

ータ」として随時大阪府立公衆衛生研究所（公衛研）に送信し、公衛研では各施設から送付されたデータをもとにレファレンス・データベースを更新して、最新版を研究協力者に配布した。

4. PFGE 法

平成 15 年度から使用している「PFGE New Protocol-Kinki」に従って *Xba* I で切断した。電気泳動時間は 19 時間を目安として、各施設の電気泳動装置でゲル下端から 1～1.5cm 程度の泳動距離になるようにした。サイズマーカーには、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断を使用し、Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できる泳動像を条件とした。

5. PFGE 画像の解析

BioNumerics ver. 6.1 (Applied Maths) を使用した。バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 5%、シヨルダー感度 0 で行い、目視で補正した後、類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

C. 研究結果

1. IS 法の精度管理

精度管理には 11 施設が参加し、菌株 1～3 は一致した判定結果が得られた (図 1)。

菌株 5 は、1-03 および 1-15 付近に非特異バンドが増幅され、3 施設で 1-03 に誤判定がみられたが、泳動量を減らす、あるいは

泳動時間を延長してバンド間隔を広げることにより、明らかにサイズが異なると判定された。

菌株 4 については、施設 10 で *stx1* および *stx2* が陰性と判定され、異なるプライマーを用いて *stx* 遺伝子を確認したが陰性であった。また、菌株 5 についても、施設 2 と施設 13 で *stx2* が陰性と判定された。

2. 高頻度の IS タイプ Ad を示す株の解析

これまでに最も多く登録された IS タイプ Ad は IS コード 249727 116975 で (表 1)、11 の参加施設から 159 株が登録されている。特に 2011 年は 10 施設から 53 株が登録され、感染研 PFGE タイプは集団事例のあった b705 や広域流行タイプの c272 など 14 タイプに分かれていた (表 3)。2009～2012 年に登録された株を中心に、各施設でなるべく感染研 PFGE タイプの異なる株を選択して PFGE 法を実施し、画像を公衛研に電送して画像解析を行った。9 施設から集まった 53 株の PFGE パターンは多様で、デンドログラムを作成したところ、全株の近似度は 82.7% であった (図 2)。保存株を用いた解析であり、分離時に実施された PFGE パターンと一致しない部分もあるが、主な感染研 PFGE タイプである d479、c272、h132、b705 はそれぞれ近似度 88% 以上の異なるクラスターに分かれた。d342 は c272 のクラスターに含まれていた。分離時期を 2011 年 7 月に限っても、該当する 10 株の PFGE パターンは、c272 および c272 と 1～3 本異なる株とそれ以外に分かれていた (図 3)。その一方で、b705 を含むクラスターの菌株 103、105、

125、140 および 132 のように、分離年や登録施設、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った（図 2）。

3. d483 株の解析

感染研 PFGE タイプ d483 は 2008 年以降に 39 株あり、その多くは 2011 年（14 株）と 2013 年（17 株）に登録されていた（表 4）。IS 型は 9 タイプに分かれ、各施設で IS 法を再実施したが結果は同じであった。最も増幅バンド数の多いタイプ Bb は 2013 年に多く、2011 年は Bb とセット 2 で 1 本異なる Bc やセット 1 と 2 で 1 本ずつ異なる Ec など 6 タイプみられた。

これらの株のうち 21 株について PFGE を実施したところ、17 株は認識バンド数に若干の違いはあるものの近似度 95.1% を示した。残りの 4 株についても、デンドログラムでの近似度は低いが、ある程度類似したパターンを示していた（図 4）。

4. 2013 年分離株の傾向

2013 年に分離された株は 270 株登録され、IS 法で 74 タイプに型別された。10 株以上登録されたタイプは 6 タイプあり、このうち Bh、Ec および Bb は前述の d483 でもみられたタイプであり Ad は高頻度 IS タイプであった（表 5）。最も多く登録されたタイプ Bh は 2 月から 12 月の長期間にわたって分離されており、Ec と Bb は 8 月に入って登録数が増えたことから、各施設に情報提供を呼びかけたが、感染源につながる情報は得られなかった。

タイプ Ia は 2012 年以前に登録のないタイプで、6 月に施設 1 で散発事例由来の 2 株が、施設 4 で保育園関連事例の 13 株が型別された。保育園関連事例の初発患者と散発事例患者は同時期に飲食チェーン店の別店舗を利用しており、感染研 PFGE タイプも一致していた。

5. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGE の精度管理には 9 施設が参加した。電送された PFGE 画像のファイルサイズやコントラストは様々で、施設 12 では制限酵素による切断が不十分であると推察されるバンドも見られた（図 5）。未消化バンドをバンド認識したままでデンドログラムを作成したところ、菌株 3 と菌株 4 では他の 8 画像との近似度が 80% 程度となった。未消化バンドや小さいサイズのバンド認識を目視で補正した解析では、どの菌株でも 94% 以上の近似度を示した（図 6）

D. 考察

IS 法は特別な装置を必要とせず、迅速性に優れることから、EHEC O157 の遺伝子型別法として利用されている。その型別能力は PFGE 法にはおよばないが、結果を数値化できることから、近畿ブロックではデータベースを構築して各府県の分離株の IS タイプについて情報共有を行っている。

データベース化の第一の目的は diffuse outbreak の探知であり、表 5 に示したタイプ Ia のように、これまでにみられなかったタイプが同時期に分離された場合は、関連性が強く疑われる。この場合も、2 施設の情報

交換から原因施設が明らかになり、PFGE タイプの一致も確認された。タイプ Ad のように毎年多く登録されるタイプでは、分離時期が同じでも PFGE タイプが一致するとは限らない (図 3)。しかし、感染研 PFGE タイプ名の同じ株と異なる株がほぼ同一の PFGE パターンを示す場合もあり (図 4)、IS 法は O157 遺伝子型別のスクリーニング法としての役割を果たしていると考えられた。

