

「事例 2」

保育所における腸管病原性大腸菌 055 : H7 による食中毒事例

長野県環境保全研究所

2013 年 7 月 29 日、長野県 A 市から管轄保健所に下痢等の胃腸炎症状を呈し多くの園児が欠席しているとの連絡があった。発症者は当該保育所の園児および職員 247 名中 81 名で、有症者の約 7 割が 7 月 28 日から 29 日にかけて発症しており、発症曲線は一峰性を示した。

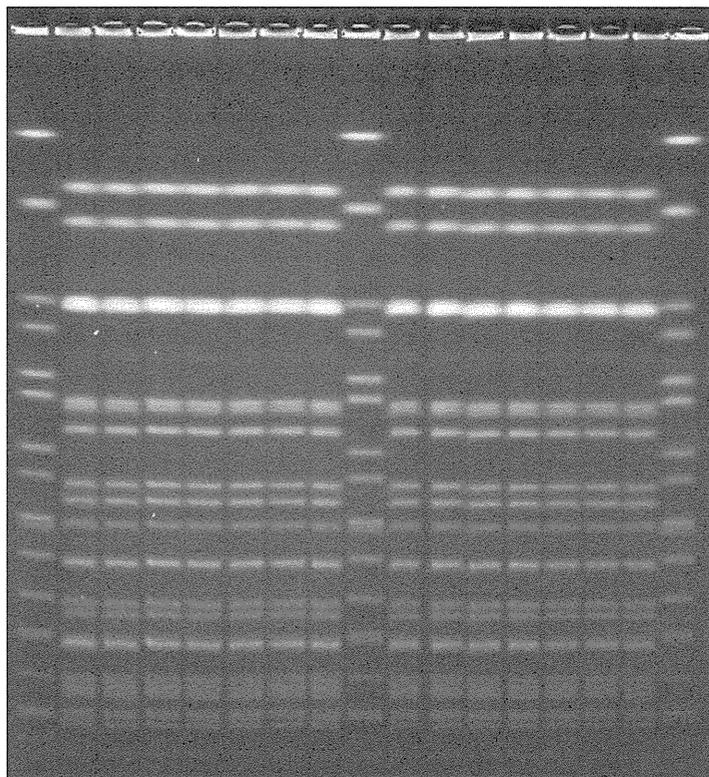
提供されていた給食は全て保育所内で調理されたもので、園児の他、保育所の職員や調理従事者も同一メニューを喫食していた。

食中毒起因菌の検査を実施したところ、患者 10 検体中 9 検体、調理従事者 8 検体中 5 検体から大腸菌 055 が優位に検出され、分離された大腸菌 055 について PCR 法により大腸菌病原性関連遺伝子 (VT1/2、LT、STp、STh、*invE*、*astA*、*afaD*、*aggR*、*eae* および *bfpA* 遺伝子) の検査を実施したところ、全てから *eae* 遺伝子が検出された。

また、分離された 14 菌株は全て H7 で、PFGE は同一パターンを示した (図)。

本事例は、患者および調理従事者から EPEC 055 : H7 が検出され PFGE パターンが一致したこと、患者の発症曲線は一峰性を示し単一暴露が推定されたこと、共通する食事はこの保育所で調理した給食のみであるなどの疫学情報から、当該施設の給食を原因とする EPEC 055 : H7 による食中毒と断定された。

M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 13 14 M



1～5：調理従事者由来株

6～14：患者由来株

M: *S. Braenderup* H9812

制限酵素 *Xba* I

図 EPEC 055:H7 PFGE 泳動像

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による IS printing System の実施とデータベースへの登録、及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）活用状況調査

主任研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所
研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所
山田和弘 愛知県衛生研究所
北川恵美子 石川県保健環境センター
白木 豊 岐阜県保健環境研究所
土屋美智代 岐阜市衛生試験所
木全恵子 富山県衛生研究所
中根邦彦 岡崎市総合検査センター
新名由季子 福井県衛生研究所
永井佑樹 三重県保健環境研究所
藪谷充孝 名古屋市衛生研究所
多和田光紀 豊田市衛生試験所
山本新也 豊橋市保健所衛生試験所

研究要旨

1) 各施設の IS printing System の型別結果と他の都県市分離株との関連

東海・北陸地方 11 施設において今年度に検出された 143 株の 0157 について IS printing System を実施した。このうち 141 株について IS printing System データベースへの登録を行った。本データベースを用いて解析を行ったところ、141 株は 49 の異なった IS 型に型別された。これら IS 型のうち 13 の IS 型は 2 施設以上から検出されていた。このうち 6 つの IS 型は東海と北陸地方両方の県から検出されていたが、残りの 7 つの IS 型は東海地方のみから検出されていた。今回の解析から最も多くの都県市から検出された IS 型は AA091 であった。AA091 型は東海・北陸地方を含め、全国では九州、近畿、関東・甲信越から検出されていた。従って、平成 25 年には AA091 型が食品等を介して全国的に流行していたことを示唆していた。

2) 行政への還元に関する調査等

平成 25 年度東海・北陸 11 施設の行政への還元に関する調査では 5 施設で PFGE の結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。行政に還元された集団事例由来病原菌は 4 施設で 0157、0121、026 の腸管出血性大腸菌であり、残り 1 施設では A 群溶血性レンサ球菌であった。

A. 研究目的

我が国で腸管出血性大腸菌 0157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働に向けた研究班活動が平成 12 年度から平成 20 年度まで行われた。

愛知県衛生研究所 (愛知衛研) ではこれまでの研究班活動として、0157、サルモネラ、赤痢菌の PFGE 実施統一プロトコール作成、及び愛知県下で過去 10 年間に検出されたサルモネラ、赤痢菌それぞれ約 150 株について PFGE を行い、そのバンドパターンのデータベース作成を行った。また東海・北陸ブロック内の活動として 1) PFGE 精度管理、2) 東海・北陸ブロック地方衛生研究所 (地研) 及び衛生試験所 PFGE 担当者を愛知衛研に集め、PFGE 実施手順に関する研修会の実施、3) 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行った。

