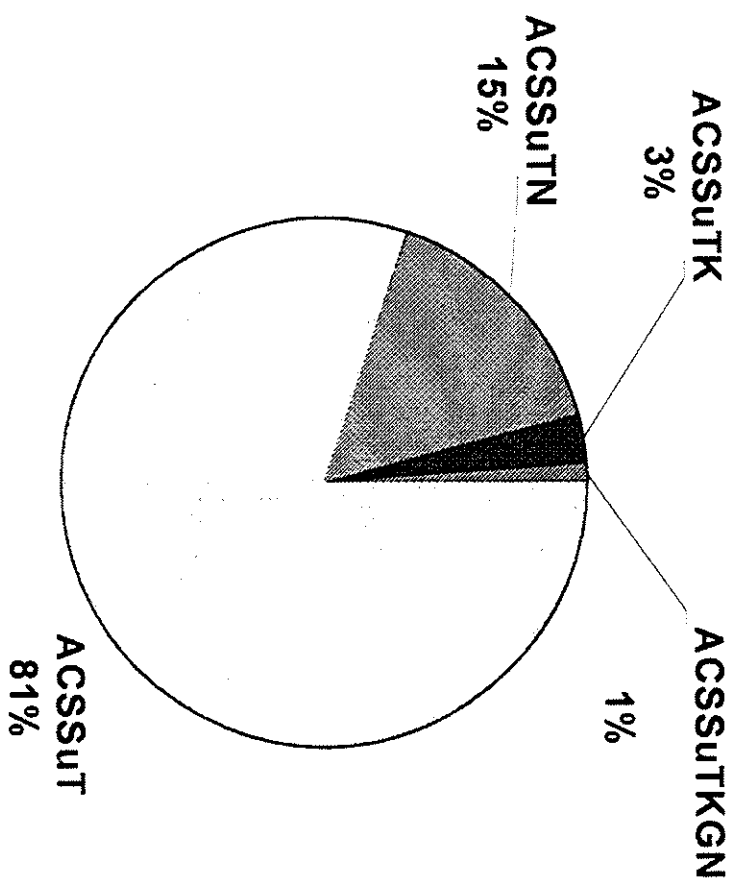
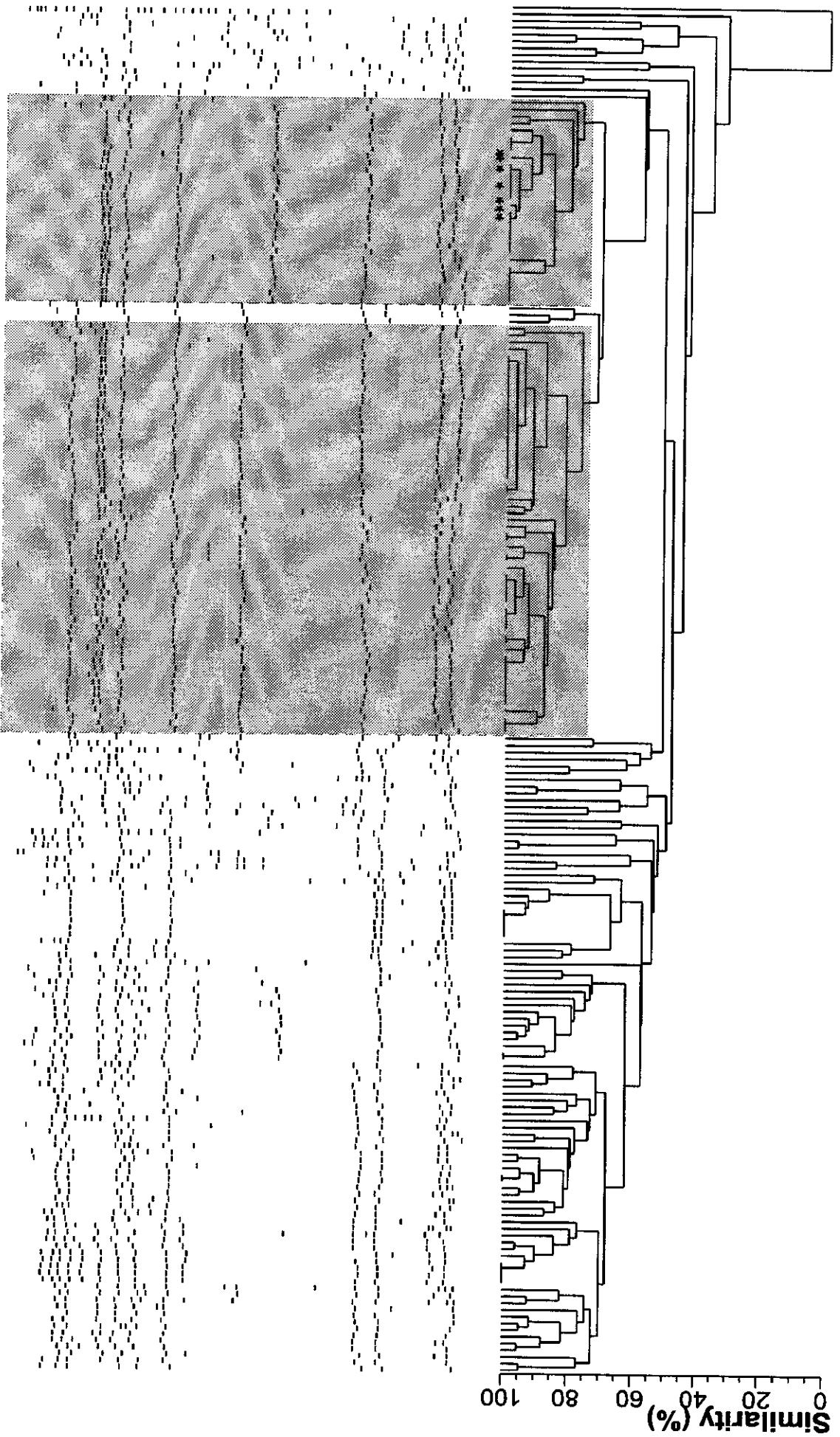


図3. 多剤耐性ST DT104の耐性パターン



A, アンピシリン; C, クロラムフェニコール; S, ストレプトマイシン; Su, サルファ剤;
T, テトラサイクリン; N, ナリジクズ酸; K, カナマイシン; G, ゲンタマイシン

