



表6. PFGE-Typeが同じでIS-printinのIDコードの関連性

Type No.	30655107406	30655632206	56643812046	56643910350	66324257737	66324257739	66324257743	66324265935	66458409931	66458475467	66458483657	66458483659	総計
c802	1	3											4
a259			2	1									3
a829				1		4	4						9
b82							2	3					5
c52								1	3				4
a94										1		2	3
b501											1	1	2
総計	1	3	2	1	1	4	6	3	1	1	1	3	30



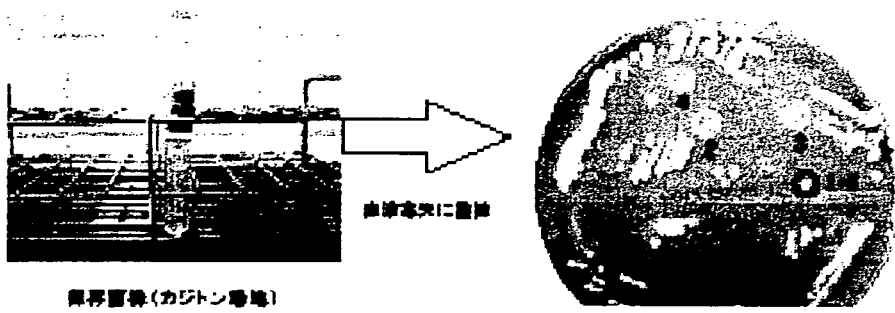


3/3		1st															2nd															VI2 VI1		Type No.					
Name	10進数コード	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		32	33	34	35	
1.16	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	b774
1.20	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c320
1.21	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c320
1.22	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c320
1.24	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c320
1.25	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c320
2.5	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c201
2.6	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c201
10.7841	66458475467	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	a94
1.72	66458483659	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c533
2.2	66458483659	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	b501
3.07047	66458483659	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	a94
3.07048	66458483659	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	a94
6.1922	66458483659	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	c822

同一県内  
同一家族  
同一家族  
同一県内

表 8. 全株のIS-printing

07014について



興野園集(カダシラ集地)

