中毒が計3件（6%）、患者計118人（10%）と細菌性食中毒の2位を占め、最近5年間で増加傾向にある。

④他方、昨年も多発が予想された病原大腸菌による食中毒は0件、サルモネラ（腸炎菌S.E.）も1件のみ発生しただけである。VTEC感染症も計19件、25人〔O157 19人、O26:H11 3人、O114:H19 2人、O111:H- 1人〕と1997年のVTEC感染者数（30件、70人）よりも半減した。

(B) 静岡県内のVTEC分離株の疫学的・細菌学的解析(平9～10のまとめ) :

(1) 静岡県及び全国のVTEC感染者の疫学的分析により、

①健康保菌者率(約30%)、②家族内感染率(約50%)、③小児感染率(10歳以下、約60%)、④溶血性尿毒症候群HUSの発生率(5～8%)が各々高い事が確かめられた。

(2) 人由来VTEC分離株(124株)の細菌学的・分子疫学的解析から、

①VTEC分離株中の157型出現率(約80%)と非O157型(O26、O111等)出現率(約20%)、②VTEC株中のVT-1、2両産生率(約60%)、③パルスフィールド電気泳動PFGEのDNA型別(感染研分類I～VI型)におけるII型(堺)、III型など、④多剤耐性(ABPC、SM、TC、EM4剤耐性、13～15%)、⑤ファージ型別(カナダLCDC分類83型中12種)での32型(約20%)などが各々高率である事が明らかになった。

(3) 動物(牛)由来VTEC分離株(22株)の細菌学的分析からは、

①VT-1、2両産生株(約60%)、②EM単剤耐性(100%)、③ファージ型別(LCDC分類で9種)での14型、34型(各18%)、54型(23%)など、人由来株との共通型(6種)が各々高率に存在する事が判明した。

(C) 静岡県内の食中毒等由来のサルモネラ(S. E.)の疫学的・細菌学的解析 :

①過去9年間(1989～97)の食中毒と散発下痢症患者由来のサルモネラ(計1,218株)のうち、腸炎菌S. E. 490株(40%)、ネズミチフス菌S. T. 195株(16%)、その他533株(44%)が分離され、血清型は30種以上に及んでいた。

②最近3年間(1995～97)の食中毒由来S. E. (計85株、13件)では

Ⓐ: EM単剤耐性株(48株56%→1997年67%)・9剤全感受性株(32株、38%)、Ⓑ: ファージ型PT4(50株、59%→1997年PT4+PT1型≒80%)、Ⓒ: PFGE型(当所分類2型あり)でA型(36株、42%)、非A型(49株、58%)が各々高率に占める事が判明した。

(2) 感染症・食中毒情報の情報公開と施策反映 :

①静岡県内・全国内の感染症・食中毒情報を“Infec-Net-Shiz”と名づけ、InternetにVTEC情報を“Ecol-Net-Shiz”として入力した。しかし“Salmo-Net-Shiz”、“Food-borne-Net-Shiz”は県内発生が少なかったため掲載しなかった。

②同様に、「静岡県の食中毒・感染症の最近の動向」、静岡県における「ペロ毒素産生大腸菌(VTEC)検出状況」として上記の結果(平10のまとめ)を静岡県医師会報(約4000部、毎月2回発行)に掲載し、医療従事者に還元した。

③食中毒予防の4原則（熱冷清迅）の遵守、県版「家庭でできる6つのポイント」（O157とS. E. 対策用）、「O157シャットアウト作戦」、From Farm to TableのHACCP方式の普及啓蒙など行政的に参加協力し、VTEC、S. E. による大型食中毒の発生防止に昨年は成功した。しかし、腸炎ビブリオ（夏期）、SRSV（冬期）の集中発生に対して、海産魚介類の生食、調理、2次汚染・相互汚染の対策が課題として残った。

(IV) 今後の発展の見通し：

平成9～10年度はVTEC（O157型と非O157型）中心に、サルモネラ（S. E.、S. T. など）も調査研究し、平成11年度は更に腸炎ビブリオとSRSV、カンピロバクター等を加えて、分担研究できればと考えている。

また、経口感染とするQ熱リケッチア（牛乳）、クリプトスポリジウム（原水）等も調査中である。

(V) 要約

以上から要約すると、①迅速、簡便、高精度の疫学マーカーとしてフェージ型別とPFGEによるDNA型別等の有用性、事例追跡比較、②増菌（集菌）・分離・同定の細菌学的解析として既存法併用・改良・開発の余地、③食中毒・感染症の発生動向と情報公開（Internet、印刷物、FAX、講演等）の有効性等が確認されつつあるため、更に検討を続行したい。

SUMMARY on Etiology of VTEC Infection in SHIZUOKA & JAPAN

Parameters**	Year	SHIZUOKA Pref.	All JAPAN
1) The Infected: $10^5$ Population	1996	0.79	80.61
	1997	1.61	14.66
2) % Healthy Carriers	1996	20.0 %	6.6 %
	1997	32.8 %	28.8 %
3) % HUS	1987-1997	4.8 %	-
4) % Death	1996	0.0 %	0.13 %
	1997	0.0 %	0.23 %
5) % Familial Infection	1987-1997	50.0 %	-
% Sporadic Infection	"	50.0 %	-
6) Sex Ratio in the Infected	"	M 1.00 : F 0.88	-
7) % Children (0-10 yrs)	"	61.3 %	-
8) % 0-157 of VTECs	"	81.5 %	-
9) % VT-1 & VT-2 (+) of VTECs	"	59.7 %	-
10) % Multi-Drug Resistant VTECs	1997	13-15 %	-
* Total Population	1996	$377 \times 10^4$	$12557 \times 10^4$

\*\* Calculated on Sep. 29, 1997