

表2 O157以外の血清型事例概要

事例	菌株	発生日	血清型	VT型	菌株由来	感染研
7	10	5月	O26:H11	1	患者	h 13
	11	8月		1	患者	h 79
8	12	8月	O26:H11	1	保菌者 (家族)	h 80 (菌株 11と 1バンド違い)
	13	8月		1	保菌者 (家族)	h 80
9	14	10月	O26:H11	1	患者	h 138
10	15	10月	O26:H11	1	保菌者	h 137
	16	9月		1	保菌者 (家族)	
11	17	9月	O103:H2	1	保菌者 (家族)	菌株 16と1 バンド違い
	18	10月		1	保菌者 (家族)	菌株 17と同じ
12	19	7月	O146:H21	1&2	保菌者 (同一職場)	
	20	7月		1&2	保菌者 (同一職場)	菌株 19と同じ
13	21	8月	O18:H7	1	患者	
14	22	7月	O不明:H2	2	保菌者	
15	23	8月	O不明:H19	1	保菌者	

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
EHEC

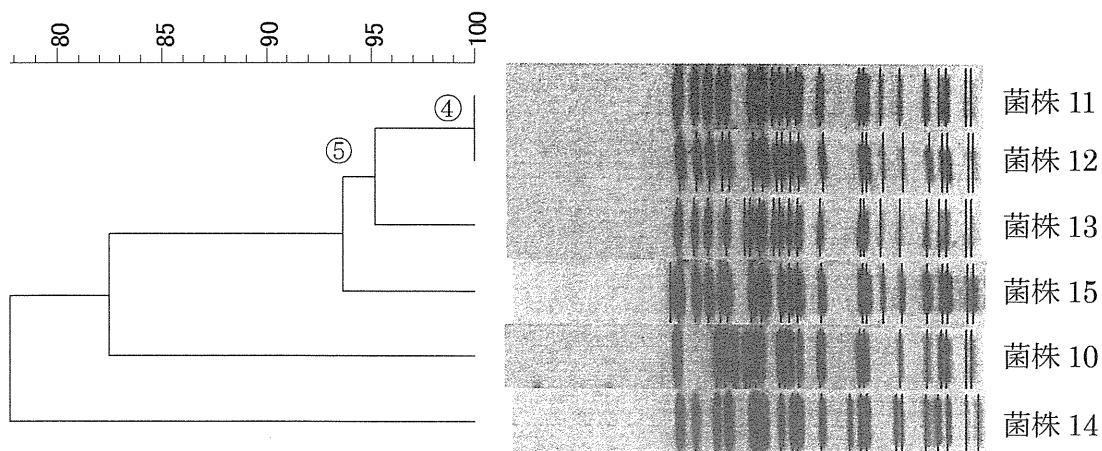


図2 O26 PFGE法結果

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
E-EC

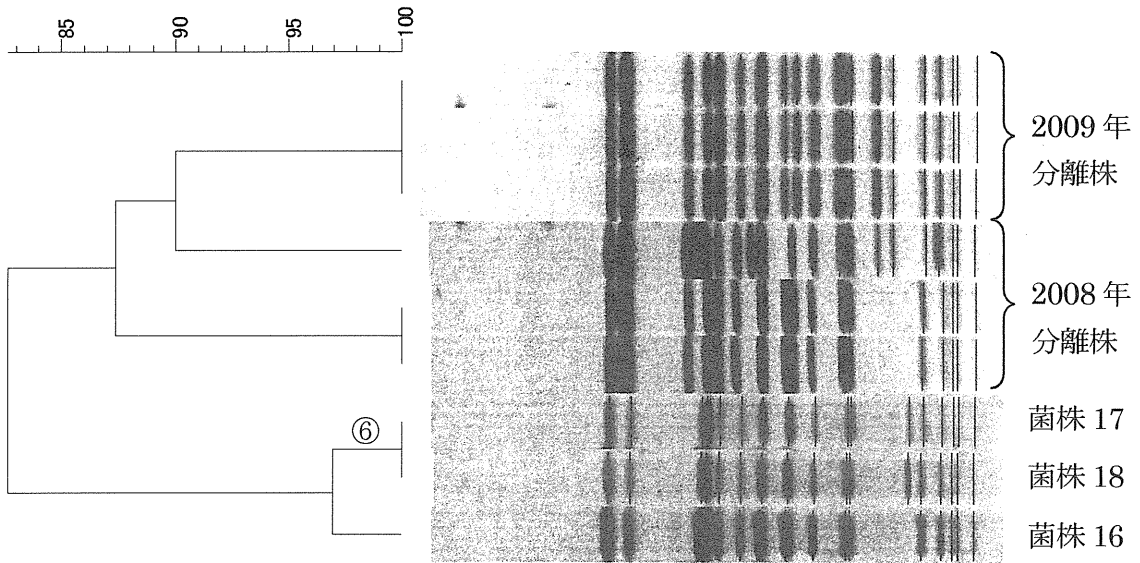


図3 O103 PFGE 法結果

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
EHEC



図4 O146 PFGE 法結果

## 愛媛県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析について

研究協力者 愛媛県立衛生環境研究所

松本純子 林 恵子

### 研究要旨

2012年に愛媛県内で発生した腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）O157感染症事例3件のうち、患者および無症状病原体保有者から分離されたEHEC O157 3株と、2009年から2011年に愛媛県内で分離されたEHEC O157 9株について、パルスフィールドゲル電気泳動（以下、PFGE）、IS-printing System（以下、IS法）、Multilocus variable-number tandem repeat analysis（以下、MLVA）を実施し、3法間の比較及び感染事例での疫学的関連性を検討した。

IS法は、迅速性、簡便性において優れており、スクリーニング検査として位置づけることにより、短期間に発生したO157感染事例の関連性の指標として有効に活用することが可能である。また、今年度から実施したMLVAもIS法と同等の指標として活用することが可能である。PFGEは、IS法と比較して、詳細な疫学解析が可能であることが報告されているが、検査時間が長くかかるため、IS法、MLVA実施後のより詳細な解析手段としての利用が有効であると考えられた。

今後、PFGE、IS法、MLVAによる解析を使い分けることによって、解析結果を迅速に関係機関へ還元し、感染事例発生初期段階での詳細な疫学調査に有効活用することが可能であると考えられた。

### A. 研究目的

EHEC O157について、PFGE、IS法、MLVAを実施し、感染事例間の疫学的関連性を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

2012年に愛媛県内で発生したEHEC O157感染症3事例の患者及び無症状病原体保有者から分離した3株を用いた。

また、PFGE、IS法と今年度から実施したMLVAの3法の比較には、2009年から2011年に愛媛県内で分離されたEHEC O157 9株を用いた。

#### 2. 検査方法

##### (1) IS法

IS法は、添付のプロトコールに準拠した。判定は各プライマーに対する増幅産物の有無を肉眼で確認し、平成19年度の本研究において近畿ブロックが実施した手法で12桁にコード化した。

