

表1 パルスフィールドゲル電気泳動法プロトコール (14年度統一法)

1. 菌の培養

\* : 同一ロットの試薬を使用

使用培地	培地量	培養温度, 時間, 条件
トリプトソーヤブイオン (BBL) *	3mL	37℃, 16~18時間, 静置培養

2. 菌液調整

使用菌液量	菌洗浄	菌液作成液, 最終液量
500μL	滅菌水* (1回)	滅菌水, 500μL

3. アガロースブロック作成

アガロース名	濃度	溶解液 (最終濃度)
Certified Low Melt agrose (BIO-RAD)*	1.2%	滅菌水 (0.6%)

4. Lysozyme処理

Lysozymeメーカー名	濃度	溶解液	温度, 時間, 反応条件
生化学工業*	1mg/mL	0.5M EDTA (Wako)*	37℃, 3~6時間, 振盪 (1回)

5. Protенase K 処理

Protенase K メーカー名	濃度	溶解液	温度, 時間, 反応条件
Roche*	1mg/mL	0.5M EDTA, 1%N-lauroylsarcosine加	50℃, 一夜, 振盪 (1回)

6. Protенase K失活

失活試薬名	濃度	温度, 時間, 反応条件	TE*での洗浄
Pefabloc SC (Roche)*	4mM in TE	50℃, 30分, 振盪 (2回)	氷上, 30分, 振盪 (1回)

7. 制限酵素Bufferによる馴化

温度, 時間, 反応条件	Buffer	BSA 添加
氷上, 30分, 振盪 (1回)	H buffer (Roche)*	SIGMA (100 μg/ml)*

8. XbaI による制限酵素処理

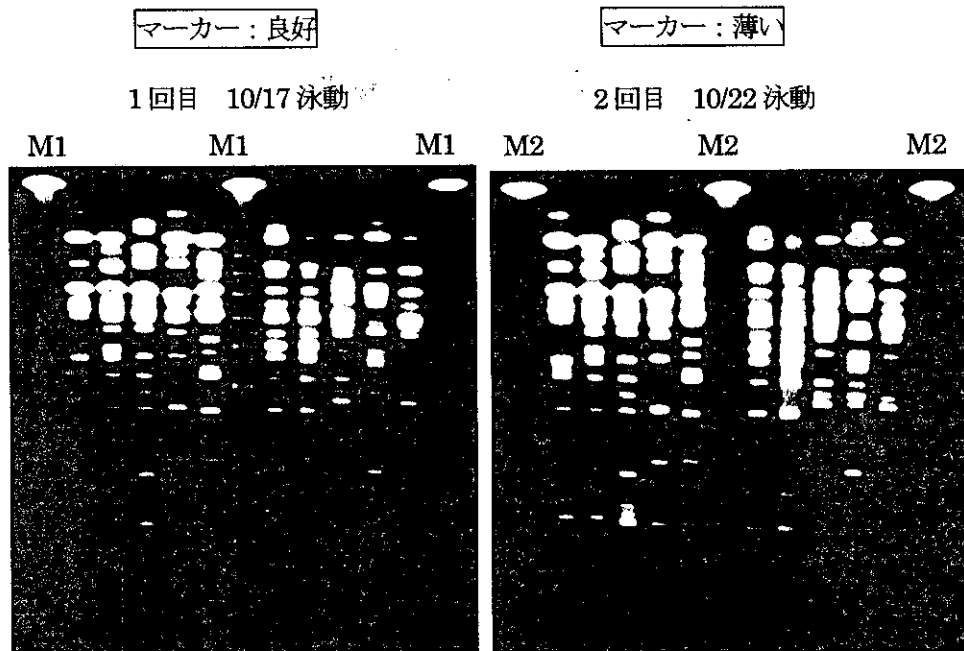
XbaIメーカー	濃度/plug	時間, 反応条件
Roche*	30u	一夜, 振盪

9. 電気泳動用アガロースとマーカー(λラダー)

アガロース名	濃度	泳動Buffer	マーカーのメーカー名
PFCアガロース (BIO-RAD)*	1%	0.5xTBE	NEW ENGLAND BioLabs*

10. 電気泳動

バッファー温度	電圧	スイッチタイム
10~12℃	6V/cm	4~8秒 (リニア) 9時間, 8~50秒 (リニア) 13時間



M1：マーカー（A社 control 92997）10月1日に1/12サイズにカットし、17日まで 0.5xTBE 中で保存したものを加熱処理した。  
M2：マーカー（A社 control 92997）10月22日に1/12サイズにカットし、すぐに加熱処理した。

マーカーの加熱方法 50° C 1.5分加温（当課の通常の方法）

- ・2mLのマイクロチューブに0.5xTBEを200μL分注。
- ・1/12に切ったブロックを3個入れる。氷上で保管。
- ・50° Cの水浴で1.5分加温。加温後は氷に浸け急冷する。

電気泳動条件      機種 BIO-RAD DRIII

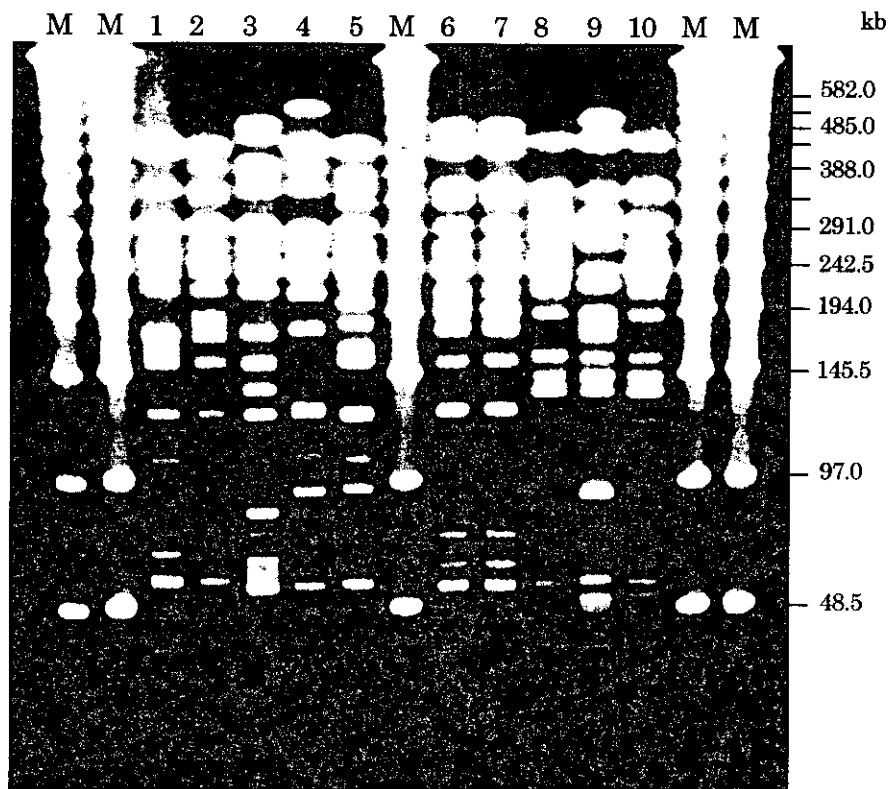
バッファー：0.5 X TBE、12° C      電圧：6V/cm

スイッチタイム：(1)4-8秒(リニア)、9時間

(2)8-50秒(リニア)、13時間

泳動時間：22時間

図1 A社のマーカーを使用したPFGE画像



レーン	検体
M	Lambda Ladder PFG Marker (NEW ENGLAND BioLabs)
1	検体 No.1 STEC O157:H7
2	検体 No.1 STEC O157:H7
3	検体 No.3 STEC O157:H7
4	検体 No.4 STEC O157:H7
5	検体 No.5 STEC O157:H7
6	検体 No.6 STEC O157:H7
7	検体 No.7 検体 No.6 の制限酵素処理済みゲルブロック
8	検体 No.8 STEC O26:H11
9	検体 No.9 STEC O26:H11
10	検体 No.10 STEC O26:H11

