

表 4 IS-printing System の電気泳動条件

施設	agaroseの濃度と種類	泳動バッファー	泳動時間
No.1	3% Pulsed Field Certified Agarose	0.5 x TBE	100V, 70分
No.3	3% NuSieve GTG: SeaKem GTG =2: 1	0.5 x TBE	100V, 75分
No.4	3% NuSieve 3: 1 agarose	0.5 x TBE	100V, 65分
No.5	3% NuSieve GTG: SeaKem GTG =2: 1	0.5 x TBE	100V, 80分
No.8	3% NuSieve GTG: SeaKem GTG =2: 1	0.5 x TBE	100V, 65分
No.10	3% NuSieve GTG: Agarose X =2: 1	0.5 x TBE	100V, 100分
No.11	3% NuSieve GTG: SeaKem GTG =2: 1	0.5 x TBE	100V, 75分

表 5 IS-printing System の増幅バンドサイズと判定のコード変換方法

1st set Primer																		
Primer No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	<i>eae</i>	1-16	<i>hlyA</i>
Size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定例	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	3		0			5			4		5			7				

2nd set primer																		
Primer No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
Size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定例	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	6			1			1			6			4			2		

表6 EHEC O157のPFGE画像解析における各解析者の近似度と認識バンド数

菌株 番号	解析者	100%一致 画像数 ^{a)}	10画像の解析		9画像の解析 ^{b)}	
			近似度 (%)	認識バンド数 (本)	近似度 (%)	認識バンド数 (本)
1	A	5 (19), 2 (19)	77.0	12, 18, 19	94.0	18, 19
	B	6 (19)	90.0	18, 19	95.0	18, 19
	C	3 (19)	90.5	16, 18, 19	90.5	16, 18, 19
2	A	7 (22)	45.0	9, 21, 22	97.0	21, 22
	B	8 (22)	83.5	16, 22	99.5	22
	C	6 (22), 2 (20)	86.5	17, 20, 21, 22	95.0	20, 21, 22
3	A	7 (19)	77.5	15, 19, 20	97.5	19, 20
	B	8 (19)	94.5	19, 20	98.0	19
	C	6 (19), 2 (18)	96.0	18, 19, 20	96.0	18, 19, 20
4	A	4 (20), 2 (22)	90.0	17, 19, 20, 21, 22	94.5	19, 20, 21, 22
	B	5 (20), 4 (19)	94.0	19, 20, 21	97.0	19, 20
	C	4 (19), 2(21)	95.0	18, 19, 20, 21	95.0	18, 19, 20, 21
5	A	7 (18)	77.5	17, 18, 19	97.0	18, 19
	B	9 (18)	93.5	18, 19	100	18
	C	6 (18), 2 (19), 2 (17) ^{c)}	95.5	17, 18, 19	95.5	17, 18, 19

a) カッコ内は認識バンド数

b) 施設5の画像を除く

c) 9画像の解析ではバンド数17本の100%一致画像はない

表7 PFGE型およびISコードが一致した株

施設	菌株	ISコード	PFGE型	施設	菌株	ISコード	PFGE型
No.11	13	012057 214443	b519	No.5	10	317575 211757	c227
No.11	14	012057 214443	b519	No.11	53	317575 211757	c227
No.11	66	012057 214443	c251	No.11	54	317575 211757	c227
No.11	67	012057 214443	c251	No.11	55	317575 211757	c227
No.11	68	012057 214443	c251	No.11	56	317575 211757	c227
No.3	7	025247 303445	b486	No.11	57	317575 211757	c227
No.3	8	025247 303445	b486	No.11	58	317575 211757	c227
No.3	17	117155 601757	b788	No.11	18	317575 611657	c107
No.3	18	117155 601757	b788	No.11	19	317575 611657	c107
No.11	43	117177 601557	c169	No.8	10	317575 611756	b272
No.11	45	117177 601557	c169	No.8	12	317575 611756	b272
No.11	27	145047 301443	c156	No.8	13	317575 611756	b272
No.11	28	145047 301443	c156	No.3	1	317575 611757	b494
No.11	26	145047 301443	c157	No.3	2	317575 611757	b494
No.11	29	145047 301443	c157	No.3	11	317577 611757	b762
No.11	15	301457 610642	c103	No.11	42	317577 611757	b762
No.11	16	301457 610642	c103	No.5	7	345457 311652	b515
No.11	17	301457 610642	c103	No.11	25	345457 311652	b515
No.5	4	307557 211457	c134	No.5	5	717177 411757	a535
No.11	30	307557 211457	c134	No.11	11	717177 411757	a535
No.8	1	307577 611655	b46	No.11	72	717557 611653	c304
No.8	2	307577 611655	b46	No.11	73	717557 611653	c304
No.11	69	307577 611657	c441	No.11	75	717557 611653	c304
No.11	70	307577 611657	c441	No.11	22	717575 611657	c106
No.4	18	311557 710413	b664	No.11	23	717575 611657	c106
No.5	9	311557 710413	b664	No.11	34	717577 611653	b522
No.11	38	311557 710413	b664	No.11	36	717577 611653	b522
No.11	39	311557 710413	b664	No.10	11	717577 611657	b705
No.11	40	311557 710413	b664	No.11	4	717577 611657	b705
No.11	41	311557 710413	b664	No.11	84	717577 611657	b705
				No.11	46	717577 611657	c176
				No.11	47	717577 611657	c176
				No.11	71	717577 611657	c176
				No.11	61	717577 611657	c234
				No.11	62	717577 611657	c234

表 8 同一 PFGE 型で IS コードが異なった株

施設	菌株	ISコード										PFGE型	VT型		
No.3	4	7	1	3	5	7	5	6	1	0	6	4	6	a259	1+2
No.4	20	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6	a259	1+2
No.10	8	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6	a259	1+2
No.11	76	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6	a259	1+2
No.1	5	3	0	1	4	5	7	4	3	0	6	4	2	a637	2
No.8	3	3	0	1	4	5	7	6	1	0	6	4	2	a637	2
No.4	17	7	1	7	5	5	7	6	1	1	6	5	7	a829	1+2
No.11	24	7	1	3	5	7	7	6	1	0	6	5	7	a829	1+2
No.1	2	7	1	7	5	7	5	4	3	1	6	5	7	b27	1+2
No.3	12	7	1	7	5	7	5	6	1	1	6	5	7	b27	1+2
No.3	14	7	1	7	5	7	5	6	1	1	6	5	7	b27	1+2
No.1	13	3	1	7	5	7	7	4	3	1	7	5	7	b326	1+2
No.3	5	3	1	7	5	7	5	6	1	1	7	5	7	b326	1+2
No.8	15	0	1	2	0	5	7	6	1	4	4	4	2	b423	2
No.8	16	0	1	2	0	5	7	6	1	4	4	4	2	b423	2
No.11	33	0	1	0	0	5	7	2	1	4	4	4	3	b423	2
No.11	35	0	1	0	0	5	7	2	1	4	4	4	3	b423	2
No.11	9	1	0	5	4	5	7	7	1	1	6	4	2	c114	2
No.11	10	3	1	5	5	5	5	3	1	1	4	0	7	c114	1+2
No.11	78	2	1	5	4	5	5	3	1	1	6	5	6	c436	1+2
No.11	77	2	1	5	4	5	7	3	1	1	6	5	6	c436	1+2
No.11	79	2	1	5	4	5	7	3	1	1	6	5	6	c436	1+2
No.10	7	2	0	5	4	5	7	6	1	1	6	4	2	c47	2
No.11	1	3	0	5	4	5	7	6	1	1	6	4	2	c47	2
No.11	7	3	0	5	4	5	7	6	1	1	6	4	2	c47	2
No.11	8	3	0	5	4	5	7	6	1	1	6	4	2	c47	2
No.11	81	3	1	7	5	7	1	2	1	1	5	5	7	c704	1+2
No.11	82	3	1	7	5	7	5	2	1	1	5	5	7	c704	1+2
No.11	83	3	1	7	5	7	5	2	1	1	5	5	7	c704	1+2

