

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 18 年度分担研究報告書

堺市におけるセレウス菌食中毒事例分離菌株の嘔吐毒産生性及び
それらの分子疫学的解析の検討

協力研究者	横田 正春	堺市衛生研究所
	大中 隆史	堺市衛生研究所
	山内 昌弘	堺市衛生研究所
	内野 清子	堺市衛生研究所
	下迫 純子	堺市衛生研究所
	中村 武	堺市衛生研究所
	田中 智之	堺市衛生研究所

研究要旨

セレウス菌の食中毒事例からの分離菌株を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による分子疫学的解析を行い、その細菌学的相同性検討における有用性を検討した。また、セレウリド合成酵素(CRS)遺伝子検出による嘔吐毒産生性のスクリーニング法についても検討した。今回の検討結果は、PFGE による分子疫学的解析は、セレウス菌食中毒事例においても分離菌株の細菌学的相同性の検討に有用であると認められた。また、PCR 法による CRS 遺伝子保有の検査は、セレウス菌の嘔吐毒産生性のスクリーニング法として有用であると考えられた。

A. 研究目的

セレウス菌による食中毒事例の発生頻度は低いものの、我が国においては毎年十数例の事例が発生している。それらの多くは嘔吐型であり、その患者数は比較的少ない小規模事例がほとんどである。一方、患者数 100 名以上の大規模事例についても、1983 年以来、ほぼ毎年1例の発生が見られる¹⁾。

集団食中毒事例においては、分離菌株の細菌学的相同性の検討が必要となる。今回、セレウス菌食中毒事例について原因菌株の細菌学的相同性検討におけるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

の有用性について検討を行った。

また、セレウス菌による食中毒事例の場合、その分離菌株について毒素産生性の検査が必要となる。最近、嘔吐毒のスクリーニング検査としてセレウリド合成酵素(CRS)遺伝子保有の有無を PCR 法により検出するためのキットが市販された。今回、CRS 遺伝子保有の有無と培養細胞による嘔吐毒産生性の結果を比較した。

B. 研究方法

1. 供試菌株について

①集団食中毒事例からの分離菌株:平成18年4月、市内医療施設の職員9名が嘔吐、腹痛等の症状を呈し、当該医療施設医師から保健所に届け出があった。保健所による調査の結果、同日、15名が市内飲食店の弁当を喫食しており、そのうちの14名が同症状を呈していることが判明した。これらの有症者に共通する食事は、先の昼食弁当のみであり、それぞれの発症状況が類似していた。これらの状況から飲食店の調整した昼食弁当による食中毒と判断された。当所においては、保健所により採取された患者の吐物、便及び食品残品等の細菌検査を実施した(表1)。

②比較対照として用いたセレウス菌株

これまでの散発発生食中毒事例の患者、従業員、検食あるいは収去食品等から分離された菌株を比較対照株として用いた(表2)。

2. 細菌培養検査

食中毒事例については、細菌性食中毒が疑われたため、黄色ブドウ球菌、サルモネラ属菌、病原ビブリオ、病原性大腸菌、腸管出血性大腸菌 O157、ウェルシュ菌、セレウス菌、カンピロバクターについて検査を実施した。検査方法は、微生物検査必携²⁾に準拠した。すなわち、黄色ブドウ球菌については食塩卵黄寒天培地(日水製薬、東京)(35℃)、サルモネラ属菌についてはSS寒天培地(極東製薬、東京)及びDHL寒天培地(日水製薬)(35℃)、病原ビブリオについてはTCBS寒天培地(栄研化学、東京)(35℃)、カンピロバクターについてはバツラー寒天培地(Oxoid Ltd., England)(42℃)、病原性大腸菌についてはDHL寒天培地(日水製薬)(35℃)、腸管出血性大腸菌 O157についてはCT-ソルビトール・マッコンキー寒天培地(栄研化学)(35℃)、セレウス菌についてはNGKG寒天培地(日水製薬)(35℃)、ウェルシュ菌についてはカナマイシン・卵黄加CW寒天培地

(日水製薬)(35℃)にて培養検査を実施した。なお、サルモネラ属菌、病原ビブリオ及びカンピロバクターの検査においては、それぞれセレナイト・シスチン培地(日水製薬)(42℃)、2%食塩加アルカリペプトン水(日水製薬)(35℃)及びPrestonブロス(Oxoid Ltd.)(42℃)による増菌培養を併用した。

分離されたセレウス菌についてはデンプン分解能及び嘔吐毒産生性について検査を行った。

3. セレウス菌の嘔吐毒産生性の検査

セレウス菌の嘔吐毒産生性は、培養細胞(HEp-2細胞)による検査³⁾を実施した。また、*Bacillus cereus* (CRS gene) Detection Kit(タカラバイオ株式会社、京都)によるCRS遺伝子の有無を検討した。

4. PFGEによるセレウス菌の分子疫学的解析

食中毒事例からの9菌株及び比較対照株としての11菌株について、Liuら⁴⁾の方法に準じてアガロース包埋、菌体の消化処理を実施し、制限酵素 *Sma*Iによる菌体DNAの処理を行った。さらに、1% SeaKem GTG Agaroseを用い、BIO-RAD CHEF DR IIIにて電気泳動を実施した。泳動条件は、2.2s-60s、14℃、20時間とした。泳動パターンの比較・解析については、Fingerprinting II (BIO-RAD)を用いた。

C. 研究結果

1. セレウス菌集団食中毒事例について

患者の吐物(1株)、便(1株)、弁当の食べ残し品(2株)、弁当のふき取り(2株)、調理環境のふき取り(3株)等からセレウス菌を検出した。なお、弁当食べ残しのやきめし及びマーゴ茄子から、それぞれ 2.0×10^7 cfu/g、 2.0×10^2 cfu/gのセレウス菌を検出した(表1)。

原因食品と考えられた「やきめし」は前日に調理され、数時間調理場内に放置されていたものであり、その後、冷蔵庫で保存し、食中毒発生の当日、再加

熱して提供されたものであった。すなわち、調理後の温度管理が不適切で、喫食までの時間も長かったという疫学的調査結果であり、セレウス菌による典型的な食中毒事例であった。

2. 嘔吐毒産生性と CRS 遺伝子の保有について

集団食中毒事例からの分離菌株及び比較対照として用いたセレウス菌株のデンプン水解能、CRS 遺伝子保有の有無及び嘔吐毒産生性について表1、2に示した。今回用いた菌株は、全てデンプン水解能陰性であった。一方、嘔吐毒産生性の菌株は CRS 遺伝子を保有していたが、嘔吐毒陰性の菌株は CRS 遺伝子を保有していなかった。