図2 配布検体の PFGE 画像 (施設 I の画像)

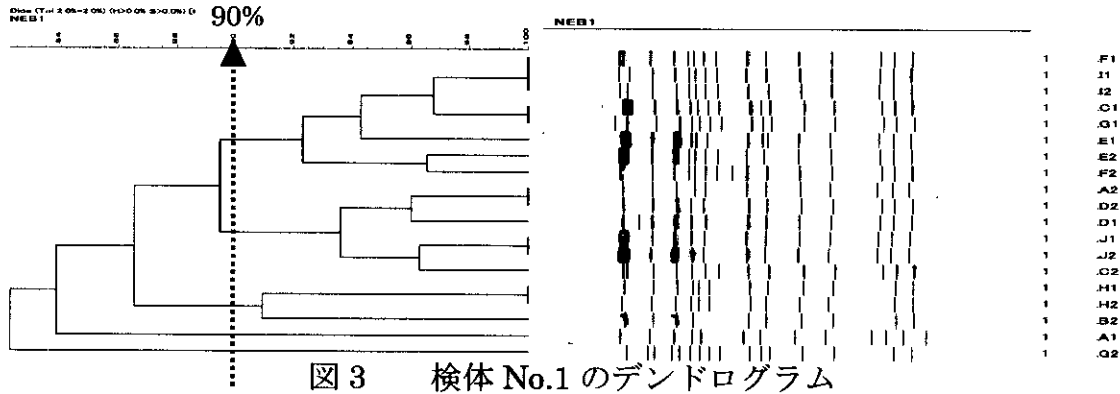


図3 検体 No.1 のデンドログラム

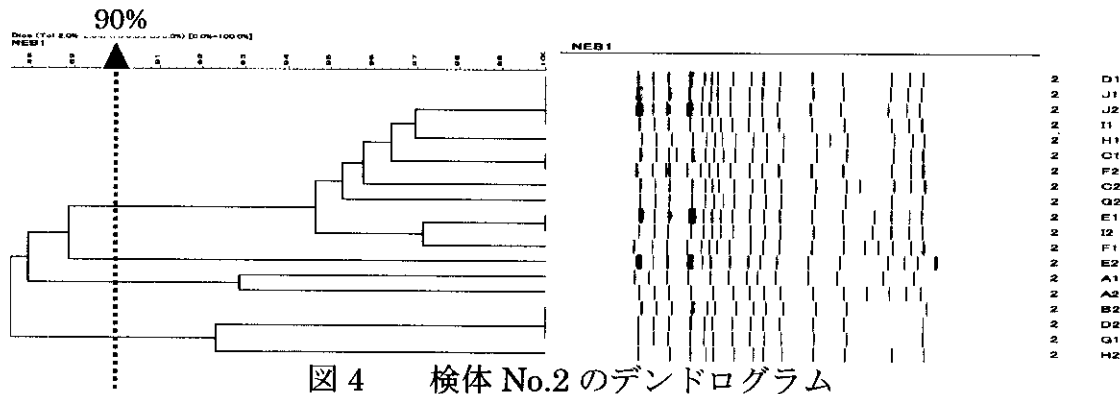


図4 検体 No.2 のデンドログラム

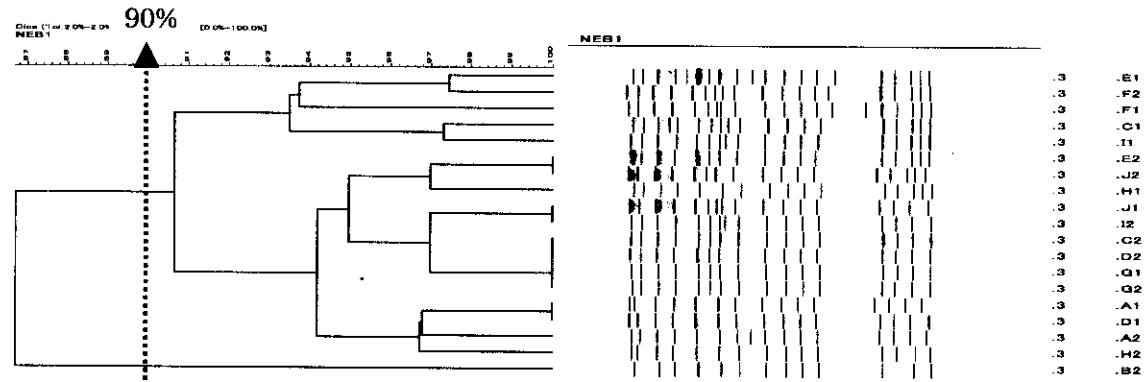


図5 検体 No.3 のデンドログラム

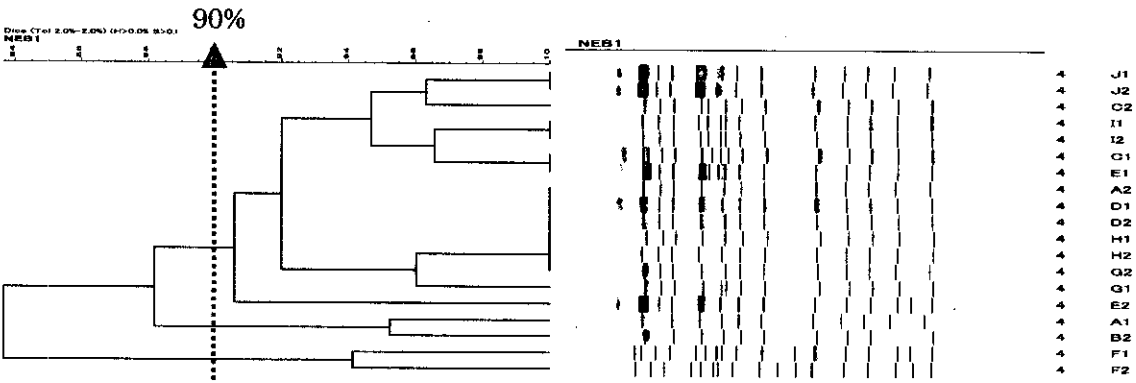


図6 検体 No.4 のデンドログラム

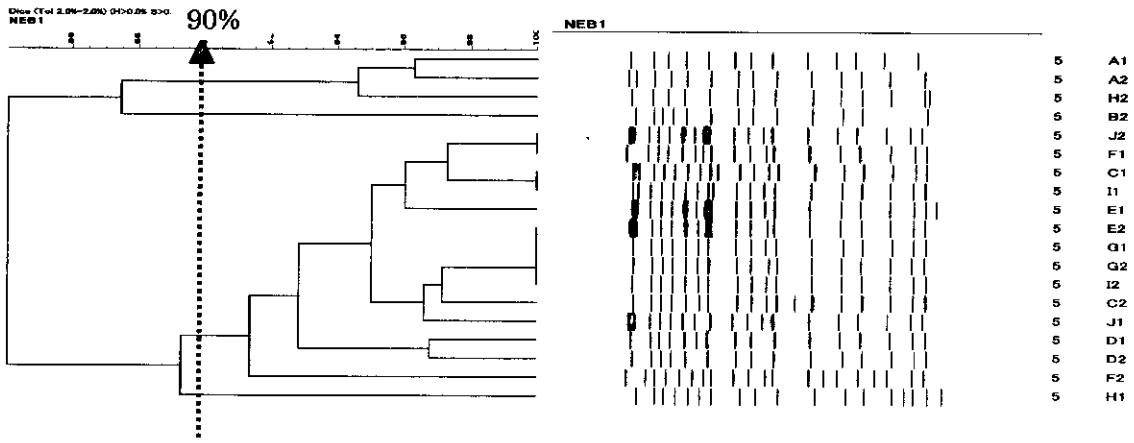


図7 検体 No.5 のデンドログラム

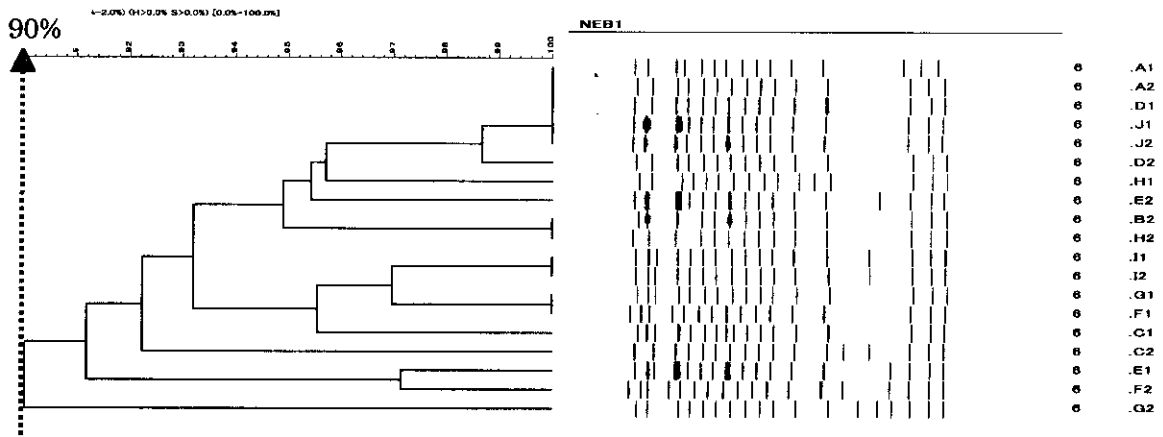


図8 検体 No.6 のデンドログラム

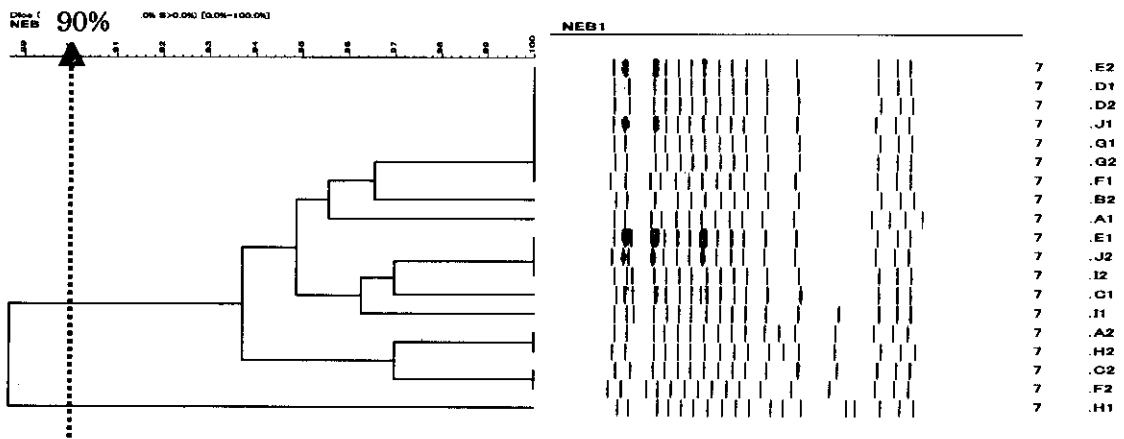


図9 検体 No.7 のデンドログラム

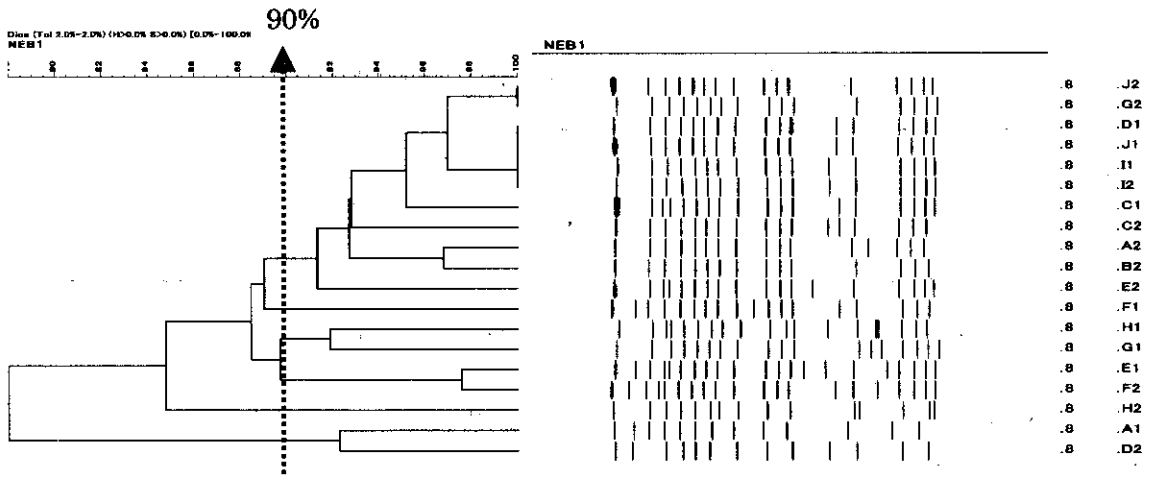


図 10 検体 No.8 のデンドログラム

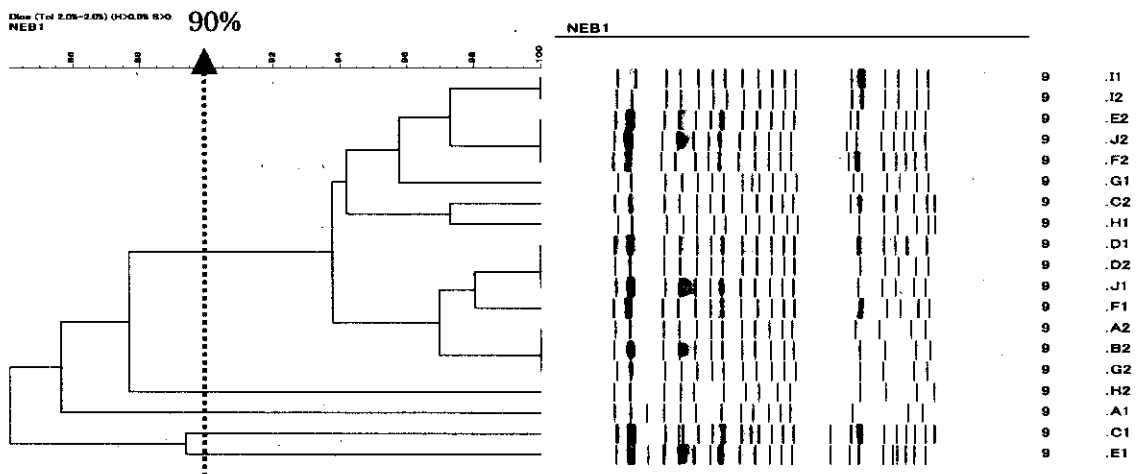


図 11 検体 No.9 のデンドログラム

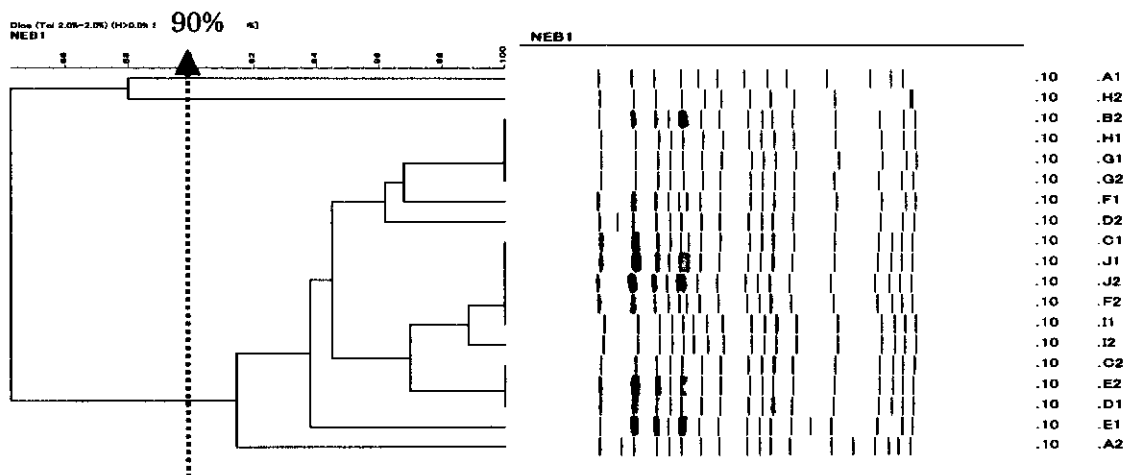


図 12 検体 No.10 のデンドログラム

表2 検体別近似度 (10施設の19画像)

検体 No.	菌種	近似度			合計
		79%以下	80-89%	90%以上	
1	STEC O157:H7		11(57.9%)	8(42.1%)	19(100%)
2	STEC O157:H7		6(31.6%)	13(68.4%)	19(100%)
3	STEC O157:H7		1(5.3%)	18(94.7%)	19(100%)
4	STEC O157:H7		4(21.1%)	15(78.9%)	19(100%)
5	STEC O157:H7		5(26.3%)	14(73.7%)	19(100%)
6	STEC O157:H7			19(100%)	19(100%)
