表３　O146 の事例概要

菌株No.	血清型	発生月	年齢	菌株の由来	VT型	感染研　PFGE型
EH 12-3	O146:H21	2012.7	20才代	保菌者	VT1＋VT2	
EH 12-4			40才代			same as EH 12-3
EH 13-18		2013.9	60才代			two bands differ. from EH12-3

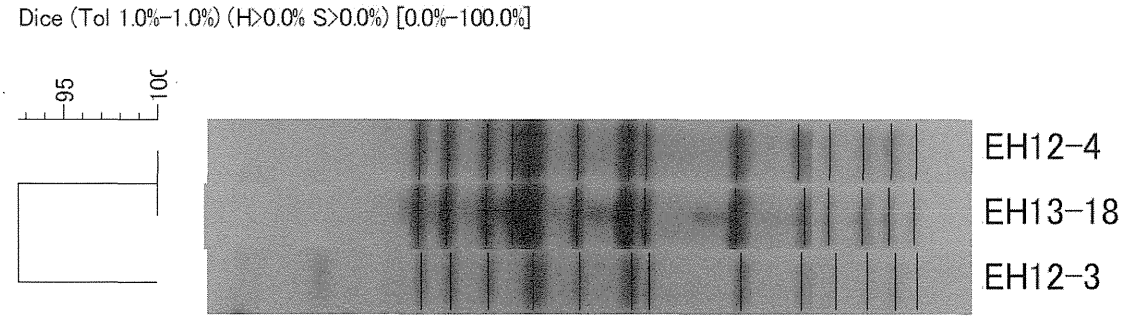

図３　O146　PFGE 法結果

表４　O159 毒素原性大腸菌事例概要

菌株No. (EH13-)	発生月	菌株の由来	毒素型	O抗原	H抗原
11	8月	有症者	ST	O159	H20
12		有症者			
13		有症者			
14		有症者			
15		有症者			
16		有症者			
17		有症者			
18		有症者			
37		従事者			
38		従事者			
39		従事者			
42		従事者			
44		従事者			
49		従事者			
50		従事者			
54		従事者			
55		従事者			

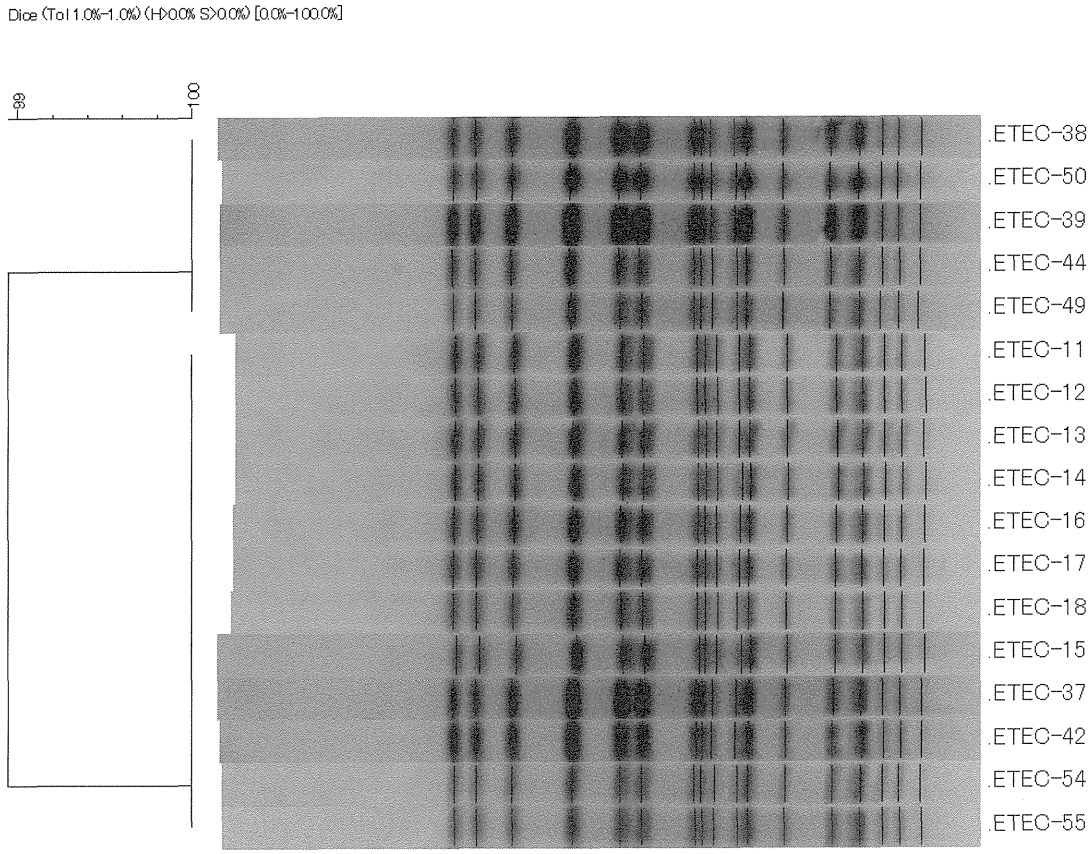

図４　O159　PFGE 法結果

香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例

研究協力者　香川県環境保健研究センター
福田千恵美　　岩下陽子　　有塚真弓　　内田順子

研究要旨

2013年10月に香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例について表現型別としてコアグラーゼ型別及びエンテロトキシン型別を遺伝子型別としてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行った。調査結果より従事者Bによる作業環境の汚染が疑われた。表現型別と遺伝子型別の疫学調査の結果は一致したが、表現型別は同じでも遺伝子型別では異なる場合があるので遺伝子型別でも確認する必要がある。