##### (2) PFGE

国立感染症研究所（以下、感染研）のニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素はXbaIを用い、泳動条件は6.0V/cm、パルスタイム2.2-63.8秒、泳動時間は19時間で行った。得られたDNA切断パターンは画像解析ソフト(BioNumerics Ver6.5、

Applied Maths)を用いて解析を行った。

### (3) MLVA

MLVA 解析には 3130Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems 社)を用い、感染研細菌第一部作成の MLVA プロトコル (2008 年 7 月現在) に準じて 9 か所の Locus (3、9、25、34、17、19、36、37、10) について解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™600 LIZ® Size Standard, Ver.2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。プライマーと蛍光標識については表 1 のように設定した。繰り返し回数 (RN) は感染研が解析した愛媛県分離株 1 株 (H23E059 株) の Fragment size データと当所における 3130Genetic Analyzer による解析データとを比較し、当所の機器にマッチした Fragment size からの RN 換算表を作成し、各 Locus の RN を求めた。

### (4) 薬剤感受性試験

センシ・ディスク (日本 BD) を用い、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に従い、薬剤に対する耐性の有無を判定した。薬剤は、アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、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)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム合剤 (ST)、ホスホマイシン (FOM)、シプロフロキサシン (CPFEX)、ナリジクス酸 (NA)、セフトキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ)、イミペネム (IPM) の 12 種類を使用した。

## C. 研究結果

### 1. O157 感染事例について

EHEC O157 感染症 3 事例の発症日、血清型、毒素型、IS コード、PFGE 型、MLVA RN、病原因子、耐性薬剤、発生状況を示す (表 2)。

今年度発生した事例は IS コード、PFGE ともに 2009 年以降で一致した事例はなかった。

### 2. 3 法の比較について

EHEC O157 9 株について、事例概要、IS コード及び MLVA RN を表 3 に、PFGE パターンを図 1 に示した。MLVA の Locus10 は Hyper variable であるため参考値とし、事例間の比較は Locus10 以外の 8 ケ所で行った。

IS コード、MLVA RN が一致した事例は事例 No.1 と 2、事例 No.3 と 4 で PFGE パターンはすべて異なっていた。事例 No.1 と 2 の IS コードは、検出されたバンドが多かったため事例 No.3 と 4 の IS コードとは 1 カ所異なっていた。また、MLVA の Locus9 の RN は事例 No.1 と 2 は 11、事例 No.3 と 4 は 12 で異なっていた。

事例 No.5~7 は 2011 年に人から広域に分離された株として報告があった株<sup>1)</sup>(感染研サブタイプ名 f93)であり、IS コード、MLVA RN、PFGE パターンはすべて一致した。

事例 No.8 は家族内での発生であり、IS コード、MLVA RN、当所で実施した PFGE パターンはすべて一致したが、感染研で実施した PFGE パターンは異なっていた。

## D 考察

今年度実施した EHEC O157 9 株では、IS コードが一致するものは MLVA RN も一致した。本県では、O157 感染事例が発生した場合、菌株搬入後、迅速に IS 法による解析を実施し、関係機関への情報提供を行

なっている。IS法は迅速性、簡便性において優れており、スクリーニング検査として位置づけることにより、短期間に発生したO157感染事例の関連性の指標として有効に活用することが可能である。また、MLVAも約1日で解析を行うことができ、IS法と同様にスクリーニング検査として位置づけることが可能であると考えられる。ISコードが一致していても、MLVA RNが異なる事例も報告されていることから、両法の結果が一致していれば同一感染源である可能性が高く、詳細な疫学調査を実施して原因究明に役立てることができると思われる。

さらに両法とも結果をコード化することによって、過去の事例で分離された菌株との比較やデータのやりとりが容易であることから、広域的な疫学解析に有効であると思われる。今後、全国的なデータベースが構築され、情報交換をリアルタイムで行える環境が整備されることにより、広域感染事例発生時の早期対応が可能となり、感染拡大防止対策において、大変有用であると

考えられる。

PFGEは、IS法、MLVAと比較して、詳細な疫学解析が可能であることが報告されているが、検査時間が長くなるため、IS法またはMLVAによるスクリーニング検査実施後のより詳細な解析手段としての利用が有効であると考えられる。

#### E 結論

- 2012年に愛媛県内で発生したEHEC O157感染症事例3件のうち、患者及び無症状病原体保有者から分離した3株について、PFGE、IS法、MLVAを用いて分子疫学解析を行なった。
- MLVAは、IS法と同等のスクリーニング検査として有用な方法であると思われた。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 参考文献

- 病原微生物検出情報、33、127-128(2012)

表1 MLVA primer と Dye set

PCR Mix	Locus		Dye	primer(5'-3')
R1	3	Forward	6-FAM	GG CGG TAA GGA CAA CGG GGT GTT TGA ATT G
		Reverse		GAA CAA CCT AAA ACC CGC CTC GCC ATC G
	9	Forward	PET	GC GCT GGT TTA GCC ATC GCC TTC TTC C
		Reverse		GTG TCA GGT GAG CTA CAG CCC GCT TAC GCT C
	25	Forward	VIC	GC CGG AGG AGG GTG ATG AGC GGT TAT ATT TAG TG
		Reverse		GCG CTG AAA AGA CAT TCT CTG TTT GGT TTA CAC GAC
34	Forward	6-FAM	GA CAA GGT TCT GGC GTG TTA CCA ACG G	
	Reverse		GTT ACA ACT CAC CTG CGA ATT TTT TAA GTC CC	
R2	17	Forward	NED	GC AGT TGC TCG GTT TTA ACA TTG CAG TGA TGA
		Reverse		GGA AAT GGT TTA CAT GAG TTT GAC GAT GGC GAT C
	19	Forward	NED	GC AGT GAT CAT TAT TAG CAC CGC TTT CTG GAT GTT C
		Reverse		GGG GCA GGG AAT AAG GCC ACC TGT TAA GC
	36	Forward	PET	GG CGT CCT TCA TCG GCC TGT CCG TTA AAC
		Reverse		GCC GCT GAA AGC CCA CAC CAT GC
37	Forward	6-FAM	GC CGC CCC TTA CAT TAC GCG GAC ATT C	
	Reverse		GCA GGA GAA CAA CAA AAC AGA CAG TAA TCA GAG CAG C	
R3	10	Forward	VIC	CAGCCTCCTGCAAACCTTTACTGTTTCATTTCTACAGTCTC
		Reverse		GGATCTGTCTGTATCATTCATTGAATGAACAACCCATTTC

表 2 腸管出血性大腸菌 O157 感染症解析結果

事例 No.	菌株 No.	発症日 <sup>1)</sup>	患者分類	血清型	毒素型	ISコード	MLVA RN										PFGE 型 <sup>3)</sup>	病原 因子	薬剤耐性	発生 状況
							3	9	25	34	17	19	36	37	10 <sup>2)</sup>					
1	H24E144	6/24	患者	O157:H7	VT1&2	717557-611657	12	9	5	10	6	6	10	8	35	12-01	<i>eaeA+</i>	ABPC,SM,TC	散発	
2	H24E149	7/4	無症状	O157:H7	VT1&2	115045-343447	-	7	4	7	4	7	9	7	40	12-02	<i>eaeA+</i>	なし	散発	
3	H24E197	8/8	無症状	O157:HUT	VT1&2	211057-310047	15	11	5	8	3	8	4	5	15	12-03	<i>eaeA+</i>	なし	散発	