これらの研究班活動の成果として毎年 PFGE 担当者が 1 名～2 名程度変わることのある東海・北陸ブロック内地研においても精度管理の実施によって同一 PFGE 型 0157 の PFGE バンドパターンの各地研相同性を約 90% 若しくはそれ以上まで高めることができた。このことから東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の 0157 等集団発生の際にも疫学的資料として用いるに足る良質な画質を提供することが可能であると思われる。また PCR を用いた型別法である IS-printing System についても PFGE と同様にこれまで精度管理の実施、各施設で検出された 0157 の型別を行い、東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の 0157 等集団発生の際にも疫学的データとして PFGE 解析結果と共に提供することが可能であると思われる。

平成 25 年度の活動内容は 1) 東海・北陸地方 11 施設 (地方衛生研究所、及び衛生試験所) において今年度検出された 0157 について IS printing System を実施し、その結果と泳動図を愛知県衛生研究所 (愛知衛研) に送付した。愛知衛研ではそれらの結果を IS データベースに登録し解析を行った。2) 東海・北陸地方各

施設が 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した事例 (行政への還元) の調査を行い、PFGE 画像がどの程度活用されているかを調査した。

また、東海・北陸地方各施設に対して行った IS アンケート結果のまとめも記載した。

B. 研究方法

1. IS printing System の実施

添付のプロトコールに従い、東海・北陸地方 11 施設で今年度に検出された 0157 について IS printing System を行い、その泳動図、菌株情報 (集団・散発、分離年月) 及びエクセルファイルに記入した IS printing System 結果を愛知衛研に送付した。愛知衛研において結果のエクセルファイルを CSV ファイルに変換し、IS データベースに入力した。このデータベースを用いて東海・北陸地方各施設で検出された 0157 と同じ IS 型が検出された都県市を検索した。

2. 行政への還元に関する調査

平成 25 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各施設で各種病原菌による集団事例の際に PFGE を行い保健所、及び県庁 (市役所) に報告した事例について事例の概要、PFGE 泳動図を愛知衛研に送付した。

C. 研究結果

1. 各施設の IS printing System の型別結果と他の都県市分離株との関連

表 1 には東海・北陸各施設で検出された IS 型とその数、表 2 には各 IS 型が検出された施設とその数を示した。

1) 愛知県

25 株について型別を行った。その内訳は散発患者株 13 株、集団事例 3 事例由来 12 株であった。これら 25 株は 10 の IS 型に分類された。集団事例 3 事例のうち 2 事例 (集団事例 1、2) では同一事例内の 0157 の IS 型は同一であったが、残り 1 事例では 6 株のうち 4 株は同一の IS 型 AA040 であったが、残り 2 株は AA023 と AA402 型であった。また、最も多く検出された AA040 型 (9 株) は、東海・北陸地方では三重県と豊田市からもそれぞれ 2 株検出されていた。AA040

型は全国では岡山県、静岡県で検出されていた。静岡県から検出された菌株は集団事例由来株であった。

2) 岡崎市

10 株について型別を行った。その内訳は散发患者株 8 株、集団事例 1 事例由来 2 株であった。これら 10 株は 5 つの IS 型に分類された。集団事例内の 0157 の IS 型は同一 (AA017 型) であった。また、最も多く検出された AA078 型 (3 株) は、東海・北陸地方では岐阜県、三重県と豊橋市からもそれぞれ 2 若しくは 3 株検出されていた。AA078 型は全国では 2010 年から九州、近畿地方で検出されている型であった。特に九州地方では馬刺しを原因とする集団事例から検出されていた。

3) 豊田市

3 株について型別を行った。その内訳は散发患者株 1 株、集団事例 1 事例由来 2 株であった。これらは 2 つの IS 型に分類された。集団事例内の 0157 の IS 型は同一の AA040 型であった。AA040 型は、東海・北陸地方では三重県 (2 株) と愛知県 (9 株) から検出されていた。AA040 型は全国では岡山県、静岡県で検出されていた。静岡県から検出された菌株は集団事例由来株であった。

4) 豊橋市

13 株について型別を行った。その内訳は散发患者株 7 株、集団事例 2 事例由来 6 株であった。13 株のうち 2 株は *eae* 遺伝子陰性のため解析不可であった。残り 11 株は 8 つの IS 型に分類された。集団事例 2 事例では何れも同一事例内の 0157 の IS 型は同一であった。また、最も多く検出された AA078 型 (3 株) は、東海・北陸地方では岐阜県、三重県と岡崎市からもそれぞれ 2 若しくは 3 株検出されていた。AA078 型は全国では 2010 年から九州、近畿地方で検出されている型であった。特に九州地方では馬刺しを原因とする集団事例から検出されていた。

5) 名古屋市

10 株について型別を行った。その内訳は散发患者株 7 株、集団事例由来 3 株であった。これら 10 株は 5 つの IS 型に分類された。集団事例では同一事例内の 0157 の IS 型は全て同一であ

った。また、最も多く検出された AA404 型 (4 株) は、東海・北陸地方、全国ともこれまで検出されていない IS 型であった。

6) 岐阜県

15 株について型別を行った。その内訳は散发患者 8 株、家庭内集団事例 2 事例由来 4 株、食中毒疑い事例 1 事例由来 3 株であった。これら 15 株は 9 つの IS 型に分類された。3 つの集団事例内の IS 型はそれぞれ同一であった。これら IS 型のうち AA382 型が最も多く検出され 4 株に認められた。これら 10 株は岐阜県のみからで、東海・北陸地方、全国とも検出されていない IS 型であった。さらに、9 株 (由来不明) についても同様に解析を行った。その結果、これらの株は AA063 (3 株)、AA028 及び AA044 (それぞれ 2 株)、AA045 及び AA403 (それぞれ 1 株) に型別された。これらの中で、最も多く検出された AA063 型はデータベースに 119 株登録されている型で、全国からその検出が報告されていた。

7) 岐阜市

5 株について型別を行った。その内訳は散发患者株 1 株、集団事例 2 事例由来 4 株であった。これら 5 株は 3 つの IS 型に分類された。集団事例 2 事例では何れも同一事例内の 0157 の IS 型は同一であった。集団事例 1 事例から検出された AA352 型は岐阜市のみから検出されている IS 型であった。また、もうひとつの集団事例由来 AA382 型は平成 25 年に岐阜県から検出されていた。