7	検体 No.6 の <i>Xba</i> I 切 断済みゲルブロック		1(5.3%)	18(94.7%)	19(100%)
8	STEC O26:H11	2(10.5%)	6(31.6%)	11(57.9%)	19(100%)
9	STEC O26:H11		4(21.1%)	15(78.9%)	19(100%)
10	STEC O26:H11		2(10.5%)	17(89.5%)	19(100%)

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 14 年度分担研究報告書

パルスフィールド電気泳動法（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）を用いた腸管出血性大腸菌における diffuse outbreak の監視に関する研究

協力研究者 石川和彦 滋賀県立衛生環境センター 主任主査  
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 2002 年までに滋賀県内で確認された 230 名の腸管出血性大腸菌(STEC)感染者のうち菌株の収集が出来た感染者由来 227 株および食品由来の 6 株について、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法を主体とした細菌学的疫学解析による diffuse outbreak の監視ならびに感染流行株の把握を行った。

解析の結果、少数の事例由来菌株間において類似性が高く diffuse outbreak が推測された事例が多かったが、6 事例は 5～9 名由来の STEC が高い類似性を示したため、diffuse outbreak が強く疑われた。そのうちの 1 事例がビーフ角切りステーキを原因食とした diffuse outbreak と断定された。また、短期間に 10 名の STEC 感染症が発生し diffuse outbreak が疑われたが、PFGE 法等により否定された事例が 1 事例あった。

接触者を含む家族内で複数の感染者が認められた 39 家族のうち 2 家族は、PFGE パターンおよび産生毒素型が異なった。また、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**

腸管出血性大腸菌(以下、STEC)の感染予防には迅速な感染源の把握および適切な対処が必要であり重要となる。

感染源の把握には疫学調査情報の他、細菌学的情報が利用され、近年、細菌学的情報に血清型別、毒素産生型、薬剤耐性パターンその他、パルスフィールド電気泳動(以下、PFGE)法による分子生物学的疫学解析が加えられ利用されてきている。

今回、PFGE 法を中心とした細菌学的疫学解析により STEC 間の関連性を明らかにし、diffuse outbreak の早期探知を目的とした監視ならびに感染流行株の把握を行った。

**B. 研究方法**

1992 年から 2002 年までに県内で発生のお

た STEC 感染者由来株を対象として、血清型、産生毒素型、薬剤耐性パターンおよび PFGE パターンから菌株間の関連性を調査した。

血清型別は病原大腸菌免疫血清(デンカ生研製)を使用し、産生毒素型は大腸菌ベロトキシン検出用キット(デンカ生研製)を用いた。薬剤感受性は、アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、テトラサイクリン(TC)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、セフトキシム(CTX)、トリメトプリム(TMP)、ナリジクス酸(NA)、ST 合剤(ST)、シプロフロキサシン(CPFX)およびホスホマイシン(FOM)の 12 薬剤について、米国臨床検査標準委員会(NCCLS)の抗菌ディスク感受性試験実施基準に基づきセンチ・ディスク(Becton Dickinson 製)を用いて行った。PFGE 法は国立感染症研究所が示したプロトコールに準じて行い、解



析には遺伝子解析ソフト Molecular Analyst(Bio Rad 製, USA)を使用した。なお、系統樹の作成には相類似度計数に Jaccardを用い、計算式に Unweighted Pair-Group Method を用いた。

解析結果は STEC 感染者が集中して発生した場合などに細菌学的疫学情報として、関係機関に報告し注意を促すと共に情報の共有化を図った。また、diffuse outbreak が疑われた場合は疫学調査情報および細菌学的疫学情報を基にして、担当者による感染源究明に向けた検討会議の開催を促した。

