

施設において正確に数値化されていることが、データの信頼性を確保する上で非常に重要となる。そこで九州ブロックでは、検査技術の向上・維持と正確な数値化を行うためのトレーニングを目的とし、精度管理を実施している。昨年度は、「明瞭なエクストラバンド」が現れる判定が非常に困難な7株の試料を用いて精度管理を実施した結果、多くの誤判定がみられていた。そこで、今回は昨年度と同一試料を用いて、各施設において手技、及び、判定が改善されたか確認を行うこととした。

B. 研究方法

1. 精度管理に使用した菌株

7株(精度管理試料A~G)のO157は、ISPSにおいてエクストラバンドが観察されるものを選択し用いた(表1)。この7株は、昨年度の精度管理に用いた株と同じ株である。精度管理試料はマニュアルに従いアルカリ抽出を行い、DNA抽出物を各施設へ送付した。

2. 精度管理実施環境

各施設で精度管理に使用されたPCR装置、電気泳動装置、画像取り込み装置等の機器類は、表2のとおりであった。また、DNA抽出物の使用量、PCR産物の泳動量、サイズマーカー、泳動時間については、表3に示した。

3. 結果の判定

各施設から、電気泳動により得られた36本の遺伝子増幅産物の出現パターンを2進数(1,0)で記載した報告を受け、評価を行った。

C. 結果

精度管理試料A~GをISPSにて解析した結果を図1に示した。この結果を正解とした場合の

各施設の結果を、表4に示した。ISPSの標的である4つの病原因子の遺伝子(*eae*、*hlyA*、*stx₁*、*stx₂*)は精度管理に参加した12施設全て問題なく増幅・判定が行われていた。また、IS629の判定は、昨年度の結果と比較すると12施設中10施設で改善されていた(表5)。今回と同一試料を用いて実施した昨年の精度管理では、全12施設において6試料中13バンドの合計26カ所の誤判定がみられたが、今回は4試料中8バンドの合計16カ所であった。このうち、試料Aの1st set primer mixで上から17番目のバンド(1-16)と、2nd primer set Mixの上から9番目(2-09)に誤判定が集中していた。

今回の誤判定の原因は以下のことによると考えられた。

1) 明瞭なエクストラバンドによる誤判定

精度管理試料A、B、C、F、及び、Gは明瞭なエクストラバンドが観察される。今回の精度管理では、試料A、Bについて、エクストラバンドに関連する誤判定があった(表4)。このうち、試料Aで1-16の出現位置から僅かに下にずれた明瞭なエクストラバンド(4bp短い)の判定が施設により異なっていた。各施設の電気泳動像を詳細に確認すると、僅かに低い位置にバンドが出現していることがわかる(図2)。また、試料Bでは1st set primer mixの上から3番目(1-03)の電気泳動でバンドが太い、または、スミアなため判定が困難となり、誤判定を招いたと推測された(図3)

2) PCRエラーによる誤判定

精度管理試料Aにおいて、2nd primer set Mixの上から9番目(2-09)のバンドが、何らかの理由により遺伝子増幅効率が悪く、バンドが薄くなったために誤判定があった施設が、4施設認められた(表4、図4)。誤判定の理由として、

1)バンドが薄い為にエクストラバンドとして判定したものの、2)他のバンドと濃さが異なる為に移動度が僅かに異なりエクストラバンドと判定されていたことが推測された。

3) 電気泳動に使用した DNA 量が過剰な為に起きた誤判定

施設 4 において、アガロースゲル電気泳動の高分子量バンドの分離が十分で無いために、複数の試料にて誤判定がみられた(表 4、図 5)。分離が不十分であった原因として、1) 泳動時間の不足、2)泳動サンプル中の過剰な DNA 量の 2 点が推測された。泳動時間が短い為に高分子バンドの間隔が十分で無く、その上、泳動した DNA 量が過剰である為にバンドが太くなり、複数のバンドが重複し、判定が非常に困難な状況であった。この施設での電気泳動の条件(泳動時間、サンプル添加量)は、ほぼ試薬添付の使用説明書通りであることから、今回の配布試料のうち特に判定が困難な試料 A の様なサンプルは、標準的手技では判定が困難であると考えられた。

D. 考察

今回の精度管理は、12 施設のうち 10 施設が昨年度と比較して改善していたことが確認された(表 5)。昨年度の精度管理において、判定が困難な試料を経験することで、より確実な判定が可能になったものと考えられた。

今回、正解率が高かった施設は、電気泳動の際に、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、ウェルへの添

加量の調整が行われていた。この 2 点の工夫により、判定が容易となる電気泳動像が得られ、その結果、誤判定が減少したと考えられた。

今回の精度管理で最も誤判定が多かった試料 A では、1-16 より僅かに低い位置に現れる明瞭なエクストラバンドと 2-09 の増幅効率の低下が原因であった。試料 A の 1-16 付近のエクストラバンドは、サイズが 1-16 と非常に近い(4bp の差)ため電気泳動時間をより長く設定し、よく分離することで改善されると推測される。また、試料 A の 2-09 のバンドは昨年の精度管理においても、施設間でバンドの濃さが異なることが観察されていた。さらに、以前の検討において、この 2-09 と 1-06 は何らかの要因(アニーリング温度、PCR チューブの不適合など)で増幅効率に影響を受けやすいことが分かっている。これらのことから、判定には特に注意が必要なバンドの一つである。

今回、試薬添付の使用説明書に近い条件では、試料 A のような判定困難なサンプルは正確に判定出来ないと考えられる結果が得られた。このことから、今後は、今回の精度管理で得られた知見を基に、判定がより確実に行える、アガロースゲル電気泳動の手技と判定に関する統一プロトコールを作成し、その検証を行いたい。

参考文献

- 1) Ooka, T. *et al.* 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 47:2888-2894.

表 1. 精度管理に使用した腸管出血性大腸菌

試料 番号	株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子
A	97E8-1	1997	保菌者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂
B	04E053	2004	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂
C	02E024	2002	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂
D	06E032	2006	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₂
E	10E134	2010	患者	O157:HNM	<i>stx</i> ₂
F	03E030	2003	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₂
G	04E116	2004	患者	O157:HNM	<i>stx</i> ₁

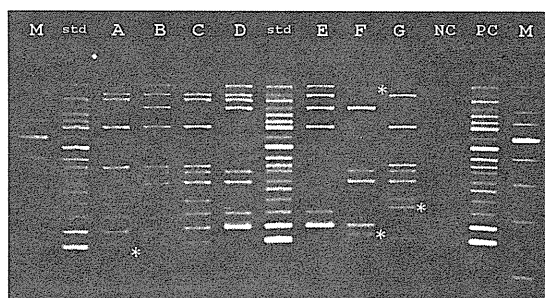
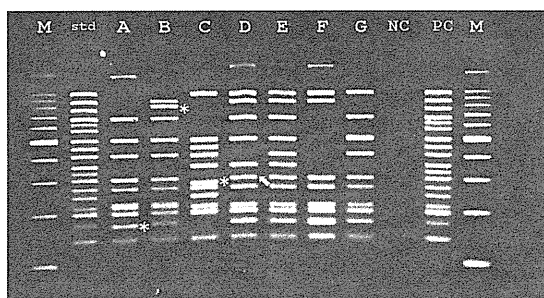
表 2. 九州各施設の IS-printing System に使用した周辺機器