A. 研究目的

黄色ブドウ球菌による食品由来感染症の疫学調査の方法は、表現型別としてコアグラーゼ型別及びエンテロトキシン型別、遺伝子型別としてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)がある。2013年10月に香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例において表現型別と遺伝子型別の疫学調査を行い菌株間の関連性を検討した。

B. 研究方法

1．供試菌株

有症者便1検体、従事者便3検体、ふき取り10検体、使用水1検体及び食品残品2検体計17検体について食中毒菌検査を実施した。その結果、有症者便1検体、従事者便2検体、ふき取り2検体から分離された黄色ブドウ球菌5株を対象とした。

2．方法

(1) 表現型別分類

コアグラーゼ型別はブドウ球菌コアグラーゼ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)、エンテロトキシン型別はブドウ球菌エンテロトキシン検出用キットSET-RPLA「生研」(デンカ生研)を用いてそれぞれ分類した。

(2) 遺伝子型別分類

PFGEは滋賀県立衛生環境センターの方法[1)]を参考に実施した。

Trypticase Soy Broth で37℃一夜静置培養後、培養液を400μlマイクロチューブに採り12000rpm 2分遠心した。上清を捨て200μlの水に再浮遊させ、56℃に加温後、1%SeaKem Gold Agarose (TaKaRa) 200μl を混和しサンプラーキャスター0.7mmに流し込み室温で15～30分固化させた。

固化ブロックを 5mg/ml Lysozyme(和光)・20μg /ml Lysostaphine(和光) 加0.5M EDTA(pH8.0) 1ml で37℃一晩振盪。その後、1mg/ml Protennase K (Roche)、1%N-Laurovlsacosin(SIGMA) 、 0.5M EDTA 1mlに交換し50℃一晩振盪。

ブロックを取り出し、カバーグラスで4mm × 4.5mm にカットする。4mM Pefabloc(Roche)、TE Buffer(pH8.0) 500μl で50℃30分振盪を2回行い Protennase Kを不活化した。TE Buffer 1mlで氷上30分振盪で洗浄を 2 回繰り返し、A buffer 200μlに交換後、氷上30分振盪。制限酵素20U *Sma* I (Roche)、A buffer 100μl を加え37℃一晩振盪を行った。

プラグを取り出し、コムに貼付け乾燥しSeaKem Gold Agarose 1g を0.5×TBE

Buffer 100ml で加温溶解後、56℃に冷却しゲルを作成した。CHEF DRⅢ(Bio Rad)にて 0.5×TBE Buffer 14℃、電圧 6V /cm、パルスタイム 5.3～34.9sec、18 時間泳動。解析は FingerprintingⅡ(Bio Rad)で行った。

C. 研究結果

1．表現型別分類

コアグラーゼ型別及びエンテロトキシン型別の結果を表１に示す。菌株 No. ３以外はコアグラーゼ型Ⅳ、エンテロトキシン型 A, C であった。菌株 No. ３はコアグラーゼ型、エンテロトキシン型ともに不明であった。

2．遺伝子型別分類

PFGE による結果を図１に示す。菌株 No. ３以外は相同性が 100%であった。

D. 考　察

香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例において表現型別と遺伝子型別の疫学調査の結果は一致した。これにより従事者Ｂによる作業環境の汚染が疑われた。

今回は菌株数も余り多くなく表現型別と遺伝子型別に差異は無かったが、表現型別は同じでも遺伝子型別では異なることがあるので遺伝子型別でも確認する必要がある。

E　結論

1．香川県内で発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例において表現型別と遺伝子型別の疫学調査が一致した。

2．表現型別は同じでも遺伝子型別で確認する必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 研究代表者　渡辺治雄：食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究　平成 16 年度　総括・分担研究報告書，125-129

表1　表現型別による分類

菌株 No.	検体名	コアグラーゼ型別	エンテロトキシン型別
1	手洗い蛇口　拭き取り	Ⅳ	A,C
2	炊飯器持ち手　拭き取り	Ⅳ	A,C
3	従事者A	型不明	－
4	従事者B	Ⅳ	A,C
5	有症者	Ⅳ	A,C

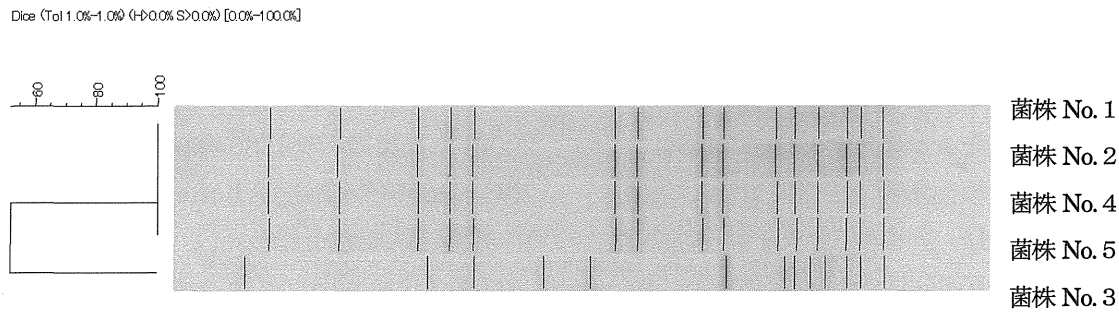

図１　黄色ブドウ球菌の PFGE　デンドログラム

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
仙波敬子　　木村千鶴子

研究要旨

2012 年 12 月から 2013 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、患者から分離された EHEC O157 3 株と 2010 年に愛媛県で分離された EHEC O157 14 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 法と MLVA は、PFGE と比較して迅速性、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 散発事例間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 による解析については、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、感染防止において有用であると考えられる。