3. PFGE による分子疫学的検討(図1, 2)

集団食中毒事例由来の CRS 遺伝子保有株は、同一のパターンを示し、高い相同性(100%)を認めた。一方、比較対照として用いた散発発生の食中毒事例あるいは収去食品等から分離された分離菌株との比較では相違が明らかに認められた。比較対照に用いた菌株間においては、収去食品由来菌株(No. 10)と病原大腸菌による食中毒事例患者からの分離菌株(No. 18)は比較的高い相同性(95.46%)を認めた。また、サルモネラによる食中毒事例の患者、従業員、食品等からの分離菌株(表2)については、それぞれ異なるパターンを示し、相同性は低いものであった。

D. 考察

今回の検討において、CRS 遺伝子検出と嘔吐毒産生性の関連は非常に良好であった。一般に、嘔吐毒産生菌株はデンプン水解能陰性であるが¹⁾、嘔吐毒産生性については培養細胞等による嘔吐毒の検査が必要である。しかし、その検査については培養細胞の準備や毒素を産生させるためのセレウス菌の振盪培養等が必要であり、食中毒発生時の同時

進行的検討は負担が大きいものである。一方、PCR 法による検査は、菌株の処理等が簡易であり、数時間で結果が得られる。今回の検討では、CRS 遺伝子保有菌株は嘔吐毒産生陽性であることが認められた。すなわち、PCR 法による CRS 遺伝子の検査は食中毒事例からセレウス菌が分離された際の嘔吐毒産生性のスクリーニング法として有用性の高いものであると考えられた。

分離されたセレウス菌それぞれの菌株について細菌学的比較を行う場合、デンプン水解能や薬剤感受性、プラスミドプロファイル、血清型別などの方法が用いられる。その中でも鞭毛の血清型別については菌株特異性が高く¹⁾、食中毒事例からの分離株の比較に用いられる。しかし、市販の免疫血清がなく、一般の検査室では血清型別の実施は困難である。一方、PFGE は、その泳動装置は国内に広く普及しており、結果を得るまでに数日を要するものの操作法も比較的簡単である。今回の分離菌株について PFGE 像(*Sma*I 処理)による比較・解析では、集団食中毒事例からの分離株は同一の泳動パターンを示し、高い相同性が認められた。一方、これらの分離菌株は比較対照菌株としたセレウス菌とは異なる泳動パターンを示し、さらに、別事例のサルモネラによる食中毒事例から分離されたセレウス菌の各菌株においては、嘔吐毒産生性の菌株が複数認められたが、それらの泳動パターンとの相違も明らかであった。それ故、セレウス菌の複合感染による食中毒ではないと判断する根拠となり、PFGE 法の高い有用性が認められた。これらのことから、セレウス菌のように細菌学的性状の多様性が比較的少ない菌種の相同性の解析では、PFGE 法は非常に有用な比較・解析法であると考えられる。

E. 結論

今回検討の結果より、PFGEによる分子疫学的解析はセレウス菌集団食中毒事例での分離菌株の細菌学的同源性検討に有用であると認められた。また、PCR法によるCRS遺伝子の検査はセレウス菌の嘔吐毒産生性のスクリーニング法として有用であると考えられた。

謝辞:セレウス菌の嘔吐毒産生性試験については、大阪府立公衆衛生研究所細菌課 河合高生先生に貴重な助言をいただきましたことを深謝致します。

参考文献

1. セレウス菌感染症. 感染症発生動向調査週報 感染症の話、2003年第5週号(1月27日～2月2日)掲載. 国立感染症研究所.
2. 経口感染症(食中毒を含む). 厚生省監修 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版. 日本公衆衛生協会 東京 (1987)p. D-1-D-189.
3. 上田成子:10 セレウス菌. 食品衛生検査指針 微

生物編 厚生労働省監修. 社団法人日本食品衛生協会 東京 (2004)pp. 266-281.

4. Liu, P. Y., S. C. Ke, and S. L. Chen. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. *J. Clin. Microbiol.* (1997) 35:1533-1535

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
なし

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 集団食中毒事例から検出されたセレウス菌

菌株No.	由来	デンプン 水解能	CRS遺伝子 の保有	嘔吐毒 産生性	備考
1	患者の吐物	-	+	+	
2	患者の便	-	+	+	
3	やきめし (弁当の食べ残し)	-	+	+	菌数 2.0×10 ⁷ /g
4	マーボナス	-	+	+	菌数 2.0×10 ² /g
5	弁当箱1のふき取り	-	+	+	
6	弁当箱2のふき取り	-	+	+	
7	カラン1のふき取り	-	+	+	
8	カラン2のふき取り	-	+	+	
9	まな板のふき取り	-	+	+	

表2 セレウス菌を原因菌としない食中毒事例あるいは収去食品等から偶発的に分離されたセレウス菌

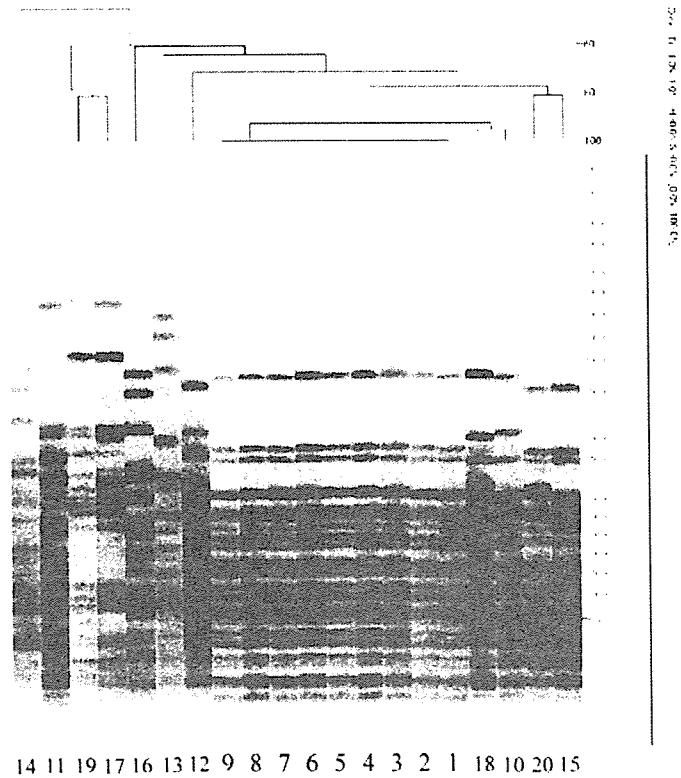
菌株No.	由来	デンプン 水解能	CRS遺伝子 の保有	嘔吐毒 産生性	備考
10	キャベツ (収去食品)	-	+	+	菌数 2.0×10 ² /g S. Enteritidisに よる食中毒事例
11	酢味噌 (検食)	-	-	-	
12	モミジ麩 (検食)	-	+	+	
13	エビの煮物 (検食)	-	-	-	
14	キス (検食)	-	-	-	
15	金属タワシのふき取り	-	+	+	他市でのセレウス菌 食中毒事例の依頼検体 ノロウイルスによる事例 ETEC 0169:H41 (STp産生性) による食中毒事例 S. Enteritidisに よる食中毒事例
16	患者A検便	-	-	-	
17	患者B検便	-	-	-	
18	患者C検便	-	+	+	
19	従業員検便	-	-	-	
20	患者D検便	-	+	+	