8) 三重県

13 株について型別を行った。その内訳は散发患者由来 4 株、3 つの集団事例 (1 事例は家庭内) 由来 9 株であった。これら 13 株は 6 の IS 型に分類された。それぞれの集団事例で同一事例内では IS 型は全て一致した。また、最も多く検出された AA031 型 (1 集団事例由来 4 株) は、東海・北陸地方では岐阜県からも 1 株検出されていた。AA031 型は全国では九州、中国・四国、近畿地方からも検出されていた。

9) 石川県

16 株について型別を行った。その内訳は散发患者株が 10 株、3 集団事例由来株は 6 株であった。これら 16 株は 9 つの IS 型に分類された。

集団事例では同一事例内の 0157 の IS 型は全て同一であった。これら IS 型のうち AA091 型が最も多く検出され、散発事例 3 株及び 1 集団事例 2 株と、計 5 株であった。AA091 型は東海・北陸地方では愛知県、岡崎市、岐阜県、富山県及び福井県から検出されていた。また、全国では九州、近畿、関東・甲信越から検出されていた。

10) 富山県

10 株について型別を行った。その内訳は散発患者株が 10 株であった。これら 10 株は 5 つの IS 型に分類された。最も多く検出された AA091 型 (6 株) は、東海・北陸地方では愛知県、岡崎市、岐阜県、石川県及び福井県から検出されていた。また、全国では九州、近畿、関東・甲信越地方からも検出されていた。

11) 福井県

14 株について型別を行った。その内訳は散発患者株 8 株、集団事例 1 事例由来 6 株であった。これら 12 株は 7 つの IS 型に分類された。集団事例では同一事例内の 0157 の IS 型は全て同一であった集団事例由来 AA017 型 (6 株) は、東海・北陸地方では愛知県、岡崎市から検出されていた。また、全国では九州、近畿地方からも検出されていた。特に九州地方から検出された菌株は韓国 (ソウル) 旅行者でユッケ、せんまいを喫食していた。

2. PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査

今年度は 5 施設から報告があった。

1) 岐阜市 (図 1)

平成 25 年に岐阜市の飲食店を原因施設とする食中毒の原因菌であった A 群溶血性レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の PFGE を実施した。

平成 25 年 8 月 13 日に依頼のあった腸管出血性大腸菌 0157 2 検体の相同性についてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により検査した。なお、上記の 2 検体と同様に VT1・VT2 陽性となった検体について同時に PFGE を実施した。

2) 三重県 (図 2)

2013 年 7 月に三重県の北勢地域で検出された腸管出血性大腸菌 0121 4 株および 2010 年 6 月に分離された 0121 2 株の計 6 株について PFGE 解析を実施した。その結果、Lane 1~4 の集団事例由来 4 株では 2 株 (Lane 1, 2) で同一パタ

ーンを示し、Lane 5~6 の家族内感染事例では、2 株が同一パターンであった。

3) 石川県 (図 3)

平成 25 年 9 月に有症者 A から腸管出血性大腸菌 0157 (VT2) が検出された (菌株 No. 1)。また、10 月に定期検便で無症状病原体保有者 B から腸管出血性大腸菌 0157 (VT2) が検出された (菌株 No. 2)。疫学調査の結果、有症者 A と無症状病原体保有者 B は、焼肉店①で同じ日に喫食していることが判明し、同一感染源による感染が疑われた。しかし、無症状病原体保有者 B は、上記焼肉店①とは別の焼肉店②に勤務していることから、別の感染源の可能性もあったため、関連性の有無を調べるために、PFGE を実施した。PFGE による解析結果より菌株 No. 1、2 の DNA 切断パターンは全て同一であったことから、同一感染源による感染と判断されたが、感染源の特定には至らなかった。

4) 富山県 (図 4)

平成 25 年 7 月から 8 月にかけて、0157 (VT1VT2、以下 0157) 感染事例が 7 件発生した。これらの事例について IS-Printing による遺伝子型別を行ったところ、6 件について IS-Printing の型別が一致した。これらの事例について PFGE を行った結果、IS-Printing の型別が一致した 6 件の 0157 の PFGE パターンが一致した。IS-Printing の型別が異なっていた 1 件の 0157 は PFGE パターンが一致しなかった。IS-Printing および PFGE パターンが一致した 6 件の感染事例はすべて散発であり、関連性は不明であった。

5) 岐阜県 (図 5)

幼稚園における腸管出血性大腸菌 026 集団感染事例

事例の概要

- ・原因施設： 高山市内の幼稚園
- ・感染者数： 6 名 (園児及びその家族)
- ・発生日： 平成 25 年 7 月 20 日
- ・原因菌： 腸管出血性大腸菌 026:H11 VT1

PFGE 解析結果

感染者 6 名から検出された腸管出血性大腸菌 026 (6 株)、及び直近に県内で発生があった 026 散発事例の 6 株について、制限酵素 Xba I による PFGE を実施した。その結果、集団感染事例 (6 株) の泳動パターンは、すべて一致した。また、散

発事例の内1株がこれと同一パターンを示したが、関連性については不明であった。

3. 東海・北陸地方各施設に対するISアンケート結果

東海・北陸地方9施設から回答があった。全株試験している施設が2施設、一部のみ、但し各事例代表株のみ（集団感染事例等では複数株実施）が1施設、必要時だけが5施設、但し、そのうち1施設は集団事例、近接事例等のみ、予定なしが1施設であった。また、ISPSのデータベースもNESFDに掲載し、各地研が閲覧、解析できるようにして欲しいとの要望があった。

D. 考察

1) 各施設のIS printing Systemの型別結果と他の都県市分離株との関連

東海・北陸地方11施設において今年度に検出された143株の0157についてIS printing Systemを実施した。このうち141株についてIS printing Systemデータベースへの登録を行った。1施設では2株が*eae*遺伝子が陰性となり登録が出来なかった。これはIS printing Systemで見られる問題点の1つであり、DNAを再抽出することで解決できることが多い。該当施設には情報提供を行い、改善していきたい。