Lab.	PCR機器		DNA 添加量 (μ l)	電気泳動装置			画像取り込み装置	
	メーカー	型式		メーカー	型式	泳動時間	メーカー	型式
1	AB	Veriti	0.5	ADVANCE	Mupid-exU	70-90分	BIO-RAD	Gel Doc XR
2	AB	GeneAmp9700	1	ELCHROM SCIENTIFIC	SEA 2000	100分	Alpha Innotech	Alphamager Mini
3	BIO-RAD	C1000Touch	1	ADVANCE	Mupid-exU	100分	BIO-RAD	Gel Doc XR+
4	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid	70分(100V)	BIO-RAD	Gel Doc XR
				ADVANCE	Mupid-2 plus	120分(50V)		
5	BIO-RAD	iCycler	1	ADVANCE	Mupid-exu	70-90分	ATTO	Printgraph typeCX
6	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid	80分	TOYOBO	FAS-III
7	ASTEC	PC320	1	ADVANCE	Mupid	68分	BIO-RAD	Gel Doc XR
8	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid-2 plus	70分	BioImage	Gel Print INFINITY
9	AB	Veriti	1	東洋紡	GelMate2000	100分	POLAROID	MP-4
10	AB	GeneAmp9700	0.5	ADVANCE	Mupid	80分	BIO-RAD	Chemi Doc XRS+
11	AB	Veriti	1	ADVANCE	Mupid-exU	80-85分	BIO-RAD	Gel Doc XR+
12	BIO-RAD	C-1000	1	ADVANCE	Mupid-ACE	70分	BIO RAD	GEL Doc XR+

表 3. 九州各施設の電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

Lab.	泳動バッファー(TBE)			泳動mixture 混合比(μ l) dye + amplicon	PCR産物 泳動量(μ l)	サイズマーカー			
	メーカー	品番	使用濃度			メーカー	品番	Lording Dye	
1	日本ジーン	318-90041	×0.5	1+5(1/2希釈)	5	アプロサイエンス	SP-2210	プレミックス	
2	invitrogen	15581-044	×0.5	1+5(1/5希釈)	5	bms	BC-BRG10001	TOYOBO	RE-DYE
3	ナカライテスク	35432-41	×0.5	1+5	1	使用せず		TOYOBO	RE-DYE
4	SIGMA	T4415-1L	×0.5	1+5	5	コスモバイオ	#SM0243	TOYOBO	RE-DYE
5	BIO-RAD	161-0733	×0.5	1+5	2	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO	RE-DYE
6	BIO-RAD	161-0733	×0.5	1+5	3	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
7	日本ジーン	318-90041	×0.5	1+3	3	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO	RE-DYE
8	TAKARA	T905	×0.5	1+5	1	TOYOBO	DNA-035	TOYOBO	RE-DYE
9	TaKaRa	T905	×0.5	1+5	2.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
10	ナカライテスク	35440-31	×0.5	1+3.5	3.5	使用せず		TaKaRa	6× Loading Buffer
11	日本ジーン	318-90041	×0.5	1+2	2	TaKaRa	3422A	TOYOBO	RE-DYE
12	BIO-RAD	16-10733	×0.5	1+5(4倍希釈)	5	TOYOBO	DNA-035	TOYOBO	RE-DYE

菌株 番号	1st set																2nd set																	
	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	1-16	1-17	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	stx2
A	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
B	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
C	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
D	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	
E	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
F	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	
G	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0



* : エクストラバンド

※ : エクストラバンドではあるが、通常のアガロースゲル電気泳動では見分けることは困難 (6bpほど小さい)

図 1. 精度管理に使用した菌株と IS-printing System の結果

表 4. 各施設の誤判定と正解率

Lab.	試薬 Lot	精度管理試料番号							施設毎の正解率
		A	B	C	D	E	F	G	
1	0651A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
2	0651A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
3	1404A	1-16	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
4	2101A	1-16, 2-03	1-03	2-02	2-02, 2-05	—	—	—	3/7 (43%)
5	0651A	—	—	—	1-12	—	—	—	6/7 (86%)
6	2101A	1-16	1-03	—	—	—	—	—	5/7 (71%)
7	05122J5	1-16	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
8	2101A	1-16	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
9	2101A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
10	05122J5	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
11	2101A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
12	2351A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
各試料の正解率		3/12 (25%)	10/12 (83%)	11/12 (92%)	10/12 (83%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	

* 明瞭なエキストラバンドを誤判定したものを示す

表 5. 同一試料(7株)を用いた精度管理(2011及び2012年)にて誤判定された数

2011年実施

Lab.	1st primer set					2nd primer set					
	1-03	1-12	1-15	1-16	hlyA	2-02	2-03	2-05	2-09	2-15	stx1
1				1/7							
2				1/7							
3	1/7			1/7	1/7						
4				1/7							
5	1/7			1/7					1/7		1/7
6				1/7							
7			2/7	1/7							2/7
8	1/7			1/7					1/7	1/7	1/7
9				1/7							
10				1/7							1/7
11	1/7			1/7							
12	1/7			1/7							2/7

2012年実施

Lab.	1st primer set					2nd primer set					
	1-03	1-12	1-15	1-16	hlyA	2-02	2-03	2-05	2-09	2-15	stx1
1											
2									1/7		
3				1/7							
4	1/7			1/7		2/7	1/7	1/7			
5		1/7									
6	1/7			1/7							
7				1/7							
8				1/7							
9									1/7		
10											
11									1/7		
12									1/7		

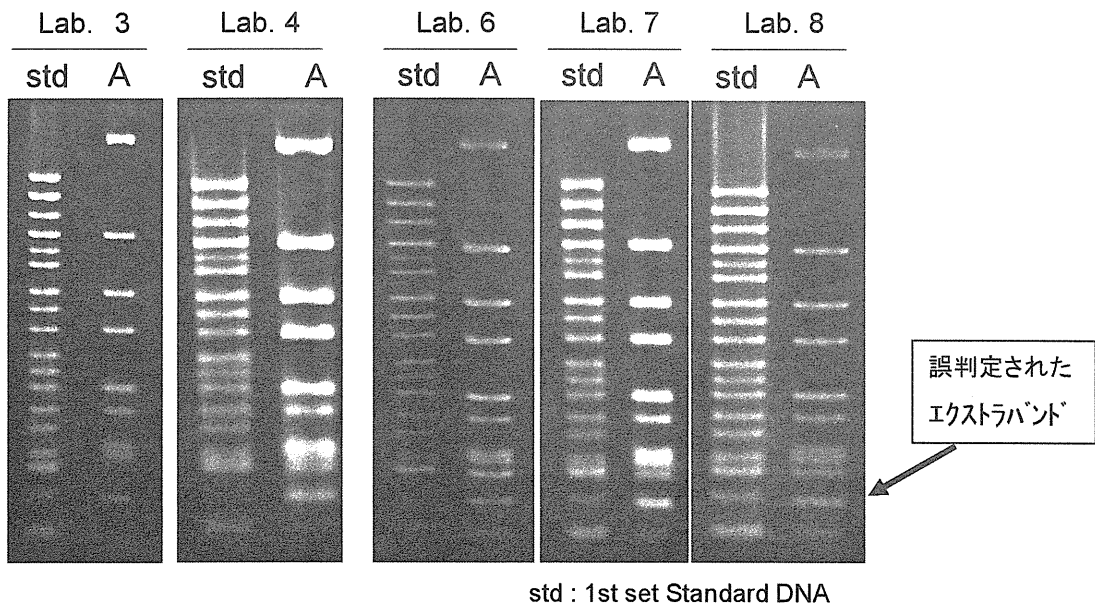


図2 精度管理試料Aの電気泳動像 (1st set primer Mix)