表9 施設11において事例内でPFGE型が異なった株のISコード

事例	菌株	性別	年齢	ISコード	PFGE型	PFGEコメント
A	33	F	9	010057 214443	b423	
	34	F	37	010057 214443	c242	b423と2本異なる
	35	M	12	010057 214443	b423	
B	20	F	3	012057 214442	c104	
	21	F	37	012057 214442	c105	c104と2本異なる
C	65	M	23	012057 214443	c253	
	66	F	27	012057 214443	c251	c253と7本異なる
D	60	F	4	013057 214443	c183	
	59	M	5	013057 214443	c244	c183と1本異なる
E	31	M	2	114057 303443	c164	
	32	F	69	114057 303443	c165	c164と1本異なる
F	43	F	3	117177 601557	c169	
	44	F	1	117177 601557	c229	c169と2本異なる
	45	F	22	117177 601557	c169	
G	28	M	22	145047 301443	c156	
	29	F	0	145047 301443	c157	c156と1本異なる
H	48	F	4	145047 301443	c241	
	49	M	67	145047 301443	c181	c241と1本異なる
I	5	F	6	215457 311656	c696	
	80	F	7	215457 311656	c619	c696と1本異なる
J	50	F	32	615455 311656	c225	
	51	M	10	615455 311656	c226	c225と3本異なる
	52	M	30	615455 311656	c246	c225と1本異なる
K	72	M	11	717557 611653	c304	
	73	M	10	717557 611653	c304	
	74	M	10	717557 611653	c700	c304と3本異なる
L	61	M	4	717577 611657	c234	
	63	M	4	717577 611657	c235	
M	71	M	5	717577 611657	c176	
	64	F	3	717577 611657	c444	c176と1本異なる
N	84	F	3	717577 611657	b705	
	85	F	34	717577 611657	c707	b705と1本異なる

表 10 5タイプ以上の PFGE 型で IS コードが一致した株

ISコード	施設	菌株	PFGE型 ^{a)}	PFGEコメント
0 1 2 0 5 7 2 1 4 4 4 3	No.4	3	b557	
	No.5	8	c429	
	No.10	1	b25	
	No.11	13, 14	b519	
	No.11	65	c253	
	No.11	66, 67, 68	c251(c253)	c253と7本異なる
7 1 7 5 7 5 6 1 1 6 5 7	No.3	12, 14	b27	
	No.4	6	b138	
	No.5	17	c410	
	No.5	19	c414	
	No.11	22, 23	c106	
7 1 7 5 7 7 6 1 1 6 5 7	No.10	2	b32	
	No.4	4	b526	
	No.4	5	b573	
	No.10	11	b705	
	No.11	4, 84	b705	
	No.11	85	c707(b705)	b705と1本異なる
	No.4	7	b720	
	No.11	46, 47, 71	c176	
	No.11	64	c444(c176)	c176と1本異なる
	No.11	61, 62	c234	
No.11	63	c235		
No.10	13	c702		

a) カッコ内は関連性のあるPFGE型

表 11 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像解析における配布株の近似度と認識バンド数

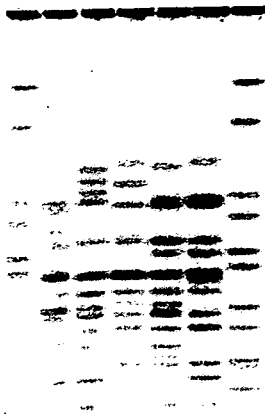
菌株 番号	<i>Sma</i> I ^{a)}			<i>Kpn</i> I ^{b)}		
	100%一致 画像数 ^{c)}	近似度(%)	認識 バンド数(本)	100%一致 画像数	近似度(%)	認識 バンド数(本)
6	7 (9)	100	9	2 (13)	77.5	12, 13, 14
7	7 (8)	100	8	2 (12)	87	10, 12, 13, 14

a) 7画像で解析

b) 6画像で解析 (施設3の画像を除く)

c) カッコ内は認識バンド数

施設 1 (19 時間)



施設 2



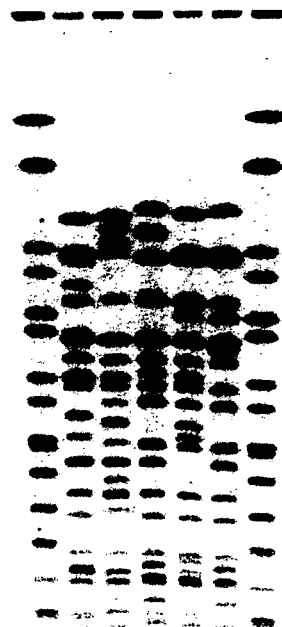
施設 3 (18 時間)



左から

- 1 Marker
- 2 菌株 1
- 3 菌株 2
- 4 菌株 3
- 5 菌株 4
- 6 菌株 5
- 7 Marker

施設 4 (19 時間)



Band 9, 10 →

Band 13, 14 →

Band 16 →

施設 5 (19.5 時間)

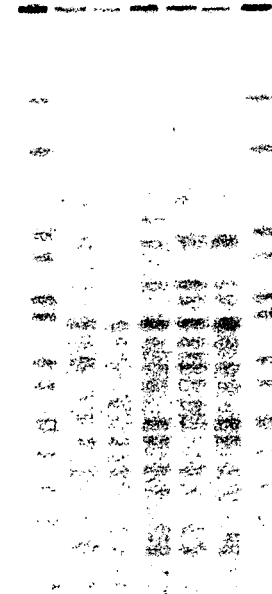
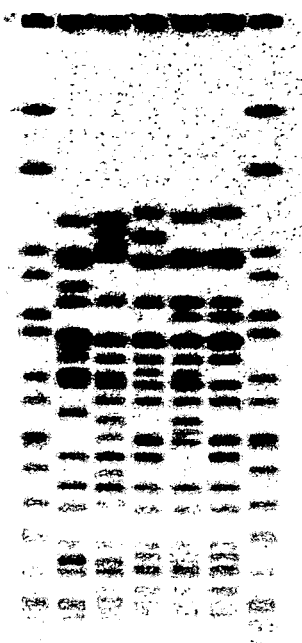


