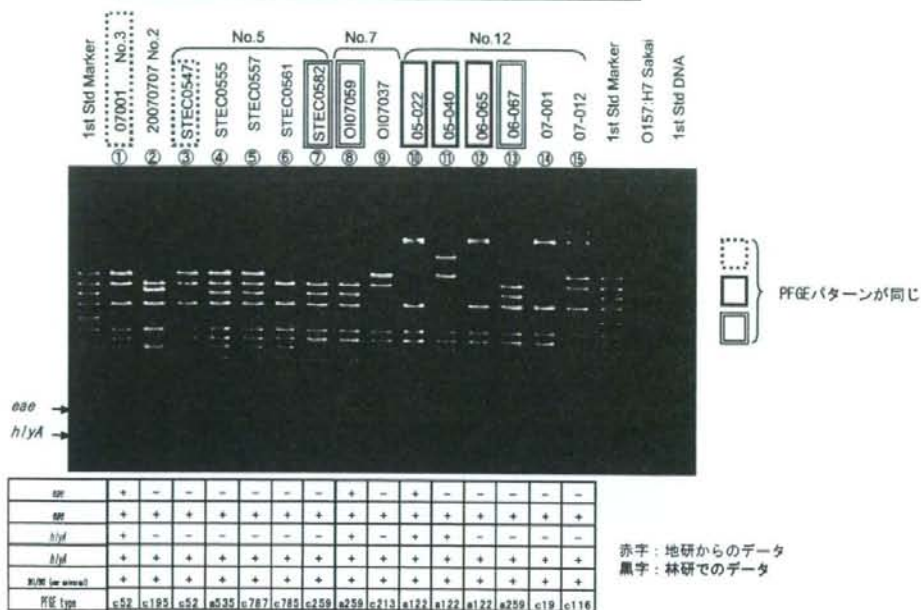


IS-printing kit Ver.2 1st primer setの検定結果



*eae*遺伝子及び*hlyA*遺伝子に関して、全ての株で陽性という結果が得られた。また、論文等でよく用いられる*eae*のuniversal primer (SK1/SK2)においても同様に全ての株で陽性を示した。

図1. 平成19年度課題株の宮崎大学での検討結果

H19 年度

H20 年度

lst set	PFGE no. 菌株番号	c52 547	a535 555	c787 557	c785 561	a259 582
	well No.	3	4	5	6	8
1-01	974	1	1	1	0	0
1-02	839	1	1	1	1	1
1-03	742	0	1	1	0	1
1-04	645	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0
1-07	495	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1
1-09	405	1	1	1	1	0
1-10	353	1	1	1	1	1
1-11	325	0	0	0	0	0
1-12	300	1	0	0	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1
1-14	241	0	1	1	1	1
1-15	211	1	1	1	1	1
aae	185	0	0	0	0	0
1-16	171	0	1	1	0	1
hlyA	137	0	0	0	0	0

lst set	PFGE no. 菌株番号	c52 547	a535 555	c787 557	c785 561	a259 582
	well No.	3	4	5	6	8
1-01	974	1	1	1	0	0
1-02	839	1	1	1	1	1
1-03	742	0	1	1	0	1
1-04	645	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0
1-07	495	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1
1-09	405	1	1	1	1	0
1-10	353	1	1	1	1	1
1-11	325	0	0	0	0	0
1-12	300	1	0	0	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1
1-14	241	0	1	1	1	1
1-15	211	1	1	1	1	1
aae	185	1	1	1	1	1
1-16	171	0	1	1	0	1
hlyA	137	1	1	1	1	1

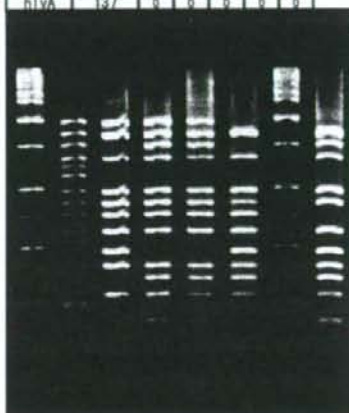


図 2-1. 平成 19 年度課題株の再検討、地研 5

H19 年度

H20 年度

H19 年度 H20 年度

c213 112	c213 080113
037	7037
P	1+2
1	1
1	1
0	0
0	0
0	0
0	0
1	1
1	1
1	1
1	1
1	1
1	1
1	1
1	1
0	0
1	1
0	0

c195 071113	c195 071113
1+2	1, 2
0	0
1	1
1	1
0	0
1	1
0	0
0	0
0	0
0	0
1	1
1	1
1	1
0	0
1	1
1	1
1	1
0	0
1	1
0	0

地研 7

地研 2

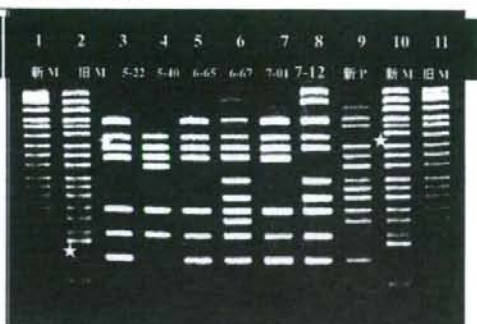
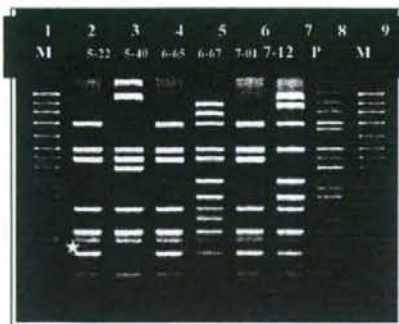
図 2-2. 平成 19 年度課題株の再検討、地研 2 と地研 7

