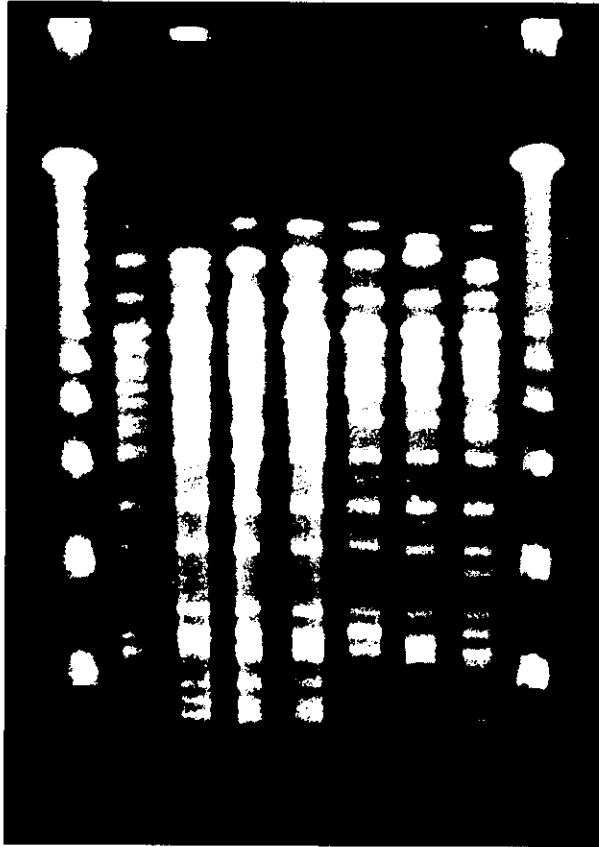


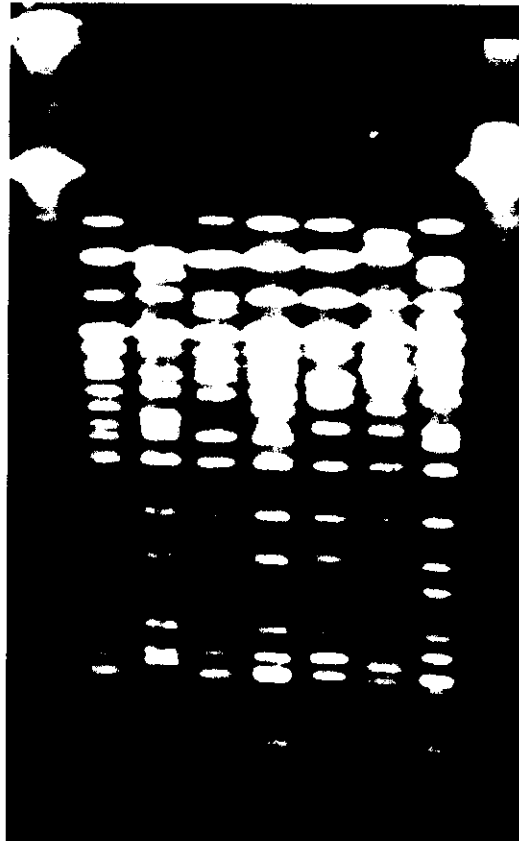
C

M 1 2 3 4 5 6 7 M

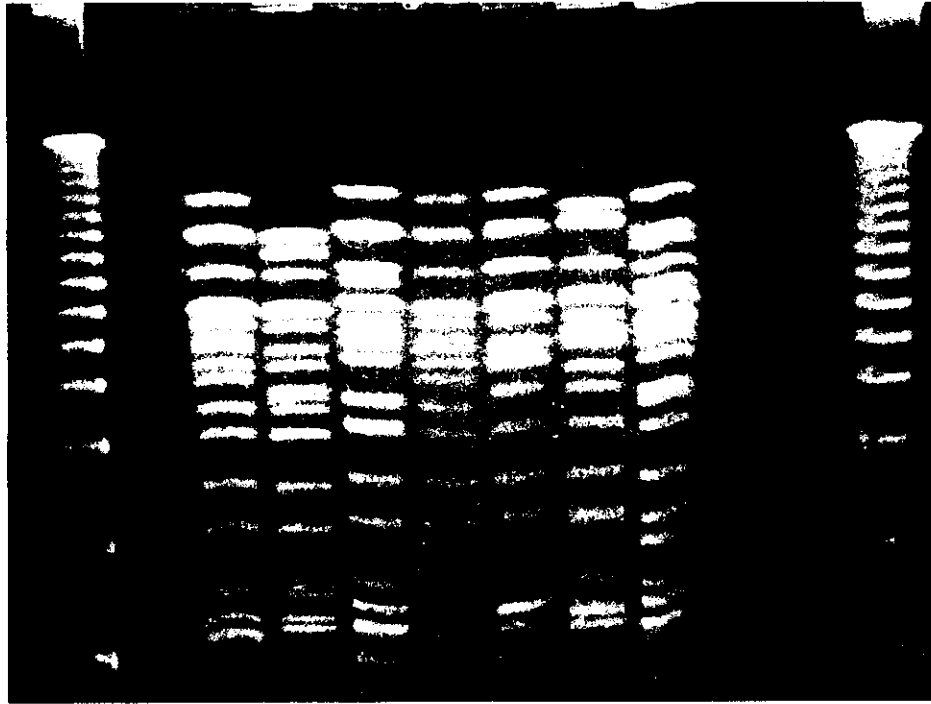


D

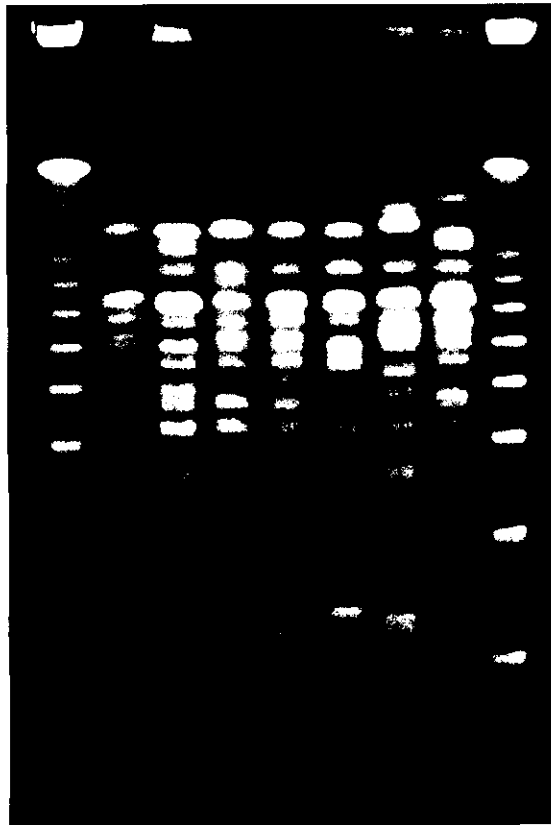
M 1 2 3 4 5 6 7 M



E M 1 2 3 4 5 6 7 M

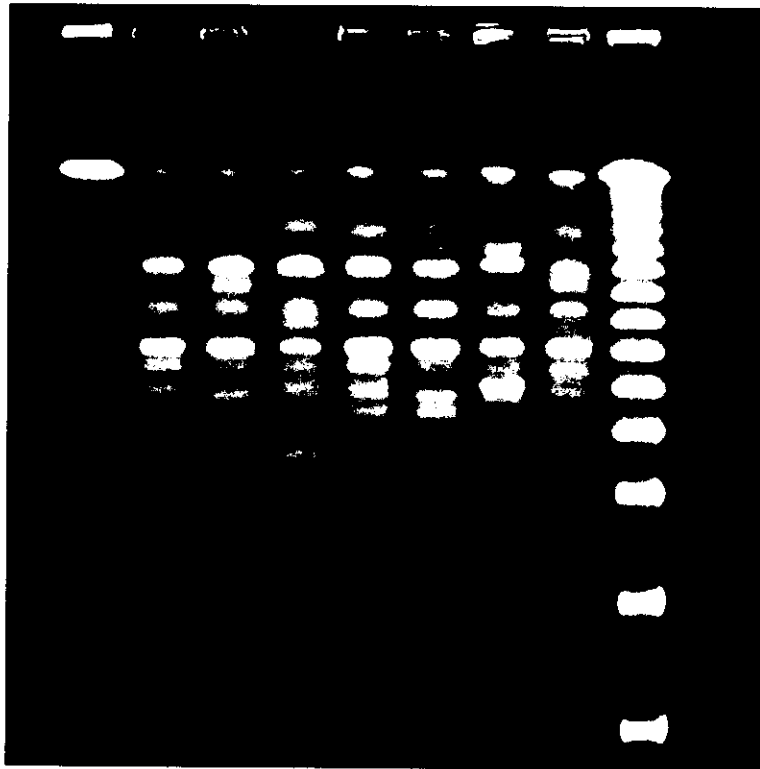


F M 1 2 3 4 5 6 7 M



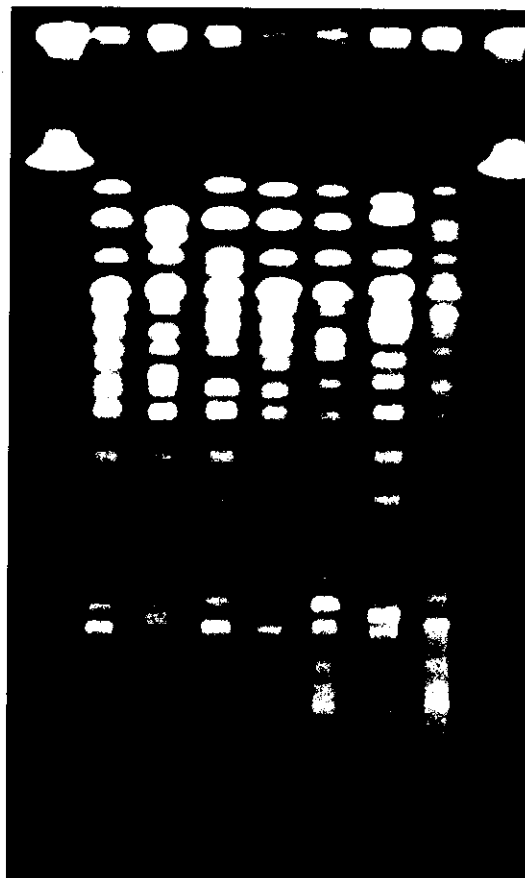
G

M 1 2 3 4 5 6 7 M

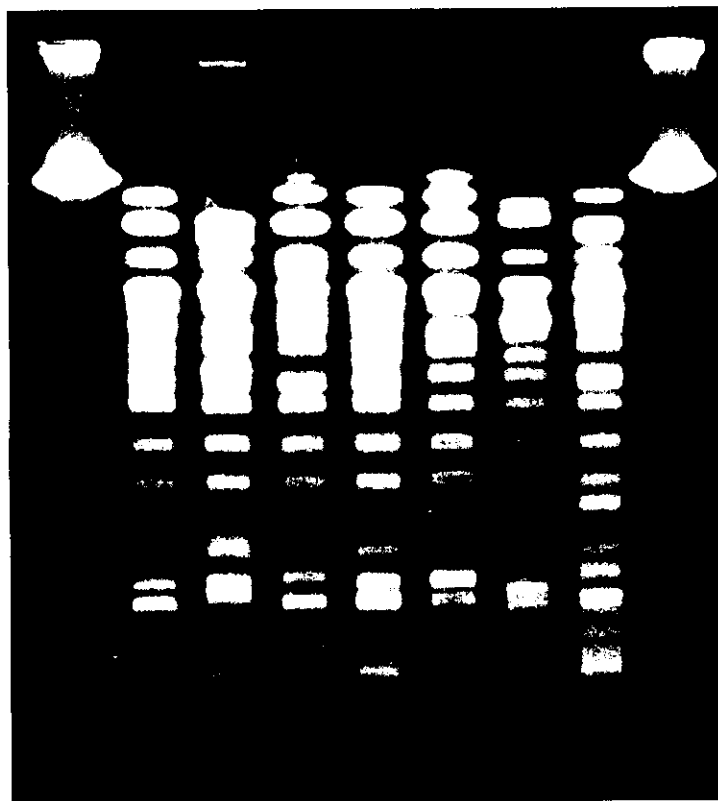


H

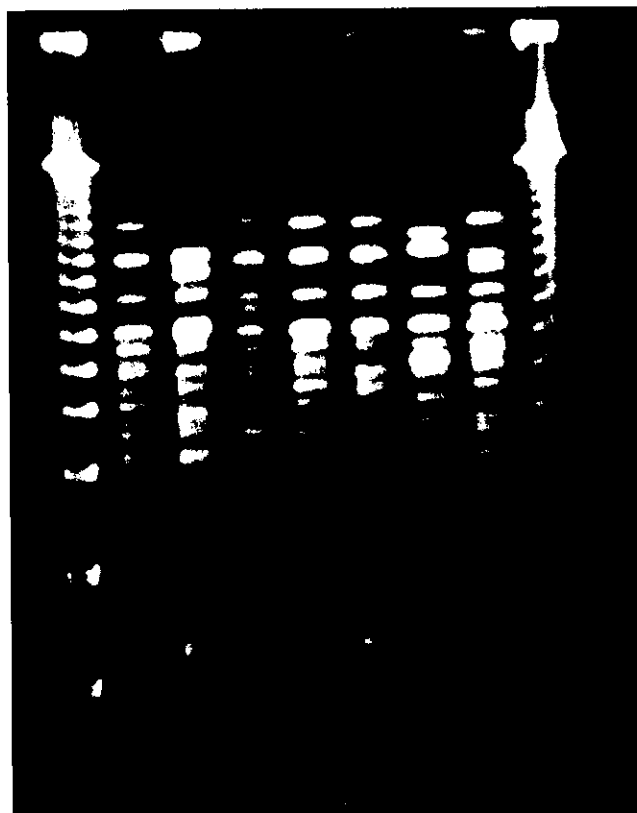
M 1 2 3 4 5 6 7 M



I M 1 2 3 4 5 6 7 M

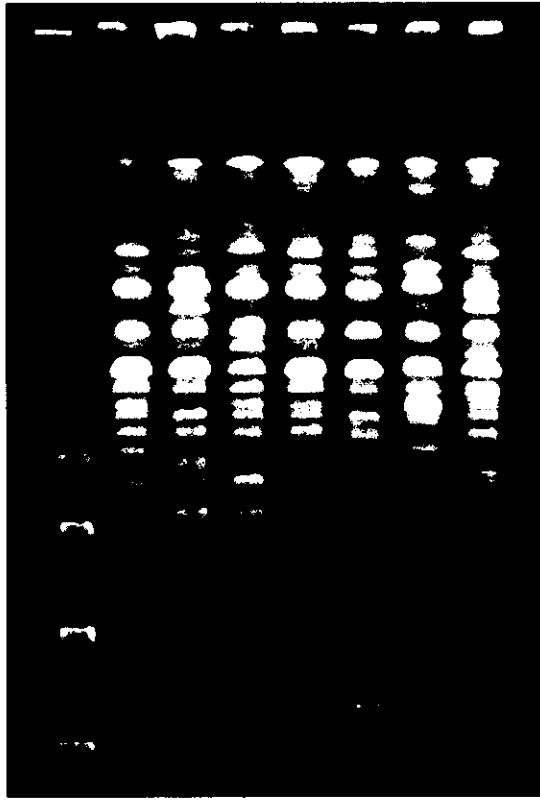


J M 1 2 3 4 5 6 7 M



K

M 1 2 3 4 5 6 7



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

分担研究・東海・北陸地方で平成8年から12年に検出された腸管出血性大腸菌026の

分子疫学的解析

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所

分担研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所

研究要旨

東海・北陸地方で平成8年から12年にかけて検出された散発及び集団発生の136事例に由来する196株の026について、12種類の抗生物質を用いた薬剤感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）による解析を行なった。なおPFGEは0157で用いられている制限酵素 *Xba* I、パルスタイム等のPFGE泳動条件を用いて行ない、0157で広く用いられている泳動条件の026への応用の可能性についても検討を加えた。