No. 11-15, 19, 20は同一事例からの分離株。



M : 分子量マーカー (*Salmonella Braenderup*/XbaI 処理)
 数字 1~20 : 菌株 No.
 右側の数字 : 塩基数

図 1. セレウス菌の PFGE 像 (*Sma*I 処理)



菌株 No. 14 11 19 17 16 13 12 9 8 7 6 5 4 3 2 1 18 10 20 15

図 2. セレウス菌の PFGE 像の相同性解析結果

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 18 年度分担研究報告書

奈良県における下痢症患者便中の細菌性病原因子の保有状況

協力研究者 榮井 毅 奈良県保健環境研究センター
中山 章文* 奈良県保健環境研究センター
（*現. 奈良県立奈良病院）

研究要旨

下痢症患者便検査における、細菌の増殖能や抗生剤の投与に影響を受けない方法として、細菌性病原遺伝子（病原性大腸菌関連）の直接検出法を試みた。平成 16 年 4 月から平成 17 年 3 月まで、奈良県下の定点 4 病院における外来患者の下痢性便試料を収集して調査した結果、集まった 95 検体中 17 検体からのべ 22 の病原遺伝子を検出し、うち 14 の病原遺伝子について菌株を分離した。

A. 研究目的

食中毒（疑い）事例における患者便の検査や、医療機関における下痢症及び食中毒患者の細菌検査において、原因菌が検出されないケースが多い。原因として、現行の検査法が分離培養法中心であること、臨床の現場では検体採取より抗生剤投与が先行することがあるという事情が考えられる。そこで、細菌の増殖能や抗生剤の投与に関係なく検査できる方法として、細菌性病原遺伝子の直接検出法を試み、その保有状況を調べた。

B. 研究方法

1. 対象

平成 16 年 4 月から平成 17 年 3 月までの、奈良県下の定点 4 病院における外来患者の下痢性便で、原則として医療機関の検査で既知の下痢症起因菌が未検出の 95 検体を試料とした。

75% glycerol/リン酸緩衝液を 1.0 ml 入れた 3.0 ml のサンプルチューブを高圧蒸気滅菌して事前に配布し、下痢便 0.5 ml 程度を懸濁して冷凍（-20℃）保存するよう依頼した。

2. 便試料からの細菌由来病原遺伝子の検索

QIAamp DNA Stool Mini Kit（キアゲン）を用いてDNAを精製し、毒素原性大腸菌の易熱性毒素および耐熱性毒素遺伝子（*lt*, *st*）、腸管出血性大腸菌のベロ毒素1型および2型遺伝子（*vt-1*, *vt-2*）、細胞侵入性大腸菌の侵入性遺伝子（*invE*, *ipaH*）、細胞附着性大腸菌の附着関連遺伝子（*eae*, *bfpA*, *aggR*）および耐熱性毒素様毒素EAST1遺伝子（*astA*）の10種類の病原遺伝子の存在を、前者6遺伝子はタカラバイオ所定の方法で、後者4遺伝子は小林らのプライマー（感染症誌, 76, 911~920, 2002）を用いてPCR法により検索した。

3. 病原遺伝子を保有する細菌の検索

病原遺伝子が検出された便試料は、マッコン

キー寒天培地を用いて直接および TSB で 37°C 一夜増菌培養後に分離培養を行い、コロニーを釣菌して便試料と同様に PCR 法を実施した。便試料と同じ病原遺伝子を検出した菌株は Vitek System (ビオメリュー; GNI+カード使用) により菌種の簡易自動同定を行った。

C. 研究結果

1. 検体の概要

下痢症という性質上未成年者、特に 10 歳未満の患者に由来する便が多く、10 歳未満 58 検体、10-19 歳 17 検体、成人 20 検体であった。性別は男 51、女 41、不明 3 で、便の性状は、血性・粘血性 12、水様性 19、泥状 23、粘液性 35、その他 6 であった。

2. 便試料の病原遺伝子検出状況

95 検体中 17 検体から、のべ 22 の病原遺伝子を検出した。各病原遺伝子の検出数は、*astA* が最も多く 10 検体で、次いで *ipaH* が 4 検体で陽性を示し、このうち 2 検体は *invE* も検出された。*eae* は 1 検体、*aggR* は 2 検体で検出されたが、*bfpA* は検出されなかった。*lt*、*vt-1*、*vt-2* 陽性検体は各 1 検体あり、*lt* 陽性検体は *astA* も陽性を示していた。

3. 病原遺伝子を保有する細菌の検索結果

病原遺伝子陽性の便試料から、当該遺伝子保有株が分離されたのは 10 検体で、便試料ごとの検出遺伝子と分離株は以下のとおりである。

- *vt-1* および *vt-2*; 腸管出血性大腸菌 O157 (病院でも分離)
- *lt*; 分離できず、*astA*; 大腸菌
- *invE* および *ipaH*; *Shigella sonnei* (病院でも分離)
- *invE* および *ipaH*; *Shigella sonnei* (病院でも分離)、*astA*; 大腸菌
- *eae*; 大腸菌

- *astA*; サルモネラ属菌 (病院でも分離)
- *astA*; *Klebsiella* 属菌
- *astA*; 大腸菌
- *astA*; 大腸菌
- *astA*; 大腸菌

*ipaH*のみ陽性の 2 検体と *aggR*陽性 2 検体、*astA*陽性のうち 3 検体からは当該遺伝子保有株を分離できなかった。

4. *astA*陽性の *Klebsiella* 属菌の検討

Vitek (GNI+カード), API-20E, API 50, VP, MR, 各種糖利用, Growth at 5°C, 44.5°Cなどの結果から、*Klebsiella planticola*と同定した。遺伝子配列は、EAST1 毒素相当分について 86% (98/114)、PCR プロダクト (別の山本らのプライマーを使用、Infect. Immun., 64, 1441-1445, 1996) 全体について 88% (344/393) の相同性が確認された。

D. 考察

医療機関の検査で既知の下痢症起因菌が検出された便試料が 10 検体含まれていたものの、95 検体中 17 検体からのべ 22 の細菌性病原遺伝子が検出され、14 の病原遺伝子について保有する細菌を特定することができた。便試料自体から病原遺伝子が検出されたことで、細菌菌株の検索が容易になったケースも多い。これらことから、便試料から細菌性病原遺伝子を直接検出する方法の有用性が示唆された。