図4. 多剤耐性ST株PFGEプロファイルのクラスター解析



DT104クラスター

*: 米国由来DT104参照株

図5. ヒト以外の由来を持つ多剤耐性ST DT104分離状況

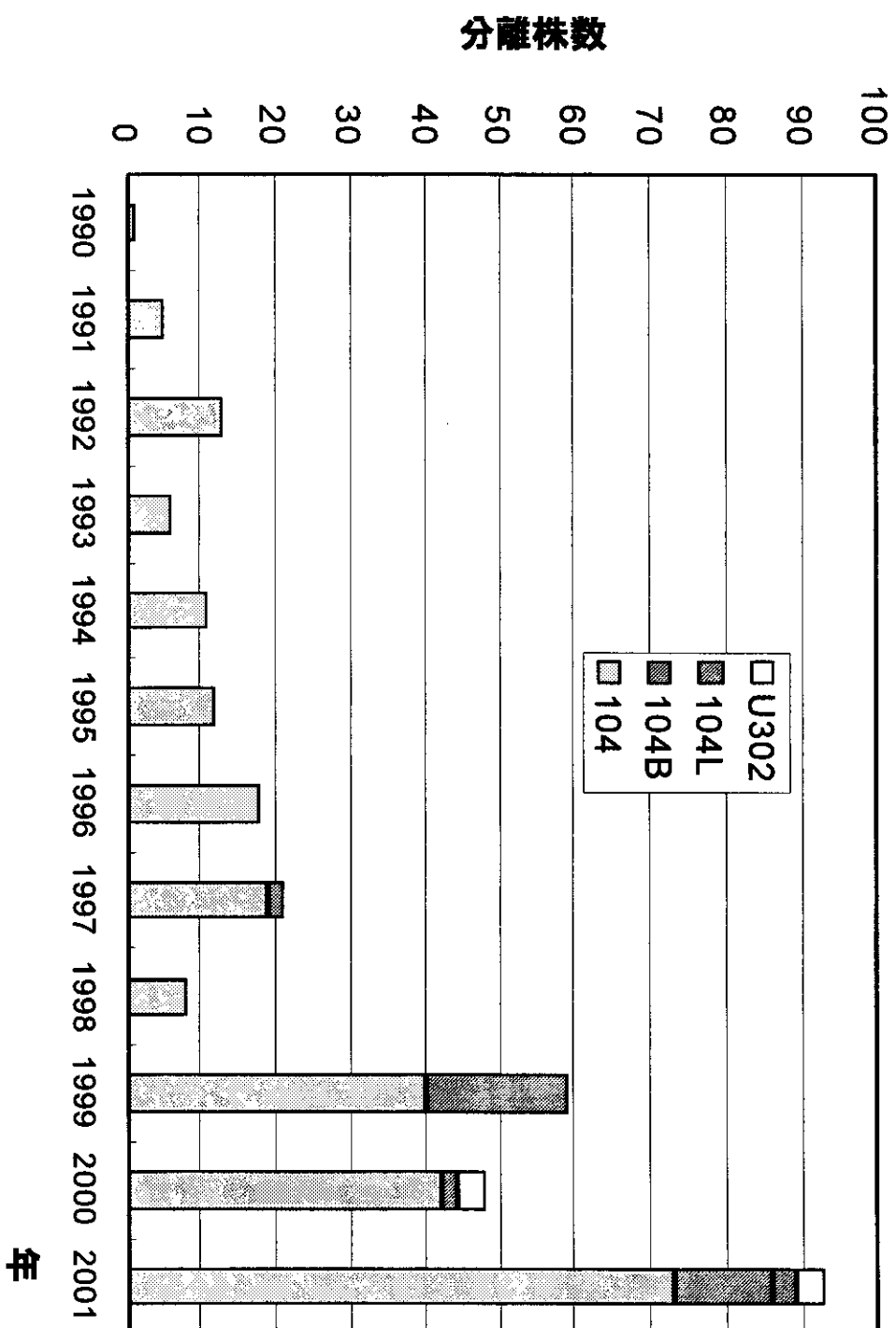
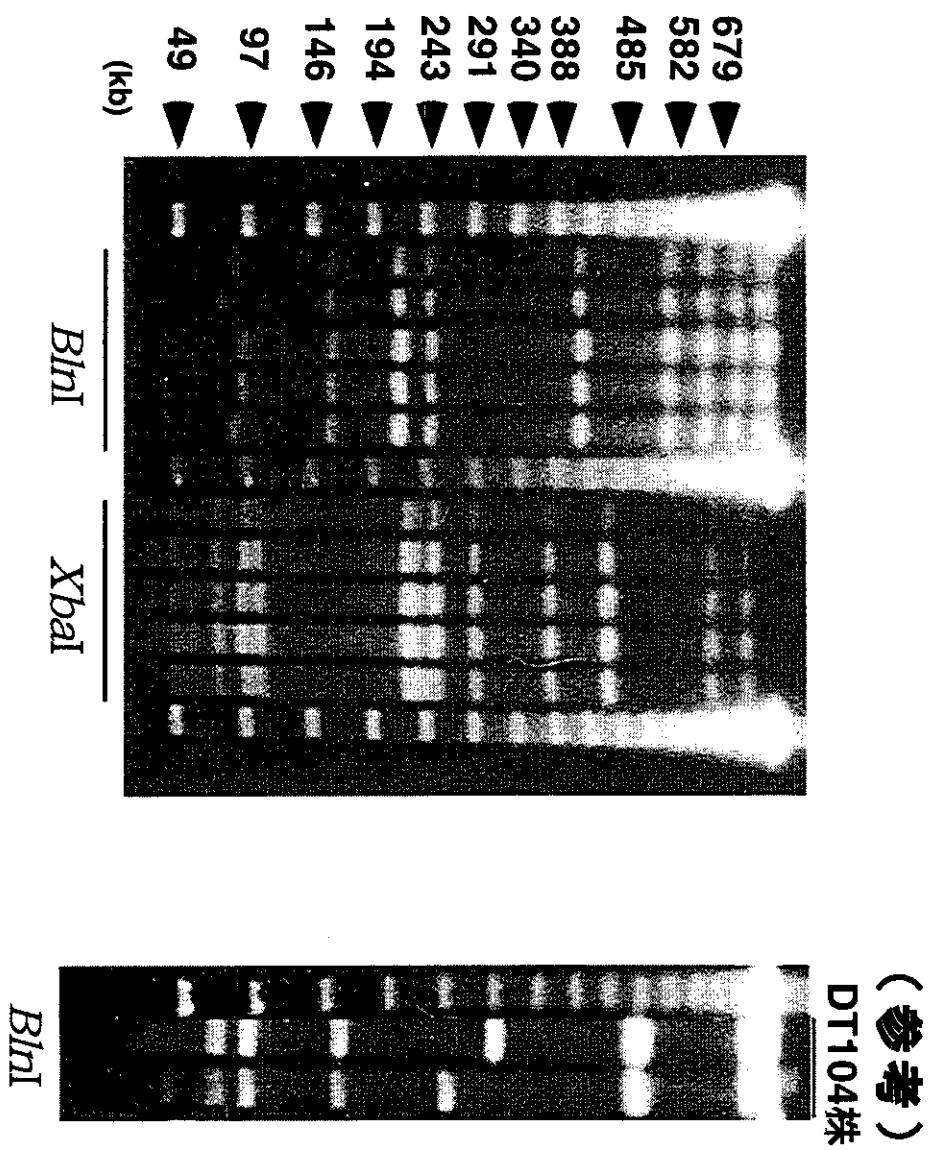


図6. フルオロキノロン耐性ST株のPFGEフラグメント



分担研究報告書

経口細菌感染症の広域的・散発的発生時の実地疫学的・調査手法等の開発に関する研究

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

協力研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 平成14年までに分離された赤痢菌のうち、わが国で最も分離頻度の高い *Shigella sonnei* 566株についてパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による解析を行い、その電気泳動像を用いて画像解析プログラムによる系統樹作成を行った。1998年に分離された国内集団発生事例由来株がそれぞれの集団内で近似度の高いクラスターを形成する一方で、推定感染地が国外と考えられる海外旅行者由来株では赤痢菌の遺伝子型に多様性が存在することを示唆する比較的近似度の低い種々のクラスターが形成された。したがって、赤痢菌 *S. sonnei* ではPFGEによる遺伝子型に多様性が存在すると考えられた。さらに、平成13年末から発生した、赤痢菌に汚染された輸入牡蠣による事例が多発した際には、輸入牡蠣とそれを喫食した患者から分離された赤痢菌が同一遺伝子型であることを示した。この事例では明確な関連性が不明な症例でも分離株が輸入牡蠣由来株と同一遺伝子型を示している場合が数多くあり、大規模な diffuse outbreak である可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

赤痢菌の遺伝子型についてPFGEによる画像診断を行う際の基準となるデータベースの構築を目的として、分離年度や由来が異なると考えられる *S. sonnei* 566株についてPFGE解析を行った。実際には、PFGE解析結果の画像を画像解析プログラムに入力してデータベース化することを目的とした。

B. 研究方法

PFGEの泳動条件等については、腸管出血性大腸菌のPFGE解析条件に準じたが一部の条

件変更を行った。すなわち、泳動条件について、linear ramp 5-50 sec, 21.5 hr, 6 V/cm と変更し、bufferの温度については12℃に設定した。この条件により約1000 kbまでの分子サイズの範囲で比較的明瞭なパターン識別能が得られた。泳動像の均一性を維持するために、実験に使用する試薬類、実験条件については厳格なプロトコールを設定して用いた。まず、プレート上のコロニーから1 µlのエーゼを使って菌体をかき取り、200 µlの滅菌蒸留水に懸濁する(OD=0.2程度)。200 µlの1%低融点アガロースを加えて混ぜ、plug moldへ流し込み(2 well/sample)、氷上で20分程度固める。