この地方の8地方衛生研究所（名古屋市、岐阜県、岐阜市、三重県、愛知県、富山県、石川県、福井県）で検出された026の薬剤感受性試験の結果、196株のうち、33事例に由来する39株（事例で24.3%の耐性率）に薬剤耐性が認められた。これら耐性株の大半はストレプトマイシン（79%）、及びテトラサイクリンに（52%）耐性であり、これら2剤に対する耐性パターンが全多剤耐性パターンの内で最も多く認められた（21%）。一方、ナリヂクス酸（9%）、及びトリメトプリム（6%）に対する耐性の割合が低かった。

検出された026は（各県由来株各地研5株から45株）が3から18の異なったPFGE型に型別分類された。また集団事例（32事例）から分離された株は、同一事例においても複数の株がいずれも同一のPFGE型に分類された。これらの結果はこの地域で分離された各026の分子レベルでの多様性を示唆するものであった。また、0157のPFGE泳動条件は、026を十分な解析力を有して型別分類することが可能であり、026のPFGE泳動条件としても応用可能であることが明らかとなった。さらに026集団事例等の疫学解析にも今回用いたPFGE条件は応用可能であることが示唆された。

今回の026のPFGE画像は、PFGEを国立感染症研究所の推奨している標準法で行なっていることから、近い将来、我が国で稼働するであろう「PFGE画像診断を基盤とした分散型システム（DNAネット）」のPFGE画像データベースに加えることも可能なものと考えられる。

A. 研究目的

我が国の腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症患者は、平成3年から7年の間は年間約100名前後で推移していた。しかし、大阪府堺市での大規模な食中毒事例が発生した平成8年（年間患者数約8300名）を契機として著しい患者数の増加が認められ、平成9年は、年間患者発生数が約2000名となり、EHEC感染症は我が国の主要な細菌性腸管感染症となった。

我が国でEHEC感染症を起こすEHECの血清型はO157、O26、O111の血清型で全体の90%以上を占めている。このなかでもO157は、平成3年から7年の間は約90%と大多数を占めてが、それ以降は年々減少し、平成12年には全体の約70%までに減少した。これとは対照的に、O26は増加の傾向にあり、平成9年から11年にかけては、我が国のEHEC感染症原因血清型の約18%を占めるまでになった。

本研究では、平成8年から12年に東海・北陸地方の地方衛生研究所（地研）で検出された196株のEHEC O26について12種類の抗生物質に対する感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）を用いた解析を行なった。これらの解析から、O26の薬剤耐性菌の分布状況を明らかにするとともに、PFGEを我が国のEHECのPFGE標準法として推奨されている国立感染症研究所の方法で行なうことから、将来、我が国で稼働するであろう「PFGE画像診断を基盤とした分散型システム（DNAネット）」のPFGE画像のデータベースに加えることも視野に入れて解析を加える。

B. 研究方法

菌株：散發、及び集団食中毒136事例に由来する196株のEHEC O26を用いた（表1）。その内訳は、富山県衛生研究所での分離株45株（15散發事例由来15株、10集団事例由来29株、下水由来1株）、名古屋市衛生研究所で分離された30株（22散發事例由来22株、2集団事例由来8株）、愛知県衛生研究所での分離株30株（22散發事例由来22株、2集団事例由来6株、2牛糞由来2株）、石川県保健環境センターでの分離株27株（10散發事例由来10株、5集団事例由来17株）、岐阜県保健環境研究所での分離株24株（12散發事例由来12株、4集

団事例由来12株）、三重県科学技術振興センター保健環境研究所での分離株24株（13散發事例由来13株、3集団事例由来11株）、福井県衛生研究所での分離株11株（9散發事例由来9株、1集団事例由来2株）、それに岐阜市衛生試験所での分離株5株（3散發事例由来3株、1集団事例由来2株）である。また、富山県衛生研究所由来1株は平成4年に検出されたものであった。その他は全て平成8年から12年の間に検出された株であった。OH血清型別分類に関しては、菌株を分離した各施設において市販の病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて行なった。また、平成11年から12年の間に愛知県衛生研究所で分離された73株のO157（62株は散發患者由来、11株は保菌者由来）をO26薬剤感受性試験の対照として用いた。

ベロ毒素遺伝子及び産生性試験：ベロ毒素遺伝子は市販のベロ毒素遺伝子検出用プライマー（タカラ）を用い、PCRにて検出した。ベロ毒素産生性は、各施設において培養上清中に存在する毒素を市販のVET-RPLA（デンカ生研）を用いて検出した。薬剤感受性試験：12種類の抗生物質を用い、寒天平板希釈法にて行なった。その薬剤と括弧に耐性と見なした濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を以下に示した。ペペラシリン(128)、セフォペラゾン(64)、カナマイシン(64)、アンピシリン(32)、クロラムフェニコール(32)、フォスфоマイシン(32)、ナリヂクス酸(32)、ゲンタマイシン(16)、ストレプトマイシン(16)、テトラサイクリン(16)、トリメトプリム(16)、ノルフロキサシン(16)。トリプトソイ液体培地（栄研化学）で一夜培養したO26及びO157菌液を、滅菌リン酸緩衝液で約 10^4 に希釈した。その希釈液を耐性と見なす濃度の抗生物質を加えたミラーヒントンII寒天平板培地（BBL）にマイクロプランターで接種した。37°C、一夜培養後、抗生物質を加えた培地に発育が認められたO26、及びO157の株をその抗生物質に耐性であるとした。本試験は全ての株について愛知県衛生研究所にて行なった。PFGE：国立感染症研究所の方法に従って行なった。その方法を簡単に述べると、寒天平板培地で一夜培養したO26の1コロニーを滅菌精製水200 μL に懸濁し、その菌液を等量の2%軟寒天と混和した。その100 μL をインサートプラグ内に注入し水中で30分放置した。固化したゲルをリゾチーム溶液（組成：0.5M EDTA pH8.0+lyso

zyme(1mg/ml)、1 ml/サンプル)で37℃、一夜処理し、

さらにプロテナーゼK溶液(組成:0.5M EDTA pH8.0+proteinase K(1mg/ml)、1 ml/サンプル)で50℃、一夜処理した。その後、制限酵素 *Xba* Iで37℃、一夜処理を行ない(30U/サンプル)、LKB 2015(ファルマシア社)又はCHEF DR-III(バイオラド社)によって電気泳動を行なった。

