

マーカー No.2 No.7      No.2 No.7  
2回目 1回目

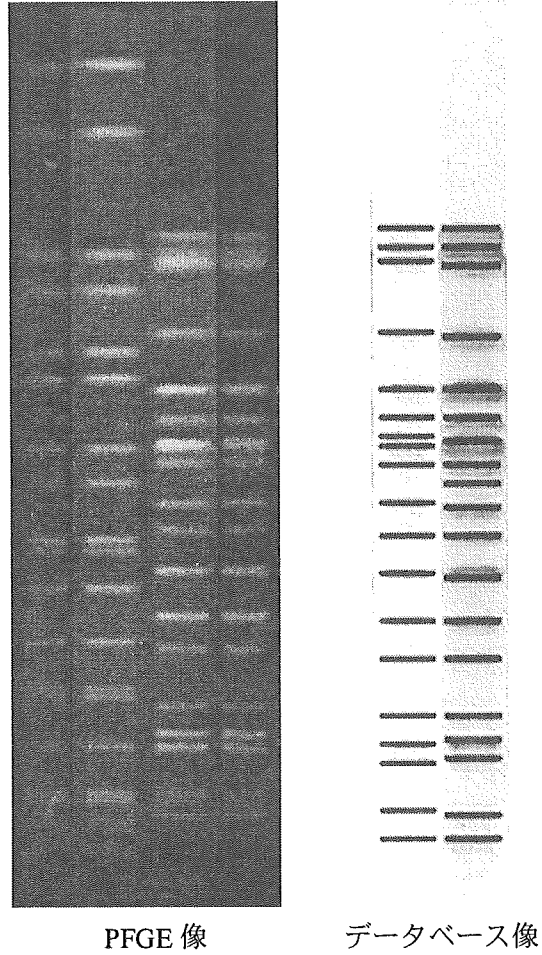


図3 PFGE 像と、解析プログラムによるデータベース像バンド位置の異同

# 秋田県で分離された志賀毒素産生性大腸菌 O121 の OI-122 保有状況、薬剤感受性と分子疫学的性状

八柳 潤、齊藤志保子、今野貴之  
(秋田県衛生科学研究所 微生物部細菌担当)

**研究要旨** STEC O121 感染者は比較的重篤な症状を呈する傾向があるなど、STEC O121 は重要な血清型の STEC であると考えられる。STEC O121 の病原性、抗生物質治療のための基礎的データ、STEC O121 と他の血清型の STEC との分子疫学的関連に関する知見を得ることを目的として、秋田県で分離された STEC O121 の OI-122 保有状況と薬剤感受性、STEC O121 と各種血清型 STEC の PFGE パターンについて検討した。STEC O121 21 株は全て OI-122 を保有し、標的とした範囲の OI-122 に遺伝子欠損がないことが示された。また、STEC O121 供試株は全て FOM、KM、NLFX に感受性であった。STEC O121 は *Xba*I PFGE パターン系統樹上でのクラスター分岐点の類似度が 69.9 % であり、今回の検討条件下においては、対照とした STECO26、STEC O157 と比較して PFGE パターンの類似度が高いことが示された。今後も国内における STEC O121 の分離実態の解明と共に、本菌による健康被害の発生防止に資することを目的とした病原性、薬剤感受性、分子疫学的性状などの菌学的性状に関する知見を集積することが重要である。

## A. 目的

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O121 の国内における分離報告は少ないが、秋田県においては毎年 STEC O121 感染者が確認され、感染者は溶血性尿毒症症候群 (HUS) を併発するなど比較的重篤な症状を呈する傾向がある。また、佐賀県や千葉県で本菌による集団感染事例が発生していることから、STEC O121 は重要な血清型の STEC であると考えられる。STEC O121 感染者が重篤な症状を呈する理由は不明であるが、最近、Karmali らが Genomic O Island 122 (OI-122) の存在が STEC の病原性と関連する可能性を指摘している。一方、STEC O121 については治療の第 1 選択とされるホスホマイシンを含む薬剤感受性データが乏しい。今回、STEC O121 の病原性に関する知見の集積と抗生物質治療の基礎的データを得ることを目的として、秋田県で分離された STEC

O121 の OI-122 保有状況と薬剤感受性について検討した。また、STEC O121 と他の血清型の STEC との分子疫学的関連に関する基礎的な知見を得ることを目的として、STEC O121 と各種血清型 STEC の PFGE パターンについても比較検討した。

## B. 方法

### 1. OI-122 の検出

秋田県内で 1997 年から 2004 年に分離された STEC O121 21 株を供試した。対照として、秋田県内で分離された STEC O26 14 株と STEC O103 13 株を供試した。OI-122 の存在は Karmali らが報告した PCR (Karmali, MA et al. JCM 41 4930p 2003) により OI-122 を構成する Z4321 (*pagC*)、Z4326 (*sen*)、Z4332、Z4333 (*efa1*) 遺伝子を検出することにより確認した。

### 2. 薬剤感受性試験

上記 STEC O121 21 株を供試した。

ABPC、CET、CTM、CTX、CAZ、CFPM、SM、KM、TC、CP、FOM、NFLX に対する薬剤感受性を KB ディスクにより検討した。

3. STEC O121 分離株の分子疫学的性状  
上記 STEC O121 21 株と、県内で分離された STEC O157 21 株、STEC O26 14 株、STEC O103 5 株の *Xba* I PFGE パターンを比較した。PFGE パターンの系統樹解析は Fingerprinting II (Jaccard, Tolerance 1.5%) により実施した。

### C. 結果・考察

表に示すように、STEC O121 21 株は全て Z4321、Z4326、Z4332、Z4333 遺伝子が陽性であったことから、供試した STEC O121 は全て OI-122 を保有し、標的とした範囲の OI-122 に遺伝子欠損がないことが示された。これに対して、対象とした STEC O26 14 株は全て Z4326、Z4332、Z4333 遺伝子のみ陽性、Z4321 遺伝子陰性であり、STEC O26 の OI-122 には遺伝子の一部に欠損が存在することが示された。一方、STEC O103 は 13 株中 6 株が STEC O26 と同様に Z4326、Z4332、Z4333 遺伝子のみ陽性、Z4321 遺伝子陰性であり、他 6 株は STEC O121 と同様に Z4321、Z4326、Z4332、Z4333 遺伝子が陽性、残りの 1 株がこれらの遺伝子が全て陰性であり、STEC O103 の OI-122 には遺伝子多型が存在することが示された。

STEC O121 供試株は 21 株全てが CET 中等度耐性もしくは耐性、1 株のみが TC 耐性であったが、STEC 感染症の治療に推奨されている FOM、KM、NFLX に対しては全株感受性であった。

*Xba* I PFGE パターンの系統樹解析の結果を図に示す。STEC O121、STEC O26、STEC O157 は血清型毎にクラスターを形成する傾向が認められた。特に STEC O121 は系統樹上でのクラスター分岐点の

類似度が 69.9 % であり、本検討条件下においては、供試したその他の血清型の STEC と比較して PFGE パターンの類似度が高いことが示された。これに対して、STEC O103 は単一のクラスターを形成せず、供試した 5 株のうち 3 株が STEC O26 のクラスターに、2 株が STEC O157 のクラスターに包含された。