本データベースを用いて解析を行ったところ、141株は49の異なったIS型に型別された。これらIS型のうち13のIS型は2施設以上から検出されていた。このうち6つのIS型は東海と北陸地方両方の県から検出されていたが、残りの7つのIS型は東海地方のみから検出されていた。今回の解析から最も多くの都県市から検出されたIS型はAA091であった。AA091型は東海・北陸地方では愛知県、岡崎市、岐阜県、富山県及び福井県から検出されていた。また、全国では九州、近畿、関東・甲信越から検出されていた。従って、平成25年にはAA091型が食品等を介して全国的に流行していたことを示唆していた。

2) 行政への還元に関する調査

平成25年度東海・北陸11施設の行政への還元に関する調査では5施設でPFGEの結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。これら5施設の泳動図は疫学調査等に活用されるに充分

な画質を有していたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われる。行政に還元された集団事例由来病原菌は4施設で0157、0121、026の腸管出血性大腸菌であり、残り1施設ではA群溶血性レンサ球菌であった。これまで当地方で実施してきたPFGE精度管理によって腸管出血性大腸菌以外の病原菌に対しても迅速な対応が可能であったと思われる。

3) 東海・北陸地方各施設に対するISアンケート結果

回答のあった9施設中8施設が集団事例等でIS printing Systemを実施していた。また、ISPSのデータベースもNESFDに掲載し、各地研が閲覧、解析できるようにして欲しいとの要望があり、今後の検討課題であると思われた。

E. 結論

1) 各施設のIS printing Systemの型別結果と他の都県市分離株との関連

東海・北陸地方11施設において今年度に検出された143株の0157についてIS printing Systemを実施した。このうち141株についてIS printing Systemデータベースへの登録を行った。本データベースを用いて解析を行ったところ、141株は49の異なったIS型に型別された。これらIS型のうち13のIS型は2施設以上から検出されていた。このうち6つのIS型は東海と北陸地方両方の県から検出されていたが、残りの7つのIS型は東海地方のみから検出されていた。今回の解析から最も多くの都県市から検出されたIS型はAA091であった。AA091型は東海・北陸地方を含め、全国では九州、近畿、関東・甲信越から検出されていた。従って、平成25年にはAA091型が食品等を介して全国的に流行していたことを示唆していた。

2) 行政への還元に関する調査等

平成25年度東海・北陸11施設の行政への還元に関する調査では5施設でPFGEの結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。行政に還元された集団事例由来病原菌は4施設で0157、0121、026の腸管出血性大腸菌であり、残り1施設ではA群溶血性レンサ球菌であった。

3) 東海・北陸地方各施設に対するISアンケート結果

回答のあった 9 施設中 8 施設が集団事例等で IS printing System を実施していた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

1. 鈴木匡弘、松本昌門ら 臨床分離薬剤耐性緑膿菌の POT 法による分子疫学解析 第 87 回日本感染症学会学術講演会 平成 25 年 6 月 5 日～6 日、横浜市
2. 鈴木匡弘 遺伝子タイピングと感染管理 第 29 回日本環境感染学会総会・学術集会 平成 26 年 2 月 15 日 東京都

表1 東海・北陸各施設で検出された IS 型

行ラベル	データの個数 / 菌株番号		
愛知県	25	AA040	2
AA017	4	AA078	2
AA018	1	AA348	1
AA023	4	石川県	16
AA040	9	AA016	2
AA063	1	AA042	1
AA091	2	AA044	1
AA285	1	AA091	5
AA400	1	AA178	2
AA401	1	AA195	1
AA402	1	AA349	2
岡崎市	10	AA413	1
AA017	2	AA414	1
AA028	2	富山県	10
AA078	3	AA044	1
AA091	2	AA048	1
AA108	1	AA091	6
岐阜県	15	AA351	1
AA009	1	AA394	1
AA031	1	福井県	14
AA060	1	AA017	6
AA078	2	AA018	2
AA091	1	AA039	1
AA128	2	AA044	1
AA331	2	AA063	1
AA382	4	AA091	2
AA383	1	AA175	1
岐阜県 N	9	豊橋市	13
AA028	2	AA042	1
AA044	2	AA064	1
AA045	1	AA070	2
AA063	3	AA078	3
AA403	1	AA142	1
岐阜市	5	AA409	1
AA023	1	AA410	1
AA352	2	AA411	1
AA382	2	(空白)	2
三重県	13	豊田市	3
AA023	3	AA040	2
AA024	1	AA064	1
AA031	4	名古屋市	10
		AA404	4

AA405	1
AA406	1
AA407	1
AA408	3

総計	143
----	-----

空白は *eae* 遺伝子陰性のため登録不可を示す。

岐阜県 N は追加の 9 株を示す。

表2 各 IS 型が検出された施設

行ラベル	データの個数 / IS 型
AA009	1
岐阜県	1
AA016	2
石川県	2
AA017	12
愛知県	4
岡崎市	2
福井県	6
AA018	3
愛知県	1
福井県	2
AA023	8
愛知県	4
岐阜市	1
三重県	3
AA024	1
三重県	1
AA028	4
岡崎市	2
岐阜県 N	2
AA031	5
岐阜県	1
三重県	4
AA039	1
福井県	1
AA040	13
愛知県	9
三重県	2
豊田市	2
AA042	2
石川県	1
豊橋市	1
AA044	5
岐阜県 N	2
石川県	1
富山県	1
福井県	1
AA045	1
岐阜県 N	1
AA048	1
富山県	1

AA060	1
岐阜県	1
AA063	5
愛知県	1
岐阜県 N	3
福井県	1
AA064	2
豊橋市	1
豊田市	1
AA070	2
豊橋市	2
AA078	10
岡崎市	3
岐阜県	2
三重県	2
豊橋市	3
AA091	18
愛知県	2
岡崎市	2
岐阜県	1
石川県	5
富山県	6
福井県	2
AA108	1
岡崎市	1
AA128	2
岐阜県	2
AA142	1
豊橋市	1
AA175	1
福井県	1
AA178	2
石川県	2
AA195	1
石川県	1
AA285	1
愛知県	1
AA331	2
岐阜県	2
AA348	1
三重県	1
AA349	2
石川県	2