IS-printing Ver.2

IS-printing Ver.1

泳動時間 120分

泳動時間 120分



1st 09.01試薬

古い(Version 1) 試薬 取扱07-11

Lane 1 新しい試薬の 1st standard DNA
 Lane 2 05-022
 Lane 3 05-040
 Lane 4 06-065
 Lane 5 06-067
 Lane 6 07-001
 Lane 7 07-012
 Lane 8 新しい試薬の 1st Positive control temperate
 Lane 9 新しい試薬の 1st standard DNA

Lane 1 古い(Version 1) の1st standard DNA
 Lane 2 新しい試薬の 1st standard DNA
 Lane 3 05-022
 Lane 4 05-040
 Lane 5 06-065
 Lane 6 06-067
 Lane 7 07-001
 Lane 8 07-012
 Lane 9 新しい試薬の 1st Positive control temperate
 Lane 10 新しい試薬の 1st standard DNA
 Lane 11 古い(Version 1) の1st standard DNA

★ *eae* 遺伝子、★ *hlyA* 遺伝子

平成 19 年度

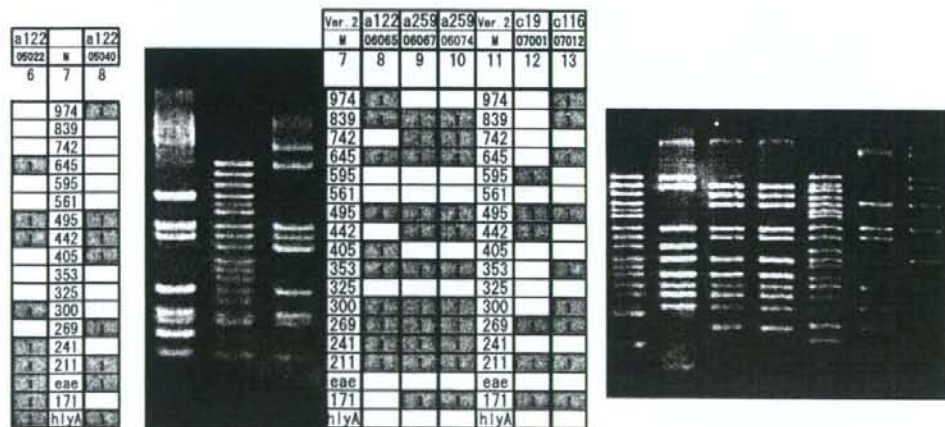
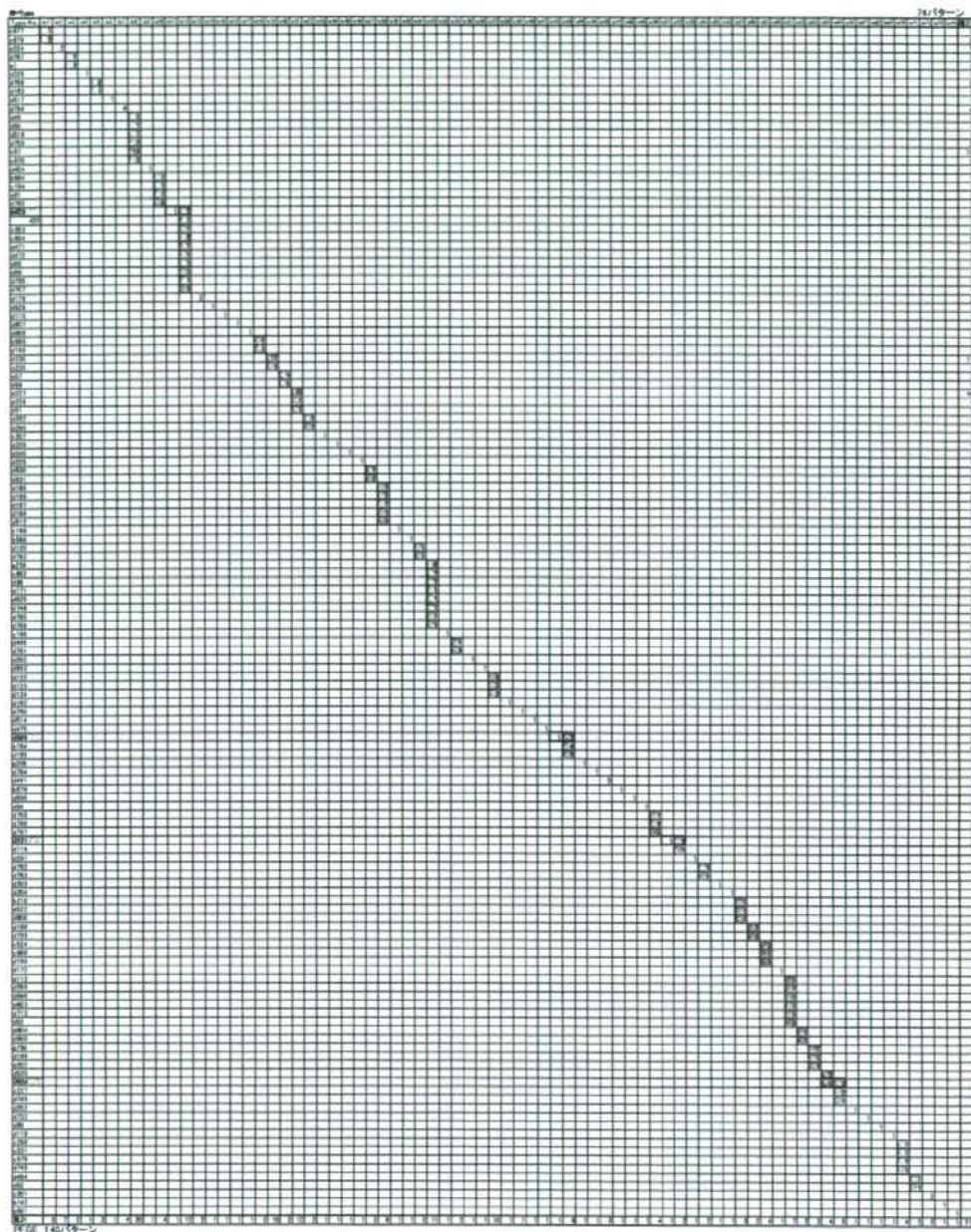