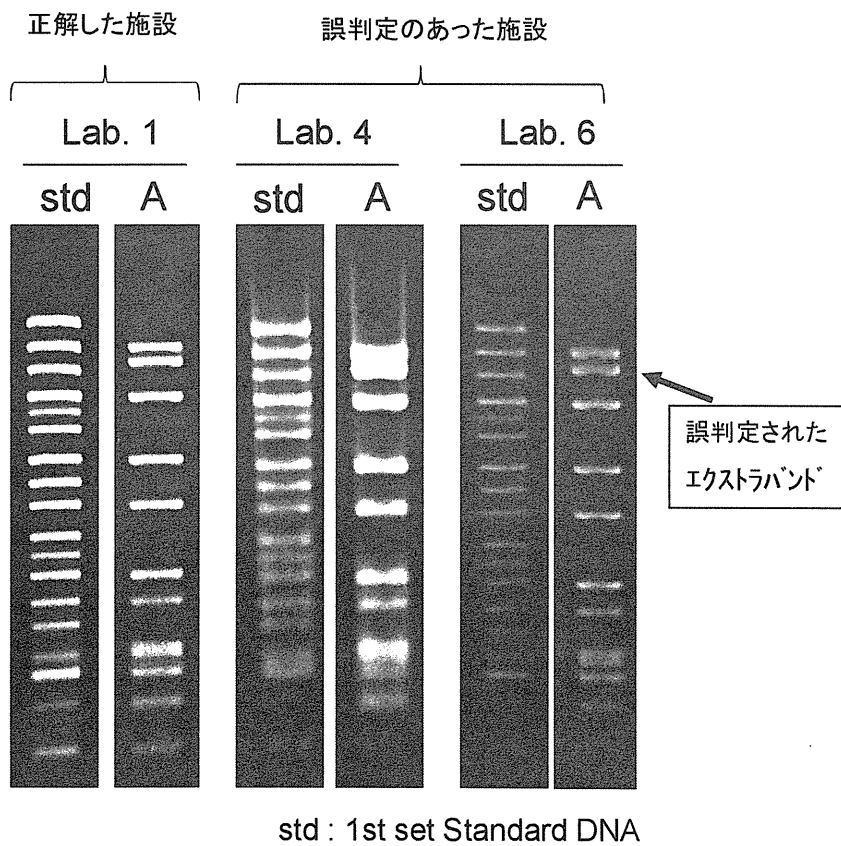


図3 精度管理試料Bのアガロースゲル電気泳動像 (1st primer set Mix)

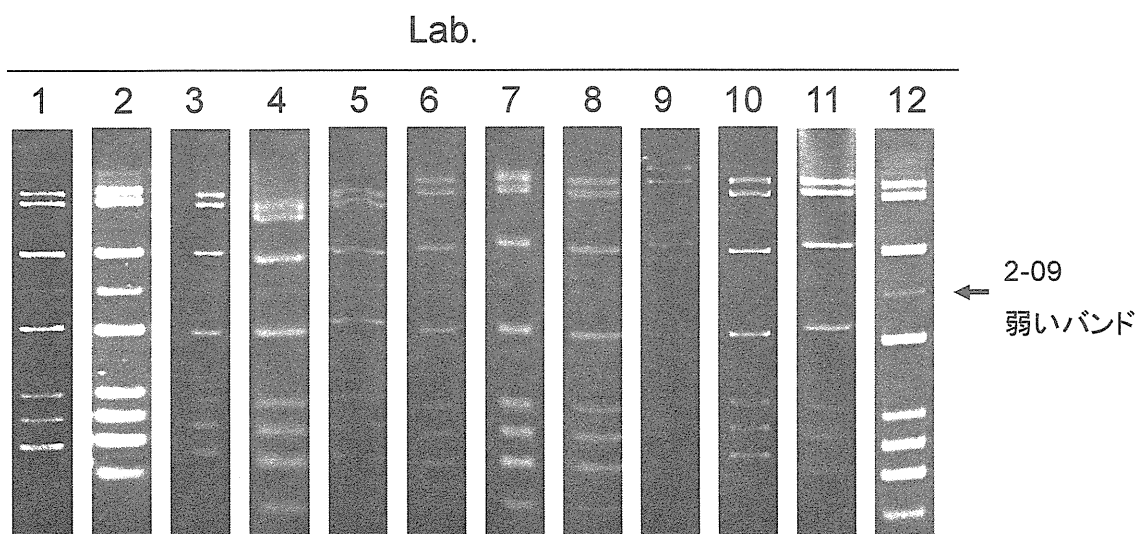
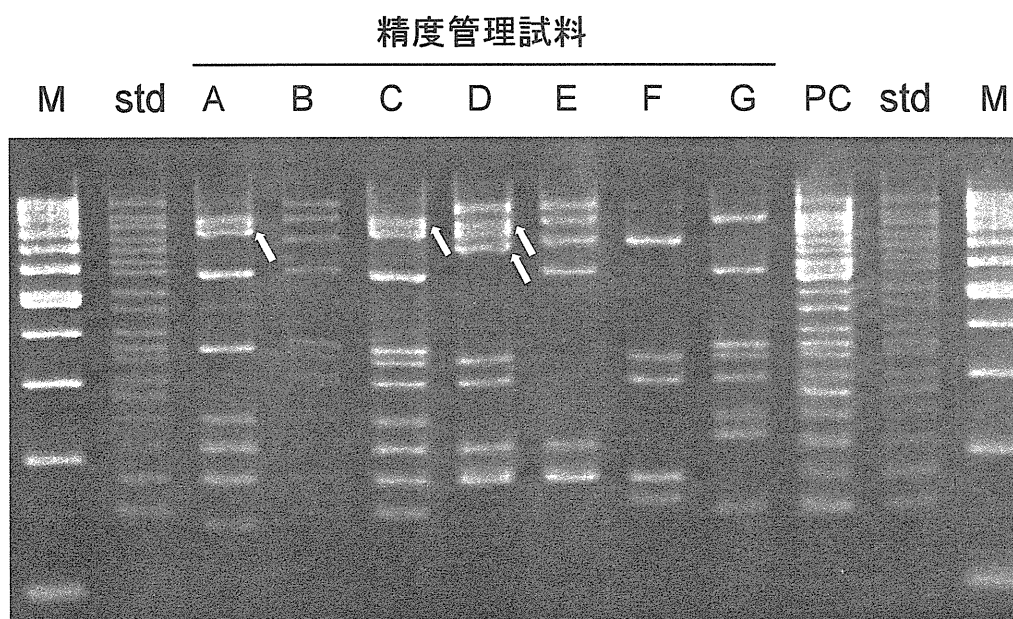


図4 試料 A のアガロースゲル電気泳動像 (2nd primer set Mix)