AA351	1	AA405	1
富山県	1	名古屋市	1
AA352	2	AA406	1
岐阜市	2	名古屋市	1
AA382	6	AA407	1
岐阜県	4	名古屋市	1
岐阜市	2	AA408	3
AA383	1	名古屋市	3
岐阜県	1	AA409	1
AA394	1	豊橋市	1
富山県	1	AA410	1
AA400	1	豊橋市	1
愛知県	1	AA411	1
AA401	1	豊橋市	1
愛知県	1	AA413	1
AA402	1	石川県	1
愛知県	1	AA414	1
AA403	1	石川県	1
岐阜県 N	1	(空白)	
AA404	4	豊橋市	
名古屋市	4	総計	141

空白は *eae* 遺伝子陰性のため登録不可を示す。

岐阜県 N は追加の 9 株を示す。

図 1

平成 25 年に岐阜市の飲食店を原因施設とする食中毒の原因菌であった A 群溶血性レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の PFGE を実施した

【実施条件】

Plug 調製、電気泳動	SeaKem Gold Agarose(1%)
溶菌処理	0.1M リン酸バッファー(pH6.2)に 5000U のムタノリシン(Sigma)を最終濃度 50U/ml となるよう添加し、37°C、5hr 消化。その後、1%N-Lauroyl sarcosine に ProteinaseK を最終濃度 0.1mg/ml となるよう添加し、50°C で over night。
Inhibitor 処理	CompleteMini 1 tablet/10ml of TE 500 μl/tube、50°C、20min
制限酵素処理	<i>Sma</i> I (TaKaRa)、10Unit/tube、Buffer:T+BSA、200 μl/tube、25°C、4hr <i>Sfi</i> I (TaKaRa)、10Unit/tube、Buffer:M、200 μl/tube、50°C、4hr
PFGE	6V/cm、0.5—35.4s、20.1hr
PFGE buffer	0.5 × TBE、2L
染色	SYBR Safe DNA gel stain in 0.5 × TBE (invitrogen)

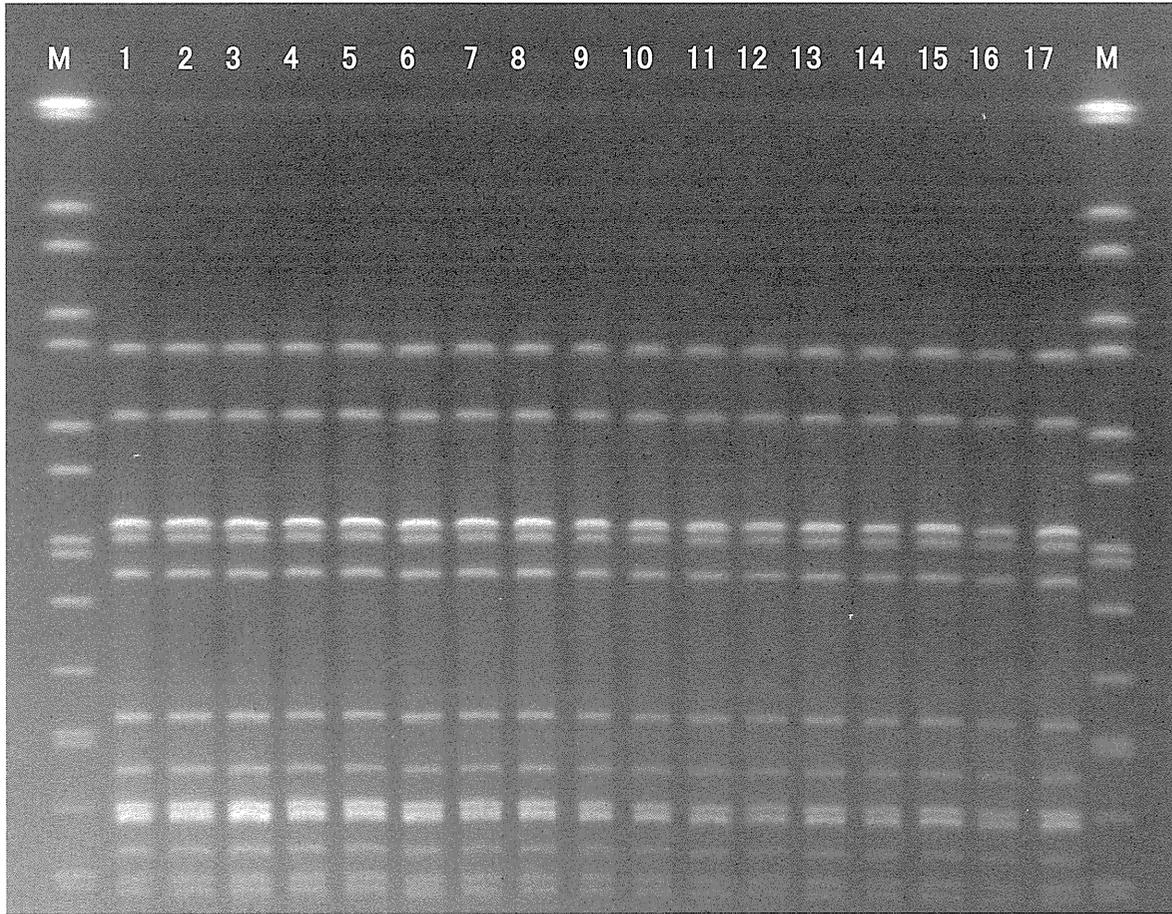
【検体】

レーン	由来
M	Salmonella Braenderup H9812 (<i>Xba</i> I 処理)
1	<i>S.pyogenes</i> (従業員 No.3)
2~7	<i>S.pyogenes</i> (岐阜市有症者)
8~17	<i>S.pyogenes</i> (岐阜県有症者)