## C. 研究結果

### C.1 細菌学的疫学解析結果の報告数

1992年から2002年までに発生した STEC 感染者 230名のうち 227株が収集された(図1)。また、食品由来株の6株を加えた計 233株について細菌学疫学解析を行った。PFGE 解析についてはスメアになった3株を除いた 230株について解析をした(図2)。

解析結果は毎年3~4回の頻度で関係機関に報告し、1996年から2002年までの5年間に19回の報告を行った(表1)。また、当該保健所管内の発生事例についてのみの解析を9件行った。

### C.2 diffuse outbreak が疑われた事例

[事例1]1996年8月下旬から9月中旬の3週間程度の中に2家族5名を含む14名の散发事例が発生した。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た。その中の1グループは1家族3名を含む6名からなり、5才以下が4名、32才女性1名および59才男性1名であった。また、居住地が同じ市町村か近接した市町村で、発生地域が集中している傾向が見られた。これらのことから diffuse outbreak を疑い6名について調査結果の再検討をするとともに8月以前の事例についてもPFGEパターンの比較を行った。8月以前に同一PFGEパターンを示す事例は見られず、時期

ならびに地区が限局した diffuse outbreak が疑われた。疫学調査は喫食調査の他、飲料水、食料品購入店などの調査を再度、検討されたが、新たな関連事項や共通した食品は認められず、原因食品は不明となった。また、その後、11月までに2事例の STEC O157 (以下、O157) が発生したが PFGE パターンおよび毒素産生型とも異なる事例であった。

[事例2] 1999年10月中旬から下旬の半月の期間に6家族9名を含む13名の散发事例が発生した。このうち5家族9名は同一PFGEパターンを示し、他の4名は異なるPFGEパターンであった。同一PFGEパターンを示した9名について diffuse outbreak を疑い調査が行われた。今回のPFGEパターンは県内では初めて確認されたものであった。感染者は3保健所管内に居住しており広範囲であり、年齢は10才未満が3名、40才代が2名、70才以上が4名であった。疫学調査を基に関係者による検討会が行われ、喫食調査の他、飲料水、食料品購入店などの調査を再度、検討されたが、新たな関連事項や共通した食品は認められず、原因食品は不明となったが、今後の発生動向の監視、疫学調査の徹底および迅速な情報交換を申し合せた。

[事例3] 2000年7月に2家族4名を含む10名の散发事例が発生した。1ヵ月間に10名の STEC 感染者の発生が確認されたことから、その関連性が注目され diffuse outbreak が疑われた。解析の結果、10名のうち5名の散发事例から分離された菌株が同一PFGEパターンを示したため、疫学調査を基に検討されたが、新たな関連事項や共通した食品は認められず、原因食品は不明となった。また、7月以前、以降とも5名と同じPFGEパターンを示す菌株は見られなかった。

[事例4] 2001年7~9月にかけて発生した20事例のうち2家族5名を含む10名の散发事例のPFGEパターンが同一であったことにより diffuse outbreak が疑われた。本事例の

PFGE パターンは国立感染症研究所により和風キムチを原因食とした食中毒事例由来株と同一であることが確認されたため、キムチを含む喫食調査の他、飲料水、食料品購入店などの調査が行われたが、キムチを喫食していた事例はなく、その他に共通した食品や新たな関連事項も認められず、原因食品は不明となった。

### C.3 diffuse outbreak が断定された事例

[事例 5] 2001 年 3 月に家族 4 名の STEC 感染者が発生し、喫食調査からファミリーレストランでビーフ角切りステーキを喫食していたことが判明した。これを受けて、喫食したビーフ角切りステーキと同一規格原料肉（以下、ステーキ半製品）の 2 検体を検査したところ、1 検体から O157 が検出された。感染者 4 名由来の O157 株とステーキ半製品由来の O157 株について、PFGE パターンを比較したところ全て同一であったため、食中毒事件として取り扱い、新たにステーキ半製品の 13 検体を調べたところ 5 検体から O157 が検出された。また、同時期に発生しファミリーレストランのチェーン店を利用していた STEC 感染者 1 名も同一 PFGE パターンを示した。

一方、富山県 2 名および奈良県 1 名の STEC 感染者もファミリーレストランのチェーン店を利用していたことが判明し、これらの感染者 3 名から分離された O157 とステーキ半製品由来の O157 は同じ PFGE パターンであることが国立感染症研究所で確認された。

感染源となったステーキ半製品は、輸入牛肉で埼玉県の食肉処理工場において、テンダライズ処理およびタンブリング処理が行われて出荷されており、食肉処理工場に保管されていたステーキ半製品からも同一 PFGE パターンを示す STEC O157 が埼玉県において検出された。

### C.4 diffuse outbreak が否定された事例

[事例 6] 1999 年 7 月に 2 家族 4 名を含む 10 名の散発事例が発生した。1 ヶ月間に 10 名の STEC 感染者が発生したことから diffuse outbreak が疑われた。PFGE 法による解析の

結果、10 名のうち 2 家族はそれぞれ同一 PFGE パターンを示したが、他に、同一 PFGE パターンとなる事例がなく、各事例は感染源が異なる散発事例と考えられ、diffuse outbreak は否定された。

### C.5 接触者に感染者が発生した事例

家族を含む接触者に STEC 感染者が認められた事例は 39 グループ 94 名あった。このうち 2 家族は、各 2 名の STEC 感染者が同時期に確認されたが、それぞれから分離された菌株の産生毒素型および PFGE パターンは異なった（表 2）。残りの 37 家族由来株は PFGE パターン等による解析結果が同一であった。感染源が究明できたのは[事例 5]の 1 家族の感染者だけで、残りの 36 家族の感染者については感染源を究明することができなかった。

### C.6 経年監視された事例

国立感染症研究所による PFGE パターン分類のうち、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。

## D. 考察およびまとめ

経口感染症と近年における食材、食品の流通機構を考え合わせると、同一感染源であっても広範囲な地域または、時間的な差がある集団発生事件、いわゆる diffuse outbreak が発生する可能性があり、既に赤痢菌、STEC ならびにサルモネラなどを原因菌とした diffuse outbreak が報告されている。

diffuse outbreak を探知するには PFGE 法を主とした細菌学的疫学解析による菌株間の関連性を調べるのが有効であり、1996 年から県内の STEC 感染者由来株について細菌学的疫学解析を実施して監視してきた。監視の結果、少数の事例由来菌株間において類似性が高く同一起源と考えられ、diffuse outbreak を推測した事例が多かった。少数の事例の場合、喫食調査および行動調査から感染源を疑える関連

事項を見つけだすことが困難であり、感染源の究明に向けた積極的疫学調査に結びつけることも難しいと考えられた。

複数の事例間で同一起源を疑う高い類似性が認められた〔事例 1〕、〔事例 2〕、〔事例 3〕および〔事例 4〕の場合は、感染者が発生した期間に感染源となる食材、食品などが流通していたと推察し、喫食調査および行動調査が行われ共通した関連性が追求された。特に〔事例 1〕および〔事例 2〕については感染源の究明および拡大防止を目的として検討会も開かれた。感染源の特定までには至らなかったが、今後の対応策が協議され関係者の意識向上が図れた。STEC 感染者の関連性が PFGE パターンなどから指摘できても、STEC の感染から発症までの潜伏期間は 2~9 日と比較的長いため、喫食調査などの疫学調査に困難をきたし、感染源が不明になる大きな理由と推察された。