↖ : 誤判定のあったバンド

M : 100bp ladder marker

std : 2nd set Standard DNA

図5 施設4のアガロースゲル電気泳動像 (2nd primer set Mix)

EHEC O157 の同時多発時における疫学調査の一助としての役割
「IS-printing System の活用により集団事例の解明・感染拡大防止に寄与した事例」

研究協力者 大分県衛生環境研究センター微生物担当
緒方喜久代 佐々木麻里 成松浩志

研究要旨

平成 24 年 9 月 4 日、BT 市内の飲食店(焼肉 A 店)において EHEC O157 による食中毒事件が発生し、その前後、8 月下旬から 10 月にかけて N 市を中心とした県北地域において、EHEC O157 の散発事例が多発した。

疫学調査の結果、食中毒事件は焼肉 A 店における焼肉が原因食品と推定され、散発事例のうち、4 名は焼肉 B 店、1 名は焼肉 C 店を利用する「焼肉店グループ」と特定の飲食店等の施設における喫食が見られない「家庭内グループ」に分けられた。さらに、「家庭内グループ」の EHEC O157 事例では、共通の食肉販売店から食肉を購入していたことが判明した。

また、入手した患者便等由来の 14 株について、IS-printing System による遺伝子解析を試みたところ、「焼肉店グループ」と「家庭内グループ」のふたつの IS パターンに分かれた。

得られた疫学情報と IS 法による分子疫学解析の結果により、食肉処理業者まで一步踏み込んだ食肉流通ルートの遡り調査を行い、食肉処理施設を管轄する 2 自治体に食品安全・衛生課を通じて情報提供を行った。また、分子疫学解析結果を含めたこれらの情報を早期に関係事業者へ還元した結果、関係事業者は自らの判断で食肉の流通ルートの変更を行い、その後、EHEC O157 散発事例は終息した。

A. 研究目的

事件探知後、感染源の特定や感染者の拡がりの確認など疫学調査の一助とするため、入手した分離菌株について随時、IS-printing System (IS 法)による遺伝子解析を行い、行政サイドへの迅速な情報還元を試みた。

保健所、民間検査機関および医療機関において分離された患者便由来 13 株および従業員検便由来 1 株、計 14 株の EHEC O157(VT1+2)株を用いた。内訳は、焼肉 A 店由来の 7 株、B 店由来の 4 株、C 店由来の 1 株、家庭内由来 2 株であった。

B. 研究方法

1. 材料

2. 分離菌の同定

入手した菌株は、CT-SMAC 寒天培地、クロモアガー O157 培地で純培養であることを確

認し、定法に従い同定を行い、EHEC O157 の特異的生化学的性状を確認した。VT 遺伝子およびVT型の確認はPCR法で実施した。

3. IS 法

IS-printing System (東洋紡)を用い、添付マニュアルに準じて実施した。なお、サンプルの調製は、クロモアガーO157 培地に発育した1mm 程度のコロニーを、推奨法であるアルカリ溶解法で処理して行った。ゲル作製および泳動に使用する buffer は 0.5×TBE を使用した。buffer は泳動の都度、新しいものと交換した。

C. 研究結果

1. 疫学調査および感染源調査

平成24年9月4日、BT市内の飲食店(焼肉A店)において患者数17名のEHEC O157による食中毒事件が発生し、その前後、8月下旬から10月にかけてN市を中心とした県北地域において、EHEC O157の散发事例が10件発生した。そこで、食中毒事例は、焼肉A店における喫食状況を、散发事例については、共通した食品や関連する施設の有無などについて、患者らの聴き取り調査を実施し、併せて、関連施設・調理器具等の拭き取りや食肉検体、有症者、接触者および従業員の便について、EHEC O157の検査を実施した。

疫学調査の結果、食中毒事件は焼肉A店における焼肉が原因食品と推定され、散发事例のうち、4名は焼肉B店、1名は焼肉C店を利用する「焼肉店グループ」と特定の飲食店等での喫食が見られない「家庭内グループ」に分けられた。

保健所における細菌検査の結果、食中毒事件の原因施設である焼肉A店の従業員1

名からEHEC O157が検出されたが、その他の焼肉店の従業員および施設の拭き取り等からEHEC O157は検出されず、施設基準を含む衛生状態では特に問題は認められなかった。また、焼肉A,B,C店は、同一の食肉処理業者から食肉を仕入れていたことが判明したため、食肉処理業者へ立入調査を行った。食肉処理業者の作業室、調理器具等の拭き取り検査を含む衛生状態の確認を行ったが調理器具等からEHEC O157は検出されず、施設基準を含む衛生状態で特に問題は認められなかった。そこで、牛トレーサビリティに基づいて実施した遡り調査の結果、関与が疑われた食肉処理施設3社を管轄する2自治体に対し、食品安全・衛生課を通じて情報提供を行った。

次に、「家庭内グループ」のEHEC O157事例では、共通の食肉販売店から食肉を購入していたことが判明した。当該食肉販売店についても、調理器具等の拭き取り検査を含む衛生状態の確認及び従業員検便を行ったが、いずれもEHEC O157は検出されず、施設基準を含む衛生状態で特に問題は認められなかった。牛トレーサビリティに基づく遡り調査の結果、2自治体管轄下の食肉処理施設4社が関与していることが判明した。

2. IS 法

図1に示すとおり、焼肉A店由来、B店由来、C店由来の「焼肉店グループ」パターンと「家庭内グループ」パターンの大きく二つに分けられた。

3. 対応

「焼肉店グループ」については、食肉流通ルートの遡り調査の結果、他県の食肉処

理施設が感染源として強く疑われたので、管轄する 2 自治体に大分県食品安全・衛生課を通じて情報提供を行ったが、明確な原因究明には至らなかった。また、これら疫学調査と菌株間の分子疫学解析のそれぞれの結果について、関係する事業者に早期に情報還元した。

D. 考察およびまとめ

平成 18 年度以降、迅速かつ簡便に疫学解析を行うため、IS 法(insertion sequence の分布を利用した multiplex PCR による EHEC O157 サブタイピング法)の導入に向けた取組みを行ってきた。我々は、平成 21 年にキムチが一連の感染源として強く示唆された EHEC O157 事例に遭遇したが、遺伝子解析手法としての IS 法の認知度が低く、迅速な遺伝子解析手法としての役割を十分に果たせなかった経験をした。この事例の発生後、大分県食品安全・衛生課長から県保健所等関係機関の長あてに、感染症担当者と食中毒調査担当者との連携を密にし、再発を防止するため、初動時の喫食状況の遡り調査など迅速かつ的確な対応を求めた「腸管出血性大腸菌感染症等の初動調査について」(平成 21 年 8 月 31 日付け食衛第 1152 号)が発出され、diffuse outbreak の探知に向けた取り組みの強化が図られることとなった。

一般的に、EHEC O157の潜伏時間は3～8日といわれ、医療機関からの届出を考慮すると、保健所が情報を入手するのは、施設が提供・販売してからかなりの時間が経過している。特に牛肉の場合、同一ロットのものが施設に残っているケースは非常に少なく、原因食品の特定が困難な状況となっている。また、トレーサビリティから遡り調査も一部可能であるが、他県を含め