DNA 抽出・精製キットの使用に際し、一部の検体について精製水加熱抽出法と比較したところ、擬陽性を減少させる効果が認められた。細菌を分離できなかった検体に関しては、死菌を含め増殖不可能な状態にある細菌の DNA を検出した可能性が高いが、損傷菌を想定した培養条件等検討の余地がある。

今後、抽出を含めた検出感度の検討や、培養

方法の詳細な検討を行なうことによって、より実用的な検査方法になることが期待される。

E. 結論

細菌性病原遺伝子の直接検出法は、細菌の増殖能や抗生剤の投与に関係なく適応できる手法である。この方法により、下痢症患者便の検査において、原因菌の推定情報および細菌菌株検索の参考情報を得ることができる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakai, T., Nakayama, A., Nakazawa, K. and Imai, S.: A Survey of Pathogenic Genes from Diarrhea Stool in Nara Prefecture, Jpn. J. Infect. Dis. (in press).

2. 学会発表等

榮井毅、中山章文、橋田みさを、大前壽子：奈良県における下痢症患者便中の細菌性病原因子の保有状況、第33回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会（2006年11月、和歌山市）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

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 18 年度分担研究報告書

下痢原性大腸菌の混合感染による修学旅行食中毒事例

分担研究者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	山崎 渉	大阪府立公衆衛生研究所
	塚本定三	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

2006年10月に大阪府内の2つの小学校で修学旅行の旅館が原因と考えられる集団食中毒事例が発生した。糞便検査の結果、A 小学校は、19名から9タイプの毒素原性大腸菌 (ETEC)、4タイプの腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC)、5タイプの腸管病原性大腸菌 (EPEC) が分離され、B 小学校は、11名から4タイプの ETEC と3タイプの EAEC が分離された。このうち、最も多い両校6名ずつから分離された EAEC OUT:H8と A 小学校の3名から分離された EAEC OUT:H10について、制限酵素 *Xba*I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施したところ、H 型別が一致した株はそれぞれ同じ PFGE パターンを示し、EAEC が集団食中毒の原因菌の一つであることを強く示唆する結果が得られた。

A.研究目的

2つの小学校で発生した集団食中毒で、21種類の下痢原性大腸菌が分離された。このうち2名以上から分離された株について、分離株の異同を調べるため薬剤感受性試験を実施し、血清型別不能株については PFGE 解析も行って、食中毒の原因菌を探求した。

B.研究方法

1.食中毒菌検査

糞便検査の直接分離培養は、SS、DHL、DHS、CT-SMAC、TCBS、MLCB、Skirrow、食塩卵、卵黄加 CW、卵黄加 NGKG の各選択平板を使用し、

サルモネラと腸炎ビブリオは増菌培養も実施した。また、A 小学校についてはノロウイルス検査も行った。

2.下痢原性大腸菌の同定

直接分離培養の DHL、DHS、CT-SMAC から TSI 寒天培地、LIM 培地、トリソイ寒天斜面培地 (TSA) に釣菌し、グルコースおよびインドール陽性株を大腸菌疑い株とした。大腸菌疑い株は、CLIG 培地 (極東) で β -グルクロニダーゼ産生性を、SMAC でソルビット分解性を確認した。また、TSA から約 10 株ずつまとめて混合テンプレートを作製し、表 1 のプライマーを用いた multiplex PCR 法で病原因子のスクリーニングを行った。陽

性を示したテンプレートは1株ずつPCRと血清型別を実施し、*elt* または *est* 陽性株を毒素原性大腸菌 (ETEC)、*aggR* 陽性株を腸管凝集付着性大腸菌 (EAEC)、*eae* 陽性株を腸管病原性大腸菌 (EPEC) と同定した。ETEC はセロトキシン LT (栄研) およびコロスト EIA (デンカ生研) で毒素産生を確認した。*astA* のみが陽性となった株は下痢原性大腸菌としなかった。なお、釣菌株の生化学的性状から、細胞侵入性大腸菌は除外して検討した。血清型別は、病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) に加えて自家血清を使用し、型別できなかった株は国立感染症研究所に依頼した。自家血清による O 型別は、試験管法で凝集価 320 倍以上を陽性と判定した。

3. 薬剤感受性試験

CLSI のディスク感受性試験実施基準にしたがい、センシディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を使用して実施した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (ST)、ホスホマイシン (FOM)、セフォタキシム (CTX)、ナリジクス酸 (NA)、オフロキサシン (OFLX)、シプロフロキサシン (CPFX) の 12 剤である。

4. PFGE 法

平成 15 年度に示された感染研新プロトコールを用い、供試菌株を制限酵素 *Xba*I で 37°C 2 時間消化後、CHEF DRIII (Bio-Rad) を使用し、1% SeaKem Gold Agarose (タカラ)、電圧 6V/cm、スイッチタイム 22.2—54.2 秒で 19 時間電気泳動を行った。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba*I 切断を使用した。

C. 研究結果

1. 事例の概要

2006 年 10 月 20 日 (金)、23 日 (月) にそれぞれ大阪府内の和泉市立 A 小学校および泉南市立 B 小学校の 6 年生に集団下痢症が発生しているとの連絡があり調査したところ、両校は 17—18 日、18—19 日に修学旅行で三重県内の同じ旅館を利用していることがわかった。有症者数は A 小学校 68 名、B 小学校 30 名で、主な症状は腹痛と下痢、潜伏時間は A 小学校 31 時間、B 小学校 53 時間であった (表 2)。旅館での両校の食事メニューは同一であった (表 3) が、児童の聞き取り調査から実施したカイ二乗検定では、A 小学校は伊勢エビが、B 小学校は焼き魚が危険率 5% 未満で有意と判定された。

2. 下痢原性大腸菌の同定

A 小学校は 20—21 日に 27 人分の糞便が搬入され、19 名から 9 タイプの ETEC、4 タイプの EAEC、5 タイプの EPEC が計 39 株分離された。B 小学校は 24—27 日に実施した 15 人分の検便で、11 名から 4 タイプの ETEC と 3 タイプの EAEC が計 20 株分離されたが、EPEC は検出されなかった (表 4)。21 種類の下痢原性大腸菌のうち ETEC O159:H27、ETEC O15:H11、ETEC O128:H12、EAEC OUT:H8 の 4 タイプは両校に共通していた。また、17 名からは複数のタイプの下痢原性大腸菌が分離され、最も多い検体 A20 では 5 タイプが分離された (表 5)。

3. 薬剤感受性試験と PFGE 型別

分離株 59 株のうち、6 タイプ 22 株はいずれの薬剤にも感受性であったが、5 タイプ 11 株は NA 耐性、その他の 26 株は 2 剤以上に耐性を示した。2 名以上から分離された 9 タイプの株について薬