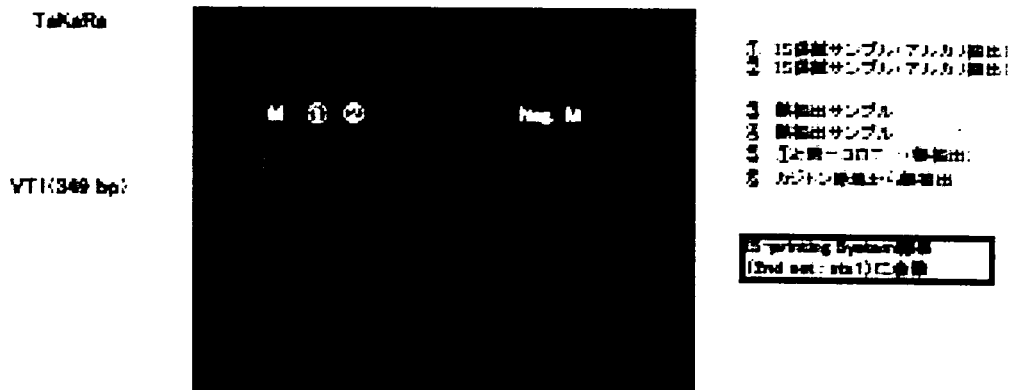


写真1. 保存した菌株から得られたコロニーの *Stx* 遺伝子型が異なった事例

Dendrogram

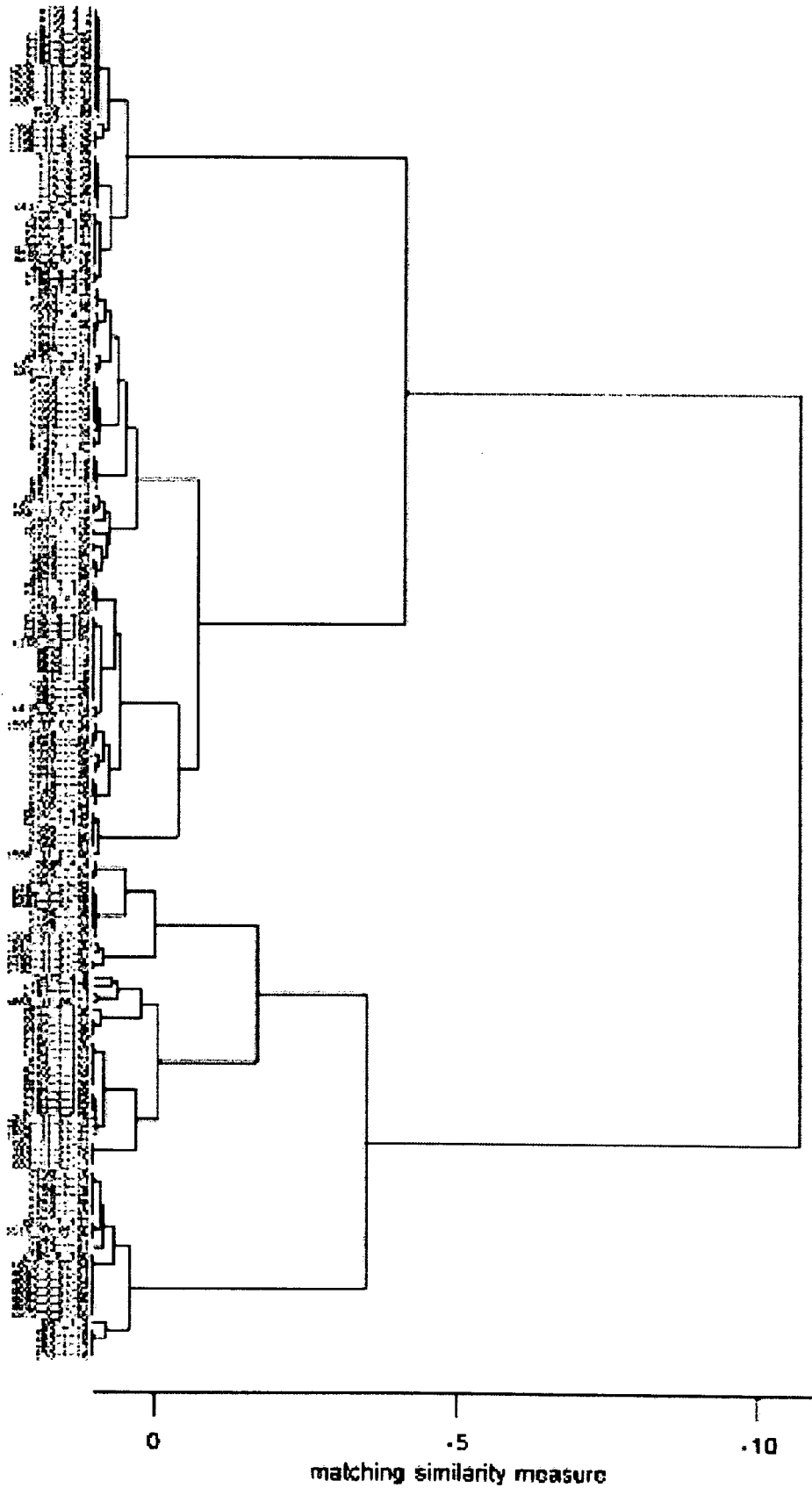


図1. IS-printing System によって得られた結果のクラスター解析



平成 19 年度 厚生労働省 新興再興感染症研究班「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」に関する九州地区 研修

*Legionella pneumophila* SBT について

場所 福岡県太宰府市向佐野 39、福岡県保健環境研究所  
 日時 平成 19 年 12 月 10 日(月)、11:00 – 19:00  
 平成 19 年 12 月 11 日(火)、9:00 – 17:00  
 講師 国立感染症研究所、細菌第一部主任研究官  
 前川純子 先生

1. 研修参加者

		氏名	所属
1班	○	村上光一	福岡県保健環境研究所
		上野伸広	鹿児島県環境保健センター
		八尋俊輔	熊本県保健環境科学研究所
		門口真由美	熊本市環境総合研究所
2班	○	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
		村瀬浩太郎	北九州市環境科学研究所
		眞子純孝	佐賀県衛生薬業センター
		右田雄二	長崎県衛生公害研究所
		堀川和美	福岡県保健環境研究所
3班	○	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
		瓜生佳世	福岡市保健環境研究所
		尾崎延芳	福岡市保健環境研究所
		江原裕子	長崎市保健環境試験所
		緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
4班	○	中村祥子	福岡県保健環境研究所
		胡 玉山	中国広州市 CDC
		河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
		久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
		竹中重幸	福岡県保健環境研究所

2. 研修内容

平成 19 年 12 月 10 日(月)、11:00 – 19:00

(1) 実習1

平成 19 年 12 月 11 日(火)、9:00 – 17:00

(2) 実習2

## Legionella pneumophila SBT マニュアル

※本マニュアルは感染症研究所の前川純子先生が作成された。

### はじめに

SBT (sequence-based typing)は *Legionella pneumophila* の型別試験法のひとつである。*L. pneumophila* の7つの遺伝子 (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*)の多型性を利用し、それぞれの遺伝子の一部領域をPCRで増幅し、定められた内部領域の塩基配列を決定し、その塩基配列の違いにより、型別を行うものである。