図 1 EHEC O157 精度管理株の PFGE—各施設の画像 (カッコ内は泳動時間)

施設 6 (19 時間)



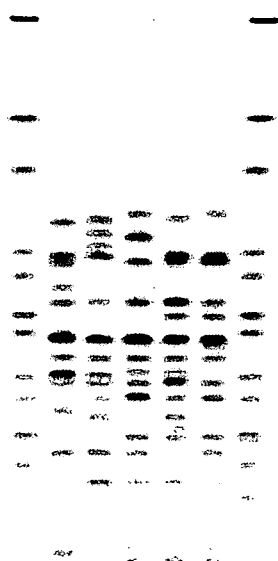
施設 7 (19 時間)



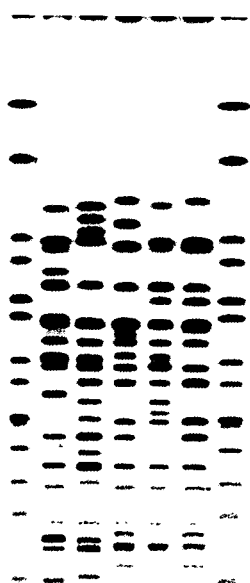
施設 8 (19.5 時間)



施設 9 (19 時間)



施設 10 (19 時間)



施設 11 (19 時間)

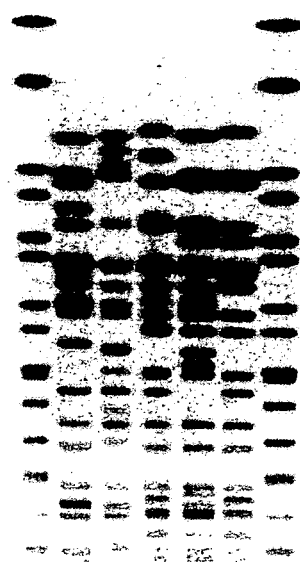


図 1 EHEC O157 精度管理株の PFGE—各施設の画像 (つづき)