剤耐性パターンをみると、6タイプでは一致していたが、ETEC O62:H12 と ETEC O15:H11、EPEC O119:H21 では株により異なっていた（表6）。このうち ETEC O62:H12 は PFGE パターンが一致していた（図1）。血清型別不能であった EAEC OUT:H10 と EAEC OUT:H8 は、それぞれ H 型の同じ株同士で PFGE 型が一致していたが、EPEC OUT:H21 はスミアになりバンドパターンを比較することができなかった（図1）。

D. 考察

大阪府では 1993 年に ETEC O25:H42 および ETEC O169:H41 の混合感染による大規模食中毒を経験しているが、今回の事例はさらに他種類の下痢原性大腸菌が分離された。両校は 1 日違いで同じ旅館に宿泊しており、食事のメニューは同一であった。しかし、聞き取り調査から推定した原因食品は異なっており、複数のタイプの下痢原性大腸菌が分離された患者も多いことから、単一の汚染源があったとは考えにくく、調理場などが他種類の下痢原性大腸菌で汚染されていたと推察される。

分離株のうち、ETEC O159:H27、ETEC O15:H11、ETEC O128:H12、EAEC OUT:H8 は両校に共通しており、本集団食中毒の主要な原因菌であると考えられた。特に EAEC OUT:H8 は最も多い 12 名から分離されたものの、菌体抗原を型別することができなかった。しかしながら、薬剤感受性試験および PFGE の結果から、12 株の OUT:H8 は同一であり、OUT:H10 とは異なることを明らかにできた。大腸菌の O 血清型は O1~O181 までであるが、市販血清ではこのうち 43 タイプしか型別できず、ラフ株が見られることから、型別不能株の異同

の判断に PFGE が有用であるといえる。

腸管出血性大腸菌以外の下痢原性大腸菌は血清型別で同定されることが多いが、病原的意義からも病原因子検索の実施が優先されるべきである。今回は釣菌株から PCR 法でスクリーニングを行ったが、分離平板からの sweep PCR 法を検討し、より迅速な同定手順を確立したい。

大腸菌の血清型別を実施していただきました国立感染症研究所 伊豫田淳先生に深謝します。

E. 結論

一日違いで同じ旅館を利用した二つの小学校で集団食中毒が発生し、30 人から 21 種類 59 株の下痢原性大腸菌が分離された。血清型別不能の分離株については、生化学的性状試験や薬剤感受性試験に加え、遺伝子解析法である PFGE を実施して、菌株間の異同を明らかにすることができた。

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

勢戸和子、田口真澄、山崎 渉、塚本定三：多種類の下痢原性大腸菌が分離された修学旅行食中毒事例、第 46 回感染性腸炎研究会（2007 年 3 月、東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 下痢原性大腸菌の病原因子検索プライマー

	標的遺伝子	プライマー (センス, アンチセンス)	増幅サイズ	文献 (メーカー)
Mix A	<i>stx</i>	MK1, MK2	228bp	1
	<i>elt</i>	Tw20, Jw11	450bp	2
	<i>est</i>	ESH-1, ESH-2	131bp	(タカラ)
	<i>est</i>	ESP-1, ESP-2	123bp	(タカラ)
Mix B	<i>eae</i>	eack1, EA2	591bp	3
	<i>aggR</i>	aggRks1, aggRkas2	254bp	3
	<i>astA</i>	EAST-1S, EAST-1AS	106bp	3
	<i>stx2f</i>	2f-a, 2f-b	150bp	4

- 文献 1. Karch H *et al* , J. Clin. Microbiol. 27:2751-7, 1989
 2. Stacy-Phipps S *et al* , J. Clin. Microbiol. 33:1054-9, 1995
 3. 小林一寛ら, 感染症学雑誌, 76:911-20, 2002
 4. Wang G *et al* , J Clin Microbiol, 40:3613-9, 2002

表2 患者数と症状

		喫食者 (人)	有症者 (人)	症状			
				腹痛	下痢	嘔吐	発熱
A小学校	小学生	113	67	88.2%	69.1%	13.2%	47.1%
	教師	5	1				
B小学校	小学生	53	26	80.0%	73.3%	10.0%	33.3%
	教師	5	4				

表3 旅館の食事メニュー

1日目夕食	キャベツマカロニケチャップ和え、車エビのフライ 串カツ、岩アサリタルタルソースかけ、伊勢エビ、 焼き魚、サラダ菜、肉鍋、茶碗蒸し、プリン、ヤクルト
2日目朝食	卵焼き、シュウマイ、キャベツ、ハム、佃煮、みそ汁

表4 分離された下痢原性大腸菌と検出者数

分類	同定成績		検出者数	
	血清型	病原因子	A小学校	B小学校
ETEC	O159:H27	LT	2	2
ETEC	O62:H12	LT		2
ETEC	O180:H21	LT	1	
ETEC	OUT:H21	LT, <i>astA</i>	1	
ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>	6	2
ETEC	O128:H12	STh	3	4
ETEC	O8:H19	STh	1	
ETEC	O25:NM	STh, <i>astA</i>	1	
ETEC	O27:H7	STp, <i>astA</i>	1	
ETEC	O148:H28	STh, <i>astA</i>	1	
EAEC	O126:H12	<i>aggR</i>		3
EAEC	OUT:H10	<i>aggR</i>	3	
EAEC	O92:H33	<i>aggR</i>	1	
EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>	6	6
EAEC	O181:H16	<i>aggR, astA</i>	1	
EAEC	O44:H18	<i>aggR, astA</i>		1
EPEC	O119:H21	<i>eae</i>	5	
EPEC	O55:NM	<i>eae</i>	1	
EPEC	O128:H2	<i>eae</i>	1	
EPEC	OUT:H19	<i>eae</i>	1	
EPEC	OUT:H21	<i>eae</i>	3	

