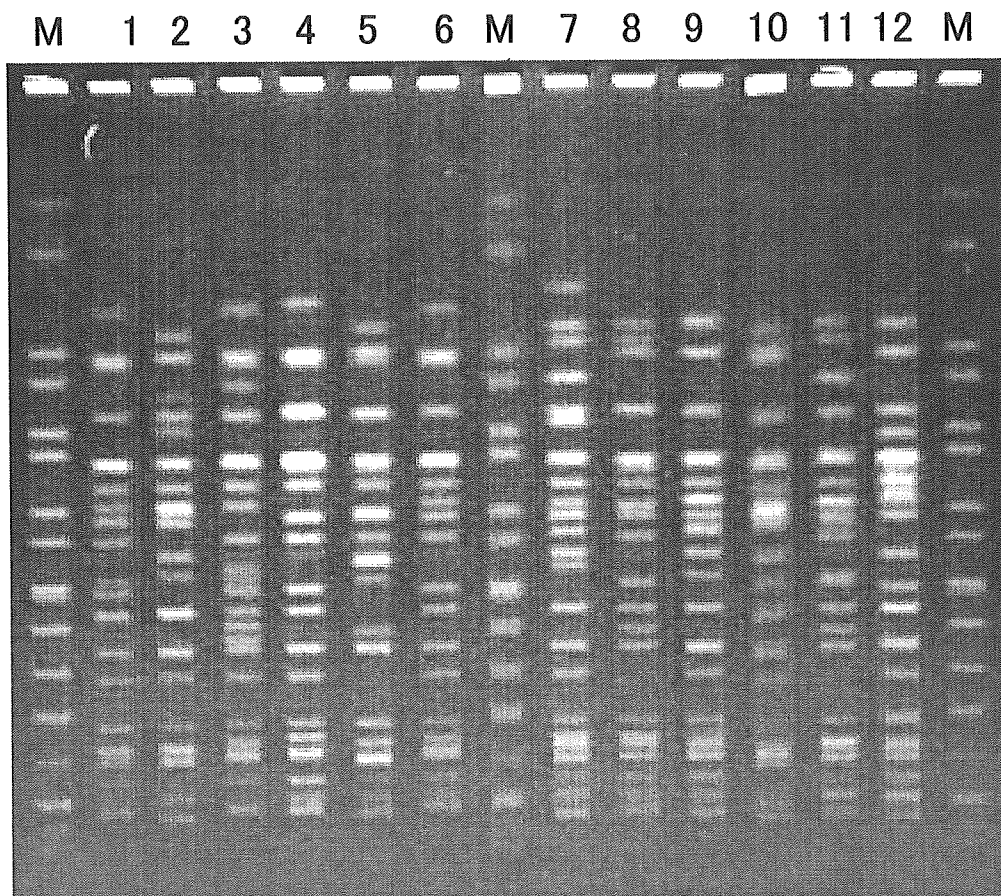


埼玉県衛生研究所（散発事例）



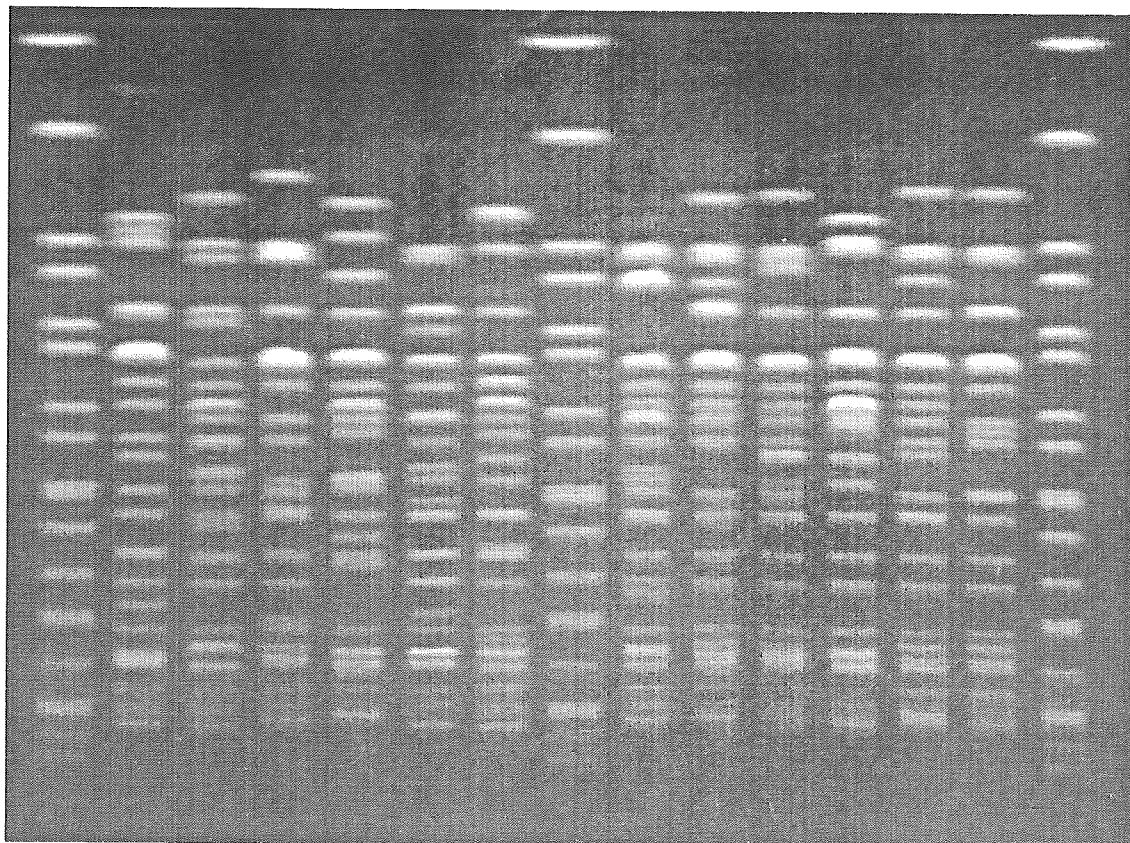
2005年に分離されたSTEC O157:H7のPFGEパターン

レーン No.	菌株No.	パターン No.	性	年齢	発症日	毒素型
1	EC05008	0502	男	7	5月22日	VT1&2
2	EC05009	0503	女	44	5月18日	VT1&2
3	EC05033	0507	男	11	6月22日	VT1&2
4	EC05042	0513	女	4	7月2日	VT1&2
5	EC05044	0514	女	31	なし	VT1&2
6	EC05052	0515	男	4	7月8日	VT1&2
7	EC05064	0518	女	22	7月21日	VT1&2
8	EC05038	0510	男	31	7月5日	VT2
9	EC05059	0517	男	29	なし	VT2
10	EC05081	0522	女	31	なし	VT2
11	EC05097	0525	男	35	8月18日	VT2
12	EC05135	0536	女	2	12月8日	VT2