0.5M EDTA pH8.0に1 mg/mlになるように

lysozyme を溶解させ、1 ml/sample ずつチューブに分注し、固まった plug mold を移し、37°C で 3 hr - ON incubate する。lysozyme 溶液を抜き取り、1 ml の 1 mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA pH8.0 溶液を入れ、50°C、ON incubate with gentle shaking する。アガロースブロックを取りだし、カバーガラスを使って半分に切り 1 ml の 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) in TE または、500 µl の 4 mM Pefabloc SC (AEBSF) in TE) に移し、50°C、30 分以上の洗浄を 2 回行う。さらに、TE に buffer を変えて、氷上にて 30 分以上平衡化する。TE buffer を抜き取り、酵素処理のための buffer (200 µl/sample) に変え氷上で 30 min 以上、1 回 incubate する。最終的には、酵素を含む buffer 100 µl (30 units/sample) に変え 37°C、最低 4 時間震盪しながら incubate する。

Bio-Rad の PFGE certified agarose を用い、泳動用のアガロースゲルを作成する (1% in 0.5 x TBE, Bio-Rad の 140mm x 125mm だと 100 ml, Pharmacia の 150mm x 150mm だと 130 ml)。この時、ゲルの作成台が水平であることに注意する。酵素処理の終わったサンプルは buffer を 0.5 x TBE に替えて、ゲルに埋め込むまで氷上に置いておく。Pasteur pipette やスパーテルを用いて、アガロースブロックを泳動用ゲルに埋め込む。

泳動槽を水平にセットする。2 liter の 0.5 x TBE を用意して予め 4°C に保存しておく。泳動用ゲルを泳動槽にセットする。泳動条件は前述した。

データベース作成には、画像解析プログラ

ムとして GelComparII (Applied Maths 社、ベルギー) を用いた。デンドログラムは、Dice coefficient を使用し 1% tolerance のもとで unweighted pair group method を用いて作成した。

C. 結果と考察

1998 年に発生した国内旅行事例では、6 県からの 4 グループにわたって発生した赤痢患者からの分離株 (*S. sonnei*) が同一 PFGE パターンを示した。旅行時期はほぼ 5 月の中旬に集中していたが、期間や旅行ルートは異なっており、疫学的な関連性については不明であった。また、この時期には、長崎市の大学において赤痢菌に汚染された上水用の井戸水を原因として集団発生事例があった。この事例においても PFGE パターンはほとんどが同一のものを示したが、バンドが 1-2 本異なる variant も存在した。また、推定感染地が国外だと考えられる海外帰国者から分離された *S. sonnei* については、1998、1999、2001、2002 年に成田空港と関西空港の検疫所において分離された株を用いて PFGE による解析を行った (図 1)。XbaI による PFGE の解析結果から、国外でもさまざまなパターンが存在することが推察された。

2001 年末から 2002 年の 4 月初旬に国内の散発事例および集団事例から分離された *S. sonnei* の PFGE パターンは、タイプ A から L の 11 タイプに分類された (図 2, 3)。これらの株のうち、冷凍保存されていた輸入牡蠣及び牡蠣の喫食が疫学的に明らかになっ

た 28 事例から分離された株は、同一の PFGE パターンを示した (図 4)。患者と牡蠣由来株が同一パターンを示していることは、3 種類の制限酵素、*Xba*I, *Bln*I, *Spe*I を使用しても両者のパターンが同じであることから確認された (図 4)。また、2001 年 11 月下旬から 12 月中旬にかけて分離株数が激増した後、分離株数自体は減少したが、同一 PFGE パターンを示す *S. sonnei* の分離は 4 月初旬まで続いた (図 5)。ヒト由来 293 株と輸入カキから分離された 10 株は同一のパターン (タイプ A) を示し、ヒト由来 32 株はタイプ B から L の異なるタイプを示した。タイプ A を示す分離株のなかには、1-2 本のバンドの違いを示すパターンも見られたが、Tenover 等の PFGE 解釈の基準に該当するものであり集団発生の一部である可能性が極めて高いと考えられた (図 6)。

以上の PFGE 解析結果から GelComparII によってデンドログラムを作成すると、1998 年の集団事例等はそれぞれのクラスターを形成し、2001 年末から 2002 年にかけての牡蠣関連株については Type A として示されるクラスターを形成した (図 7)。このクラスターに属するタイプ A の菌株はデンドログラム上で 90% 以上の近似度を示した。国内散发事例由来株や海外帰国者から分離された株ではほとんどがタイプ A とは異なるクラスターに属し、その近似度は約 70% 以下であった。総数 566 株の *S. sonnei* のうち、タイプ A と同一のクラスターに属している分離株には 2001 年以前の国内分離株は含まれなかった。疫学的に牡蠣の喫食との関連が明らかになった症例由来株では同一の PFGE パターン

を示しているものの、このクラスターのなかには感染の原因が不明である事例由来株も多数含まれていた。しかしながら、多様性の存在する *S. sonnei* の遺伝子型のうちで同一遺伝子型の分離株であることは、感染源が同一であることを強く示唆する結果であると考えられた。

D. 結論

赤痢菌 *S. sonnei* の PFGE による解析結果からその遺伝子型には多様性が存在することを示し得るデータベースを構築することができた。2001 年末に発生した広域散发事例の発生では、このデータベースに基づき同一クラスターに属する株が牡蠣を原因とする diffuse outbreak の関連株であることを強く示唆する結果が得られた。

参考文献

1. Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Tamura K, and Watanabe H. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. *Jpn. J. Infect.* 55; 19-22. 2002
2. 渡辺治雄、寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、田村和満。分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制；パルスネットの構築。感染症学雑誌、76, 842-848, 2002
3. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、田村和満、渡辺治雄。パルスネット-疫学調査と DNA 解析。日本臨床、60, 1070-1076, 2002
4. 渡辺治雄、寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎。細菌ゲノム配列の多様性を利用した分子疫学的解析-パルスネットの構