*Legionella pneumophila* SBT のホームページ

[http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)

\* 研修会用User ID: kyu \* Password: kyul35

### 1. 試薬等

プライマー 15 種類

EWGLI SBT Protocol Ver. 3.1 を参照。

今回は TE で 1 pmol/μL に希釈したものを working solution とする。

試薬、消耗品

一例として、AmpliTaq Gold (Applied Biosystems N8880245 他)

10x PCR Buffer (AmpliTaq Gold 添付品)

dNTP MIX (8 mM each, AmpliTaq Gold 添付品)

ExoSAP-IT (GE/USB 78200)

BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems 4337451 他)

BigDye Terminator v.1.1/3.1 Sequencing Buffer

(5x, BigDye Terminator v1.1 添付品)

Sephadex G-50 Superfine (GE 17-0041-01)

MultiScreen Plate (Millipore MAHVN4510)

Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 4311320)

(Sigma 社の同等 Formamide で代替可能)

MicroAmp Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems N8010560)

機材

一例として、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

一例として、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

遠心器: スイングローターで 2000 rpm が可能なもの

そのほか菌体より DNA を抽出するための試薬、機材等、および PCR 実験で通常必要な 1.5mL マイクロ

チューブ、200  $\mu$ L PCR 用 8 連チューブ、チップなど。

PreMIX、その他

#### PCR PreMIX

PCR 反応液から、プライマー、Taq polymerase、DNA を除いたものをあらかじめ調製しておき、4°C に保存する。1 週間以上保存する場合は-20°C。

原液濃度	1 反応	50 反応(約 5 サンプル分)*
dNTP**8 mM	2 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Buffer 10 x	2 $\mu$ L	100 $\mu$ L
milliQ 水	10.9 $\mu$ L	545 $\mu$ L

\* 1 サンプルにつき、7 PCR 反応を行うが、ロスが出るので 1 サンプルにつき 10 反応分準備する。

\*\*他の濃度のものが Taq polymerase に添付されている場合もあるが反応量は同じでさしつかえない。

#### 膨潤 Sephadex-G50 Superfine (約 5 サンプル分)

50mL ポリプロピレンチューブに Sephadex-G50 Superfine 3g と milliQ 水 30mL を入れ、均一化した後に 4°C に一晩おく。

## 11. SBT

### 1. ゲノム DNA の調製

EWGLI SBT Protocol Ver. 3.1 に従い、*L. pneumophila* から DNA を調製する。

あるいは PCR グレードの DNA 調製法であれば他の方法でもよい。

### 2. PCR

#### 1) Primer MIX の調製

7 つの遺伝子について各プライマーセットを用いて PCR で増幅する。1.5mL マイクロチューブ 7 本に 1-7 の番号をふり、それぞれの番号に対応する Primer MIX を下の表に従って調製する。

1. *flaA*
2. *pilE*
3. *asd*
4. *mip*
5. *mompS* (R プライマーは *mompS*-1116R を使う)
6. *proA*
7. *neuA*

1 反応量 x サンプル数 +  $\alpha$  \*

PCR PreMIX	14.9 $\mu$ L	x	=	$\mu$ L
1 pmol/ $\mu$ L Primer F	2 $\mu$ L	x	=	$\mu$ L
1 pmol/ $\mu$ L Primer R	2 $\mu$ L	x	=	$\mu$ L

一例 AmpliTaq Gold  $0.1 \mu\text{L} \times$   $= \mu\text{L}$

\*サンプル数が2ないし3以上10以下の場合は $\alpha=1$ 、20以下の場合は $\alpha=2$ とする。以下同様。サンプル数が1ないし2の場合は、2)の\*に従う。

2) 8連チューブの1-7の列に上記のプライマーのはいった Primer MIX を  $19 \mu\text{L}$  ずつ分注する。

\*サンプル数が1ないし2の場合は、1)の Primer MIX は作らずに、PCR PreMIX に Taq polymerase を加え、 $15 \mu\text{L}$  (PreMIX  $14.9 \mu\text{L}$  + Taq polymerase  $0.1 \mu\text{L}$ ) ずつ8連チューブに分注した後に Primer F と R を  $2 \mu\text{L}$  ずつ加える。

3) ゲノム DNA を  $1 \mu\text{L}$  ずつ8連チューブに加える。

4) キャップをして、以下の条件で PCR をかける。(GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)の場合)

$95^\circ\text{C}$  10 min (AmpliTaq Gold を用いた場合。酵素により時間は変更する)

$95^\circ\text{C}$	30 sec	} 35 cycles
$55^\circ\text{C}$	30 sec	
$72^\circ\text{C}$	30 sec	