秋田県において STEC O121 は Non-O157 STEC の中で唯一患者に HUS を惹起し、感染者が重篤となる傾向が示されてきたが、STEC O121 感染者が重篤な症状を呈する理由は明らかではない。その理由を説明する仮説の 1 つとして、Karmali らは STEC O157、O121、O111、O145 が遺伝子欠損のない OI-122 を保有し、このことがこれらの血清型の STEC が集団事例や HUS の発症と高頻度に関連している理由の 1 つである可能性を指摘しているが、STEC O121 供試株数はわずか 3 株であった。今回、我々は秋田県内でこれまでに分離された STEC O121 21 株を供試して Karmali の仮説の検証を試みた結果、STEC O121 21 株は全て Z4321、Z4326、Z4332、Z4333 遺伝子が陽性であったことから、供試した STEC O121 21 株は全て OI-122 を保有し、標的とした範囲の OI-122 に遺伝子欠損がないことが示され、この結果は Karmali らが提唱した可能性を裏付けるものと考えられた。

1997 以降に秋田県内で分離された STEC O121 21 株は全て FOM、KM、NFLX 感受性であり、現在の治療指針上問題となる薬剤耐性を獲得した株はみられなかった。しかし、STEC O26 には FOM 耐性株が存在することが報告されており、STEC O121 についても現在治療に推奨されている抗生物質に対する耐性菌の出現を今後も継続して監視する必要があるものと考えられる。

STEC O121 21株と、県内で分離された STEC O157 21株、STEC O26 14株、STEC O103 5株の *Xba* I PFGE パターンを比較し、STEC O121 と他の血清型の STEC との分子疫学的関連に関して検討した。その結果、*Xba*I PFGEパターンを指標とした今回の検討条件下において、STEC O121 は系統樹上でのクラスター分岐点の類似度が 69.9 % であり、供試した STEC O157、STEC O26 と比較して PFGE パターンの類似度が高いことが示された。この傾向が他の制限酵素を使用した PFGE パターンの解析や、PFGE 以外の分子疫学解析手法によっても同様に認められるかどうかは興味深い点であり、今後の検討課題と考えられる。一方、STEC O103 は STEC O121、STEC O157、STEC O26 とは異なり、単一のクラスターを形成しない傾向が認められた。このことは、STEC O121、STEC O157、STEC O26 とは異なり、

STEC O103 の OI-122 に遺伝子多型が認められたこととの関連と併せて興味深い。さらに STEC O103 の Lineage について興味を持たれる。今回供試した STEC O103 はわずかに 5 株であったことから、今後、供試株の数をさらに増やして検討する必要があるものと考えられた。

STEC O121 は Non-O157 STEC の中で重要な血清型であると考えられるにもかかわらず、これまで型別用血清が市販されていなかったことから国内における分離実態は必ずしも明らかではなく、菌学的性状の検討も十分には行われてきたとは言い難い。最近、ようやく国産の型別用血清が市販されたことから、国内におけるその分離実態の解明と共に、本菌による健康被害の発生防止に資することを目的とした病原性、薬剤感受性、分子疫学的性状などの菌学的性状に関する知見を集積することが重要である。

表 STEC O121、STEC O26、STEC O103 の OI-122 保有状況

	供試株	株数	Z4321	Z4326	Z4332	Z4333
			<i>pagC</i>	<i>sen</i>	<i>efa1</i>	<i>efa1</i>
STEC O121	21	21	+	+	+	+
STEC O26	14	14	-	+	+	+
STEC O103	13	6	-	+	+	+
		6	+	+	+	+
		1	-	-	-	-

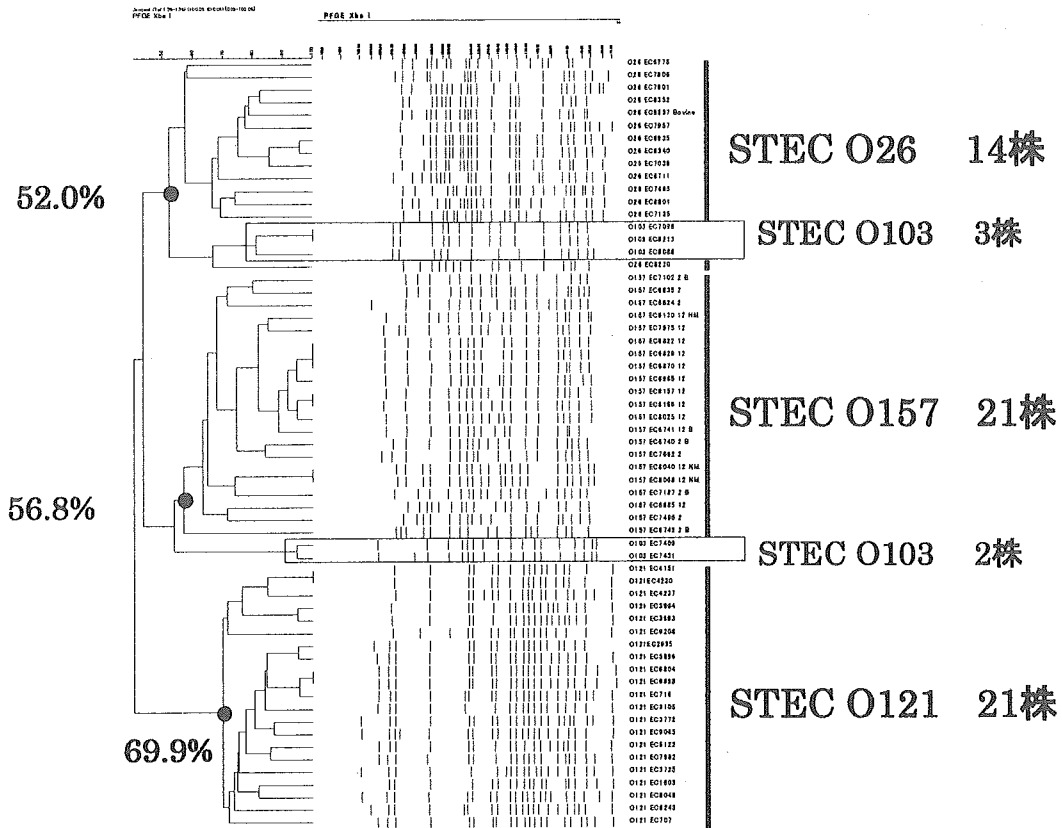


図 STEC O121、STEC O26、STEC O157、STEC O103 の *Xba*I PFGE パターン系統樹

保育所において二つの異なるPFGEパターンが分離された腸管出血性大腸菌  
O26:H11による集団感染事例（岩手県）

岩手県環境保健研究センター保健科学部

藤井伸一郎 松館宏樹 佐藤 卓 蛇口哲夫

**要旨：**平成17年8月、岩手県内の保育所において、腸管出血性大腸菌 O26:H11（VT1）による集団感染が発生した。感染者は園児18名であり、分離株について薬剤感受性試験とパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による遺伝子解析を行ったところ、薬剤感受性は11薬剤すべてに感受性であったが、PFGEパターンは二つの異なるパターンに分類された。PFGEのパターンの違いは、概ね年齢によるクラスの違いであり、0歳～2歳時のクラス（2組）と3歳～5歳のクラス（3組）で異なっていた。一般的に、同一施設における集団感染の場合、分離株のPFGEパターンは同一であるが、今回の事例は、二つの異なるパターンが分離された稀な事例であった。感染源の特定はならず、事件の全容を解明することはできなかったが、同じ時期に、同じ施設において、二つの由来の異なる株による感染が偶発的に発生し、主に同一クラス内または接触頻度の高いクラス間でヒトからヒトへ感染した事例であると推察された。