築。現代医療、34, 29-35, 2002

HACCP 2001 12. 64 - 68 寺嶋 淳、泉谷秀

5. Pulse Net Japan の構築について 月刊

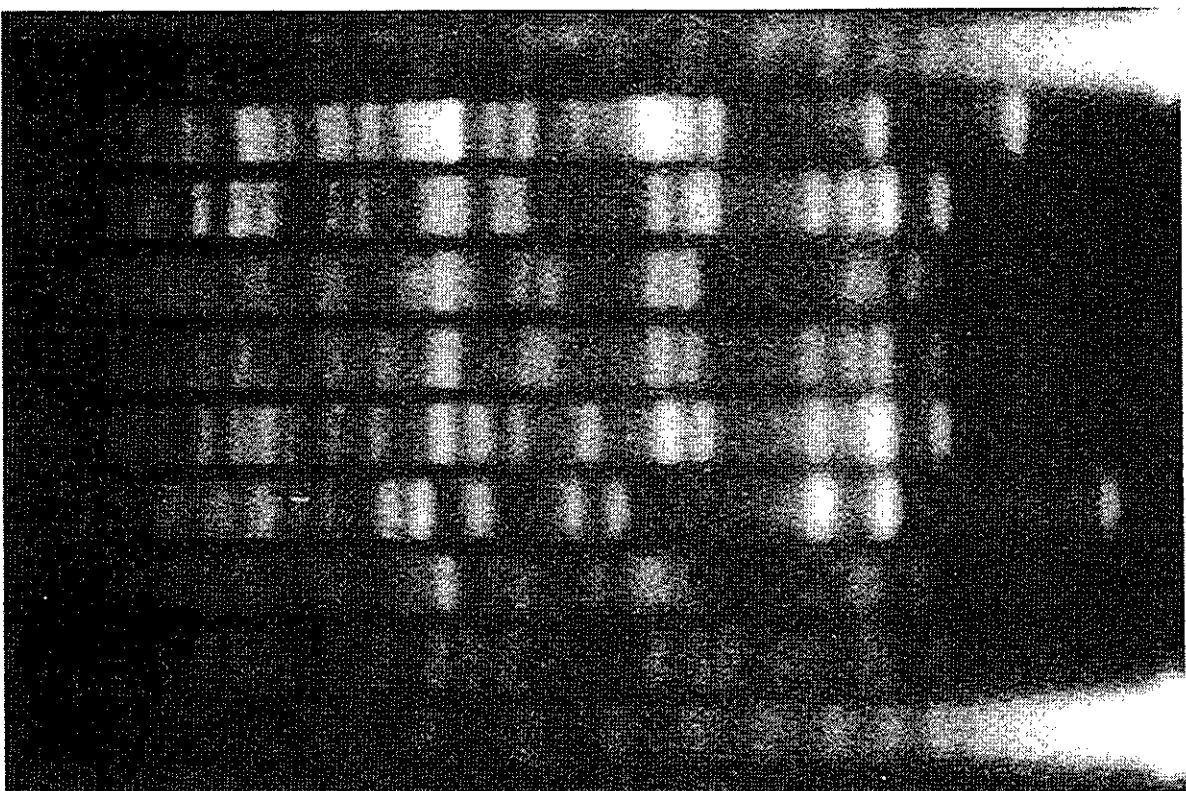
昌、渡辺治雄

PFGE profile of *S. sonnei*

Mr 1 2 3 4 5 6 7 8 Mr

- 1: Japan (98N)
 - 2: Japan (98H)
 - 3: India
 - 4: Serbia
 - 5: Mexico
 - 6: India
 - 7: China
 - 8: Indonesia
- (*Xba* I digestion)

582 —
 485 —
 388 —
 291 —
 194 —
 145.5 —
 97 —
 48.5 —
 (kb)



PFGE profile of *S. sonnei* isolated in Nov. '01 - Mar. '02, Japan

Mr A B C D E F Mr G I J A Mr

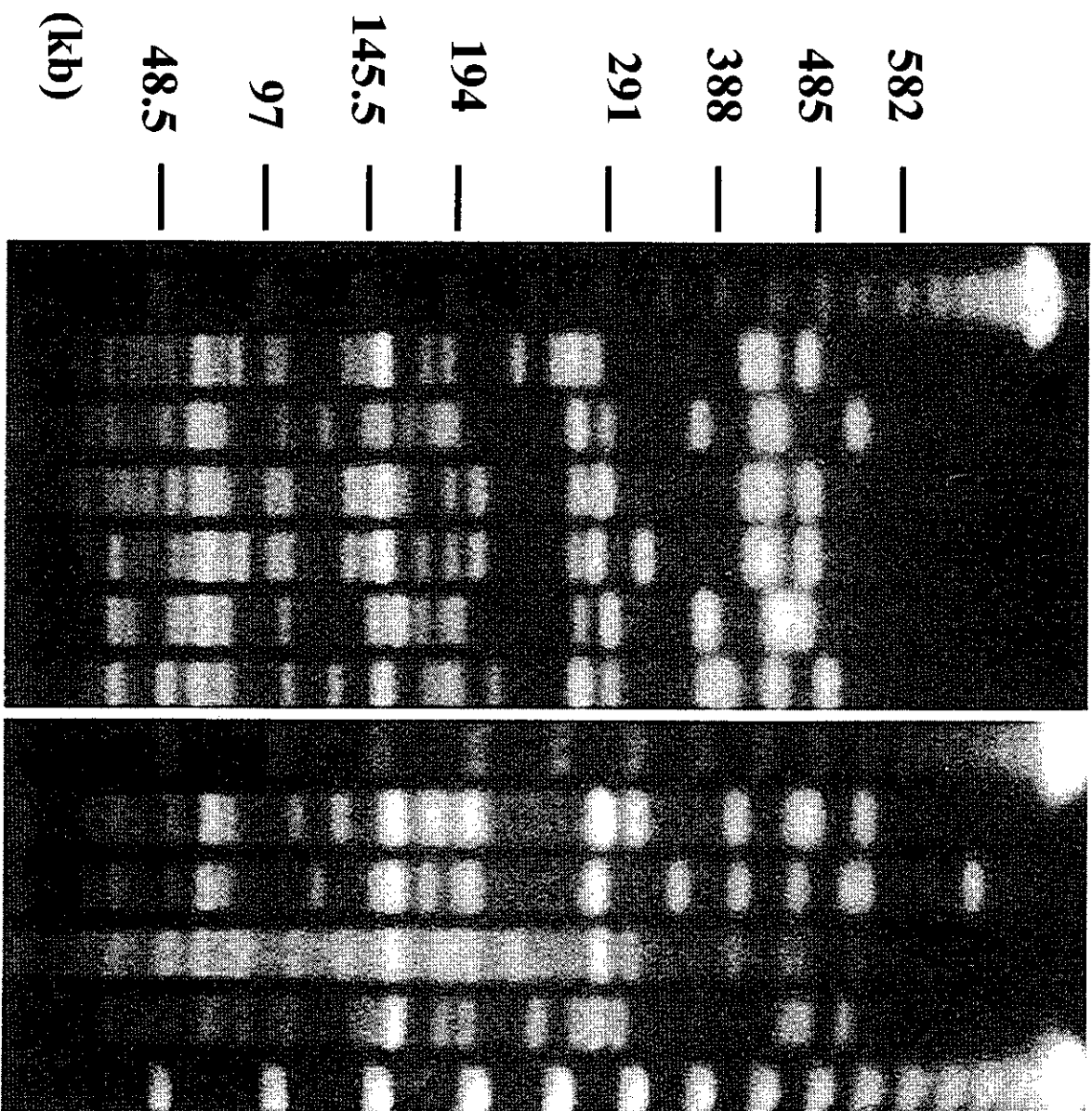
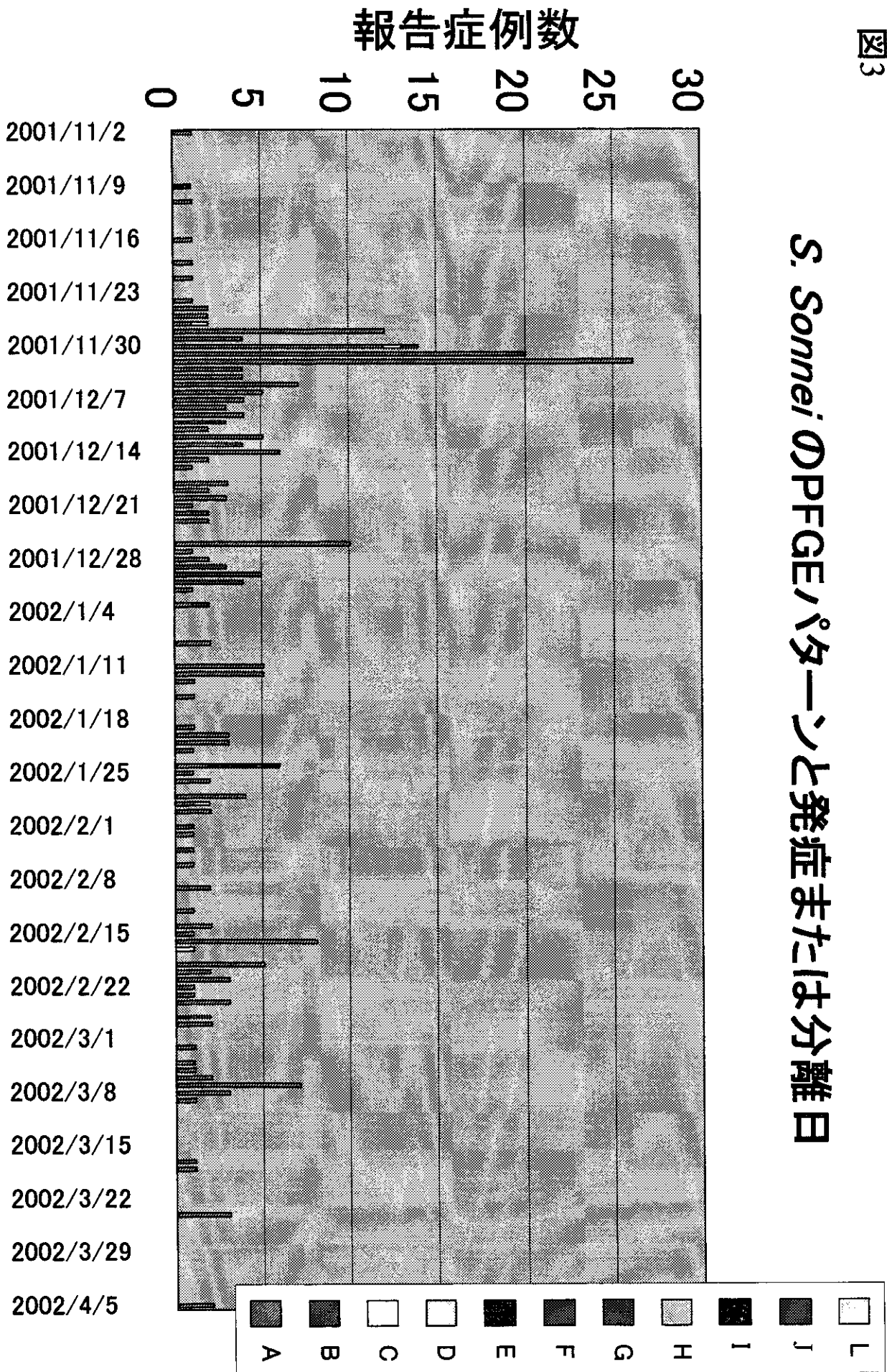


図3

S. Sonnei の PFGE パターンと発症または分離日



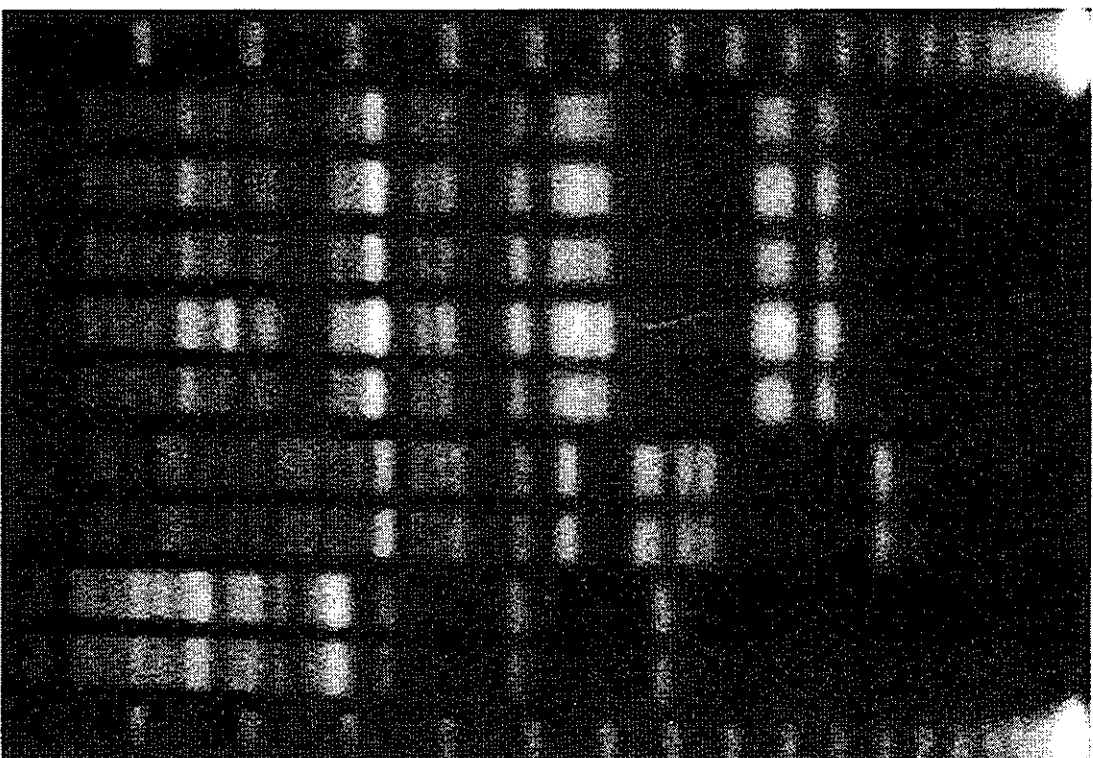
PFGE profile of *S. sonnei* isolated in Nov.-Dec., 2001,

Japan

A B C D : patients
E : Oyster

582—
 485—
 388—
 291—
 194—
 145.5—
 97—
 48.5—
 (kb)