千葉県衛生研究所

腸管出血性大腸菌O157

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

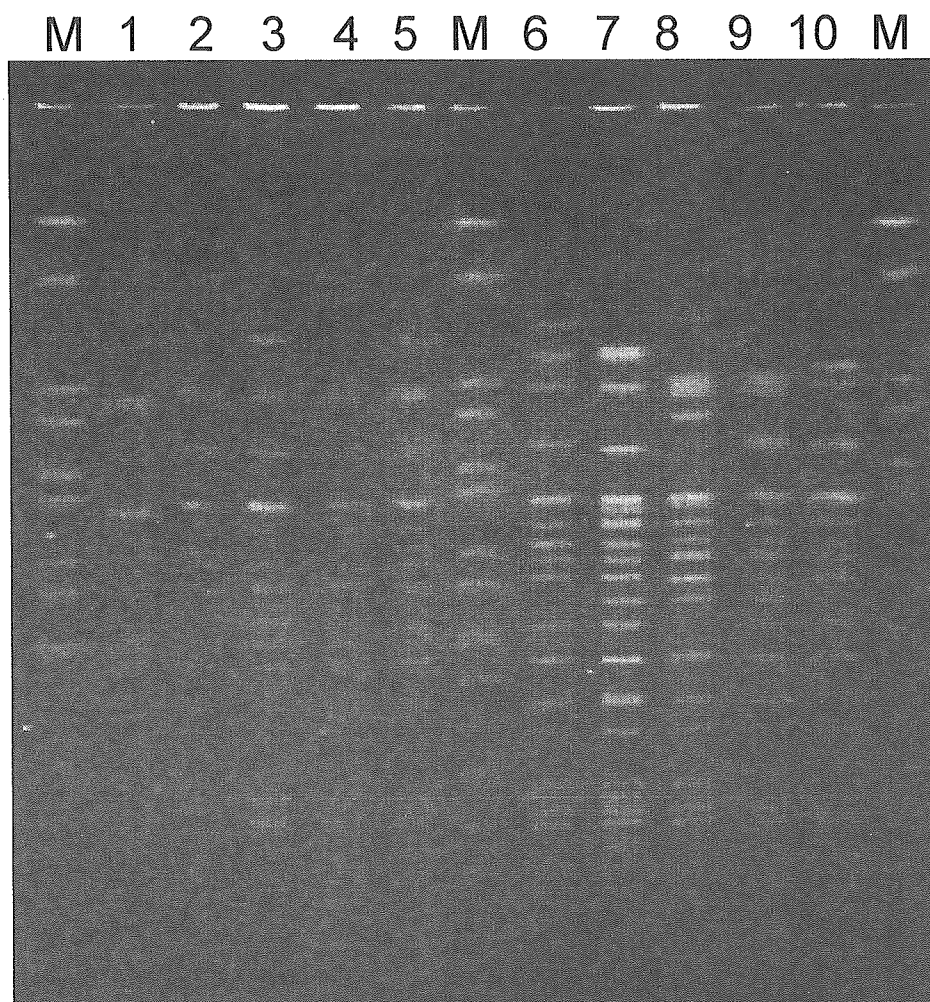


- Lane1,8, 15; マーカー
- Lane2;CEC05010(VT1&2, 散発)
- Lane3;CEC05034(VT2, 散発)
- Lane4;CEC05039(VT1&2, 散発)
- Lane5;CEC05042(VT2, 散発)
- Lane6;CEC05063(VT2, 散発)
- Lane7;CEC05066(VT2, 散発)
- Lane9;CEC05072(VT1&2, 集団)
- Lane10;CEC05097(VT1&2, 散発)
- Lane11;CEC05119(VT1&2, 集団)
- Lane12;CEC05137(VT2, 散発)
- Lane13;CEC05138(VT1&2, 散発)
- Lane14;CEC05142(VT2, 散発)

制限酵素 *Xba* I

神奈川県衛生研究所

腸管出血性大腸菌O157



レーン1~5:O157(VT1+VT2)

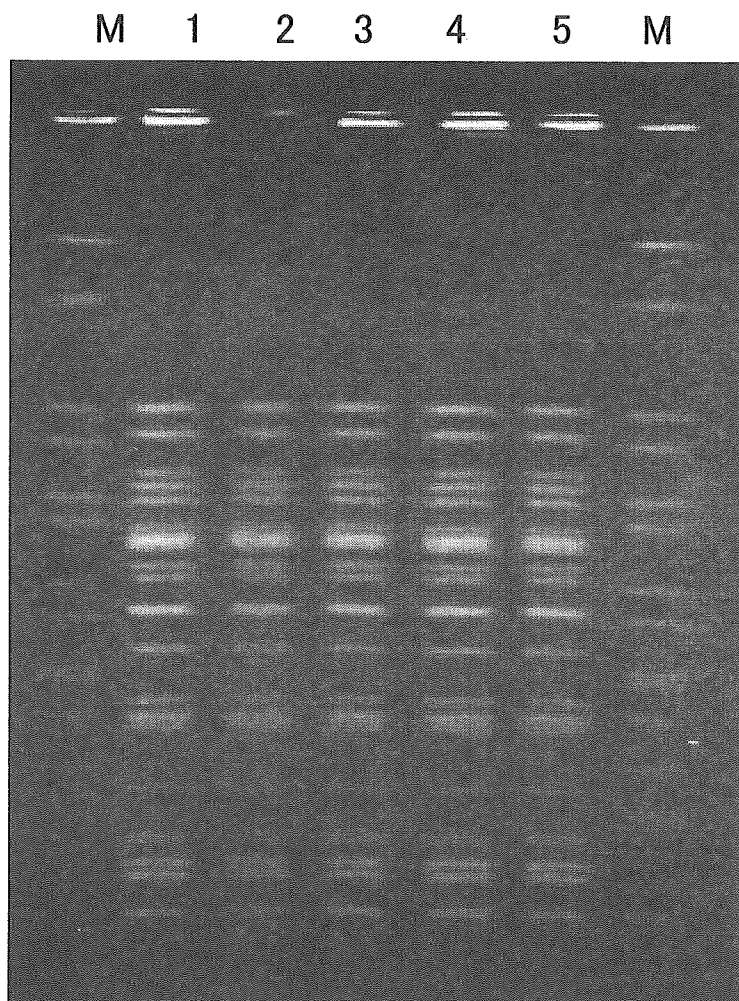
レーン6~10:O157(VT2)

神奈川県で分離された散発事例由来EHEC O157株のPFGEパターン

神奈川県衛生研究所

腸管出血性大腸菌O26による感染症事例(2005年)

平成17年7月、腸管出血性大腸菌O26:H11(stx1)による患者発生届出(①例)があった。その数日後、患者と同保育園に通院する保育園児からも同菌が検出され患者発生届出(②例)は計2名となったため、通園していた保育園および家族検便を実施した。検査の結果、保育園の他の園児、職員および給食等の検食からは菌が検出されず、②例の患者家族3名(母、祖母、祖父)より同菌が検出された。患者2名および患者家族3名のXba IによるPFGEパターンは一致していた。患者の感染源、感染経路は不明であったが、家族は患者からの二次感染が疑われた。



- 1 : KE-1509 (患者①)
- 2 : KE-1515 (患者②)
- 3 : KE-1521 (患者②の母)
- 4 : KE-1522 (患者②の祖母)
- 5 : KE-1523 (患者②の祖父)
- M : S.Branderup