図 2-3. 平成 19 年度課題株の再検討、地研 12



- IS-printing の ID コードが同じであるが PFGE-Type が異なる
- IS-printing の ID コードが異なるが PFGE-Type が同じ

図 3. IS-printing Type と PFGE Type

平成 20 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

新規遺伝子解析法について

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 20 年 12 月 1 日(月)、11:00 - 19:00
平成 20 年 12 月 2 日(火)、9:00 - 17:00
講師 国立感染症研究所、感染症情報センター、第5室長
伊藤 健一郎 先生

1. 研修参加者

	氏名	機関名
1班 ○	村上光一	福岡県保健環境研究所
	山崎省吾	長崎県環境保健研究センター
	西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
	江原裕子	長崎市保健環境試験所
	竹中重幸	福岡県保健環境研究所
2班 ◎	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	松本一俊	熊本県保健環境科学研究所
	岩永 貴代	熊本市環境総合研究所
3班 ○	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	上野伸広	鹿児島県環境保健センター
	財津修一	福岡市保健環境研究所
4班 ○	中村祥子	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
	岡野 祥	沖縄県衛生環境研究所
	川崎 恵	福岡市保健環境研究所
	堀川和美	福岡県保健環境研究所

2. 研修内容

- (1) 下痢原性大腸菌の遺伝子検査法について
Conventional PCR とReal-time PCR による検出法
- (2) 付着性大腸菌の検査法と判定について

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）
分担研究報告書

輸入冷凍海産物を原因とした赤痢集団事例

福岡市保健環境研究所

尾崎延芳 眞子俊博 宮尾義浩 財津修一 川崎 恵 江渕寿美 吉田眞一

要 旨 2008年7月中旬から8月中旬までの間に、細菌性赤痢 (*S.sonnei*) による集団感染事例及び散発事例が複数発生した。集団感染事例については、原因施設として飲食店が関与しており、赤痢菌 (*S.sonnei*) による食中毒と断定された。この期間の赤痢菌感染者38名から分離された当該菌の代表株に対してパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を実施したところ、全て一致した。また、これら集団感染事例の原因施設において使用食材を詳細に調査し、遡り調査を行った結果、輸入冷凍海産物が共通食材であると判明した。

A. 研究目的

2008年7月19日から8月16日の間に、海外渡航歴のない細菌性赤痢患者が相次いで発生した。表1に事例一覧及び赤痢菌検出状況 (2008年7~8月) を示した。この間の赤痢菌発生事例は、集団及び散発事例を含め6事例となり、感染源を特定するための疫学調査、接触者検便、施設のふき取りおよび食品等の検査を行うとともに、分離された赤痢菌について薬剤感受性試験及びパルスフィールドゲル電気泳動法 (以下 PFGE と略) による分子疫学的解析を行った。

B. 事例の概要

【事例1】 (集団事例1)

1. 発生日
7月19日 (7月18日の食事が原因)
2. 原因施設
料亭
3. 共通食材
コース料理中の造り (鯛、カンパチ、
輸入冷凍海産物)

4. 患者数等

有症者23名 (*S.sonnei* 検出12名)
※35名のグループ

【事例2】 (散発事例1)

1. 発生日
7月27日
2. 原因施設
不明
3. 共通食材
不明 (輸入冷凍海産物が流通していた
飲食店の利用あり)

4. 患者数等

有症者2名 (*S.sonnei* 検出2名)
※家族内感染と推定

【事例3】 (散発事例2)

1. 発生日
7月30日
2. 原因施設
不明

3. 共通食材
不明（輸入冷凍海産物が流通していた飲食店の利用あり）
4. 患者数等
有症者1名（*S.sonnei* 検出1名）

【事例4】（散发事例3）

1. 発生日
8月6日
2. 原因施設
不明
3. 共通食材
不明
4. 患者数等
有症者1名（*S.flexneri 3b* 検出1名）

【事例5】（集団事例2）

1. 発生日
8月7日（8月5日の食事が原因）
2. 原因施設
居酒屋
3. 共通食材
海鮮サラダ（鯛、カンパチ、輸入冷凍海産物、ヒラメ、サザエ、ポイルしたエビ）
4. 患者数等
有症者3名（*S.sonnei* 検出3名）
※5名のグループ

【事例6】（集団事例3）

1. 発生日
8月15日（8月14日の食事が原因）
8月16日（8月15日の食事が原因）
2. 原因施設
すし屋
3. 共通食材
仕出し料理中の刺身盛り中の輸入冷凍

海産物

4. 患者数等
有症者105名（*S.sonnei* 検出20名）
※855名（出前等を含む）

C. 研究方法

検査状況について表2に示した。

1. 検査材料

集団事例について、原因施設で使用されていた参考品をはじめ、以下について赤痢菌の検査を実施した。

(1) 集団事例1

施設ふき取り7検体、従業員検便13検体、食材4検体

(2) 集団事例5

施設ふき取り4検体、従業員検便9検体、食材7検体

(3) 集団事例6

施設のふき取り6件、従業員検便16検体、食材12件、活魚の水槽水3件、活魚の仕入れ先の水槽水等3件

(4) 輸入冷凍海産物の仕入れ先

冷凍海産物（同一ロット品含む）2件

(5) 市内の流通品

市内の業務用スーパーの輸入冷凍海産物15件

(6) 輸入冷凍海産物の輸入者の在庫

27件

2. 赤痢菌の分離

(1) ヒトからの赤痢菌分離

ヒト糞便はシードスワブ（COPAN）により採便し、直接分離培養（37℃、18～24時間）及び増菌培養（37℃、6時間）を行った。増菌培養液については、*invE* 遺伝子の確認をPCR法により行った。*invE* 遺伝子を確認し、