泳動条件は、LKB 2015の場合は電圧200V、泳動時間22時間1分、パルスタイム4秒から8秒 6時間、8秒から4秒 1分、4秒から8秒 6時間、8秒から50秒 10時間であり、CHEF DR-IIIの場合は6 V/cm、パルスタイム4秒から8秒 9時間、8秒から50秒 13時間である。型別分類は、目視にて行ない、お互いのバンドの相違が3本までは同じPFGE型とし、4本以上異なる場合は異なったPFGE型とした。なお東海地方の地研(名古屋市、岐阜県、岐阜市、三重県、愛知県)で分離された026株は、愛知県衛生研究所にてLKB 2015を用いてPFGEを行ない、北陸地方(富山県、石川県、福井県)で分離された026株は、富山県衛生研究所にてCHEF DR-IIIを用いてPFGEを行なった。

なおPFGE画像の解析は全て愛知県衛生研究所で行なった。

C. 研究結果

[I] 026の血清型と毒素型

表1に平成8年から12年に東海・北陸地方の8地研で検出された026の血清型と毒素型を示した。検出された026の80%以上が026:H11 VT1又は026:HNMT1であった(菌株数で84.1%、事例数で81.5%)。

[II] 026の薬剤感受性試験

136事例に由来する196株の026のうち、何らかの抗生物質に耐性が認められたものは33事例由来39株(事例で24.3%の耐性率)であった。これら耐性菌は岐阜市(全5株)を除く7地研、すなわち東海・北陸地方6県いずれからも検出された。また耐性が認められた抗生物質は12薬剤中7剤で、その耐性パターンは単剤から4剤までであったが、単剤(27%)と2剤耐性(45%)で全耐性菌の約7割を占めていた(表2)。最も多く耐性が認められた抗生物質はストレプトマイシン(26事例/33事例)、次いでテトラサイクリンで

(17事例/33事例)であり、両者が同時に認められる2剤耐性パターンが全耐性パターンの中で最も多く認められた(7事例/33事例)。

一方、ナリヂクス酸(3事例/33事例)、及びトリメトプリム(2事例/33事例)は耐性の割合が低かった。なお同一の集団食中毒事例に由来する菌株は全て同じ耐性パターンを示したことから薬剤感受性試験の項のみ事例数を用いて結果を示した。

愛知県で平成8年から12年に検出された02630株と岐阜県で平成11年から12年の間に検出された0157について、その薬剤感受性試験の結果を比較した(表3)。薬剤耐性の割合は、026が23.3%、0157が17.8%とほぼ同一であった。最も多く認められた耐性パターンは両者ともストレプトマイシン+テトラサイクリンで、耐性菌に占める割合(026の57%、0157の54%)もほぼ同様であった。また赤痢菌、サルモネラ及びEHECではほとんど存在しないナリヂクス酸耐性株が026で1株、0157でも2株認められた。

[III] PFGEによる026の型別分類

検出された026は(各地研5株から45株)各地研毎に3から18の異なったPFGE型に分類された(表4)。

地研別では、福井県で分離された11株が9つのPFGE型に分類され、菌株に対して最も多くのPFGE型に分類された。一方、富山県での分離45株は14のPFGE型に分類されたのみで、菌株に対して最も少ない型別分類結果であった。また集団事例(32事例)はそれぞれの事例での複数の分離株全て同一のPFGE型に分類された。

D. 考察

196株の026の薬剤感受性試験の結果から、東海・北陸地方における026薬剤耐性菌の頻度及び耐性薬剤の様相が明らかとなった。

これら耐性菌の大半(27/33)はストレプトマイシン及びテトラサイクリン耐性であり、その耐性パターン、及び耐性率は同時に実施した0157検査結果と類似していた。

今回、026のPFGE解析にあたり、制限酵素、パルスタイム等のPFGE泳動条件として0157の解析に広く一般に用いられている条件を用いて行なった。そして、その型別分類結果は、各地研で検出され

た026が、最も少ないものでも45株が14のPFGE型、最も多いもので11株が9のPFGE型に分類されたことから、今回用いたPFGEの条件により、十分な解析力が得られるものと思われた。また疫学調査の結果から、集団発生と考えられた事例から分類された菌株の全てが事例ごとに単一のPFGE型に型別分類された。以上の結果から、0157のPFGE泳動条件は026のPFGEにも応用可能であることが明らかとなった。さらに026集団事例等の疫学解析にも今回用いたPFGE条件は応用可能であることが示唆された。

また、今回得られた026のPFGE画像は、PFGEを我が国の標準法として推奨されている国立感染症研究所の方法で行なっていることから、近い将来、我が国で稼働する「PFGE画像診断を基盤とした分散型システム（DNAネット）」のPFGE画像のデータベースに加えることも可能であると思われる。今回は、富山県、愛知県においてPFGEを行なった。解析にあたっては目視による分類という限界があったため、各地研ごとの比較のみで、地研間の比較はできなかった。しかしながら上に述べた分類結果が得られたことから、各県内における026の分子レベルでの多様性を明らかにすることができた。来年度に配布される日本語版PFGE解析ソフトは目視による型別分類より大量の菌株の型別分類を迅速に行なうことが可能であり、東海・北陸地方において検出された026の分子レベルでの多様性を明らかにすることが可能となるであろう。

E. 結論

東海・北陸地方で平成8年から12年に検出された196株の026について、0157のPFGE泳動条件を用いてのPFGE及び12種類の抗生物質を用いた薬剤感受性試験を実施した。その結果、東海・北陸地方で検出され026の約25%が薬剤耐性菌であり、これら耐性菌の大半はストレプトマイシン、及びテトラサイクリンに耐性であった。これらの結果は同時に愛知県で分離された0157の検査結果と類似していた。

0157のPFGE泳動条件は、十分な解析力を有して026を型別分類することが可能であり、026のPFGE泳動条件としても応用可能であることが明らかとなった。さらに026のPFGEは、国立感染症研究

所の方法で行なっており、そのPFGE画像は近い将来、我が国で稼働する「PFGE画像診断を基盤とした分散型システム（DNAネット）」のデータベースに加えることも可能であると思われた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし

表1 東海・北陸地方で検出された026の血清型と毒素型

血清型	毒素型	事例数	菌株数
026:H11	VT1	87	131(2)*
026:H11	VT1+2	15	18
026:HNM	VT1	23	32(1)**
026:HNM	VT1+2	3	5
026:H?	VT1	6	8
026:H?	VT1+2	2	2
		136	196

HNM:運動性がないためにH抗原が決定できない。

H?: H抗原未決定

VT:ペロ毒素

*:うち牛糞、下水由来がそれぞれ1株。

** :うち牛糞由来1株

表3 愛知県で検出された026と0157の薬剤耐性パターンの比較

耐性数	026<7/30>	0157<13/73>
1	NA(1), FOM(1), TC(1)	NA(2)
2	SM TC(4)	SM TC(7), APM SM(2)
3		APM SM TC(2)

<耐性株数/検査株数>
(耐性株数)

表4 PFGEによる026の解析結果

分離地	研 菌株数	PFGE型別分類数
富山県	45	14
名古屋市	30	18
愛知県	30	18
石川県	27	12
岐阜県	24	12
三重県	24	12
福井県	11	9
岐阜市	5	3
	196	

表2 026の薬剤耐性パターン(事例数)

耐性剤数	薬剤	AMP	FOM	KM	NA	SM	TC	TMP	事例数
	単 剤		FOM(2)		NA(2)				2
						SM(2)	TC(3)		2
	二 剤	AMP(2)		KM(4)		SM(2)			2
						SM(4)			4
						SM(7)	TC(7)		7
						SM(2)		TMP(2)	2
	三 剤	AMP(2)	FOM(2)			SM(2)			2
			FOM(1)			SM(1)	TC(1)		1
				KM(1)		SM(1)	TC(1)		1
	四 剤	AMP(4)		KM(4)		SM(4)	TC(4)		4
		AMP(1)			NA(1)	SM(1)	TC(1)		1
		(9)	(5)	(9)	(3)	(26)	(17)	(2)	33