一方で、PFGE タイプが一致するにもかかわらず IS タイプが異なる株は、その流行が IS 法で探知できないことが心配される。これまでも、家族事例や保育園集団事例で IS 法の判定が 1 本異なることはあったが、同一の PFGE タイプで IS タイプが 9 タイプに分かれることはかなり珍しいと言える。

d483 は 2008 年に青森県の散発事例由来株につけられたタイプ名で、その後も全国で断続的に分離されている。2011 年分離株については、感染研で Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) が行われ、リピート数が少しずつ異なる多数の変異株の集合であると報告されている (IASR, 33, 127-128, 2012)。保存株を用いた PFGE 法では、図 4 のように若干異なるパターンを示す株もあり、「変異しやすいタイプ」であると考えられた。このような例外的な株の情報についても、ブロック内で情報共有を図りたい。

以上のように、IS 法による型別はあくまでも「ふるい」であり、遺伝子型別の標準法として PFGE 法の果たす役割は大きい。近畿ブロックでは毎年精度管理を実施しており、各施設で手技の継承や機器の状態を

チェックする大切な機会となっている。今年度も未消化バンドやコントラスト不足の画像がみられたが、概ね良好な結果であった。供試菌株の濃度やゲルブロックの大きさを揃える、ゲルブロックを丁寧に洗浄する、電気泳動槽の水平を確認する、泳動時間が過剰にならないよう気をつけるなど、細かい点に注意することにより、さらなる改善が期待される。

IS 法の精度管理では、3 施設で毒素遺伝子の脱落がみられた。前培養の段階で毒素遺伝子脱落コロニーを選択したものと考えられたが、その頻度が高かった理由は不明である。精度管理株を選択する際に、注意する必要がある。

E. 結論

近畿ブロック IS データベースには、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。最も多く登録されている IS タイプ Ad については、分離時期が一致していても PFGE パターンが一致するとは限らなかった。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、遺伝子型別のスクリーニング法としての役割は果たしていると考えられた。特に、新しい IS タイプの株が同時期に分離された場合は、関連性が強く疑われることから、情報交換と PFGE 法の実施を急ぐべきである。

一方で、PFGE タイプが一致するにもかかわらず、IS タイプが異なる株もあり、d483 は IS タイプが 9 タイプに分かれていた。このような例外的な特徴をもつ株についても、

ブロック内で情報共有を図りたい。

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 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ールの最適化が必要である、

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Osawa K, Shigematsu K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, Seto K, Raharjo D, Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T: Modulation of O-antigen chain length by the *wzz* gene in *Escherichia coli* O157 influences its sensitivities to serum complement. *Microbiol. Immunol.* 2013, 57: 616-623.
- 2) Harada T, Hirai Y, Itou T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an *IS1203* variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 77: 176-178.

- 3) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of Gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66: 530-533.

- 4) Kanki M, Seto K, Kumeda Y: Simultaneous immunomagnetic separation method for the detection of *Escherichia coli* O26, O111, and O157 from food samples. *J. Food Protect.* 2014, 77: 15-22.

- 5) 川津健太郎, 勢戸和子, 久米田裕子: 食中毒細菌の簡易迅速検査法. 微生物の簡易迅速検査法 (株式会社テクノシステム) 2013, 521-530.

2. 学会発表

- 1) 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 田口真澄: 大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較, 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2013 年 7 月, つくば)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 2 IS-printing System および PFGE の精度管理に使用した株

菌株番号	菌種(毒素型)	分離年	感染研PFGEタイプ
1	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2013	g285
2	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2013	i198
3	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2013	d483
4	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2013	i77
5	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2013	i387

表 3 IS タイプ Ad の近畿 IS データベース登録数(2009~2012 年)

分離年	登録数(%) ^a	登録施設数 ^b	感染研PFGE	
			タイプ数	主なタイプ名(登録数)
2009	14 (5.6)	4	4 (+1) ^c	d479(10) ^d
2010	30 (6.1)	8	13 (+1) ^c	c272(5), d342(6)
2011	53 (16.8)	10	14	b705(15) ^e , c272(25)
2012	19 (8.5)	8	13	h132(6)

a 各年の登録数にしめる割合

b 参加施設数は2009年は9施設, 2010年は10施設, 2011年以降は11施設

c 1株はタイプ名不明

d 保育園での集団事例

e バーベキュー集団事例を含む

表 4 感染研 PFGE タイプ d483 の IS タイプと近畿 IS データベース登録数

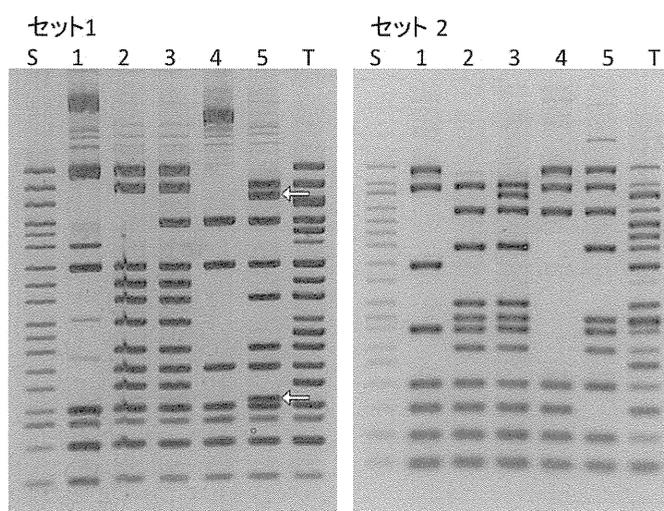
タイプ名	登録数	登録施設数	分離年ごとの登録数(施設数)					タイプBbと判定が異なるプライマー ^a
			2013	2012	2011	2010	2008	
Bb	17	4	15 (3)				2 (2)	
Bc	9	6	2 (1)		6 (5)			2-16
Bh	2	2			1 (1)	1 (1)		2-03
Bi	2	2		2 (2)				2-03, 2-16
Ch	1	1			1 (1)			1-14, 2-03
Db	1	1					1 (1)	1-13
Ec	5	3		1 (1)	4 (2)			1-10, 2-16
Fe	1	1			1 (1)			1-09, 2-07, 2-16
Gg	1	1			1 (1)			1-02, 2-04
計	39	10	17 (4)	3 (2)	14 (8)	1 (1)	3 (3)	

a タイプBbはバンドあり、他のタイプではバンドなし

表 5 2013 年分離株の主な IS タイプ

タイプ名	登録数	登録施設数	分離時期	主な感染研 PFGEタイプ	備考
Bh	39	9	2月, 4~10月, 12月	g9, i18, i130	4つの家族またはグループ事例を含む
Ec	26	7	1月, 8~9月	g307, i253	3つの家族事例を含む
Bb	25	6	8~9月	d483	2つの家族事例を含む
Ia	15	2	6月	i77	飲食チェーン店関連事例
Hf	11	2	7~9月	h310	スポーツ合宿関連事例を含む
Ad	10	5	4月, 7~11月		2つの家族事例を含む