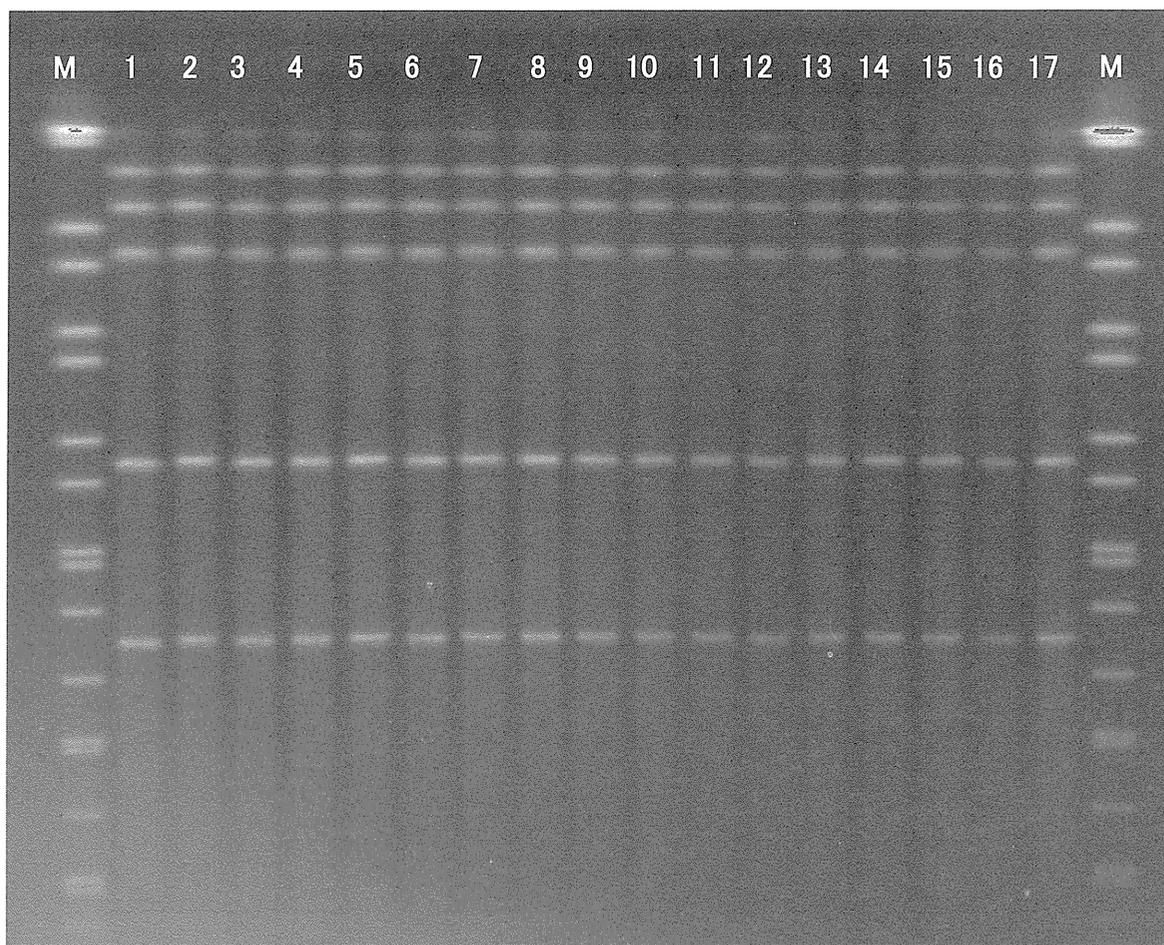
【検体内訳】

レーン		レーン	
1	従業員 No.3	10	岐阜県有症者 No.13-38
2	岐阜市有症者 No.9	11	岐阜県有症者 No.13-39
3	岐阜市有症者 No.10	12	岐阜県有症者 No.13-40
4	岐阜市有症者 No.12	13	岐阜県有症者 No.13-41
5	岐阜市有症者 No.13	14	岐阜県有症者 No.13-44
6	岐阜市有症者 No.14	15	岐阜県有症者 No.13-45
7	岐阜市有症者 No.15	16	岐阜県有症者 No.13-52
8	岐阜県有症者 No.13-36	17	岐阜県有症者 No.13-53
9	岐阜県有症者 No.13-37		

【*Sma* I 处理】



【Sfi I 処理】



【結果】

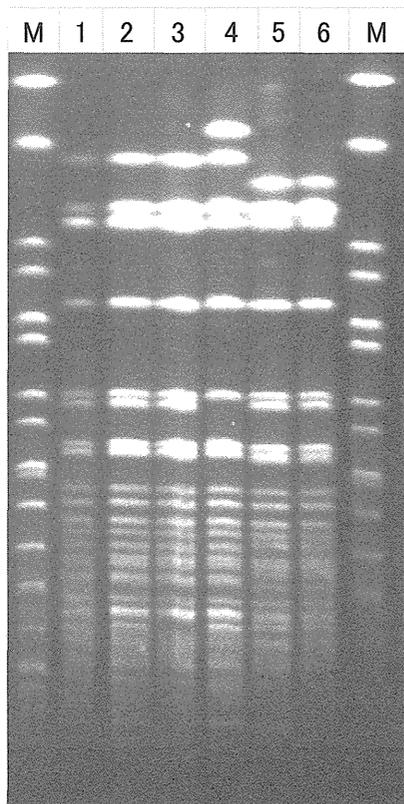
今回分離した *S. pyogenes* は制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I による PFGE パターンがそれぞれすべて一致しており、市内の有症者由来株および県内の有症者由来株のいずれも原因施設の従業員由来株と同一株であることが判明した。

【参考文献】

奥野ルミ、遠藤美代子、下島優香子、柳川義勢、諸角聖、大仲賢二、古畑勝則、福山正文
: 劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来 A 群レンサ球菌の薬剤感受性とパルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別 感染症学雑誌 第 79 巻第 4 号

図 2

2013年7月に三重県の北勢地域で検出された腸管出血性大腸菌 O121 4株および2010年6月に分離された O121 2株の計6株について PFGE 解析を実施した。その結果、Lane 1~4の集団事例由来4株では2株(Lane 1,2)で同一パターンを示し、Lane 5~6の家族内感染事例では、2株が同一パターンであった。