なおかつ直接分離培養で赤痢菌が確認できなかったものについては、シードスワブからの再分離と増菌培養液からの分離培養を試みた。分離用の寒天培地は、*Salmonella-Shigella* 寒天培地（極東製薬）、Desoxycholate-Hydrogen Sulfide-Lactose 寒天培地（日水製薬）、Hektoen-Enteric 寒天培地（BD）の3種類を用い、増菌培養には Tryptic Soy Broth（BD）を使用した。

(2) 食品等からの赤痢菌分離

① 食品

食品約 25g に 9 倍量の Buffered Peptone Water (OXOID) (35°C, 18~24 時間培養)、食品約 150g に 2 倍量の Buffered Peptone Water (35°C, 18~24 時間培養) 及び食品約 25g に 9 倍量の Tryptic Soy Broth (35°C, 6 時間培養) による 3 通りの方法で一次増菌後、それぞれの培養液をさらにノボピオシン加 *Shigella* Broth (OXOID) にて二次増菌後 (44°C, 18~24 時間、嫌気培養)、分離培養と PCR 法により *invE* 遺伝子の検出を行った。

② 水

検体 3L を孔径 0.45µm のフィルターで濾過濃縮後、Tryptic Soy Broth に全量を投入し 35°C, 18~24 時間の一次増菌とノボピオシン加 *Shigella* Broth による二次増菌後 (44°C, 18~24 時間、嫌気培養)、分離培養と PCR 法により *invE* 遺伝子の検出を行った。

③ ふき取り

ふき取り液 1ml を Tryptic Soy Broth に接種し、35°C, 18~24 時間の一次増菌とノボピオシン加 *Shigella* Broth による二次増菌後 (44°C, 18~24 時間、嫌気培養)、分離培養

と PCR 法により *invE* 遺伝子の検出を行った。

また、一部の食品に関しては、免疫磁気ビーズ法（自家製）も併用した。分離培養にはいずれの検体、培養方法においても *Salmonella-Shigella* 寒天培地（極東製薬）、Desoxycholate-Hydrogen Sulfide-Lactose 寒天培地（日水製薬）、MacConkey 寒天培地（日水製薬）の3種類を用いた。

3. 赤痢菌の同定及び解析

分離培養後の疑わしいコロニーは、Triple Sugar Iron 寒天培地（日水製薬）、Lysine Indol Motility 寒天培地（日水製薬）にてスクリーニング後、赤痢菌免疫血清（デンカ生研）を用いて血清型別及び PCR 法 (TaKaRa EX Taq, TaKaRa 特殊細菌検出用 Primer Set INV-1, INV-2, IPA-1, IPA-2) により、*invE* と *ipaH* 遺伝子を確認し、さらに糖分解試験等による生化学的性状の追加試験を行った。また、分離された赤痢菌は、8 種類の薬剤 (CP, KM, SM, NFX, ABPC, FOM, NA, TC) について、Sensi-Disk (Kirby-Bauer 法) (BD) により薬剤感受性試験と、制限酵素 *Xba I* (BioLabs) を用いた PFGE を実施した。

D. 研究結果

今回、2008 年 7 月 19 日から 8 月 16 日の間に、集団事例及び散発事例における赤痢菌 (*S. sonnei*) 感染者は最終的には 38 名となった。

ヒト糞便に関して、Tryptic Soy Broth 37°C, 6 時間培養後、この培養液で PCR 法による *invE* 遺伝子の検出を試みた結果、遺伝子が検出されたにも関わらず、赤痢菌を分離することができなかった者が、4 名存在した。これら 4 名は全て無症状者であった。環境の調査

では、いずれの飲食店、従業員、食材等からも赤痢菌は検出されなかった。

各事例から分離された赤痢菌は散发事例の *S.flexneri 3b* の 1 事例を除いて他は全て *S.sonnei* (D 群: I 相) で、それぞれの事例から分離された当該菌の代表株による薬剤感受性試験では SM, ABPC, NA の 3 薬剤に耐性のパターンを示した。また、PFGE は同一のパターンを示した (図 1)。

一方、保健所では、有症者等の喫食状況及び原因施設の使用食材を詳細に調査し、仕入れ先等の遡り調査を実施した。その結果、共通食材として特定輸入日のベトナム産輸入冷凍海産物が判明した。

E. 結論

これら一連の事例から検出された代表株による赤痢菌の PFGE は一致し、同一感染源が推定された。また、発症者に提供された共通食材は輸入冷凍海産物であり、福岡市の情報を基に国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース (FETP) による疫学調査においても同食品が感染源であることが示唆された。しかも、遡り調査の結果、発症者は、一輸入者の輸入冷凍海産物を喫食していたことが明らかになり、また、全国約 20 の自治体に流通していたことも判明した。福岡市以外の複数の自治体から報告された散发症例については、国立感染症研究所細菌第一部による PFGE は一致したが、福岡市での発生以前の

事例も含まれていたこともあり、各自治体での事例の検証は困難であった。

福岡市は、厚生労働省及び輸入者を管轄する東京都と情報の共有化を図るとともに、共通食材として提供された輸入冷凍海産物のロットの確認ならびに販売先等の流通経路を調査し、関係自治体と連携しながら被害拡大防止に努めた。

厚生労働省からは関連製造施設から輸入した輸入冷凍海産物について、赤痢菌検査命令 (2008.8.28) が発出され、菌株の国立感染症研究所への送付についても課長通知が行われた (2008.10.9)。

しかしながら、輸入冷凍海産物を含む食品等の検査からは赤痢菌は検出されず、断定的な結果は得られなかった。今回の事例は、行政区単位では散发事例、全体としてはアウトブレイクという情報共有の重要性を示した例であり、かつ、国全体への寄与が多であったと思われる。