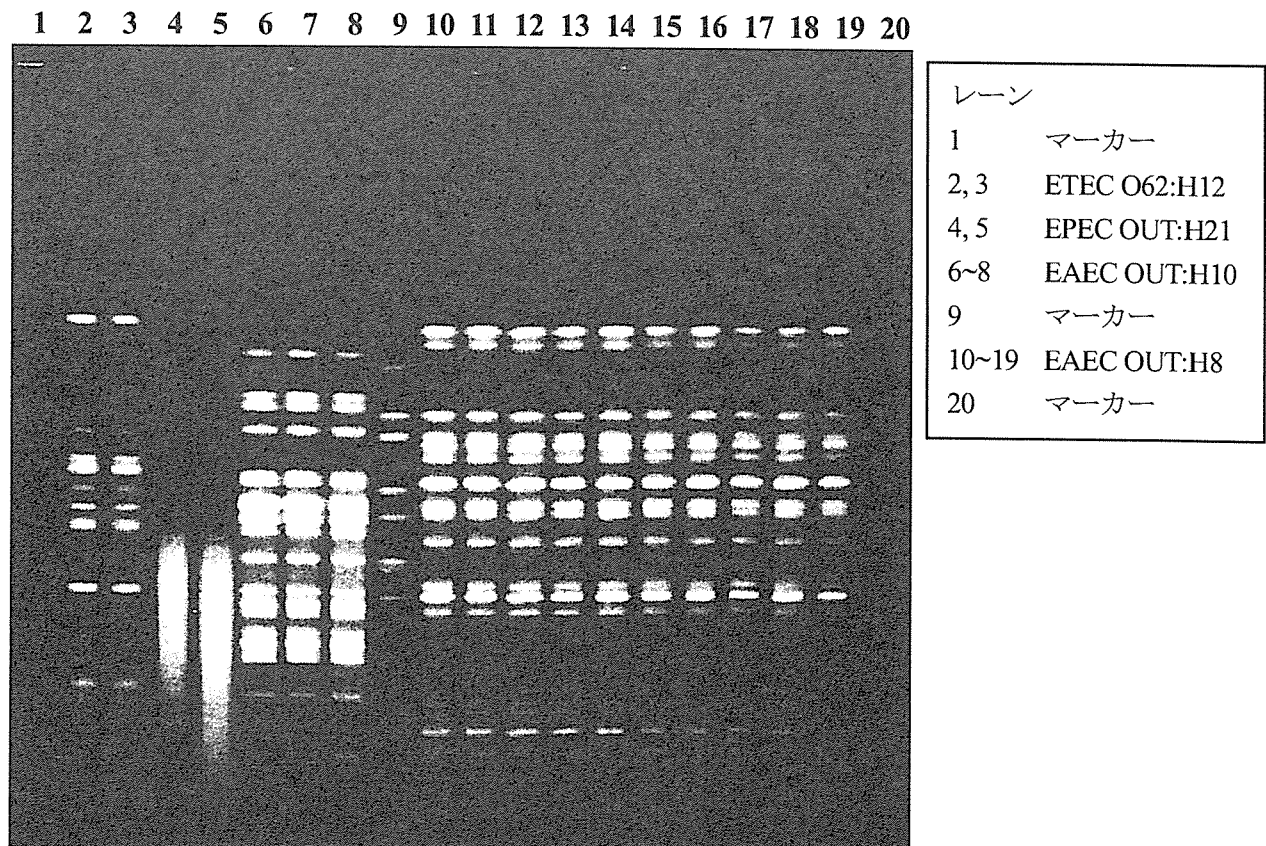
表5 2種類以上の下痢原性大腸菌が分離された検体

検体番号	分離菌			検体番号	分離菌		
	分類	血清型	病原因子		分類	血清型	病原因子
A 1	ETEC	O159:H27	LT	A 23	ETEC	O180:H21	LT
	EPEC	O119:H21	<i>eae</i>		ETEC	OUT:H21	LT, <i>astA</i>
A 2	ETEC	O159:H27	LT		EAEC	O92:H33	<i>aggR</i>
	ETEC	O8:H19	STh		EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>
	EPEC	O119:H21	<i>eae</i>	B 1	ETEC	O128:H12	STh
A 5	EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>		EAEC	O126:H12	<i>aggR</i>
	EPEC	O119:H21	<i>eae</i>	B 3	ETEC	O128:H12	STh
	EPEC	OUT:H21	<i>eae</i>		EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>
A 7	ETEC	O27:H7	STp, <i>astA</i>	B 5	ETEC	O62:H12	LT
	ETEC	O148:H28	STh, <i>astA</i>		ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>
	EAEC	O181:H16	<i>aggR, astA</i>	B 6	EAEC	O126:H12	<i>aggR</i>
A 12	ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>		EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>
	ETEC	O128:H12	STh, <i>astA</i>	B 7	ETEC	O159:H27	LT
A 13	EAEC	OUT:H10	<i>aggR</i>		ETEC	O128:H12	STh
	EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>	B 10	ETEC	O62:H12	LT
	EPEC	O128:H2	<i>eae</i>		EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>
	EPEC	OUT:H21	<i>eae</i>	B 12	ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>
A 14	ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>		EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>
	ETEC	O128:H12	STh, <i>astA</i>	B 13	ETEC	O128:H12	STh
	EPEC	O119:H21	<i>eae</i>		EAEC	O126:H12	<i>aggR</i>
A 20	ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>		EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>
	ETEC	O25:NM	STh, <i>astA</i>				
	EAEC	OUT:H10	<i>aggR</i>				
	EPEC	O119:H21	<i>eae</i>				
EPEC	OUT:H21	<i>eae</i>					

表6 2名以上から分離された株の薬剤耐性パターンと PFGE 型

分離株			薬剤耐性パターン	株数	PFGE
ETEC	O159:H27	LT	ABPC, ST	4	nt
ETEC	O62:H12	LT	ABPC, NA	1	A
			NA	1	A
ETEC	O15:H11	STh, <i>astA</i>	ABPC, NA	1	nt
			NA	7	nt
ETEC	O128:H12	STh	ABPC, ST, NA	7	nt
EAEC	O126:H12	<i>aggR</i>	ABPC, SM, TC, ST, NA	3	nt
EAEC	OUT:H10	<i>aggR</i>	ABPC, SM, ST	3	B
EAEC	OUT:H8	<i>aggR, astA</i>	感受性	12	C
EPEC	O119:H21	<i>eae</i>	ABPC, ST	1	nt
			感受性	4	nt
EPEC	OUT:H21	<i>eae</i>	感受性	3	スメア

図1 PFGE 実施株の泳動パターン



中国四国ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）の精度管理について

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	榊美代子 大原祥子	広島県保健環境センター
	中嶋 洋 大島律子	岡山県環境保健センター
	最首信和	鳥取県衛生環境研究所
	吉田紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
	絹田美苗 谷脇 妙	高知県衛生研究所
	森 敏彦	徳島県保健環境センター
	蔵田和正 笠間良雄	広島市衛生研究所
	富田正章	山口県環境保健研究センター

研究要旨

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究の一環として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）の標準化と PFGE により解析された画像を基盤とした分散型情報システム（パルスネット）構築のため、昨年度に引続き、検査施設間における PFGE 技術の精度管理を行った。精度管理には中・四国地区の地方衛生研究所(地研)9 施設が参加し、PFGE タイプの異なる腸管出血性大腸菌 O157:H7 (O157) 4 株を供試菌株として、新しいプロトコールによる PFGE を実施した。