Lane No.	毒素型	患者・保菌者	集団・散発	管轄保健所	分離月日
1	Stx1,2	患者	集団	四日市市	2013/7/1
2	Stx1,2	患者	集団	四日市市	2013/7/4
3	Stx1,2	患者	集団	桑名	2013/7/4
4	Stx1,2	患者	集団	鈴鹿	2013/7/9
5	Stx2	保菌者	家族内	桑名	2010/6/2
6	Stx2	患者	家族内	桑名	2010/6/2

図 3

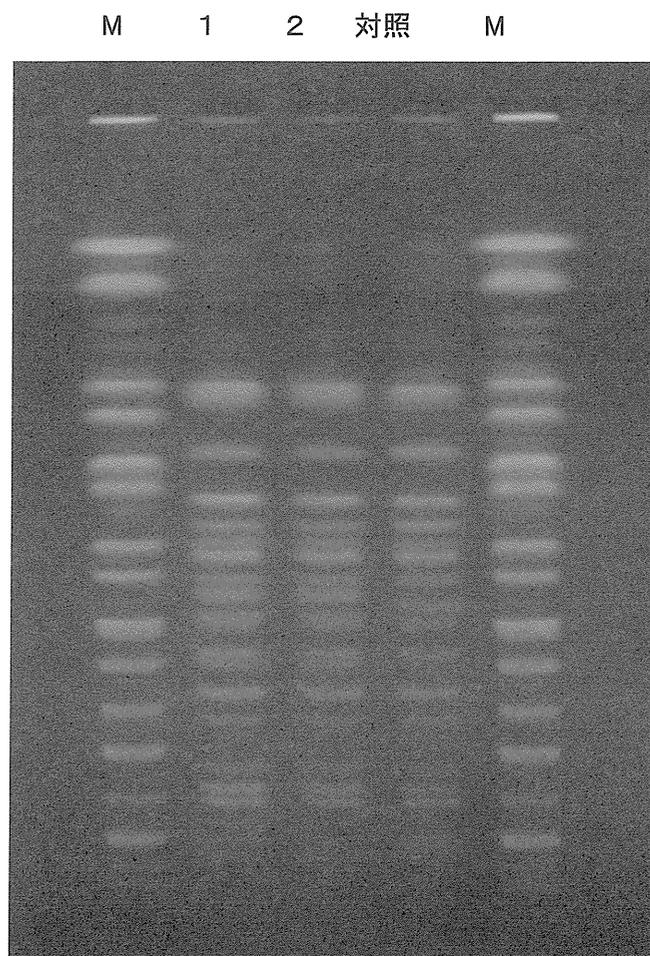
<概要>

平成 25 年 9 月に有症者 A から腸管出血性大腸菌 O157(VT2)が検出された(菌株 No.1)。また、10 月に定期検便で無症状病原体保有者 B から腸管出血性大腸菌 O157(VT2)が検出された(菌株 No.2)。疫学調査の結果、有症者 A と無症状病原体保有者 B は、焼肉店①で同じ日に喫食していることが判明し、同一感染源による感染が疑われた。しかし、無症状病原体保有者 B は、上記焼肉店①とは別の焼肉店②に勤務していることから、別の感染源の可能性もあったため、関連性の有無を調べるために、PFGE を実施した。

PFGE による解析結果より菌株 No.1、2 の DNA 切断パターンは全て同一であったことから、同一感染源による感染と判断されたが、感染源の特定には至らなかった。

<PFGE による解析結果>

菌株 No.1、2 の DNA 切断パターンは全て同一であった。



M: Size Marker (*Salmonella* Braenderup H9812)

制限酵素: *Xba* I、泳動条件: 6V/cm (200V) 2.2-54.2sec 19hr

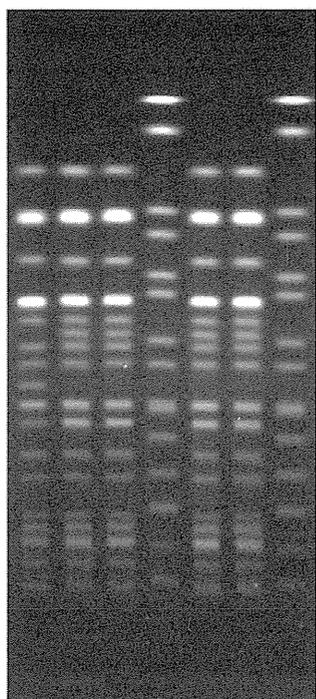
図 4

富山県では腸管出血性大腸菌感染症全事例についてPFGE解析を行っている。このうち、本年は腸管出血性大腸菌0157感染事例についてPFGEによる解析を行ったので報告する。

平成25年7月から8月にかけて、0157(VT1VT2、以下0157)感染事例が7件発生した。これらの事例についてIS-Printingによる遺伝子型別を行ったところ、6件についてIS-Printingの型別が一致した。

これらの事例についてPFGEを行った結果、IS-Printingの型別が一致した6件の0157のPFGEパターンが一致した。IS-Printingの型別が異なっていた1件の0157はPFGEパターンが一致しなかった。IS-PrintingおよびPFGEパターンが一致した6件の感染事例はすべて散発であり、関連性は不明であった。

1 2 3 M 4 5 M



M サルモネラマーカ

lane 1 平成25年7月 散発1

lane 2 平成25年8月 散発2

lane 3 平成25年8月 散発3

lane 4 平成25年8月 散発4

lane 5 平成 25 年 8 月 散発 5

O157散発7件のうちPFGEパターンの異なる事例 (lane 1) と

同一 PFGE パターンを示した 4 事例 (lane 2-5) について掲載した

図 5

幼稚園における腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例
事例の概要

- ・原因施設：高山市内の幼稚園
- ・感染者数：6名（園児及びその家族）
- ・発生日：平成25年7月20日
- ・原因菌：腸管出血性大腸菌 O26:H11 VT1