1) 電気泳動画像



S: Standard DNA, 1~5: 精度管理株, T: Template Mix, 矢印: 非特異バンド

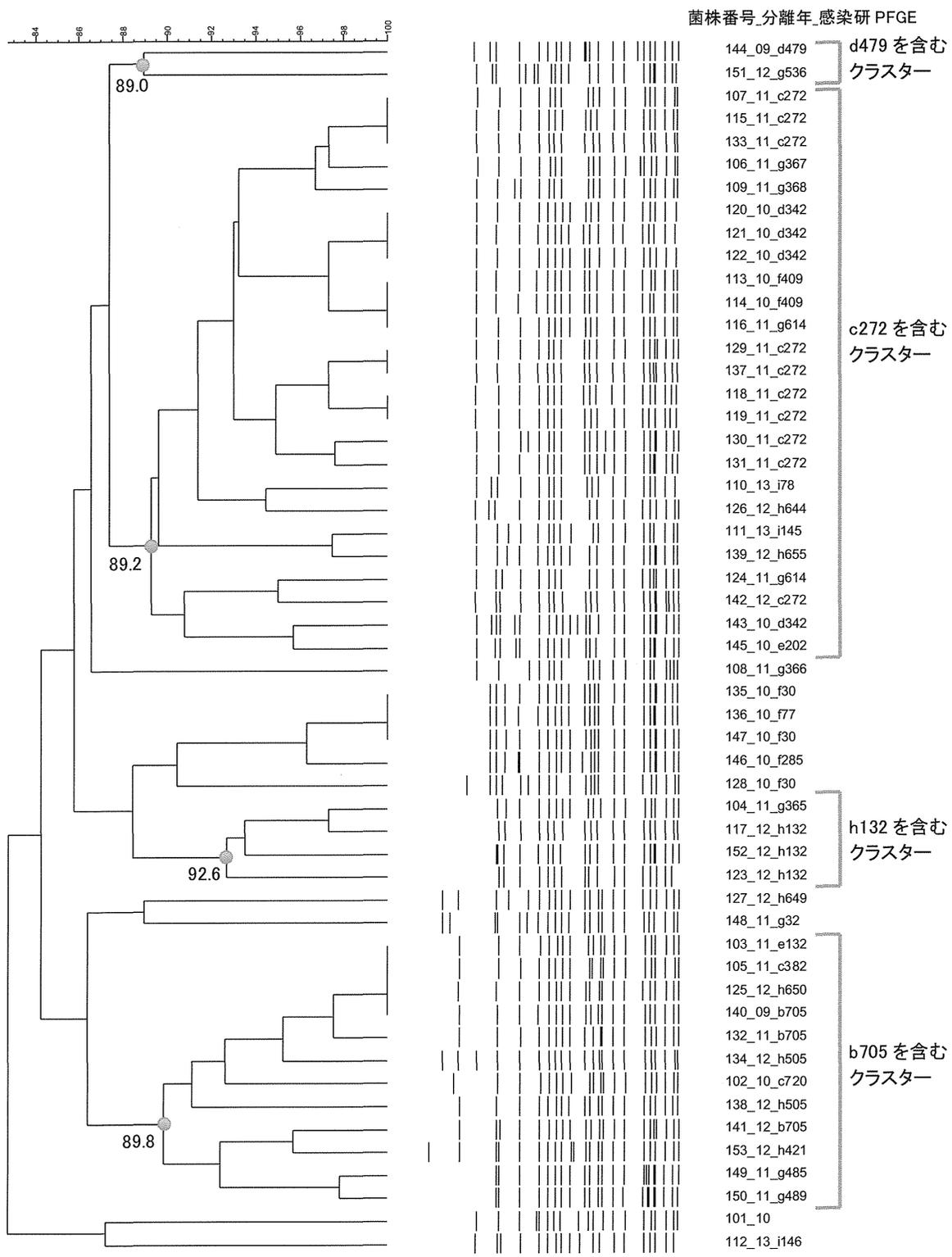
2) 判定

菌株	セット1 判定 ^a																セット2 判定																						
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	ease	16	hiyA	備考 ^b	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1			
2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1			
3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1			
4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1		1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1		
5	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	800, 220	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1			

a 1: 増幅あり, 0: 増幅なし

b 非特異バンドの増幅サイズ

図 1 EHEC O157 精度管理株の IS-printing System 実施例(施設 1)



数字はクラスターの近似度(%)

図2 EHEC O157 IS タイプ Ad のデンドログラム(2009~2013年)

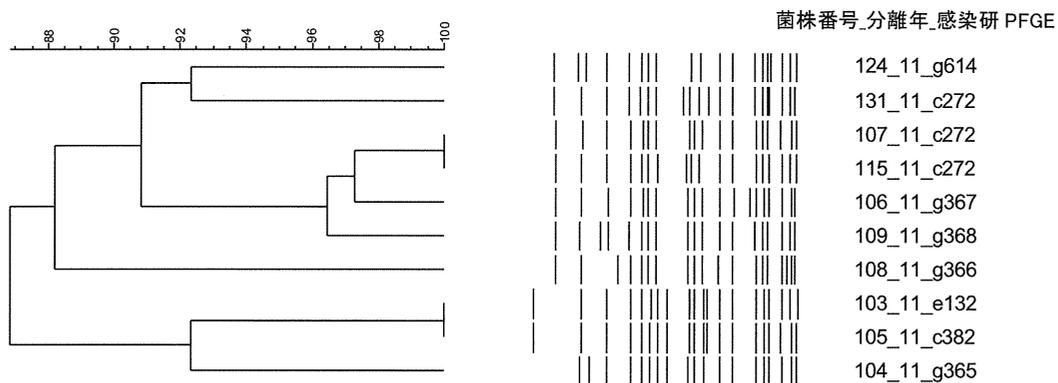


図 3 EHEC O157 IS タイプ Ad のデンドログラム(2011 年 7 月分離株)