- 1)患者分類が無症状の場合は、菌検出日を記載  
 2)Locus10はHyper variableであるため参考値  
 3)本所で実施したPFGE型を記載

表 3 O157 事例概要と IS コード、MLVARN 及び PFGE 型

事例 No.	菌株 No.	発症日 <sup>1)</sup>	患者分類	血清型	毒素型	ISコード	MLVA RN										PFGE 型 <sup>3)</sup>	PFGE 型 <sup>4)</sup>	発生 状況
							3	9	25	34	17	19	36	37	10 <sup>2)</sup>				
1	H21E231	2009/7/5	患者	O157:H7	VT1&2	317577-611756	8	11	5	10	7	6	6	7	47	09-03	d73	散発	
2	H21E283	2009/9/27	患者	O157:H7	VT1&2	317577-611756	8	11	5	10	7	6	6	7	50	09-07	e627	散発	
3	H22E161	2010/8/14	患者	O157:H7	VT1&2	317575-611756	8	12	5	10	7	6	6	7	51	10-02	f513	散発	
4	H23E059	2011/5/11	患者	O157:H7	VT1&2	317575-611756	8	12	5	10	7	6	6	7	50	11-01	g557	散発	
5	H23E083	2011/7/23	患者	O157:H7	VT1&2	613575-610446	13	16	5	9	7	4	12	6	29	11-03	f93	散発	
6	H23E084	2011/7/22	患者	O157:H7	VT1&2	613575-610446	13	16	5	9	7	4	12	6	24	11-03	f93	散発	
7	H23E086	2011/8/1	患者	O157:H7	VT1&2	613575-610446	13	16	5	9	7	4	12	6	25	11-03	f93	散発	
8	H23E128	2011/10/17	患者	O157:HUT	VT1&2	717577-251457	14	15	5	9	7	6	8	6	22	11-07	g556	家族	
	H23E132	2011/10/31	無症状	O157:HUT	VT1&2	717577-251457	14	15	5	9	7	6	8	6	22	11-07	g554	家族	

- 1)患者分類が無症状の場合は、菌検出日を記載  
 2)Locus10はHyper variableであるため参考値  
 3)本所で実施したPFGE型を記載  
 4)感染研で実施したPFGE型を記載

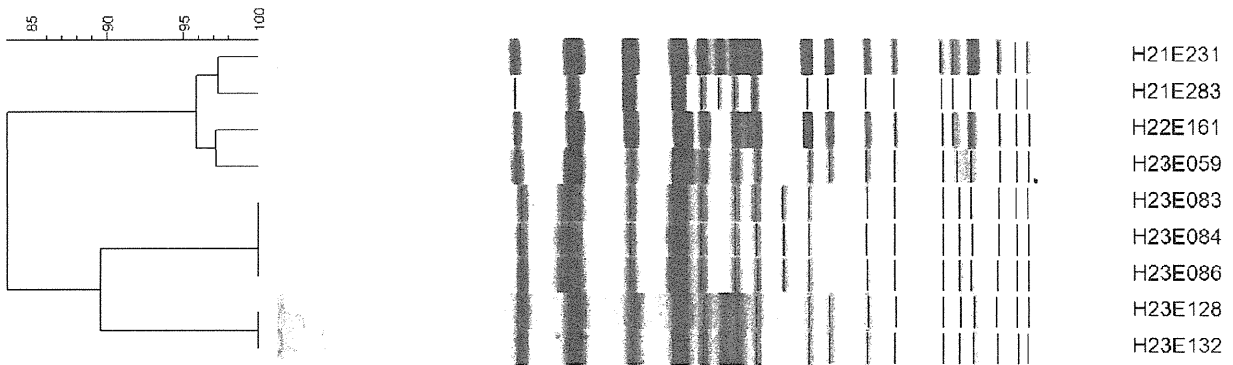


図 1 PFGE パターン

## 中四国ブロックにおける高知県での食中毒疑 2 事例での分子疫学解析

研究協力者 高知県衛生研究所

藤戸亜紀、鍋島 民、松本 一繁、松本 道明

### 研究要旨

高知県において、2012年8月 *Salmonella* Virchow による食中毒事例が発生した。また、同時期に感染症発生動向調査で搬入された菌血症を呈した3症例は *S. Virchow* によるものであった。これらは同じ地域での発生であったため、制限酵素 *Xba*I および *Bln*I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法（以下 PFGE 法）による分子疫学解析を行った。その結果、食中毒由来 *S. Virchow* 菌株7株中5株で PFGE 泳動パターンが一致した。感染症発生動向調査由来菌株とも高い一致率を示したが、原因追求には至らなかった。

また、10月に腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒疑事例があり、IS-printing system および制限酵素 *Xba*I を用いた PFGE 法により分子疫学解析を実施した結果、IS コード、PFGE 泳動パターンとも一致した。

### A. 研究目的

#### 【事例1 *Salmonella* Virchow】

2012年9月1日 S 市内の医療機関から複数の食中毒様症状を呈する患者がいるとの連絡が H 保健所にあった。疫学調査の結果、8月28日から29日の間に S 市の料理店が調製した料理を喫食した14名中11名が発熱、下痢、腹痛等を主症状とする食中毒様症状を呈した。患者の共通食は同施設の調製した食事および弁当のみであること、患者便（9人中3名）からサルモネラ属菌（O7 属）が検出されたことから、同施設を原因施設とする食中毒と断定した。当所では H 保健所の依頼により、その後分離された便由来3菌株および食品由来2菌株を合わせた計8菌株の同定と PFGE 法による分子疫学解析を実施した。また、同時期に S 市内の別の医療機関において、サルモネラ属菌（O7 属）による感染症例が複数あり、そのうち菌血症を呈した小児3例の検体が感染症発生動向調査検体として搬入された。これらの小児には食中毒事例におけ

る原因施設での喫食はなかったが、食中毒事例由来菌株と同じ血清型であったため、同時に PFGE 法による分子疫学解析を実施した。

#### 【事例2 腸管出血性大腸菌 O157】

2012年10月15日 K 市内の医療機関から K 保健所に腸管出血性大腸菌 O157 感染症の発生届があり、疫学調査を実施したところ、友人2名と焼肉店を利用していたことが判明した。友人のうち1名は、調査時点では症状はおさまっていたが、焼肉店での食事後数日間下痢症状が続いていたとのことで K 保健所で検査をしたところ腸管出血性大腸菌 O157 が検出された。