A. 研究目的

2012 年 12 月から 2013 年に愛媛県内で発生した EHEC O157 3 株と 2010 年に愛媛県において分離された EHEC O157 14 株について IS コードが同じであるが PFGE パターンが異なる 3 事例について 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 12 月から 2013 年に愛媛県内で発生した EHEC O157 感染症 3 事例の患者から分離した 3 株を用いた。

また、PFGE、IS 法と MLVA の 3 法の比較には、2010 年に愛媛県で分離された EHEC O157 14 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 *Xba*I 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（25、3、34、9、17、19、36、37、10）について解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™600 LIZ ® Size Standerd,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（CPFX）、ナリジクス酸（NA）、セフォタキシム（CTX）、セフタジジム（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、発生状況を表 2 に示す。

2012 年 12 月から 2013 年に発生した事例は IS コード、PFGE ともに 2009 年以降愛媛県で一致した事例はなかった。事例№2 は患者が住所地の大阪市で発症後、愛媛県に帰省し届出があった。感染研の PFGE 解析結果において、2013 年 8 月に発生した東京都足立区、大阪府での散発事例由来株の示すパターンと一致していた。

薬剤感受性試験の結果、分離された 3 株のうち、事例№2 の 1 株は ABPC、CP、SM、TC、KM に耐性を示したが、他の事例では、12 薬剤に対して感受性を示した。

2. 3 法の比較について

2010 年の EHEC O157 発生事例について、事例概要、IS 法、MLVA、PFGE の解析結果を表 3 に示した。

事例№4 と№5 については、IS コードは同一であった。また、短期間に同一管内で発生した事例であり、IS コードと当所で実施した PFGE パターンは一致したが、感染研で実施した PFGE パターンは異なっており、疫学的な関連性は見出せなかった。なお、この IS コードは事例№3 の H25E072 株と *stx2*の有無によるバンド 1 本の違いであった。これらの 3 株の MLVA RN は、事例№3 の H25E072 株と事例№4 の H22E180 株および№5 の H22E212 株について、Locus9 が 1 リピートと Locus10 が異なった。事例№4 と事例№5 については、Locus10 が 1 リピートの違いであった。

事例№6 は、2010 年に愛媛県内の保育園において EHEC O157 による集団感染事例で、分子疫学調査の結果、IS コードの一致と PFGE パターンがいずれも 2 バンド以内の違いであったことから、同一株による集団感染事例であることが確認されている。また、本事例由来株は *stx2* 変異型（variant）である *stx2* 遺伝子を保有し、*stx2* 遺伝子に IS629（Insertion Sequence の一種）の挿入が認められ、VT2 の産生が

抑制された特異な EHEC 株であったことを報告している。[1)]

MLVA RN については、locus10 以外は、すべての菌株で一致していたが、locus10 ではリピート数 45 が 2 株、44 が 1 株、43 が 5 株、42 が 3 株、32 が 1 株であった。

D　考察

今年度 MLVA を実施した事例№3 と№4・5 では、locus9 において 1 リピート異なり、locus10 が数リピート異なっていた。locus10 については Hyper variable であり、他の locus より変異しやすい領域であることを考慮すると、事例№4 と№5 の 2 株は、遺伝構造が極めて類似し関連性が高いことが考えられる。事例№6 については、同一株由来の事例であったが locus10 のリピート数の違いにより、IS 法より詳細な解析結果が得られた。

これらのことから、迅速性、簡便性に優れている IS 法と IS 法よりも変異株に対しての識別能が優れている MLVA 法[2)]をスクリーニング検査として実施することで、散発発生事例を早期に探知し拡大を防ぐことへの利用が有効であると考えられる。

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。今後、IS 法に MLVA を加えることで短期間に発生した O157 感染事例の関連性の指標としてより有効に活用したい。また、PFGE タイプが同一である株でも、分離期間が長期に及ぶ場合は変異株が含まれていることがある[3)]場合や起源の異なる株が存在する[4)]ので、IS 法と MLVA を組み合わせることが望ましく、分離株の関連性は菌株の遺伝子学的解析結果のみならず、疫学解析結果を十分考慮することが重要と考える。

生食用食肉の規格基準設定や牛生レバー提供禁止に伴い、EHEC の発生件数は全国的に減少し、本県においても 2010 年 21 件、2011 年 16 件、2012 年 6 件と減少傾向を示している。2013 年は、EHEC O157 2 件の散発事例が発生し集団感染・家族内感染はなかった。