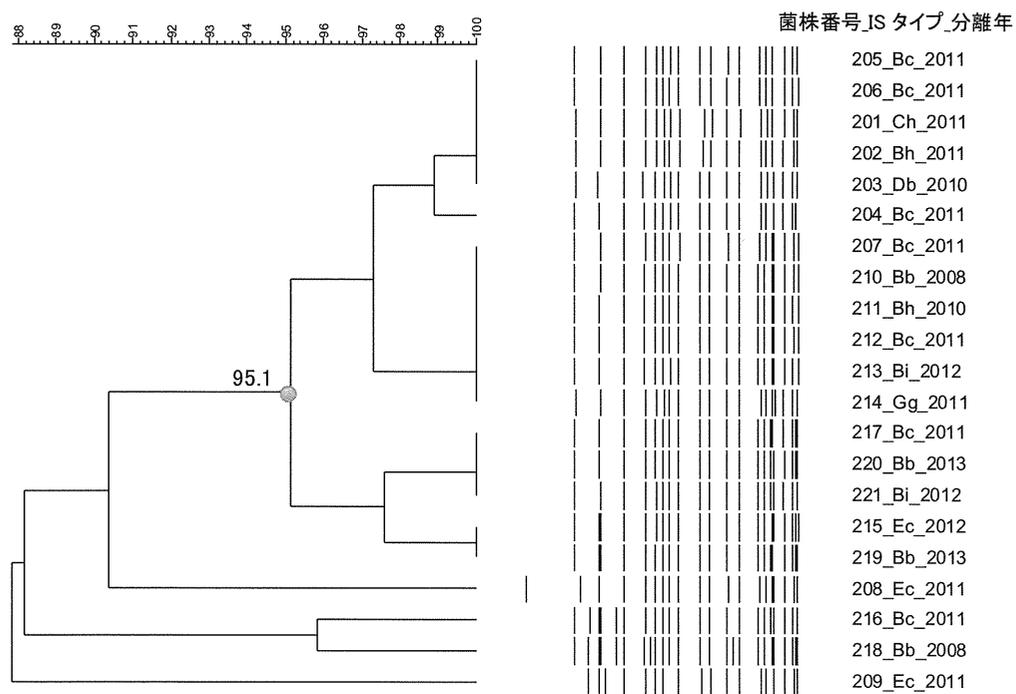
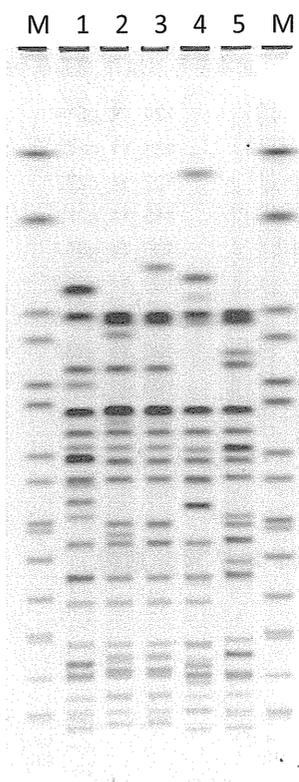
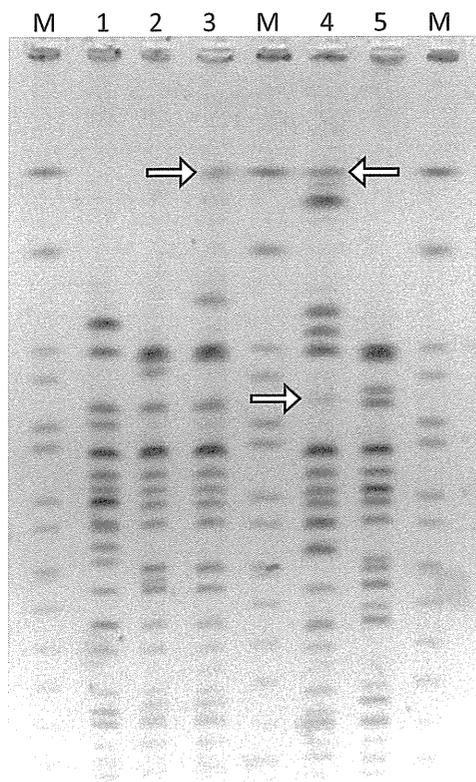


図 4 感染研 PFGE タイプ d483 のデンドログラム

1) 施設 9



2) 施設 12



M: マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812)