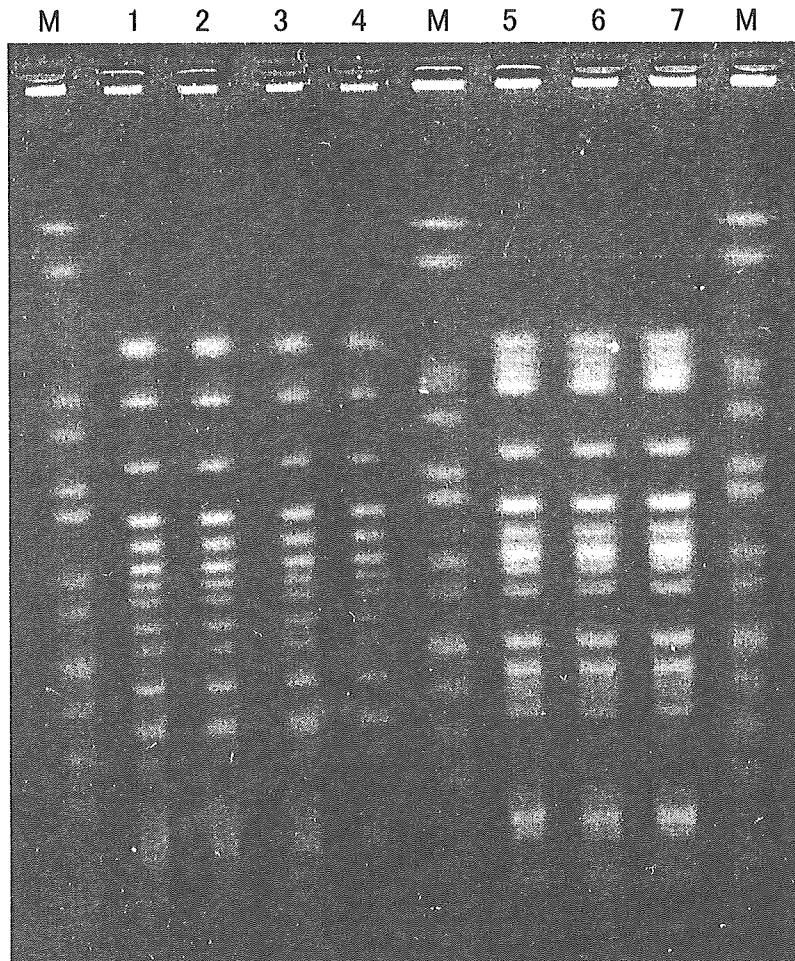
横浜市衛生研究所

事例1

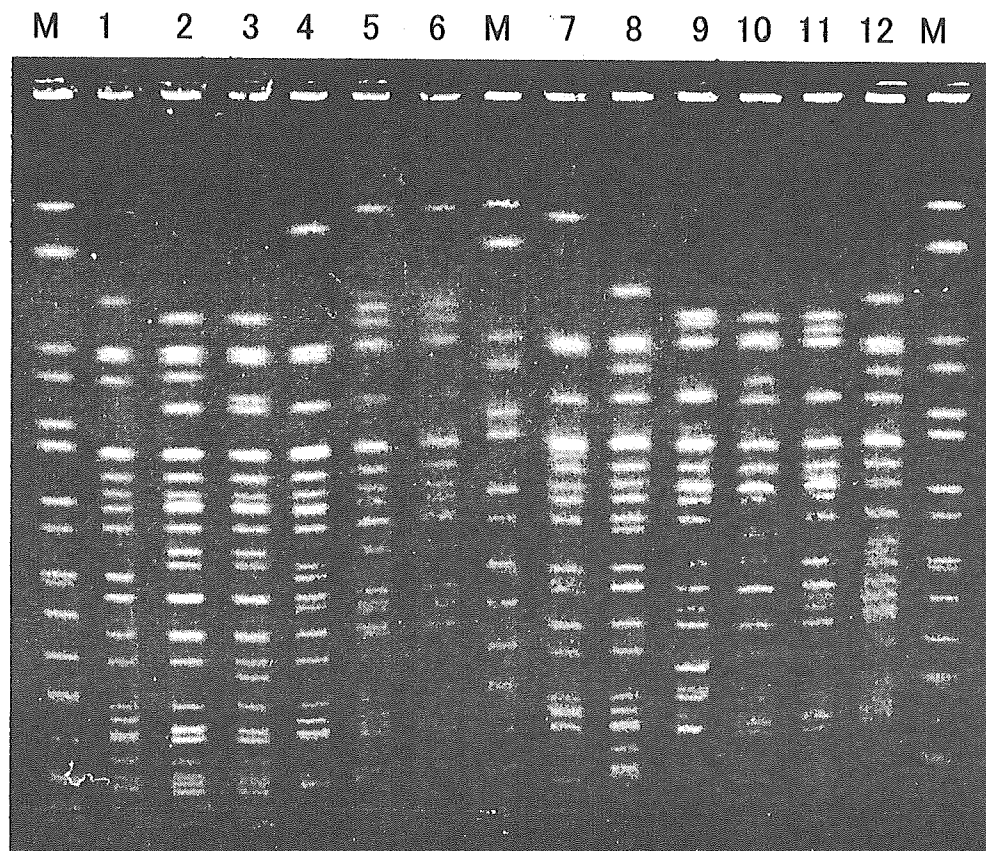
7月に焼肉店で喫食した家族で、市内の医療機関からO157:H7,VT2の届出があり、その家族の検便、喫食調査が行われた。その結果家族2名からO157:H7,VT2が検出された。焼肉店の食品、フキトリ検査からは同一菌は検出されなかったが、従業員の検便の結果、1名からO157:H7,VT2が検出された。この事例から分離された4株とも同一のPFGE泳動パターンを示した(レーン1~4)

事例2

11月に市内の医療機関からO157:H7,VT2の届出があり、その家族の検便、喫食調査が行われた。家族1名の検査から、O157:H7,VT2が検出された。この家族は焼肉店で喫食していたが、この焼肉店の食品、フキトリ検査からは同一菌は検出されなかった。しかし、同時期に同区の他の医療機関からO157:H7,VT2の届出があり喫食調査の結果、同じ焼肉店を利用していることが判明している。3株のPFGE解析の結果同一のパターンを示した(レーン5~6)。

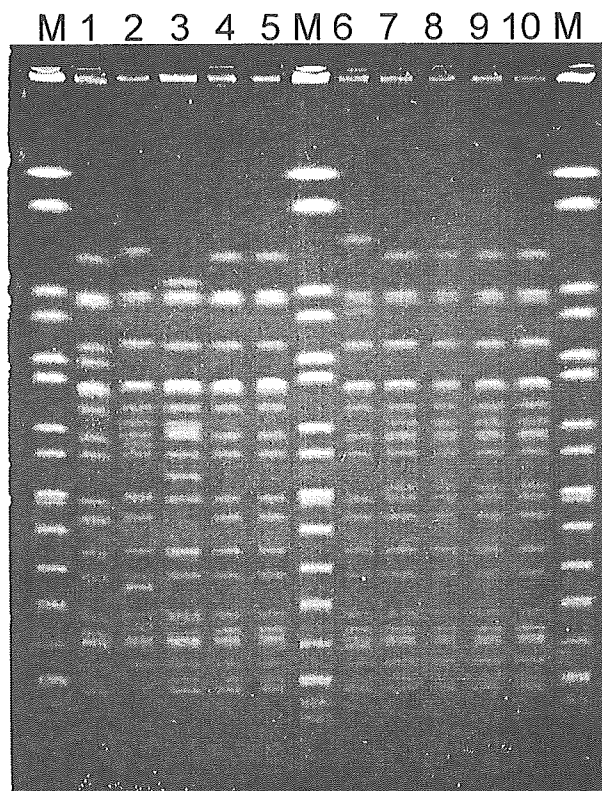


横浜市で分離されたEHEC O157散发事例由来株のPFGEパターン



レーン1: O157:H7, VT1 & 2
2: O157:H7, VT2
3: O157:H7, VT2
4: O157:H7, VT1 & 2
5: O157:H-, VT1 & 2
6: O157:H-, VT1 & 2
7: O157:H7, VT1 & 2
8: O157:H7, VT1 & 2
9: O157:H7, VT2
10: O157:H7, VT2
11: O157:H7, VT2
12: O157:H7, VT2