また、10月17日に同医療機関より新たな腸管出血性大腸菌 O157 感染症の届出が出され、調査の結果、同じ焼肉店の利用が判明した。

2 グループ3人は同一店舗を利用していたが、喫食日が異なっていたため、K 保健所の依頼により PFGE 法による分子疫学

解析を行った。また、同時に IS-printing system による解析も実施した。

## B. 研究方法

### 【事例1 *Salmonella* Virchow】

#### 1. 血清型別

H 保健所から依頼のあった 8 菌株および感染症発症動向調査で搬入された 3 菌株について、サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研) を用い血清型を確定した。

#### 2. PFGE 法

食中毒由来 8 菌株中血清型の一致した食中毒関連 6 菌株と H 血清型別が一部不能であった 1 株および感染症発症動向調査由来の 3 菌株の計 10 菌株について、感染研ニュープロトコールに基づき PFGE 法による解析を行った。制限酵素は *Xba* I (Roche) および *Bln* I (Roche) を使用し、37°C で一夜消化した。泳動条件は 6.0/cm、パルスタイム 2.2-54.2sec、バッファー温度 14°C、泳動時間 19 時間で行った。サイズマーカーは *Salmonella* Braenderup H9812 の *Xba* I 切断を使用した。

### 【事例2 腸管出血性大腸菌 O157】

#### 1. 血清型別

2 グループ 3 菌株について、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いて O 血清型、H 血清型を確定した。

#### 2. PFGE 法

事例 1 と同様に感染研ニュープロトコールに基づき行った。制限酵素は *Xba* I を使用した。

#### 3. IS-printing system

IS-printing system キット(東洋紡)を用い、添付の説明書に従って実施した。電気泳動には 3%濃度のアガロース(Nusive GTG : SeaKem GTG=2 : 1)を用いた。結

果はプライマーごとに Standard DNA18 バンドを、増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」「2」「4」の数字を当て、増幅された場合にはその数字を加算し、1st、2nd の順に並べて 12 ケタにした IS コードを用いた。

## C. 研究結果

### 【事例1 *Salmonella* Virchow】

#### 1. 血清型別

食中毒関連 8 菌株のうちわけは、患者便から分離培養された 6 菌株と、卵液および調理済み残品から分離培養された各 1 菌株であった。すべて O7 群であったが、卵液から検出された菌株(食 No.4)は *Salmonella* Mbandaka (O7 : z10 : e,n,z15) であった。調理済み残品由来の 1 菌株および患者便由来 6 菌株中 5 菌株は *S. Virchow* (O7 : r : 1,2) であった。患者便由来の 1 菌株(食 No.5)は O7 : r : UT であった。感染症発症動向調査由来の 3 菌株はすべて *S. Virchow* であった(表 1)。

#### 2. PFGE 法

食中毒由来菌株では、*S. Virchow* と判定した患者由来 5 菌株(食 No.1-3,6,7)は *Xba* I、*Bln* I とともに泳動パターンが一致した。血清型判定不能の菌株(食 No.5)は *Xba* I で 96.78%、*Bln* I で 86.65%の相同性を示した。調理済み残品由来の 1 菌株(食 No.9)は *Xba* I で 96.28%、*Bln* I で 94.12%と高い相同性を示した(図 1,2)。

感染症発症動向調査由来の 3 菌株中 2 菌株(感 No.1,2)は *Xba* I、*Bln* I とともに泳動パターンが一致した。また、この 2 菌株は *Xba* I 処理では食中毒由来菌株(食 No.8)とパターンが一致した。



#### 【事例2 腸管出血性大腸菌 O157】

2グループ3菌株ともVT型は1,2、血清型はO157:H7、ISコード317577-611756であった(表2)。また、PFGE法パターンも一致した(図3)。

#### D 考察

##### 【事例1 *Salmonella* Virchow】

液卵から分離培養された菌株は *S.* Mbandaka であった。しかし、推定喫食日に使用された液卵は残っておらず、その後調製された液卵から分離培養された菌株であった。患者便から分離培養された *S.* Virchow 5 菌株は *Xba* I、*Bln* I とともにPFGE法パターンが一致し、疫学調査の結果とあわせ、該当施設による食中毒事例であると考えられた。

感染症発生動向調査由来2菌株と食中毒事例での調理済み残品由来の1菌株が *Xba* I でPFGEパターンが一致し、同一起源が疑われたが、疫学的関連性を見つけることが出来なかった。しかしながら、事例発生当時感染性胃腸炎等で同じ血清型のサルモネラ属菌が検出されていることから、この地域に一過性の流行があったことは推察された。

#### 【事例2 腸管出血性大腸菌 O157】

2グループ3菌株とも血清型、PFGE法パターン、ISコードが一致し、PFGE法同一起源であることが示唆された。

#### E 結論

##### 【事例1 *Salmonella* Virchow】

同一地域での食中毒1事例、感染症発生動向調査3件から分離されたサルモネラ属菌(O7群)11検体中9検体が *S.* Virchow であった。食中毒事例では、血清型の一致した患者便由来5菌株は同じPFGE法パターンを示した。同時期同一地域で発生した感染症発生動向調査由来3事例と食中毒事例との疫学的関連性を見つけることはできなかった。

##### 【事例2 腸管出血性大腸菌 O157】

同一焼肉店を利用していたが喫食日の異なる2グループ3人から分離培養された菌株では毒素型、血清型、ISコード、PFGE法のパターン全てが一致し、疫学調査の結果を裏付けた。

表1. サルモネラ属菌 (O7属) 菌株の概要

検体番号	検体 (由来)	血清型別
食 No. 1	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>
食 No. 2	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>
食 No. 3	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>
食 No. 4	菌株 (液卵)	行政検査依頼関連 菌株 <i>S. Mbandaka</i>
食 No. 5	菌株 (便)	型別不能 (O7:r:UT)
食 No. 6	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>
食 No. 7	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>
食 No. 8	菌株 (食品)	<i>S. Virchow</i>
感 No. 1	菌株 (便)	感染症発生動向調 査関連菌株 <i>S. Virchow</i>
感 No. 2	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>
感 No. 3	菌株 (便)	<i>S. Virchow</i>

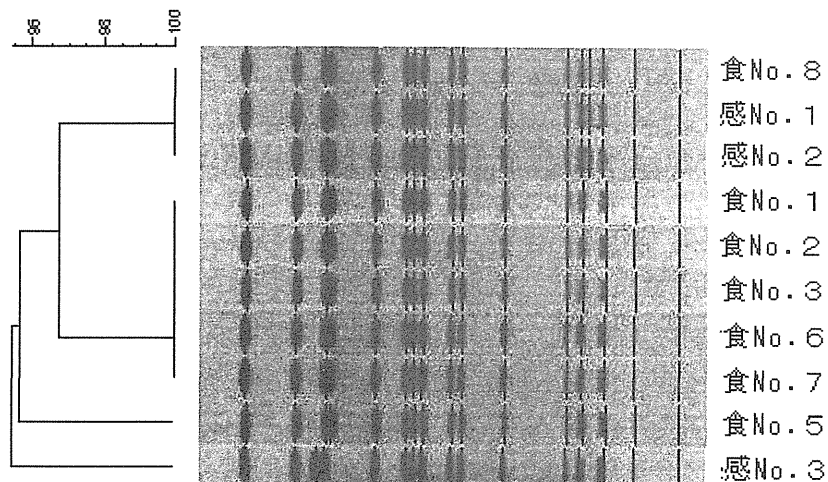


図1. 制限酵素 *Xba* I による PFGE 法デンドログラム (*S. Virchow*)