## I 事件の概要（表1）

平成17年8月17日、県内の医療機関から、保育所の園児1名が腸管出血性大腸菌に感染している旨の通報が管轄保健所にあった。保健所ではその園児の家族検便を行ったところ、20日に同じ保育所に通う姉が感染していることが判明した。また、23日、24日に別の医療機関から同保育所に通う別の兄弟が感染している旨の報告を受け、24日に保育所の全園児、職員の検便を実施した。26日にさらに園児14名の感染が判明し、同日及び27日に、感染が判明した園児の家族53名の検便を行ったが、すべて陰性であった。

## II 検査内容

### 1 菌の分離

検便141検体（園児67名、職員17名、園児の家族53名）について菌の分離を行った。

### 2 薬剤感受性試験

センシディスクを用い、11薬剤（ABPC, CTX, KM, GM, SM, TC, CP, CPF, NA

, FOM, ST）について感受性を調べた。

### 3 PFGEによる遺伝子解析

制限酵素に *Xba* I を用い、系統樹解析を行った。

## III 検査結果

### 1 菌の分離

園児18名から菌が分離された。

### 2 薬剤感受性試験

分離株はすべて11薬剤に感受性であった。

### 3 PFGEによる遺伝子解析

PFGEパターン（図1）は、二つの異なるパターンに分類された。

系統樹解析の結果（図2）、二つのクラスターに分類された。

パターンI（8株が概ね同一）とパターンII（10株が概ね同一）と分類した場合、年齢別のクラスにおけるパターン（表2）は、A及びBではパターンIであり、C、D及びEではパターンIIであった。

#### IV 考察

PFGEパターンは二つに分類され、パターンIは、A及びBのクラスであり、この2クラスは共に遊ぶなど接触頻度が高かった。感染者8名中7名が有症状であり、なかには8月5日や6日（図1）から症状を呈していた者もあり、全園児等の検便を行った日（24日）までの期間中に蔓延したものと思われた。系統樹解析の結果、蔓延中の菌の変異によると思われるバンド数の違う株も数株認められ、類似度もパターンIIと比べ、ばらつきが見られた。

パターンIIは、C、D及びEのクラスであったが、例外が1名（B）いた。その者の感染は、姉がDにいたことから、兄弟間の感染であると思われた。感染者10名中5名が有症状であり、発症日は早い者で17日であり（図1）、パターンIと比べ、短い期間に感染が広まったと思われる。系統樹解析の結果においても、1名を除き、類似度が100%であった。

一般的に、同一施設における集団感染の場合、分離株のPFGEパターンは同一であるが、今回の事例は、二つの異なるパターンが分離された稀な事例であった。感染源の特定はならず、事件の全容を説明することはできなかったが、同じ時期に、同じ施設において、二つの由来の異なる株による感染が偶発的に発生し、主に同一クラス内または接触頻度の高いクラス間でヒトからヒトへ感染した事例であると推察された。

表1 事件の概要

区分	内容
発生（届出）期間	H17. 8. 16~27
発生場所	保育所
患者数/全園児数	18/71
患者数/職員数	0/17
患者数/園児の家族	0/53
発症率（有症状）	67%（12/18）

表2 PFGEパターン

クラス	人数	患者数	パターンI	パターンII
A (0~1歳)	13	5	5	
B (1~2歳)	10	4	3	1
C (3歳)	20	3		3
D (4歳)	15	3		3
E (5歳)	13	3		3
計	71	18	8	10

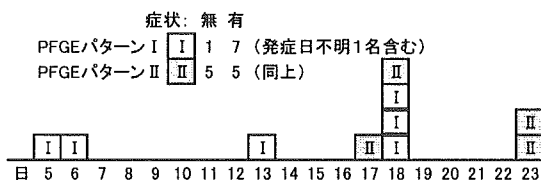


図1 発症日における流行曲線

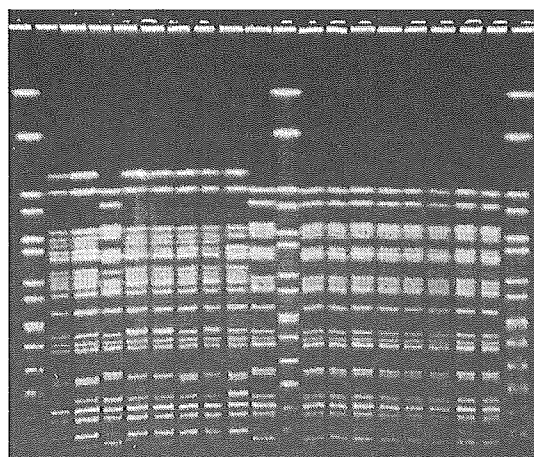


図2 腸管出血性大腸菌O26:H11のPFGEパターン（*Xba*I処理）

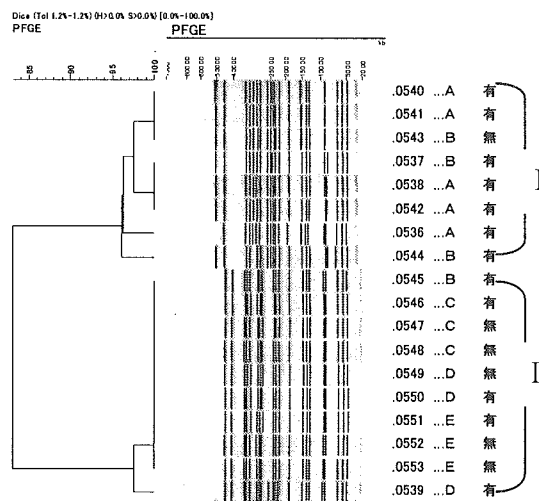


図3 系統樹解析結果

宮城県下で発生した大腸菌感染事例  
ーパルスフィールドゲル電気泳動法による解析とその概略ー

宮城県保健環境センター  
谷津壽郎、田村広子、三品道子、菅原直子  
佐藤由美、畠山敬、秋山和夫

A. 保育園における腸管出血性大腸菌集団感染事例

2004年9月に宮城県内の保育園で発生した腸管出血性大腸菌(EHEC)集団感染事例について、概要を報告する。

9月16日、県内の医療機関よりO血清型不明でVT1産生によるEHEC感染症患者1名の届出があった。患者は2歳の男児で、9月7日より下痢・腹痛、9日に血便があり、同日医療機関を受診した。患者が保育園に通っていたことから、管轄保健所は同保育園における健康調査を開始した。