広域にまたがっているケースも多く、感染拡大防止のための汚染原因究明まで至らないのが現状である。

その中で、IS法は、最短でほぼ1日で解析結果が得られるため、今回のような散発事案の関連性について情報を早期に察知する上で、非常に有用な方法であるといえる。今回の事例のように、一見、散発事例と思われていた事例に関連性が認められたり、同一感染源が疑われた事例も異なる複数の事例の重なりであることが判明したりと、散発事例間での関連性を明らかにすることにより、よりの確な疫学調査を迅速に行うことが可能となる。とくに散発事例間で関連性が高いことが早く分かれば、その情報を早期に関係する事業者へ還元することにより、事業者が流通部分まで踏み込んだ対策を講じることができ、結果として感染拡大防止につながるものと考えられる。

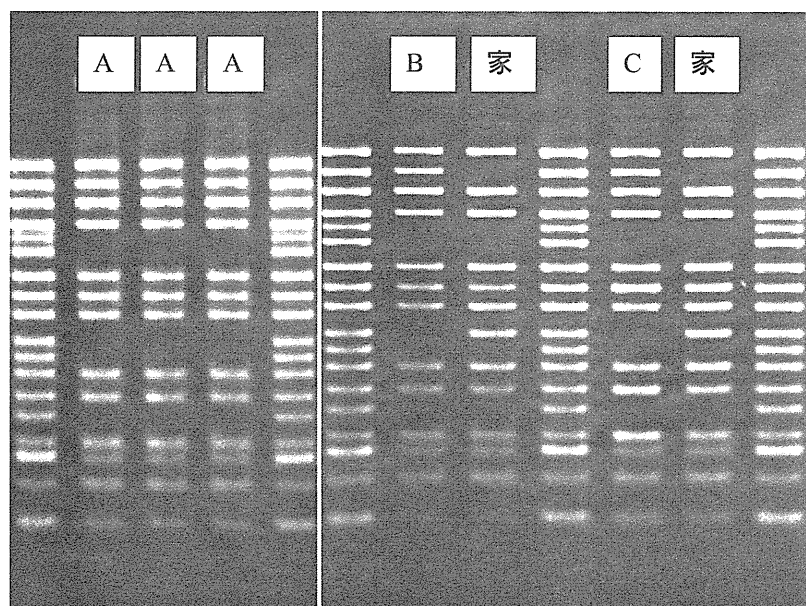
今回の事例において、関係事業者は自らの判断で食肉の流通ルートの変更を行い、その後、EHEC O157 散発事例は終息した。

今後、迅速かつ簡便に結果が得られる疫学解析手段として、IS 法は行政現場での即応に大いに役立つものと思われる。行政対応に十分貢献できるよう、さらなる精度を確保し、事例を重ねる必要がある。

謝辞

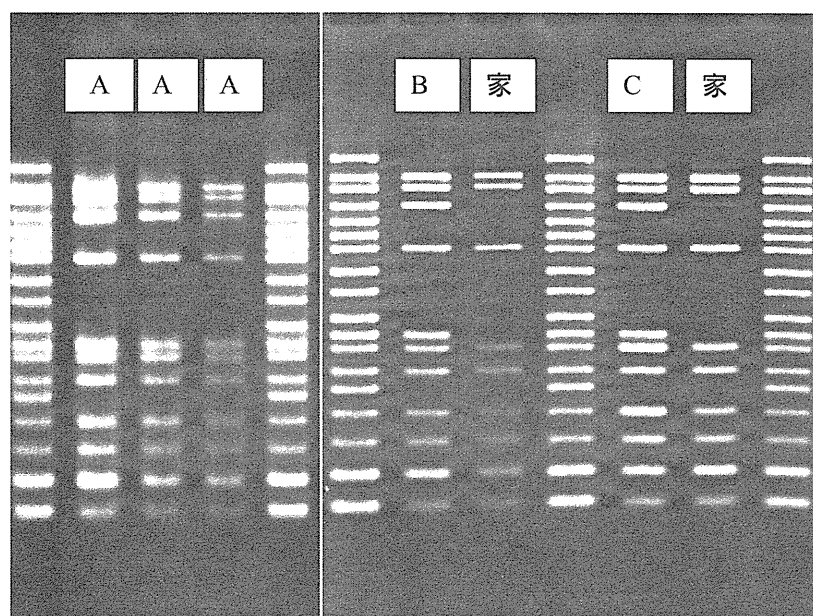
疫学調査および菌株提供にご協力いただいた北部保健所の関係者に深謝します。

【1st】



A: 焼肉 A店
B: 焼肉 B店
C: 焼肉 C店
家: 家庭内

【2nd】



A: 焼肉 A店
B: 焼肉 B店
C: 焼肉 C店
家: 家庭内

図 1 IS 法による解析パターン(抜粋)

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

IS-printing および PFGE 解析により、
宅配弁当が原因と推定された腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例

福岡市保健環境研究所
麻生嶋七美 本田己喜子 佐藤正雄

要旨 2012年7月に腸管出血性大腸菌 O157 患者 5名の感染症発生届が市内医療機関より管轄保健所に提出された。5名は同じ仕出し店の宅配弁当を喫食していたため、この仕出し店の従業員検便、施設のふきとりおよび保存食について検査を実施したところ従業員 1名から O157:H-(*stx1&2*) (以下 O157) が分離された。その後、この弁当を喫食した別の 4名からも O157 が検出され、これら患者由来 9株と、従業員由来 1株の計 10株の O157 は、IS-printing System (以下 IS) 法による解析で IS コードが一致した。また、これら 10株のパルスフィールド・ゲル電気泳動法のパターンもほぼ同一であった。したがって、本事例は、菌の分子疫学的解析および保健所の実施した疫学調査の結果から、宅配弁当を原因食品とする食中毒事例であることが判明した。また、本事例では、分子疫学的解析にパルスフィールド・ゲル電気泳動法に加えて、IS 法による解析を併用したが、IS 法では菌分離後の解析時間が大幅に短縮され、解析結果を迅速に保健所等の関係部署へ提供することが可能であった。

A. 事例の概要

2012年7月13～18日にかけて、腸管出血性大腸菌 O157 患者 5名の感染症発生届が、市内医療機関より管轄保健所に提出された。保健所の聞き取り調査で、この患者らは、仕出し店が提供した宅配弁当を共通して喫食していたことがわかった。この仕出し店は、福岡市内および周辺地域で 1日約 1800食の宅配弁当を提供する大規模調理施設であった。発生届が提出された 5名は7月10～12日に下痢等の症状を発症しており、7月4～6日の弁当を共通して喫食していた。感染の拡大防止と原因究明のために、この仕出し店の従業員 31名の糞便と7月4～6日の3日分の保存食 18検

体および施設のふきとり 10検体、弁当喫食者 116名の糞便が当研究所へ搬入され、検査を実施することとなった。そして、その後さらに 3名の患者の発生届が管轄保健所に提出された。