1~5: 精度管理株

矢印: 未消化が疑われるバンド

図 5 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像例

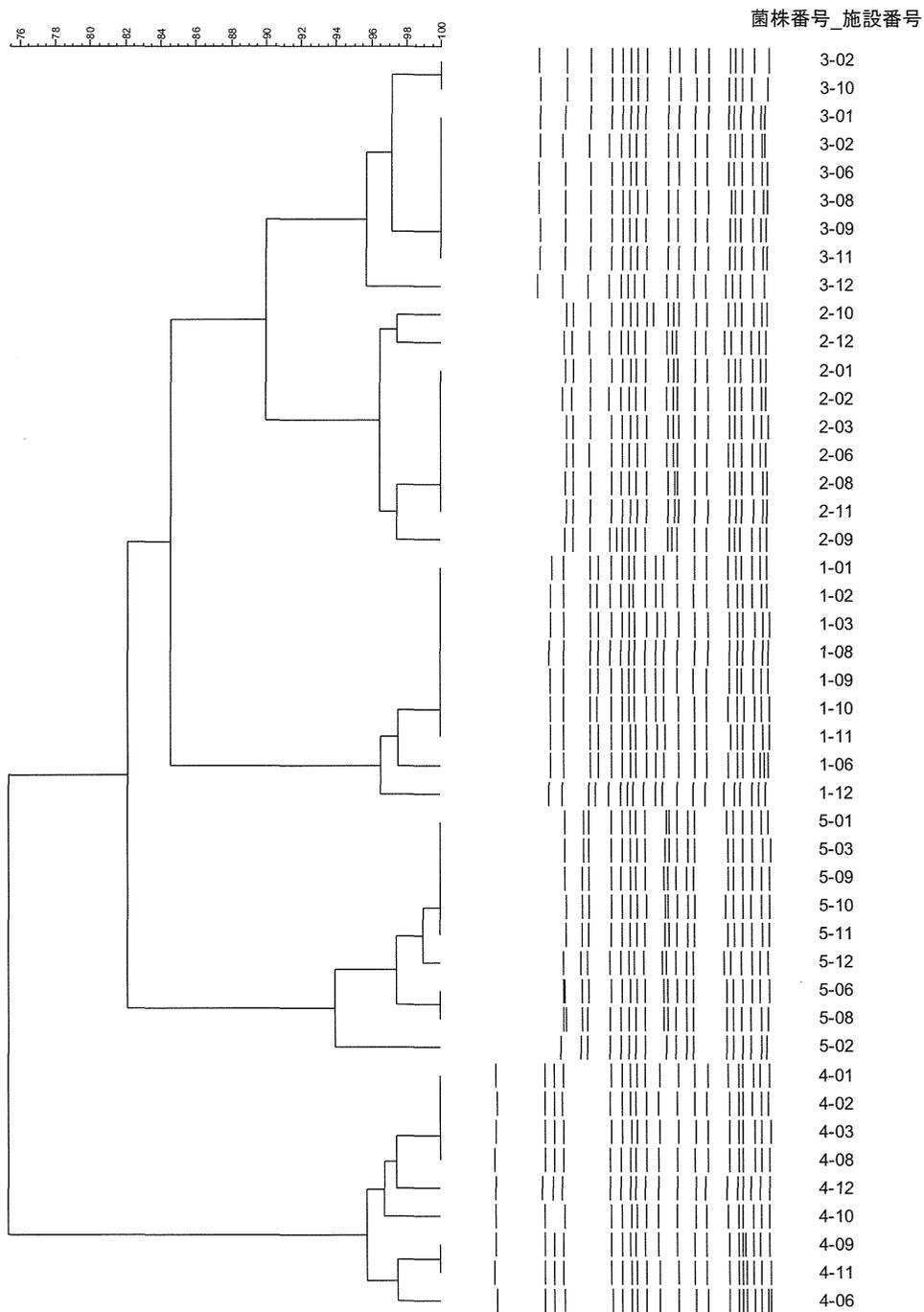


図6 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

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

腸管出血性大腸菌の新規 MLVA 法実施のための基礎的検討

研究協力者 原田哲也 大阪府立公衆衛生研究所
研究分担者 勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

近畿ブロックでは、腸管出血性大腸菌（EHEC）の遺伝子型別法である Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法について、O157 だけでなく O111 や O26 の遺伝子型別も可能な Izumiya らの方法（新規 MLVA 法）の導入をめざしている。本法は、2 組の Multiplex PCR 反応で得られた増幅産物をフラグメント解析に用いるが、どの遺伝子座でも安定して増幅産物が得られるよう、Multiplex PCR について基礎的な検討を行い、プロトコールの最適化をめざした。テンプレートの調整方法については、滅菌水によるボイル法と DNA 抽出キットを使用した方法との間に差はほとんどみられなかったが、プライマー希釈液については、菌株によって 1～2 か所の遺伝子座で TE 希釈プライマーでは十分な増幅産物量が得られない場合がみられた。また、滅菌水希釈プライマーを用いた場合でも十分な増幅産物が得られなかった 3 つの遺伝子座については、PCR 反応を別にすることにより良好な結果が得られた。今後は、被検菌株数を増やして今回非検出が多かった遺伝子座について検討するとともに、本法を複数の機関で実施して最適なプロトコールの確立を目指す。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法については、2006 年に発表された CDC 法（Hyytia-Trees ら、Foodborne Pathog. Dis., 2006）が使われてきたが、2010 年には Izumiya らによって O157 だけでなく O111 や O26 の遺伝子型別も可能な方法（新規 MLVA 法）が開発され、国立感染症研究所（感染研）で実施されてい

る（Izumiya ら、Microbiol. Immunol., 2010）。

この方法は 18 か所の遺伝子座を標的としており、2 組の Multiplex PCR で得られた増幅産物を希釈してフラグメント解析を実施する。近畿ブロックでも non-O157 EHEC 感染症の多発に対応できるよう、昨年度は 4 機関で新規 MLVA 法を検討したが、フラグメント解析に必要な増幅産物が十分に得られない遺伝子座がみられた。そこで Multiplex PCR について、テンプレートの調整法やプ

ライマーの希釈法など、基礎的な検討を行い、プロトコールの最適化をめざした。

B. 研究方法

1. 供試菌株

大阪府内で 2009 年および 2010 年に分離された EHEC で、すでに国立感染症研究所で新規 MLVA 法の解析データが得られている 11 株 (O111 1 株、O157 10 株) を使用した。

2. テンプレート調整方法の比較

PV09-11 (O111) および PV09-115 (O157) の 2 株について、テンプレート調整法の解析結果への影響を比較した。DNA 抽出は滅菌水によるボイル法および DNeasy® Blood&Tissue Kit (QIAGEN、QIAGEN 法) を使用し、PCR 反応には後述の TE 希釈ワーキングプライマーを用いた。

3. プライマー希釈液の比較

ライフテクノロジーズ社より購入したプライマーを TE (pH8.0) で 100 μM に調整し、マスタープライマーとした。各マスタープライマーを滅菌水または TE で表 1 に示す濃度に希釈したものをワーキングプライマーとし、PCR 反応液の調整に用いた。それぞれの PCR 反応液にボイル法で調製したテンプレートを加えて PCR を行い、MLVA 解析後、増幅産物の分子量および増幅量を示す height 値を比較した。