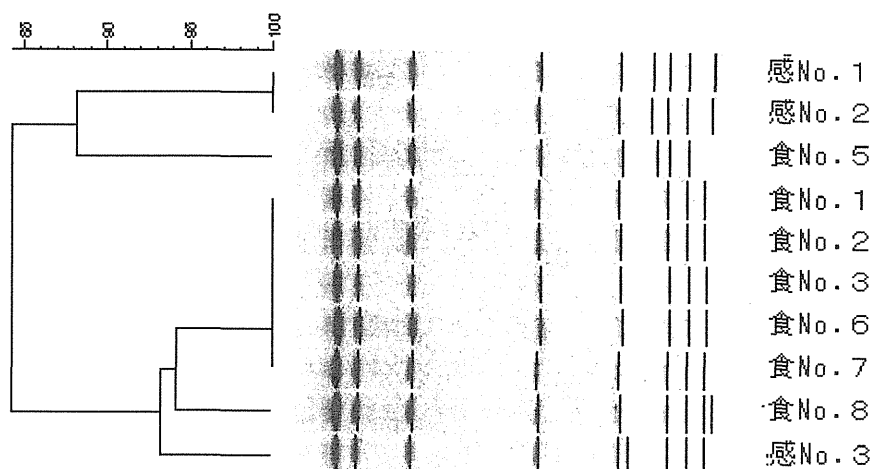
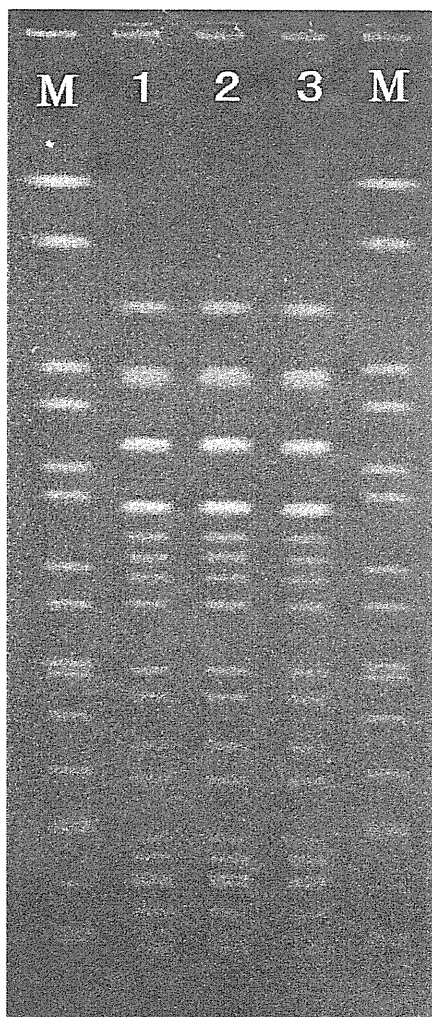


図2. 制限酵素 *Bln* I による PFGE 法デンドログラム (*S. Virchow*)

表2. 腸管出血性大腸菌株の概要

検体 番号	年齢	性別	毒素型	血清型	IS コード		感染研 PFGE 型
					1st	2nd	
No.1	19	男	VT1,2	O157 : H7	317577	611756	e786
No.2	19	女	VT1,2	O157 : H7	317577	611756	e786
No.3	54	女	VT1,2	O157 : H7	317577	611756	e786



M : マーカー  
 1 : 検体 No. 1  
 2 : 検体 No. 2  
 3 : 検体 No. 3

図3. O157 : H7 の PFGE パターン

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

九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究  
— IS-printing System のデータ共有化と九州地区での非 O157EHEC 検出状況 —

研究分担者	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	寺西泰司	北九州市環境科学研究所
	成瀬佳菜子	佐賀県衛生薬業センター
	右田雄二	長崎県環境保健研究センター
	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
	徳岡英亮	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
	濱田まどか	鹿児島県環境保健センター
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	江藤良樹、前田詠里子	福岡県保健環境研究所

## 要旨

九州ブロックでは、1) IS-printing System (ISPS) のデータ共有化、2) 九州地区での非 O157 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 検出状況の解析、3) ISPS 精度管理について取り組んだ。さらに、4) 大分県および 5) 福岡市で発生した EHEC O157 集団事例における ISPS での解析事例、6) 沖縄県でのサルモネラ食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による分子疫学的解析、7) 宮崎県での毒素原性大腸菌の PFGE による分子疫学的解析、および 8) 北九州市で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例に関して報告する。本稿では、1) ISPS データの共有化状況、および 2) 九州地区での非 O157EHEC 検出状況について報告する。

九州地区における ISPS データ登録数(平成 24 年 12 月現在)は 207 件であった。ISPS の結果および疫学調査により、7 事例が集団発生と確認された。一方、九州地区で検出または収集された非 O157 は 343 株であった。非 O157 による集団発生事例は、O103 が 5 事例、O26 および O111 が各 4 事例、O145 が 2 事例、および O186 が 1 事例、計 16 事例であった。

## A. IS-printing System(ISPS)のデータ共有化

### A-1. 概要

宮崎大学医学部林教授のグループにより開発<sup>1)</sup>された ISPS は、O157 のゲノム構造多形を PCR によって判定し、菌株識別をするものであり、検査結果をデジタル化することが容易である。そこで、九州ブロックでは平成 22 年度から ISPS 情報を登録し、菌情報の共有化を行っている。本システムを利用して、各地研が ISPS 情報登録時に ISPS コードを検索することにより、自地研内での同一 ISPS code、および他地研での存在を確認することにより、菌株間の関連性についてモニタリングを行っている。ここでは平成 24 年 4 月から平成 25 年 2 月までの登録数並びに登録された ISPS の関連性について解析する。

### A-2. ISPS と登録菌株

#### A-2-1. ISPS とその結果の解析

ISPS は、IS (insertion sequence) の分布を利用したマルチプレックス PCR による O157 サブタイピング法である。IS の検出は、ISPS キット Version 2 (TOYOBO 製) を用い、取扱説明書に従って実施した。ISPS キットは、2 種類のプライマーセット (1st set / 2nd set) を用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動で検出する。2 種類のプライマーセットにより、IS の分布に由来する 32 の増幅バンド (No. 1-01 ~ 1-16/2-01 ~ 2-16) および病原性関連遺伝子 (*stx1* / *stx2* / *eae* / *hlyA*)、計 36 種の遺伝子を検出する。菌株間の相同性を比較するためには、36 種のプライマーによって得られた PCR 増幅情報を数値化しなければならない。そこで、Excel の VBA を用いた解析ソフトを開発し、九州地区地研へ配布した。このソフトは、増幅バンドの有無を 1、0 の 2 進数とし、さらに 10