B. 検査方法

1. 糞便からの分離

亜テルル酸カリウム添加 (2.5 mg/L) ソルビトールマッコンキー培地 (Oxoid), CT-SMAC 培地 (Oxoid) およびクロモアガー O157 培地 (CHROMagar) を用いて直接分離 (37°C, 18～20 時間培養) を行うとともに、Tryptic Soy Broth 培地 (BD) にて、37°C で 6 時間培養した増菌液を免疫磁気ビーズ (Dynabeads

anti-E.coli O157, invitrogen)で濃縮し、菌の分離を行った。

2. 保存食、施設のふきとりからの分離

ノボビオシン加 mEC 培地(栄研化学)で、42℃、20～24 時間増菌培養を行い、増菌液で PCR 法(O-157 PCR Typing Set Plus, タカラバイオ)による *stx* 遺伝子の検出を行った。保存食については、BPW 培地で、35℃、24 時間前培養を行った。

3. 菌の同定

生化学的性状試験、血清型別(デンカ生研)および PCR 法による *stx* 遺伝子の検出と型別を行った。

4. 分子疫学的解析

IS-printing System(以下 IS, 東洋紡)法は添付プロトコールにしたがって実施し、解析は、福岡県保健環境研究所作成の解析ソフトを用いて行った。パルスフィールド・ゲル電気泳動(以下 PFGE)法は国立感染症研究所が作成したプロトコールにしたがって実施した。

C. 検査結果

従業員 31 名中 1 名、弁当喫食者 116 名中 1 名の糞便から、腸管出血性大腸菌 O157:H-(*stx1&2*) (以下 O157)が分離されたが、保存食および施設のふきとりから O157 は検出されなかった。医療機関から分与された患者 8 名由来の菌株、従業員から分離された 1 株および喫食者から分離された 1 株の計 10 株の O157 は、いずれも同一の生化学的性状を示した。

Fig. 1.に IS 法の電気泳動像を示す。本事例由来の 10 株とも、同じ IS コード(57733536074)であり、1st set において、共通して 2 本のエクストラバンドが検出された。

これら 2 本のエクストラバンドは上から 2 番目(1-02:839bp)と 3 番目(1-03:742bp)の間および上から 14 番目(1-14:241bp)と 15 番目(1-15:211bp)の間に観察された。

Fig. 2.に PFGE パターンを示す。lane3 の患者由来 1 株のみ 2 バンド異なっていたが、そのほかの 9 株は同一であった。

D. 結論

本事例で、喫食者 9 名と従業員 1 名から分離された計 10 株の O157 は、分子疫学的解析により、遺伝子型が一致した。この分子疫学的解析結果と、疫学調査の結果から、保健所は、本事例の原因食品は宅配弁当であると特定し、当該仕出し店に対して、営業禁止処分を行った。

本事例では、分子疫学的解析に IS 法と PFGE 法を併用して実施した。本事例は、当初、喫食者に対して発症者が数名と少数であり、また、喫食調査も不明な点が多かったため、散發事例だと考えられていた。しかし、7 月 13～18 日に発生届が提出された 5 名の患者のうち 3 名が、部署は異なるものの同じ職場に勤務していたことから、関連性の有無を IS 法で確認することとなった。その結果、IS 法で遺伝子型が一致し、その後、保健所の実施した疫学調査でも同じ宅配弁当を喫食していることが明らかとなり、本事例を早期に探知することができた。このように、IS 法の実施により菌分離後の解析時間が大幅に短縮され、解析結果を迅速に保健所等の関係部署へ提供することができ、早期に感染の拡大防止を実施できたと考えられる。以上のことから、IS 法は PFGE 法とともに、O157 の食中毒発生時における原因食品の特定に有用なツールとして利用できると考えられる。

平成9年3月に厚生労働省より、大規模食中毒を未然に防ぐために、大量調理施設衛生管理マニュアルが通知された。今回のように、大量に提供された食事が食中毒菌に汚染されていた場合、その被害は大規模となる。さらに原因となる菌が O157 のようなヒト-ヒト感染する細菌である場合、喫食者が本菌に感染するだけでなく、接触者にも感染する可能性があるため、被害はさらに拡大していくおそれがある。したがって、今後も大量調理施設においては、このマニュアルによる衛生管理を徹底していく必要があると思われる。

E. 研究発表

なし

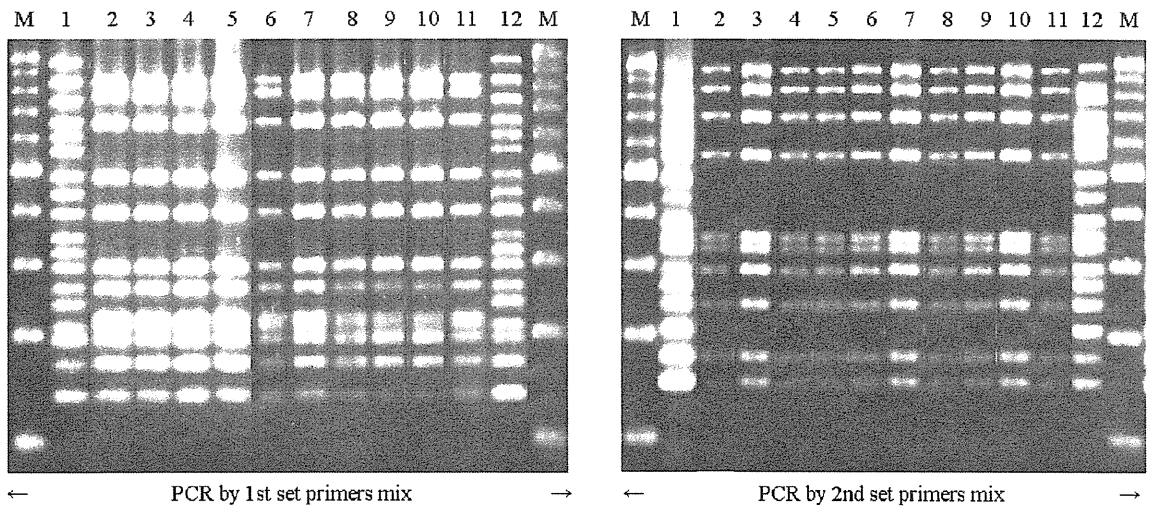


Fig. 1. Electrophoresis patterns derived from IS-printing system for the 10 strains of O157.

M: 100 bp DNA ladder, lane 1: standard DNA, lane 2-10: patients who ate the box lunch, lane 11: employee who cooked the box lunch, lane 12: positive control.

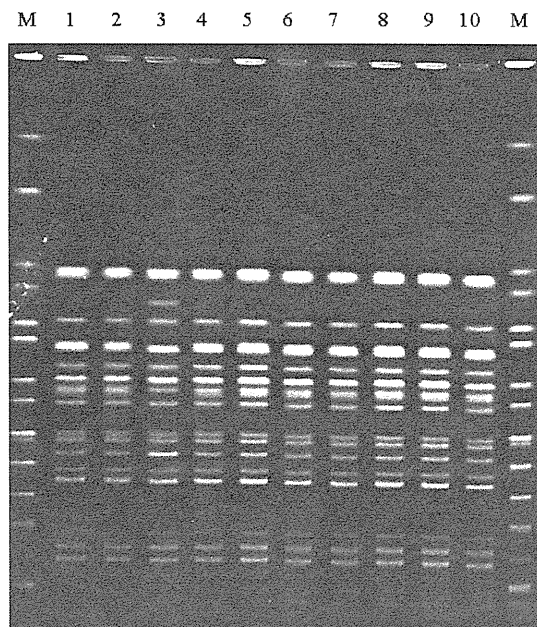


Fig. 2. PFGE patterns with *Xba*I for the 10 strains of O157.