山梨県衛生公害研究所



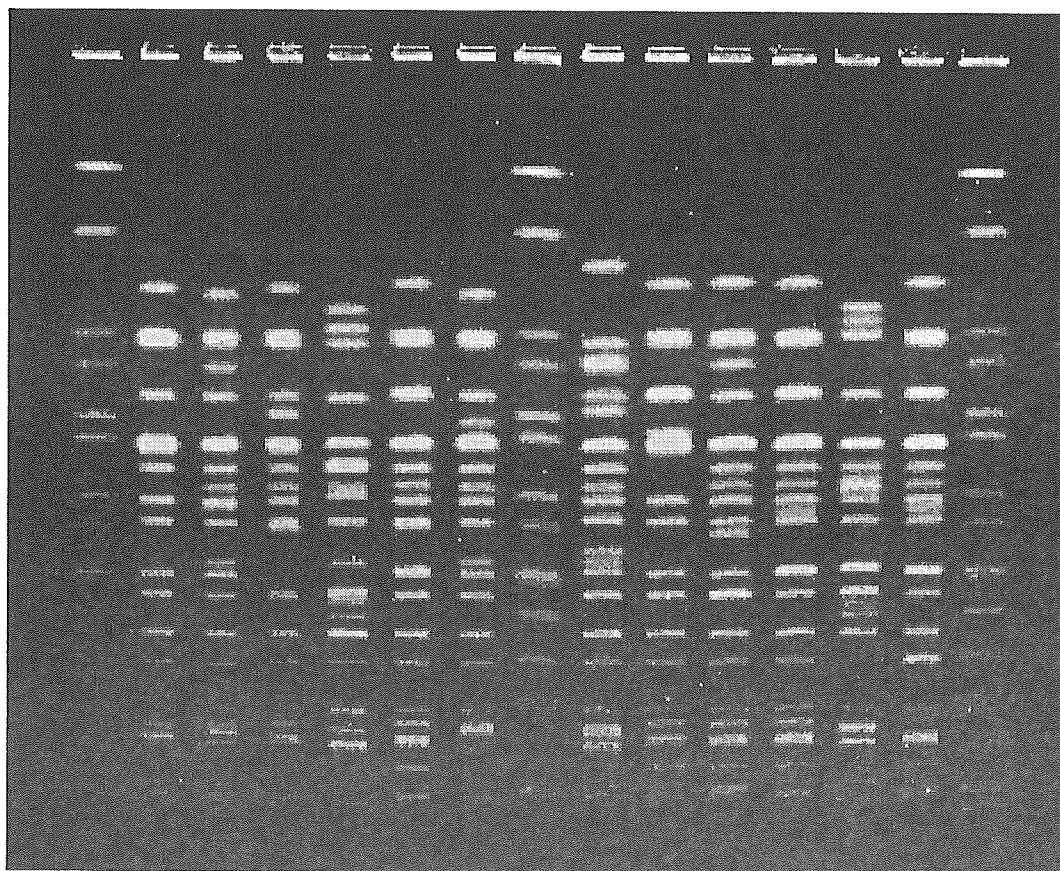
- レーン1: 散発事例由来株
- 2: 散発事例由来株
- 3: 散発事例由来株
- 4~5: 同一グループ由来株
- 7~10: 同一家族由来株

山梨県で分離されたEHEC O157:H7 (VT1+VT2) 株の
PFGEパターン

長野県環境保全研究所

腸管出血性大腸菌O157(散発事例由来株)

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



レーン No	検出日	年齢	性別	血清型	VT1	VT2
1	H17. 6. 1	6	女性	O157:H7	+	+
2	H17. 6. 21	13	男性	O157:H7	+	+
3	H17. 7. 26	58	女性	O157:H7	+	+
4	H17. 7. 30	10	女性	O157:H7	+	+
5	H17. 8. 16	66	女性	O157:H7	+	+
6	H17. 8. 27	9	女性	O157:H7	+	+
7	H17. 9. 1	75	女性	O157:H7	+	+
8	H17. 9. 17	1	女性	O157:H7	+	+
9	H17. 9. 23	15	女性	O157:H7	+	+
10	H17. 9. 11	28	女性	O157:H7	+	+
11	H17. 10. 12	7	男性	O157:H7	-	+
12	H17. 10. 14	1	女性	O157:H7	+	+

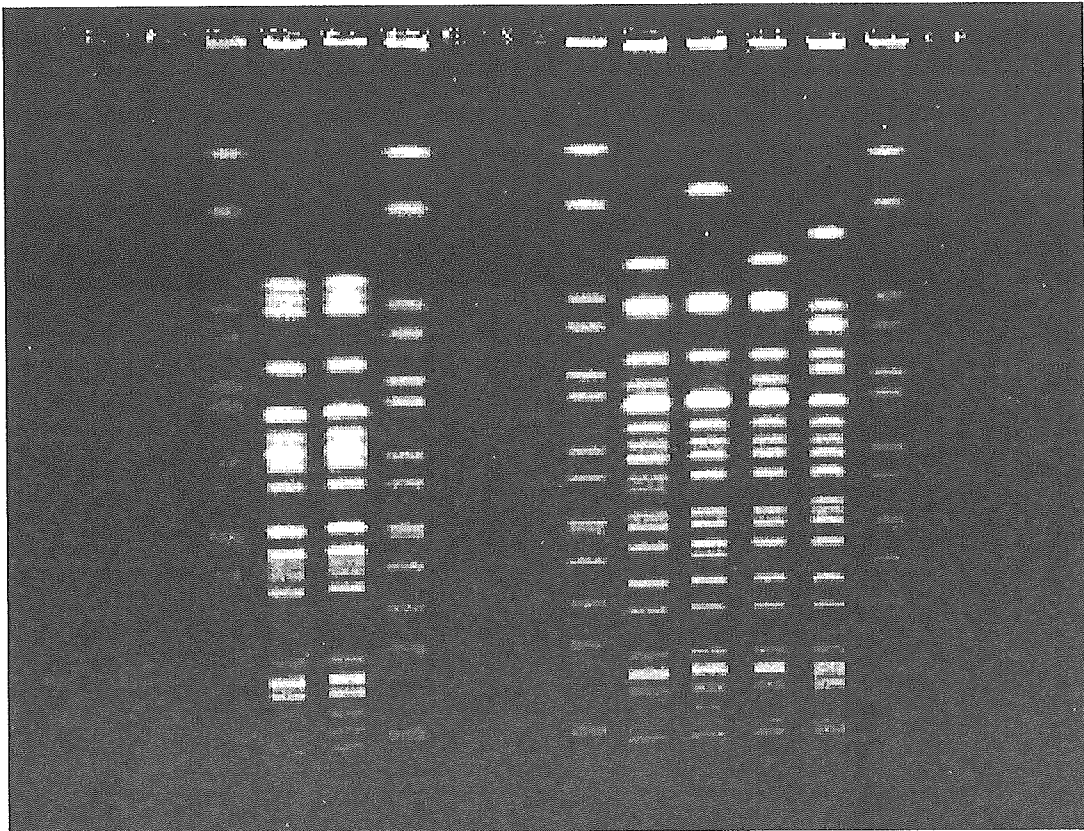
M: マーカー *Salmonella* Braenderup H9812

泳動条件: 6V/cm 2.2sec~54.2sec 20時間

buffer温度 12°C

腸管出血性大腸菌O157(集団事例由来株)