今後も、疫学解析結果を迅速に行政機関へ還元することにより、関係機関と連携しながら感染予防、感染防止対策に有効な手段を検討していきたい。

E　結論

1．2012 年 12 月から 2013 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。

2. MLVA は、PFGE と比較して迅速性、簡便性において優れており、散発事例間の関連性の指標に有用である。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 寺嶋　淳：厚生労働科学研究費補助金「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」平成 22 年度 総括・研究分担報告 (2011)

2) 寺嶋　淳：厚生労働科学研究費補助金「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」平成 20 年度 総括・分担研究報告書（2009）

3) IASR　Vol.33127-128：2012 年 5 月号

4) 寺嶋　淳：厚生労働科学研究費補助金「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由

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	CAGCCTCCTGCAAACTTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC
		Reverse		GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTC

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	患者分類	血清型	毒素型	ISコード	MLVA RN									PFGE 型[1]	病原因子	薬剤耐性	発生状況
							25	3	34	9	17	19	36	37	10				
1	H25E006	12/6	患者	O157:H7	VT1&2	305557-211757	5	9	10	12	6	6	6	5	47	h645	*eaeA*+	なし	散発
2	H25E063	8/4	患者	O157:HUT	VT1&2	615457-311656	2	17	8	12	11	7	4	7	26	i218	*eaeA*+	ABPC、CP SM、TC、KM	散発
3	H25E072	8/24	患者	O157:H7	VT1	317577-211755	5	8	10	11	7	6	6	6	51	i338	*eaeA*+	なし	散発

1)感染研で実施したPFGE型を記載

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

事例 No.	菌株 No.	発症日[1]	患者分類	血清型	毒素型[2]	ISコード	MLVA RN									PFGE 型[3]	PFGE 型[4]	発生状況
							25	3	34	9	17	19	36	37	10			
4	H22E180	2010/8/23	患者	O157:H7	VT1&2	317577-211757	3	17	9	14	8	6	8	8	33	10-04	f514	散発
5	H22E212	2010/8/20	患者	O157:H7	VT1&2	317577-211757	5	8	10	10	7	6	6	6	40	10-04	f173	散発
6	H22E213	2010/8/28	患者	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	44	10-06	f501	集団
	H22E217	2010/8/27	患者	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	43	10-07	f502	集団
	H22E236	2010/912	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	45	10-08	f500	集団
	H22E237	2010/9/13	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	43	10-06	f501	集団
	H22E238	2010/9/13	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	42	10-06	f501	集団
	H22E239	2010/9/13	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	42	10-06	f501	集団
	H22E240	2010/9/14	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	45	10-06	f501	集団
	H22E241	3010/9/17	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	32	10-09	f498	集団
	H22E242	2010/9/17	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	43	10-06	f501	集団
	H22E243	2010/9/18	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	43	10-06	f501	集団
	H22E244	2010/9/18	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	42	10-06	f499	集団
	H22E245	2010/9/24	無症状	O157:H7	VT1	305057-311457	2	13	7	8	4	8	14	7	43	10-06	f501	集団

1)患者分類が無症状の場合は、菌検出日を記載
2)RPLA法により確認
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

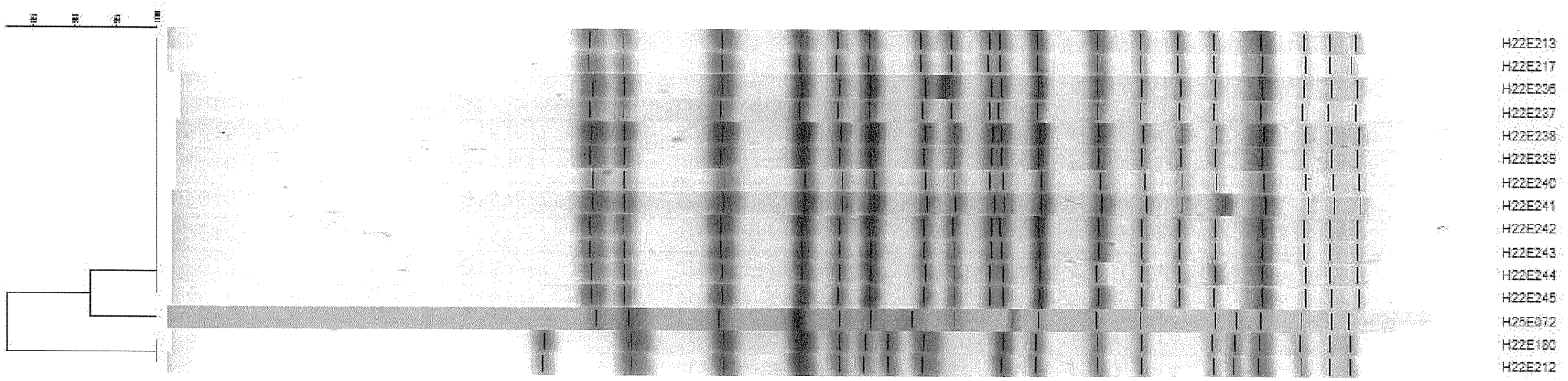
H22E213
H22E217
H22E236
H22E237
H22E238
H22E239
H22E240
H22E241
H22E242
H22E243
H22E244
H22E245
H25E072
H22E180
H22E212

図１　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）
「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」

平成25年度分担研究報告書

九州地区におけ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
—IS型別データベースの運用、EHEC検出状況及び集団発生事例の解析—