精度管理の結果、8 施設では概ね良好な画像が得られたが、1 施設の作製した画像は不鮮明であった。前者 8 施設間の差異を画像解析ソフトによるクラスター解析で確認したところ、比較的良好的な画像の得られた 8 施設の O157 の 4 株は類似性が高く、それぞれ異なるクラスターを形成（類似値 92～100%）した。今後、より良好な画像を得るため、技術的問題点を改善するとともに継続的な精度管理が必要と思われた。

A. 研究目的

平成 12 年度から中・四国地区の各地研がパルスネット構築の基礎的資料を得るため、PFGE 解析の有効性と技術的問題点について共同研究を行ってきた。その結果、PFGE 解析は細菌性食中毒や感染症の疫学調査に有効な手段となることが明らかとなった反面、パルスネットを構築し円滑に運用するには、PFGE の標準化と精度管理の必要性が示唆された。今年度も昨年度に引続き、中・四国地

区の各地研が米国 CDC のプロトコールをもとに感染研が新たに作成した PFGE のプロトコール(感染研ニュープロトコール)により、O157 について PFGE の精度管理を行い、技術的問題点を指摘・改善していくことを目的とした。

B. 研究方法

1. 参加施設

広島県保健環境センター、岡山県環境保健

センター、鳥取県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研究所、香川県環境保健研究センター、高知県衛生研究所、徳島県保健環境センター、広島市衛生研究所、山口県環境保健研究センター

2. 供試菌株

精度管理用菌株として、平成 18 年に愛媛県内で分離され、国立感染症研究所で PFGE 型別された腸管出血性大腸菌 O157:H7 (ヒト由来株) の 4 株を使用した。

- ・ 菌株番号 1 (感染研 No 060211 b3)
- ・ 菌株番号 2 (感染研 No 060969 a259)
- ・ 菌株番号 3 (感染研 No 060972 b19)
- ・ 菌株番号 4 (感染研 No 060973 a412)

3. PFGE

方法は感染研ニュープロトコールに準拠した。詳細は次のとおりである。

1) 菌量の調整とアガロースブロック包埋

菌株は 2 通りの集菌方法を試み、比較した。ブイヨンからの集菌方法としてトリプトソイブイヨン 3ml に 35~37°C、16~18 時間静置培養した菌液 200 μ l を 1.5ml のマイクロチューブに移し、12,000rpm で 2 分間遠心した。遠心後、上清を除去、沈渣に滅菌蒸留水 200 μ l を加え、懸濁した。この懸濁液にプレート法と同様、200 μ l の 1% Seakem Gold Agarose を加え、その混合液を plug mold で固化させた (ブイヨン法)。一方、プレートからの集菌方法として、35~37°C で 16~18 時間培養したトリプトソイ寒天平板上の菌苔をプラスチックエーゼでかき取り、滅菌蒸留水に懸濁後 OD を 0.5 (610nm) に調整した。分光光度計が使用できない施設はマッファランドの濁度計を目安に調整した。(OD0.5 はマクファーランド 5 に相当することを予め確認した。) この懸濁液 200 μ l に等量の 1% Seakem Gold Agarose を加えて混ぜ、その混合液を Sample Plug Caster 0.7mm (Bio-Rad)

へ流し込み、室温で 10~15 分間(4°C で 5 分間)固化させた (プレート法)。

2) 菌体処理 (Proteinase K)

固まったプラグを 1 mg/ml Proteinase K (Roche)、1% N-Lauroylsarcosine (Sigma) in 0.5M EDTA, pH8.0 溶液 1 ml の入ったチューブに移し、50°C で 2 時間、振盪培養した。

3) 制限酵素処理 (前処理)

アガロースブロックを取り出し、泳動時用の大きさ(4 mm \times 4 mm)にカットした。この断片を 4 mM Pefabloc SC (AEBSF)(Roche) in TE 1 ml の入ったマイクロチューブに移し、50°C で 20 分間の洗浄を 2 回行った。さらに、バッファーを TE (1 ml/sample) に替え、氷上で 20 分以上平衡化した。

4) 制限酵素処理 (バッファーによる平衡化)

TE buffer を抜き取り、酵素処理のための H buffer (200 μ l/sample) を加え、氷上で 20 分間処理した。

5) 制限酵素処理 (消化反応)

100 μ l の制限酵素 *Xba* I (Roche) を含むバッファー (30 units /sample) に置き換え、37°C で一昼夜、振盪培養を行った。酵素処理の終わったサンプルには、0.5 倍の TBE buffer を 400 μ l 加え反応を停止した。

6) コムへの貼り付け

プラグをコムの泳動方向面に静置、5~10 分間乾燥させた後、ゲル作製台にセットし、55~60°C に保温した 1% SeaKem Gold Agarose (0.5 倍の TBE buffer で溶解) 100ml を流し込み、泳動用アガロースゲルを作製した。

7) 泳動槽の設定・泳動条件

予め 4°C に保存しておいた 0.5 倍の TBE buffer 2 リットルを水平に設定した泳動槽に加えた後、泳動用ゲルを泳動槽に配置した。泳動条件は、6.0V/cm、2.2-54.2 s、19 時間、バッファー温度は 14°C に設定した。

8) ゲルの染色・写真撮影

泳動後のゲルを 0.2 μ g/ml Ethidium bromide 水溶液で 30 分間染色、染色後、蒸留水で 30 分間脱色し、Transilluminator 上でポラロイドカメラにて撮影した（1 施設は CCD カメラで撮影）。

4. 画像解析

各施設で写真撮影された画像を電子メールまたは郵送で愛媛県立衛生環境研究所に集め画像解析ソフト（Fingerprinting II、Bio-Rad）を用いてクラスター解析を行った。

C. 研究結果

1. 各施設の PFGE 画像の比較

今回、9 施設（A. B. D~J 施設）が統一した方法で作製した O157 の PFGE 画像の作製を試みた。その結果、8 施設では概ね良好な画像が得られたが（図 1~6、図 8~9）、施設 H の作製した画像は全体的に不鮮明であった（図 7）。この画像はマーカーレーンのバンド認識が非常に困難なうえに、菌株 2~4 の各 PFGE パターンでは 500Kbp 以上のバンドが多数確認され、他施設と大きく異なる結果となった。このことから PFGE の一連の操作および試薬等の技術的な問題が考えられ、改善点を検討する必要があると思われた。また、他施設の概ね良好な画像でも、分子量の大きい太いバンドでは本数が認識し難い個所が見られた。

2. 各施設間の画像解析

画像をもとに画像解析ソフトでデンドログラム（図 10、図 11）を作成し、各施設間の差異を確認した結果、施設 H を除き概ね良好な解析結果が得られた。これら 8 施設では、同一菌株は同じクラスターを形成し、その類似度は概ね 92~100%であった。集菌方法を異にした場合でも同様な傾向を示し、鮮明な画像が作製できた施設間での差異は小さい値