当センターで医療機関から患者菌株を入手し性状の確認を行った結果、リジン陰性、運動性は微弱で、市販のO型別免疫血清にも反応しなかった。さらにエンテオグラム(和光純薬株式会社製)を用いた糖分解能では、ラフィノース非分解性の特徴が認められた。そこでこの性状を利用し、検体をmEC培地により増菌後、PCRでVT1遺伝子が検出された培養液を、ラフィノース加マッコンキー寒天培地で培養し、ラフィノース非分解性のコロニーについて再度PCRでVT1遺伝子の検出を行った。VT1遺伝子が検出されたコロニーについて、生化学試験および血清型別試験を実施し、患者菌株との性状比較を行った。

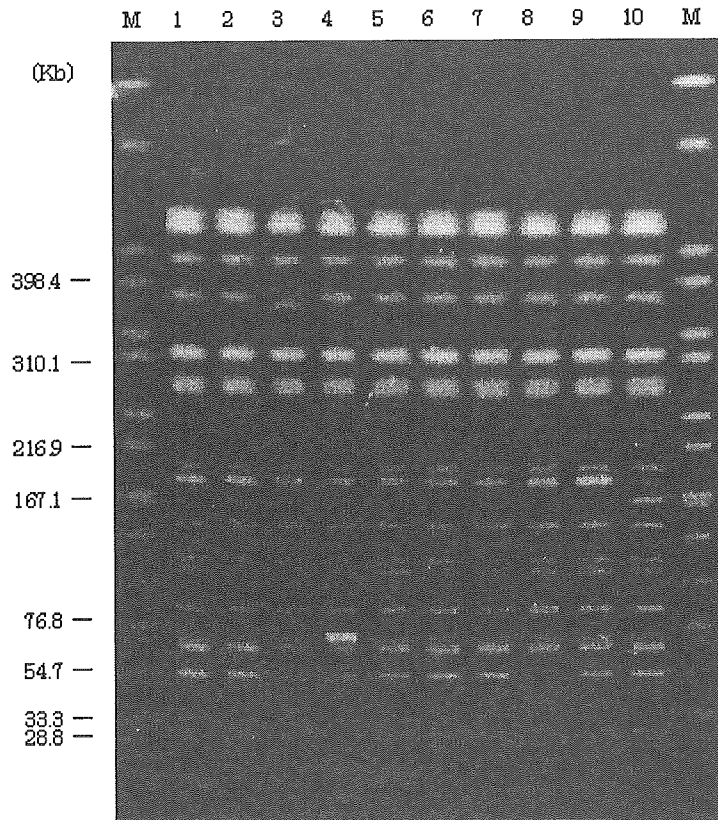
調査開始当初、患者の家族、保育園の職員、患者との接触が多いと考えられる1歳・2歳児クラスの園児を対象として検便を実施した結果、1歳・2歳児クラスの7人より菌が検出された。そのため菌の検出された園児の家族と保育園全員に範囲を拡大して検便を実施したところ、さらに園児の家族2人から菌が検出された。しかし3歳児以上のクラスの園児から菌は検出されなかった。最終的に検便総数は235人で、菌検出者は計9人となったが、そのうち症状があったと報告されたのは園児1人(下痢)のみであった。患者菌株を含め検出された10株について国立感染症研究所で精査を行った結果、患者菌株はOUT:H-(VT1)、それ以外の9株はO145:H-(VT1)と同定された。図1に制限酵素Xba Iによるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)の結果を示す。レーン1が初発患者、2～8は園児、9は2の家族、10は6の家族である。レーン3で398.4kb付近のバンドの相違、4で76.8kb付近のバンドの相違、8で28.8kbと54.7kb付近のバンドの欠損、10で167.1kb付近にバンドの付加が認められた以外は一致したパターンを示した。

患者菌株と他の9株でO血清型に違いが見られた明確な理由は得られていないが、本事例は同一時期に限定された集団から菌が検出され、そのPFGEパターンがほぼ一致したことから、これらの菌株は同一起源である可能性が考えられた。なお、保育園の調理室や遊具等のふきとり(20件)と給食の検食・食材(248件)から菌は検出されなかったことから、保育園内で人→人感染が起きたと推察されたが、感染経路の特定には至らなかった。

なお、届出医療機関が依頼した検査機関では、EHECの補助的鑑別にBeutin培地を用いていた。



図1. PFGEパターン



M : *Salmonella* Eraenderup H9812

レーン1 : 初発患者、2~8 : 園児、

9 : 2の家族、10 : 6の家族

## B. 冬期に保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 による集団感染事例

2005年2月末から3月にかけて県北部の1保育園において、園児・家族・職員に及ぶ腸管出血性大腸菌 O26:H11 による集団感染が発生したので概要を報告する。

3月3日(木)に医療機関から1歳の保育園男児1名の O26, VT1 産生株による腸管出血性大腸菌感染症の発生届が保健所に提出された。その後、保健所による保育園児の接触者調査が行われたところ、他の園児からも O26:H11 (VT1 産生) 株が検出されたため、全保育園児と職員の検査が行われた。その結果、表1に示したように初発の園児1名を含む103名中24名、職員24名中3名から同菌が検出された。さらに、菌陽性となった園児の家族内の調査も行われ38名中16名からも同菌が検出された。陽性となった24名の園児のうち有症者は16名、症状が認められなかった者が8名で発症率は67%であった。一方、職員および家族16名に発症者はなく発症率に有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。また、初発患者自宅の調理器具、玩具など9件のふきとり検査を行ったが同菌は検出されなかった。一連の検査は3月17日までに終了した。

表1. 検査検体数と O26:H11 (VT1 産生) 株陽性数

	検 体 数	陽 性 数 (有症状、無症状)
園 児	103	24(16, 8)
職 員	20	3( 0, 3)
家 族	38	16( 0, 16)
ふきとり	9	0

\* 初発の園児および家族の検体(菌株)を含む

表2. 園児クラス別陽性数

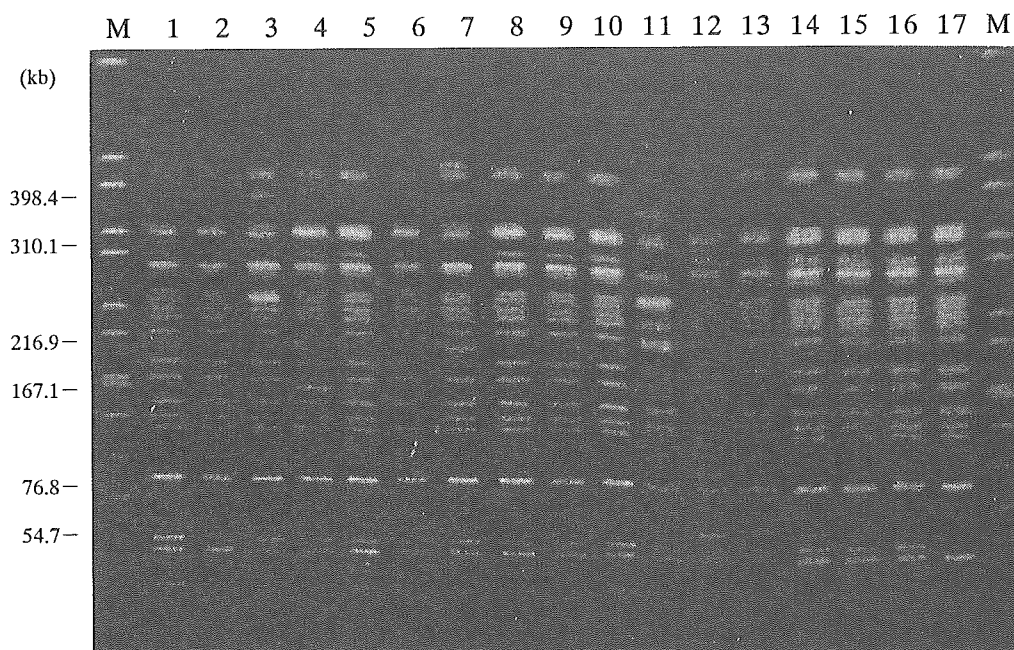
クラス	園 児 数	陽 性 数 (率)
0歳児	8名	3名 (38%)
1歳児	11	9 (82%)
2歳児	18	8 (44%)
3歳児	16	0 ( 0%)
4歳児	19	2 (11%)
5歳児	16	0 ( 0%)
6歳児	15	2 (13%)