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所
研究分担者	世良暢之	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
	世戸伸一	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
	福司山郁恵	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
	黒木真理子	宮崎県衛生環境研究所
	濵田まどか	鹿児島県環境保健センター
	高良武俊	沖縄県衛生環境研究所
	村上光一	福岡県保健環境研究所
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	大石明	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所
	岡元冬樹	福岡県保健環境研究所

要旨

九州地区では、1. IS-printing System（以下、IS法とする）によるIS型別データベースの運用、2. 腸管出血性大腸菌（以下 EHECとする）検出状況の解析、3.EHECによる集団発生事例の集約、4. IS法の精度管理及び5.集団発生事例の詳細な解析の5項目について取り組んだ。本稿では、1. IS型別データベースの運用、2. EHEC検出状況の解析及び3.EHECによる集団発生事例の集約について、平成25年度の成果を報告する。4. IS法の精度管理については、研究協力者の江藤良樹から、別途報告する。5. 集団発生事例の詳細な解析については、それぞれの地方衛生研究所（以下、地衛研とする）から、(1) 同一保育園における腸管出血性大腸菌026の続発事例について（長崎県環境保健研究センター）、(2)長崎市で発生した黄色ブドウ球菌による集団感染事例（長崎市保健環境試験所）、(3)ナグビブリオ

食中毒事例に関する話題提供(大分県衛生環境研究センター) 及び(4)特定の地域において同時期に多発したEHEC(O157)感染症事例について(熊本県保健環境科学研究所) の4事例について、別途報告する。

九州地区における腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157EHEC とする) のIS型別の登録数は平成25年12月現在で956件 (平成22年度312件、平成23年度220件、平成24年度212件及び平成25年度212件) であり、毎年200件前後の登録で推移している。956株のO157EHECのIS型は217型に分類された、毎年登録数の多いIS型別があり、4年間で21株以上登録されたO157EHECのIS型別は10型 (4.6%) で、それに属する株は合計396株 (41.4%) であった。IS法の実施状況についてのアンケート集約の結果、12地衛研中6地衛研が全株について実施、4地衛研が一部の株について実施及び2地衛研が必要時のみ実施であった。九州地区で平成25年度に収集されたEHECは603株であった。その内訳は、O157EHECが216株、O26 EHECが174株、O111 EHECが89株、O103 EHECが54株、O121 EHECが20株、O91 EHECが10株、O145 EHECが7株、その他の血清型が19株及び血清型別不能が14株であった。九州地区は非O157EHECの占める比率が63.3%と全国の46.2%よりも高く、本研究でO157EHECに加えて非O157EHECの情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。平成25年度のO157EHEC及び 非O157EHECによる集団発生事例は27事例であった。その内訳は、O157EHECによるものが14事例で、そのうち9事例 (5事例 (家庭での発生事例)、2事例 (保育園及び家庭での発生事例)、1事例 (高齢者福祉施設での発生事例) 及び1事例 (バーベキュー関連事例)) が1地衛研から報告された。非O157EHECによるものは13事例で、O26EHECによるものが6事例、O103EHEC、O111EHEC及びO121 EHECによるものが各2事例、O26とO103による混合感染事例が1事例であった。であった。

A. 研究目的

食中毒や感染症等の緊急事例発生時には、科学的根拠に基づいた感染源及び感染経路を解明し、原因究明や拡大防止等の行政対応をすることが求められる。科学的根拠としては、有症者、調理従事者及び推定原因食品等から分離された病原細菌について、分子疫学的手法を用いて関連性を鑑別することが最も一般的である。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法として汎用されているパルスフィールド・ゲル電気泳動法（以下、PFGE 法とする）は、国立感染症研究所（以下、感染研とする）を中心に全国規模の PFGE 型別データベースの構築が進んでいる。九州地区では、従来からの PFGE 法と比較して操作が簡便で迅速性に優れ、デジタル結果が得られるといった特徴がある IS 型別データベースを構築し、菌株識別のためのデジタル情報の共有、流行菌株の探知及び監視等を目的に研究を実施している。また、EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例についても集約し、解析している。

B. 研究方法

IS法は、IS-printing system（東洋紡(株)）を用い、取扱い説明書に従って実施した。IS型別は、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）及び病原性関連遺伝子（stx_1、stx_2、*eae*及びEHEC-*hlyA*）の合計 36 種の遺伝子の検出の有無を 1 及び 0 の 2 進数で置き換えた後、10 進数に再変換した 11 桁の整数として数値化した。

EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例の集約については、メールを利用したエクセルデータ等のやりとりにより実施した。

C. 研究結果及び考察

1. IS 型別データベースの運用

ここでは平成 25 年 4 月から平成 25 年 12 月までの IS 型別の登録状況等について解析したものを報告する。

九州地区における 0157EHEC の IS 型別の登録数は平成 25 年 12 月現在で 956 件（平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 220 件、平成 24 年度 212 件及び平成 25 年度 212 件）であり、毎年 200 件前後の登録で推移している（表 1）。