4. PCR 反応液調整の検討

他の遺伝子座と比較して低い height 値を

示した O157-34、EH111-11、O157-10 について、解析に十分な増幅量を得るため新たに Mix 3 (表 2) をデザインした。各供試菌株について PCR を実施し、増幅産物の分子量および height 値を比較した。

5. MLVA 解析

PCR 反応条件および MLVA 解析は Izumiya らの方法に準じて実施した。PCR 増幅産物は滅菌水で 100 倍に希釈し、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer でフラグメント解析を行った。分子量マーカーは GeneScan-600LIZ Size Standard (Applied Biosystems) を使用した。

C. 研究結果と考察

1. テンプレート調整方法の比較

PV09-11 と PV09-115 について、各遺伝子座の増幅産物分子量および height 値を比較した (表 3)。PV09-11 では、ボイル法および QIAGEN 法ともに、検出可能な 12 遺伝子座のうち 11 か所で、感染研実測値とほぼ一致する増幅産物が得られたが、O157-9 については両方法のテンプレートとも height 値が 50 前後で、増幅産物がほとんど確認されなかった。PV09-115 では、検出可能な 14 遺伝子座のうち 11 か所では感染研実測値とほぼ一致した結果であったが、O157-34、EH111-11、O157-10 の 3 か所では height 値が 56 から 228 であり、得られた増幅産物は感染研実測値に比べて極めて微量であった。

2 株のみの検討であるが、増幅が認められた遺伝子座では増幅産物の分子量あるいは height 値について QIAGEN 法とボイル法の

差がほとんど認められなかったことから、テンプレート調整法は PCR 反応に影響していないと推測された。

2. プライマー希釈液の比較

O111 1 株および O157 10 株について、滅菌水希釈および TE 希釈プライマーを用いた結果を比較したところ、TE 希釈プライマーでは十分な増幅産物量が得られない場合がみられた。すなわち、Mix 1 では、PV09-11

(O111) で O157-9 の height 値が 32 と低く、O157 については、O157-34 で 9 株、EH111-11 で 7 株の height 値が 137 以下であった。

遺伝子座ごとに各増幅産物の height 値の平均を比較すると (表 4)、Mix 1 の O157-9、O157-34 ならびに EH111-11 で滅菌水希釈に比べ、TE 希釈プライマーは有意に低値を示した (Student's t test ; 危険率 5%)。Mix 2 の O157-37 では滅菌水希釈で TE 希釈よりも有意に height 値の低下がみられたが、滅菌水希釈 height 値は 1075.5 ± 198.0 (平均 \pm S.D.) で、解析に十分な増幅産物量が得られていた。

これらの結果から、滅菌水希釈によるワーキングプライマーを用いることで、良好な MLVA 解析結果が得られることが明らかとなった。TE に含まれる EDTA のキレート作用が PCR 増幅に影響を与えることがこのような結果の一因であると考えられた。

3. PCR 反応液の検討

滅菌水希釈プライマーを用いた場合でも、height 値が 500 程度と十分な増幅産物が得られなかった O157-34、EH111-11、O157-10 に

ついて、Mix 3 (表 2) を用いて MLVA 解析を実施した (表 5)。その結果、O157-34、EH111-11 および O157-10 の平均 height 値 \pm S.D. は、それぞれ 2511.9 ± 695.2 、 2176.6 ± 449.1 、 1280.9 ± 231.5 で解析に十分な増幅産物量を得ることができた。

以上の結果から、これら 3 遺伝子座については、Mix 3 を使用して MLVA 解析することが必要であると考えられた。

D. 結論

新規 MLVA 法では 18 遺伝子座が標的とされ、血清型あるいは菌株により増幅されない (プライマーの標的となる配列が存在しない) 遺伝子座が含まれている。そのため、MLVA 解析に十分な標的遺伝子座の増幅産物が得られない場合、非検出と誤判定される危険性がある。このような誤判定を避けるため、最適なプロトコールの確立をめざして、テンプレート調整法、プライマー希釈法、PCR 反応液を検討した。

今回の検討から、テンプレート調整法は解析結果に影響を与えないが、ワーキングプライマーの希釈は滅菌水で行うべきであることが明らかとなった。さらに、Izumiya らの 2 組の Multiplex PCR 反応で十分な増幅が得られない O157-34、EH111-11、O157-10 については、別の PCR 反応液での増幅が有効であることが示された。一方、Mix 1 の EHC-5 および Mix 2 の EH26-7、EH111-14、EHC-6 については、非検出となった株が多かったことから、菌株数を増やしてさらに検討が必要であると考えられた。

MLVA 法は異なる実施機関でのデータ共

有が容易で、広域流行株を検出するうえで優れた疫学解析法である。本方法を有効に活用していくためには、どのような機器類を用いても正確かつ適切な解析を可能とするプロトコルの確立が必要不可欠である。次年度以降は、複数の機関と協力して最適なプロトコルの確立を目指していく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

Hyytia-Trees E., Smole S.C., Fields P.A., Swaminathan B., Ribot E. (2006) Second generation subtyping: A proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog. Dis.* 3: 118-131.

Izumiya H., Pei Y., Terajima J., Ohnishi M., Hayashi T., Iyoda S., Watanabe H. (2010) New system for multilocus variable-number tandem repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54: 569-577.