であった。しかし、前述した施設 H の画像では明らかに他施設のクラスターから大きく乖離していた。

3. 集菌方法の違いによる画像の比較

施設ごとに比較したところ、施設 H を除く各施設では比較的高い類似度（95~100%）で、同様なクラスターを示し、集菌方法の違いによる画像の差異は見られなかった。（図 12~20）

D. 考察

現在、中・四国地区の 10 地研では感染研ニュープロトコールに準拠して PFGE を実施しているが、パルスネットを構築し、diffuse outbreak の早期発見に成果を上げるには各施設の検査技術の維持が必要であり、精度管理は不可欠である。これまでに精度管理を実施した結果、各施設間で比較しうる画像が得られ、クラスター解析でも高い類似度が得られているため、中・四国地区の地研では新しいプロトコールによる PFGE 技術が概ね取得されたと考えられる。しかし、各施設の画像の一部で不確定な個所が認められ、クラスター解析で施設間の差異を生ずる原因となった。今回の精度管理でも分子量 500Kbp 近辺のバンドの判読では、より慎重にデンストメトリーカーブから判定するものの、濃度が濃くバンド幅が比較的広いときには、複数バンドになる場合と単一バンドになる場合があった。この問題点を解決するには適当な菌量の調製とともに、画像解析の際に判定基準を統一することも必要と思われた。

一方、前回の精度管理では添加菌量の違いから分子量の小さい領域でバンドが認識できない例があったが、今回はそのような例は比較的少なかった。その原因として、今回使用した菌株 2 と菌株 3 は、100Kbp 近辺で 1 本のバンドの違いを示す類似株であり、H 施設

を除く 8 施設においてはこのバンド 1 本の差を検出し、両株の類似度 95%以上のクラスターに分類することができたためと推察した(図 11)。

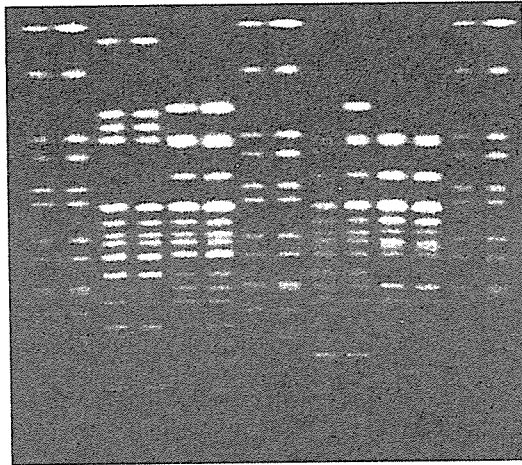
プレート法とブイヨン法の集菌方法の違いによる画像の比較では、施設 H を除いて両法の画像に大きな差異は見られなかった(図 12～14、16～20)。これは前年度と同様、菌量を客観的な方法で測定・添加したためと思われる。今後も菌液調製には十分な注意が必要であることが再認識された。

E. 結論

中・四国地区の 9 地研で、感染研ニュープロトコールによる PFGE を行い、精度管理を実施したところ、概ね良好な PFGE 画像を得ることができた。しかし、パルスネットを構築し、PFGE 技術の施設間格差を最小限に留めるためには、技術的問題点の改善と解析技術の保持が必要であり、継続的な精度管理は今後とも不可欠である。

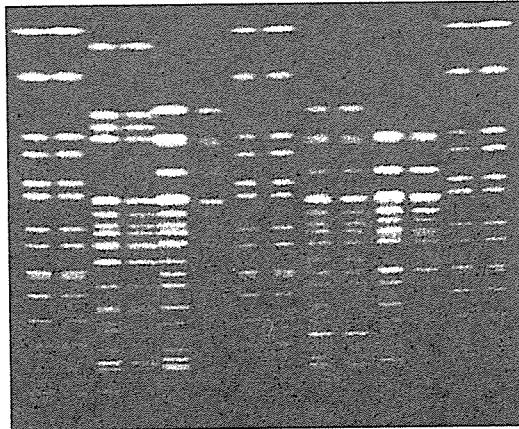
F. 研究発表

なし



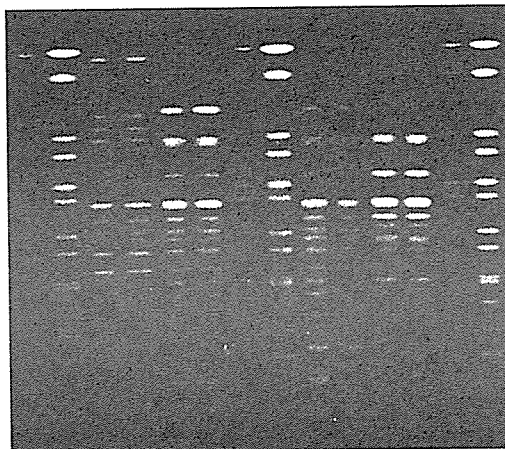
- | Lane | |
|------|------------------|
| 1 | marker ブイオン |
| 2 | marker プレート |
| 3 | 菌株1 ブイオン |
| 4 | 菌株1 プレート |
| 5 | 菌株2 ブイオン |
| 6 | 菌株2 プレート |
| 7 | marker ブイオン |
| 8 | marker プレート |
| 9 | 菌株3 ブイオン |
| 10 | 菌株3 プレート |
| 11 | 菌株4 ブイオン |
| 12 | 菌株4 プレート |
| 13 | marker ブイオン |
| 14 | marker プレート |

図1 A施設のPFGE画像



- | Lane | |
|------|------------------|
| 1 | marker ブイオン |
| 2 | marker プレート |
| 3 | 菌株1 ブイオン |
| 4 | 菌株1 プレート |
| 5 | 菌株2 ブイオン |
| 6 | 菌株2 プレート |
| 7 | marker ブイオン |
| 8 | marker プレート |
| 9 | 菌株3 ブイオン |
| 10 | 菌株3 プレート |
| 11 | 菌株4 ブイオン |
| 12 | 菌株4 プレート |
| 13 | marker ブイオン |
| 14 | marker プレート |

図2 B施設のPFGE画像



- | Lane | |
|------|------------------|
| 1 | marker ブイオン |
| 2 | marker プレート |
| 3 | 菌株1 ブイオン |
| 4 | 菌株1 プレート |
| 5 | 菌株2 ブイオン |
| 6 | 菌株2 プレート |
| 7 | marker ブイオン |
| 8 | marker プレート |
| 9 | 菌株3 ブイオン |
| 10 | 菌株3 プレート |
| 11 | 菌株4 ブイオン |
| 12 | 菌株4 プレート |
| 13 | marker ブイオン |
| 14 | marker プレート |

図3 D施設のPFGE画像