厚生科学研究補助金(新興・再興感染症事業)
(分担)研究報告書

腸管出血性大腸菌とサルモネラにおけるパルスフィールド電気泳動(PFGE)法
による解析の利用に関する研究

分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所・公衆衛生部・微生物課長

研究要旨

近畿地区の3衛生研究所で経験した腸管出血性大腸菌(EHEC)、O157の散発、家族内発生と集団発生事例から分離した菌株、2衛生研究所で経験したサルモネラの小規模食中毒事例および全国規模でのdiffuse outbreaksの原因となった菌株について、従来から行われている薬剤感受性試験や生化学的性状試験に加えて近年確立されたPFGE法による解析を行った。

同一施設内、同一事例内の菌株は同じPFGE型を示し共通の感染源と考える結果を得ているが、時期を同じくして発生した散発、家族内由来株にも同じPFGE型を示すものがあり、これが地域内での潜在的な共通感染源によるoutbreaksを示唆するが、原因は特定できなかった。

今後ますます人的、物的交流が盛んとなり、感染症や食中毒は一地域に限定して発生するよりも行政範囲を超えた規模で発生することが増加すると考えられる。そのような場合の感染源調査や疫学調査においてはそれぞれの事例から分離された菌株の比較が必須となる。その方法として菌株の系統発生的遺伝子情報で識別するPFGE法は比較的簡便に実施でき事例間の菌株を検討するには有用な方法と考えられた。

A. 研究目的

下痢症あるいは食中毒事例の感染源調査あるいは集団発生における発生規模の特定や地理的、時間的に異なって発生した広域流行事例の疫学解析においては、従来から生物学的、血清学的方法による解析が行われてきたが、近年分子生物学的研究の進展に伴い遺伝学的手法による解析法が頻用されるようになってきている。下痢原性細菌のうち腸管出血性大腸菌(以下EHEC)、O157とサルモネラは毎年散発発生あるいは集団発生をみており、それらの事例の解析法としてPFGE法が開発され、特に集団発生由来の菌株間の類似性を調べ、喫食状況、患者発生状況などの疫学調査結果の蓋然性に科学的根拠を提供できる一つの有効な方法として行われ

ている。本研究では近畿地区において経験した事例に適用しPFGE法による解析法の有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

近畿地区において経験したEHEC、O157の散発あるいは家族内発生事例(滋賀県、和歌山市)、集団発生の2事例(大阪府)由来菌株についてPFGE解析を行った。また近年鶏卵が感染源として注目されている*Salmonella* Enteritidis(以下SE菌)による散発事例と小規模集団発生事例の解析(奈良県)および青森県の業者が製造したイカ菓子を原因として発生したdiffuse outbreaks由来の*S. Oranienburg*(以下SO菌)、*S. Chester*(以下SC菌)のPFGE解析(大阪府)を行った。PFGE法は国立感

染症研究所の方法に準じて実施した。菌株のPFGE型並びに菌株間の類似性の判定はそれぞれの施設の判定基準によった。

C. 研究結果

1. EHEC, O157のPFGE解析

和歌山市では家族内8事例と散発9事例の合計17事例29株をPFGE解析した。3家族6名は全く交流がないが、PFGE型と他の疫学マーカーが一致したことから、同一の感染源が疑われた。調査の結果同一店舗での喫食歴とその店舗のチェーン店での喫食が明らかになった。また散発事例の1株は食肉の流通経路から神奈川県での患者と同じPFGE型であることが証明され、離れた地域において同一菌株による患者発生が確認された。

大阪府では4週間にわたって散発的に発生したことから集団発生の認識が遅れた保育園事例での解析は、患者やその家族から分離したO157は泳動パターンが3本以内であり菌株間に類似性が認められたことから、同じ菌株によるヒトからヒトへの二次、三次感染によって拡大した集団発生例であることを裏付けた。またO157によるキャンプでの集団発生事例は、当初他県で一名の患者発生があり、参加したキャンプでの感染が疑われたことから、本府において参加者全員の健康調査を行い、11名から同菌が分離できた。それらをPFGE解析し全株が同一型であり、姉から二次感染した一名の患者も明らかにした。

滋賀県では1992年から2000年にかけて分離された散発患者の169株について解析した。同一家族内での発生であってもPFGE型が異なり感染源が別と思われる2家族(4株)を経験した。また1996年8～9月に14名(14株)、2000年7月に5名(5株)の散発患者発生をみたがそれらの患者由来株は、それぞれ同じPFGE型であることがわかり、県内で同じ感染源による潜在的流行があった可能性を示唆しているが、原因食は特定できなかった。また2000年10月の半月間に4家族9名と別の散発患者1名の発生があり、これも潜在的流

行が疑われたが、2家族(4名)は同一型であったが、他のものは異なる型であったことから感染源は別と考えている。

2. サルモネラのPFGE解析

奈良県では2000年4～10月の7ヶ月間に12例のSE菌の小規模な集団発生があった。各事例でのヒト糞便以外からのSE菌検出は、ふきとり材料からの1例のみであった。同一事例内のPFGE型は全ての事例で完全に一致し、同一感染源が証明された。一方事例間でも同じPFGE型のものがあり、感染源調査によって鶏卵を使用した食品を喫食したことは確認できたが、原因食品の特定はできなかった。そこでSE菌の感染源は鶏卵が関係して発生した事例が多数報告されていることから、喫食した鶏卵の流通経路を調査して同一であったことは確認している。しかしながら本県で検出頻度が高いPFGE型の流通経路を調査しても、別ルートで販売された事例もあり、必ずしも同一経路のSE菌が、同じPFGE型を示すという関連性はみられていない。

全国規模でのdiffuse outbreaksであったことが、各地の事例解析から明らかにされている「*イカ菓子事件*」は、大阪府でも1999年1～5月にSO菌とSC菌による多発流行として経験している。本府では*イカ菓子*由来株およびそれを喫食した患者由来株と同時期に発病したが*イカ菓子*の喫食状況が不明の患者菌株を解析した。また事件前に分離され保存中の両血清型菌株と事件終息後に検出された両血清型も実験に供して比較を行った結果、事件由来の両血清型株は、それぞれ今回の事件関連菌株に特徴的なPFGE型株であり、以前の菌株や事件後に分離された菌株とは異なっていることを明らかにしている。この解析では別の疫学マーカーによる解析も行ったが、その結果からも事件由来株とそれ以外の株では異なっていることが確認されている。

D. 考察

EHEC、サルモネラにおけるPFGE解析は疫学

調査結果を裏付けるに重要な科学的根拠を与えるものと考えられるが、同一家族内で相違したり、疫学調査では明らかに別と考えられる患者株において同じ型を示すことがあることや、原因食品として強く示唆される鶏卵等の食品の流通経路が同じであるのにPFGE型が異なったSE菌が検出されることがあるが、これらはすでにある特定のPFGE型SE菌の鶏卵(食品)汚染が高くなっており、流通経路に関係なく同一菌が検出される状況にあることも考えられるので、PFGE型だけの結果をもって判断することに問題があることも多い。従ってこれまでの薬剤感受性やプラスミドプロファイル解析など別の疫学マーカー解析と総合的に判断することが必要と思われる。