進数に変換して 11 桁の整数に数値化する。得られたこの数値を ISPS コードとした。

#### A-2-2. 登録菌株

登録株数は、平成 24 年度 (1 月 31 日時点) は 207 件であった (表 1)。O157 による集団発生事例は 7 事例で、その内訳は、保育所 3 事例、施設 1 事例、焼肉店 1 事例、農村体験学習 1 事例、および仕出し弁当による食中毒 1 事例であった (表 2)。

#### A-3. ISPS 登録により判明したこと

平成 24 年度に登録された O157 の ISPS code と登録地研を表 3 に示した。207 株は 79 種の ISPS code に分類され、60 種は単一の地研により登録され、他 19 種は複数の地研からの登録であった。

ISPS 登録により菌株の相同性について得られた結果は、株間の関連性を比較する上で各自治体において疫学調査に大きく寄与した。さらに、複数の地研に跨った事例 II、III、VI においては、菌株のやりとりをすることなく事前の連絡によって、株間の相同性を比較することができた。事例 II は、9 月に福岡県から大分県の牧場を体験学習のため訪問し、参加した小学生が発症した事例である。大分県内で同時期に検出した事例はなかったが、6 月に同一 ISPS code【57733470538】の O157 が検出され、前後して福岡県や福岡市でも同型の O157 が分離されていた。事例 III は、7 月に仕出し弁当が原因と推定された食中毒事例で、当該弁当は広範囲に販売されていた。福岡市から福岡県への連絡により関連性を疑われる患者由来株について速やかに登録を行い、同一 ISPS code であることが判明し、その後の原因究明が迅速に行われた (本報告書に福岡市から別途報告)。事例 III の ISPS code は【57733536074】で、福岡市と福岡県以

外の 4 地研からも登録がされていた。22 株中 10 株は食中毒事例株であったが、他 12 株はいずれも原因は特定されていない。事例 VI は 9 月に大分県で発生した食肉が原因と考えられる食中毒事例で、ISPS により因果関係が解明され、食肉の流通ルートまで遡り調査が行われ、迅速な予防対策がとられた(本報告書に大分県から別途報告)。事例 VI の ISPS code は【66324257231】で、大分県の他に福岡市および福岡県からも登録され、焼肉が関係した事例も見られたが因果関係は判明していない。

平成 23 年度に登録された ISPS code と登録地研を表 4 に示した。登録数は 223 株で、66 種の ISPS code に分類され、21 種が 2 地研から 7 地研に跨っていた。平成 24 年度と同型の ISPS code は 18 型であった。18 型中 ISPS code【57733470538】、【57733536074】および【66324257743】の 3 型は、平成 24 年度の集団発生事例 II、III および VII の原因株と同型であった。このように ISPS code の種類は経年的な推移がみられ、流行株についての監視が必要であると考えられた。

#### A-4. まとめ

九州地区での ISPS による菌情報の共有化は、地研間の協力により順調に行われてきた。一方で、ISPS を利用した菌情報の共有化のためには、正確な ISPS 結果を得ることが必要十分条件である。今後も、定期的な ISPS の研修並びに精度管理が必要不可欠と考えられた。

## B 九州地区での非 O157 EHEC 検出状況

### B-1. 概要

国立感染症研究所に送付される EHEC の O 群血清型は、平成 23 年(2011)の集計では

O157 が 59%、O26 が 21%、O145 が 5.7%であった<sup>2)</sup>。近年、特に非 O157 群血清型 EHEC を原因とする発生事例が増加傾向にあり、集団発生事例についても多数報告されている。九州地区の地研において検出または収集された菌株数について集計を行い、その状況について解析した。

### B-2. 非 O157 EHEC 菌株数

九州地区 12 地研にて平成 24 年 4 月から 12 月までに 343 株の非 O157 EHEC 菌株が収集された(表 5)。343 株のうち 323 株が 21 種類の O 群に型別された。その内訳は、O26 が 95 株(28%)、O111 が 94 株(28%)とほぼ同数で、両者が全体の 50%以上を占めた(図 1)。これについて、O103 が 58 株(13%)、O145 が 35 株(10%)、O91 が 11 株(3%)の順であった。20 株は O 群血清型不明であった。

### B-3. 集団発生事例

集団発生があった非 O157 EHEC は、5 種 O 群で O103 が 5 事例、O26 および O111 が各 4 事例、O145 が 2 事例および O186 が 1 事例で、合計 16 事例であった(表 2)。集団発生事例の内訳は、保育所が 11 事例、保育所以外の集団生活施設が 3 事例、飲食店関連 1 事例、および生の食肉が原因と考えられる 1 事例であった。これらの集団発生事例の原因は、いずれも究明されていない。

平成 24 年度に九州地区での EHEC による集団発生事例(平成 24 年 12 月末集計)は 23 事例で、そのうち O157 による事例は 7 事例で全体の約 3 割であった(表 2、図 2)。O26 や O111 を原因とした保育所等での集団発生事例は従来から多発していたが、O103、O145 および O186 による集団発生事例が 8 事例と多様な O 群血清型の EHEC による事例が多い特徴があった。

#### B-4. まとめ

「大量調理施設衛生管理マニュアル」が平成 20 年に改正<sup>4)</sup>され、調理従事者(食品の盛付け・配膳等、食品に接触する可能性のある者及び臨時職員を含む)の検便対象項目が EHEC O157 から非 O157 を含む EHEC へと拡大された。これにより、検査機関での検査項目も拡大され、非 O157 EHEC 感染者が顕在化しているものと推察される。一方で、EHEC の食中毒の場合、原因の特定が容易ではなく、いずれの事例も原因は不明であった。今後、非 O157 においても、何らかの方法により菌情報の共有化が必要と考えられた。

#### C. 文献

- 1) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, and Hayashi T.: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J Clin Microbiol. 2009, 47:2888-94.
- 2) 病原微生物検出情報 (IASR)、Vol.33 No.5(No.387).
- 3) 食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究(課題番号:H21-信仰-一般-003)平成 23 年度総括・分担九州ブロック報告書。
- 4) 食安発第 0618005 号、平成 20 年 6 月 18 日付、「大規模食中毒対策等について」(平成 9 年 3 月 24 日付衛食第 85 号(最終改正:平成 12 年 28 日付け生衛発第 1891 号))別添の「大量調理施設衛生管理マニュアル」の改正。

表 1. 3年間の ISPS データの登録数

2013.1.31 現在

地研	IS 登録数(年度別)			
	平成 22 年	平成 23 年	平成 24 年	合計
1	112	47	40	199
2	40	53	44	144
3	30	15	12	57
4	12	10	17	39
5	23	18	11	52
6	6	5	4	15
7	13	16	23	52
8	16	10	5	31
9	5	3	7	15
10	20	14	16	50
11	19	25	21	65
12	6	7	7	20
合計	302	223	207	739