園児における発生状況を表2に示した。陽性者24名のうち、0歳児クラス3名、1歳児クラス9名、2歳児クラス8名、4歳児クラス2名および6歳児クラス2名であった。0歳児、1歳児および2歳児クラスでの陽性率が高く、特に初発患者のクラスで82%に達した。この3クラスの担任職員とも陽性者であったことに加え、他のクラスに兄弟姉妹がいたことなどから、感染が広まったと推測された。

菌陽性者より検出された同菌株のパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)を行った結果の一部を図1に示した。Dice法による類似度は、38名中36名は90%以上であったが、2名(レーン8, 12)は80~90%にとどまった。しかし、類似度の差異からは園児、職員、家族などに一定の傾向は見出せなかった。また、

過去 6 年間に宮城県内で分離された O26:H11 (VT1 産生) 株とは一致するものはなかった。

図 1 PFGE パターン



M: *Salmonella* Braenderup H9812

レーン 1,3,6,9: 有症園児

レーン 2,5,7,10,11: 症状が認められなかった園児

レーン 4,8: 職員

レーン 12~17: 有症園児の家族

## C. 過去6年間に検出した腸管出血性大腸菌（EHEC）の PFGE パターン

### 1 はじめに

パルスフィールド電気泳動（Pulsed-field Gel Electrophoresis;PFGE）法は、感染症の分子疫学的解析には欠かすことのできない標準的解析法としての地位を確立しつつある。今回、平成16年度に多発した腸管出血性大腸菌感染症から分離された菌株（O157, O26）について PFGE 法による解析を実施した。さらに過去6年間に分離同定した保存菌株と照合し、県内における動態を探った。

### 2 材料および方法

菌株は平成11年度39株、12年度58（うち牛由来6）株、13年度43（うち牛由来3）株、14年度51株、15年度35株（うち牛由来14）および16年度163（うち牛由来11）株である。制限酵素は *Xba* I を用いた。PFGE は、パルスタイム 2.2～54.2 秒、泳動 19 時間とした。

### 3 結果

#### 3.1 O157:H7 VT1,2 および O157:H7 VT2 については表1に示した。

O157:H7 VT1,2 は、Aタイプ、Bタイプおよびその他に分類した。Aタイプは167.1–310.1kb間に6本、Bタイプは5本のバンドが確認できるのが特徴的で、他のバンドは一致した（図1）。AおよびBタイプ以外をその他とした。表中の数字は菌株数で、○数字はAおよびBタイプの基本型とし、○のない数字はサブタイプで167.1–310.1kb以外にバンドの相違を認めた。また、2以上の数字は同一事例の家族や保育園児から検出された菌株数を表し、Cは牛（cattle）由来株、ハイフンは同一事例での家族内および保育園児内から検出された菌株の比較で1～2本バンドが異なるサブタイプを表した。破線矢印はPFGEの同一パターンを示し、矢印のない破線は1～2本増減する類似パターンを意味する。Aタイプは12年度から認められ、家族由来2株はAサブタイプ、別のAサブタイプは1株ずつが時および場所を異にして同一パターンを示した。13年度は家族由来のAタイプ基本型である②株が①株と同一パターンを示した。この同一パターンの菌株は16年度の家族由来②株とその飼育牛⑦株に関連し、さらに別の①株が確認された。13年度の1-1はAサブタイプのさらに1本のバンドの相違を認めた。また、Aサブタイプ1株は16年度に同一パターンの1株が検出された。14年度のAサブタイプ1株はBサブタイプ1株とバンド2本の相違であった。16年度には別にAサブタイプ1株も確認された。同様に、Bタイプもサブタイプとともに11から16年度まで毎年確認された。その他では、13年度家族由来3株が16年度の家族由来3株と同一パターンであることが確認された。また、15年度に家族由来3株とその飼育牛9株で同一パターンが確認された。

O157:H7 VT2 はCタイプ、Dタイプおよびその他に分類した。Cタイプは310.1–668.9kb間に5本、Dタイプは同3本のバンドが特徴的に確認され、CおよびDタイプ以外をその他とした（図1）。11年度から毎年確認され、年度を超えた同一パターンやと畜場で解体された牛由来株との類似パターンも確認された。また、Cタイプでは15年度のO157:H7 VT1,2その他2株と3本のバンドが異なる類似パターンが確認された。

3.2 O157:H7 VT1, O157:HNM VT1,2 および O157:HNM VT2 については表2に示した。

O157:HNM VT1,2 は、平成15年度にと畜場の牛から確認された1株と16年度家族由来2株および3株と同一パターンであった。

3.3 O26:H11 VT1, O26:HNM VT1 および O26:H11 VT1,2 については表3に示した。

O26:H11 VT1 では、平成11年度に1株ずつの同一パターンが確認され、1から2本のバンドが異なるサブタイプの3グループも確認された。そのうち1株が13年度の1株と同一パターンが確認された。また、ほかに1株ずつ12, 14年度および15年度に類似パターンが確認された。12年度にはO26:HNM VT1 との類似パターンも確認された。16年度は、同一パターンが家族由来4株、別の家族由来2株、患者由来1株とさらに患者由来1株の4事例で確認された。ほかに異なる5つの株で同一パターンが確認された。(仙)は仙台市の関連調査で確認されたことを表している。9つの株は患者由来の株であったが、8つの株で家族内感染、4つの株で集団発生が確認された。集団発生1事例で検出された38株からは、同一パターン34株とサブタイプ3株および全く異なるパターン1株が確認された。

#### 4 まとめ

(1) O157 は、年度を越え、牛も含めて同一パターンが多数確認された。

(2) O26 は、年度を越えた同一・類似パターンは少数であったが、同一年度内にサブタイプが多数確認され、集団発生事例でも サブタイプおよび全く異なるパターンが確認された。

(3) 今後、O157 の A~D タイプ分類の妥当性を検討するとともに、O26 の遺伝的多様性を念頭に置いた積極的疫学調査を実施する。

#### 5 考察

腸管出血性大腸菌はO抗原、H抗原を基本として分類されてきた。近年、食中毒や集団感染が発生し、乳幼児や高齢者の死亡例が報告されるようになって、ベロ毒素による分類が追加されて、遺伝子検査としてのPCR法による同定が迅速かつ正確な分類法として実用化されてきた。一方、1980年代に産声をあげたPFGEが完成度増して遺伝子検査に参入し、細菌の分類に重要な証拠を提供することになった。