M 1 2 M M 3 4 5 6 M



M: マーカー *Salmonella* Braenderup H9812

泳動条件: 6V/cm 2.2sec~54.2sec 20時間

buffer温度 12°C

事例1

レーン1: 患者1

レーン2: 患者2

事例2

レーン3: 患者1

レーン4: 患者1家族 保菌者

レーン5: 患者2

レーン6: 患者2家族 保菌者

事例1および事例2

2事例共に患者の住所は市町村が異なり、接触歴なし

感染者単発あるいは患者家族に保菌者がいることが判明

2事例のPFGE結果はそれぞれの患者で一致し、家族では数本のバンドが異なっていた

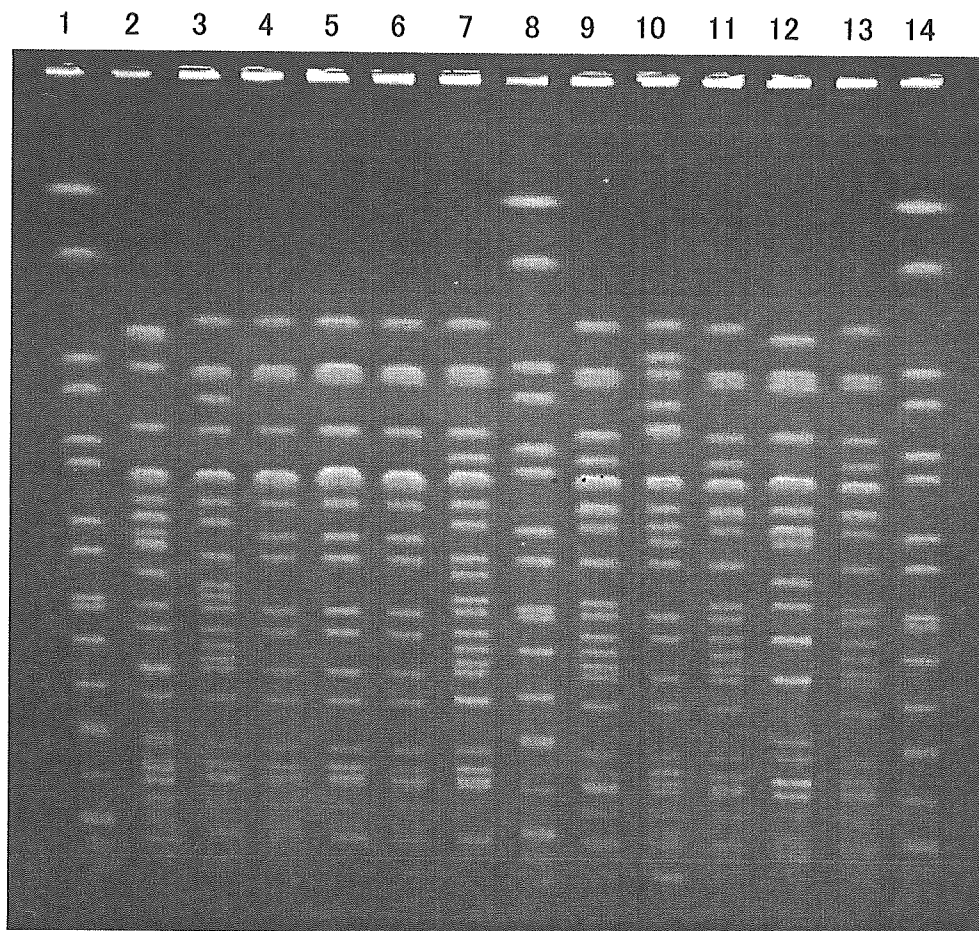
2事例共に外食で同時期に同じ焼肉店を利用しているが他に苦情がなく、原因施設の疑いとしての踏み込んだ調査ができない

外食以外は自宅の食事でメニューが思い出せないことが多く、食材はスーパーで購入しているから他に苦情はなし

このような経過で、飲食との因果関係が不明のまま、感染症で終わった。

静岡県環境衛生科学研究所

静岡県分離株(O157:H7)のPFGE画像



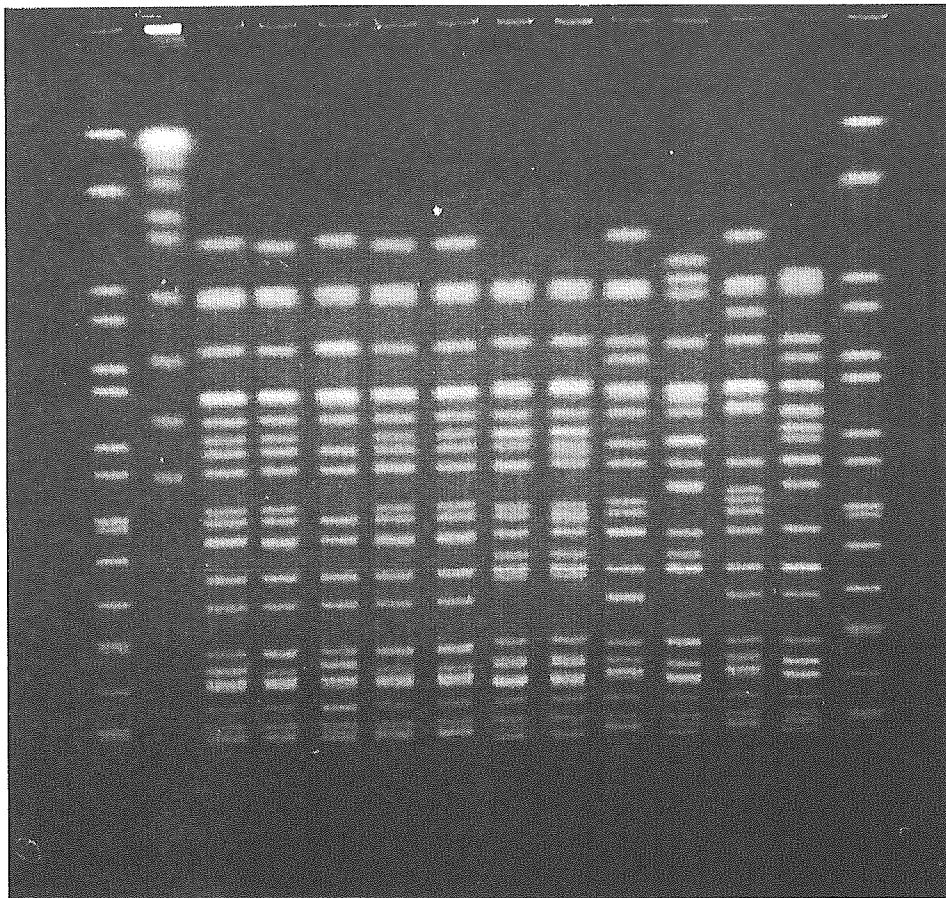
- 1,8,14レーン : DNAサイズマーカー (*S. Braenderup* H9812)
- 2レーン : S05066 (VT2)
- 3レーン : S05079 (VT1+VT2)
- 4レーン : S05080 (VT1+VT2)
- 5レーン : S05081 (VT1+VT2) S05080の家族
- 6レーン : S05082 (VT1+VT2) S05080の家族
- 7レーン : S05094 (VT1+VT2)
- 9レーン : S05095 (VT1+VT2) S05094の家族
- 10レーン : S05096 (VT1+VT2)
- 11レーン : S05097 (VT1+VT2)
- 12レーン : S05118 (VT2)
- 13レーン : S05126 (VT1+VT2)

東京都健康安全研究センター

東京都内および神奈川県内の系列店Bで発生したEHEC食中毒事例 (2005年6月)

5月21日及び22日に、同じ営業者の焼肉チェーン店を利用した3組6名(別グループ)から腸管出血性大腸菌O157(VT1,2)が検出された。PFGE解析の結果、3名のPFGEパターンが一致したことから、同一チェーン店で発生した食中毒と断定した。チェーン店で提供された牛レバーは、関連施設で下処理後牛レバ刺し用として提供されており、加工日が同一であった可能性が示唆された。