今後の課題として、二枚貝以外の食品からの赤痢菌検出方法についての研究推進等も必要ではないかと考えられた。

F. 研究発表

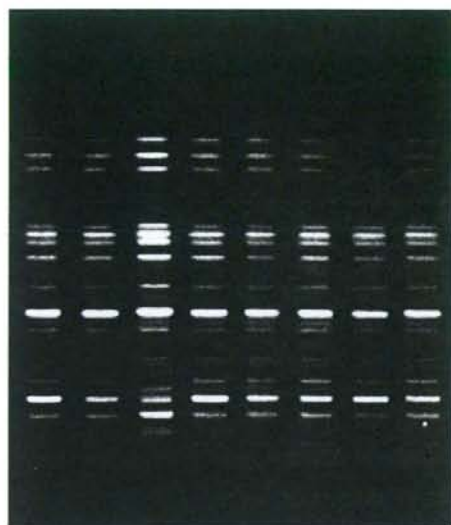
なし

表 1 事例一覧及び赤痢菌検出状況(2008年7~8月)

	発生日	発生区	喫食日	施設	喫食者	有症者	陽性者	備考
1	7月19日	博多区	7月18日	飲食店	35	23	12	集団事例 1
2	7月27日	南区	—	不明		2	2	散发事例 1
3	7月30日	西区	(7月28日)	(飲食店)		1	1	散发事例 2
4	8月6日	中央区	—	不明		1	1	<i>S.flexneri3b</i>
5	8月7日	西区	8月5日	飲食店	5	3	3	集団事例 2
6	8月15日 ~ 8月16日	東区 博多区 南区 早良区 城南区 西区	8月14日 ~ 8月15日	飲食店	855	105	20	集団事例 3

表 2 検査状況

	集団事例 1	散发事例 1	集団事例 2	集団事例 3
従業員検便	13	喫食した飲食店 では他に有症苦 情なし	9	16
施設ふき取り	7		4	5
食材等	4		7	62 ※
喫食者・接触者等	558(38) ※※			
※ 輸入冷凍海産物(仕入れ先同一ロット品, 市内流通品, 輸入者の在庫品)を含む ※※ 茨城発生事例を含む ()内は陽性者数				



1 2 3 4 5 6 7 8

Xba I, 30unit/sample plug, 6.0V/cm, 2.2-54.2sec, 19hr, 14°C

図1 PFGEパターン(各事例から分離された*S. sonnei*)

患者情報					
1	集団事例 1	患者A	<i>S. sonnei</i>	I相	茨城県分与株
2	散発(南区)	患者B	<i>S. sonnei</i>	I相	
3	散発(西区)	患者C	<i>S. sonnei</i>	II相	
4	集団事例 2	患者D	<i>S. sonnei</i>	I相	
5	集団事例 3	患者E	<i>S. sonnei</i>	I相	
6	集団事例 3	患者F	<i>S. sonnei</i>	I相	
7	集団事例 3	患者G	<i>S. sonnei</i>	I相	
8	集団事例 3	患者H	<i>S. sonnei</i>	I相	

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

運動会時の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例の
パルスフィールドゲル電気泳動法による解析

研究協力者 長崎県環境保健研究センター

右田 雄二 山崎 省吾 吾郷 昌信

要 旨

嘔吐など食中毒様症状を呈している家族4名より黄色ブドウ球菌が嘔吐物から2株、便から1株分離された。また、喫食した市販オードブルから7株が分離された。患者および食品由来の計10株のコアグラマーゼ型とエンテロトキシン型はすべて一致した。さらに、改良を加えたパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析を行ったところ、良好な泳動像が得られ、今回検体より分離された菌株はすべて同じ由来であることが示唆された。以上のことから、黄色ブドウ球菌の食中毒事例においても、PFGE法を使用することの有用性が確認された。

A. はじめに

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法は制限酵素を用いて細菌や真核生物の染色体DNAを切断後、生じた大きなDNA断片を特殊な電気泳動装置にかけて分離する方法である。電気泳動装置は進行方向の斜めから電場をかけ、適当な時間の後角度を変えDNAをジグザグに流すことで大きなDNA断片の電気泳動を可能とし、その泳動後の多型性を比較する方法である。Tenoverら¹⁾は病原細菌のPFGE泳動パターン解析において、バンドの違い0箇所で「区別できない」、2-3箇所で「きわめて関連あり」、4-6箇所で「関連の可能性あり」および ≥ 7 箇所で「異なる」との評価基準を提唱している。

PFGE法は病原細菌の分子疫学解析手法の一つとして、腸管出血性大腸菌(EHEC)やサルモネラ菌などを中心に行われてきた。黄色ブドウ球菌については、臨床において、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の疫学解析で広く用いられているが、食中毒での対応事例は少ない。

今回、平成20年5月、対馬市の小学校運動会時の喫食後に嘔吐など食中毒様症状を呈した家族5名のうち4名が医療機関を受診した。常法に従い嘔吐物、便および食品からの菌分離を行い、コアグラマーゼ型別試験およびエンテロトキシン型別試験を行った。さらに同一菌由来であるかを確認するためにこれまで食中毒事例ではあまり用いられていなかった黄色ブドウ球菌のPFGE解析法に改良を加え、その有用性について検討したので報告する。

B. 研究方法

菌数の算定: 嘔吐物と食品の菌数はPBS(-)で10倍段階希釈を行い、マンニト食塩寒天培地にコンラージ棒で直接塗布し、35℃48時間培養後、マンニト分解能(+), 卵黄反応陽性のコロニーを黄色ブドウ球菌として、菌数算定を行った。

コアグラマーゼ型別およびエンテロトキシン型別試験: コアグラマーゼ型別「生研」およびエンテロトキシン型別「生研」いずれもデンカ生研を用い、使用書

に従って実施した。

黄色ブドウ球菌の PFGE 解析法: PFGE 法は国立感染症研究所のプロトコールに従い、黄色ブドウ球菌細胞壁のペプチドグリカン層の加水分解処理は熊谷²⁾らの方法に一部改良を加えて行った。以下、その方法を記す。

当該菌をトリプトソイブイオン 3 ml に移植し、35 °C、18 時間静置培養後、McF.No.3.0 以上の菌濃度に調整した菌液 500 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、12,000 rpm 5 分遠心し、上清除去後、PBS (-) 500 μ l に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、滅菌超純水 500 μ l に懸濁した。そのうちの 100 μ l を 0.5 ml マイクロチューブに移し、25 mg/ml Lysozyme と 2 mg/ml Lysostaphin 溶液をそれぞれ 4 μ l 添加し、十分に混和した後、55 °C に保温した 1% Sea Kem Gold Agarose (TAKARA) を 100 μ l 加えて混合し、plug mold に注入して氷上で固化させた。

0.5 M EDTA 1 ml を入れたチューブに 25 mg/ml Lysozyme と 2 mg/ml Lysostaphin 溶液をそれぞれ 40 μ l ずつ添加し、固化したアガロースブロックを浸漬させて、37 °C、1 時間酵素処理を行った。処理後、チューブ内の酵素溶液を除去し、アガロースブロックを TE 緩衝液で 2 回洗浄した。

アガロースブロックを 1 mg/ml Protinase K、1%-N lauroylsarcosine を含む 0.5 M EDTA (pH8.0) 溶液 1 ml を入れたチューブに移し、50 °C で 2 時間 over night 振盪しながら処理を行った。

4 mM Pefablock SC を含む TE 緩衝液 500 μ l に泳動用の大きさにカットした処理後のアガロースブロックを浸漬し、50 °C、20 分間以上振盪して、Protinase K を不活化した。再度、同様の操作を繰り返した後、1 ml TE 緩衝液に置換し、氷上で 20 分間以上平衡化・洗浄操作を 2 回行った。

洗浄後、ブロックを新しいマイクロチューブに移し、所定の制限酵素で処理した。黄色ブドウ球菌は *Sma* I (30units/sample) で、25 °C、2 時間 over night、マーカー株の *Salmonella* Braenderup H9812 は *Xba* I (30units/sample) で 37 °C、2 時間 over night 切断

反応を行った。

制限酵素処理したアガロースブロックに 0.5 \times TBE 緩衝液 400 μ l を加えて氷冷し、コームに貼り付けた後、1% Sea Kem Gold Agarose 100 ml を加えて固化させ、ブロックを泳動ゲル内に封入した。泳動用緩衝液には 50 mM チオ尿素添加 0.5 \times TBE 緩衝液を使用した。

電気泳動における緩衝液の温度は 14 °C とし、電場のスイッチングタイムの初期時間は 5.3 秒、最終時間は 34.9 秒に設定し、6 V/cm (200 V) で 19 時間泳動した。泳動後、Ethidium bromide (0.3 μ g/ml) で 30 分間染色し、写真撮影を行った。

C. 研究結果

今回の食中毒事例から分離された黄色ブドウ球菌の菌数および菌型に関する検査結果を表 1 に示した。発症者 2 名の嘔吐物からそれぞれ 4.1×10^6 cfu/g、 6.9×10^6 cfu/g の黄色ブドウ球菌が検出され、1 名の便からも同菌が検出された。食品については市販オードブル内食品 22 種中 7 種の食品から 3.1×10^3 cfu/g ~ 5.6×10^8 cfu/g の範囲で検出された。菌数は焼き肉、かまぼこ、だし、まき卵および鮭の順に多かった。

また、分離された患者およびオードブル分離株はすべてコアグラゼ III 型で A 型エンテロトキシン産生株であった (表 1)。PFGE 法による DNA 切断パターンでも、すべて同一泳動パターンを示した (図 1)。

D. 考察

今回、患者および市販オードブル分離株はコアグラゼ型、エンテロトキシン型および PFGE 泳動パターンが一致したことから、すべて同一由来と考えられた。オードブル内の各食品における菌数の差異は屋外への放置経過時間により隣接する食品に広がったものと考えられた。

しかしながら、もう一つの共通食である自家製おにぎりは完食されており、発症者はこの家族のみに限定されていたことから、ヒトの手指を介して、自家

分離株の菌数および菌型 (表1)

No.	検体	菌数 (cfu/g)	コアグラーゼ型	エンテロキシン型
1	嘔吐物	4.1×10^8	Ⅲ	A
2	患者嘔吐物	6.9×10^8	Ⅲ	A
3	患者便	—	Ⅲ	A
4	かまぼこ・だしまき卵	1.0×10^7	Ⅲ	A
5	ポテト	5.0×10^5	Ⅲ	A
6	鮭	5.5×10^6	Ⅲ	A
7	ポテトサラダ	5.6×10^3	Ⅲ	A
8	焼き肉	5.6×10^8	Ⅲ	A
9	ウインナー	5.0×10^5	Ⅲ	A
10	エビフライ	3.1×10^3	Ⅲ	A

製おにぎりからオードブルへの菌の伝播を完全に否定出来ないことから市販オードブルを原因食品と断定するには至らなかった。

従来、黄色ブドウ球菌の PFGE 解析のサンプル処理には、厚いペプチドグリカン層の加水分解処理に Lysostaphin 処理が単独で用いられてきたが、分解処理が不十分であるため、プロテナーゼ K による菌体蛋白の消化が不完全となり、良好な泳動像が得られないことが多かった。現在では Lysozyme 処理も同時に併用³⁾され、改善がみられるようになった。

今回、行った処理方法は Lysostaphin と Lysozyme をプラグ内に包埋し、さらに Lysostaphin と Lysozyme の混合溶液中に浸漬させることにより、プラグ内外か

ら同時に効率良く酵素を作用させる方法であり、良好な泳動像を得ることができた。

即ち、本法によるペプチドグリカン層の加水分解処理法は十分に効果を発揮し、プロテナーゼ K による菌体消化および制限酵素処理が効率良く働いたことが証明され、本処理法が優れていることが確認された。

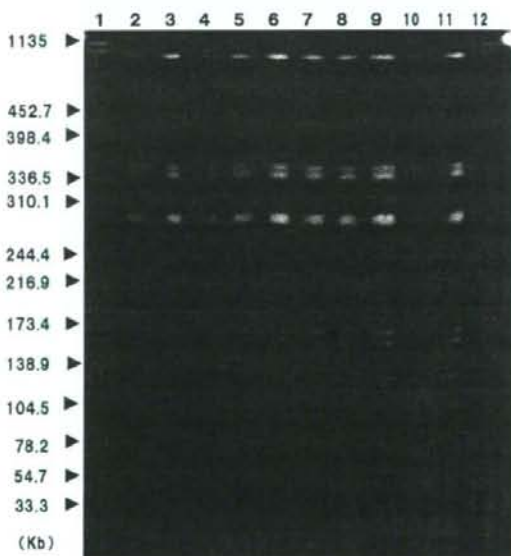
謝辞: 本事例の調査に協力いただいた対馬保健所並びに県央保健所の関係諸氏に深謝します。

E. 参考文献

- 1) Tenover FC et al, J Clin Microbiol 33; 2233-2239 (1995)
- 2) 熊谷奈々子他 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 平成 17 年度総括・分担研究報告書 48~49
- 3) 森木省治他, 日本臨床微生物学雑誌 14; 153-158 (2004)

F. 研究発表

なし



分離株の Sma I による PFGE パターン (図1)

[レーン No.]

- 1, 12: S. Braenderup H9812 CDC-PulseNet Standard Strain. Xba I 消化
- 2: 患者嘔吐物由来株
 3: 患者嘔吐物由来株
 4: 患者便由来株
 5: かまぼこ・だしまき卵
 6: ポテト
 7: 鮭
 8: ポテトサラダ
 9: 焼き肉
 10: ウインナー
 11: エビ

保育園における腸管出血性大腸菌 O111 とノロウイルスの同時流行による集団発生事例

宮崎県衛生環境研究所

河野喜美子(研究協力者) 岩切 章 三浦美穂 塩山陽子

山本正悟 川畑紀彦

宮崎県都城保健所

吉野修司 小寺美津夫 藤本茂紘

要 旨 2007年11月、保育園児2名から腸管出血性大腸菌(EHEC)を検出したという届出に伴い、当該保育園児82名、職員19名、陽性者家族64名の計165名の検便を実施し、その結果、園児20名、職員1名、家族4名の計25名からEHEC O111:H-(VT1産生)を検出した。分離された25株をパルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE, 制限酵素 *Xba*I 使用)により遺伝子解析した結果、EHEC O111による集団発生は同一感染源によって起こったものと推定された。また、疫学調査が進むにつれ、保育園では10月中旬～11月初めにかけて嘔吐、下痢を主訴とした患者が発生し、家族にも同様の症状を示すものが発生していたことが判明した。これらは、同時期に県内で頻発していたノロウイルス(NV)感染症の症状に似ていたため、NVの検査を行ったところ、O111陽性者(25名)のうち、2名(NV検査未実施)を除く23名中9名からNVが検出され、O111陰性者からもNVが検出された。また、検出されたNVのうち、遺伝子型を決定した4例はいずれもGII/4類似型で、カプシド領域の270bpが100%一致していた。これらの調査結果から、本保育園で発生した、嘔吐・下痢等の集団発生事例はEHEC O111とNVの同時流行によるものと判明した。

A. 研究目的

2007年11月、発熱、嘔吐、水様性下痢を呈した保育園児2名からEHECが検出されたという届出があったため、管轄保健所では、患者家族と保育園について、疫学調査およびEHEC検査を実施したが、疫学調査が進むにつれ、当保育園では10月中旬～11月初めにかけて嘔吐、下痢を主訴とした患者が多数発生していることが判明した。これらの患者の症状は、ノロウイルス(NV)感染症の症状に似ていたため、EHEC検査に加え、NV検査も実施して、本集団発生の原因究明を行った。

B. 研究方法

1. 材料

EHECの検査には、園児82名、職員19名、陽性者家族64名の計165名の便を用い、VT遺伝子検出(PCR法)および菌分離を並行して実施した(表1)。分離株についてはパルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE, 制限酵素 *Xba*I 使用)による遺伝子解析を実施した。

NVの検査には、EHEC検出陽性者25名中23名、陰性者8名の計31名の便を用い、リアルタイムPCR法を実施した。

2. EHEC の検出方法

便をノボビオシン加 mEC 培地(栄研化学)に培養した培養液、DHL 培地(日水製薬)又はマッコンキー寒天培地(日水製薬)に培養して発育したコロニーについて、PCR(TAKARA One Shot PCR Typing Kit, TAKARA)を実施し、VT1およびVT2 遺伝子の検出を行った。VT 遺伝子陽性を示した便について、CT-SMAC(関東化学)又はCHROMagar O157 TAM(CHROMagar)を用い、VT 遺伝子陽性菌の分離を行った。大腸菌の同定および血清型の決定は常法通り実施した。

3. PFGEによる遺伝子解析

PFGEの方法は、国立感染症研究所の方法を基に作成した「大腸菌のバルスフィールドゲル電気泳動法による解析 九州ブロックマニュアル(2005)」に準拠して行った。制限酵素は、*Xba* I (ロッシュ)を使用し、泳動は、1%アガロース(SeaKem Gold Agarose, CAMBREX)により、電圧6v/cm、パルスタイム2.2~54.2秒、バッファ一温度14℃、泳動時間20時間の条件で行った。

4. NV の検出方法

NV の検出は、リアルタイム PCR 法による公定法(平成19年5月14日食安監発第0514004号)に準じて実施した。すなわち、便材料からRNAを抽出した後、Random primer hexamerを用いた逆転写を行ってcDNAを作成した。次いで、このcDNAを鋳型とし、COG1F/COG1RとCOG2F/COG2RプライマーペアおよびTaq manプローブを用いたリアルタイムPCRを実施し、Genogroup IおよびGenogroup IIのノロウイルス遺伝子の検出を行った。

C. 研究結果

1. 事例の概要

2007年11月2日、宮崎県内の病院より、発熱、嘔吐、水様性下痢を呈した入院患者2名からEHECが検出されたという届出があった。この2名は同じ保育園に通う1歳男児であったため、家族に加え保育園に対しても聞き取り調査を行った。その結果、2名の届出患者については、入院前の旅行、会食、焼肉等の感染源に関わる特記すべき事項はなかったが、通っている保育園に同様の症状を呈する園児がいたことから、園児、職員、家族の計165名についてEHEC検査を実施し、その結果、25名からEHEC O111:H-(VT1産生、以下O111と略)が検出された。

当保育園では、嘔吐、下痢を主訴とした患者が、10月中旬から11月初めにかけ多数発生しており(図1)、家族にも同様の書状を示す患者が発生していた。これらの症状は、同時期に、県内で頻発していたNVによる嘔吐下痢症にも似ていたことから、31名の便についてNVの検査を行ったところ、15名が陽性であった。これらのことから、本保育園では、O111感染症流行と同時期にNV感染症も流行していたことが判明した。

患者発生期間中、管轄保健所は、保育園関係者および園児保護者に対し、感染の予防方法、陽性者の就業制限、並びに発生の経過等の説明を適宜実施した。また保育園でのO111の感染拡大を防止するため、1週間休園し、園内消毒等の指導を行い、11月16日に最終患者の病原体消失が確認されたため本事例への対応を終了した。

2. EHEC の検査結果

表1に示すように、園児82名、職員19名、陽性者家族64名の計165名の便を検査し、園児20名、職員1名、家族4名の計25名からEHEC O111:HNM(VT1産生)を検出した(表2)。これらの25名から分離された25株について、バルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE, 制限酵素

XbaI 使用)による遺伝子解析を行った結果、22株は同一、他の3株もよく似た遺伝子パターン(1つのバンドだけ異なっていた)を示したことから、本集団発生は同一感染源によって起こったものと推定された(図1)。

3. NVの検査結果

最初の届出患者2名を除くO111陽性者23名、陰性者8名の計31名の便について、リアルタイムPCR法によりNVの検査を行ったところ、表3に示すように、O111陽性者中9名、陰性者中6名の計15名がNV陽性であった。検出されたNVのうち、遺伝子型を決定した4例(表3のNo. 2:11/1発症、No. 3:10/20発症、No. 4:11/1発症、No. 29:発症無)は、いずれも、GII/4類似型で、Capsid領域の270bpが100%一致していた。

4. EHECおよびNV検査結果のまとめ

EHECおよびNV検査結果から、本保育園では、O111感染症流行と同時期にNVによる感染症も流行していたことが判明した。

5. 疫学調査結果

症状については、表3に示すように、O111とNVが同時に検出された9名では、7名(78%)に下痢等が見られ、2名(22%)が無症状であった。また、NVのみ陽性であった6名では、5名(83%)に下痢が見られたのに対し、O111のみ陽性であった14名では、6名(43%)に下痢等の症状が見られたにすぎず、NV感染者で症状の発現頻度が高かった。

保育園において、最も高率にO111が検出されたのは1歳児クラスで、16名中12名(75%)から検出された。1歳児クラスはトイレに隣接した部屋であり、また、トイレに備えられたタオルが共用であったこと、トイレと同じ区画内に汚物入れ、洗濯機が設置されていたこと等が確認され、このクラスで感染が拡大した要因と考えられた。

D. 考察

一般に、EHEC感染症の主な症状は下痢、腹痛、血便とされており、下痢、嘔吐、発熱を主症状とするNV感染症とは少し異なる。今回のO111とNVの同時流行による集団発生事例では、O111のみに感染したヒトは症状も軽く無症状者も多かったが、O111とNVに混合感染することにより、下痢、吐き気・嘔吐、発熱を呈するヒトが多くなったと考えられた。すなわち、症状からはNVを疑わせる患者が多く、最初の入院患者について病院がVTを検査していなければ、O111を見逃した可能性も高い。

また、O111感染者が最も多かった1歳児クラスがトイレに隣接した部屋であること、トイレに備えられたタオルが共用であったこと、トイレと同じ区画内に汚物入れ、洗濯機が設置されていたこと等が、感染拡大の要因として示唆されたのに加え、NV感染による下痢便の飛散も、NVおよびO111の感染拡大の要因として推測された。

E. 結論

2007年11月、宮崎県内の保育園で嘔吐・下痢を主訴とした集団発生事例は、EHEC O111とNVの同時流行によるものと判明した。その発生原因は不明であったが、O111感染者が最も多かった1歳児クラスがトイレに隣接した部屋であったこと、トイレに備えられたタオルが共用であったこと、トイレと同じ区画内に汚物入れ、洗濯機が設置されていたこと等が感染拡大の要因として示唆された。また、NV感染による下痢便の飛散も、NVおよびO111の感染拡大の要因と推測された。

F. 研究発表

無し

表1. 事例の概要

発生施設	保育園
発生期間	平成19年10月17日 ～11月16日
最初の患者届出	平成19年11月2日
検査実施者数	
EHEC O111	165名
ノロウイルス	31名
陽性者数	
EHEC O111	25名
ノロウイルス	15名

表2. EHEC O111(VT1)陽性者の内訳

区分	検査人数	陽性者数(%)
0歳児クラス	12	4(33.3)
1歳児クラス	16	12(75.0)
2歳児クラス	8	0(0)
3歳児クラス	9	1(11.1)
4歳児クラス	18	1(5.6)
5歳児クラス	19	2(10.5)
保育園職員	19	1(5.3)
陽性者の家族	64	4(6.3)
計	165	25

図1. 有症患者(下痢・嘔気・嘔吐)の症状の持続状況