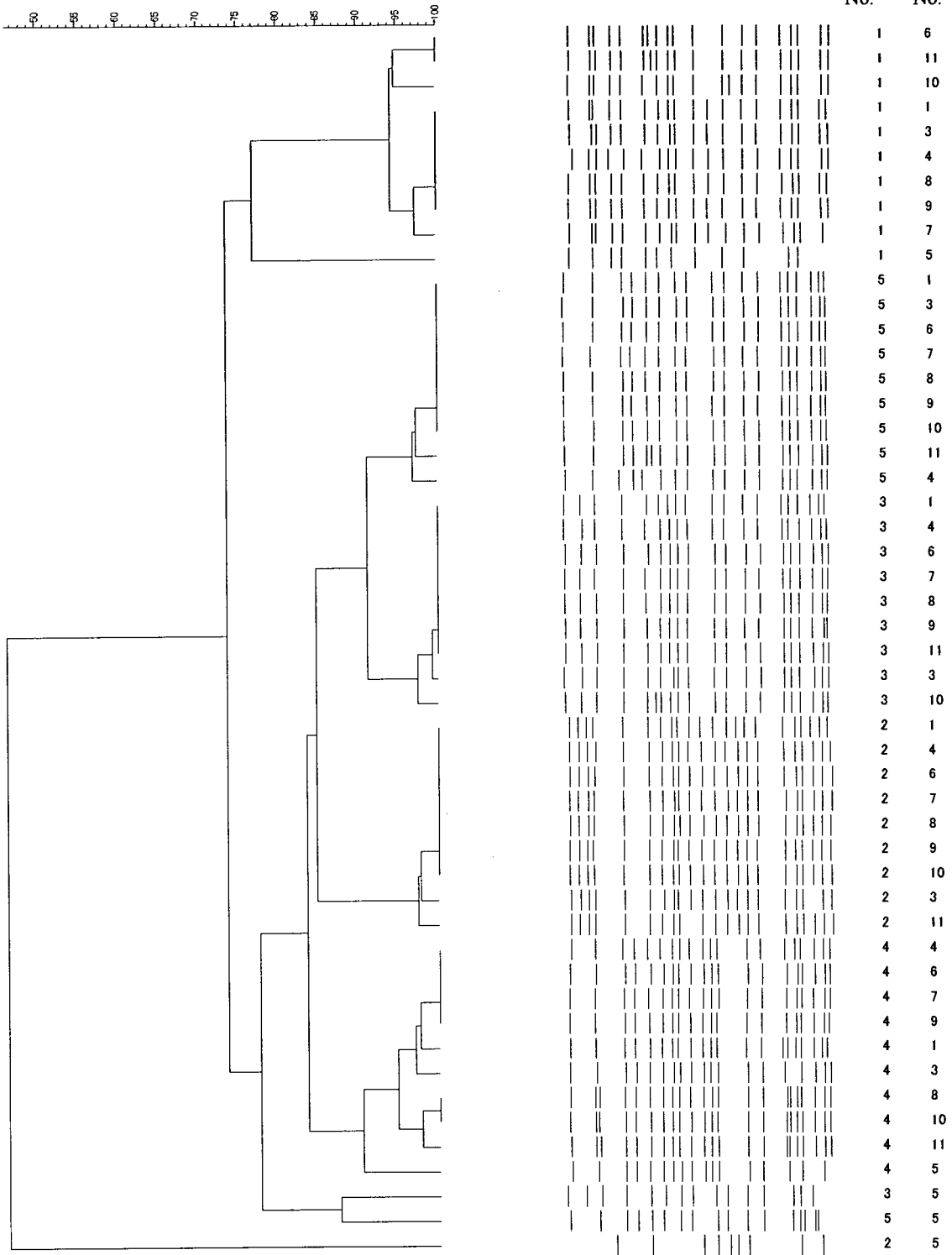


図2 A 解析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

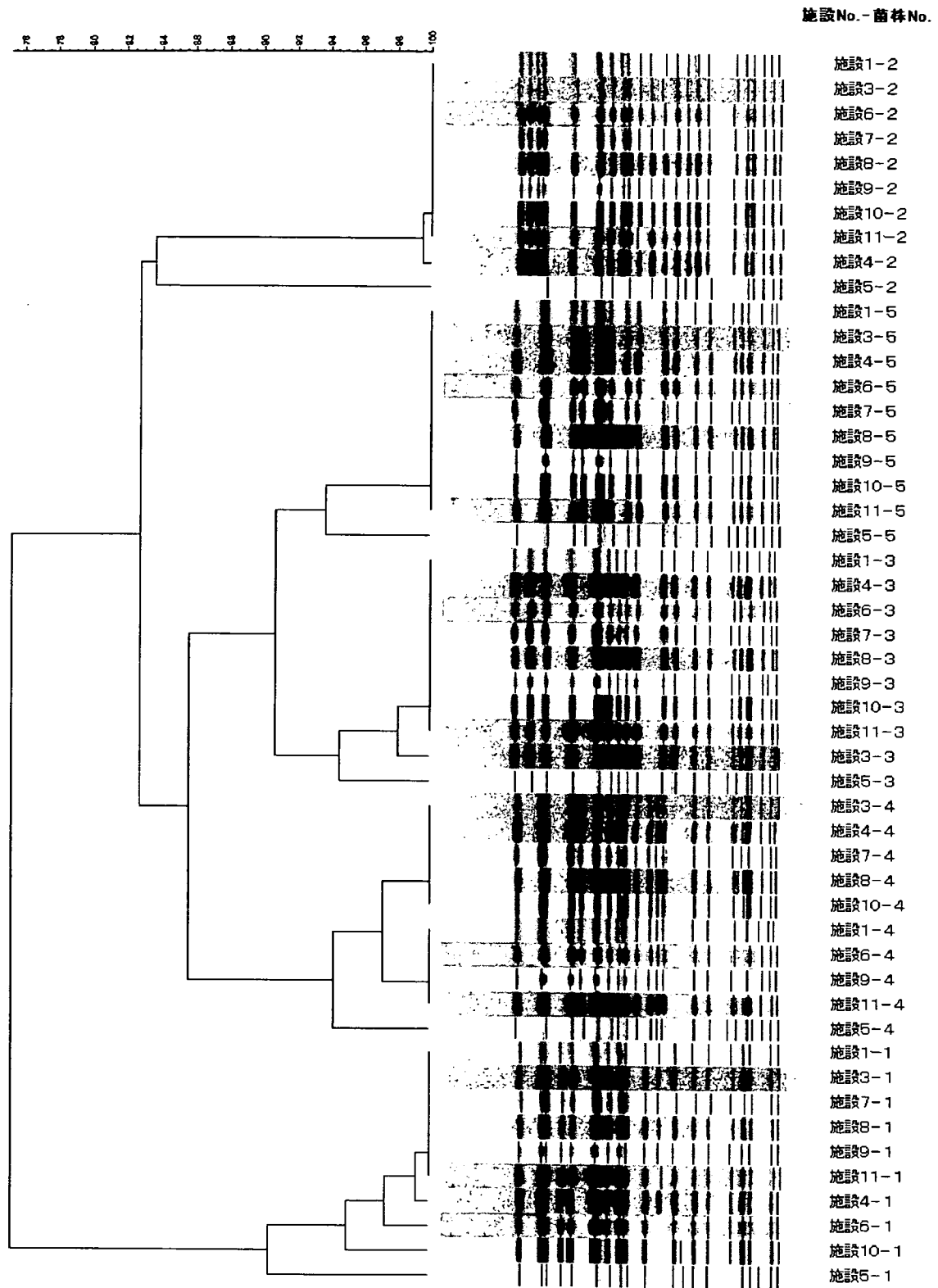


図3 B析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

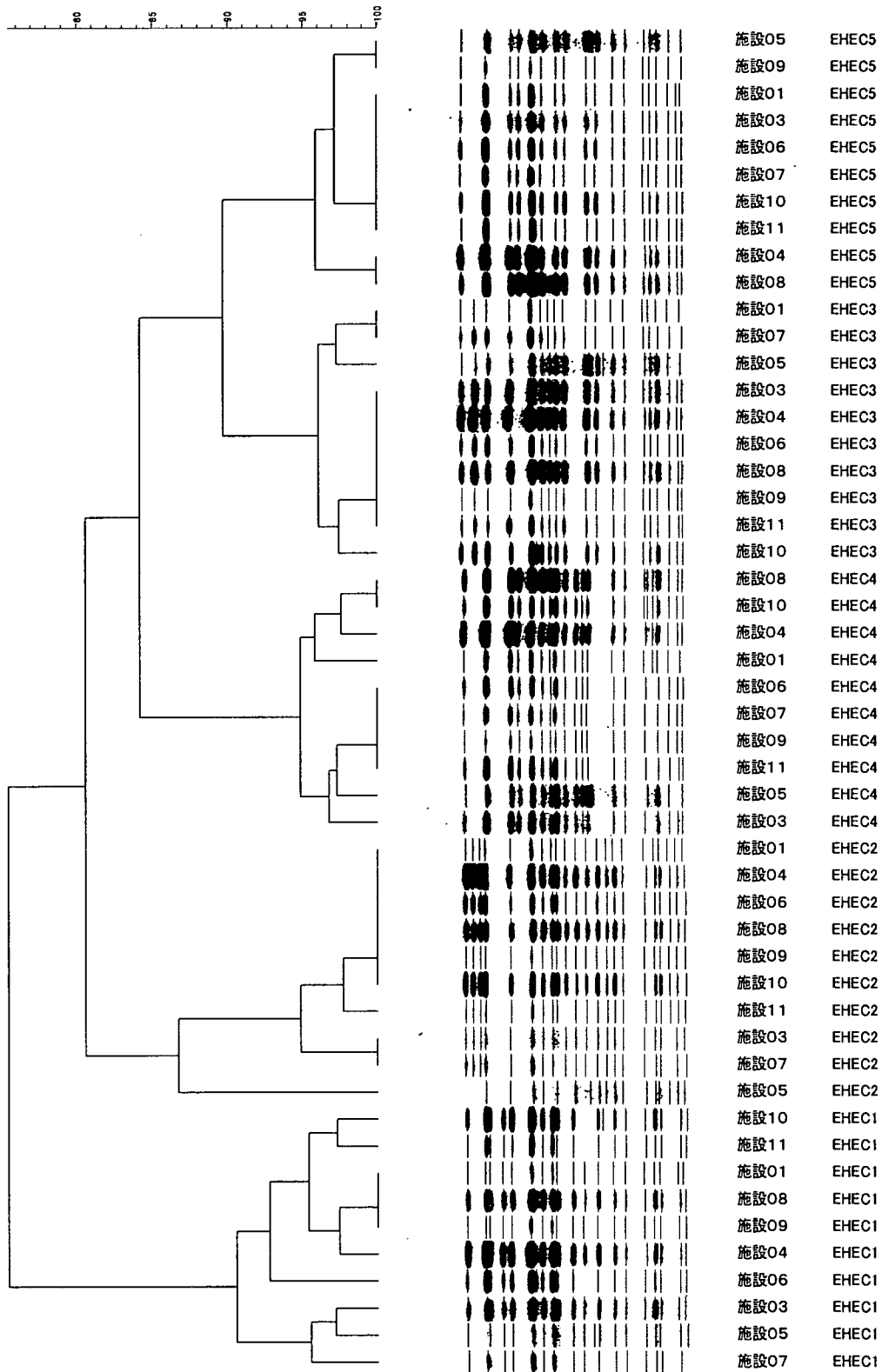
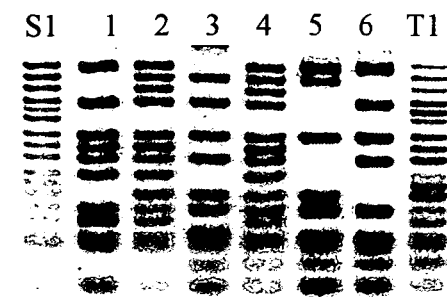