M M 1 ② 3 ④ ⑤ 6 7 8 9 10 11 M

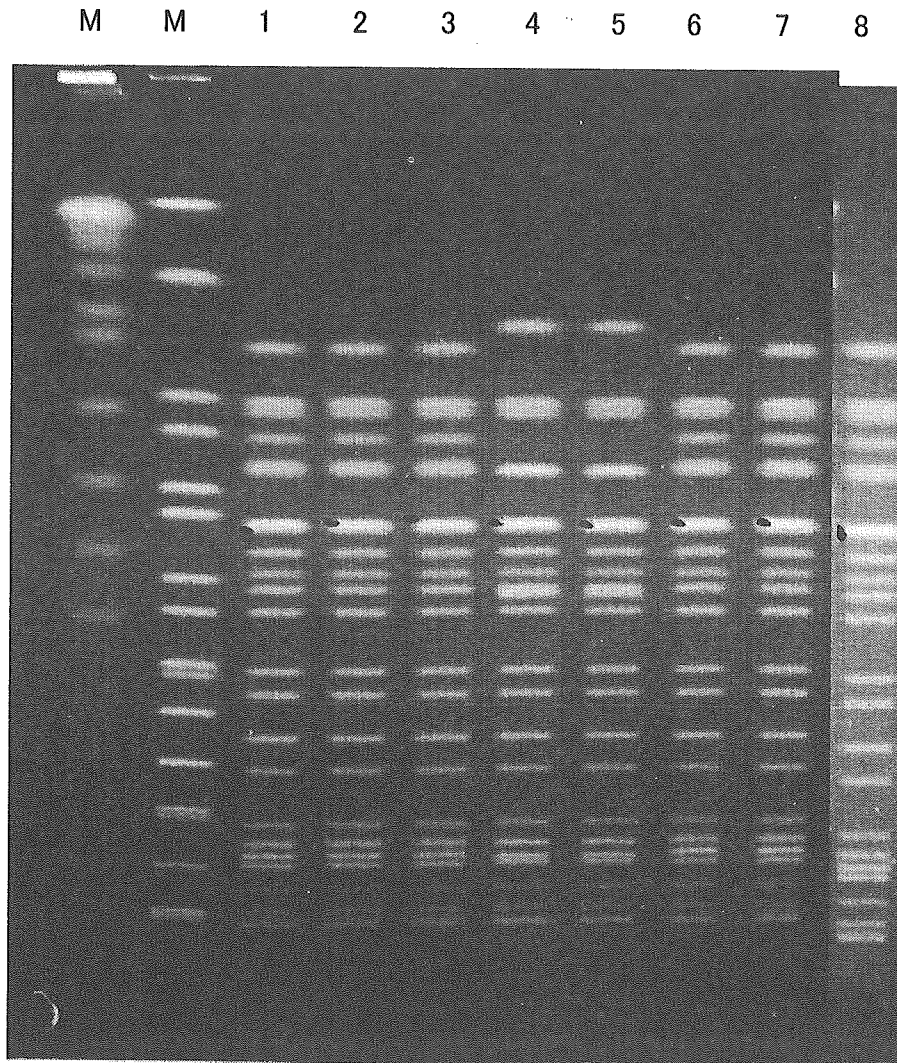


- 1. 2004年分離株
- ②. 患者No.16(八王子市)
- 3. 散発事例由来
- ④. 患者No.238(川崎市)
- ⑤. 患者No.239(川崎市)
- 6. 散発事例由来
- 7. 散発事例由来
- 8. 散発事例由来
- 9. 散発事例由来
- 10. 散発事例由来
- 11. 散発事例由来

レーン1~10:
O157(VT1+T2)
レーン11:O157(VT2)

東京都内S苑で発生した腸管出血性大腸菌O157事例(2005年8月)

8月17日に飲食店で焼肉等を喫食した2家族5名(No.85、86及び200並びに201及び202)から腸管出血性大腸菌O157(VT1,2)が検出された。発症者5名のPFGEパターンが一致したことおよび患者の共通食が当該飲食店のみであり、互いに生活圏も異なっていたことから、本件は食中毒と断定された。その後、8月11日に当該飲食店を利用した患者1名(No.164)から分離されたO157のPFGEパターンが一致したことから、本件の患者は6名となった



1. 患者No.85
2. 患者No.86
3. 患者No.200
4. 牛刺し用まな板(拭き取り由来株)
5. まな板由来株
6. 患者No.201
7. 患者No.202
8. 患者No.164 (都内C区)

O157:H7(VT1+VT2)

PFGE型

患者由来株: T-0506d

拭き取り由来株:T-0510c

サルモネラ食中毒事例へのPFGE解析の応用例

1. *Salmonella* Montevideo による集団食中毒(千葉県衛生研究所)
2. 2005年7月に発生したサルモネラ血清型Enteritidis 食中毒事例(1) (東京都健康安全研究センター)
 - ・「ドレッシング」を原因とした食中毒事例
3. 2005年7月に発生したサルモネラ血清型Enteritidis 食中毒事例(2) (東京都健康安全研究センター)
 - ・「うなぎの厚焼き玉子」が原因食品と推定された食中毒事例
 - ・仕出し弁当を原因とした食中毒事例