また、今回施設間におけるPFGE法の方法の違いによる比較は行っていないが、大阪府での結果において、酵素切断時の被検菌濃度の違いが電気泳動像に影響することを経験しており、多くの検査施設で行われたPFGE型別の結果を比較する場合には、ゲルブロックの濃度や、使用酵素の種類、濃度、処理時間およびその方法を規定し、菌種による最適条件を統一して”PFGE法検査マニュアル”を作成し、それに従って行うことが最小条件と思われる。

E. 結論

腸管出血性大腸菌、O157とサルモネラにおけるPFGE解析は、同じ集団間の患者由来菌株の類似性をみるには適した方法と考えられた。また地理的に離れた地域、お互いに交流がない家族内発生事例が頻発するような、平常時と異なった患者発生がある時には、それらの菌株についてPFGE解析で菌株の類似性が確認されたならば、潜在的に流行が起こっている可能性を考えた対策が必要であり、積極的に疫学調査を行う必要がある。そのためには広域で分離された同種菌株の解析結果の比較が必要で、パルスネットワーク体制の整備が緊急課題である。しかしながらPFGE法単独では疫学調査結果と一致しない事例も認められ

ていることから、場合によっては従来からの生物学的、免疫学的解析法の結果も考慮して判定することが必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

「学術雑誌」

勢戸和子、田口真澄、河原隆二、小林一寛、ガールスカウト夏期キャンプにおける腸管出血性大腸菌、O157:H7の集団発生例、厚生省・病原微生物検出情報、21:271-272、2000。
森野吉晴、山下晃司、金澤祐子、上野美知、太田祐元、北口三知世、岩崎恵子、辻澤恵都子、旅田一衛、牛生レバー喫食後の腸管出血性大腸菌 O157 感染発症事例の続発 - 和歌山市、病原微生物検出情報、21 : 164-165、2000。

「学会口演」

勢戸和子、田口真澄、河原隆二、小林一寛、STEC、O157およびO26集団発生事例の疫学解析、第43回日本感染症学会中日本地方会、2000年11月(岐阜市)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

I. 研究協力機関及び協力者

滋賀県衛生環境センター

石川和彦、林 賢一

奈良県衛生研究所

青木喜也、吉田 哲、市川啓子

和歌山市衛生研究所

森野吉晴、山下晃司、金澤祐子、

上野美知、太田祐元、北口三知世、

岩崎恵子、辻澤恵都子、旅田一衛

大阪府立公衆衛生研究所

田口真澄、勢戸和子、河原隆二

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

Salmonella Enteritidis による食中毒事例の パルスフィールドゲル電気泳動
による遺伝学的解析

奈良県衛生研究所 青木喜也 吉田 哲 市川啓子

要旨

2000年4月から10月までに発生した食中毒事例の中で、*Salmonella* Enteritidis（以下 S.E.と略）を原因とする食中毒事例について、感染源および感染経路解明の目的で、菌株の遺伝学的解析をパルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE と略）を用いて検討した。PFGEの分析結果は、12食中毒事例が6種の泳動パターンに分類できた。各々の事例内での不一致例は観察されなかった。このことから同一事例内では、同一遺伝子型、すなわち同一クローン由来であることが示唆された。原因食品の遡り調査を実施し、泳動パターンと流通経路の関係をみたが、関連性は見いだせなかった。

目的

本研究は S.E.による食中毒事例から分離した菌株について、PFGE 分析を実施し、遺伝学的解析による疫学調査への有効性を検討することを目的とした。

材料

2000年4月から10月に県内で発生した食中毒事例から分離した S.E.菌株を検索対象とした。

PFGE 分析

菌体を cell suspension buffer に懸濁させる。lysozyme と embedding アガロースを加え、サンプルプラグを作成する。このプラグに lysis buffer と lysozyme を加え、37℃1時間反応させる。洗浄後、proteinase K を加え、50℃で16～20時間反応させる。wash buffer で洗浄後、制限酵素 Bln I (Xba I) を加え、37℃で16～20時間処理した。パルスフィールド電気泳動は CHEF DR III (Bio Rad 社) を用い、同社の添付バッファを使用し、温度：14℃、パルスタイム：5.3 から 66 秒、泳動時間：19.5 時間の条件下で行った。泳動後、アガロースゲルは ethidium bromide で染色し、UV照射下で撮影した。

PFGE 分析結果

食中毒事例

事例A「もずく」による食中毒事例：家庭で4月30日夕食に1つの生卵の黄味を5人分のもずくに分けてかけてたべ、5月1日に4人が激しい下痢、腹痛、発熱(39℃)など食中毒症状を訴え入院、1人は軽症であった。この4人から S.E.が分離された。

事例B「カツ丼」による食中毒：5月7日下痢、発熱(39.5℃)、腹痛で2人の人(友人)が別々の医療機関を受診したが共通食がカツ丼であることが判明した。2人から S.E.を分離した。

事例C「原因不明」食中毒：7月25日家族4人が伊勢志摩方面へ旅行中、食中毒症状を呈し入院 S.E.が分離された。旅行に参加しなかった家族1人も奈良で入院し S.E.を分離した。

事例D「生卵かけごはん」による食中毒：7月16日スーパーで卵を購入。7月19日卵かけごはんを食べ、7月20日発症、21日～23日まで夜間診療を受診、23日から県立病院へ入院。患者から S.E.が分離されたが、残りの卵から S.E.は分離できなかった。尚、納入業者によると特売品のため生産者は複数で特定できない。

事例E「麦+定食」による食中毒：8月31日に健康ランドの食堂でむぎ+定食を食べた利用者が下痢、発熱(38～40℃)の食中毒症状を呈した。患者便からS.E.を分離。しかし、食材及びふきとりからは分離できなかった。

事例F「原因不明」による食中毒：ある保健所から、苦情者は事例Eの患者と思われるが本人は別の業者へ苦情を申し立てているのでと検査依頼があったものでS.E.を分離。

事例G「ハム」による食中毒：患者は、9月10日にハムを食べ11日に子供3人が下痢、発熱(40℃)の症状を呈し、受診した医療機関でサルモネラが検出されたと届け出た。同定の結果S.E.を確認した。残食のハムからS.E.は検出されなかった。届け出者はハムを原因食品としているようだが、喫食調査票によると発症前日にカツ丼を食べていることがわかった。

事例H「飲食店」食中毒：飲食店で9月12日と13日の昼食(どちらもバイキング形式)をとった、いくつかの家族からそれぞれのメンバー全員が下痢、腹痛、発熱(38～40℃)の食中毒症状を呈して入院。患者便からS.E.を分離した。

事例I「ちらし寿司」による食中毒：9月16日保育園のうちあげで職員らがちらし寿司を食べ下痢、腹痛、発熱(37～39.5℃)の食中毒症状を呈し、入院者も出た。持ち帰った者もあり、家族にまでおよんでいる。患者と従業員の便からS.E.を分離したが、残食からは分離できなかった。

事例J「カキフライ」食中毒：9月17日昼グループ4人でスーパーで購入した惣菜を食べ、その夜4人が下痢、嘔吐、発熱(40℃)を呈し、18日に受診。共通食は昼食のカキフライ、さつまあげ、その後夕食に焼きそば(豚肉、イカ、そば、野菜)を摂っている。医療機関より提出された菌株はS.E.であった。

事例K「仕出し店」食中毒：9月15日仕出し店が調製した弁当を共通食とする人たちが下痢、腹痛、発熱の食中毒症状を呈し、受診し入院者も出た。患者便及びふきとりからS.E.を分離した。

事例L「カツ丼」による食中毒：10月

17日昼大阪で友人と3人でカツ丼を食べ18日に下痢、腹痛、発熱(39.5℃)を呈し受診し、便培養でS.E.が分離された。あとの友人2人も県外で入院し、サルモネラが分離されている。