表 1 新規 MLVA 法の PCR 反応液組成

Mix 1		Mix 2	
プライマーなど	1反応あたりの 使用量 (μ l)	プライマーなど	1反応あたりの 使用量 (μ l)
DW	1.05	DW	2.05
QIAGEN Multiplex PCR mixture	6.25	QIAGEN Multiplex PCR mixture	6.25
O157-3F (2.5 μ M)	0.2	O157-10F (2.5 μ M)	0.2
O157-3R (2.5 μ M)	0.2	O157-10R (5 μ M)	0.2
O157-9F (2.5 μ M)	0.2	O157-17F (2.5 μ M)	0.2
O157-9R1(5 μ M)	0.2	O157-17R (2.5 μ M)	0.2
O157-9R (5 μ M)	0.2	O157-19F (2.5 μ M)	0.2
O157-25F (2.5 μ M)	0.2	O157-19R (2.5 μ M)	0.2
O157-25R (2.5 μ M)	0.2	O157-37F (2.5 μ M)	0.2
O157-34F (2.5 μ M)	0.2	O157-37R (2.5 μ M)	0.2
O157-34R (5 μ M)	0.2	O157-36F (2.5 μ M)	0.2
EH157-12F (2.5 μ M)	0.2	O157-36R (2.5 μ M)	0.2
EH157-12R (2.5 μ M)	0.2	EH26-7F (5 μ M)	0.2
EH111-11F (2.5 μ M)	0.2	EH26-7R (5 μ M)	0.2
EH111-11R (2.5 μ M)	0.2	EH111-14F (2.5 μ M)	0.2
EH111-8F (2.5 μ M)	0.2	EH111-14R (2.5 μ M)	0.2
EH111-8R (2.5 μ M)	0.2	EHC-6F (2.5 μ M)	0.2
EHC-1F (2.5 μ M)	0.2	EHC-6R (2.5 μ M)	0.2
EHC-1R (2.5 μ M)	0.2	テンプレート	1
EHC-2F (2.5 μ M)	0.2	計	12.5
EHC-2R (2.5 μ M)	0.2		
EHC-5F (2.5 μ M)	0.2		
EHC-5R (2.5 μ M)	0.2		
テンプレート	1		
計	12.5		

表 2 Mix 3 の PCR 反応液組成

プライマーなど	1反応あたりの 使用量 (μ l)
DW	4.05
QIAGEN Multiplex PCR mixture	6.25
O157-34F (2.5 μ M)	0.2
O157-34R (5 μ M)	0.2
EH111-11F (2.5 μ M)	0.2
EH111-11R (2.5 μ M)	0.2
O157-10F (2.5 μ M)	0.2
O157-10R (5 μ M)	0.2
テンプレート	1
計	12.5

表 3 テンプレート調整方法の比較

被検株	反応液	遺伝子座	QIAGEN法		ポイル法		感染研実測値	
			分子量	height値	分子量	height値	分子量	height値
PV09-11 (O111)	Mix1	O157-3	ND ^a	ND	ND	ND	ND	ND
		O157-9	520.65	47	520.83	52	520.83	3725
		O157-25	121.5	2576	121.51	1851	121.43	6667
		O157-34	190.2	324	190.16	560	189.96	9116
		EH157-12	329.25	3513	329.22	2134	329.19	7821
		EH111-11	433.81	369	433.73	359	433.51	8570
		EH111-8	252.62	239	252.63	273	252.65	4876
		EHC-1	110.88	2981	110.86	1944	111.66	9335
		EHC-2	228.89	6076	228.99	3713	229.06	9334
		EHC-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Mix2	O157-10	410.22	54	410.2	44	ND	ND
		O157-17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		O157-19	278.13	1315	279.2	1627	279.11	5061
		O157-37	117.5	2218	117.5	2390	117.28	3850
		O157-36	156.31	51	156.38	57	ND	ND
		EH26-7	348.91	39	ND	ND	ND	ND
		EH111-14	156.31	2636	156.38	2549	156.1	8395
		EHC-6	410.22	2287	410.29	2300	410.14	8843
	PV09-115 (O157)	Mix1	O157-3	362.35	2015	362.36	2366	362.85
O157-9			519.81	674	519.81	838	520.34	9397
O157-25			138.47	1913	138.38	2246	138.51	7280
O157-34			240.64	56	240.46	144	297.94	8867
EH157-12			320.18	2333	320.18	2895	320.5	7849
EH111-11			428.56	61	428.5	119	428.92	8449
EH111-8			170.56	1879	170.56	2317	170.73	7791
EHC-1			105.37	2499	105.46	2599	106.6	9269
EHC-2			240.55	3881	240.55	4679	240.61	9285
EHC-5			ND	ND	170.47	58	ND	ND
Mix2		O157-10	530.24	228	530.35	141	530.36	2774
		O157-17	136.58	1546	136.57	1270	136.61	9115
		O157-19	298.86	1415	298.86	1127	298.86	7897
		O157-37	117.56	1793	117.46	1569	117.49	6705
		O157-36	140.46	2556	140.46	1971	140.62	8801
		EH26-7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		EH111-14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		EHC-6	ND	ND	ND	ND	ND	ND

a ND: 非検出

表 4 プライマー希釈液の違いによる増幅産物 height 値の比較

反応液	遺伝子座 ^a	比較 菌株数 ^b	height値(平均±S.D.)	
			滅菌水希釈	TE希釈
Mix1	O157-3	10	3089.7 ±670.9	3054.1 ±858.4
	O157-9*	9	1784.1 ±967.1	420.4 ±247.1
	O157-25	11	2311.8 ±269.1	2478.3 ±259.0
	O157-34*	11	500.6 ±561.7	146.0 ±181.3
	EH157-12	11	4013.2 ±698.3	3850.5 ±647.9
	EH111-11*	11	673.7 ±280.4	174.3 ±109.4
	EH111-8	11	3882.5 ±824.4	3225.5 ±937.3
	EHC-1	11	3784.7 ±540.6	4215.8 ±513.2
	EHC-2	11	7048.9 ±866.6	6076.5 ±951.5
	EHC-5	2	1527.5 ±13.5	1135.0 ±188
Mix2	O157-10	10	434.1 ±88.9	367.0 ±117.6
	O157-17	10	2632.2 ±321.0	1959.1 ±211.4
	O157-19	11	1853.2 ±248.9	1697.4 ±221.3
	O157-37*	11	1075.5 ±198.0	2906.2 ±485.5
	O157-36	11	4300.7 ±442.6	3339.2 ±281.7
	EH26-7	0	ND ^c	ND
	EH111-14	1	2592.0	3757.0
	EHC-6	2	2288.5 ±200.5	1859.5 ±764.5