感染源の原因食品が発見された〔事例 5〕は滋賀県、富山県および奈良県の 3 県にまたがる O157 感染者 6 名が発生した **diffuse outbreak** となった。疫学調査から O157 の感染源が推察され、PFGE 法により感染者と感染源の関連が確定された事例で、PFGE 法による解析の効果が発揮され確認できた事例でもあった。感染源となったステーキ半製品は、テンダライズ処理およびタンプリング処理が行われていたため、食肉の内部まで O157 が汚染していた可能性があり、調理において食肉の中心部まで十分な加熱ができず O157 が死滅しなかったと考えられた。また、PFGE パターンによる監視は同時期および事件以降に発生した O157 と〔事例 5〕由来 O157 との関連性を否定するのにも有効であった。

〔事例 6〕は短期間に通常では見られない STEC 感染者が多数発生した場合であり、従来であれば **diffuse outbreak** を疑い疫学調査を基にした感染源の究明が行われるところであるが、PFGE パターンにより **diffuse outbreak** が否定された。これも細菌学的疫学解析による監

視の大きな成果の一つと考えられた。

家族を含む接触者に STEC 感染者が認められた事例は 39 グループ 94 名家族内で、感染源が究明できたのは〔事例 5〕の 1 家族だけであり、残りの 38 家族は感染源を究明することができなかった。家族を含む接触者から STEC 感染者が確認された事例は、無症状の健康保菌者が多く、一次感染か二次感染かの区別も難しく、疫学調査による感染源の推定も困難となることが多い。また、産生毒素型および PFGE パターンが異なった 2 家族は、異なる感染源であったこと推察されるが、複数の STEC により汚染された感染源であった可能性も考えられた。

一方、同一の PFGE パターンが経年的に確認されたことは長期に渡り感染源が流通していることが推測され、**diffuse outbreak** の可能性が潜んでいるものと考えられる。経年的に同一 PFGE パターンを示す STEC を監視し、事例間の関連性を調査することは **diffuse outbreak** の早期探知ならびに防止に必要と考えられた。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 石川和彦、松根 涉、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 涉、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)
- 3) 石川和彦、脇坂祐子、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、36:37-42(2001)
- 4) 石川和彦、林 賢一、梅原成子、山田和枝、杉山信子、児玉弘美、橋本信代、安田和彦：ビーフ角切りステーキを原因食とした散在的集団食中毒事例、病原微生物検出情報、22:166-167(2001)

2. 学会発表

- 1) 石川和彦、林 賢一、梅原成子、山田和枝、杉山信子、児玉弘美、橋本信代：ビーフ角切りステーキを原因食として発生

した腸管出血性大腸菌食中毒事例の疫学的検討、第6回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム（2002年6月、東京）

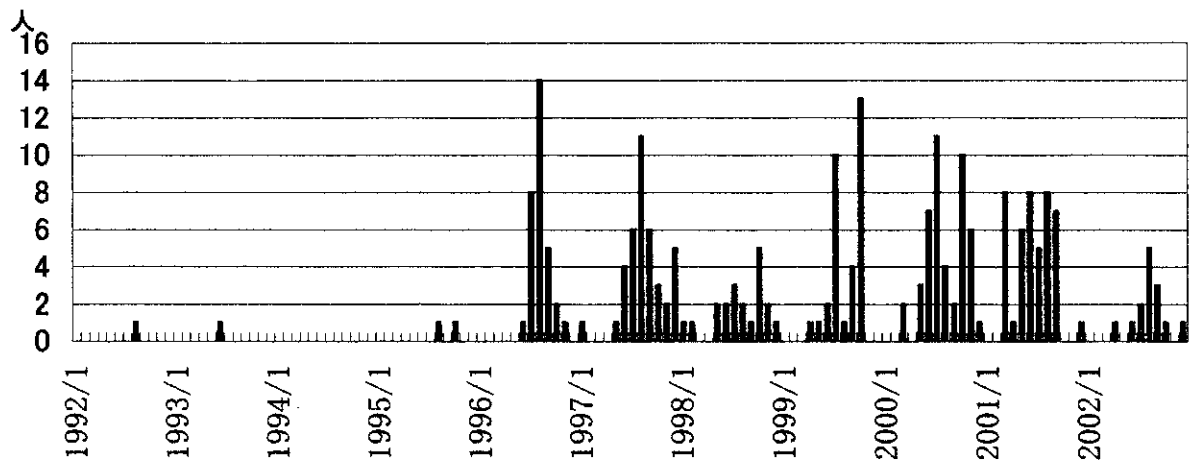


図1 腸管出血大腸菌感染者の月別発生状況（滋賀県）

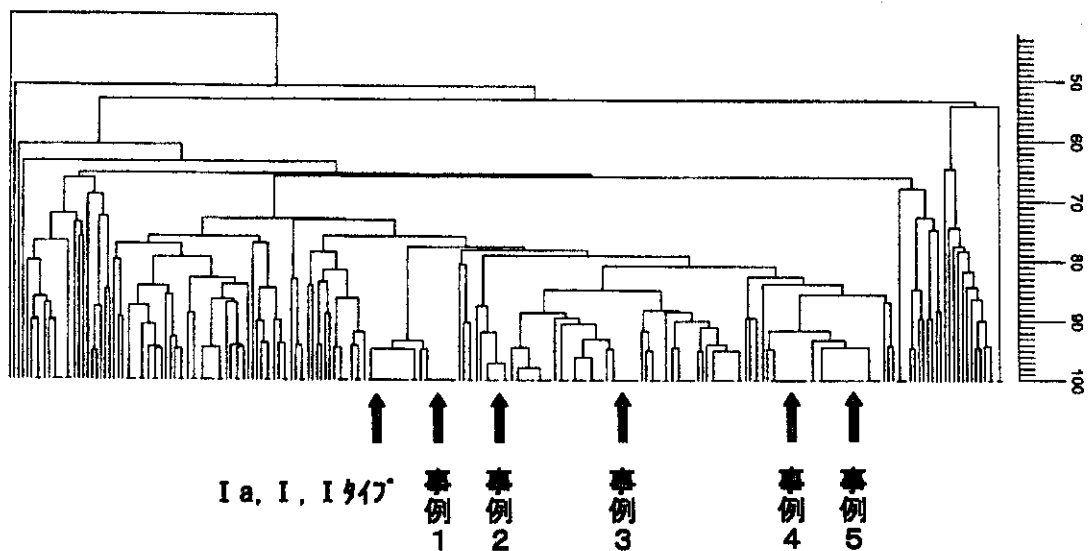


図2 腸管出血性大腸菌の系統樹（滋賀県、1992-2002年）

表1 細菌学的疫学解析の報告数（滋賀県）

	解析報告数		検討会の開催数
	関係機関	該当保健所	
1996年		1	1
1997年	2		
1998年	4		
1999年	3		1
2000年	3	1	
2001年	4	6	
2002年	3	1	
計	19	9	2

表2 家族(接触者)内で複数の感染者が確認された事例（滋賀県）

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
2001年	9	24		
2002年				
計	37	90	2	4