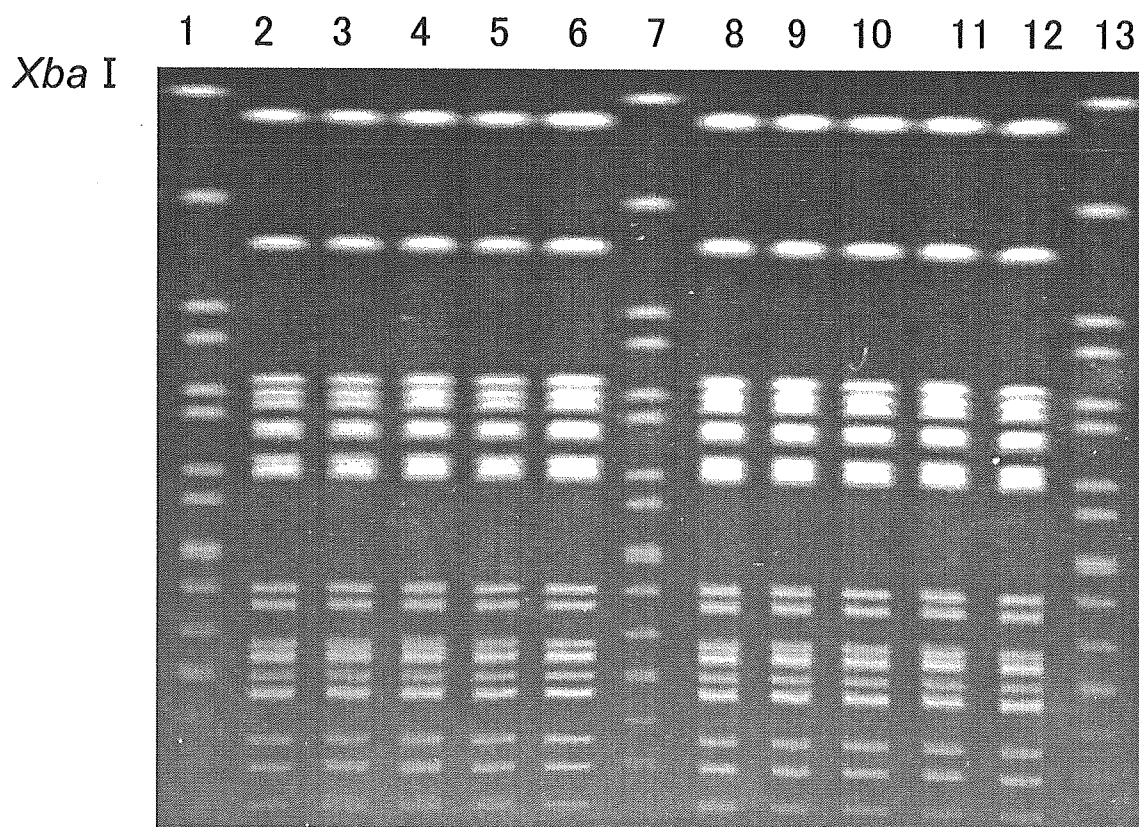
千葉県衛生研究所

Salmonella Montevideo 集団食中毒

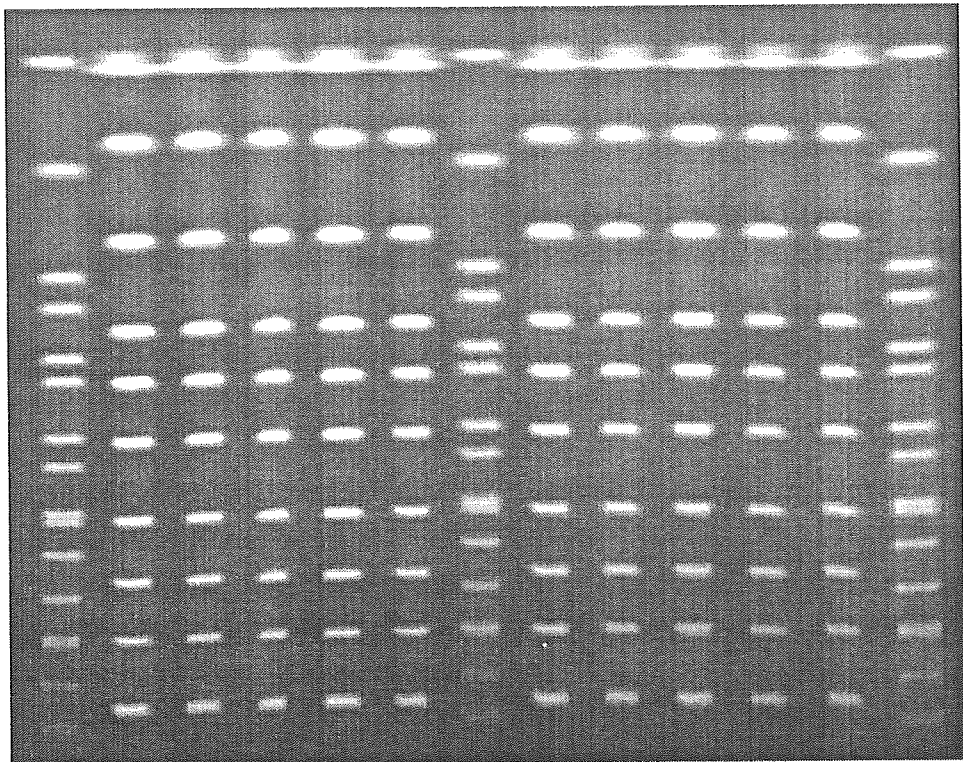
Salmonella Montevideoによる集団食中毒の概要

平成17年8月初旬、うなぎ店で会食した3家族9人のうち5人が翌日から発熱、下痢、腹痛等の食中毒症状を呈した旨の届け出があった。有症者5人の検便の結果、3人から*S. Montevideo*が検出された。また、うなぎ店の従業員3人、うなぎ店自家製の漬物2種、うなぎおよびまな板のふき取り検体から*S. Montevideo*が検出された。合計10株のPFGEパターンは全て一致した。

当うなぎ店は3日間の営業停止処分を受け、食中毒の発生が公になったことから、さらに35人から発症の届け出があった。



Bln I 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



- Lane1, 7, 13; マーカー
- Lane2; 患者1
- Lane3; 患者2
- Lane4; 患者3
- Lane5; 従業員1
- Lane6; 従業員2
- Lane8; 従業員3
- Lane9; 食品1
- Lane10; 食品2
- Lane11; まな板
- Lane12; 食品3

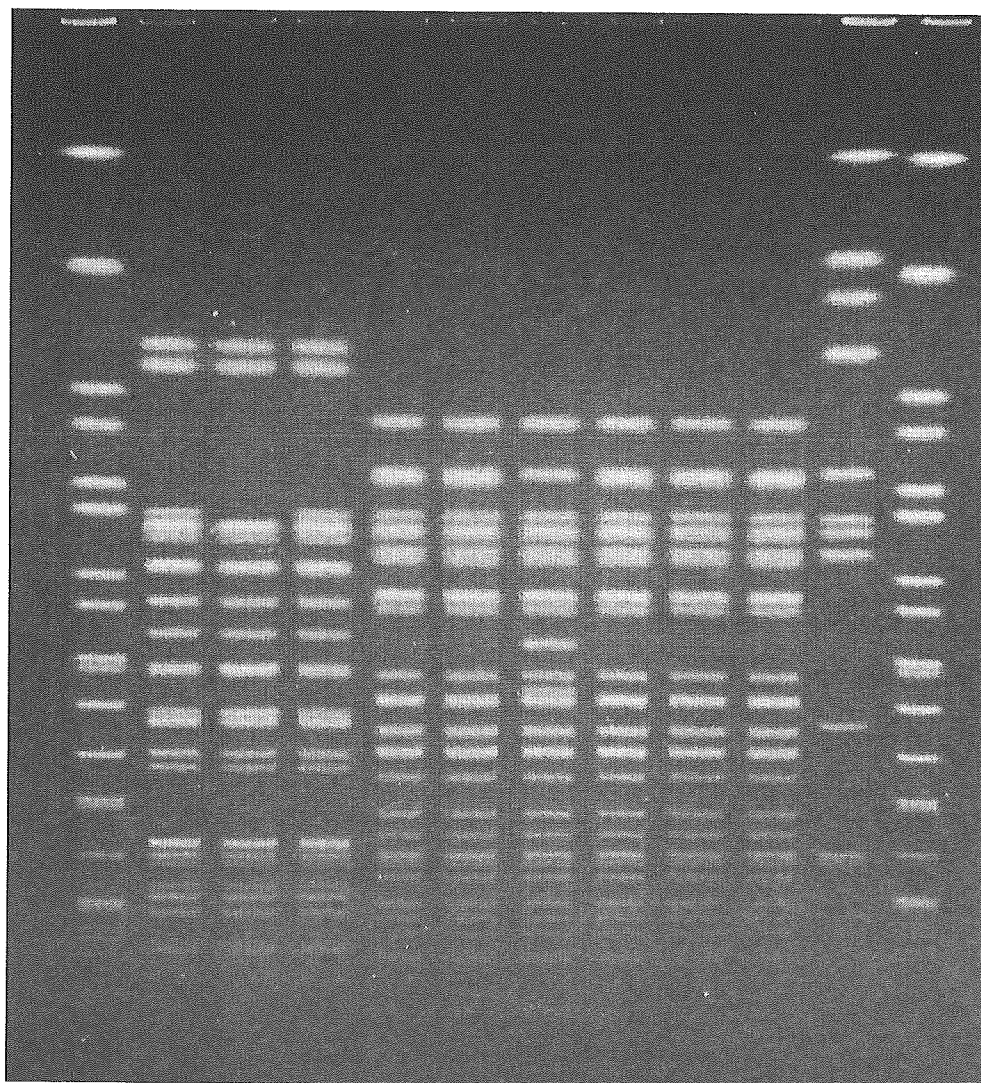
東京都健康安全研究センター(写真1)

2005年7月に発生したサルモネラ血清型Enteritidis 食中毒事例(1)

事例2

7月6日及び8日に飲食店で食事をした3グループ9名のうち8名が発症し、患者4名から*S. Enteritidis*を検出した。また、同飲食店が製造した「ドレッシング」を購入し喫食した家庭6名も同様の症状を呈し、検便の結果、同血清型菌が検出された。更に患者宅に残されていた「ドレッシング」からもSEを検出した。喫食調査および検出されたSEのPFGEパターンが一致したことから「ドレッシング」が原因である食中毒事例と断定された。

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



1～3. 事例1 患者

4～9. 事例2

4. 患者No.91

5. 患者No.92

6. 患者No.93

7. 患者No.94

8. ドレッシング(残品)

9. ドレッシング(残品)

10: 鶏肉由来株(別事例)

制限酵素: *Bln* I

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・平成17年度東海・北陸地方8地方衛生研究所と豊田市衛生検査所による腸管出血性大腸菌 O157 を用いたパルスネット構築のための精度管理

主任研究者	寺嶋 淳	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
研究協力者	鈴木匡弘	愛知県衛生研究所
	倉本早苗	石川県保健環境センター
	白木 豊	岐阜県保健環境研究所
	田中保知	岐阜市衛生試験所
	田中大祐	富山県衛生研究所
	石畝 史	福井県衛生研究所
	岩出義人	三重県科学技術振興センター保健環境研究部
	藪谷充孝	名古屋市衛生研究所
	奥村貴代子	豊田市衛生試験所

研究要旨

「パルスネットジャパン」構築のための準備活動として東海・北陸地方8地方衛生研究所（地研）と豊田市衛生検査所（豊田市）による腸管出血性大腸菌 O157 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）精度管理を実施した。平成15年度及び16年度の何れかまたは両年に使用した2検体（検体番号3，4）について、これら9施設がサルモネラマーカの使用と泳動条件は統一して、その他の PFGE 実施条件は各施設によって感染研もしくはそれに類似した条件で実施した。その結果、得られた9施設全ての泳動図は解析ソフトによる解析が可能な良好な画質であった。これら泳動図について解析ソフトを用いて検討したところ、2検体とも同一検体が同一クラスターを形成した。検体3の施設間の相同性は、平成17年度は78.6%であり、平成15年度の89.2%よりは低かったものの平成16年度の76.4%よりは高い値となった。検体4に関しては、平成17年度は87.8%と非常に高率で、平成16年度の82.4%より高い値となった。