a *は滅菌水希釈とTE希釈で有意差が認められた(Student's t test;危険率5%)

b height値の比較が可能であった菌株数

c ND;非検出

表 5 Mix 3 による MLVA 解析結果

菌株番号	O157-34		EH111-11		O157-10	
	分子量	height値	分子量	height値	分子量	height値
PV09-11	190.27	3107	433.89	2607	ND	ND
PV09-115	297.91	3833	428.77	2959	530.42	1204
PV09-119	297.98	2211	428.81	2004	ND	ND
PV10-13	315.52	2498	428.74	1902	475.5	1451
PV10-15	297.85	3084	428.63	2421	493.74	1605
PV10-17	315.75	2386	428.66	2443	499.83	1425
PV10-18	315.83	2726	428.69	2169	500	1226
PV10-19	369.51	1826	428.63	1961	499.92	1293
PV10-20	315.77	1954	428.72	1575	499.91	961
PV10-21	315.72	2851	428.64	2532	499.92	1495
PV10-23	369.51	1155	428.77	1370	499.92	868

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

保育施設における腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例

研究協力者 小笠原 準、中村寛海 大阪市立環境科学研究所 調査研究課

研究要旨

平成 24 年 5 月、大阪市内の医療機関より腸管出血性大腸菌感染症発生の届出があった。調査の結果、園児 75 名、職員 15 名、家族 25 名、計 115 名（有症者 68 名、無症状病原体保有者 47 名）より腸管出血性大腸菌（EHEC）O26 VT1 が検出された。陽性者の陰性確認（治癒）後の再陽性者が 6 名（5.2%）あり、再陽性者から分離された EHEC O26 VT1 の薬剤感受性試験を行ったところ、調べた 12 薬剤（ABPC, CTX, GM, KM, SM, TC, CPF, NA, ST, AMPC/CVA, CP, FOM）全てに感受性であった。また、再陽性者およびその家族より分離された株のパルスフィールド電気泳動のパターンは一致し、治癒後の再感染と考えられた。

A. 事件の概要

平成 24 年 5 月 29 日、大阪市淀川区内の医療機関より保育園児 2 名（3 歳、5 歳）の腸管出血性大腸菌感染症（EHEC O26 VT1）発生の届出があった。更に同園には胃腸炎症状の園児が約 30 名いるとの情報を得て、北部生活衛生監視事務所及び淀川区保健福祉センターは、食中毒疑いとしての調査及び二次感染予防の防疫措置を講じるため、直ちに家族、保育園から聞き取り調査を行い、園児とその家族、職員を対象に検便を実施した。

当該保育園では園児 132 名（長期欠席者 1 名除く）、職員 27 名が同園で調理された給食を喫食しており、うち園児 18 名が 5 月 24 日から 5 月 27 日にかけて下痢、腹痛、発熱等の食中毒様症状を呈していることが確認された。6 月 1 日時点で、発症者 18 名の共通食は給食以外に

なく、その発症状況が類似していること、また、発症者らに非食餌性の感染を疑わせる事象がないこと、さらに、発症者 11 名及び調理従事者 2 名の便から EHEC O26 VT1 が検出されたことから、同保育園の厨房を原因施設とする食中毒と断定し、同保育園に対し 6 月 1 日から 2 日間の給食業務の停止を命じた。

B. 患者発生状況

当該保育園では、壁のないワンフロアでの異年齢保育が行われており、0 歳児を除く園児・職員は同一給食を摂取していることから、検便対象者を園全体に拡充し、最終的に園児 132 名、職員 32 名（系列保育園からの応援職員を含む）、感染者の家族 240 名の計 404 名に対して検便を実施した。培養検査にはラムノース・CT 加マッコンキー平板培地を使用し、増菌培

養は行わなかった。菌陽性者は園児 75 名、職員 15 名、家族 25 名の計 115 名(有症者 68 名、無症状病原体保有者 47 名)で、検便陽性者の割合は 3～5 歳児クラスが約 70～80%と多く、発症者は園児 3 歳児クラス以下が 80%以上と低年齢ほど多かった。

陽性者の陰性確認(治癒)後の再陽性者が 6 月 18 日から 7 月 7 日にかけて 6 名(5.2%)あった。再陽性者から分離された EHEC O26 VT1 の薬剤感受性試験を行ったところ、調べた 12 薬剤(ABPC, CTX, GM, KM, SM, TC, CPF, NA, ST, AMPC/CVA, CP, FOM)全てに感受性で、耐性化は認められなかった。また、再陽性者およびその家族より分離された株のパルスフィールド電気泳動のパターンは一致し(図)、治癒後の再感染と考えられた。陰性確認は 7 月 21 日で全て終了し、最初の発生届出から最終の陰性確認までに 53 日間を要した。

C. 考察

早期に給食による食中毒と断定し給食業務の停止を命じたこと、その後、給食業務の自粛、陽性者の陰性確認が終了するまでの登園不可、最終の陰性確認までプールの中止、有症状者の早期受診及び検便の実施、消毒の徹底等のまん延防止策を講じたことにより、終息することができた。今回の EHEC O26 VT1 集団感染に関しては、症状がいずれも軽く未受診者が多かつ

たことが発見の遅れにつながったと考えられる。また、有症の期間に登園していた者が 5 月 25・26 日に約 30 名いたことより非食餌性の二次感染が広がったため、保育園での日々の健康観察、「社会福祉施設等における感染症等発生時に係る報告について」(通知)の遵守の重要性を改めて考えさせられた。

二次感染の拡がりの観点でみると、園児と職員の接触者(給食を食べていない群)から 25 名の陽性者があり、そのうち父母の陽性者数は計 13 名で約半数を占め、かつ 1～3 歳児の発症者のいる世帯に限られていた。これはオムツ交換やトイレトレーニング時の排便処理等の感染予防策の不十分さから感染が広がった可能性が高いと考えられる。飲食物を介した感染以外に、園内及び家族内におけるヒトからヒトへの感染が関与しており、平常時を含めた二次感染防止策の徹底・予防の啓発が重要であることを示している。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし