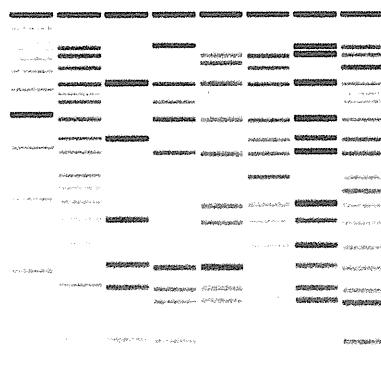


a) セット 1

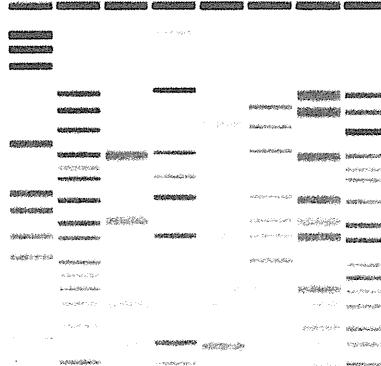
DNA-1000 キット

M S 1 2 3 4 5 T



DNA-2500 キット

M S 1 2 3 4 5 T

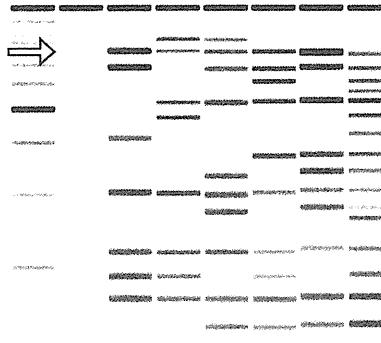


M: サイズマーカー, S: Standard DNA, 1~5: 精度管理株, T: Template Mix

b) セット 2

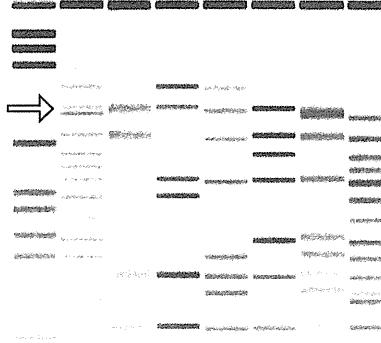
DNA-1000 キット

M S 1 2 3 4 5 T



DNA-2500 キット

M S 1 2 3 4 5 T



M: サイズマーカー, S: Standard DNA, 1~5: 精度管理株, T: Template Mix

矢印: 2-02 および 2-03

図 3 MultiNA を用いた泳動のゲルイメージ(施設 11)

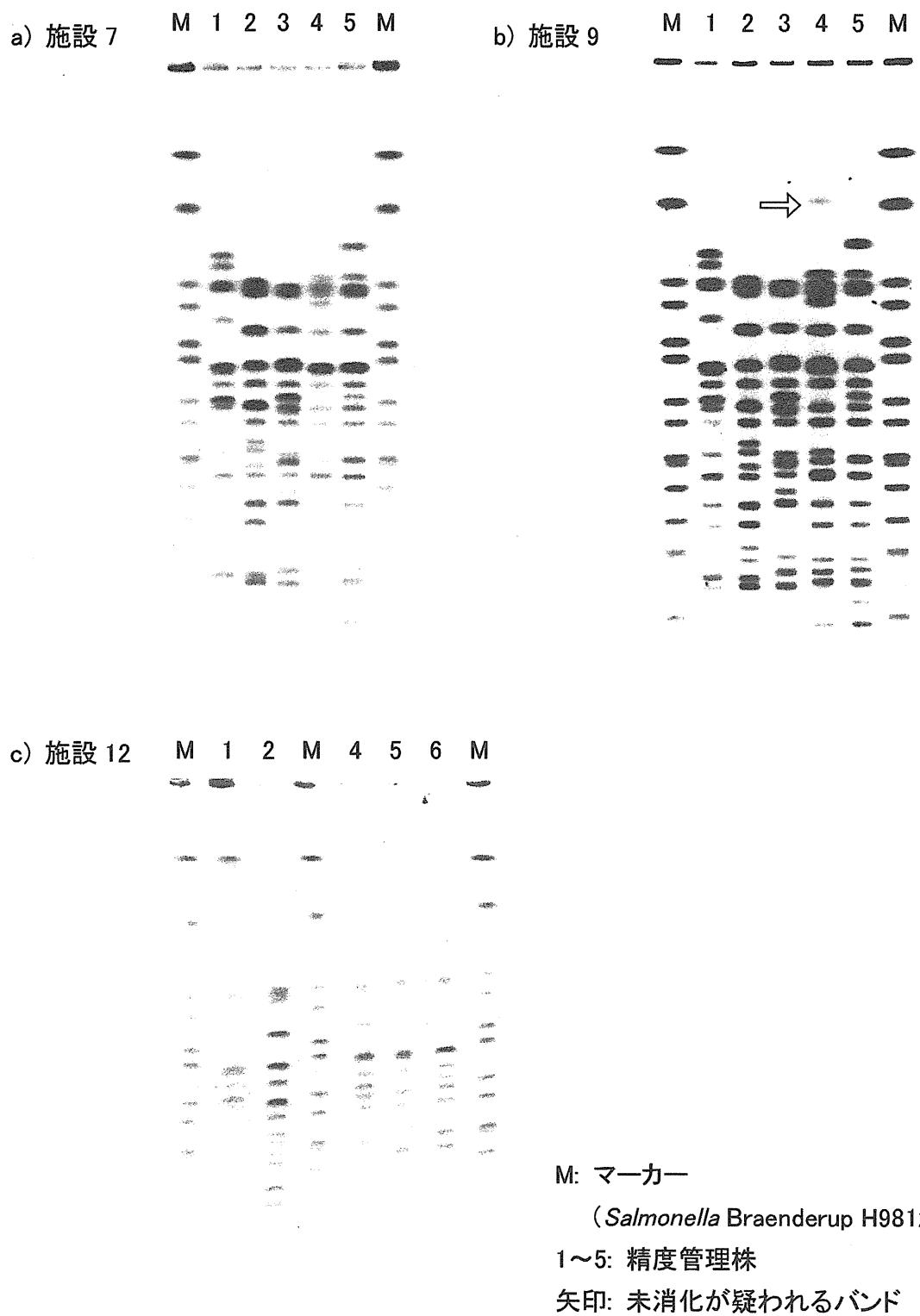


図 4 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像例

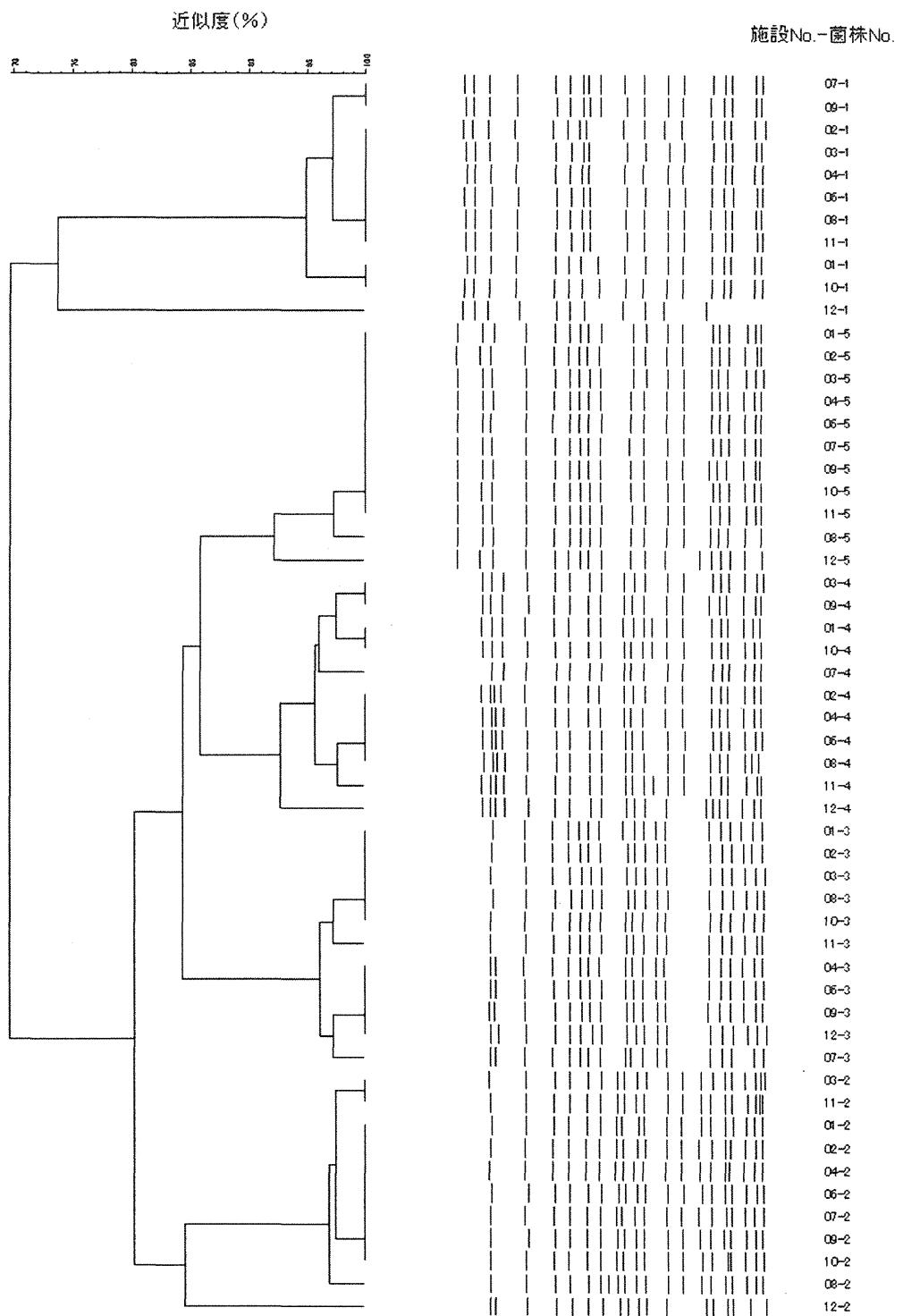


図 5 A 解析者が作成した EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

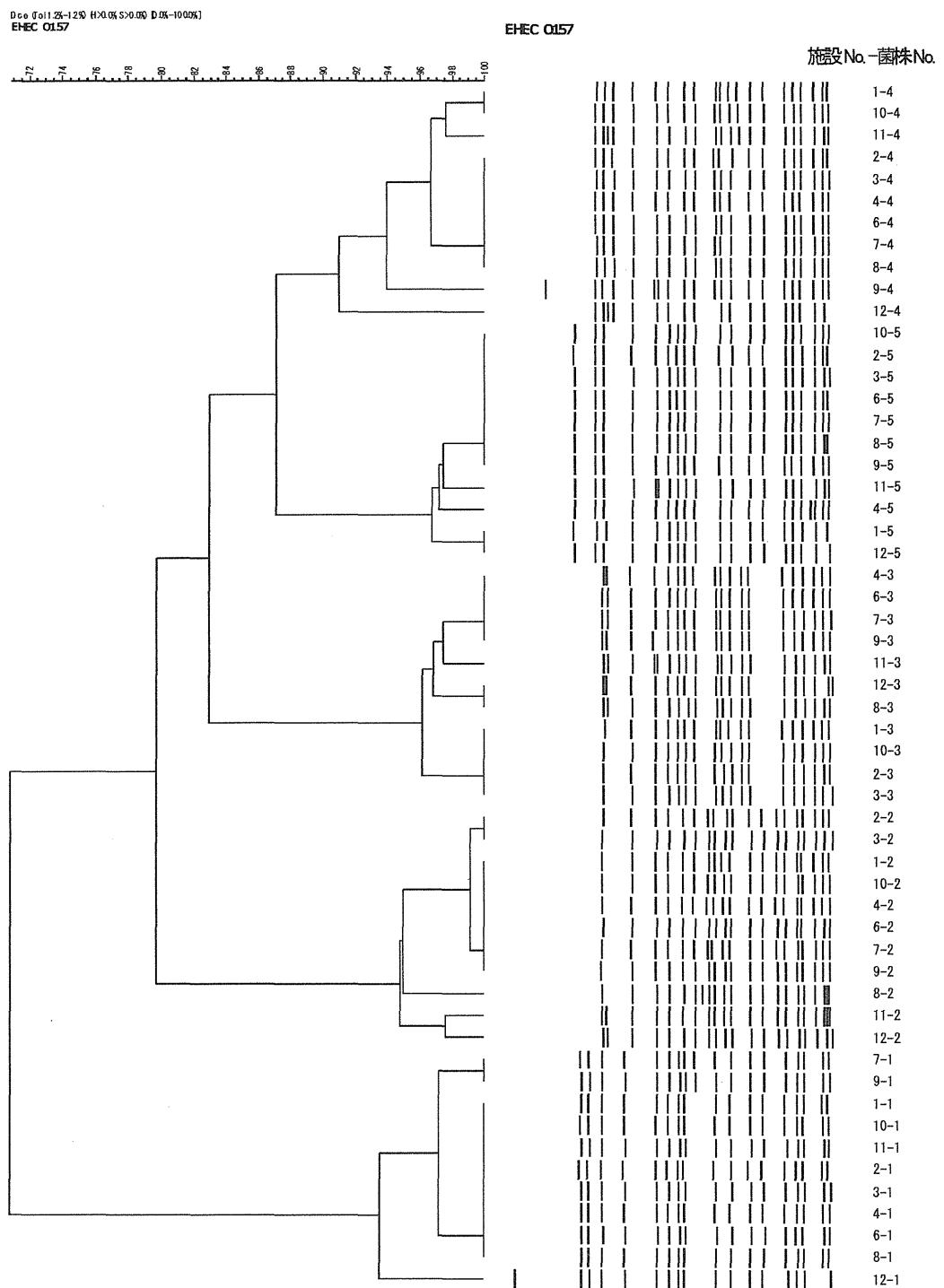


図 6 B 解析者が作成した EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

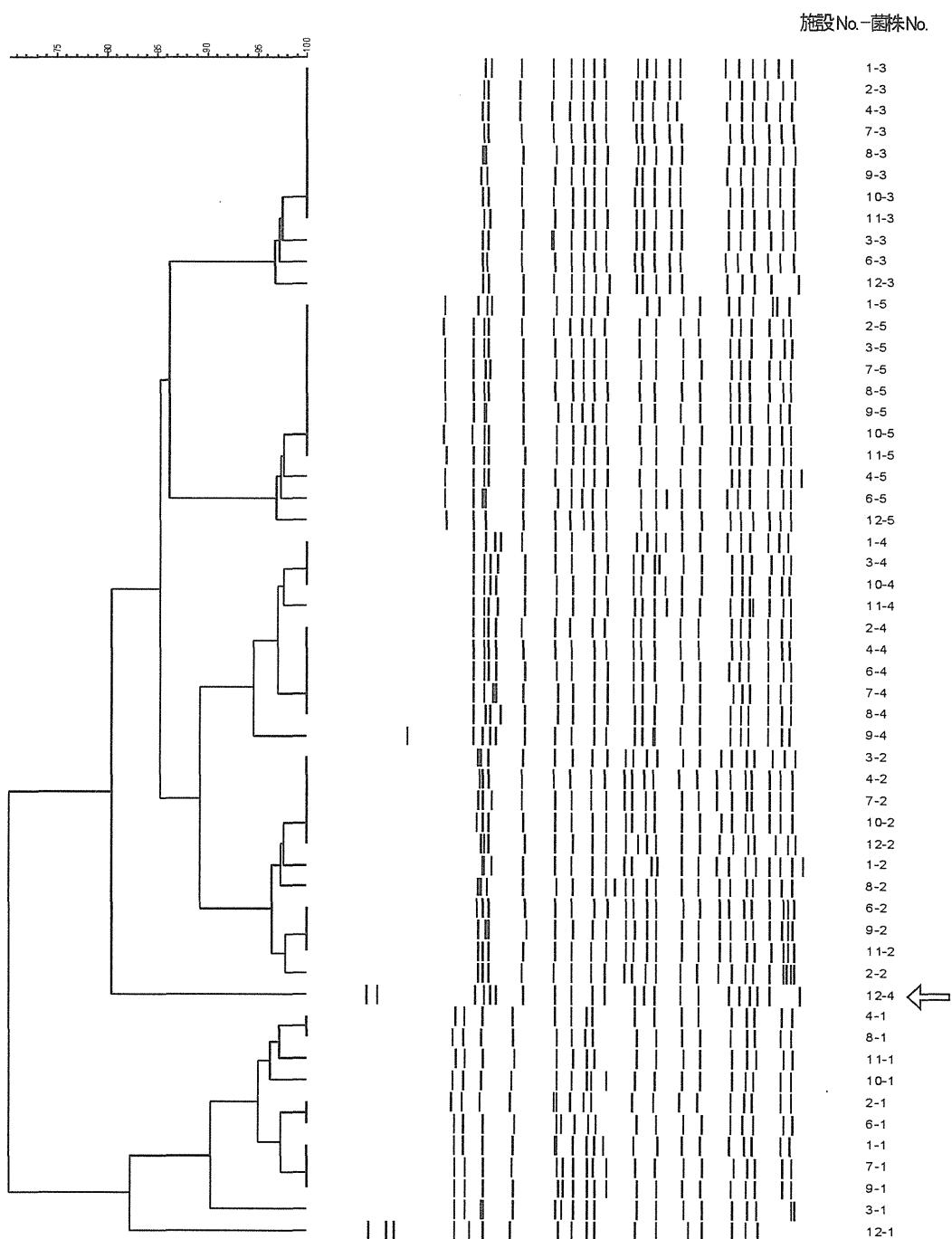


図7 C 解析者が作成した EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

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 24 年度分担研究報告書

加熱用牛レバーの生食による腸管出血性大腸菌 O157、散発 3 事例の関連性調査

研究協力者	浅井紀夫	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
	杉浦伸明	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
	真田正稔	京都府保健環境研究所	細菌・ウイルス課
	岡本裕行	京都府山城北保健所	衛生室
	飯田貴久	京都府山城北保健所	衛生室
	布野千代美	京都府山城北保健所	衛生室

研究要旨

平成 23 年 5 月に京都府山城地域で散発的に発生した 3 例の腸管出血性大腸菌 O157 届出事例の実施疫学調査及び分子疫学調査を行った結果、3 事例とも管内の焼肉レストランあるいはレストラン併設の食肉販売店で提供された加熱用牛レバーを生のまま喫食していたことが原因であると断定された。

A. 研究目的

平成 23 年 5 月に散発的に発生した 3 事例の腸管出血性大腸菌 O157 届出事例が管内の特定焼肉レストランあるいは併設の食肉販売店に関連している可能性が予測された。そこで、詳細な実施疫学調査を行うと共に、PFGE および IS-printing system を用いて分離された菌株について分子疫学調査を行い、3 事例の関連性について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 23 年 5 月 23 日から 5 月 30 日までの期間に山城北保健所及び山城南保健所へ医療機関から 3 名（3 グループ）の O157 感染者の届出があった。このうち、菌分離ができた患者由来株 2 株（No1：山城北保健所管内在住女性およ

び No2：山城南保健所管内在住女性）を用いた。

2. 検査方法

2.1 IS-printing system

IS-printing system は IS-printing system（東洋紡）のキットを用い、添付のプロトコールに従い実施した。電気泳動は説明書の推奨どおり 3 %アガロース（NuSieve GTG Ararose（Lonza 製）、Seakem GTG Agarose（Lonza 製）を重量比 2:1 で使用）ゲルを用い、1 時間泳動してエチジウムプロマイド染色後、紫外線照射下でバンドを検出した。各検体について規定分子量サイズ位置でのバンドがあれば 1、なければ 0 として、セットごとに 18 衡数字を分子量サイズの大きい順に並列して結果を示した。

2.2 PFGE

PFGE は平成 19 年度の総括・分担研究報告書において近畿ブロックが報告した「PFGE

「New Protocol-Kinki」に従って実施した。制限酵素は Xba I を用い、泳動時間は 18 時間とした。

3. 疫学調査

山城北保健所で施設及び患者について詳細な実施疫学調査を行った。

C. 研究結果

IS-printing system 解析では、No1, No2 ともに 1st set primer mix の系は 111010011100111111、2nd set primer mix の系では 011100100111101111 となり、一致した。図 1 に示した PFGE の泳動結果でも、No1 および No2 の泳動パターンは一致し、これらにより 2 つの菌株については同一由来株であると推測された。

実施疫学調査から、いずれの事例も提供された加熱用牛レバーをレストランまたは家庭で消費者の判断で生のまま喫食していたことが判明した。販売店においては、「加熱用」の表示が明記されていた牛レバーを、従業員が「生でも食べられる」と認識している等、衛生意識が不十分であることが認められた。3 事例の内容は①客（関連店舗従業員）がレストランにおいて生で喫食した。②従業員が販売店に来所した客に「生で食べられます」とコメントし、客は購入後、生で喫食した。③販売店へ来所した客の強い要望で、購入後、生で喫食した。で、あった。牛レバーの仕入れ状況を調査したところ、喫食したものは 3 事例とも同一の牛レバーであることはわかったが、牛個体までさかのぼることはできなかった。

D. 考察

実施疫学調査および分子疫学調査から 3 事例は当該レストランあるいは併設の食肉販売

店で提供された牛レバーによる散発事例であることが判明した。また、菌が分離できなかつた 1 事例については、当初受診した医療機関で抗生素を投与されていたために、検便検査はできなかつたが、HUS 発症、血清中 O157LPS 抗体価が陽性(3+)となったことから、腸管出血性大腸菌 O157 患者として届け出があった。

喫食者の生食に対する意識不足が事例発生の直接の原因になったとして、当該施設の行政処分は行わなかつたが、施設従業員や消費者への衛生教育は徹底した（別紙）。

近畿 IS データベースから、同じ IS パターンを示す菌株による事例が、京都府内では昨年（平成 22 年）8 月 29 日～9 月 17 日の間に 4 事例あつたが、丹後保健所管内、南丹保健所管内および山城北保健所管内と地域も異なり、関連性はなかつた。同年（平成 23 年）では本事例が初めてのパターンであった。また、近畿各府県内では本事例と同じ IS のパターンとして 55 件のデータが一致した。平成 17 年 1 例、平成 19 年 2 例、平成 20 年 4 例、平成 21 年 2 例、平成 22 年 41 例、平成 23 年 5 例であり、平成 22 年に最も多く発生していた。

E. 結論

散発的に発生した腸管出血性大腸菌 3 事例については同じ施設を原因とし、加熱用牛レバーを生で喫食していたことにより腸管出血性大腸菌 O157 に感染し、発病したと結論した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

岡本裕行、飯田貴久、布野千代美、足立有佳里、

藤原恵子、小嶋新也、浅井紀夫、杉浦伸明：熱用レバーを生食したことによるO157散発事例とその対策として食育を利用したリスク啓発、

平成24年度獣医学術近畿地学会（2012年10月、大阪府）

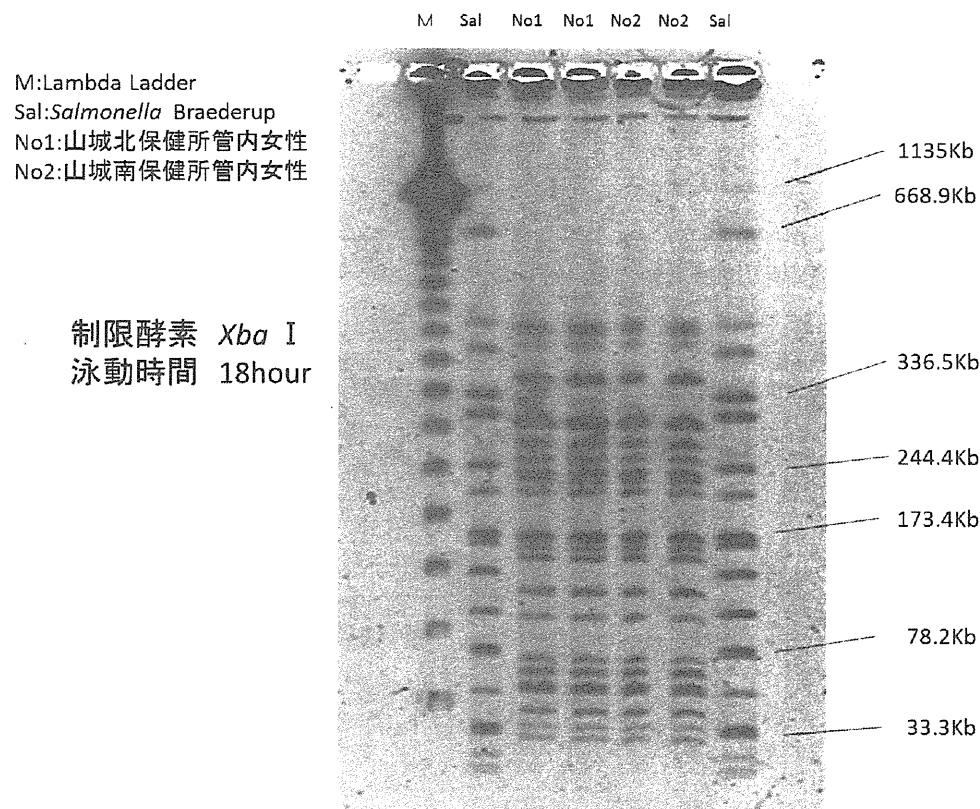
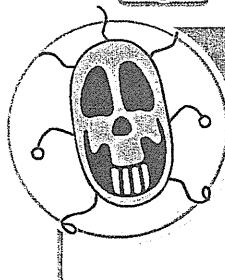


図1 患者便由来菌株のPFGE結果

肉の生食はやめましょう



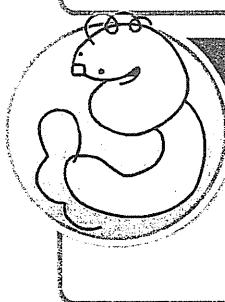
牛や豚、鶏などの生肉、生レバーには食中毒を起こす
色々な細菌が潜んでいる可能性があります。



腸管出血性大腸菌 (O111 + O157 等)

食中毒の中でも重症化しやすく、激しい下痢、血便に加えて腎不全や意識障害を伴う溶血性尿毒症症候群 (HUS) を起こすことがあります。平成 8 年には全国で 10,000 名以上が発症し、小学生を含む 8 名が死亡。平成 14 年には 9 名が、平成 23 年には 6 月までに 4 名の命が奪われています。

ユッケやレバ刺しなど肉の生食を原因とする事例が多くを占めています。

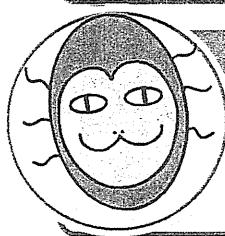


カンピロバクター属菌

下痢、腹痛のほか、手足や呼吸筋が麻痺する恐ろしい後遺症 (ギラン・パレー症候群) を起こすこともあります。

日本で起こる細菌性の食中毒の中で発生件数が最も多く約 60 % を占めます。

京都府でも飲食店で提供された鶏刺しやタタキが原因と疑われる事例が毎年多数確認されています。



サルモネラ属菌

細菌性食中毒事件の中で発生件数の約 20 % を占めます。
加熱不足の肉類や卵を原因とした集団食中毒を起こすことが多く、重症化すると高熱、激しい腹痛や血便を起こします。
京都府内では平成 16 年にこの食中毒で 1 名が亡くなられました。

これらの菌はごく少数でも食中毒を起こすため
「新鮮な肉だから安全」とは限りません!!!

安全に肉類を食べるためには ▶▶▶ 裏面

安全に肉類を食べるためには



ユッケやレバ刺し、鶏刺しなど生の食肉は食べないようにしましょう。
特に、子どもや抵抗力の弱っている方には生肉だけでなく、肉のタタキなどの半生食肉も食べさせないようにしてください。
健康な人では何も症状が出なくても、子どもやお年寄りなどは命に関わってくる危険性もあります。



危険

生肉に潜む菌が包丁、まな板、箸や手指を介して他の食品にうつることも

予防

- 生肉用の調理器具と、サラダなどそのまま食べるものの用の調理器具は使い分ける。
- 店や家庭で焼肉、バーベキューを食べるときは生肉をさわる箸やトングを別に用意する。
- 調理器具は使用後よく洗剤で洗い、熱湯や塩素系消毒剤で消毒する。
- 肉を扱った後に他の食材を触る時や、食事の前は手をしっかり洗う。

危険

中まで火を通せば菌は死滅しますが、加熱が不十分な場合は生き残ります

予防

- 焼肉以外に、ハンバーグや煮込み料理等も肉の中の色が変わるものまでしっかりと火を通す（中心温度75℃で1分以上加熱すれば菌は死滅する）。
- 調理済み食品は室温に放置せず、早く食べる。保存する場合は冷蔵庫に入れる。

お問い合わせ先

名 称	所在地	電話番号
乙訓保健所 環境衛生室	向日市上植野町馬立8	075-933-1241
山城北保健所 衛生室	宇治市宇治若森7-6	0774-21-2912
山城南保健所 環境衛生室	木津川市木津上戸18-1	0774-72-4302
南丹保健所 環境衛生室	南丹市園部町小山東町藤ノ木21	0771-62-4754
中丹西保健所 環境衛生室	福知山市篠尾新町一丁目91	0773-22-6382
中丹東保健所 環境衛生室	舞鶴市倉谷村西1499	0773-75-1156
丹後保健所 環境衛生室	京丹後市峰山町丹波855	0772-62-1361
京都府健康福祉部生活衛生課	京都市上京区下立売通新町西入敷ノ内町	075-414-4759

✿ 京 都 府

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成 24 年度 分担研究報告書

病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	花原 悠太郎	鳥取県衛生環境研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	樺本 孝史	//
	大畠 律子	岡山県環境保健センター
	河合 央博	//
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	山田 裕子	//
	河村 美登里	//
	児玉 実	広島市衛生研究所
	田内 敦子	//
	富永 潔	山口県環境保健センター
	矢端 順子	//
	亀山 光博	//
	石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
	宮本 孝子	香川県環境保健研究センター
	松本 純子	愛媛県立衛生環境研究所
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	鍋島 民	//

研究要旨

中四国ブロックの調査では、データベースの構築に不可欠なデータの精度を維持・向上させることを目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 菌株を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)および IS-printing System による精度管理を実施した。その結果、本年度は IS-printing system による解析で、異なった結果を報告した施設が例年より多かった。PFGE 法による結果は、ほとんどの施設で良好であった。中四国地域の EHEC O157 による感染事例について、IS-printing system による解析データを利用して疫学解析を行った結果、同一 IS コードの菌による感染で、複数の県で多数の患者が発生していたことが確認された。本年度から全国規模での IS-printing system データベースの試行が始まったことにより、さらに広域な発生事例についても、迅速な解析が可能になるものと思われる。

A. 研究目的

本研究班は、感染症や食中毒事例の広域あるいは同時多発的な発生において、それらの事例由来株の疫学解析を迅速に行うこと可能にするため、遺伝子による分子疫学的な解析結果を統合・集積し、必要時にアクセスできるデータベースの構築を目指している。一方で、データベース構築にはデータの高い精度が要求され、データの精度を向上し維持するために、遺伝子解析法の精度管理が重要である。過去の研究班で検討した結果から、遺伝子解析法としてパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法と言う)や、IS-printing System による腸管出血性大腸菌(以下、EHEC と言う)O157 菌株の遺伝子解析法が、有用な分子疫学解析ツールであることが確認されている。そこで、データベース構築に向けて、これらの解析方法を用いた試行を行ったので、報告する。

B. 研究方法

1. 使用菌株

精度管理：岡山県で平成 24 年度に分離された EHEC O157 : H7 VT1,2 菌株 5 株 (No.1674、1675、1676、1680、T2941) を使用した。

岡山県の事例解析：岡山県で平成 24 年度に分離された EHEC O157 株 31 株

2. 分子疫学解析法および精度管理

(1) PFGE 法および型別

PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、画像解析ソフト(BioNumerics)を使用して泳動像の解析を行った。

PFGE 型別は、菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(2) IS-printing System

IS-printing System (Version2 : TOYOB0 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。このうち、PCR 反応に供する DNA 量は、菌のアルカリ熱抽出液の遠心上清を 5 倍希釈して用いた。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット(Api)の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を各区分毎に足してコード化し、コードによる解析を行った。

(3) 精度管理

精度管理用に送付した菌株 5 株について、各県の施設(A～J)の計 10 施設で、PFGE 法および IS-printing System の両法により、解析した。なお、1 施設は、IS-printing System による解析のみ参加した。PFGE 法は、解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを、IS-printing System は、1st および 2nd set primer ごとに増幅産物のバンドをコード化した表を、いずれも泳動像と共に当センターにメールで送付してもらって、比較検討した。

3. 疫学情報の収集と還元

データベース構築に向けた試行として、中四国地域で発生した患者等由来 EHEC O157 菌株について、各県の施設で IS-printing system により解析し、その結果を多少の疫学情報とともにメールで当センター宛送付してもらった。これらの情報は各県において疫学解析に役立てるため、統合したデータとして各施設に還元した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) PFGE 法による解析結果

中四国ブロックの 10 施設中 9 施設が参加して、PFGE 法の精度管理を実施した。その泳動像とデンドログラムを、図 1 に示した。また、それらの結果をまとめて、表 1 に示した。PFGE の泳動像について、(A) 施設では No1674 のみスメアーになってバンドの確認が難しい状況であった。また、(J) 施設の No1674 で見られた高分子量側の 4 番目のバンドは、他の施設では見られなかった。両施設のそれ以外の菌株の泳動像や他の施設の泳動像は良好であった。デンドログラムによる遺伝子パターンの類似度は、未実施の(A)施設以外の施設では、No1675 と No1680 が 100%一致していた。この 2 株に対する類似度は、No1676 が 86.9%~97.6%、No1674 は 80%~93.2% であった。これら 2 株で類似度の高い順序は、No1676 > No1674 の順が 4 施設 (C、D、G、H)、逆に No1674 > No1676 の順は 3 施設 (E、F、J) で、(I) 施設のみ No1675 及び No1680 に対する No1674 と No1676 の類似度が、90% と同一であった。No T2941 は、No1675 及び No1680 に対する類似度が、どの施設も 65%~84% と低かった。なお、国立感染症研究所で実施した PFGE 型別は、No1674 (h64)、No1675 (h63)、No1676 (g332)、No1680 (g107)、No T2941 (h41) で、それぞれ異なっていた。

(2) IS-printing System による解析結果

IS-printing System の精度管理は、中四国ブロックの 10 施設すべてが参加して実施した。各施設の泳動像および IS コード一覧表は、図 2 および表 2 に示した。泳動像は、ほとんどの施設で PCR の増幅バンド

が充分確認できたが、一部の施設では泳動像がややスメアーになってバンドが確認しづらいもの (B、H 施設) や、泳動時間が長すぎて、スタンダード及び陽性対照の低分子量のバンドがゲル外へ出てしまったケース (A 施設) も見られた。また、泳動距離の短いゲルを使用した場合に、バンドが不鮮明なときは、バンド同士の間隔が狭いため、スタンダードや陽性対照のバンドとの位置関係が判定しにくい傾向が見られた。10 施設中、5 株すべての IS コードが他施設と一致した施設は、7 施設 (C~E、G~J) であった。これら以外の 3 施設のうち、(B) 施設は No T2941 の 1st primer set の IS コードが、(F) 施設は No1676、T2941 の 2 株で 2nd primer set の IS コードが異なっていた。これらの施設はいずれも 1 箇所のバンドを読み違えて異なる結果となっていた。また、(A) 施設は 5 株の 1st および 2nd primer set で、バンドの読み違いにより異なる IS コードになっていた。

2. 中四国地域の発生状況と解析結果

中四国地域で平成 24 年度に発生した EHEC O157 による事例について、各県の施設で患者等由来株の IS-printing System による解析を実施し、PFGE 型を含む疫学情報とともに収集して、表 3~5 にまとめた。

中四国地域で分離された患者等由来 EHEC O157 株は計 155 株で、山口県 43 株、岡山県 31 株、広島県 23 株、島根県 17 株の順に多かった (表 3)。IS-printing System による解析結果から、これらの株は 51 種類の IS コードに分類された。1st および 2nd primer set で増幅されたバンドの IS コード [IS コード (1st) - IS コード (2nd)] 別の株数は、613157-610446 が 18

株で最も多く、305577-211757 が 14 株、717577-611657 が 13 株、717557-611657 が 10 株の順に多かった(表 4)。613157-610446 は 6 月～7 月に山口県(集発)、広島県、岡山県で発生し、305577-211757 は主に 12 月に岡山県で散発事例が多発し、広島県、香川県でも発生が見られた。717577-611657 は 5 月～10 月にかけて広島県を中心とし、島根県、岡山県、香川県でも発生が見られ、717557-611657 は 4 月～12 月にかけて山口県、広島県、香川県、愛媛県で発生した事例であった(表 5)。

D 考 察

本年度の精度管理では、PFGE 法による泳動像およびデンドログラム解析とも、参加したほとんどの施設で良好な結果を示した。No1675 および 1680 は同一家族由来株で、デンドログラム解析ではすべての施設が 100% 一致した結果であったが、感染研の PFGE 解析結果は異なった型に型別された。これは、型別用菌株と精度管理用の菌株の発送時期が異なり、また発送までの菌株の保存状況も異なっていたため、遺伝子の一部に変異が生じた可能性が考えられた。No1675 および 1680 に対する No1674 や 1676 の類似度の差は、それらの類似度がかなり近似しており、デンドログラム作成時のバンド認識の過程で生じた差によるものと思われた。一方、IS-printing system による解析結果は、例年に比べ施設の結果に多少の差が出ており、原因を明らかにして、データベース構築に不可欠な高いデータ精度の維持・向上を図る必要がある。他施設と異なった結果を出した施設では、その原因が増幅バンドのコード化の間違いや、泳動像の不鮮明さによるバンド認識の間違

い、泳動時間超過による増幅バンドのゲル外への流出など、色々なケースが見られた。このうち、コード化の間違などの単純なものは、再チェックにより容易に正しい結果を得ることができる。不鮮明な泳動像については、PCR 反応に供する DNA 量を少量にするなどにより、非特異的な増幅を抑えて、シャープでより見易いバンドにする工夫が必要である。各 primer set で増幅されるバンドが各々 18 本あり、特に、2nd primer set の高分子量側はバンドの間隔がより狭く判別が難しい傾向にあるため、バンド認識の間違が起こり易い。これを回避するために、泳動距離の長いゲルを使用してバンド間隔を広くする方法がある。また、スタンダード DNA と陽性対照を、サンプルの増幅バンドの両側に泳動することで、左右の同じ基準バンドの位置関係から、サンプルバンドの判別が容易になる。泳動時間はバンドの判別が可能な最適な時間を設定する必要があり、各施設で使用する泳動装置に合わせて、スタンダード DNA と陽性対照のバンド 18 本が、ゲルから流出することなく、最もバンド間隔が広くなるような条件を検討する必要がある。今後もさらに、データ精度の向上のため、検討が必要であると思われた。

中四国地域内で発生した EHEC O157 による感染事例では、IS-printing system のデータベース構築に向けて、数年前から IS-printing system により各県の事例解析を行い、メールによる集計と統合されたデータの還元を行って、疫学解析に利用している。本年度は幾つかの IS コードの菌株による発生が多発したことが、IS 解析結果の情報から判明した。特に、例年発生が減少してほとんど見られなくなる 12 月を中心にして、本県で散発事例が多発した際に、

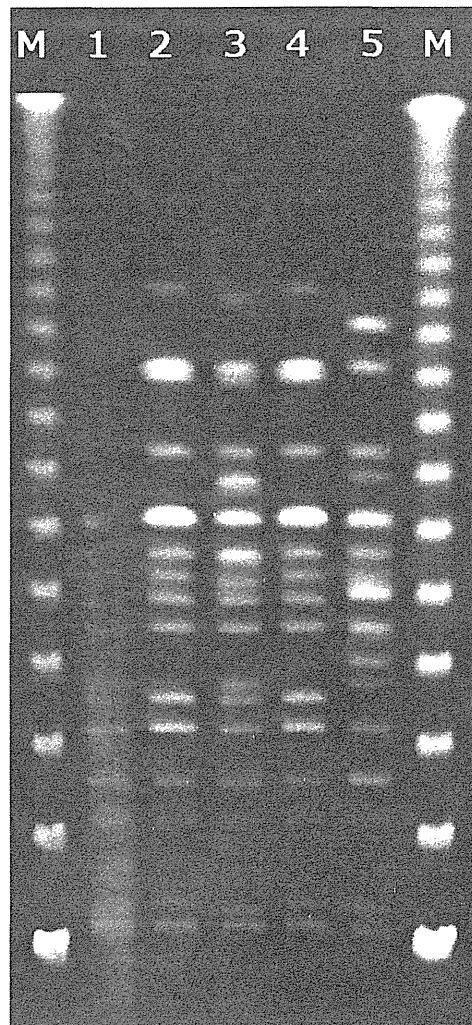
中四国ブロック内の発生状況が把握でき、また本研究班の他地域の IS データへの照会から他府県でも発生事例があったことが確認され、疫学解析に役立てることができた。感染研の IS-printing system データベースは、本年度試行が始まったばかりであるため、未だデータの登録数は少ない状況であるが、将来的には今回のような多発事例発生の際に、感染研のデータベースにアクセスすることで、容易にまた迅速に他地域の同一菌による発生状況を把握でき、疫学解析上非常に役立つものと期待できる。IS-printing system は PFGE 法に比べ手技が簡単で迅速に結果が出るため、有効な疫学解析ツールである。その一方で、今回の精度管理の結果から、正確な解析結果を出すための工夫も欠かせないことが示され、精度管理の重要性を再認識する結果となつた。今後もさらに精度の高いデータベースの構築に向けて、遺伝子解析手法の技術の維持と向上をはかり、O157 による感染症対策に勤めていく必要がある。

E 結論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 VT1,2 菌株を用いて、PFGE 法と IS-printing System による精度管理を実施した。
2. PFGE 法による解析結果は、多くの施設が良好であった。
3. IS-printing System による解析結果は、例年に比べて施設間で結果にやや差が生じたため、正確な結果を出すための検査法の工夫が必要であると思われた。
4. データベース構築に向けて、PFGE 法と IS-printing System の手技の維持・向上のため、継続した精度管理の必要性が示された。
5. IS-printing System による疫学情報の共有が、広域的な事例発生の把握に有用であった。

F. 研究発表 なし。

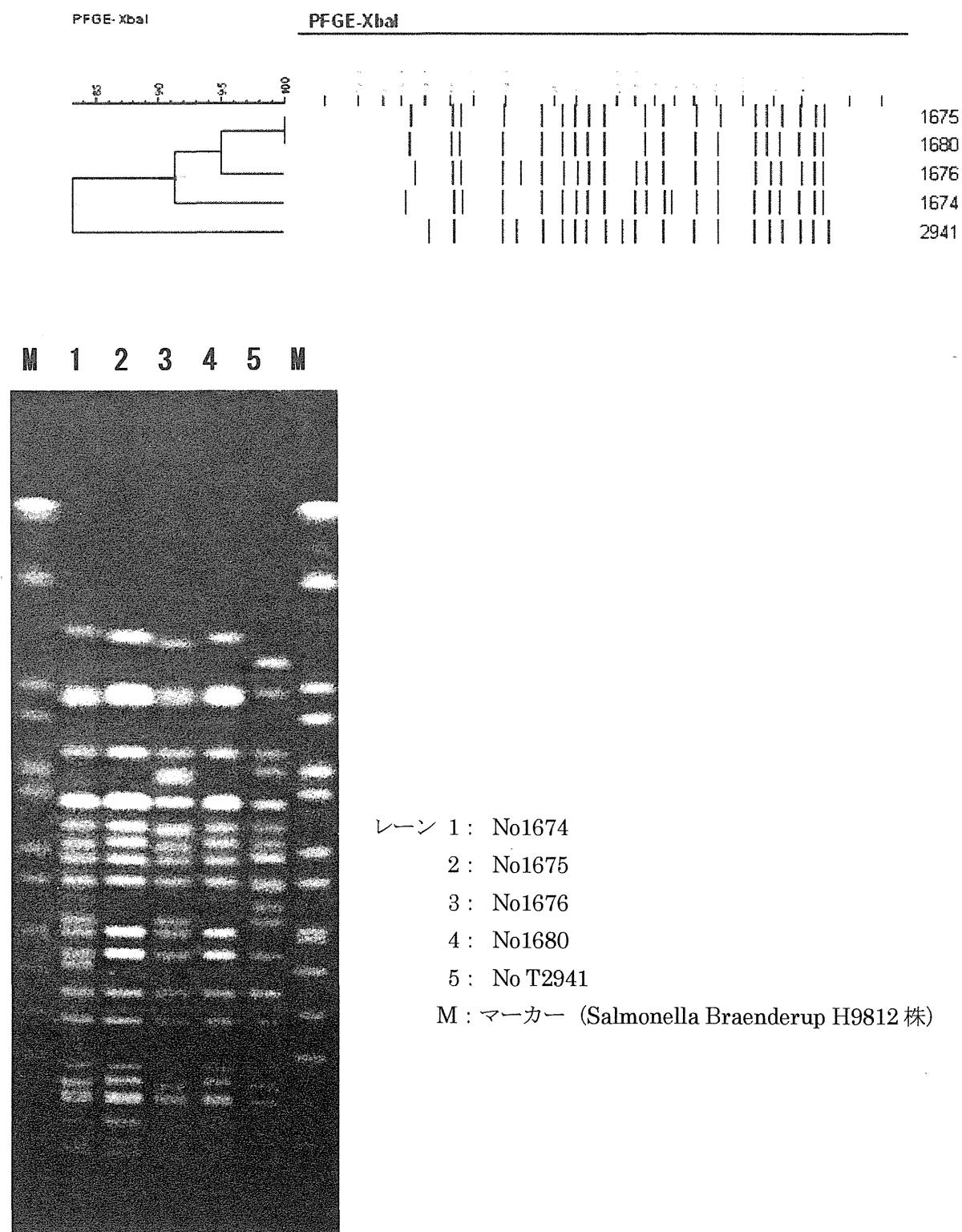
図1 EHEC O157 株の PFGE 法による精度管理結果
(A)



レーン 1 : No1674
2 : No1675
3 : No1676
4 : No1680
5 : No T2941
M : スタンダード DNA (LONZA 社製)

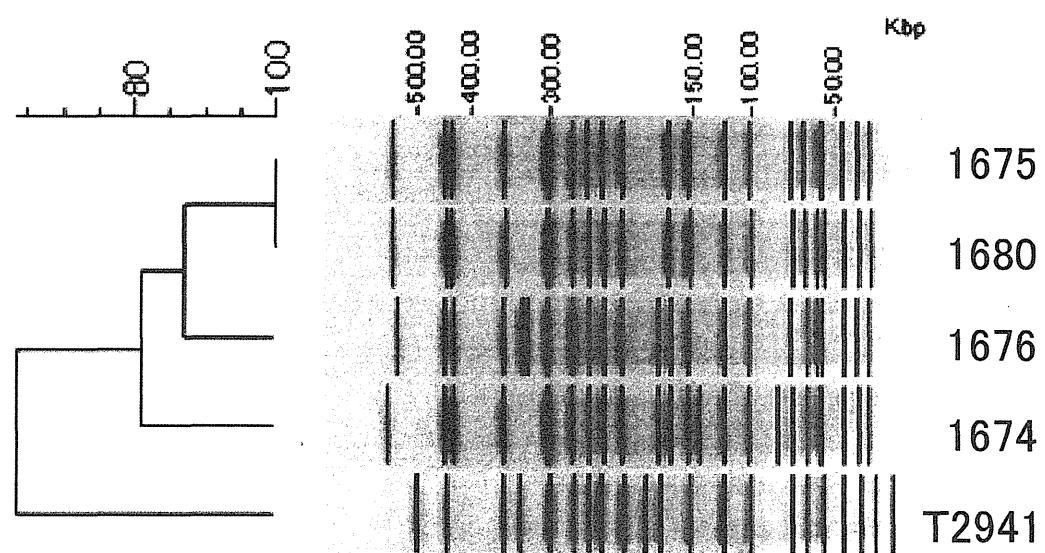
(B)
不参加

(C)