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 14 年度分担研究報告書

ウェルシュ菌食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析

協力研究者 中村寛海 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課  
小笠原準 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課  
長谷 篤 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課

研究要旨

2001 年 10 月に大阪市内で発生した食中毒事例では、患者便を加熱処理後増菌培養することにより、患者から高率にウェルシュ菌が検出された。増菌培養法により分離されたこれらのウェルシュ菌についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による解析とエンテロトキシン（*cpe*）遺伝子の検出を行った。その結果、増菌培養法で分離された *cpe* 遺伝子保有 52 株の PFGE パターンは大きく 2 種類に分類された。このうち 36 株（44.4%）の PFGE パターンは直接塗抹法で分離された *cpe* 遺伝子保有 13 株（15.7%）の PFGE パターンと一致した。また、増菌培養法でのみ分離された *cpe* 遺伝子保有 14 株（17.3%）の PFGE パターンは一致した。これらの菌株の血清型別試験の結果は PFGE 法の結果と一致した。本事例において、増菌培養法は PFGE 法を用いて分離菌株の解析を行うことにより、ウェルシュ菌食中毒の原因究明に有用であった。また、PFGE 法は市販の血清に該当しないウェルシュ菌の疫学マーカーとして有効であると考えられた。

A. 研究目的

典型的なウェルシュ菌食中毒の患者便および原因食品からは、大量の芽胞および栄養型菌が検出される。しかしながら、疫学的にウェルシュ菌が原因として疑われるにもかかわらず、患者便中から検出されるウェルシュ菌量が少ない場合がある。ウェルシュ菌はヒトや動物の腸管内および環境中に広く存在するため、このような場合には検査室内でウェルシュ菌食中毒を確認するのが難しいと考えられる。2001 年 10 月に

大阪市内で発生した食中毒事例は、疫学的にウェルシュ菌が原因として疑われたが、直接塗抹法では患者便から検出される菌量が少なく、検出率も低かった。そこで、加熱処理後増菌培養を行ったところ、これらの患者便から高率にウェルシュ菌が検出された。分離菌株の多くは市販の血清に該当しなかった。増菌培養法により患者便から分離されたこれらの菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による解析とエンテロトキシン（*cpe*）遺伝子の検

出を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株

2001年10月に大阪市内で発生した食中毒事例の患者便から分離された以下のウェルシュ菌を使用した。直接塗抹法による分離菌株として患者便83検体を卵黄加KMCW培地(KMCW)(ニッスイ)に直接塗抹し、ウェルシュ菌が検出された25検体のうち20検体由来の20株を使用した。また、-20°Cで冷凍保存しておいた患者便81検体をチオグリコール酸培地II(ニッスイ)に投入して75°C20分間加熱後増菌培養を行い、KMCWに塗抹してウェルシュ菌が検出された69検体のうち68検体由来の68株を増菌培養法による分離菌株として使用した。

### 2. PFGE法

ウェルシュ菌を卵黄GAM寒天平板培地(ニッスイ)に発育させ、Canardら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989; 86: 6676-6680)の方法に従ってプラグを作製した。プラグは20UのSmaI(NEB)で18~20時間処理した。電気泳動はCHEF DRIII(BIO-RAD)により、電圧6V/cm、パルスタイム0.5-40秒で0.5xTBEを使用し14°Cで20時間泳動を行った。泳動後0.5µg/mlのエチジウムブロマイド溶液で染色し、写真を撮影した。

### 3. エンテロトキシン(cpe)遺伝子の検出

cpe遺伝子の検出はPCR法により行った。すなわち、市販されているウェルシュ菌毒素検出用プライマーCPE-1および2(TaKaRa)を使用し、添付の説明書にした

がってPCR法を実施した。PCR増幅産物は、3% NuSieve3:1Agarose(BMA)で泳動後、0.5µg/mlのエチジウムブロマイド溶液で染色した。PCR増幅産物として456bpのバンドが検出されたものをcpe遺伝子保有株とした。

### 4. ウェルシュ菌の血清型別試験

ウェルシュ菌と同定された菌株は市販の血清(耐熱性A型ウェルシュ菌免疫血清「生研」)(デンカ生研)によりHobbsの血清型別を行い、これらに該当しないものをHobbs型別不能(untypable, UT)とした。HobbsUT株の一部は、東京都立衛生研究所に依頼しTWの血清型別を実施した。

## C. 研究結果

食中毒事例01-213号の概要を表1に示した。本食中毒事例の事件発生は10月11日であったが、事件の探知が15日であった。当研究所に最初の患者便が搬入されたのは16日であり、事件発生からすでに5日が経過していた。患者の多くは同一の飲食店で調製された弁当を喫食してから平均11時間の潜伏時間の後、一過性の軽い下痢と腹痛を呈した。このことから、ウェルシュ菌が食中毒の原因として疑われたが、直接塗抹法で患者便から検出されたウェルシュ菌量は少なく、検出率も83検体中25検体(30.1%)と低かった。そこで、-20°Cで冷凍保存していたこれらの患者便について加熱処理後に増菌培養を行ったところ、患者便81検体中69検体(85.2%)からウェルシュ菌が検出された。

表 2 に直接塗抹法および増菌培養法により分離されたウェルシュ菌の PFGE パターンと *cpe* 遺伝子保有状況を示した。増菌培養法で分離された 68 株のうち *cpe* 遺伝子を保有していたのは 52 株であった。このうち 36 株 (44.4%) の PFGE パターンが直接塗抹法で分離された *cpe* 遺伝子保有 13 株 (15.7%) の PFGE パターンと一致した。PFGE パターン C を示した 13 株のうち 2 株、36 株のうち 8 株の血清型は TW69 で一致していた (図 1)。増菌培養法のみで分離された *cpe* 遺伝子保有 14 株 (17.3%) は、すべて PFGE パターン D を示した。これらの血清型は Hobbs1 であった (図 1)。PFGE パターンの E, F および G を示した菌株が直接塗抹法および増菌培養法にそれぞれ一株ずつあった。これらはそれぞれ同一の患者由来であった (表 2、図 1)。PFGE パターン F を示した菌株の血清型は TW40 で、*cpe* 遺伝子を保有しなかった (表 2、図 1)。

#### D. 考察

本事例は患者の喫食状況、潜伏時間および症状からウェルシュ菌が食中毒の原因として疑われた。しかしながら、患者便中のウェルシュ菌量は少なく、検出率も低かった。また、原因として疑われた食品からウェルシュ菌は検出されなかった。発症から 5 日が経過していたため、患者便中のエンテロトキシン検査も行うことができなかった。そこで、 $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存していた患者便を加熱処理後に増菌培養したところ、高率にウェルシュ菌が検出された。増菌培

養法により分離された *cpe* 遺伝子保有 52 株の PFGE パターンは C と D の 2 種類に大きく分類された。増菌培養法で分離された *cpe* 遺伝子保有 36 株 (44.4%) は PFGE パターン C を示し、直接塗抹法で分離された *cpe* 遺伝子保有 13 株 (15.7%) のパターンと一致した (表 2、図 1)。このパターンを示した菌株が最も多かった。PFGE パターン D を示した *cpe* 遺伝子保有 14 株 (17.3%) は、増菌培養法でのみ分離された。これらのウェルシュ菌が本食中毒事例の原因である可能性が高いと考えられた。このことから、増菌培養法は PFGE 法を用いて分離菌株の解析を行うことにより、ウェルシュ菌食中毒の原因究明に有用であると考えられた。