今回、平成16年度に多発したEHECにPFGEパターンの同一な菌株が時と場所を異にして多数検出されたため、感染源として広域流通食品の特定や多発地域を限定できれば、感染源を突き止めることができないものか、過去に遡って例数を増やし検討した。O157:H7 VT1,2 の A タイプ、B タイプは過去に全国で集団発生した(和風キムチ)時に用いられた。分類である。他のCタイプ、Dタイプは、多発した同一パターンの菌株を便宜上分類したものである。

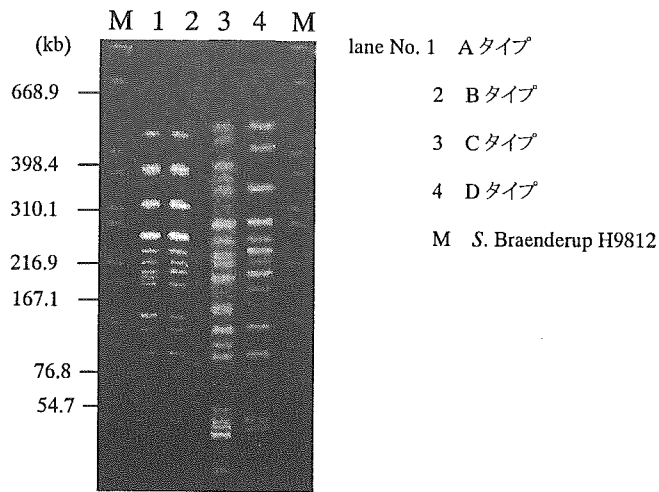


図1 PFGE 基本パターン

表1 O157:H7 VT1, 2 および同 VT2 菌株の PFGE 比較

年度	O157:H7 VT1, 2			O157:H7 VT2		
	Aタイプ	Bタイプ	その他	Cタイプ	Dタイプ	その他
11		① -1 1	1 1		①-1	1
12	2 1	② 1 1 1	3 1 1 C1	①-3	①	
	1	2	C1	①		C3
13	② 1-1	C① 1 1 1	1	②		1 C1
	① 1	1 1 1		②		
14	1-	1 1-1		⑦		5 2 1 1
		1 1				1
15		② 1 1	2-3			C1
		1 1	3 C9			
16	② 1 1	1 1	3 3 1 1	②-1	②	1 1 1-1 4 1
	C⑦			①		C4
	①					

表2 O157:H7 VT1 同 HNM VT1, 2 および同 HNM VT2 菌株の PFGE 比較

年度	O157:H7 VT1	O157:HNM VT1, 2	O157:HNM VT2
11	1		
12		2	2 C1
13	C1		
14			
15		C1 ↓ 2	
16		↓ 2 ↓ 3	

表3 O26:H11 VT1、同 HNM VT1 および同 H11 VT1, 2 の PFGE 比較

年度	O26:H11 VT1	O26:HNM VT1	O26:H11 VT1, 2
11	2-1 1 1 1 2 1 1 1 2 1 ↓ 1 ↓ 1 ↓ 1 ↓ 1 5 1 1-1-1 1 1-1	1	
12	4-3-1-1-3 1 1 1-1 2-3 ↓ 2-1 ↓ 1 2 1	2	
13	6 1 1 1 1 1 1 1 2 2-1 1 2 1 1	2	
14	2 12-4-1-1-2 1 1	1-1 2 ↓ 1	
15	1 C2 C2 1 2 1 2 1 2	1	
16	4 1 1 1(仙) -1(仙) 2 1 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ 2 1 1 1 1 3 ↓ 1(仙) 6 2 3 3 5 4 2 6 11 12 ↓ 1 1 1 1 1 1 1 1 35-3 ↓ 1	5	1

# メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の院内感染が疑われた事例の PFGE 解析

山形県衛生研究所 村田敏夫、最上久美子、大谷勝実、水田克巳

## 1 はじめに

緑膿菌やセラチアなどによる院内感染は、医療現場をはじめとして社会的な問題になっている。県内の基幹病院においてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）による院内感染が疑われる事例が発生し、メチシリン耐性表皮ブドウ球菌（MRSE）2株を含む合計8株について当所に PFGE による遺伝子解析の依頼があった。また、これらの株は病院で行った薬剤感受性試験の結果、すべてバンコマイシン（VCM）、テイコプラニン（TEIC）に低度耐性を示していたことから、VanA、VanB 遺伝子を保有する VRSA であるか否かの検討と微量液体希釈法による薬剤感受性試験を併せて実施した。

## 2 材料および方法

### 1) 材料

2004年5月から2005年6月の間に分離され、当所に送付された菌株MRSA 6株とMRSE 2株を表1に示す。なお、病院で行ったVCMおよびTEICに対するMIC値はすべての株において、各々2μg/ml、16μg/mlであり、VCMよりTEICに対して比較的高い耐性を示した。

### 2) PFGE による遺伝子解析

表1に示した8株と、対照として当所に保存してあるMRSA 4株の合計12株についてPFGEによる遺伝子解析を行った。制限酵素はSma Iを使用し、泳動条件はスイッチタイム5.3秒-34.9秒、泳動時間20時間とした。

### 3) 薬剤耐性遺伝子の検索

PCR法によりMecA遺伝子<sup>1)</sup>およびVanA<sup>2)</sup>、VanB、VanC遺伝子の検索を行った。

### 4) 薬剤感受性試験

ドライプレート‘栄研’DP22を用いて微量液体希釈法で行った。

表1 病院で分離された菌株

菌株No	分離年月日	菌名	VCM MIC値	TEIC MIC値	患者(性別)	年齢	検体の由来
1	2004.05.26	MRSE*	2 μg/ml	16 μg/ml	女	56	血液
2	2005.02.28	MRSA	2 μg/ml	16 μg/ml	女	80	喀痰
3	2005.03.09	MRSA	2 μg/ml	16 μg/ml	女	69	ドレーン浸出液
4	2005.03.14	MRSA	2 μg/ml	16 μg/ml	男	57	便
5	2005.03.25	MRSA	2 μg/ml	16 μg/ml	男	77	喀痰
6	2005.03.25	MRSA	2 μg/ml	16 μg/ml	女	77	便
7	2005.05.23	MRSE*	2 μg/ml	16 μg/ml	男	13	CAPD廃液
8	2005.06.20	MRSA	2 μg/ml	16 μg/ml	男	55	喀痰