平成 22～25 年度に登録された 956 株の 0157EHEC の IS 型は 217 型に分類された（表 2）。平成 22 年度以降、毎年登録数の多い IS 型別があり、4 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 10 型（4.6%）で、それに属する株は合計 396 株（41.4%）であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 69 株（7.2%）が 11 地衛研から、ついで「56643812046」が 61 株（6.4%）で 8 地衛研から、「30671622280」が 51 株（5.3%）で 9 地衛研から、「57733536074」が 49 株（5.1%）で 8 地衛研から、「27384601163」が 36 株（3.8%）で 9 地衛研から、「30653010185」が 30 株（3.1%）で 9 地衛研から、「66323217359」が 30 株（3.1%）で 6 地衛研から、「66457435083」が 27 株（2.8%）で 8 地衛研から、「66456318921」が 22 株（2.3%）で 8 地衛研から、「66455337865」が 21 株（2.2%）で 4 地衛研から、登録されている。また、4 年間で 20 株以下しか登録が無い 0157EHEC の IS

型別は 207 型（95.4%）で、それに属する株は合計 560 株（58.6%）で、その内訳は 11～20 株登録されている 0157EHEC の IS 型別が 11 型、6～10 株の登録が 13 型、5 株未満の登録が 183 型、そのうち 1 株だけ登録されている 0157EHEC の IS 型別が 110 型と最も多かった。

IS 法は操作が簡便で迅速性に優れた特徴を有する特徴を有する一方で、PFGE 型別が同一で IS 型別が異なる株等も報告されていることから、別途報告するような IS 法の精度管理等で解析能力の向上に努める必要がある。また、IS 法の迅速性が生かされているかどうかを推察するため、0157EHEC が分離されてから IS 型別がデータベースに登録されるまでの期間について検討した。その結果、図 1 に示すように 2 峰性を示した。1 峰目は 0157EHEC が分離後、迅速な行政判断が必要であったため、直ちに IS 法を実施し、IS 型別のデータベースに登録及び解析したものと推定された。2 峰目はある程度の 0157EHEC をまとめて処理することで IS 法を効率的に実施したためと推測された。これは IS 法の実施状況についてのアンケート集約の結果（表 3）、12 地衛研中 6 地衛研が全株について実施、4 地衛研が一部の株について実施及び 2 地衛研が必要時のみ実施であることから、IS 法の実施は、人的及び予算的問題、PFGE 法の実施等を考慮し、効率的な運用という観点から、各地衛研において判断され、実施されていると考えられた。

2. 九州地区での EHEC 検出状況

九州地区の地衛研における EHEC の各 0 群血清型毎の検出状況について解析した。

九州地区 12 地衛研にて平成 25 年 4 月から 12 月までに 603 株の EHEC 菌株が収集され（表 4）、その内訳は 0157EHEC が 216 株（35.8%）、非 0157EHEC が 373 株（61.9%）及び 0 群血清型別不能 EHEC が 14 株（2.3%）であった。非 0157EHEC は 14 種類の 0 群に型別され、その内訳は 026EHEC が 174 株（28.9%）、0111EHEC が 89 株（14.8%）、0103EHEC が 54 株（9.0%）、0121EHEC が 20 株（3.3%）、091EHEC が 10 株（1.7%）及び 0145EHEC が 7 株（1.2%）などの順であった。九州地区で収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC、0121EHEC、091EHEC 及び 0145EHEC などで、全体の 9 割を占めている。平成 25 年 4 月から 12 月に感染研の病原微生物検出情報に登録された EHEC は 1831 株でその内訳は、0157EHEC が 931 株（50.8%）、非 0157EHEC が 847 株（46.2%）及び 0 群血清型別不能 EHEC が 53 株（2.9%）であった。非 0157EHEC の内訳は、026 EHEC が 483 株（26.4%）、0111 EHEC が 123 株（6.7%）、0103 EHEC が 93 株（5.1%）、0121 EHEC が 86 株（4.7%）、0145 EHEC が 45 株（2.5%）及び 091 EHEC が 17 株（0.9%）であった。九州地区の傾向を全国と比較すると、非 0157EHEC の占める比率が九州地区は 63.3%と全国の 46.2%よりも高く、本研究で 0157EHEC に加えて非 0157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。

また、九州地区 12 地衛研にて平成 25 年 4 月から 12 月までに収集された 603 株の 0157EHEC 及び非 0157EHEC 菌株のうち、年齢が記載してあった 391 株についての男女

別の年齢構成をみたところ、表5に示すように、男女比は180人：211人で1：1.17と大きな開きは無かった。年齢構成は0～4歳が全体の 47.6%と全体のほぼ半分を占め、5～9歳が16.9とこれに次いでおり、この傾向は全国の傾向（病原微生物検出情報、34(5)、2013年5月）とほぼ同じであった。

3. EHECによる集団発生事例数

平成25年度のEHECによる集団発生事例は27事例であった（表6）。その内訳は、0157EHECによるものが14事例で、そのうち9事例（5事例（家庭での発生事例）、2事例（保育園及び家庭での発生事例）、1事例（高齢者福祉施設での発生事例）、1事例（バーベキュー関連事例））が1地衛研から報告されており、集団発生事例の地域的な発生と集中が認められた。非0157EHECによるものは13事例で、026EHECによるものが6事例、0103EHEC、0111EHEC及び0121 EHECによるものが各2事例、026と 0103 による混合感染事例が1事例であった。発生場所別に見ると、27 事例中 15 事例（55.6%）が保育園関連、8事例（29.7）が家庭、その他 4 事例（14.8%）が高齢者福祉施設や焼肉関連であった。集団発生事例は、保育所や高齢者福祉施設など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。これらの集団発生事例のうち、「同一保育園における腸管出血性大腸菌026の続発事例（長崎県環境保健研究センター）及び「特定の地域において同時期に多発した EHEC(0157)感染症事例（熊本県保健環境科学研究所）」については、別途、報告する。