$72^\circ\text{C}$  5 min

5) 必要に応じて PCR 産物が得られているかアガロースゲル電気泳動等を用いてチェックする。

### 3. プライマーおよび dNTP の除去

1) ExoSAP-IT の 20 倍希釈液を調製する。

約 5 サンプル分の場合

ExoSAP-IP  $20 \mu\text{L}$

milliQ 水  $380 \mu\text{L}$

(残った場合は  $-20^\circ\text{C}$  で保存する。次回は、冷凍したものから用いる。)

20 倍希釈 ExoSAP  $10 \mu\text{L}$  を PCR 産物の入ったチューブに加える。

2) 以下の条件で PCR 機器を用いて、インキュベートする。

$37^\circ\text{C}$  30 min

$80^\circ\text{C}$  15 min

### 4. シークエンス反応

1) BigDye Terminator ver1.1 を用いて PCR 産物のラベリングを行う。まず、プライマー及び PCR 産物を含まない反応液を調製する。

	1 反応量		サンプル数 * x20
BigDye Term	$0.5 \mu\text{L}$	x	$= \mu\text{L}$
5x Buffer	$1.5 \mu\text{L}$	x	$= \mu\text{L}$
milliQ 水	$7.0 \mu\text{L}$	x	$= \mu\text{L}$

\*サンプル数が1ないし2の場合は、サンプル数 x16 で調製し 2)はとぼして 3)の\*に従う。

2) 1.5mL マイクロチューブ 14 本に 1F, 1R-7F, 7R の番号をふり、BD PreMIX を調製する。

1)の反応液  $9 \mu\text{L} \times (\text{サンプル数} + \alpha^*) =$   
F または R プライマー  $0.5 \mu\text{L} \times (\text{サンプル数} + \alpha^*) =$

\*サンプル数が 10 以下の場合は  $\alpha=1$ 、20 以下の場合は  $\alpha=2$  とする。以下同様。

それぞれの番号に対応するプライマーは以下の通りである。

1F. *flaA*-F

1R. *flaA*-R

以下も同様に、F と R を用意する。

2. *pilE*

3. *asd*

4. *mip*

5. *mompS* (R プライマーは *mompS*-1015R を使う)

6. *proA*

7. *neuA*

3) 96 穴プレートの A-G の行にそれぞれ、

A. *flaA*

B. *pilE*

C. *asd*

D. *mip*

E. *mompS*

F. *proA*

G. *neuA*

の F または R プライマーを含む BD PreMIX を  $9.5 \mu\text{L}$  ずつ分注する。奇数列には F プライマーの、偶数列には R プライマーを含む BD PreMIX を分注する。

\*サンプル数が 1 ないし 2 の場合は、2) の Primer MIX は作らずに、1) のシーケンス反応液を  $9 \mu\text{L}$  ずつ 8 連チューブに分注した後に、各プライマーを  $0.5 \mu\text{L}$  ずつ加える。サンプルごとに F と R の 2 本の 8 連チューブを準備することになる。

4) ExoSAP-IT 処理が終わった PCR 産物を BD PreMIX の入ったウェルに  $0.5 \mu\text{L}$  ずつ分注する (F に  $0.5 \mu\text{L}$ 、R に  $0.5 \mu\text{L}$ )。