M: *Salmonella* Braenderup H9812, lane 1-9: patients who ate the box lunch, lane 10: employee who cooked the box lunch.

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 分担研究九州ブロック報告書

2011 年沖縄で発生した食中毒由来 *Salmonella* Enteritidis のフェージ型と
パルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析

沖縄県衛生環境研究所 衛生化学班

久高潤、平良勝也、喜屋武向子、仁平稔、岡野祥、高良武俊、玉那覇康二

国立感染症研究所 細菌第一部

泉谷秀昌

要旨

2011 年に沖縄県では 13 事例 239 名のサルモネラ食中毒が確認された。そのうち疑いを含む 10 事例について当所で検査を実施した結果、*S. Weltevreden* による 1 事例を除き 9 事例は *S. Enteritidis* (SE) によるものであった。これら 9 事例から分離された患者、環境及び従業員由来の代表株 36 株について、株間の関連性を比較するためフェージ型別および PFGE 解析 (*Xba*I 及び *Bln*I) を行った。その結果、7 事例は PT14c 型であり、PFGE による解析結果も遺伝的に近縁種であった。これらの事例間に疫学的な関連性はないことから、沖縄県では PT14c で遺伝的にも近縁の SE 株が広く分布していることが示唆された。PT14c は世界的にも報告は少なく、今後の動向が注目される。また、疫学的な関連性がない 4 つの事例で PFGE タイプが同一であった。サルモネラの PFGE 解析は一般的に *Xba*I 及び *Bln*I が用いられているが、SE の場合、*Xba*I 及び *Bln*I の多様性指数 (Simpson's Index diversity) は比較的低いことから、集団発生や散发事例の関連性を調べるための分子疫学的解析は、これらの制限酵素に加え、*Sfi*I/*Pac*I/*Not*I 3 種類を組み合わせた解析が必要と考えられた。

A. はじめに

サルモネラは、ヒトや動物の腸管内に生息する腸内細菌の一種で、その一部は、ヒトや動物に感染して病気を起こす人畜共通の感染症である。ヒトに病原性のあ

るサルモネラ属菌は、腸チフスあるいはパラチフスと呼ばれ重篤な全身感染症を起こすチフス性サルモネラと、下痢や腹痛などの胃腸炎を起こす食中毒性のサルモネラに大別される。また、生物学的に

は 2500 種類以上の血清型に分類され、血清型は病原性と関連するほか、食中毒等の疫学的調査に利用されている。

2011 年に沖縄県で報告された食中毒は事件数 31 事例、患者数 457 名であった。そのうち最も多い原因物質はサルモネラによるもので 13 事例 (41.9%)、患者数 239 名 (52.3%) で全体の半数近くを占めていた。この年は、本県で初めてとなる食中毒での死者が 2 名確認され、*S. Weltevreden* 及び *S. Enteritidis* (SE) を原因とする食中毒で、それぞれ 88 歳女性と 8 歳男児が亡くなっている。

サルモネラ食中毒は全国的に減少する傾向にあるが、沖縄県では依然として多く、なかでも SE によるものがほとんどである。今回は 2011 年に県内で確認された SE 食中毒事例について、その生物学的特徴を把握するため各種解析を行った。

B. 研究方法

(1) 材料

2011 年 6 月から 12 月、当所で検査を実施した有症苦情 1 事例を含む 9 事例の SE 食中毒 (疑) から分離された 36 株 (患者便 24、患者血液 2 株、食品 6 株、環境 2 株および従業員検便 2 株) を用いた。各事例と株の関係は表 1 に示した。

(2) ファージ型別

国立感染症研究所の細菌第一部に依頼して実施した。

(3) FGE

制限酵素 *Xba*I および *Bln*I (Roche) を用いた。泳動条件は 6V/cm、スイッチングタイム 2.2 ~ 63.8 秒、泳動時間 19 時間で行った。得られたバンドの解析は、

Tenovar らのカテゴリに従い目視判定するととともに、Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いて解析を行った。解析は Dice 法 (最適化 1.5%、トレランス 0.0%) による類似計数を算出し、平均距離法 (UPGMA) によるデンドログラムを作成した。

(4) 薬剤感受性試験

CLSI のディスク感受性試験実施基準に従い、センシディスク (BD) 及び Mueller Hinton II agar (BD) を用いて実施した。使用した薬剤は、ABPC、SM、TC、CTX、KM、OPFX、OFLX、CP、ST、GM、NA 及び FOM の 12 薬剤である。

C. 研究結果

(1) ファージ型別

9 事例は、2 種類のファージ型 (PT) PT14c 及び PT13 に分類された。事件 No. 3 は PT13、それ以外の 8 事例はすべて PT14c であった。

(2) PFGE

9 事例の SE 食中毒から分離された 36 株は、制限酵素 *Xba*I 及び *Bln*I を用いたタイピングにて、いずれも 4 つのパターンに分かれ、それぞれの PFGE タイプを X1a、X1b、X1c、X2a 及び B1a、B1b、B1c、B2a とした (図 1)。X1a、X1b、X1c 及び B1a、B1b、B1c は、目視判定で近縁種 (サブタイプ) と判定され、Fingerprinting II による解析結果も X1a、X1b 及び X1c は同一のクラスターに属していた (図 2)。

各事例の PT と PFGE の結果を表 2 に示す。同一の事例から分離された株はす

べて同じ PT、PFGE タイプも一致していた。事件 No. 5 は、PT13、X2aB2a で他の事例とは唯一異なっていた。他の 8 事例はすべて PT14c で PFGE の解析結果からも遺伝的に近縁種によるものと判定された。特に、事件 No.2、3、4、7 及び 9 は、すべて X1aB1a で遺伝的にも同一株と見なされた。

解析した 36 株はすべて 12 薬剤に感受性株であった。

D. 考察

1. 2011 年の SE を原因とした食中毒の分子疫学的特徴

9 事例の SE 食中毒のうち 8 事例はすべて PT14c であった。さらに、事件 No. 2、3、4、7 及び 9 (PT14c) は、同一の PFGE タイプ (X1aB1a) であったが、各事例に疫学的な関連性はないことから、同一の感染源による食中毒であることは否定的である。事件 No. 1 (ガーリックチキン事例) では鶏肉が、事件 No. 8 (8 歳男児死亡事例) では、鶏卵が感染源として疑われたことから、今後は食品や家畜等について、調査する必要がある。

病原微生物検出情報の 1990~2008 年の集計結果⁹⁾⁻¹³⁾では、SE の主要なファージ型は、PT1、4、6a、21、47、RDNC 型等であったが、今回、沖縄で分離された PT13 や PT14c は報告されていない。PT13 は、カナダ¹⁵⁾、米国で下痢症患者²⁾やプロイラー³⁾から高頻度に検出され、台湾⁴⁾の下痢症患者からも頻度は低いものの検出されている。一方、PT14c は近年 PT14b から新しく派生した型で、国内の他の地域でも検出されているが頻度は

高くない。PT14c は米国²⁾、台湾⁴⁾、カナダ¹⁵⁾、オランダ⁵⁾、ブラジル^{6), 7)}の調査でも検出されていなかった。しかし、2009 年にイングランド・ウェルズ及び北アイルランドで実施された海外旅行者の調査では、エジプト旅行者から分離された SE の 34.6% (62/179) が PT14c であり、さらに、エジプト旅行者以外からは殆ど検出されていなかった¹⁴⁾。今回、試験した事例のほぼすべてが PT14c であったことから、PT14c は、ある地域に限局し、沖縄県内に広くまん延している可能性が示唆された。今後、過去の食中毒株や家畜、食品由来の SE についても調査する必要があるとともに、PT14c の今後の動向が注目される。

SE の PFGE 解析は、一般的に制限酵素 *Xba* I や *Bln* I が用いられている。*Xba* I 及び *Bln* I の多様性指数 (Simpson's diversity Index: SI) は、それぞれ 0.83 及び 0.76 で、株を識別する能力は、腸管出血性大腸菌 O157 等と比べ低い。2 種類を組み合わせた解析でも 0.92 であるが、*Sfi*I/*Pac*I/*Not*I の 3 種類の制限酵素を組み合わせることで SI が 0.98 に高まることが報告されている⁸⁾。そのため、集団発生や散発事例の関連性を調べるための分子疫学的解析は、これらの 3 種類の制限酵素を組み合わせ、詳細に解析する必要があると考えられた。

2. 各事例の概要と考察

(1) 事件 No. 1 (J 総菜店事例)

中部保健所は、6 月 22 日に患者からの情報を受け調査を開始した。調査の結果、患者は 4 名で、ガーリックチキン (G チキン) が共通食であった。

検査の結果、患者 4 名から SE が検出され、患者宅に残されていた G チキンの残品からも SE が検出された。その結果、J 総菜店の G チキンによる食中毒と判断され、6 月 30 日から 3 日間の営業停止処分となった。一方、6 月 29 日に別の医療機関からも、食中毒疑いの届出があり、中部保健所が調査したところ、同店で製造した G チキンを喫食していた。さらに、この事例に関する新聞報道を受けて、購入者から製造者に寄せられた有症苦情を調査したところ、6 月 13 日～25 日にかけて同店で製造された G チキンを食べて下痢、腹痛等を呈している者がいることが判明し、最終的には患者数 32 名の食中毒となった。

患者由来株 8 株 (17 日購入者 5 名、24 日購入者 3 名由来)、患者宅残品 (17 日購入) 由来株 1 株、原材料由来株 3 株 (22 日収去品) 及び原因施設のシンク由来株 1 株 (22 日採取) の 13 株について、PFGE による分子疫学的解析を実施したところ、13 株はすべて X1bB1c であった。この結果、食中毒発生の要因は、加熱不足による SE の生存も考えられるが、チキンを購入した日や検体を採取した日が異なるにもかかわらず、患者や原材料及び環境由来株の遺伝子型が一致したことから、調理済み製品が、調理器具等を介して二次汚染した可能性が示唆された。

(2) 事件 No. 3 及び事件 No. 5 (D 飲食店の弁当食中毒事例)

事件 No. 3 は那覇市内の会社で社員 18 名が、D 飲食店 (那覇店) で製造された弁当を摂食し、うち 16 名が食中毒症状を呈した。患者 9 名の検便を実施したと

ころ 4 名から SE が検出された。患者の症状、潜伏期間や共通食が当該弁当以外にないこと等から、同施設の弁当を原因とする食中毒と断定し 3 日間の営業停止処分となった。PFGE 解析の結果、患者由来株はすべて X1aB1a であった。

事件 No. 5 は 9 月 24、25 日の両日に実施された講習会において、弁当を摂食した 102 名のうち 66 名が発症した。調査の結果、弁当を提供した施設は事件 No. 3 と同じ系列の D 飲食店 (浦添店) が製造した弁当であった。有症者 27 名、無症状者 3 名、調理従事者 1 名および弁当の残品 (菜の花) から SE が検出された。この結果、D 飲食店を原因とする食中毒であると断定され、5 日間の営業停止処分となった。分離株の PFGE 解析の結果、患者、調理従事者および弁当由来株はすべて X2aB2a 型であり、2011 年に沖縄で発生した他の 7 事例の SE 食中毒由来株とはクラスターが大きく異なっていた。なお、弁当中の一品で SE が検出された「菜の花」は、油で調理されたもので、その原材料は中国製の冷凍食品であった。そのため、流通食品を介した広域的食中毒の可能性も示唆されたことから、国立感染症研究所へ分離株を送付し PT を依頼した。その結果 PT13 型によるものであったが、沖縄以外の他の地域で同型による SE の検出は無かった。

(3) 事件 No. 6 (保育園集団発生)

0 歳から 10 歳までの保育園児 66 名が胃腸炎を発症した。11 名の保育園児から分離された 11 株のうち、年齢、クラスが異なる 4 株を解析したが、いずれも PT14c、X1cB1a 型であった。そのため、

同一の食品を介した集団食中毒の可能性が示唆されたものの、原因食品は不明であり、発症の時期は、1峰性の流行曲線とはならず、人ヒト感染症による広がりも否定できなかった。

(4) 事件 No. 8 (8歳男児死亡事例)

11月24日に8歳男児が食中毒様症状で救急搬送され、姉(10歳)、弟(5歳)も症状を訴え医療機関を受診した。救急搬送された1名は、同日に別の総合病院へ搬送されたが27日に死亡した。他の2名は30日に退院した。3人に共通する食事は、家庭の食事と市販の調理パンであった。調理パンは205℃の加工工程があり、県内の販売店に200個ほど販売されているが、他に同様の苦情はなかった。家庭の食事では、発症前に姉弟3名で納豆に生卵を入れて食していたこともあり、感染源として生卵が疑われたが、特定には至らなかった。分離株の解析の結果はPT14c、X1aB1bで、県内で発生した他の食中毒と同じ系統のSEであり、また、薬剤感受性株であったことから、特に強毒株など特別な株による感染ではないことが示唆された。また、感染源が生卵であることが疑われたことから、PT14c型によるSE食中毒と鶏卵由来SE株の関連性について、今後、調査する必要がある。

E. 結論

2011年沖縄県では13事例のサルモネラ食中毒が発生し、その内9事例(1事例は疑い)から分離されたSEについて各種解析を行った。その結果、8事例はPT14c型でPFGE解析の結果も近縁種であった。この8事例に疫学的な関連性は

無いことから、PT14cは、本県に特徴的な株である可能性が高く、今後の動向が注目される。

F. 文献

1) F C Tenovar, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 33: 2233-2239. 1995.

2) F W Hickman-Brenner, et al. Phage typing of Salmonella in the United State. Clin Microbiol. 1991; 29: 2817-2823.

K Lthong, et al. Morecular Analysis of Salmonella enteritidis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Ribotyping. J Clin. Microbiol, 1070-1074, 1995.

3) S F Altekruze, et al. Salmonella Enteritidis in Broiler Chikens, United States, 2000-2005. Emer Infect Dis. 12: 1848-1852, 2006.

4) J C Pang et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. J Appl Microbiol: 99, 1472-1483. 2005.

5) E Duijkeren, et al. Serotype and Phage type Distribution of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. J Clin Microbiol, 40: 3980-3985, 2002.

6) L R Santos, et al. Phage Types of Salmonella Enteritidis Isolates from