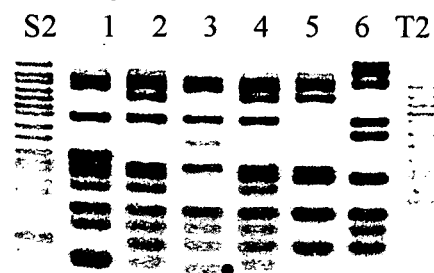
図4 C析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

施設 1

1st set primer

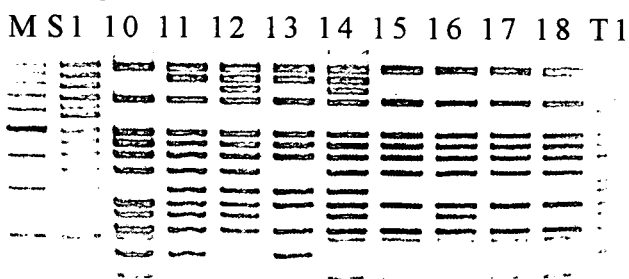


2nd set primer

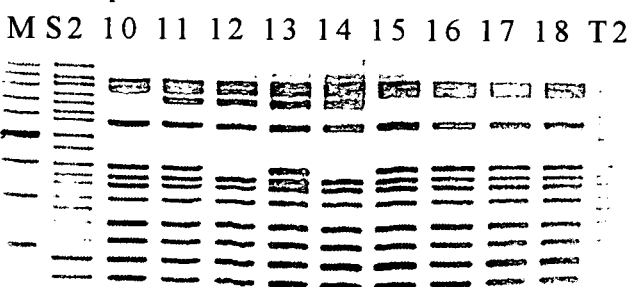


施設 3

1st set primer

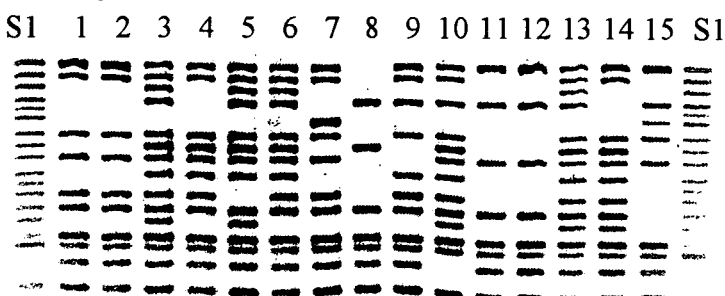


2nd set primer

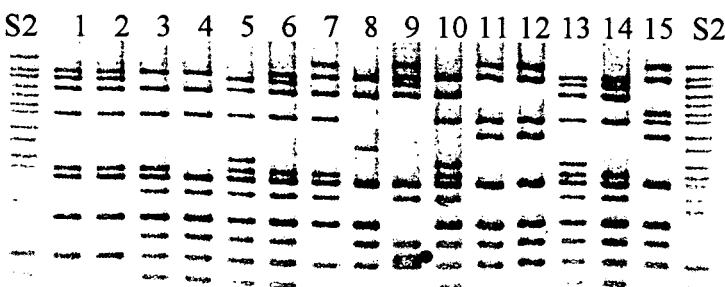


施設 5

1st set primer



2nd set primer

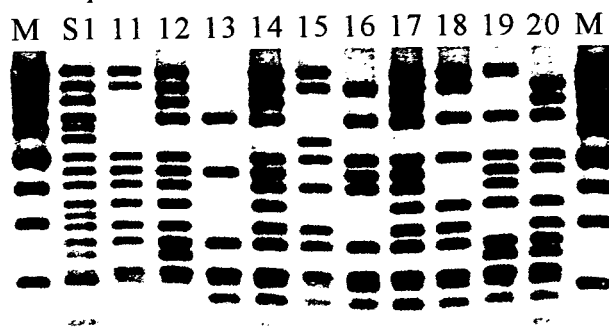


- S1 1st set Standard DNA
- S2 2nd set Standard DNA
- T1 1st set Template Mix
- T2 2nd set Template Mix
- M 100bp ladder
- 番号 各施設菌株番号
- 非特異バンド

図 5 IS-printing System の電気泳動像

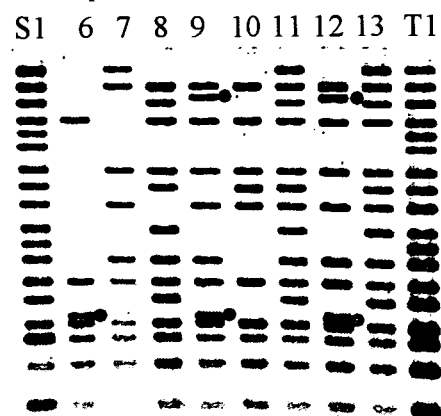
施設 4

1st set primer

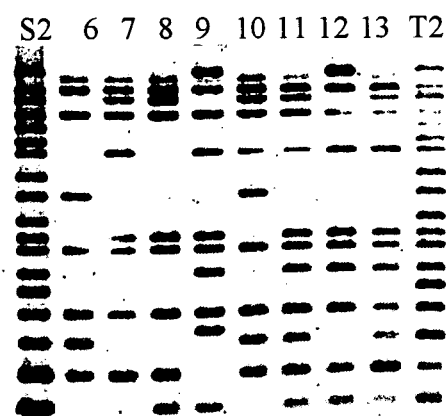
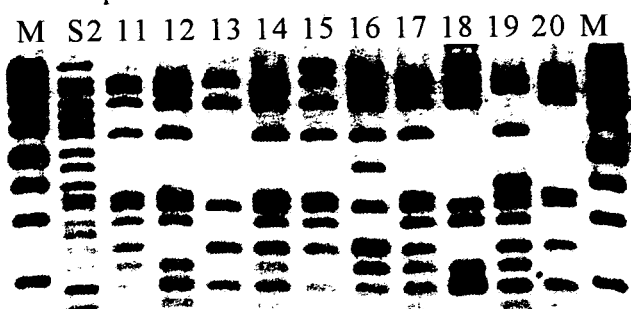


施設 10

1st set primer



2nd set primer



施設 8

1st set primer

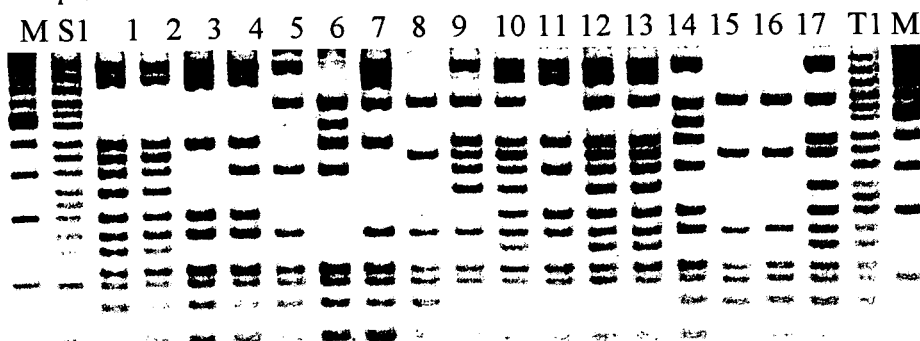


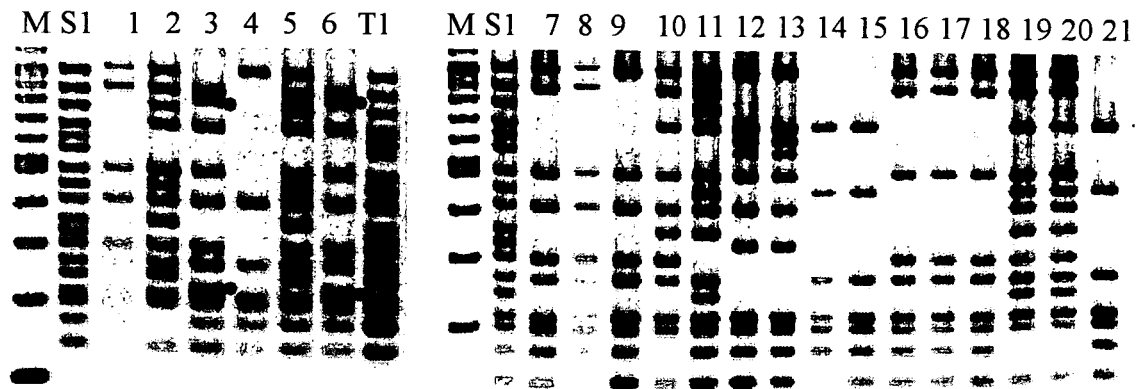
図 5 IS-printing System の電気泳動像 (つづき)

2nd set primer



施設 11

1st set primer



2nd set primer

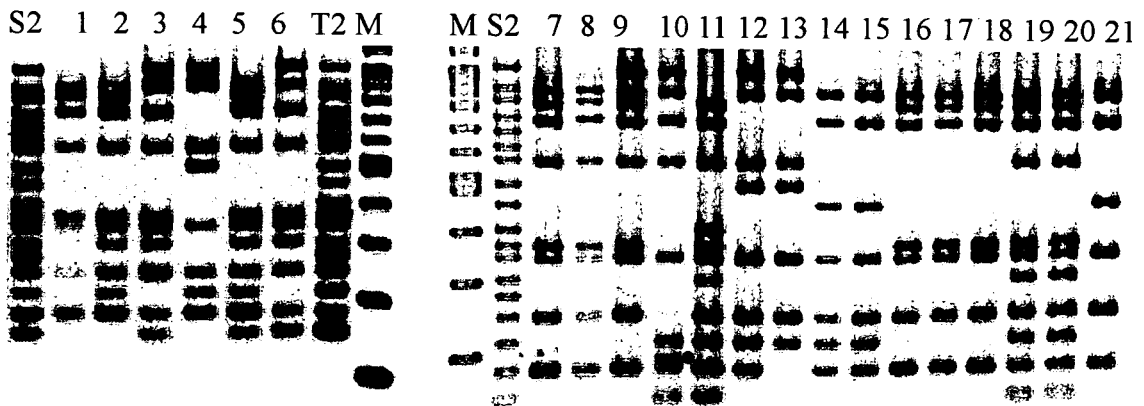
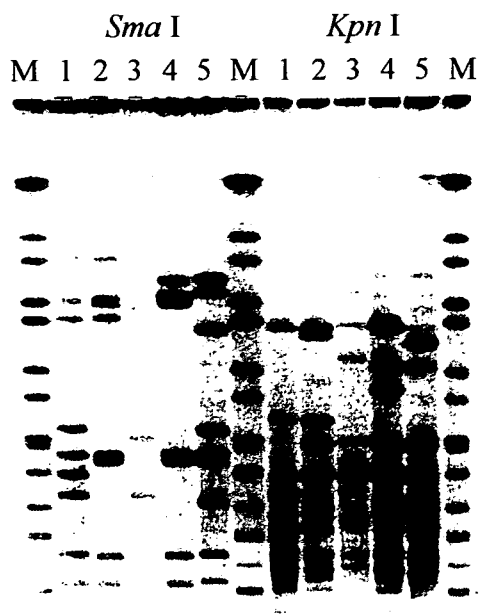
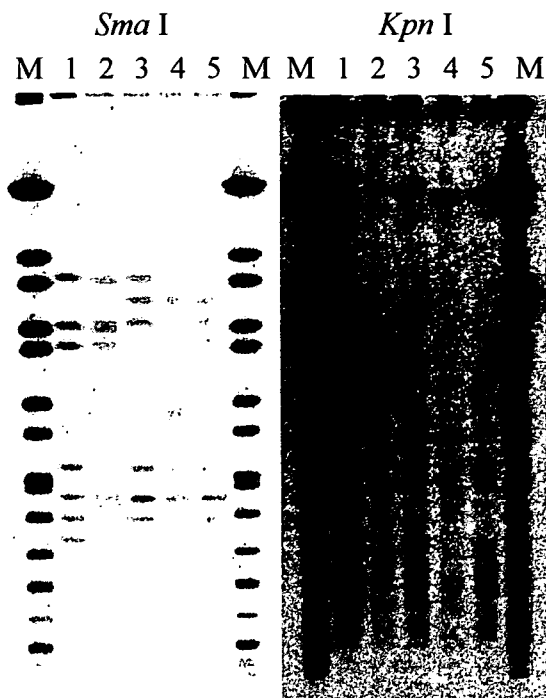


図5 IS-printing System の電気泳動像 (つづき)