5) プレートにゴムの蓋をし、以下の条件でシーケンス反応を行う。

$96^\circ\text{C}$  10 sec

$96^\circ\text{C}$  10 sec

$50^\circ\text{C}$  5 sec

$60^\circ\text{C}$  4 min

} 25 cycles

以下、ゲル濾過による精製、あるいは Xterminator を用いた精製のいずれかを行う。

<ゲル濾過による精製>

6) 反応後、各ウェルに milliQ 水を  $10 \mu\text{L}$  ずつ加える。

- 7) Multi Screen Plate の下にふたをはずした 96 穴プレート(PCR 用ではなく、ELISA や細胞培養等に用いる通常のもの)をセットする(横をビニールテープ等で仮止めする)。Multi Screen Plate の各ウェルに膨潤化した Sephadex-G50 Super Fine を 400  $\mu$ L ずつ分注する。
- 8) スイングローターを用いて、2000 rpm で 10 min 遠心して、余分な水分を捨てる。バランスをとること。
- 9) Multi Screen Plate の下に、96 穴 PCR プレートセットし、ラベリング反応液全量を Sephadex-G50 の上、各ウェルの中心にアプライする。
- 10) スイングローターを用いて、2000 rpm で 2 min 遠心する。バランスをとること。
- 11) 溶出液のはいった 96 穴 PCR プレートに 10  $\mu$ L ずつ HiDi を分注する。
- 12) PCR 機器を用いて、96 穴 PCR プレートを 96°C 2-3 min 熱変性をおこなう。以下 13)へ。  
<Xterminator を用いた精製>
- 6) 反応後、各ウェルに SAM 溶液を 25  $\mu$ L、Xterminator を 5  $\mu$ L ずつ加える。
- 7) プレートにシールをする。
- 8) シェーカーで、30 分間攪拌する。
- 9) 各ウェルに 10  $\mu$ L ずつ HiDi を分注する。
- 10) 1000 rpm で 2 分間遠心する。
- 11) 熱変性は行わない。
- 12) Instrument Protocol は Xterminator 専用のもを用いる。
- 13) キャピラリーシークエンサーを用いて、DNA 配列を決定する。
- 14) Sequencing Analysis software で解析を行い、良好なシグナルが得られていることを確認する。
- 15) [http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq\\_assemble\\_legionella1.cgi](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/sbt/seq_assemble_legionella1.cgi) にアクセスし、得られたシークエンスファイルを送り、ST を決める。
- 16) 前項が何らかの理由でできない場合は、適当な解析ソフトを用いて、塩基配列をテキスト化し、  
[http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella\\_sbt/php/sbt\\_homepage.php](http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) に入力し、ST を決める。

(付録)

細菌同定用のユニバーサルプライマー(16S rRNA 遺伝子増幅用プライマー)について

MicroSeq-F: 5-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3

MicroSeq-500R: 5-TACCGCGGCTGCTGGCAC-3

PCR の条件およびシークエンス反応条件は SBT と同様に行う。

適当な DNA 解析ソフトを用いて、得られた塩基配列を

<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>

に入力する。

検索対象データベースとして、16S rRNA (Prokaryotes) を選ぶ。

入力内容を送信する。

米国及び極東米軍基地に流通する冷凍ビーフパティールによる  
腸管出血性大腸菌 O157:H7 の感染事例と原因食品の加熱試験

沖縄県衛生環境研究所: 久高 潤, 安里龍二, 糸数清正, 中村正治, 平良勝也.

沖縄県中部保健所: 国吉秀樹, 金城夕子. 国立感染症研究所: 寺島 淳, 渡辺治雄, John Kobayashi.

Centers for Disease Control and Prevention: Swaminathan, B., Braden, C. R., Dunn, J. R.

**要 旨** 2004 年 2 月, 沖縄県中部福祉保健所および沖縄県衛生環境研究所は, 同一家族内で発生したハンバーグの喫食に関連する大腸菌 O157:H7 感染の 3 症例を調査し感染源を特定した。本事例は, 日本の公衆衛生機関によって汚染が発見され, 日米複数の公衆衛生部局の協力により米国本土と極東地域の米軍基地において, 約 9 万ポンドの冷凍牛ひき肉が自主回収された初事例である。また, 今回, この感染の原因となった冷凍ビーフパティールを用いて加熱試験を行った結果, 十分解凍せず調理を行った場合, 通常の加熱方法では O157 が生存することが示された。

**A. 事例の概要**

2004 年 2 月 17 日沖縄県中部保健所(中部保健所)は, 入院中の小児患者 1 例において O157 による 3 類感染症の報告を受けた。患者は 6 日前の 2 月 11 日に発症していた。聞き取り調査により, 患者の姉 1 名が同様の症状を呈しており, 家族全員が 2 月 6 日にハンバーグを喫食していたことが判明した。検査の結果, 患者の姉, および無症状の母から O157:H7 が分離された。この家族が食べたハンバーグは米国製の冷凍ハンバーグ用ビーフパティール(パティール)で, 在沖縄米軍の売店で購入したものである。中部保健所が患者宅冷凍庫に残っていたパティールを回収し, 沖縄県衛生環境研究所(当所)にて大腸菌 O157:H7 が分離された。沖縄県より疫学調査結果および検査結果の連絡を受けた在沖縄米国海軍病院が, 未開封の同ロットのパティールを売店から入手し,

当所で検査したところ, 検査した 7 枚のパティール全てから O157:H7 が分離された。パティール 1 枚あたりの O157 菌量は平均 171cfu/patty (1.47cfu/g)であった。症例を含む 3 名からの分離株, 患者宅から回収されたパティール, および未開封のパティールからの分離株について, 国立感染症研究所および当所にて PulseNet プロトコールに準じてパルスフィールド電気泳動法による解析(PFGE)を実施したところ, パターンは一致した。結果は米国の Centers for Disease Control and Prevention(CDC) の PulseNet に送信され, 米国の分離株と比較された。この PFGE パターンはこれまで, 日本および米国 PulseNet データベースでみられなかったものであった。