表 2. 平成 24 年度に九州地区地研で確認された集団発生事例数

地研	集団事例 計	(O157 以外計)	O群血清型					
			混合3 O157	混合1 O26	混合1 O111	混合9 O103	混合9 O145	混合9 O186
1	5	(4)	1 (農村体験)	1 (保育所)		2 (W飲食店、K食肉)*	1 (保育所)	
2	2	(1)	1 (仕出し弁当)			2 (W飲食店、K食肉)*	1 (保育所)	
3								
4	4	(3)	1 (修道院)	1 (保育所)		1 (施設)		1 (施設)
5	1	(0)	1 (保育所)					
6								
7	1	(0)	1 (焼肉店)					
8	2	(1)	1 (保育所)		1 (幼稚園)			
9								
10	5	(5)		2 (保育所)	1 (保育所)	2 (保育所)		
11	2	(2)			2 (保育所)			
12	1	(0)	1 (保育所)					
事例 合計	23	(16)	7	4	4	5	2	1

\* 地研1と2のO103集団発生2事例はいずれも同一事例

\*\* 家庭内での集団発生例は含まれず



表 3. 平成 24 年に登録された O157 の ISPS code と登録地研(昇順、79 型)

	ISPS code	株数	地研数	検査地研	主な事例
	18525159491	1	1	福岡県	
	21761022275	1	1	鹿児島県	
	21762922819	1	1	鹿児島県	
	21763971394	1	1	宮崎県	
	21764233539	1	1	大分県	
	22063005993	1	1	北九州市	
	22063071529	1	1	北九州市	
	23357018211	5	3	熊本県 佐賀県 大分県	
	23357020259	6	2	長崎県 福岡県	
	26326588226	1	1	佐賀県	
I	30116073736	2	1	長崎県	保育所集団発生
	30116135265	1	1	鹿児島県	
	30116139272	2	1	長崎県	
	30406332552	1	1	北九州市	
	30418917706	1	1	宮崎県	
	30602416232	1	1	福岡県	
	30602416744	1	1	福岡市	
	30619189609	3	1	宮崎県	
	30652416353	1	1	熊本市	
	30652748041	1	1	鹿児島県	
	30652940641	1	1	熊本県	
	30653006177	2	2	大分県 熊本市	
	30653010185	3	2	沖縄県 福岡県	
	30671556808	3	1	宮崎県	
	30671822280	1	1	北九州市	
	30671622344	3	1	福岡市	
	31964453835	1	1	大分県	
	31964462031	3	2	鹿児島県 福岡市	
	31964519375	1	1	福岡県	
	39731581001	2	1	熊本市	
	43506457419	1	1	鹿児島県	
	49278548939	1	1	鹿児島県	
	51542097920	1	1	熊本市	
	52080394958	1	1	北九州市	
	56643746510	1	1	福岡県	
	56643812046	3	2	福岡県 北九州市	
	56660513091	1	1	沖縄県	
	57230219598	1	1	福岡県	
	57450942537	1	1	北九州市	
	57732749642	2	1	鹿児島県	
II	57733470538	9	3	大分県 福岡県 福岡市	農村体験集団事例など
	57733471562	1	1	福岡市	
	57733536066	2	2	大分県 福岡県	
	57733536072	1	1	大分県	
III	57733536074	22	6	宮崎県 佐賀県 長崎県 福岡県 福岡市 北九州市	仕出し弁当食中毒、韓国旅行など
	57867500491	5	4	宮崎県 佐賀県 長崎市 北九州市	
	57868483019	1	1	福岡県	
	57868483531	1	1	沖縄県	
	57868547019	1	1	宮崎県	
	57868549067	3	3	沖縄県 福岡県 福岡市	
	64778656074	1	1	沖縄県	
	65012749577	1	1	沖縄県	
	65021133161	1	1	佐賀県	
IV	65365865161	2	1	熊本県	保育所集団発生
	66037993547	1	1	鹿児島県	
	66053725133	1	1	大分県	
	66055756743	1	1	佐賀県	
V	66055822279	4	1	佐賀県	修道院集団発生
	66307414735	1	1	福岡市	
	66321118153	1	1	福岡県	
	66323217355	1	1	福岡市	
	66323217359	8	3	鹿児島県 大分県 福岡市	
	66324191695	1	1	福岡市	
	66324192203	4	1	福岡県	生レバー等の生食
	66324192207	7	2	宮崎県 福岡県	
VI	66324257231	17	3	大分県 福岡県 福岡市	焼肉店食中毒など
	66324257735	1	1	福岡県	
VII	66324257743	4	3	沖縄県 佐賀県 鹿児島県	保育所集団発生
	66324265931	3	1	長崎県	
	66324265935	1	1	福岡県	
	66456318921	14	5	熊本市 長崎県 長崎市 福岡市 北九州市	
	66457369547	5	3	鹿児島県 福岡市 北九州市	
	66457435018	1	1	鹿児島県	
	66457435083	8	4	鹿児島県 大分県 福岡県 福岡市	
	66458417611	1	1	鹿児島県	
	66458418123	1	1	宮崎県	
	66458483659	1	1	鹿児島県	
	66462603983	1	1	熊本市	
	66614444041	1	1	福岡市	

表 4. 平成 23 年に登録された O157 の ISPS code と登録地研 (昇順、66 型)

ISPS code	株数	地研数	検査地研
21762922819	1		長崎県
22063071593	3	2	鹿児島県 福岡県
22283278659	1		福岡県
23357018211	1		福岡市
23373764963	1		佐賀県
23373797731	10	7	福岡県 北九州市 福岡市 長崎市 長崎県 宮崎県 佐賀県
23374846305	2		熊本県
27384601163	3	2	北九州市 宮崎県
30116069736	1		福岡市
30602416232	1		福岡市
30619451745	2	2	福岡県 熊本県
30652940641	1		福岡県
30652944713	1		鹿児島県
30653006121	1		宮崎県
30653006185	5	3	福岡市 北九州市 宮崎県
30653010241	4	3	福岡市 熊本県 沖縄県
30653010249	2	2	福岡市 宮崎県
30671622280	11	5	福岡市 福岡県 鹿児島県 熊本市 宮崎県
30689710536	1		佐賀県
47851491528	1		福岡県
49278613963	2	2	福岡県 北九州市
56375311054	1		大分県
56375366350	1		熊本県
56643812046	14	7	福岡県 福岡市 北九州市 鹿児島県 長崎市 長崎県 佐賀県
II 57733470538	2	2	福岡市 福岡県
III 57733536074	12	5	福岡県 長崎市 長崎県 福岡市 熊本市
57734323151	1		北九州市
57867500491	1		鹿児島県
57868483531	1		福岡市
64964055176	1		佐賀県
64964513865	1		福岡市
65012683017	1		鹿児島県
65012749065	4		沖縄県
65031360712	1		長崎県
65046135105	1		佐賀県
65250524110	5		大分県
65384676296	1		福岡市
66038255691	1		福岡県
66053733321	1		福岡県
66054773699	2		長崎市
66055822287	1		佐賀県
66190048203	1		大分県
66307414991	1		福岡県
66307422923	15	2	鹿児島県 福岡市
66307480527	4		福岡県
66307488395	8	2	福岡県 福岡市
66315869135	5		福岡県
66321054665	1		北九州市
66323151823	4	3	大分県 北九州市 長崎県
66323217359	8	4	福岡県 北九州市 福岡市 大分県
66324192203	9	2	福岡市 宮崎県
66324192207	7	2	福岡市 福岡県
66324200387	1		宮崎県
66324257615	1		沖縄県
VII 66324257743	30	9	福岡市 福岡県 北九州市 鹿児島県 大分県 長崎県 熊本県 熊本市 宮崎県
66455337865	2		長崎県
66456318921	2		鹿児島県
66456318921	1		長崎県
66457369547	1		福岡県
66457435083	2	2	福岡県 長崎県
66458409931	2		長崎県
66458417611	1		熊本県
66458418123	3		佐賀県
66458483659	2		北九州市
66461629135	1		福岡県