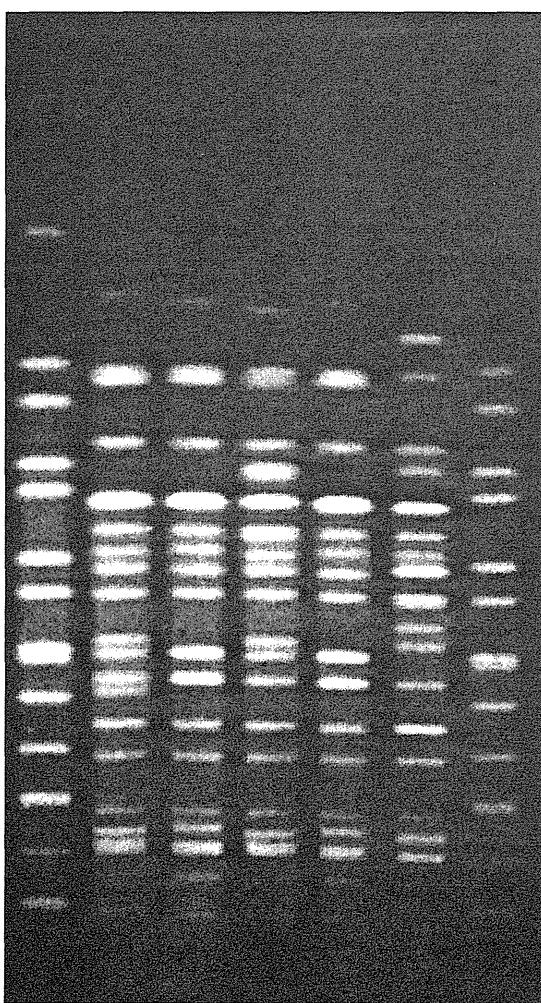


検査まで 4°Cで保存後、実施

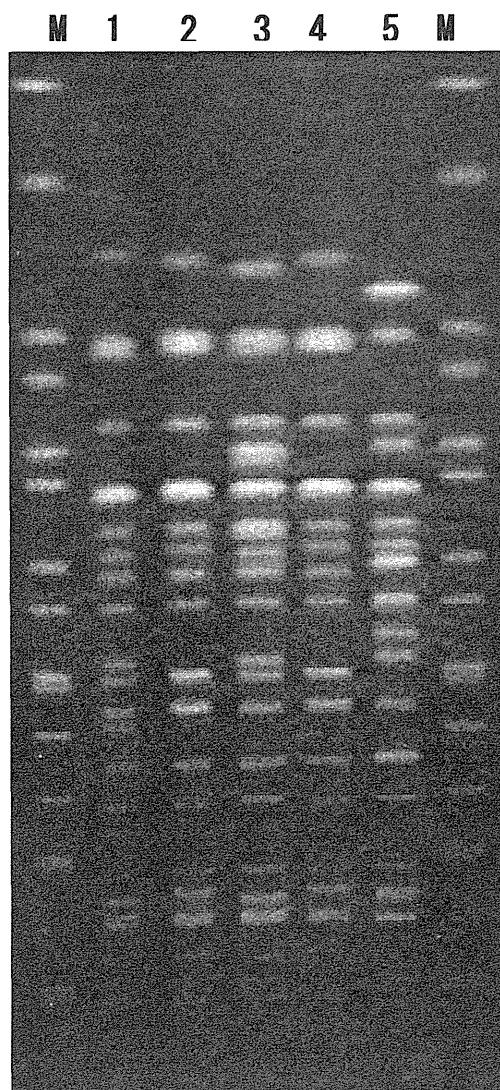
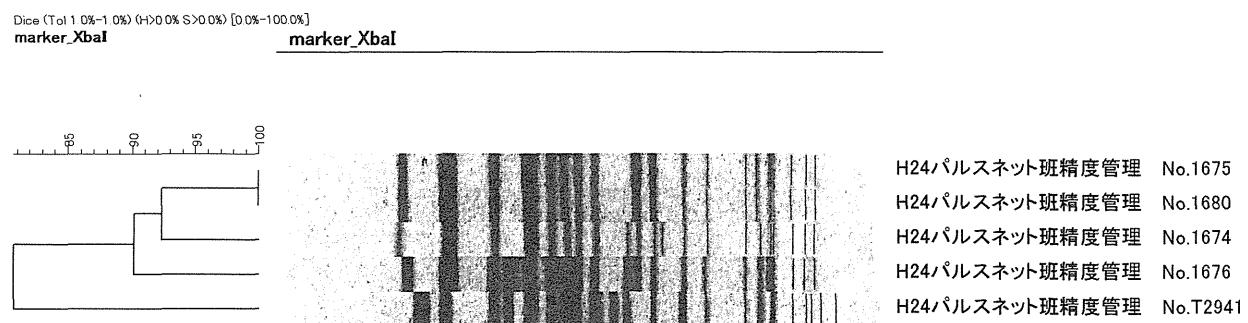
(D)



M 1674 1675 1676 1680 T2941 M



(E)



レーン 1 : No1674

2 : No1675

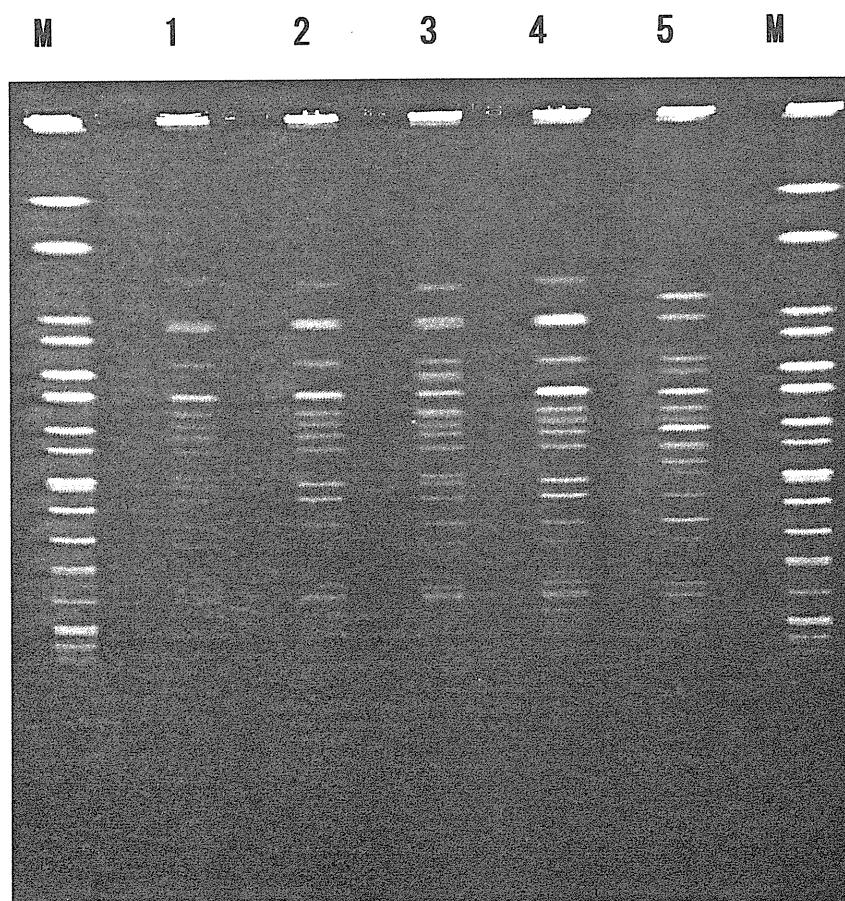
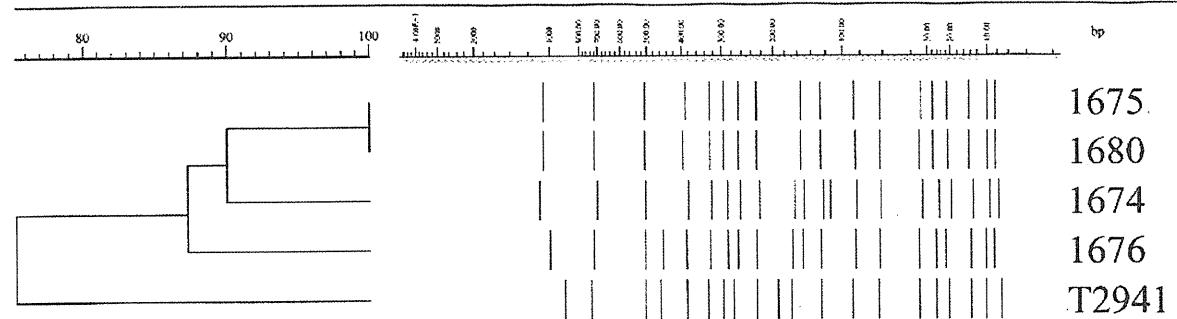
3 : No1676

4 : No1680

5 : No T2941

M : マーカー (Salmonella Braenderup H9812 株)

(F)



レーン 1 : No1674

2 : No1675

3 : No1676

4 : No1680

5 : No T2941

M : マーカー (Salmonella Braenderup H9812 株)