溯り調査の結果, 同ロットのパティールは米国の会社で 2003 年 8 月 11 日に製造されたことが突き止められた。同日に製造された生およ

び冷凍のひき肉商品は、極東の米軍基地とカリフォルニア、アイダホ、オレゴン、およびワシントン州の基地および小売店に出荷されていた。この調査の結果、2月25日、米国農務省の食品安全検査機関(FSIS)は約9万ポンド(約4万トン)の冷凍牛ひき肉、および牛ひき肉製品のリコールを発表した。

この調査の数週間後に、さらに3つの腸管出血性大腸菌 O157 感染症が確認されたことが、CDC の調査で判明した。1つは日本(沖縄)で2つはアメリカ合衆国である。2月27日、沖縄に駐留する米国軍人の家族で11歳の子供が腸管出血性大腸菌感染症で入院した。この分離株の PFGE パターンはこのレポートの事例と同一であった。この家族は、同じブランドの冷凍ビーフパティ―を在沖縄米軍基地内の売店で購入した。リコールの2日前である2月22日にハンバーガーとして調理され喫食していた。製造業者は同じであったが、家族がリコールの情報を受けパッケージを捨ててしまった後であったため、同じロットであったかは確認できなかった。

## B. 研究方法

### **O157 検出法, 汚染菌量, 加熱後の O157 生存確認試験**

#### 1) 冷凍パティ―から O157 の検出

患者宅より回収した冷凍パティ―3枚と同一未開封ロット7枚の計10枚について O157 の検出を行った。検体25gをそれぞれノボジオン加 mEC 培地にて42°C, 24時間培養後、蛍光酵素免疫測定法 Vidas *E. coli* O157 を用いて O157 のスクリーニング試験を行った。また、培養液1mlを Dymabeads anti *E. coli* O157 を用い免疫磁気ビーズ法にて100 $\mu$ lに集菌した。そのうち50 $\mu$ lを CT-SMAC 寒天培

地に各線培養し37°C, 20時間培養した。残りの50 $\mu$ lは PCR 法にて、スクリーニング的に Vero 毒素遺伝子の検出を行った。CT-SMAC 寒天培地に発育した O157 の特徴的集落を釣菌し、CLIG 寒天培地による生化学的性状試験、ラテックス凝集反応による O157 及び H7 凝集試験、PCR 法及び RPLA 法による Vero 毒素確認試験を行い腸管出血性大腸菌 O157 の同定を行った。

#### 2) 原因食品の汚染菌量

患者宅回収冷凍パティ―3個及び同一未開封ロット製品3個の計6個について、MPN3 本法にて O157 の菌数測定を行った。菌の検出法は免疫磁気ビーズ法上記と同様の方法で実施した。

#### 3) 患者分離株およびパティ―(患者宅回収品および未開封同一ロット品)の PFGE

患者3名の分離株、患者宅から回収された冷凍パティ―3個からそれぞれ分離された株及び同一未開封ロット製品5個からそれぞれ分離された5株の合計11株について、PulseNet プロトコールに準じて PFGE を実施した。

#### 4) 冷凍食品の規格基準検査

未開封で同一ロットのパティ―6枚について、日本の食品衛生法が示す冷凍食品の成分規格基準及び検査法により大腸菌、生菌数及び大腸菌群の検査を実施した。

#### 5) 冷凍パティ―の加熱試験

原因食品の表示に記されている調理法に従い、原因食品の冷凍パティ―(116g;  $\phi$ 12cm  $\times$  厚さ12mm)を冷凍のまま(n=3)ガスコンロとフライパンを用い、中火(フライパン表面温度230~250°C)で片面1分30秒ずつの計3分間、パティ―中心部で深さ6mmの中心温度を測定しながら調理した。また、冷蔵庫にて一



晩解凍後(n=4)ホットプレートを用いて 200℃、中心温度を測定しながら中心温度が 71℃に達するまで調理した。調理終了後、上記の方法にて O157 の検出を行った。

### C. 研究結果および考察

患者宅から回収した製品 3 個及び同一未開封ロット製品 7 個の計 10 個について O157 の検査を行った結果、すべてのパティ―から O157:H7, Stx.1&2 が検出された。また、患者 3 名、患者宅から回収されたパティ―および未開封同一ロット製品からそれぞれ分離された O157 株の PFGE パターンはすべて同一であった(図 1)。このことから、原因食品は当該ビーフパティ―であることが証明され、また、同一ロットが広範囲に汚染されていることが示唆された。