Mr A B C D E C E C E Mr



XbaI **BlnI** **SpeI**

図5

S.Sonnei の PFGE パターンと発症または分離日

報告症例数

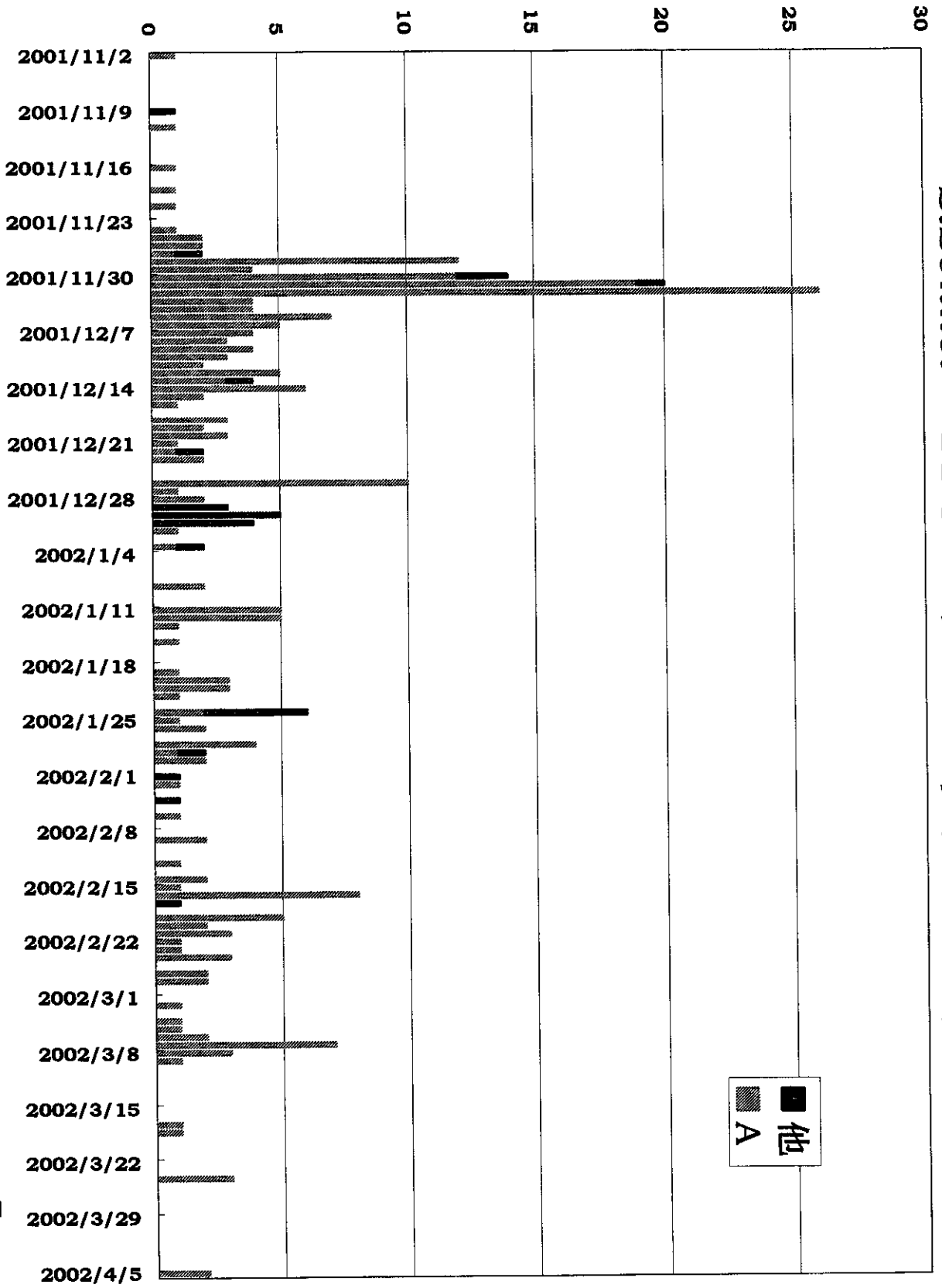
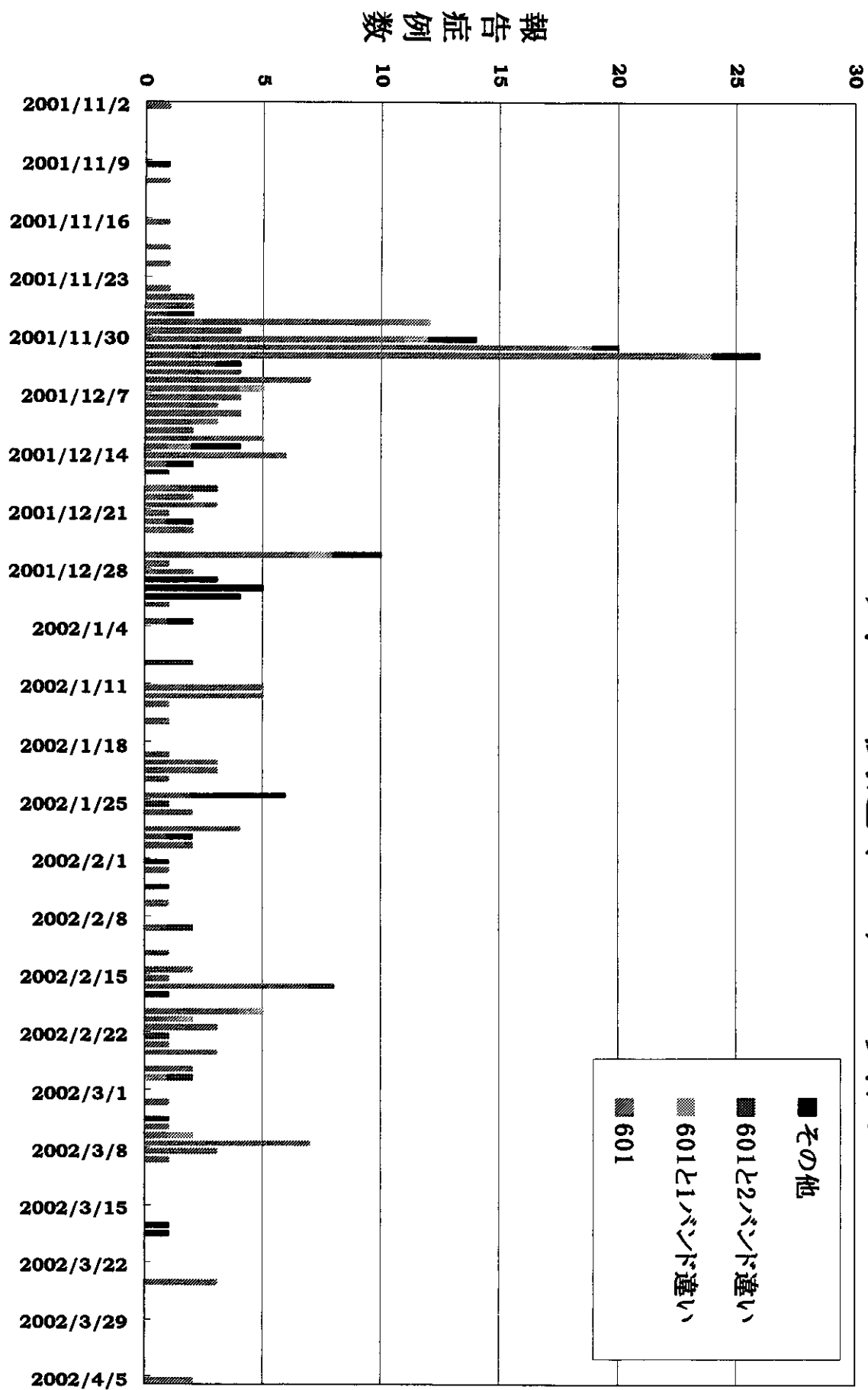
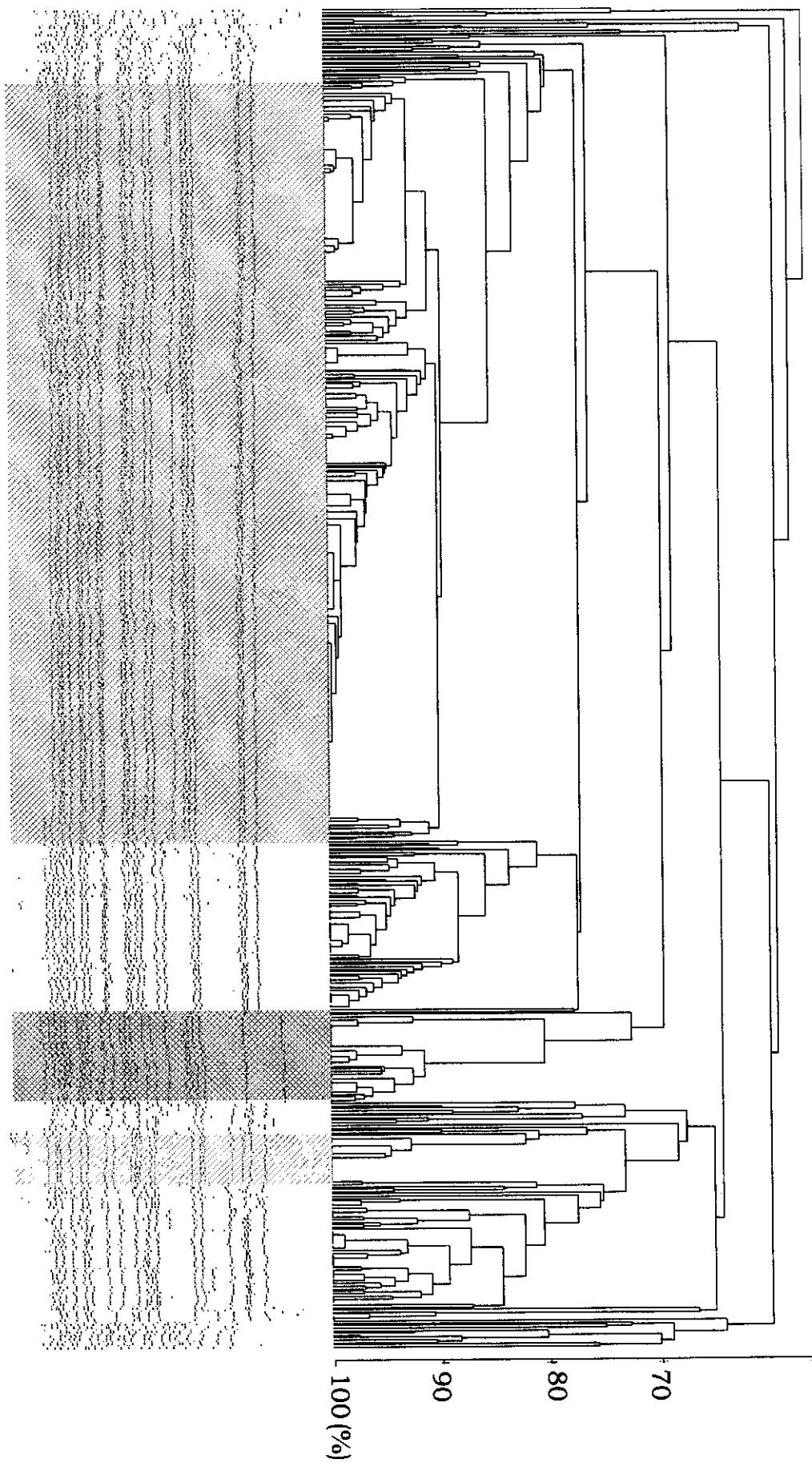


図6

分離された*S. sonnei*のPFGEパターン(*Xba*I)
パターンAのみ、カキ関連(601)との異同



S.sonnei 1998, 1999, 2001-2002 (566entries)



Type A

'98N '98H

食中毒事件あたり患者数の年次推移に関する一考察

研究協力者 谷原 真一 島根医科大学 助教授

研究要旨

【目的】近年認められる食中毒事件あたり患者数の低下は特定の自治体に限定的に生じているのかを検討する。

【方法】1981年以降の「食中毒統計」から都道府県別の食中毒事件あたり患者数を求め、各年毎の順位の変動を検討した。その後、1) 上位第1位～第10位、2) 上位第11位～第37位、3) 上位第38位～第47位、の3群に分類し、群別に各年の食中毒事件1件あたり患者を再集計して年次推移を検討した。

【結果】食中毒事件あたり患者数は1981年から1992年までは増加傾向を示したが1992年以降は減少傾向に転じた。食中毒事件あたり患者数の順位が大きく変動する都道府県と変動の小さい都道府県が認められた。食中毒事件あたり患者数が上位第11位～第37位に属する都道府県に限定しても、1992年以降の食中毒事件あたり患者数は減少傾向を示した。

【結論】食中毒事件あたり患者数の低下は特定の自治体に限定して生じたものではないと考えられた。

A. 研究目的

近年、一部自治体において患者数1人の食中毒事件の散発事例が多数報告されるようになったことから、これまでの統計の継続性を重視するとともに散発事例の解析を進めるため、1998年以降の食中毒統計から患者数2人以上の事例と患者数1人の事例をそれぞれ分類して集計が実施されるようになった。しかし、食中毒事件数及び患者数の報告状況の変化は一部の自治体に限られているのかについては、十分検証されているとは言いがたい。今回、一部の自治体の変動による影響を除いた上で、食中毒事件数、患者数及び食中毒事件あたり患者数の推移を検討した。

B. 研究方法

食中毒統計が伝染病統計と分離して刊行されるようになった1981年以降の食中毒統計を用いた。まず、国全体の食中毒事件あたり患者数及びその5年移動平均を求め、年次推移を検討した。次に各年ごとに事件あたり患者数が多い側から都道府県順位を求め、1) 上位第1位～第10位（以後、上位群）、2) 上位第11位～第37位（以後、中位群）、3) 上位第38位～第47位（以後、下位群）の3群に分類し、各群ごとの食中毒事件あたり患者数を再

集計して年次推移を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は既存の統計資料を新たな観点から再検討したものであり、個人情報を全く利用していないので、倫理的な問題が生じることはない。

C. 研究結果

図1に国全体の食中毒事件あたり患者数の年次推移を示す。単年の事件あたり患者数には変動は認められるものの、1981年から1992年までは増加傾向であった。1992年以降は減少傾向に転じ、なかでも1997年には前年の38.1人/件から20.4人/件と大きく減少した後は20人/件を上回ることはなく推移した。

表1に食中毒調査票の一部改正が行われた1997年以後の食中毒事件あたり患者数が上位5位または下位5位に該当する都道府県を各年ごとに示す。各年とも最も事件あたり患者数が多い都道府県では100～130人/件であった。最も事件あたり患者数が少ない都道府県では1.6～2.2人/件であった。都道府県間の格差はいずれの年も40倍以上であり、1997年は80倍以上であった。

年ごとの順位変動が大きい都道府県と小さい都道府県があり、2000年第1位の大阪府は前年第33位であり、1999年に第5位であった青森県は翌2000年には第43位となっていた。愛媛県は1997年から

2000年のすべての年で上位5位以内であった。また、事件あたり患者数が少ない群では山梨県及び広島県がすべての年で第46位もしくは第47位であり、事件あたり患者数の多少にかかわらず順位変動が小さい都道府県が存在していた。

図2に1) 上位第1位～第10位(以後、上位群)、2) 上位第11位～第37位(以後、中位群)、3) 上位第38位～第47位(以後、下位群)の各群ごとに再集計した食中毒事件あたり患者数の年次推移を示す。下位群では、1981年から1994年までは1985年の18.1人/件が最大であり、1987年の9.4人/件以外はいずれも10～15人/件で推移していた。しかし、1994年以降減少傾向に転じ、1996年の10.8人/件から1997年の5.0人/件と半減した後は約3人/件前後で推移した。中位群では1981年から1991年にかけて24.2人/件から45.8人/件に増加した後減少傾向に転じ、2000年では21.4人/件と減少していた。上位群では1988年の169.7人/件を除いて50～150人/件の範囲で推移していた。しかし、1996年から1999年にかけては99.1人/件から50.0人/件までほぼ半減した。1996年以降は全群で減少傾向が認められた。

D. 考察

本研究では、1) 食中毒事件あたり患者数は1981年から1992年までは増加傾向であったが、1992年以降は減少傾向に転じたこと、2) 食中毒事件あたり患者数が全国値と異なる傾向を示す都道府県が存在すること、3) 食中毒事件あたり患者数が中位に属する都道府県でも、1992年以降食中毒事件あたり患者数は減少傾向を示していたこと、が明らかになった。

食中毒に限らず、届け出義務が規定されている疾病がどの程度実情を反映しているかという問題は公衆衛生対策上重要である。しかし、わが国においてこの問題について検討した報告は非常に限られている。食中毒患者の届け出を実施しない理由として最も多く該当するものは「弧発例であったから」とされるが、近年は散発事例の報告数が増加し、1999年の総事件2,697件中、患者数1人の事件は1,416件(52.5%)と過半数を超えている。1996年以降に観察された事件あたり患者数の低下は、患者数の少ない事例の届け出状況が変化したために生じた可能性が考えられる。

事件あたり患者数の都道府県順位が大きく変動する都道府県と変動の小さい都道府県が認められた。順位変動の大きい都道府県は多数の患者が発生する大規模事件の影響を受けていると考えられる。しかし、事件あたり患者数の多少にかかわらず、順位変動が小さい都道府県も存在していた。事件あたり患者数が少ない群に属する山梨県と広島県の1999年の食中毒事件数はそれぞれ173件、1,149件であり、この2県で全国の事件数のほぼ半数であった。また、患者数1人の事件数はそれぞれ1

40件、1,087件であり、患者数1人の事件数全体の87%を占めていた。これは診断された食中毒事件が実際に報告される割合が都道府県で異なっている可能性を示唆するものである。

食中毒調査票の一部改正が行われた1997年以降、食中毒事件数が増加したが事件あたり患者数は低下傾向を示した。また、原因食品の判明率は1996年の73.5%から、1997年には41.0%に低下し、その後も40%前後となったことから、食中毒事件数及び患者数の報告状況に変化が生じたと考えられる。しかし、この状況が全国的なのか一部の自治体に限定されたものなのか十分に検討されていなかった。今回、大規模事件の発生や患者数1人のいわゆる散発例の届け出状況に影響を受けていると考えられる都道府県を除外した集計を実施しても、食中毒事件あたり患者数の減少傾向が認められた。この結果から、食中毒事件あたり患者数の減少は特定の自治体に限定して生じたものではないと考えられた。

事件あたり患者数の減少が実際の事件発生数に対する届け出数の増加によってもたらされたとすれば、法の規定に沿った望ましい方向への変化である。この研究は食中毒統計として報告された事件のみに基づいて分析を行っている。そのため、散発的発生事件が現実増加しているのか、何らかの理由によって届け出される基準が変化したために変化が生じたのか、を直接解明することは困難である。届け出されている食中毒事件数及び患者数が実態をどの程度反映しているのかについては、保健所などの報告を受ける機関による積極的な再調査(アクティブ・サーベイランス)による検討が食中毒対策にとっても重要である。

E. 結論

患者数1人の食中毒事件についての取り扱いについては、従来の統計との比較可能性も重要であるが、大型化、広域化する食中毒事件の実態を把握し必要な対策を実行する上では、届け出を通じた情報の集積が必須である。大量生産された食料品による広域化した食中毒事件では、患者発生は複数の都道府県、複数の国にまたがって発生する場合もある。そのため、届け出対象となる患者はさまざまな医療機関を受診しており、特定の医療機関に患者が集中するとは限らない。異常発生を探知するためには散発事例情報の共有と速やかな還元を進める必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表 谷原真一、山部清子、大津忠弘、津田敏秀、中村好一、藤田委由：食中毒事件あたり患者数の年次推移に関する一考察. 厚生 の 指標, (掲載予定),2003.