PFGE解析結果

感染者6名から検出された腸管出血性大腸菌 O26(6株)、及び直近に県内で発生があった O26 散発事例の6株について、制限酵素 *Xba*I による PFGE を実施した。その結果、集団感染事例(6株)の泳動パターンは、すべて一致した。また、散発事例の内1株がこれと同一パターンを示したが、関連性については不明であった。

M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 11 12 M

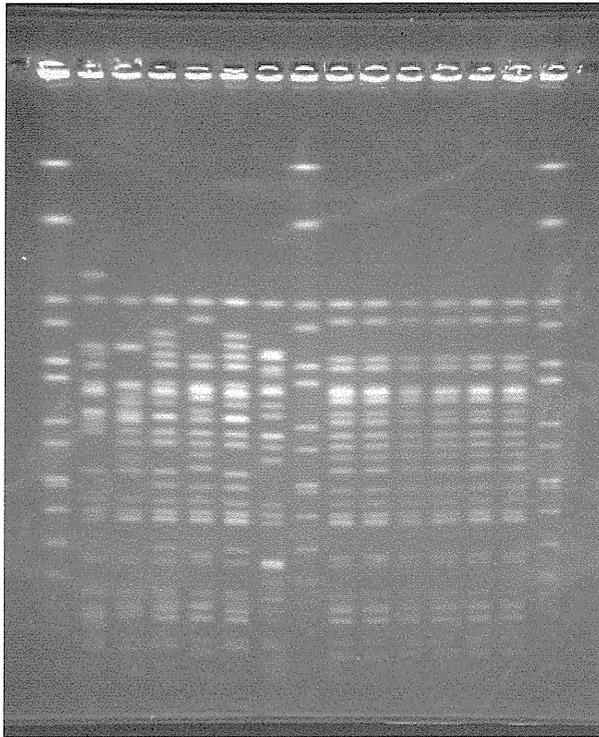


図 O26 集団感染事例の PFGE 結果

レーン 1～6 :散発事例(レーン 4 が集団事例と同一パターン)

7～12 :集団感染事例

M :マーカー *S. Braenderup* H9812

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 25 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおける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	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	梅原成子、河野智美	滋賀県衛生科学センター
	浅井紀夫、平田佐知	京都府保健環境研究所
	杉浦伸明	京都府保健環境研究所
	清水麻衣	京都市衛生環境研究所
	秋山由美、齋藤悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹	神戸市環境保健研究所
	横山北斗	姫路市環境衛生研究所
	村山隆太郎	尼崎市衛生研究所
	小笠原準、中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	下迫純子、岩崎直昭	堺市衛生研究所
	田辺純子、辻本真弓	奈良県保健研究センター
	琴原優輝	奈良県保健研究センター
	廣岡真理子	和歌山市衛生研究所
	中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
	田口真澄、河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
	原田哲也	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

近畿ブロックでは、IS-printing System (IS) 法を EHEC O157 遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、2009 年から各施設で実施した IS タイプをデータベース化して情報を共有している。2013 年 6 月には、これまでになかった IS タイプの株が 2 施設から登録され、原因施設の判明につながった。データベースには、2014 年 2 月 10 日現在で 2,064 株が登録されているが、毎年複数の施設から登録される高頻度の IS タイプがあり、最も多い IS タイプ Ad は 11 施設から 159 株が登録されていた。このうちの 53 株について 9 施設でパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法を実施して画像解析をおこなったところ、PFGE パターンは多様で、同時期に分離された株でも PFGE タイプが一致しない株がみられた。しかし、登録施設や感染研 PFGE タイプ名が異なっても、ほぼ同一の PFGE パターンを示す株もあり、IS 法は遺伝子型別スクリーニング法として役割は果たしていると考えられた。一方で、感染研 PFGE タイプ名が同じであるのに IS タイプが一致しない場合もある。家族事例

や保育園集団事例で IS 法の判定が 1 本異なることはしばしばみられるが、感染研 PFGE タイプ d483 は IS タイプが 9 タイプに分かれていた。このような株では、その流行が IS 法だけでは探知できない。IS データベースにより情報交換や精査が必要と判断された場合には、型別能力に優れた PFGE 法や Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の実施が必要となる。それぞれの解析手法について、近畿ブロックで共通の疫学指標として使用するため、精度管理の継続やプロトコルの最適化が必要であると考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の遺伝子型別法は、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法が標準法として汎用されているが、血清群 O157 (以下 O157) については、迅速性に優れた IS-printing System (IS) 法も多用されつつある。近畿ブロックでは、IS 法を O157 遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、2009 年から各施設で実施した IS タイプをデータベース化して情報を共有している。2014 年 2 月 10 日現在で 2,064 株が登録されているが、毎年複数の施設から登録される高頻度の IS タイプがみられる一方で、感染研 PFGE タイプ名が同じであるのに IS タイプが一致しない場合もある。この 2 点を検証するため、前者はこれまでに最も多く登録された IS タイプ Ad (表 1) について、後者は感染研 PFGE タイプ d483 について、各施設保存株で PFGE 法や IS 法を実施し、その成績を比較した。合わせて、解析手法の信頼性確保のため、同一の菌株を用いた精度管理も実施した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には 2013

年に分離された EHEC O157 5 株 (菌株 1~5) を用い、トリプトソイ寒天培地 (TSA) 1ml を分注したマイクロチューブ (輸送培地) に接種して研究協力者に配布した (表 2)。

2. IS 法

IS 法は、IS-printing System Version 2 (東洋紡) を使用し、プライマーごとに増幅の有無を判定した。電気泳動は、施設 5 で自動電気泳動装置 QIAxcel (QIAGEN) を使用したほかは取扱説明書どおりに実施した。非特異バンドが増幅された場合はそのサイズを記載した。

3. 近畿 IS データベース

データベースは「施設内データベース」と「近畿レファレンス・データベース」からなり、データ入力は、必須項目である菌株番号、血清型、日付 (発症日、分離日など)、管轄保健所、IS 法の判定結果 (IS データ) のほか、感染研 PFGE タイプ、備考欄を設け、IS データは十進数に変換した「IS コード」としてもデータベース上に表示した。各施設で実施した成績を施設内データベースに入力あるいは感染研 PFGE タイプなどを追記した場合は、「レファレンス用デ