今回、食中毒の原因となったパティ―の加熱試験の結果を表 1 に示す。冷凍パティ―の O157 汚染菌量は 1gあたりの最確数(MPN)は、0.3 以下~2.8M/g、平均 1.47/g であり、パティ―1 枚あたりに換算すると 30 以下~325、平均 171/patty であった。同様の事例で 1992~93 年にかけて米国ワシントン州のファーストフードチェーン店でおきた大規模食中毒の際の汚染菌量 MPN 値は 1.5/g(レンジ:<0.3~15)、パティ―あたり 67.5/patty(<13.5~675)<sup>1)</sup>で、今回のケースも、これと同様の結果であった。

本事例における冷凍パティ―の平均生菌数は 55,900/g、*E. coli* は陰性であったことから、食品衛生法による冷凍食品のうち加熱後接種冷凍食品の規格基準(生菌数 3,000,000/g 以下かつ *E. coli* 陰性)をみたしていた。この結果から流通・消費過程での不適切な温度管理はなかったことが示唆される。

凍結状態のパティ―3 検体を、製品のラベルに記載された方法により調理した結果、中心部すべてのパティ―から、1 個あたりの<30~174 個の O157 が検出された。そのうち 2 検体は中心温度が約 80℃に達しているにもかかわらず、O157 は死滅していなかった。一方、解凍後、調理温度 200℃で中心温度が 71℃に達するまで調理した 4 検体パティ―からは、O157 は検出されなかった。このことから、ハンバーグの安全な調理には、電子レンジあるいは冷蔵庫で十分解凍したものを、中心温度を測定しながら調理することが重要であることが再確認された。米国食品医薬品局(FDA)の報告によると、パティ―の製造基準として最低調理温度(中心部)は、68.3℃である。本温度で O157 は 8 秒で死滅する。従って本温度で 15 秒以上の処理時間が求められている。また、USDA はパティ―を安全に調理するためには、中心温度が 71℃に達するまで加熱することを指導している。しかしながら、パティ―中の O157 の熱抵抗性は、菌の保存温度、保存期間により異なり、-18℃の低温に保存した菌のほうが 15℃に保存したものより熱抵抗性が高いとの報告<sup>2)</sup>がある。

今回のケースについて、患者らが喫食したパティ―の調理方法の詳細は不明であるが、おそらく、今回の食中毒原因食品のパティ―には、1 枚あたり<30~325 個の O157 が付着しており、不完全調理により O157 が生存した可能性が推察された。O157 が検出された発症者のうちパティ―2 個を喫食した 8 歳次男が 4 日後、1 枚を喫食した 12 歳長女が 9 日後に発症している。当事例は、大量にしかも広範囲に流通した食品が原因であり、大規模な集団発生につながる可能性も十分あったが、沖縄県と海軍病院、感染研及び CDC の連携と

USDA の迅速な対応により、患者発生の発生を最小限に防げたものと考える。

#### E. 結論

本集団発生は小規模な事例ながら、冷凍食品の中では食品媒介病原体が長期間生存することの重要性を示す事例であった。さらに、牛ひき肉における腸管出血性大腸菌汚染防止の必要性と、消費者が安全な調理のガイドラインを遵守することの必要性を示している。また、国際的な食中毒発生の可能性、国際的連携の必要性、標準化された分子疫学的手法の有用性、PulseNet の有用性が示されている。

#### F. 研究発表

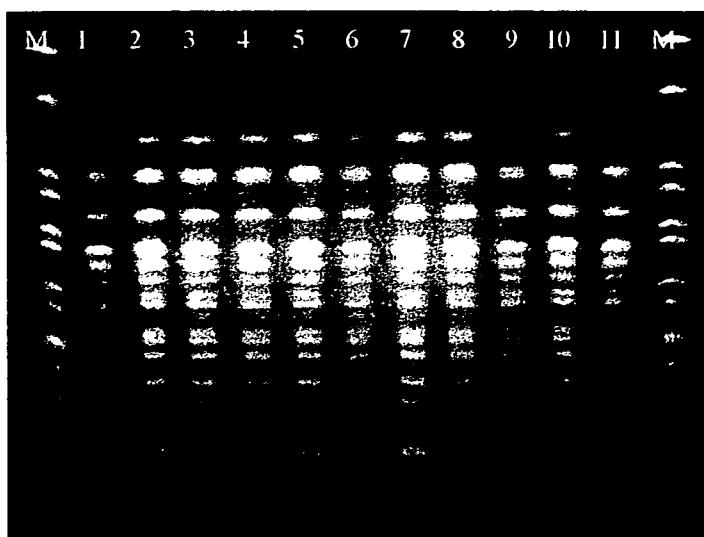
1) Kudaka, J., Asato, R., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Kuniyoshi, H., Kinjo, Y., Terajima, J., Watanabe, H., Kobayashi, J., Swaminathan, B., Braden, CR., And Dunn, JR. *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated

with Ground Beef from a U. S. Military Installation- Okinawa, Japan, February 2004. *MMWR*; 54, 40-42, 2005.