MRSE\*:メチシリン耐性表皮ブドウ球菌

## 3 結果と考察

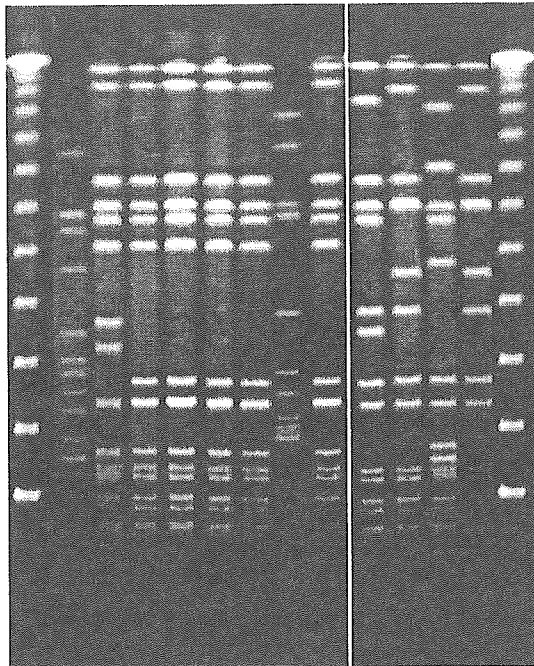
PFGEの結果を図1に、薬剤感受性試験の結果を表2に示す。PFGEの結果からNo3、No4、No5、No6、No8は遺伝子学的に同一のMRSAであり、No2はこれら5株と近似の関係にあることが示唆された。また、薬剤感受性パターンは6株すべてが一致しており、2005年2月から6月のあいだに同一のMRSAによる院内感染があったことが推測された。No1とNo7のMRSEはPFGEパターンおよび薬剤感受性パターン（EMとFOM）共に異なっており、分離された日付もおおよそ1年離れていることから、両株間に細菌学的な関連性はないと考えられ



た。なお、TEIC に対する MIC の結果に病院の結果と 1~2 管のずれがみられた。

近年、VRE (バンコマイシン耐性腸球菌) が Plasmid 上に保持している VanA、VanB 遺伝子が MRSA に伝達された VRSA<sup>3)</sup> の拡がり懸念されていることから、PCR 法により Meca 遺伝子および VanA、VanB、VanC 遺伝子の検索を行った。その結果、8 株すべてから Meca 遺伝子は検出されたが、VanA、VanB、VanC 遺伝子はいずれも検出されなかった。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M



M:	Lambda Ladder
1:	菌株 No1
2:	No2
3:	No3
4:	No4
5:	No5
6:	No6
7:	No7
8:	No8
9:	MRSA 1 (保存株)
10:	MRSA 2 (保存株)
11:	MRSA 3 (保存株)
12:	MRSA 4 (保存株)

図1 パルスフィールド電気泳動の結果

表2 薬剤感受性試験結果

菌株No	PCG	ABPC	CEZ	CTM	CCL	FMOX	IPM	GM	MPIPC	ABK	MINO	EM	CLDM	VCM	TEIC	FOM	LVFX	ST
1	>0.25	4	2	2	2	2	0.12>	0.5>	2	0.5>	0.5>	0.25>	0.12>	2	4	8>	0.5>	9.5/0.5>
2	>0.25	>16	>32	>32	>32	>32	>16	>16	>4	4	0.5>	>8	>4	2	8	>32	>8	9.5/0.5>
3	>0.25	>16	>32	>32	>32	>32	>16	>16	>4	4	0.5>	>8	>4	2	8	>32	>8	9.5/0.5>
4	>0.25	>16	>32	>32	>32	>32	>16	>16	>4	4	0.5>	>8	>4	2	8	>32	>8	9.5/0.5>
5	>0.25	>16	>32	>32	>32	>32	>16	>16	>4	4	0.5>	>8	>4	2	8	>32	>8	9.5/0.5>
6	>0.25	>16	>32	>32	>32	>32	>16	>16	>4	4	0.5>	>8	>4	2	8	>32	>8	9.5/0.5>
7	>0.25	8	2	2	4	4	0.5	0.5>	4	0.5>	0.5>	>8	0.12>	2	8	32	0.5>	9.5/0.5>
8	>0.25	>16	>32	>32	>32	>32	>16	>16	>4	4	0.5>	>8	>4	2	8	>32	>8	9.5/0.5>

参考文献

- 1) Kuroda M, et al.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 357 : 1225-1240, 2001
- 2) Arther M, Courvalin P : Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 37 : 1563-1571, 1993
- 3) Weigel LM, et al.: Genetic analysis of a high level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science 302 : 1569-1571, 2003

# マンニット非分解性黄色ブドウ球菌による食中毒事例の

## パルスフィールドゲル電気泳動法による解析

福島県衛生研究所 微生物グループ

熊谷奈々子 須釜久美子 平澤恭子 長沢正秋 渡部啓司

### はじめに

今年度県内で発生し、PFGE 法による解析によってその有用性が得られた事例について報告する。

### 事例の概要

2005年8月4日、会津保健所管内で行われた祭り打ちあげ会の参加者の中で、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛の食中毒様症状を呈している者がいるとの通報を受け、調査が開始された。発症者の共通食は、A社施設で製造・調理された食品（おにぎり、唐揚げ）であった。

また、祭り関係者以外でもA社他店舗にて販売されたおにぎりを喫食して発症した者が8名おり、発症者は合わせて35名となった。

検査の結果、食品、従事者手指及び調理用具等ふきとり液、発症者便（新潟市衛生試験所にて分離）から計9株の黄色ブドウ球菌が検出された。なお、発症者は県外にもいたため、発症者便1件は新潟市衛生試験所で、さらに別の発症者便1件は新潟県保健環境科学研究所で検査が実施されていた。これら9株の黄色ブドウ球菌の性状を表に示す。おにぎ

りから検出された2株（表中No. 1, 2）と従業員手指ふきとり液及び発症者便から検出された2株（表中No. 7, 8）がコアグラゼIV型、エンテロトキシンA型と一致した。またこれらの菌株は、分離培地（エッグヨーク培地）の性状で卵黄反応は見られたが、マンニット非分解性でコロニーの黄色色素も薄く、黄色ブドウ球菌の典型的な性状を示していないという点でも一致した。

以上のことから、この菌株を原因菌とする食中毒と断定した。

### 材料および方法

#### 1. 材料（使用菌株）

食品由来（おにぎりから2株、唐揚げから1株）の3株、従事者手指ふきとり由来3株、調理用具等ふきとり由来1株、発症者便（新潟市衛生試験所にて分離）由来の2株の計9株を使用した。

#### 2. 方法

菌液 100 $\mu$ L に Lysozyme / Lysostaphin 液（25mg/mL / 2mg/mL）4 $\mu$ L と、溶解した1% SeaKem Gold Agarose 100 $\mu$ L を加えて固めた。

表 分離された黄色ブドウ球菌の性状

	エンテロキシン	コアグラゼ型 (デカ生研)	培地の性状(エッグヨーク培地)		黄色ブドウ球 菌数
			卵黄反応	マンニット	
1 おにぎり(梅)	A	IV	+	-	1.1 $\times$ 10 <sup>9</sup> /g
2 おにぎり(昆布)	A	IV	+	-	6.6 $\times$ 10 <sup>9</sup> /g
3 からあげ	-	III	+	+	1.5 $\times$ 10 <sup>3</sup> /g
4 従業員手指ふきとり液	-	III	+	+	1.4 $\times$ 10 <sup>3</sup> /ml
5 従業員手指ふきとり液	-	不明	+	+	4.9 $\times$ 10 <sup>3</sup> /ml
6 冷凍庫取っ手ふきとり液	-	III	+	+	9.0 $\times$ 10 <sup>10</sup> /ml
7 従業員手指ふきとり液	A	IV	+	-	5.1 $\times$ 10 <sup>4</sup> /ml
8 発症者便(新潟市衛生試験所)	A	IV	+	-	
9 発症者便(新潟市衛生試験所)	D	II	+	+	