D. 結論

九州地区における0157EHECのIS型別の登録数は毎年200件前後の登録で推移している。平成 22～25 年度に登録された 956 株の0157EHECのIS型別は217型に分類され、4年間で21株以上登録された0157EHECのIS型別は10型（4.6%）でそれに属する株は合計 396 株（41.4%）であった。最も多く登録されている0157EHECのIS型別は「66324257743」で 69 株（7.2%）が 11 地衛研から、登録されていた。

九州地区12地衛研にて平成25年4月から12月までに603株のEHEC菌株が収集され、0157EHECが216株(35.8%)、非0157EHECが 373 株（61.9%）及び0群血清型別不能EHECが14株（2.3%）であった。九州地区で収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC、0121EHEC、091EHEC 及び 0145EHEC などで、全体の 9 割を占めていた。

平成25年度のEHECによる集団発生事例は27事例であった。その内訳は0157EHECによるものが14事例、非0157EHECによるものが13事例で、026EHECによるものが6事例、0103EHEC、0111EHEC及び0121 EHECによるものが各2事例、026と0103による混合感染事例が1事例であった。発生場所別に見ると、保育所や高齢者福祉施設など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

E. 研究発表

1) 前田詠里子、村上光一、江藤良樹、市原祥子、大石明、濱﨑光宏、堀川和美、

麻生嶋七美、本田己喜子:Antimicrobial resistance and lineage of Shiga toxin-producing Escherichia coli 091 isolates from humans in Fukuoka Prefecture, Japan、28th International Congress of Chemotherapy and Infection（2013年6月、横浜）

2）江藤良樹、市原祥子、前田詠里子、平井晋一郎、横山栄二、世良暢之、堀川和美:福岡県で分離された腸管出血性大腸菌0157のclade解析と志賀毒素産生量の比較、第17回腸管出血性大腸菌感染症研究会（2013年7月、つくば市）

表1　九州地区の地衛研におけるIS型別の登録数

地衛研	IS型別の登録数				
	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
1	112	47	39	22	220
2	50	50	47	19	166
3	30	15	13	14	72
4	12	10	17	51	90
5	23	18	11	28	80
6	6	5	4	8	23
7	13	16	25	18	72
8	16	10	5	30	61
9	5	3	7	2	17
10	20	14	16	3	53
11	19	25	21	15	80
12	6	7	7	2	22
合計	312	220	212	212	956

表2　九州地区で登録されたIS型別の年度毎及び地衛研毎の内訳

No	IS型別	登録株数																合計
		登録年度				登録地衛研												
		22	23	24	25	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	66324257743	22	31	5	11	17	10	4	6	9		5	6	1	4	6	1	69
2	56643812046	31	14	3	13	19	17	7	3	6	2	6				1		61
3	30671622280	33	11	1	6	30	5	3		1	2	1		1	6	2		51
4	57733536074	3	15	23	8	13	11	1	11	4	4			1	4			49
5	27384601163	26	3		7	8	1	4		8	6		2	3	2	2		36
6	30653010185	9	3	5	13	4	2	3	2	7		1	7		3		1	30
7	66323217359	10	8	8	4	4	14	1	1			9				1		30
8	66457435083	6	2	9	10	9	4	3	1	1		2			3	4		27
9	66456318921		3	17	2	3	8	1		2	3		1	2		2		22
10	66455337865	19	2			12	4	3		2								21
11	23373797731	7	10		3	5	4	2	1	2	1		2		1	2		20
12	49010179019				20		1		19									20
13	66324257231			18		3	3					12						18
14	66324192207	3	4	10		4	7		1	1					4			17
15	57733470538		2	12	1	10	4					1						15
16	22081687688	12			1	4	3			3				2	1			13
17	66324192203		9	4		4	7								2			13
18	66458483659	8	2	1	2			2		2			7			2		13
19	66458417611		1	1	10								11			1		12
20	66307422923		11													11		11

表3　IS法の実施状況についてのアンケート集約（九州地区地衛研）

地衛研	IS法の実施状況			備考・要望
	全株について実施	一部の株のみ実施	必要時だけ実施	
1		○		
2	○			mupidで泳動できる株数が少ないので，もう一台ほしいです。
3		○（O157のみ）		疫学的に使用されたケースがほとんどなく（行政依頼もなく）、せっかく短時間でできる手法なので、上手に運用している自治体にその手法を教えていただきたいです。他にO157以外の血清型にも対応できるとありがたいです。
4	○			
5		○先行してPFGEを実施した際は、代表株のみ対応		食中毒の迅速対応を求められる際にIS-printingは有効と考えているが、対応事例がなかなか発生しない。 よって、菌株がある程度揃ったら定期的に実施している状況である。
6	○			
7	○			
8	○			
9			○	
10			○	
11		○		
12	○			