#### G. 参考文献

- 1) Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M. P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R. V., Griffin, P. M. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol Infect.* 122, 185-192. 1999.
- 2) Jackson TC, Hardin MD, Acuff GR. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties influenced by storage and holding temperatures. *J Food Prot.* 59(3), 230-237, 1996.

図 1 患者 3 名、患者宅のビーフパティおよび米軍基地内から回収された未開封同一ロットから分離した腸管出血性大腸 O157:H7, Stx.1+2 の PFGE パターン(制限酵素 *Xba* I)



M: *S. Braenderup* H9812, Lane 1: 患者 8 歳・男, Lane 2: 患者 14 歳・女, Lane 3: 保菌者 12 歳・男, Lane 4 ~ Lane 6: 患者宅に保存されていたビーフパティ, Lane 7~Lane 11: 米軍売店から回収された未開封同一ロットビーフパティ. 写真は当所にて泳動したものを示した.

表1 食中毒の原因となった冷凍ビーフパティの加熱試験

No.	加熱前の状態	加熱温度℃	加熱時間 分:秒	中心部温度℃		O157 結果	菌量 MPN/patty
				最低	最高		
1	冷凍	200-230	3:00	-1	68	+	104
2	冷凍	200-250	3:00	-4	79	+	46
3	冷凍	200-250	3:00	-4	80.6	+	174
4	解凍	200-250	3:00	5	75.9	-	<30
5	解凍	200	3:00	8.8	71.1	-	<30
6	解凍	200	3:10	17.9	71.1	-	<30
7	解凍	200	3:20	8.8	71.1	-	<30

PFGE により湧水を原因と特定し得た *Yersinia pseudotuberculosis* による家庭内感染事例

協力研究者 鹿児島県環境保健センター 微生物部

上野伸広 本田俊郎 蓑田祥子 石谷完二 松山茂樹 藏元強

**要 旨** 湧水を原因と特定した *Yersinia pseudotuberculosis* による家庭内感染事例を経験した。家族 10 名のうち4名が発症し、無症状者1名を含む3名から同菌を分離した。湧水による水系感染が疑われたため、水源から家庭の蛇口までの水系等を調査したところ、いくつかの地点で同菌を分離した。ヒトと水系由来の同菌について PFGE を行った結果、パターンが一致した。PFGE による分子疫学的解析は、*Yersinia pseudotuberculosis* についても有用であることを確認した。

**A. はじめに**

エルシニア感染症は、胃腸炎症状以外にも多彩な病状を呈し、時に川崎病の重要な鑑別疾患となることでも知られている。

今回、川崎病症状を呈した患者便から、*Yersinia pseudotuberculosis* (以下、*Y.p*) を分離し、感染原因の特定のため現地調査を実施したところ、環境材料からも *Y.p* を検出したため、PFGE を行い、その原因を特定し得たので報告する。

**B. 事例の概要**

2007 年 11 月、川崎病症状を呈した患者が同一家族内から複数発生し、抗生剤治療で解熱傾向を認めたことから、その鑑別疾患であるエルシニア感染症を疑う症例について、保健所及び医療機関から検査依頼があった。便培養を実施した結果、無症状者1名を含む3名から *Y.p*SGO1 を分離した(表1)。

患者の家族構成は両親と兄弟8名の計 10 名が生活を共にしており、うち5歳から18歳の兄弟4名が発症した。患者家族以外に症状を呈する

ものがなく、共通食も家庭内に限られていた。

患者宅は山間部に位置し、生活用水として湧水を未消毒で利用していたことから、湧水が感染原因として強く疑われた。

現地調査の結果、湧水の水源は住居から約 150m 離れた山中にあり、住居まで7カ所の簡易な沈殿槽があるのみで、滅菌装置等は設置していないことが判明した(図1)。また、水源周辺には動物の死骸や糞便等も確認できなかった。

そのため、水源から台所蛇口までの水系試料、水源の砂、水源周辺土砂、野鼠の計 16 検体について検査を実施した。

その結果、貯水タンクと台所蛇口の2カ所の水から *Y.p* SGO1 を、水源近くの沈殿槽水(30L ポリタンク)から *Y.p* SGO5 を分離した。また、沈殿槽に堆積した微細砂粒、水源の土砂混じりの水、水源の砂から、*Yersinia enterocolitica* (以下、*Y.e*) nonSGO1-09 を分離した(表2)。

*Y.p* の血清型は、O群、O垂群、O抗原、H抗原と細分化されているが、その血清は入手困難であったため、PFGE を実施することとなった。