8, 9 は同一発症者由来

0.5M EDTA 1 mLと Lysozyme /Lysostaphin 液 40 $\mu$ L の中に固まったプラグをいれ、37 $^{\circ}$ C で1時間処理後、液を吸い取り TE buffer で洗淨した。それから proteinase K 液 (proteinase K を N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA で溶解) の中にいれ、50 $^{\circ}$ C で一晩処理・洗淨後、制限酵素で切断した。

制限酵素は *Sma*I (20units) を使い、泳動条件は電圧 6V/cm, パルスタイム 5.3~34.9 秒, 泳動時間 19 時間, バッファー温度は 14 $^{\circ}$ C とした。

なお, DNA サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた。

### 結果

PFGE パターンを図に示す。食品由来 (おにぎり) の 2 株, 従事者手指ふきとり由来の 1 株, 発症者便由来 (新潟市衛生試験所にて分離) の 1 株が同一パターンを示した。

### 考察

生化学的性状の他, PFGE 法によっても発症者便由来株 (図中 8) の DNA 切断パターンがおにぎり梅・昆布及び従業員手指ふきとり液由来株 (図中の 1, 2, 7) と一致し, これら 4 株は同一である可能性が高いと考えられた。よって, DNA 解析上からもおにぎりが原因食品と強く疑われ, DNA 解析が疫学調査の有効な裏付けとなった。

この事例の原因食品であるおにぎりは, 当日 11 時 30 分頃製造され, 納品するまで室温放置されていた。また, 納品後も祭り事務局において室温に放置され, 17 時~22 時にかけて喫食された。さらに, 唐揚げや従業員の手指ふきとり液等からも黄色ブドウ球菌が検出されるなど, 営業者側の衛生管理の不備が今回の事例の発生原因として考えられた。

今回行った黄色ブドウ球菌の PFGE 法は, Lysozyme /Lysostaphin 液をプラグ中にも入れることで, 処理時間を 1 時間と短くする事が可能であった。これにより, 大腸菌等グラム陰性菌と同じ日数で結果を得ることが出来る。今後も様々な菌株・方法で PFGE を行い, 有用性が得られれば報告したい。

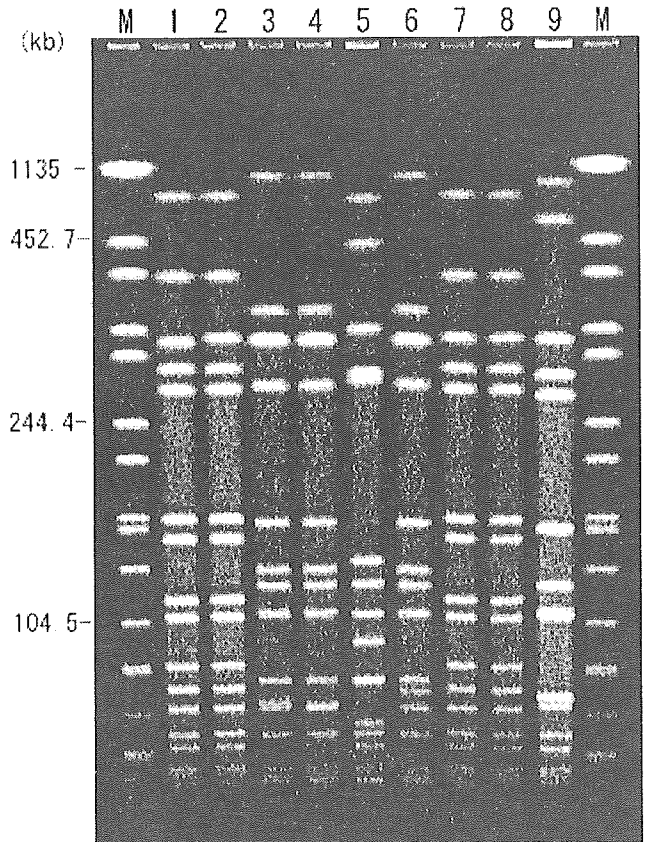


図1 黄色ブドウ球菌の *Sma*I による PFGE パターン

- 1 おにぎり(梅)
  - 2 おにぎり(昆布)
  - 3 唐揚げ
  - 4 従業員手指ふきとり液
  - 5 従業員手指ふきとり液
  - 6 冷蔵庫取っ手ふきとり液
  - 7 従業員手指ふきとり液
  - 8 発症者便(新潟市衛生試験所)
  - 9 発症者便(新潟市衛生試験所)
- ※ 8、9 は同一発症者

# 北海道日高支庁で発生した集団 O157 症

北海道立衛生研究所

木村浩一、伊東拓也、合田悟、長野秀樹

## <事例概要>

2005年6月21日、北海道日高支庁管内の老人施設で、入所者からO157症の患者1名が発生した。その後の患者発生数は、22日に4名（うち2名死亡）、23日に9名（うち2名死亡）、24日に7名、25日2名、26日に1名、27日に1名、7月3日に1名となり、合計26名からなる集団発生となった。患者の内訳は、入所者24名、職員1名、および職員家族1名であった。入所者のうち、22日発症の2名と23日発症の2名が、発症後3～9日後に死亡した。

## <検査結果と考察>

当該施設の入所者、職員、職員家族の全員に対し便検査を施行した結果、患者全員を含む42名から腸管出血性大腸菌 O157:H7 (VT1+, VT2+) を検出した。北海道立衛生研究所にて PFGE 解析を行った結果、42名中、40名から検出された菌株については観察される PFGE パターンが完全に一致した。また、残り2名から検出された菌株の PFGE パターンは互いに一致し、他40名の菌株と類似度97.3%であった。なお、先の40名中1名からは、PFGE パターン類似度90%の菌株も同時に検出された（図1、表1）。

患者発生のパターンから、食材を介した食中毒の可能性が強く疑われ、所轄管内保健所によって施設で保存されていた食材の検査を行ったが、大腸菌 O157 は検出されなかった。この結果を受け、原因究明専門委員会は、7月8日に残りの食材すべてを北海道立衛生研究所にて再検査することを決定したが、同研究所での検査でも大腸菌 O157 は検出されなかった。このため、7月29日に開かれた同委員会において、今回の集団発生は、原因は特定出来なかったが、食材を介した集団発生を疑うとの結論となった。

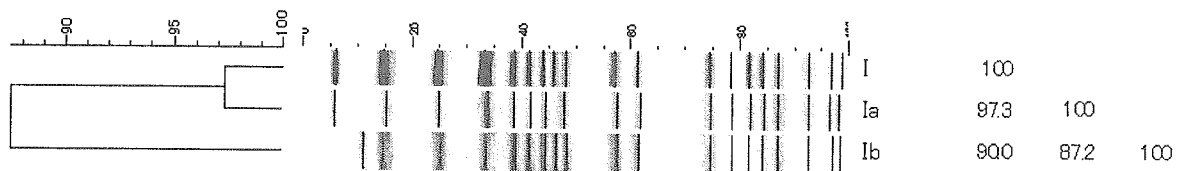


図1 北海道日高支庁で発生した集団 O157 症の代表的 PFGE パターン