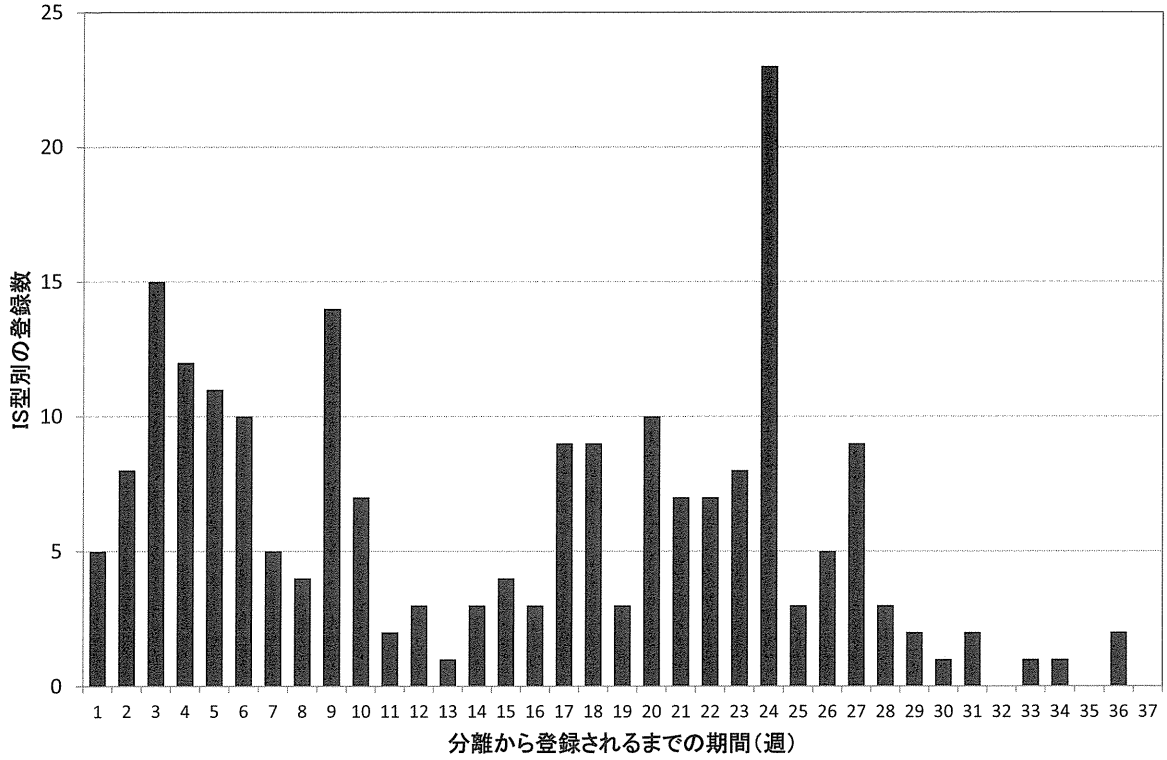

図１　0157EHECが分離されてからIS型別が登録されるまでの期間について

表4　平成25年度に九州地区の地衛研で収集された腸管出血性大腸菌

地衛研	血清型毎の腸管出血性大腸菌の分離菌株数																計
	O157	O26	O111	O103	O121	O91	O145	O146	O183	O115	O156	O136	O28	O128	O130	OUT	
1	22	43	1	4	1	5	2									2	80
2	21	9	81	12	4	3	2	2		1			1	1		2	139
3	14	2					1									1	18
4	52		3	1	9	1										2	68
5	26	25	2	2	1		1	2									59
6	8	1		1			1										11
7	19	7				1										1	28
8	30	35		4												1	70
9	2									1							3
10	4	41		24	3							2					74
11	15	8	2	6	2	0	0		4	1	3				1	2	44
12	3	3														3	9
合計	216	174	89	54	20	10	7	4	4	3	3	2	1	1	1	14	603

表5　EHEC患者の男女別年齢構成

年齢	患者数(人)			
	男	女	総計	
0	0	1	1	(0.2 %)
1	31	30	61	(15.0 %)
2	25	21	46	(11.3 %)
3	25	19	44	(10.8 %)
4	15	19	34	(8.4 %)
5	14	17	31	(7.6 %)
6	9	6	15	(3.7 %)
7	2	3	5	(1.2 %)
8	8	2	10	(2.5 %)
9	2	3	5	(1.2 %)
10～19	8	13	21	(5.2 %)
20～29	9	23	19	(4.7 %)
30～39	4	18	31	(7.6 %)
40～49	7	7	23	(5.7 %)
50～59	7	5	13	(3.2 %)
60～69	6	7	11	(2.7 %)
70～79	2	3	26	(6.4 %)
80～89	2	4	8	(2.0 %)
90～99	1	0	3	(0.7 %)
合計	177	201	407	(100 %)

表6　平成25年度に九州地区の地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

地衛研	O群血清型毎のEHEC集団発生事例									
	O157	（概要）	O26	（概要）	O103	（概要）	O111	（概要）	O121	（概要）
1	1	（高校食中毒疑い）	1	（保育園）						
2					1	（保育園）	1	（保育園）		
3	1	（Y県S市焼肉店成型肉レアステーキ）								
4	9	（家庭）×5、（保育園及び家庭）×2、（高齢者福祉施設）×1、（BBQ）×1					1	（家庭内）	2	（家庭内）×1、（保育園及び家庭）×1
5	1	（保育所）	2	（保育所）						
6	1	（家族内）								
7										
8	1	（保育園）	2	（保育園）						
9										
10			2	（保育園、1事例はO103との混合感染）	2	（保育園、1事例はO26との混合感染）				
11										
12										
合計	14		7		3		2		2	