事例AからLまで、各々の事例内では同一パターンを示し、同一遺伝子型、すなわち同一クローン由来であった。

パターン1：事例B・C・D・H・I・Jの5事例が同じ泳動パターンをしめした。

パターン2：事例E・Fが同一パターンであった。

パターン3：事例A

パターン4：事例G

パターン5：事例Kは、B・C・D・H・I・Jと1バンドの違いであった。

パターン6：事例L

12食中毒事例のPFGEパターンは6種に分類できた。

考察およびまとめ

県内で発生した食中毒事例より分離した菌株のPFGEパターンは6種に分類できた。また同期間で、県内の医療機関で分離した散发事例のS.E.菌株の提供を受けた菌株についてPFGE分析を実施したところ、事例Lのパターン6を除く5種のパターンであり、パターンにより地域差、発生時期差が観察された。パターン1は昨年度発生したS.E.食中毒2事例と同じであった。またパターン2も昨年度発生したS.E.食中毒2事例と同じであった。パターン2の疫学調査では、鶏卵の流通経路が同じであることがわかった。しかしパターン1の事例は多くあるが、流通経路が判明した事例を比較すると異なっていた。S.E.食中毒は鶏卵が原因食品となることが多いが、PFGEパターンと鶏卵流通の関連性は見いだせなかった。S.E.食中毒事例から分離された菌株について、PFGEを用いた遺伝学的解析の結果、食中毒事例内では同一パターンを示し、同一遺伝子型、すなわち同一クローン由来であることが示唆された。感染源および感染経路の究明における有用性の検討は基礎的データを今後さらに積み重ねる必要がある。

本県で発生したサルモネラ エンテリティデスの PFGE 分析
2000/4~11



制限酵素 : Bln C|CTAGG
Marker: Lambda ladder

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

滋賀県における腸管出血性大腸菌の分子生物学的疫学解析

協力研究者 石川和彦 滋賀県立衛生環境センター 主査
林 賢一 滋賀県立衛生環境センター 参事

研究要旨

1992年から2000年の間に滋賀県内で発生した172名の腸管出血性大腸菌(EHEC)感染者のうち菌株が収集出来たEHEC169株について、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法による分子生物学的疫学解析を行った。接触者を含む家族内で複数の感染者が認められた30家族のうち2家族は、PFGEパターンが異なった。また、短期間に集中して10数名の散発EHEC感染者が確認され散在的集団が疑われた3件のうち2件はPFGEパターンにより散在的集団事例が疑われ疫学調査が行われた。また、他の1件はPFGEパターンにより散在的集団が否定された。一方、同一のPFGEパターンが経年的に確認されている。

A. 研究目的

滋賀県内で発生した腸管出血性大腸菌(EHEC)感染者から分離されたEHECを供試し、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法による分子生物学的疫学解析を行い、得られた情報をEHECの感染経路および感染源の把握に活用し、予防対策に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

1992年から2000年の間に滋賀県内で発生した散発のEHEC感染者172名から分離された菌株のうち、収集が出来たEHEC169株を供試した(表1)。PFGE法については1997年5月に国立感染症研究所で実施された技術研修の方法に準じて行った。

C. 研究結果

3.1 感染経路および感染源調査

PFGE法による分子生物学的疫学解析ならびに喫食調査、行動調査等による疫学調査が行われたが、いずれの事例とも感染経路および感染源は特定されなかった。

3.2 接触者を含む家族内で複数感染者が発生した事例

接触者を含む家族内で複数の感染者が認められた30家族のうち2家族は、PFGEパターンが異なったことにより、感染経路および感染源は異なると推測され喫食調査、行動調査等による疫学調査がなされた(表2)。残りの28家族は同一PFGEパターンを示したため、感染経路および感染源は同じと推測され喫食調査、行動調査等による疫学調査がなされた。

3.3 散在的集団事例が疑われた事例

【事例1】1996年8月下旬から9月中旬にかけて2家族5名を含む14名の散発事例が発生した。14名由来の14株はPFGEパターンにより6グループに分類され、それぞれのグループごとに共通の食材および食品が調査された。

【事例2】2000年7月に2家族4名を含む11名の散発事例が発生した。11名のうち5名由来の5株が同一PFGEパターンを示したため、5名に関して散在的集団事例を疑い共通の食材および食品が調査された。

【事例3】2000年10月中旬から下旬の半月の期間に4家族9名を含む10名の散発事例が発生した。2家族4名は同一PFGEパターンを示したが、他の2家族は異なったPFGEパターンであったため、散在的集団事例の疑いは否定された。

3.4 経年観察

国立感染症研究所による分類のうち、I a, I, Iのタイプが、1996年に5事例、1997年に7事例および1998年に2事例の計14事例が経年的に確認されたが、1999年以降の発生は認められていない。また、II a, II b, Iのタイプは、1996年に3事例、1997年に1事例、1998年に3事例、1999年に2事例および2000年に2事例が確認され、毎年、少数であるが発生している。

D. 考察およびまとめ

家族内で複数の感染者が発生した事例において、PFGEパターンが異なる事例が確認されたことは、複数の菌により汚染

された感染源であったか、或いは異なる感染源であったと推察された。

PFGE パターンにより事例間の関連性が指摘された [事例 1] および [事例 2] は、感染源の特定までには至らなかったが、共通する喫食物および行動調査が行われ感染源の追求がなされると共に発生拡大の予防対策が検討された。また、[事例 3] では散在的集団事例が疑われたが、PFGE パターンにより事例間の関連性が否定されるなど PFGE パターンの情報は、疫学調査に有効に利用された。

一方、同一の PFGE パターンが経年的に確認されたことは集団発生の可能性が潜んでいるものであり、これを監視し関連性を調査することは感染源の究明および集団発生の防止に役立つと考えられた。

散発事例を検討する場合、現在の食品流通事情を考え合わせると、広域にわたる散在的集団事例の可能性が憂慮される。現に、平成 10 年に発生したイクラ事例などは感染源が一つの散

在的集団事例であった。散在的集団事例を推測する場合、事例間の関連性の発見が重要であり、PFGE パターンから得られる情報は事例間の関連性を判定できる大きな要素であると考えられた。

E. 研究発表

1 論文発表

- 1) 石川和彦, 松根渉, 林 賢一: 県内で分離された腸管出血性大腸菌の性状と疫学的検討, 滋賀衛環セ所報, 33, 53~59 (1998)
- 2) 石川和彦, 松根渉, 橋本正, 林 賢一: 滋賀県内で分離された腸管出血性大腸菌感染症に関する細菌学および疫学的検討, 滋賀衛環セ所報, 35, 25~30 (2000)

表 1 腸管出血性大腸菌の血清型および毒素型

年次	O157:H7			O157:H-		O26:H11		O6:H34	O128:H-	O111:H-	計
	VT1	VT1&2	VT2	VT1&2	VT2	VT1	VT1&2	VT2	VT2	VT1	
1992年		1									1
1993年		1									1
1994年											0
1995年		2									2
1996年		17	10			2	1	1			31
1997年		28	8			1			1		38
1998年	1	10	6	1		2					20
1999年		18	12			2					32
2000年		26	15		1	2				2	44
計	1	103	51	1	1	9	1	1	1	2	169

表 2 家族(接触者)内で複数の感染者が確認された事例

年次	同一 PFGE パターン		異なる PFGE パターン	
	家族数	感染者数	家族数	感染者数
1996年	5	12		
1997年	6	16		
1998年	2	4		
1999年	6	13	1	2
2000年	9	21	1	2
計	28	66	2	4