表 5. 平成 24 年度に九州地区地研で収集された非 O157 菌株数\*

地研	O群血清型																					
	混合6	混合5	混合1	混合2	混合9	混合9	混合1	混合6	混合1	混合9	混合2	混合9	混合4	混合5	混合9	混合6						
	O8	O25	O26	O55	O91	O103	O105	O111	O115	O118	O119	O121	O126	O145	O148	O153	O165	O169	O172	O185	O186	OUT
1	64	1	0	14	0	3	20	0	3	1	0	0	2	0	13	1	0	1	0	0	0	5
2	41	0	0	3	0	7	8	1	1	1	0	0	0	0	15	0	1	0	1	0	0	3
3	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
4	61	0	1	36	0	0	10	0	4	0	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	6	0
5	16	0	0	3	0	0	2	0	2	0	0	2	0	5	0	0	0	0	0	1	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	7	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
8	22	0	0	15	0	0	2	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	42	0	0	12	0	0	11	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
11	80	0	0	9	1	1	2	0	59	0	1	0	1	2	1	0	0	1	0	0	2	
12	3	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
合計	343	1	1	95	1	11	58	1	94	2	1	1	7	2	35	1	1	2	1	1	1	20

\*平成24年12月末現在

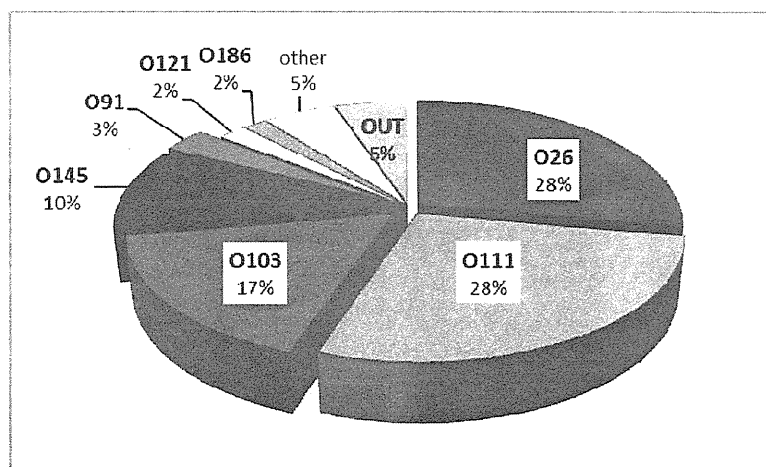


図 1. 平成 24 年度における九州地区地研で収集された非 O157 菌株の O 群血清型別割合

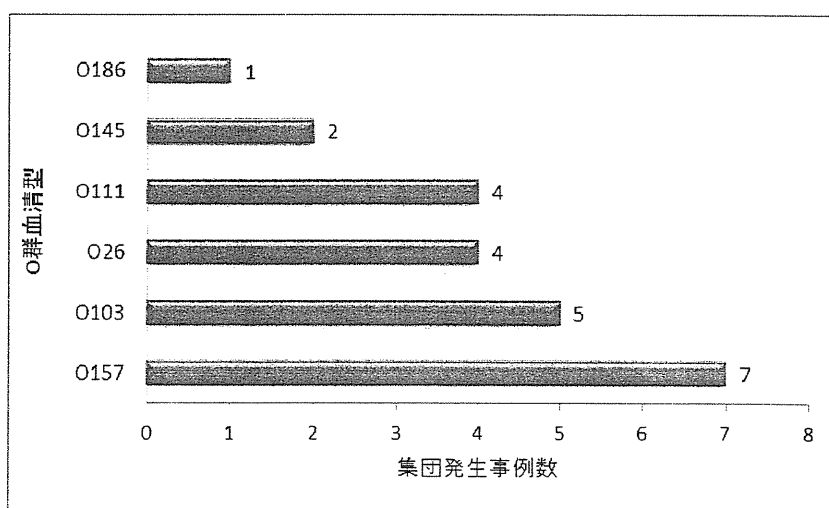


図 2. 平成 24 年度における九州地区での EHEC 集団発生事例の O 群血清型と事例数

九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究

— IS-printing System の精度管理 —

福岡県保健環境研究所	江藤良樹、前田詠里子、堀川和美
福岡市保健環境研究所	麻生嶋七美
北九州市環境科学研究所	寺西泰司
佐賀県衛生薬業センター	成瀬佳菜子
長崎県環境保健研究センター	右田雄二
長崎市保健環境試験所	江原裕子
大分県衛生環境研究センター	緒方喜久代
熊本県保健環境科学研究所	徳岡英亮
熊本市環境総合センター	杉谷和加奈
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司
鹿児島県環境保健センター	濱田まどか
沖縄県衛生環境研究所	久高潤

### 研究要旨

IS-printing system (ISPS) の精度管理を、九州ブロック 12 施設を対象に実施した。今回も昨年度と同様に「明瞭なエクストラバンド」をもつ判定が非常に困難な 7 株の DNA (昨年度と同一試料) を参加施設に配布した。その結果、精度管理に使用した 7 株の ISPS 型別は、12 施設のうち 10 施設が昨年度と比較して改善していた。昨年度は全 12 施設で 6 試料中の 13 バンドに合計 26 カ所の誤判定がみられたが、今回は 4 試料中の 8 バンドで 16 カ所であった。昨年度に比べ誤判定が減少した要因として、1) 泳動時間の延長(90 分以上)、2) 泳動サンプルの濃度調整、もしくは、アプライ量の調整が、正解率の高い施設で行われていたことにあると考えられた。

### A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に必要な標準的な手段である。その一方で、迅速性に優れず、画像による情報共有は①解析に手間がかかる、②解析を実施する担当者によって解析結果が異なるなどの難点がある。しかし、近年、腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子型別に

は IS629 によるゲノム構造多型を利用した、遺伝子型別手法である IS-printing system (ISPS) が広く用いられるようになった<sup>1)</sup>。この手法は、①迅速であること、②数値化が容易であることが最大の利点であり、九州ブロックでは、この利点を生かし、平成 22 年より共有データベースを用いたリアルタイムな情報共有を実施している。

ISPS 遺伝子型別結果の共有においては、各