本事例において、PFGE 法の結果は血清型別試験の結果と一致した (図 1)。しかしながら、*cpe* 遺伝子保有株の中で最も多かった PFGE パターン C を示した株は市販の血清に該当せず、PFGE 法により同一である可能性が示された。このように市販の血清に該当しない菌株の疫学マーカーとして PFGE 法の有効性が示唆された。

#### E. 結論

2001 年 10 月に大阪市内で発生した食中毒事例において、増菌培養法は PFGE 法を用いて分離菌株の解析を行うことにより、ウェルシュ菌食中毒の原因究明に有用であった。また、PFGE 法は市販の血清に該当しないウェルシュ菌の疫学マーカーとして期待される。



## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

中村寛海、小笠原準、長谷 篤、北瀬照代、  
和田崇之、中田 薫、石井営次、春木孝祐：  
増菌培養法が有効であったと考えられたウ  
ェルシュ菌食中毒事例について、第 29 回  
地研近畿支部細菌部会研究会（2002 年 10  
月、京都）

中村寛海、小笠原準、長谷 篤、門間千枝、  
鈴木 浩、甲斐明美、春木孝祐：増菌培養  
法により分離されたウェルシュ菌の解析、  
第 23 回日本食品微生物学会（2002 年 9 月、  
東京）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 食中毒事例 01-213 号の概要

発生日	2001年10月11日
事件の探知	2001年10月15日
発生場所	飲食店 弁当屋
原因食品	不明 (給食弁当)
摂食者数	464名
患者数	161名 (発病率 34.7%)
潜伏時間 (平均)	11時間
患者の症状	下痢 (96.9%)、腹痛 (67.7%)、倦怠感 (11.2%)、嘔気 (10.6%) 悪寒 (6.8%)、発熱 (5.0%)、嘔吐 (3.1%)

表2 ウェルシュ菌の PFGE パターンと *cpe* 遺伝子保有状況 (01-213 号)

PFGE パターン	直接塗抹法 (n=83) <sup>1)</sup>		増菌培養法 (n=81) <sup>2)</sup>	
	<i>cpe</i> 遺伝子		<i>cpe</i> 遺伝子	
	+	-	+	-
C	13 (15.7)	0	36 (44.4)	0
D	0	0	14 (17.3)	0
E	0	1	0	1
F	0	1	0	1
G	0	1	0	1
ND <sup>3)</sup>	0	1	2	10
UT <sup>4)</sup>	0	3	0	3
Total	20		68	

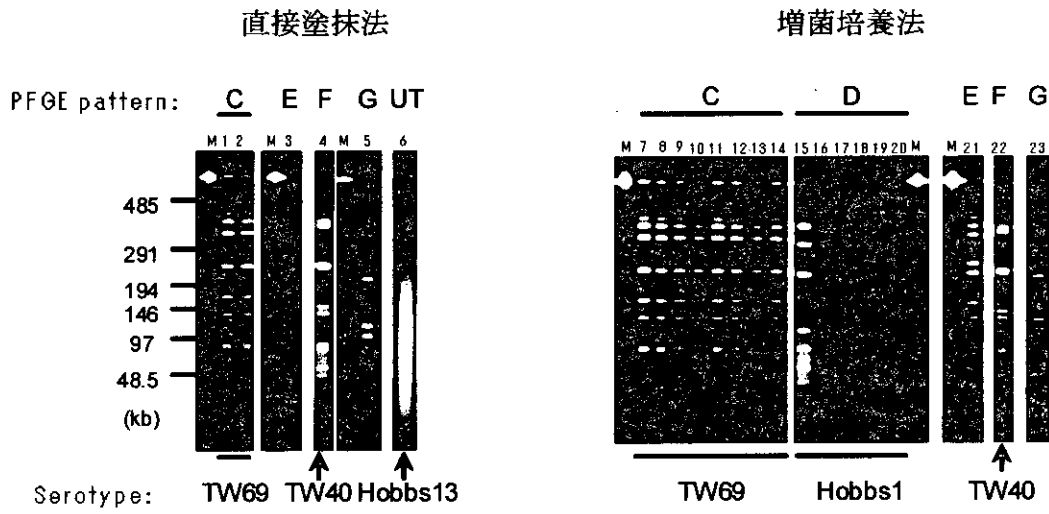
1) 患者便 83 検体のうちウェルシュ菌が検出されたのは 25 検体で、そのうち 20 検体由来の 20 株について菌株の解析を行った。

2) 患者便 81 検体のうちウェルシュ菌が検出されたのは 69 検体で、そのうち 68 検体由来の 68 株について菌株の解析を行った。

3) ND: nondescript (C から G に含まれない PFGE パターンを指す)  
これらの 13 株はそれぞれ異なる PFGE パターンを示した。

4) UT: untypeable (PFGE でバンドが得られなかった株)

図1 直接塗抹法および増菌培養法により分離されたウェルシュ菌のPFGEパターンと血清型



lane1~6 : 直接塗抹法により分離されたウェルシュ菌  
 lane7~23: 増菌培養法により分離されたウェルシュ菌  
 M: Marker ( $\lambda$  Ladder)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 14 年度分担研究報告書

病院内保育園における腸管出血性大腸菌 026:H11 感染症原因菌株の疫学的解析に関する研究

協力研究者 山内 昌弘、横田 正春、大中 隆史、石津 眞理子、  
中村 武、田中 智之 堺市衛生研究所

研究要旨

平成 14 年 8 月に堺市内の保育園で発生した腸管出血性大腸菌（以下 EHEC）026:H11 の集団発生事例の分離菌株について、パルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE）法及び他の細菌学的性状による解析を行った。

園児 106 名中 23 名（22%）から、EHEC 026:H11 が分離された。各検出菌は症状の有無に関係なく細菌学的性状及び PFGE パターンが一致する菌であった。また、園児の疫学調査の結果、園内での感染が疑われたが、感染経路については不明であった。なお、分離菌株については、堺市内において平成 9 年度以後ヒトあるいは河川等から分離された EHEC 026:H11 との PFGE 法による比較、解析を行ったが、類似度の高い菌株は見られなかった。

A. 研究目的

EHEC 感染症の発生時においては、菌株間の関連性を見るため、分離菌株の細菌学的性状の比較・解析を実施することが必要とされる。本報告では、平成 14 年 8 月に堺市内の民間保育所で発生した EHEC 026:H11 の集団発生事例を、PFGE 法及び薬剤感受性パターン、生化学的性状、ペロ毒素型により比較、解析し、その結果について報告する。

B. 研究方法

1. 菌株：保育園での集団感染事例において、園児 23 名から分離された EHEC 026:H11、23 株及び保育園の下水放流水（消毒前）から分離された 1 株。さらに、平成 9 年度以降、堺市内において発生した EHEC 026:H11 感染症例から分離された 8 菌株。当所においては平成 11 年度から河川水中の EHEC 0157、026 の調査を行っているが、その調査中に分離された EHEC 026:H11 の 8 株、合計