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

パルスフィールド電気泳動法等による腸管出血性大腸菌 O157 の解析に関する研究
——— 平成 12 年の成績 ———

協力研究者 森野吉晴 山下晃司 金澤祐子 上野美知 太田裕元 北口三知世
岩崎恵子 辻澤恵都子 旅田一衛 和歌山市衛生研究所

研究要旨

平成 12 年に和歌山市に関係した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例 17 事例について、分離株の志賀毒素 (*stx*) 型、薬剤感受性及びパルスフィールド電気泳動 (PFGE) パターンを調べ、疫学的解析を行った。

17 事例中 9 事例において、患者が発病した数日前に焼肉店で食事をしていたことが確認されたが、このうちの 3 事例は疫学調査及び PFGE パターン等の解析結果から、同一チェーンの焼肉店 (2 店舗) での Diffuse Outbreak であることが推定された。また、他の 1 事例は神奈川県で発生した事例と同じ PFGE パターンであったことから、総合的な疫学調査が行われた結果、Diffuse Outbreak が強く示唆された。

全国レベルの Diffuse Outbreak をいち早く検知し、感染の拡大を最小限に食い止めるために、パルスネットの構築が必要であると考えられた。

A. 研究目的

我が国の腸管出血性大腸菌 O157 事例は、大規模な集団事例が減少してきたものの、依然として小規模集団事例や散発事例及び家族内感染事例が多数発生している。和歌山市及び周辺地域においても、小規模集団事例や家族内事例並びに散発事例の発生が継続し、発生頻度は増加する傾向にある。

本研究は、当地域で分離された腸管出血性大腸菌 O157 について、志賀毒素 (*stx*) 型、薬剤感受性、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) パターンを疫学マーカーとして解析し、地域特性に関する科学的なデータを得ると共に、疫学調査に資することにより感染源究明と感染の拡大防止を図ることを目的として実施した。

B. 研究方法

1. 供試株

平成 12 年 1 月から 12 月の間に発生し、和歌山市に関係した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例の患者及び無症状感染者から分離された 29 株を各試験に供した。

2. 血清型別

病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研、東京) を使用した。

3. *stx* 型別

RPLA 法 (デンカ生研、東京) 及び PCR 法 (TaKaRa、東京) により、*stx1* 及び *stx2* の産生性試験を実施した。

4. 薬剤感受性試験

センシディスク (BBL、USA) 及びミューラーヒントン II 寒天培地 (BBL、USA) を用いた Kirby-Bauer (KB) 法で行った。薬剤は、フォスフォマイシン (FOM)、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)、トリメトプリム/スルファメトキサゾール (ST)、テトラサイクリン (TC)、トリメトプリム (TMP)、シプロフロキサシン (CPFX)、ゲンタマイシン (GM)、カナマイシン (KM)、ナリジクス酸 (NA)、セフォタキシム (CTX) の 12 剤を供試した。

5. PFGE

各株から得た DNA を制限酵素 *Xba* I (Boehringer Mannheim, Germany) で消化した後、CHEF DR III system (Bio-Rad, USA) を用いて PFGE を行った。PFGE 法は、平成 9 年 5 月に国立感染症研究所で行われた技術研修会の方法

に準じた。泳動後のゲルをエチジウム・ブロマイドで染色後、UV(254nm)照射下で写真撮影を行い、泳動パターンを比較観察した。

C. 研究結果

1. 腸管出血性大腸菌 O157 感染事例発生状況 (表 1)

平成 12 年に和歌山市に関係した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例は、17 事例あった。大規模な集団発生事例はなく、家族内感染事例が 8 事例、散発事例が 9 事例であった。月別の発生状況は、5 月から 8 月にかけて特に多かったが、冬季にも発生が見られた。感染者の年齢幅は 0 歳～63 歳であったが、散発事例 9 事例中 6 事例の患者が 20 歳代前半であり、特に目立った。性別は女性が 16 名、男性が 13 名で顕著な差は認められなかった。また、17 事例中 9 事例においては、患者が発病した数日前に焼肉店で喫食していたことが確認されている。

2. 分離された腸管出血性大腸菌 O157 の血清型及び毒素型 (表 1)

O157:H7 が 29 株中 28 株 (96.6%)、O157:H- が 1 株 (3.4%) であった。毒素型は *stx1&2* 産生株が 18 株 (62.1%)、*stx2* 産生株が 11 株 (37.9%) であった。なお、同一事例で複数の感染者から分離された株は、すべて同一の毒素型を示した。

3. 薬剤感受性試験 (表 1)

29 株中 15 株 (51.7%) がいずれかの薬剤に耐性を示した。耐性パターンは 3 種類あり、ABPC 耐性が最も多く 11 株、ABPC・SM・TC の 3 剤耐性が 3 株、ABPC・SM の 2 剤耐性が 1 株であった。臨床的に使用されている FOM に対して耐性を示す株はなかった。また、同一事例内でのすべての分離株は、薬剤感受性試験の結果が全く同じであった。

4. PFGE パターンによる疫学的解析

散発事例を除いた各事例中の分離菌株間では、PFGE パターンは同一、若しくはバンド 1 本の差であり、概ね一致していた。食材等から菌が検出されていないが、他の疫学マーカーや喫食状況等の調査結果を加味した総合的な疫学解析により、各事例内で共通した感染源の存在が推測された。

また、PFGE パターンの解析から Diffuse Outbreak を推定できたケースが二つあった。一つは、表 1 に示した事例 4、事例 5 及び事例 6 の 3 事例に関してである。これらの事例では、患者及び感染者から *stx2* 産生の O157:H7 が検出された。それぞれの患者が発病する前に、同

チェーンの焼肉店 (2 店舗) で喫食していた。施設のふき取り検査、食材 (患者が喫食したものとは別ロット) の検査及び従業員の検便で O157 は検出されなかった。しかし、両店の食材が同じ食材センターから配送されていたこと、分離された菌株の PFGE パターン (図 1) 及び薬剤感受性等の性状が各事例間で一致したことから、両焼肉店が原因施設であると推察された。

もう一つは、事例 15 に関してである。分離菌株を送付していた国立感染症研究所から 9 月 28 日に連絡が入り、神奈川県内で確認された患者 (9 月 9 日発病) とその患者が発病前 (9 月 3 日) に喫食していた焼肉店で収去された牛肉から、事例 15 の分離株と同じ PFGE パターンを示す O157 (*stx2* 産生) が検出されていたことがわかった。神奈川県及び和歌山市保健所の調査により、事例 15 の患者が喫食していた和歌山市内の焼肉店と神奈川の事例の焼肉店は全く無関係であったが、両店で使用していた牛肉が米国の同じ会社から輸入され、流通経路が途中まで一緒であったことが判明した。

D. 考察及びまとめ

平成 12 年に和歌山市に関係した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例 17 事例のうち、3 事例が当市及び周辺地域で発生した Diffuse Outbreak であり、また、1 事例が遠隔地での Diffuse Outbreak に関与していたことがわかった。O157 感染症事例を解析するにあたり、毒素型や薬剤感受性等の表現型は勿論重要であるが、PFGE による DNA 解析は、喫食調査等の疫学調査結果と併せて総合的に検討することにより、感染源や感染ルートの解明に非常に有用であると考えられた。しかし、一地域内で発生した事例間では各地方衛生研究所において速やかに解析することができるが、広域的な事例間では国立感染症研究所及び関係する地方衛生研究所の協力が不可欠であることから、やや迅速性に欠けていると思われる。したがって、全国レベルの Diffuse Outbreak をいち早く検知し、感染の拡大を最小限に食い止めるために、パルスネットを構築していく必要があると考える。

E. 研究発表

本研究内容の一部については、病原微生物検出情報 Vol.21 No.8 (2000.8) で報告した。