以上の結果から PFGE 実施条件のうち DNA 調製等の相違は PFGE 泳動図の相同性の向上に大きな影響を及ぼさず、平成15，16年度と同様にマーカと泳動条件の統一が東海・北陸地方各施設が実施した PFGE 泳動図の相同性を76%以上の高率に保つことに重要であると思われた。

A. 研究目的

我が国では、0157 による diffuse outbreak (散在的集団発生) を迅速に検出するためのシステムである「パルスネットジャパン」稼働のため、国立感染症研究所 (感染研) と全国の各地域ブロック代表の 5 地方衛生研究所 (地研) が協力して平成 15 年度より研究班活動を行なっている。研究班活動の結果などを基に構築される「パルスネットジャパン」では、各地研が都道府県内で検出された 0157 についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行ない、その泳動図を感染研に電送し、感染研でこれら泳動図について解析ソフトを用いて比較を行なう。もし同一もしくは非常に類似した泳動図が複数の異なった都道府県から得られた場合には diffuse outbreak の発生が強く疑われ、迅速な diffuse outbreak の検出、及びその疫学情報の裏付けが可能となる。

本システムが円滑かつ信頼性を持って稼働するために最も重要な点は、「異なった地研で同一の PFGE 型の 0157 について PFGE を実施した場合、解析ソフトを用いてその泳動図を比較するとその相同性が 100% となる。」ことである。

昨年度東海・北陸ブロックでは、研究班活動の一環として 8 地研と豊田市衛生検査所 (豊田市) が参加して 0157 を用いた PFGE 精度管理を実施した。その結果、サルモネラマーカの使用及び PFGE 泳動条件の統一によって、各地研の PFGE 画質の向上、及び同一検体を用いた PFGE 解析において各施設間の相同性の向上が認められた。そこで、本年度も PFGE 画質、及び各地研間の同一検体を用いた PFGE 解析における相同性向上のため、精度管理を実施した。具体的には平成 15 年度及び 16 年度の何れかまたは両年に使用した 2 検体について PFGE 実施条件のうちサルモネラマーカの使用と泳動条件は統一して各施設で PFGE を実施した。そして、得られた泳動図を愛知県衛生研究所 (愛知衛研) にメールで電送した。愛知衛研では解析ソフトを用いてその泳動図の比較を行ない、その相同性について検討した。

B. 研究方法

菌株：散发事例 2 事例に由来する 2 株の腸管出血性大腸菌 0157 を用いた。これら菌株は、愛知県内で平成 12 年度 (愛知衛研菌株番号：2000-48)、

及び 14 年度 (2002-58) に検出されたもので、その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研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。

精度管理

[I]送付菌株

2 検体の 0157 を精度管理に用いた。検体番号 3 と 4 はそれぞれ菌株番号 2000-48、及び 2002-58 である。これら検体は平成 15 年度及び 16 年度の何れかまたは両年に使用した使用した菌株と同一である。

[II]方法

愛知衛研よりそれぞれ 2 検体を 7 地研 (石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県科学技術振興センター保健環境研究部、名古屋市衛生研究所)、それに豊田市衛生試験所 (豊田市) に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設 (仮に施設 A から I とした。) において、送付された 2 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、サルモネラマーカの使用と泳動条件は全ての施設で統一して行ない、その他の実施条件は感染研の方法 (表 1) 若しくは各施設独自の方法で実施することとした。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。また同時に PFGE 実施条件に関するアンケートも実施し、各施設の PFGE 実施条件の確認を行なった。

C. 研究結果

[I]精度管理

1. 東海・北陸地方 9 施設の PFGE 実施条件 (表 2)

泳動条件に関しては全施設統一であったが、9 施設のうち 1 施設は泳動時間が 22 時間と統一条件より 3 時間長かった。これは PFGE 機器に既にプログラムされている 0157 のプログラムを用いたためであった。しかし残りの 8 施設は感染研の統一条件を用いていた。サルモネラマーカは全ての施設で統一されていた。DNA 調製及び制限酵素

処理（表1の感染研のPFGE実施条件のCell suspension bufferからRestriction digestionに相当する）に関しては、9施設のうち3施設が感染研と全く同一の方法で行なっていた。残りの6施設うち3施設ではバイオラド社のキットを用い、3施設は感染研類似の方法を用いていた。具体的には2施設ではCell suspension bufferの項目で、感染研法（OD=0.5～0.6）より濃い菌懸濁液（OD=2程度）を用いていた。1施設では電気泳動用のアガロースがPFGE用アガロースであった。

2. 異なったPFGE型検体の各施設間での同一性の比較とその泳動図

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体3、4の泳動図の解析を行ない系統樹を作成した。

検体3（図1）に関しては9施設全体の同一性は78.6%とやや低かった。これは9施設の泳動図が2つの大きなクラスターに分かれたためと考えられ、ひとつのクラスターには8施設が含まれ、もうひとつのクラスターには残りの1施設が含まれた。しかし8施設が含まれたクラスター内の同一性は84.0%であった。またクラスター内で100%の同一性を示した泳動図は5施設と2施設の泳動図で認められた。

泳動パターンを解析してみると、8施設が含まれたクラスターに属さない1施設で高分子量領域においてバンドが1本多く認められた。平成17年度の検体3の同一性を平成15、16年度の結果と比較してみると（表3）、平成17年度は78.6%であり、平成15年度の89.2%よりは低かったものの平成16年度の76.4%よりは高い値となった。

検体4（図1）については9施設全体の同一性は87.8%と検体1に比べて高かった。9施設のうち8施設は96.0%と非常に高い同一性を示す同一のクラスターを形成していた。残りの1施設は検体3でも同一性が低かった施設であった。このクラスター内に含まれる5施設間で同一性が100%を示した。平成17年度の検体4の同一性87.8%は平成16年度の82.4%より高い値となった。

9施設の検体3、4の泳動図を図2に示した。泳動図からも分かるように、いずれの泳動図も解析ソフトを用いた解析に供するのに十分な画質であった。

D. 考察

昨年度実施した精度管理の結果からPFGE泳動図の相互比較のために最も重要と考えられる実施条件として1) シャープなバンドが安定して得られるサルモネラマーカの使用、2) PFGE泳動条件の統一の2点が挙げられた。従って、この点に留意し、平成17年度においてもサルモネラマーカの使用とPFGE泳動条件の統一を行なって精度管理を平成15年度、16年度何れか若しくは両年度と同じ検体を用いて実施した。平成15年度には参加した8施設のち1施設の泳動図が解析不能であったが、本年度の精度管理では全ての泳動図が解析ソフトを用いた解析に供するに十分な画質であった（図2）。

特に参加した9施設のうち2施設の研究協力者は本年度からのPFGE担当者であったにもかかわらず良好な結果が得られたことは、PFGEの実施条件のうち最低2点を統一すれば実施者の経験に大きく作用されることなく良好な結果を得ることが可能なことを示すものと考えられた。これは昨年度も2施設でPFGE担当者が変更になったに関わらず通年で76%以上の同一性を維持できたことから支持された。

PFGE実施条件全てを統一することが各施設間の同一性比較のためには最も望まれることであるが、東海・北陸地方では、施設によっては年間のPFGE実施回数が非常に少ないことや試薬の調製の煩雑さからDNA調製及び制限酵素処理の項目でキットを用いる施設がある（表2）。PFGE泳動条件のうち2点を統一した今年度及び昨年度の精度管理で好結果が得られたことは、東海・北陸地方各施設に感染研の統一実施条件を周知させる必要はあるものの、サルモネラマーカ使用とPFGE泳動条件の統一の2点のみでも本研究班の目的である「PFGEによる0157 diffuse outbreakの検出」に十分な泳動図の画質は得られるものと思われる。

同一性の低かった検体3では目視で確認しても1施設のバンドパターンに違いが認められた。また、当該施設以外からの泳動図においても、高分子量領域に薄いバンドが認められたり、認められない場合があり、バンドが1から2本程度異なる場合があった。平成17年度パルスネット研究班