2. 学会発表 谷原真一、大津忠弘、津田敏秀、中村好一、藤田委由：食中毒事件あたり患者数の年次推移に関する一考察. 日本公衆衛生学会総会, 大宮 2002年10月22日 日本公衆衛生学会誌49巻10号pp908,2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1 食中毒事件あたり患者数の推移(全国値)

事件あたり患者数
(人/件)

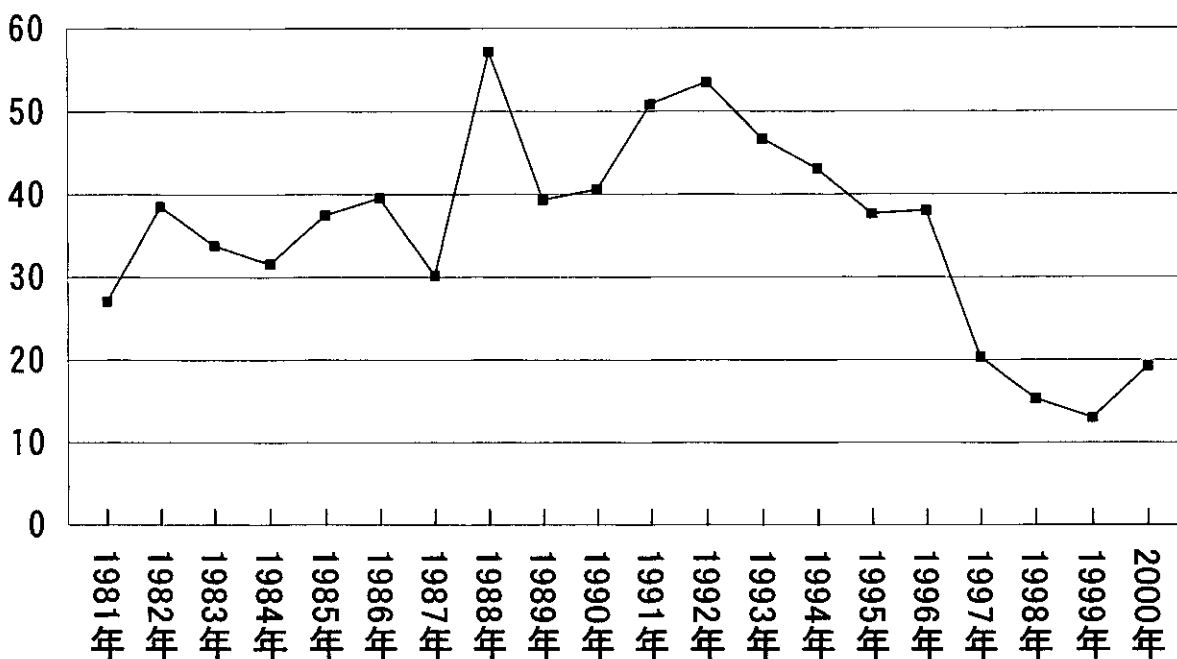


図2:群別に再集計した食中毒事件あたり患者数の推移

中位群及び下位群
事件あたり患者数(人/件)

上位群
事件あたり患者数(人/件)

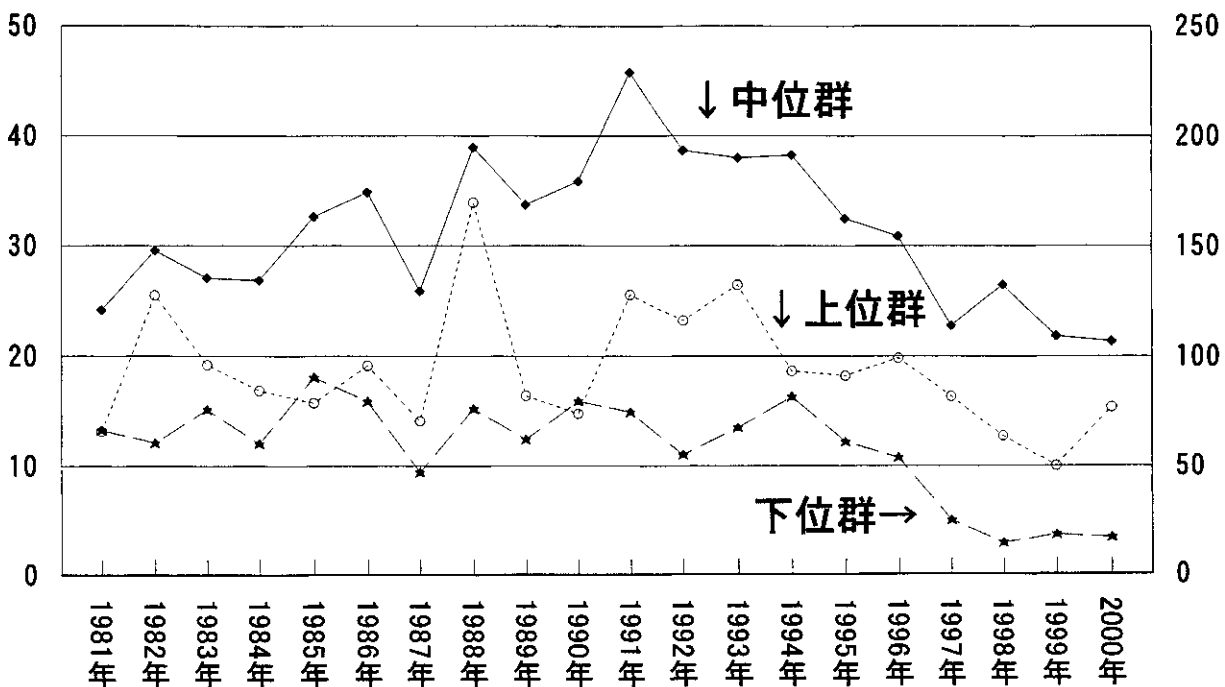


表1:平成9～12年の食中毒事件あたり患者数が上位5位及び下位5位の都道府県

	順位	2000年	1999年	1998年	1997年
		事件あたり 患者数(人)	事件あたり 患者数(人)	事件あたり 患者数(人)	事件あたり 患者数(人)
上位5県	第1位	大阪府	愛媛県	岐阜県	奈良県
	第2位	奈良県	佐賀県	滋賀県	兵庫県
	第3位	大分県	大分県	愛媛県	群馬県
	第4位	静岡県	山形県	福島県	栃木県
	第5位	愛媛県	青森県	群馬県	愛媛県
下位5県	第43位	青森県	宮城県	長野県	鳥取県
	第44位	北海道	沖縄県	鳥取県	富山県
	第45位	北宮山	高梨山	富山県	富山県
	第46位	梨山	高梨山	富山県	富山県
	第47位	山梨県	高梨山	富山県	富山県
(参考)	全国値	19.3	13.1	15.3	20.4