施設 1



施設 3



施設 4

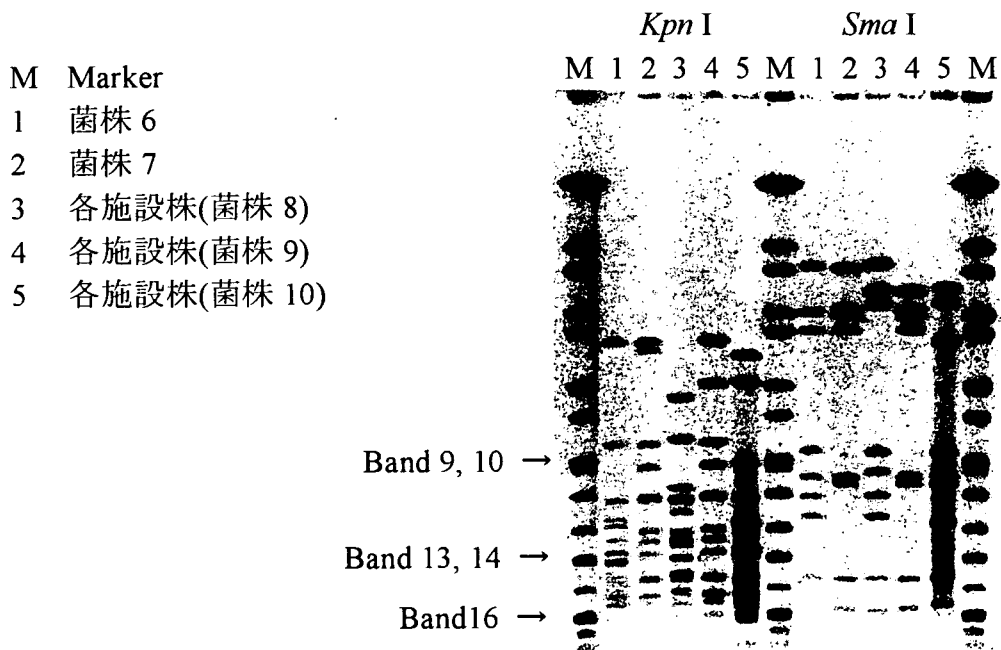
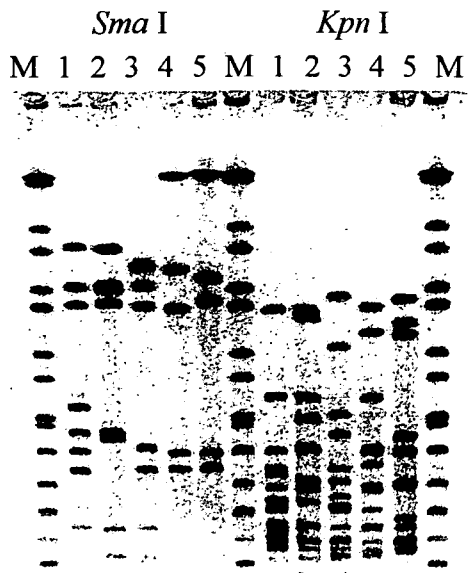
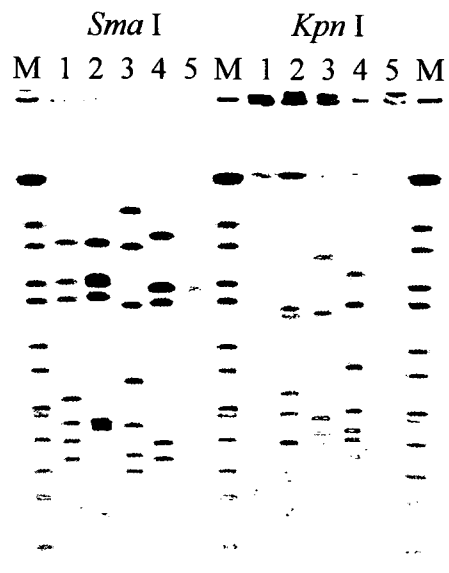


図 6 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像

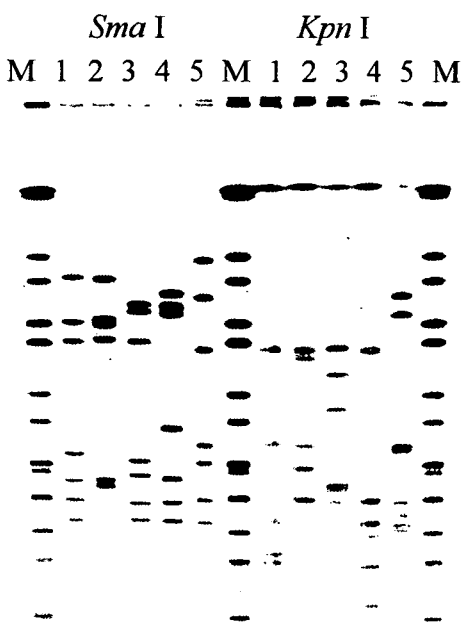
施設 8



施設 9



施設 10



施設 11

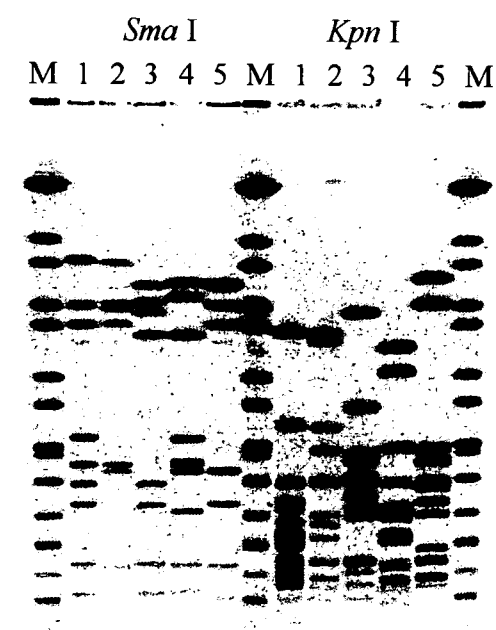


図 6 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像 (つづき)

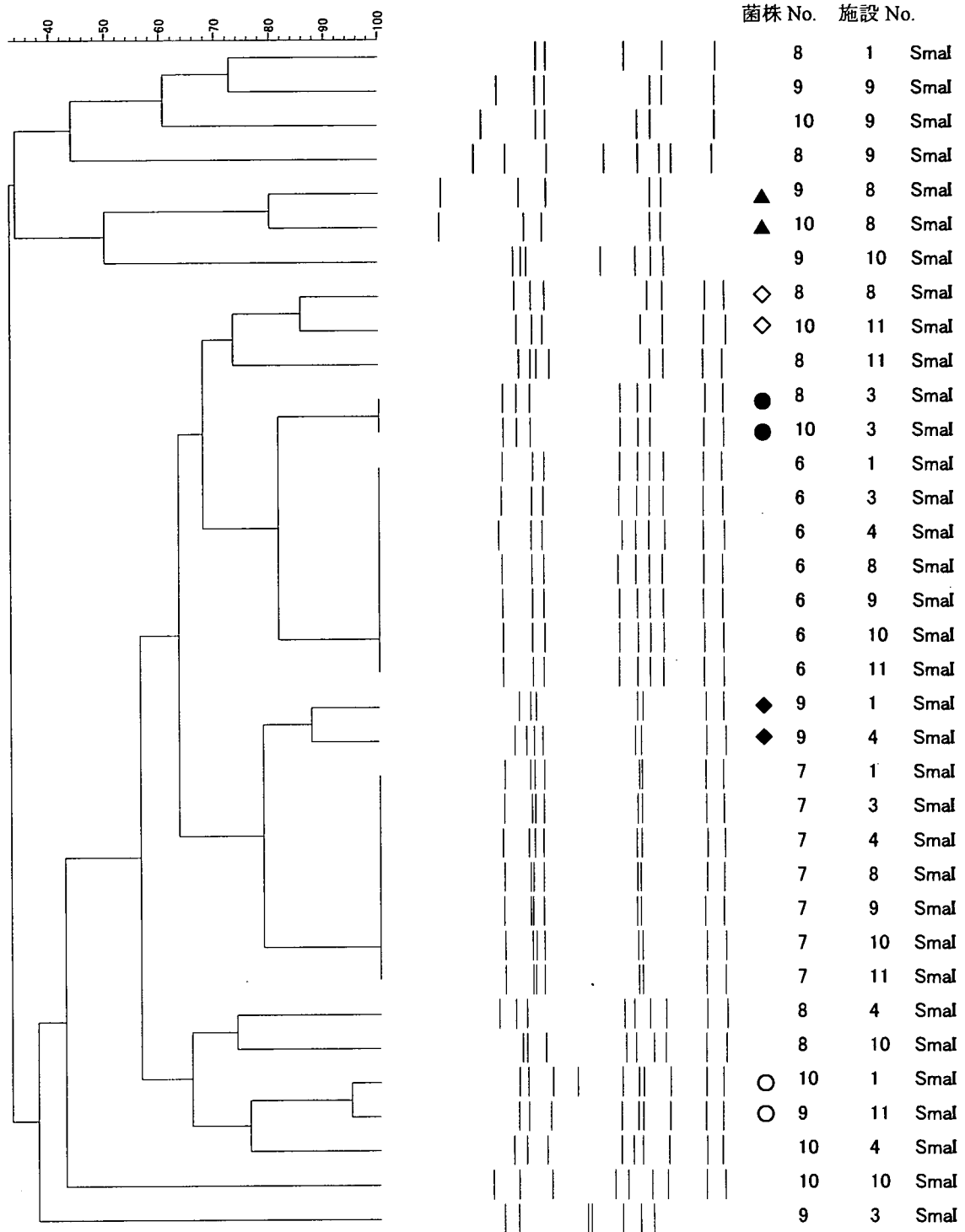


図7 A 解析者作成 *Campylobacter jejuni* のデンドログラム—*SmaI* 切断

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
CampS



菌株 No.	施設 No.	KpnI
8	4	KpnI
▲ 9	8	KpnI
6	9	KpnI
6	10	KpnI
6	1	KpnI
6	11	KpnI
6	8	KpnI
6	4	KpnI
9	10	KpnI
7	1	KpnI
7	11	KpnI
7	8	KpnI
7	4	KpnI
7	9	KpnI
7	10	KpnI
◆ 9	1	KpnI
◆ 9	4	KpnI
○ 10	1	KpnI
○ 9	11	KpnI
10	4	KpnI
8	9	KpnI
◇ 8	8	KpnI
8	11	KpnI
◇ 10	11	KpnI
8	1	KpnI
9	9	KpnI
10	9	KpnI
▲ 10	8	KpnI
8	10	KpnI
10	10	KpnI

図 8 A 解析者作成 *Campylobacter jejuni* のデンドログラム—KpnI 切断

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 19 年度分担研究報告書

複数保育施設での腸管出血性大腸菌 O157 集団発生事例

協力研究者 小笠原 準 大阪市立環境科学研究所
協力研究者 長谷 篤 大阪市立環境科学研究所

研究要旨

2007 年 8 月 1 日に市内病院から 3 歳女児（A 園）の EHEC 感染症の届出があった。調査の結果、同園園児複数から腸管出血性大腸菌（EHEC）O157（VT2）が分離された。8 月 6 日初発女児が死亡した。A 園で保育を受けた園児の所属する 3 保育施設（B 園、C 園、B 乳児センター）で調査を実施したところ、C 園の園児複数より EHEC O157（VT2）が分離された。A 園関連 9 株はパルスフィールド電気泳動（PFGE）で解析したところ、同一の PFGE 型を示した。当初 A 園からの感染拡大と考えられていた C 園関連 9 株は、A 園関連株とは PFGE 型が異なり、別の感染源によるものであった。C 園関連 9 株中 7 株は PFGE 型が一致したが、2 株はそれぞれ異なる PFGE 型を示し、保育施設での集団感染とは別の散发事例と考えられた。

A. 研究目的

大阪市内の複数の保育施設で発生した EHEC O157 感染事例について、感染経路追及の参考とするため PFGE 解析を行った。

B. 研究方法

糞便検査は CT-SMAC（栄研）を用い、ソルビット非分解のコロニーを CLIG 培地（極東）に釣菌した。血清型別および毒素遺伝子の確認は、病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）および O-157 & ベロ毒素遺伝子同時検出キット（TaKaRa）により行った。

PFGE は感染研新プロトコールに従い、供試菌株を制限酵素 *Xba*I（Roche）で処理後、1% SeaKem Gold Agarose（TaKaRa）を用い、CHEF

DRIII（Bio-Rad）で泳動した。

C. 研究結果

1. 事例の概要

2007 年 8 月 1 日、大阪市内病院より腸管出血性大腸菌感染症（EHEC O157（VT2））の発生届があった。患者は認可外保育施設（A 園）に通園していた。調査の結果、下痢で受診していた他の園児からも EHEC O157（VT2）が分離されたことがわかり、A 園での集団感染の可能性が高くなった。8 月 6 日になって初発女児が死亡した。7 月 1 日以降 A 園に一日でも通園した園児全員（25 名）に検便を勧奨したところ、陽性者はいなかった。A 園で保育を受けた園児の所属する 3 保育施設（B 園、C 園、B 乳児センタ

一)でも調査を実施したところ、C園の園児複数より EHEC O157(VT2)が分離された。B園およびB乳児センターには陽性者がいなかった。全ての陽性園児の家族も検査対象とした。検査結果を表1に示す。陽性者は園児10名、家族8名であった。

2. PFGE 型別

分離された EHEC O157(VT2)18株について、PFGE法で解析した。A園関連9株(図1:レーン1~8、11)は同一のパターンを示した。しかし、当初A園からの感染拡大と考えられていたC園関連株(図1:レーン9~10、図2:レーン1~7)は、A園関連株とはPFGE型が異なっていた。

C園関連9株の内7株のPFGEパターンは一致した。C園関連の2株(図2:レーン6~7)は、それぞれ他のいずれの株とも異なったパターンを示した。

D. 考察

当初A園からの感染拡大が疑われたC園のEHEC O157集団感染は、PFGE解析の結果よりそれぞれ別の感染源による独立した事例であることがわかった。C園関連株の内2株はA園・C園、いずれの集団発生関連株とも異なったパターンを示した。この2株は無症状感染者の姉弟より分離された株で、複数の菌型に汚染された食品が原因である可能性が高いと考えられるが、原因食品の特定はできなかった。

聞き取り調査の結果を考慮すると、今回の事例はPFGE型別の結果より、少なくとも3つの感染原の異なる事例が同時に検出されたものと考えられた。我々は大阪市内の保育施設での無症状保菌者の状況についての詳細な知見は持っていない。したがって、今回のように、2

ヶ所の近接した保育施設で連続してEHEC O157(VT2)感染症が発生し、その調査中に無症状保菌者を検出するという状況をどのように評価すべきかの判断は難しい。

いずれにしても、集団発生時の感染経路等の検証にはPFGE法による型別が不可欠であることを示す事例であった。

E. 結論

A園関連9株はPFGE型が全て一致した。当初A園からの感染拡大と考えられていたC園関連9株は、A園関連株とはPFGE型が異なり、二つの保育施設での集団発生は別の感染源によるものであった。これらの解析結果に基づき適切な指導を行うことができた。

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

小笠原 準、和田崇之、梅田 薫、北瀬照代、長谷 篤、石井營次：平成19年に大阪市内の保育園で発生した腸管出血性大腸菌感染症集団事例について、第34回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会(2007年11月、和歌山市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし