

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、世良暢之
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	世戸伸一
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	福司山郁恵
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	黒木真理子
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	高良武俊

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。今年度は、昨年度までの精度管理で誤判定が少ない施設のプロトコルを参考に統一プロトコルを作成し、泳動像や判定への影響を調べた。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、統一プロトコルを作成していなかった昨年度と比較して、大幅に改善していた。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 2 試料中の 2 バンドで 2 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、統一プロトコルにおいて、1) 泳動時間の延長(90 分程度)、2) 泳動サンプルの濃度調整、もしくは、アプライ量の調整などを行うことを明記したことが考えられた。

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¹⁾。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。平成 23 度は、ISPS 標的領域に起きた挿入、または、欠失が原因で現れる「明瞭なエクストラバンド」が観察される、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。その結果、この「明瞭なエクストラバンド」を原因とする誤判定が多くみられていた。また、平成 24 年度は、再度、同じ試料を用い精度管理を実施したところ、正解率は大幅に改善したが、誤判定を無くすことはできなかった。そこで、今年度は、昨年度までの精度管理で誤判定が少なかった施設のプロトコルを参考に統一プロトコルを作成し、泳動像や判定への影響を調べた。

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、平成 23 年度、平成 24 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. 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)で記載した報告および電気泳動像をもとに、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 2 に示した。今回は、12 施設中 2 施設において、2 試料で 2 カ所の誤判定がみられた。前回は、12 施設中 10 施設において、16 カ所の誤判定がみられていたことから(表 3)、明らかな改善が見られた。また、前回は、「明瞭なエクストラバンド」を誤判定した施設が 5 施設みられていたが、今回は全くみられなかった。

D. 考察

今回の調査では、12 施設のうち 10 施設が全て正解して、昨年度の結果より大幅な改善が見られた。このことから、今回作成した統一プロトコルが誤判定の防止に効果があったと判断できた。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 分程度)、2) 泳動サンプルの濃度調整、もしくは、アプライ量の調整などを行った事が考えられた。

今回、不正解であった 2 施設のうち、1 施設は単純な入力ミスであったが、他の 1 施設は 2-09 のバンドが薄かったことから、増幅効率の低下が原因と考えられた(図 2 施設 12)。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。これらのバンドを正確に判定するには、各施設で良好な増幅が得られる条件を事前に検討しておく必要があると考えられた。

前回の検討において、1-03 や 1-16 付近に現れた「明瞭なエクストラバンド」による誤判定は、今回は見られなかった。これは統一プロトコルにより泳動時間を 90 分程度と定めたため、以前

より正確にバンドの判定ができるようになったためと考えられた。

今回作成した統一プロトコールでは2mm幅と6mm幅のコームについて記載をしたが、2mm幅のコームを使用すると泳動像がスメアとなる傾向がある(図2 施設2,4)。このことから、正確な判定を行う必要がある場合は、6mm幅のコームを使用する事が望ましいと考えられた。このことから、6mm幅のコームを使い、一度に多くの検体を処理するためには、泳動槽を2台以上準備する必要がある。

一部の施設に統一プロトコールの感想を聞いたところ、多くの施設からは統一プロトコールに

より電気泳動像が判定しやすくなったとの感想が聞かれた、一方で、アガロースゲルの使用量が増えたことからランニングコストが増加したという意見や、シャープな泳動像が得られず判定が難しくなったとの意見もあった(図2 施設5)。今後、これらの意見を取り入れ、統一プロトコールを改良を行いたい。

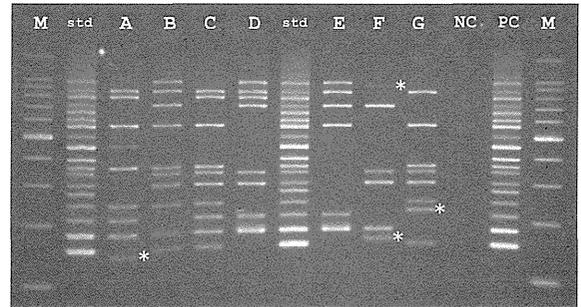
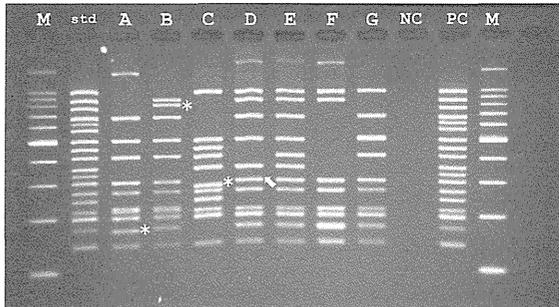
参考文献

- 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

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	1-18	1-19	1-20	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	stx1	
A	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
B	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
C	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	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	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	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	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	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	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
G	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	



* : 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

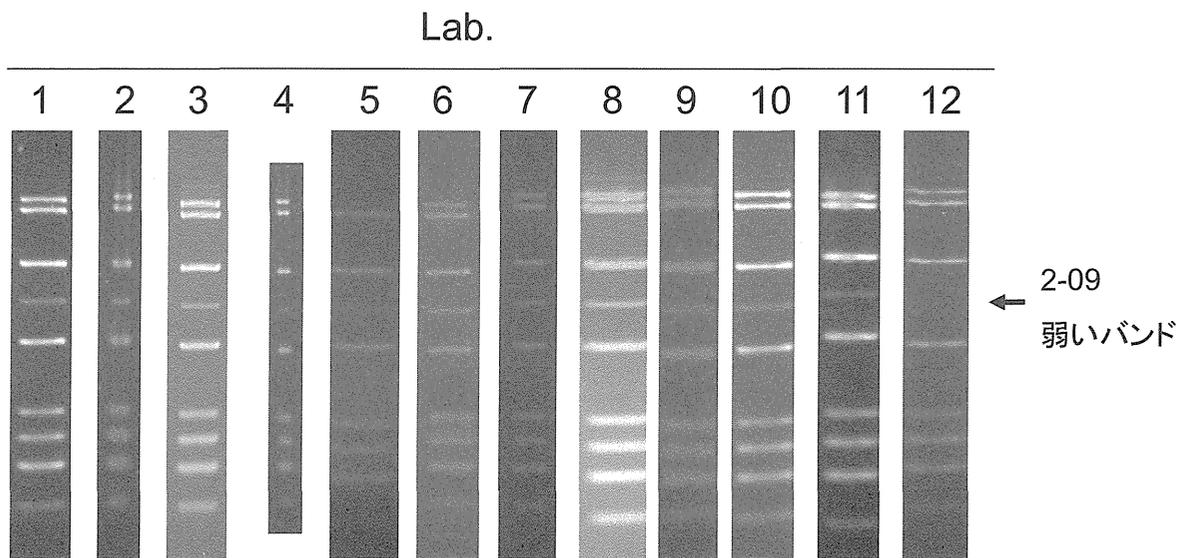


図2. 試料 A のアガロースゲル電気泳動像 (2nd primer set Mix)

表 2. 各施設の誤判定と正解率(今回)

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	2101A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
3	1404A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
4	2601A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
5	2101A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
6	2101A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
7	0651A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
8	2601A	—	—	—	—	2-01	—	—	6/7 (86%)
9	2601A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
10	05122J5	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
11	2601A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
12	2601A	2-09	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
各試料の正解率		11/12 (92%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	11/12 (92%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	

表 3. 各施設の誤判定と正解率(前回)

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%)	

* 明瞭なエクストラバンドを誤判定したものを示す

IS-printing では、数%の割合でエクストラバンドが見られます。エクストラバンドのほぼ全ては、ISが移動する際に生じるIS挿入部位前後の領域での欠損・挿入によるものです。これらによる判定の差を解消するために、電気泳動法マニュアルの試案を作成しました。

1. 用意する物

(ア) 電気泳動槽

① Mupid-exU (ADVANCE 社製)

(ア) TBE バッファー

(イ) 25mM NaOH

(ウ) 1M Tris-HCl(pH 7.0-8.0)

(エ) 必要に応じて用意する物

① 耐熱ゲルメーカーセット

1. ゲルメーカーセット EXU-HR (ADVANCE社製) *

*Mupid-exU に対応

② アガロースゲル溶解用容器

1. Bench Pint 250mL、又は、500ml (フナコシが販売)

<http://www.funakoshi.co.jp/contents/6740>



写真 Bench Pint 250 mL

2. サンプルの調製

(ア) アルカリ溶解法

- ① 大きさ 1 mm 程度の菌体を 50 μ l の 25 mM NaOH 水溶液に懸濁
 1. 検査に必要な場合、釣菌を先に行う。
 2. 1 コロニーを全てディスポーザブル白金耳で掻き取る。
- ② 95° C で 5 分間加熱
- ③ 4 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 7.0~8.0) を加えて中和する。
- ④ 12,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 1 μ l を PCR のテンプレートとする。

3. PCR 反応

PCR 反応は、サーマルサイクラーの温度条件の除き、試薬添付のマニュアルに従う。

サイクル条件 (1st set / 2nd set 共通)

96 °C · 2 min

↓

96 °C · 20 sec	} 20 cycles
62 °C* · 30 sec	
68 °C · 1 min	

Ramp rate (温度変化率) は、2 °C/sec 程度に設定する。

* 試薬添付のマニュアルではアニーリング温度が 64°C に設定されているが、1st set の上から 6 番目 (1-06) のバンドと 2nd set の上から 9 番目 (2-09) のバンドの増幅が弱いことから 62°C に変更した。アニーリング温度が 62°C でも 1-06 と 2-09 のバンドが薄い場合、また、*eae* と *hlyA* のバンドが薄い場合には、60°C で反応を行う。

4. 電気泳動 (1st set / 2nd set 共通)

(ア) 3% アガロースゲル電気泳動作成

ゲル作製のアガロースは NuSieve GTG : SeaKem GTG = 2 : 1 で使用する。

- ① ゲル 1 枚あたり以下の材料を容器*に入れ電子レンジで加熱する。

NuSieve GTG	2.0 g
SeaKem GTG	1.0 g
0.5× TBE	100 ml

*アガロースゲル溶解用容器 (Bench Pint 500 mL) を使用すると、加熱時の突沸が防げ、気圧がかかる為、きれいに溶ける。

- ② 沸騰したら電子レンジを止めて、溶液を軽く攪拌する。(火傷に注意)
- ③ 再度、電子レンジで沸騰するまで加熱する。
 1. 耐熱ゲルメーカーセットを使用しない場合は、45℃の温水中に放置し、50-60℃(手で触れるくらい)まで冷やす。室温で放熱しても構わない。
- ④ ゲルメーカーを水平な台に置き、コームをセットする。
 1. コームは6mm幅*を使用する。

*検体数が多い場合は、2mm幅を使用しても構わない。ただし、事前にPCR産物の希釈濃度の検討が必要。
 2. ゲルトレイはゲルトレイ大を使用する。
 3. 必要に応じて台の水平を水平器で確認する。

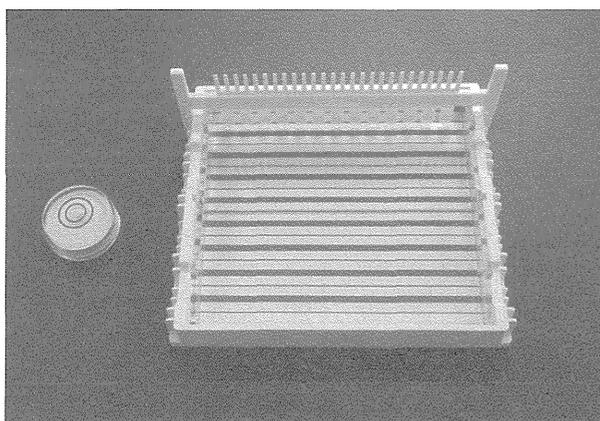


写真 ゲルトレイの組み立てと水平器

- ⑤ 溶解したアガロースゲルをゲルメーカーに流し込む。
 1. 耐熱ゲルメーカーセットを使用する場合には、沸騰直後のアガロースゲルを流し込んでも構わない。
 2. 流し込んだゲルの表面に泡や埃がある場合には、ピペットチップの先端でゲルの端に移動させる。

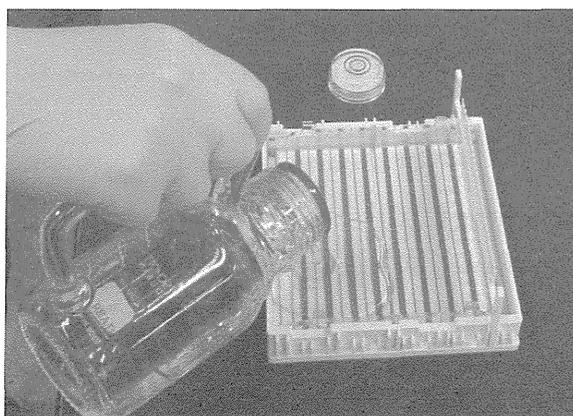


写真 ゲルトレイへのゲルの流し込み

- ⑥ 室温で 20～30 分間放置する。
 - 1. 気温が高い季節には、さらに氷上で 10 分間程度冷やす。
- ⑦ ゲルの上に 0.5×TBE を少量加えてから、コームをゆっくり引き抜く。
 - 1. 液体をかけておくとウェルに泡が入りにくくなります。

(イ) 電気泳動

- ① 電気泳動槽に 0.5×TBE を 300 ml 注ぐ。
- ② 作成したアガロースゲルをゲルトレイごとセットする。
 - 1. ゲルトレイの下に空気が入らないように注意してセットする。
- ③ アガロースゲルが泳動バッファーに浸かっている場合は、アガロースゲルが浸る程度に 0.5×TBE を追加する。
- ④ PCR 産物を 2-5 倍に蒸留水や 0.5×TBE で希釈する。
 - 1. 希釈する倍率は、施設にて検討を行って決定する。
 - 2. 試薬添付のマニュアル通りの方法で、非常に太いバンドであった施設は、希釈倍率 5 倍を推奨する。
- ⑤ 希釈した PCR 産物 5 μ l に 6×Loading Dye を 1 μ l 添加し、アプライする。
 - 1. PCR サンプル 4～5 レーン毎にマーカを設定する。
 - 2. サンプルが多い場合、26 本コームを使用することも可能。その場合は、ウェルへのアプライ量は 2 μ l とする。
- ⑥ 100V で 90–99 分間泳動を行う。
 - 1. 気温の低い冬には、時間を長く設定する。
- ⑦ エチジウムブロマイドで 20 分間染色を行う。
 - 1. 電気泳動に使用した 0.5×TBE もしくは精製水 300 ml に、2 μ g/ μ l のエチジウムブロマイドを 45 μ l 加え、染色液 (最終濃度: 0.3 μ g/ml) とする。
- ⑧ 精製水で脱色 20 分間
- ⑨ 精製水で脱色 20 分間
- ⑩ 装置で撮影する。

(ウ) 結果判定

- ① ポジティブコントロールのバンドが全て現れていることを確認する。
 - 1. 1st set の上から 6 番目 (1-06) のバンドと 2nd set の上から 9 番目 (2-09) のバンドの増幅が弱くなりやすいことから、特に注意する。
 - 2. *eae* と *hlyA* のバンドが薄い場合は、アニーリング温度をさらに 2°C 下げ 60°C とし、再検査を実施する。アニーリング温度が改善されない場合には、反応チューブやサーマルサイクラーを変更し、再検査する。

- ② サンプルの両端にあるマーカーのバンドに定規などを当てながら、バンドの判定を行う。もしくは、PCで電気泳動写真を開き、直線を引ながら判定を行う。

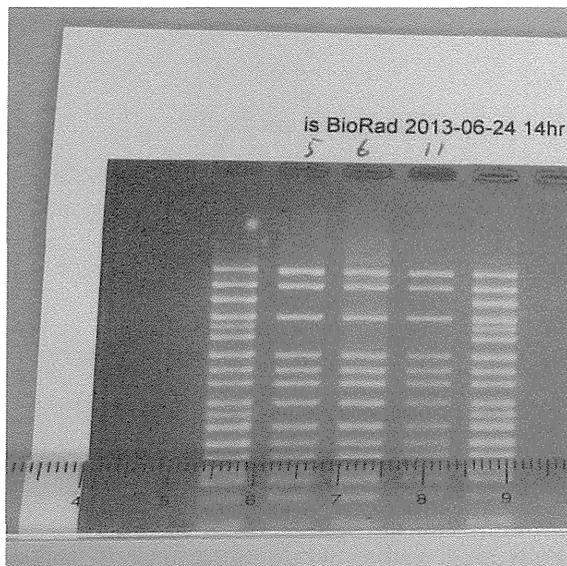


写真 定規を利用した判定方法

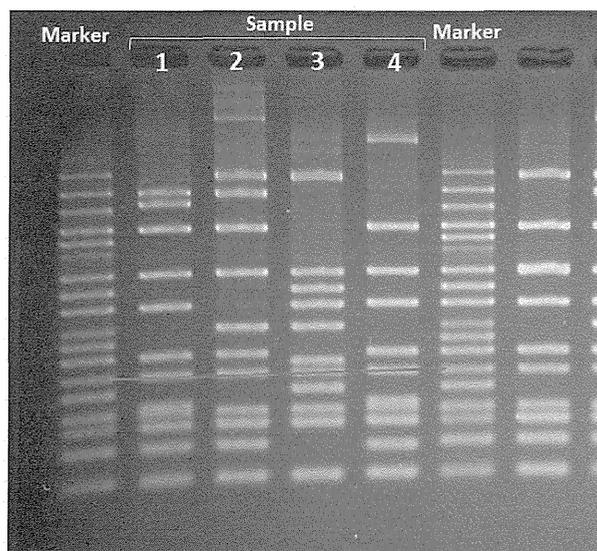


写真 Excelを使った判定方法の一例
図形で直線を画像上に描画した

お問い合わせ先

福岡県保健環境研究所
保健科学部病理細菌課
江藤 良樹

〒818-0135
福岡県太宰府市大字向佐野 39
TEL (092)921-9944
FAX (092)928-1203
Mail : etoh@fihes.pref.fukuoka.jp

同一保育園における腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 の続発事例について

長崎県環境保健研究センター 保健科
石原 雅行、西村 隼人、右田 雄二

要旨

2013 年 10 月下旬、長崎県内の A 保育園において 1 名の腸管出血性大腸菌 O26 患者が発生した。管轄保健所による全園児および職員を対象とした接触者調査の結果、74 名中 3 名から O26 が分離された。その後、事件は終息したと思われたが、12 月上旬に同保育園で新たに 1 名の O26 患者が発生した。再調査の結果、77 名中 4 名から O26 が分離された。このため、10 月および 12 月に分離された O26 (9 株)について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)法による制限酵素断片長多型 (RFLP)解析を実施した結果、これらの 2 事例は関連性が高いと推察された。

A.研究目的

同一保育園において O26 感染事例が続発したため、両事例の疫学的な関連を究明するために PFGE 法による分子疫学解析を実施した。

B.研究方法

10 月に O26 (4 株)、12 月に O26 (5 株)および O157 (2 株)が保健所からそれぞれ搬入された。これらの EHEC について毒素遺伝子型 (PCR 法)と H 血清型 (デンカ生研)を確認した後、制限酵素 *Xba* I 消化による PFGE 法を実施した。解析条件は九州ブロックマニュアル¹⁾に従った。O157 については、IS-printing system (ISPS) ver. 2 (東洋紡)による解析も併せて実施した。

C.研究結果

供試された EHEC のうち、O26 (9 株)はいずれも O26: H11, Stx 1 産生株、O157 (2 株)は O157: H-, Stx 1 産生株で同じ表現型であることが確認された。PFGE 法による RFLP 解析の結果 (図)において、10 月および 12 月に分離された O26 は泳動パターンが全て一致した。12 月のみ O26 と同時に検出された O157 については 1 バンド違いであった (白矢頭)。ISPS では locus L16 (Sp 13 prophage)の 1 ヶ所に欠失を認めた (IS コードは No. 10; 49278548931 および No. 11; 49278614467)。

D.考察

Tenover²⁾の判断基準によると、泳動パターンが一致する場合は「区別できな

い」、2~3 バンド異なる場合は「極めて関連あり」と解釈されることから、10月と12月に分離されたO26は関連性が高いと推察される。また、保健所による10月の調査で園児が当該保育園近くの牛舎を度々訪れていたことが判明したため、保育園に対して牛舎に近付かないよう指導がなされていた。しかしながら、10月から12月にかけてO26感染が続発したことに加え、12月には2つの血清型が園児および家族から分離されたため、感染源を特定するには牛舎を含む園児の周辺環境

を調査する必要があると考えられる。

F.参考文献

- 1) 堀川 和美 他 (2003): 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 15 年度総括・分担研究報告書, 154-163.
- 2) Tenover, F.C. et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233-2239

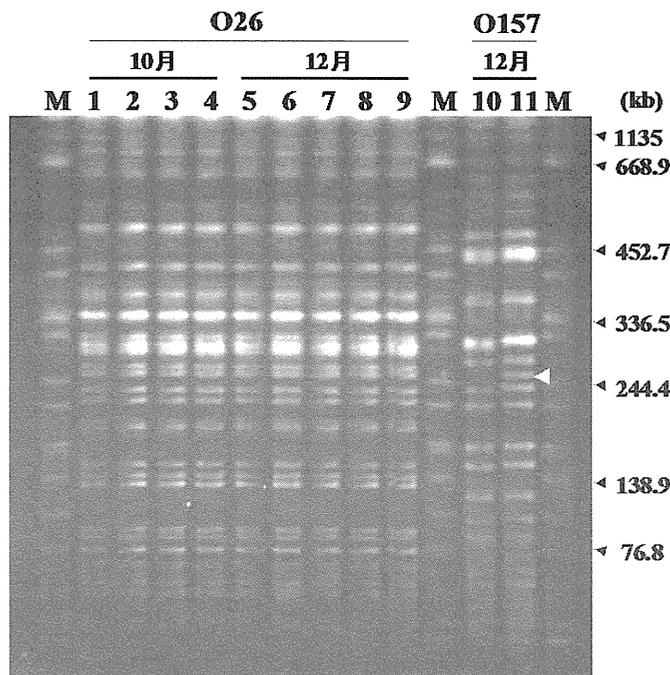


図 PFGE 法 (*Xba* I 消化)による O26 および O157 分離株の RFLP 解析結果

レーン 1: 初発園児 (10月), レーン 2~4: 園児 (10月),
 レーン 5: 初発園児 (12月), レーン 6: No. 5 の弟,
 レーン 7~8: 園児 (12月), レーン 9: No. 8 の母,
 レーン 10: 園児 (12月), レーン 11: No. 10 の父,
 M: マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812)

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

江原裕子、植木信介、貞光恵子、森本コヤノ、島崎裕子、飯田國洋

長崎市保健所生活衛生課

尾田千恵子、山口洋子、平山満

要旨

2013 年 8 月、全国高等学校総合文化祭(総文祭)の会場であるAホールにおいて、黄色ブドウ球菌による集団食中毒が発生した。B弁当店から提供された弁当を喫食した 337 人中 34 人が発症しており 20 名の高校生が救急搬送された。検出された黄色ブドウ球菌はエンテロトキシンA型、コアグラゼVII型であり、検食や弁当残品、調理従事者から同菌が検出されたことにより、Aホールで喫食されたスタッフ用弁当が原因と特定された。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も実施した。

A. 事件概要

2013 年 8 月 4 日 16 時 20 分、長崎市消防局から、総文祭の参加者のうち嘔吐等の症状を呈した 20 名を医療機関に搬送しているとの連絡が、保健所にあった。

Aホールで総文祭スタッフ用弁当を喫食した337名中34人の高校生が嘔吐・下痢・腹痛等の症状を呈しており、その多くが喫食後6時間以内に発症していた。有症者7人の便及び4人の嘔吐物、消防職員から搬入された嘔吐物(氏名不明)11件の食中毒菌検査を実施し、黄色ブドウ球菌(エンテロトキシンA)を検出した。弁当を提供したB弁当店の従業員の便、手指ふきとり、B弁当店調理場のふきとり、弁当店に保管されていた検食、Aホールに配達されていた未開封弁当の検査を実施し、感染

源について原因究明を行った。

B. 検査方法

1. 分離培養検査

糞便は 0.5%塩化ナトリウム加 1%ペプトン水で10倍希釈して試料とし、卵黄加マンニット食塩培地で 35°C48 時間培養した。検出された黄色ブドウ球菌については、PSラテックス(栄研)で確認検査を実施した。

また、検食・施設ふきとり・手指ふきとりからの分離については、直接培養に加えて、7.5%塩化ナトリウム加ペプトンで増菌培養を行い、一部増菌培地からは、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の直接検索も行った。

2. エンテロトキシン型別試験

エンテロトキシン型別は、RPLA法とPCR法で行った。RPLA法はSET-RPLA(デンカ)を

使用し、PCR法はPrimerSet(タカラ)を使用し、添付説明書に従って実施した。

3. コアグララーゼ型別試験

コアグララーゼ型別試験には、ブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清(デンカ)を使用した。

4. PFGEによる遺伝子解析

TSBで培養後、1000 μ lの培養液を採り、PettIV solutionで3回洗浄後、PettIV400 μ lを添加した。1%SeakemGold agarose100 μ lに調整菌液100 μ lを加えて、アガロースブロックを作成した。Achromopeptidase4mg/mlとLysostaphine40U/mlで溶菌し、制限酵素Sma Iを使用した。電圧6.0V/cm、Initial5.3、Final34.9、19時間の条件で泳動した。

C. 検査結果

有症者便及び嘔吐物、調理従事者便及び手指ふきとり、検食、Aホールに残されていた未開封弁当のうち26検体から、黄色ブドウ球菌(エンテロトキシンA型)が検出された。卵黄加マンニット食塩培地で、濃い黄色と薄い黄色の明確に色調が異なるコロニーが確認できた。両者とも黄色ブドウ球菌の性状を示したが、薄い黄色のコロニーのみがエンテロトキシンA産生であった。

弁当提供日8月4日の調理従事者の検便・手指ふきとりからは検出できなかったが、前日夜に野菜の仕込みを行った従業員1人の便と2人の手指のふきとりから黄色ブドウ球菌(エンテロトキシンA型)を検出した。

多くの患者を出した8月4日のスタッフ用弁当(検食)からは、すべての総菜から黄色ブドウ球菌が検出され、そのうちエンテロトキシンAが検出されたものが3検体あった。また、Aホールに残っていたスタッフ用弁当(未開封残品)からは、4検体の黄色ブドウ球菌(エンテロ

トキシンA)が検出され、菌量も 10^5 cfu/g以上のものが2検体あった。(表1)

エンテロトキシンA産生黄色ブドウ球菌の26検体のうち、13検体についてコアグララーゼ型別を実施したところ、すべてコアグララーゼVII型であった。

患者2件(嘔吐物1、便1)、従業員便1件、従業員手指ふきとり2件、未開封残品2件、検食2件について、PFGEを実施したが、すべて同一パターンを示した。(写真1)

D. 結論

本事例では、卵黄加マンニット食塩培地での黄色ブドウ球菌は2種類混在しており、エンテロトキシンを産生する菌株の選択には慎重を要した。

有症者及び検食、未開封の弁当残品、調理従事者より分離された黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシンA型、コアグララーゼVII型であった。PFGEによる遺伝子解析も一致しており、B弁当店の弁当による黄色ブドウ球菌食中毒であると特定した。

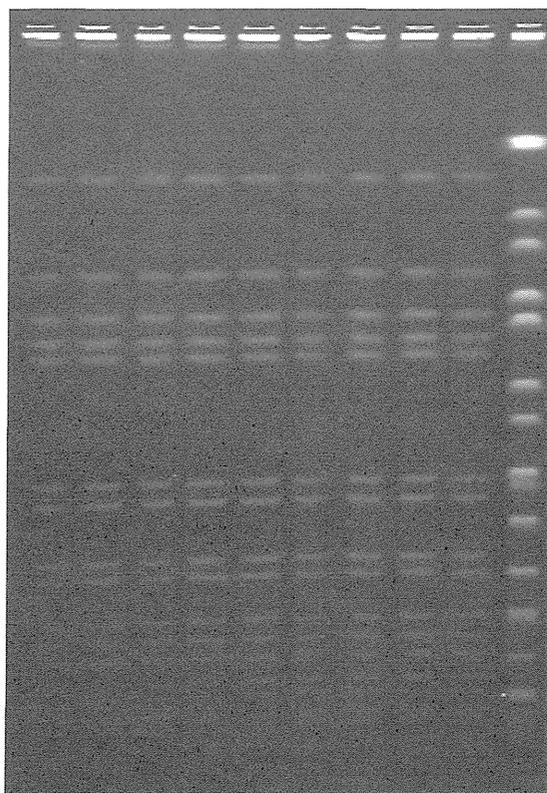
検食の検査結果から、事件当日だけではなく、数日前から継続的な汚染があったことが示された。また、原因となった8月4日のスタッフ用弁当の検食と未開封残品の黄色ブドウ球菌の菌量を比較すると、喫食するまでの不適切な保管が菌量を大幅に増加させたことが推察された。

(表 1) 食品からの黄色ブドウ球菌の検出状況

弁当提供日	献立	菌量 cfu/g	エンテロトキシン検査
8/2 弁当 (検食)	甘鯛のすりみ揚げ	100 未満 (増菌培養で+)	陰性
	シュウマイ	100 未満 (増菌培養で+)	陰性
	なます	100 未満 (増菌培養で+)	陰性
	はるまき	100	陰性
8/3 弁当 (検食)	ワカメの酢の物	800	陰性
	揚げ物*	100 未満 (増菌培養で+)	エンテロトキシンA
8/4 スタッフ用弁当 (検食)	和風チャーハン	100	陰性
	あじしそ巻きフライ	100	エンテロトキシンA
	麺類*	100	エンテロトキシンA
	ポテトサラダ	1500	陰性
	玉子焼き	100	陰性
	夏野菜サラダ	100	陰性
	フルーツカクテル	300	エンテロトキシンA
8/4 スタッフ用弁当 (未開封残品)	和風チャーハン	100,000 以上	エンテロトキシンA
	あじしそ巻きフライ	陰性	
	麺類*	1000~10000	エンテロトキシンA
	ポテトサラダ	陰性	
	玉子焼き*	100,000 以上	エンテロトキシンA
	夏野菜サラダ	100~1000	エンテロトキシンA
	フルーツカクテル	陰性	

*PFGEを実施した検体

(写真 1) 黄色ブドウ球菌PFGE



- 1 有症者(嘔吐物)
 - 2 有症者(便)
 - 3 調理従事者C(便)
 - 4 調理従事者D(手指ふきとり)
 - 5 調理従事者C(手指ふきとり)
 - 6 8/4 スタッフ用弁当(未開封残品) 麺類
 - 7 8/4 スタッフ用弁当(未開封残品) 玉子焼き
 - 8 8/3 弁当(検食) 揚げ物
 - 9 8/4 弁当(検食) 麺類
- M S BraenderupH9812

泳動条件

6.0V/cm Intial5.3 Final34.9 19時間

制限酵素 Sma I

1 2 3 4 5 6 7 8 9 M

ナグビブリオによる食中毒事例について

研究協力者 大分県衛生環境研究センター

緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志

要旨

2013年9月、同年10月と大分県の県北地域において、ナグビブリオによる食中毒事例が続発した。患者便と検食および未開封製品から当該菌が検出されたため、*Vibrio cholerae* 血清型や遺伝子型の詳細について、国立感染症研究所に解析を依頼し、患者便由来株と食品由来株の一部について血清型、PFGE 泳動パターンが一致し、ナグビブリオによる食中毒と断定された。

A. 事例の概要

【事例1】2013年9月17日9時15分、大分県 K 市内の医療機関から敬老会の仕出し弁当を食べた人が下痢などの食中毒様症状を呈している旨の届出があり、管轄保健所が直ちに調査を開始した。調査の結果、9月15日、16日に開催された敬老会において11地区で提供された仕出し弁当750食を、一部の人宅へ持ち帰り、計846名が摂食し、そのうち396名が下痢、腹痛などの食中毒様症状を呈していることが判明した。潜伏時間は6時間から48時間、平均26.6時間であった。患者便7検体中6検体から *Vibrio cholerae* が検出され、生化学的性状から *V. cholerae* と同定された分離株について、コレラ菌免疫血清 O1 混合血清、ビブリオコレラ免疫血清 O139 “Bengal” の凝集反応を実施したが、ともに凝集は認められず、CT 遺伝子も保有していなかった。したがって、*V. cholera non O1&non O139* (以下、ナグビブリオ) による食中毒と判断された。患者便の検査結果を受け、直ちに検食(残品の仕出し弁当)について、*V. cholerae* の汚染状況の調査を開始し、ニシ貝からナグビブリオが検出された。

【事例2】製品回収後の2013年10月17日、大分県 BT 市の葬儀社の責任者から、葬儀の食事で体調不良者が数名いる旨、管轄保健所に相談があった。管轄保健所による調査の結果、10月14日の葬儀に参列し、食事をした49名中32名が腹痛や下痢などの食中毒様症状を呈していることが判明した。提供された食事は、葬儀社から A 仕出し屋に外注されたもので、先に K 市内で発生した食中毒事件と同じニシ貝スライス(別ロット)が提供されていた。患者便7検体中2検体からナグビブリオが、3検体から EAggEC 86a, EAggEC OUT が、1検体から ETEC O27(ST)が検出された。今回の事例においては、患者便から ETEC、EAggEC も検出されたため、未開封のニシ貝スライスについて *V. cholerae* に併せて同菌も対象として検査を実施し、未開封のニシ貝スライスからナグビブリオ(110~3600cfu/100g)が検出され、菌分離には至らなかったものの ETEC ST 遺伝子、EPEC *eae* 遺伝子が確認された。

B. 方法

1. 検査方法

患者便については定法に従い、下痢起因

菌の検索を実施した。TCBS 寒天平板上に *V. cholerae* 様発育を認めたため、増菌培養液から *V. cholerae* (表 1) およびコレラ菌関連遺伝子 (O1、O139、CT) のマルチプレックス PCR スクリーニング (表 2) を実施した。その結果、*V. cholerae* の特異的な遺伝子の保有は確認されたが、O1、O139、CT 遺伝子の保有は認められなかった。本事例において分離された *V. cholerae* の特徴として、TCBS 寒天平板上には白糖分解の 2mm 程度大の黄色コロニーを形成するものの、クロモアガービブリオ寒天平板の 20 時間培養では、*V. cholerae* に特徴的な「青みどり」の発色が認められず、*V. cholerae* ではないと誤判断されるような発育状況であった。

食品については、*V. cholerae* 以外の好塩菌の増殖を抑制するために、低い NaCl 濃度のアルカリペプトン水で一次増菌後、短い培養時間で二次増菌への植え継ぎするなど選択増菌への工夫を行った。すなわち、0.2%NaCl 加アルカリペプトン水で 36°C 18 時間培養後、1 白金耳を 0.25%NaCl 加アルカリペプトン水に接種し、36°C 8 時間培養後、選択分離培地に塗抹培養した (図 1)。

2. 血清型別および遺伝子型

患者便とニシ貝から検出された菌株について、血清型や遺伝子型などの詳細な検査は国立感染症研究所 (以下、感染研) に依頼した。

C. 検査結果

事例 1 においては、患者便 7 検体中 6 検体から *Vibrio cholerae* が検出され、うち 1 検体は、同時に *Salmonella* Mbandaka (O7:z₁₀:e,n,z₁₅) が検出された。同検体については菌分離には至らなかったものの毒

素原性大腸菌 (以下、EPEC) ST 遺伝子の存在も確認された。増菌培養液から *V. cholerae* およびコレラ菌関連遺伝子 (O1、O139、CT) のマルチプレックス PCR スクリーニングを実施した結果、*V. cholerae* の特異的な遺伝子の保有は確認されたが、O1、O139、CT 遺伝子の保有は認められなかった。確認ため、生化学的性状から *V. cholerae* と同定された分離株について、コレラ菌免疫血清 O1 混合血清、ビブリオコレラ免疫血清 O139 “Bengal” の凝集反応を実施したが、ともに凝集は認められず、CT 遺伝子も保有していなかった。食品検査については、ニシ貝のみから *V. cholerae* が検出され、患者便から検出された当該菌と同様、コレラ菌免疫血清 O1 混合血清、ビブリオコレラ免疫血清 O139 “Bengal” の凝集は認められず、CT 遺伝子も保有していなかった。

患者便由来株は *V. cholerae* O144、ニシ貝由来株は *V. cholerae* O49、OUT と判明し、遺伝子型もそれぞれに異なっていた。しかし、その後、仕出し屋に冷凍保管されていた同一ロットのニシ貝スライスの検査を実施した結果、*V. cholerae* が検出され、ナグビブリオと同定されたため、感染研に菌株を追加送付した結果、送付菌株のうち、数株が患者便由来株と同じ血清型 *V. cholerae* O144 で、遺伝子型も同一パターンを示した。

事例 2 においては、患者便 7 検体中 2 検体からナグビブリオが、3 検体から EAggEC 86a、EAggEC OUT が、1 検体から ETEC O27(ST) が検出された。今回の事例においては、患者便から ETEC、EAggEC も検出されたため、未開封のニシ貝スライスについて *V. cholerae* と併せて同菌も対象として検査を実施し、未開封のニシ貝スライスからナグビブリオ (110 ~

3600cfu/100g) が検出され、菌分離には至らなかったものの ETEC ST 遺伝子、EPEC *eae* 遺伝子が確認された。ニシ貝スライスの汚染状況の把握のために一般細菌数および大腸菌群数、大腸菌数の測定を行った結果、一般細菌数が $3.3 \sim 5.1 \times 10^8$ cfu/g、大腸菌群数が $1.2 \sim 2.1 \times 10^7$ cfu/g、推定大腸菌数 $5.0 \sim 5.5 \times 10^6$ cfu/g であった。

前回の事例と本事例との関連の精査するため、患者便およびニシ貝スライスから検出されたナグビブリオを感染研に送付した結果、患者便由来株は血清型 *V. cholerae* O144、ニシ貝スライス由来株の数株が同じ血清型 *V. cholerae* O144 であり、遺伝子型も同一パターンを示した。

D. 結論

事例 1 の検査結果を受け、ニシ貝を原因食品とするナグビブリオによる食中毒事件として報告され、また、他県においても、

同時期に同ニシ貝スライスの加工品を摂食したことによるナグビブリオ食中毒事件が発生していることが判明したため、同一ロット製品は回収されることとなった。しかし、事例 2 は回収漏れの製品から食中毒事故が起きており、ロット管理の曖昧さが指摘された。

ニシ貝スライスの原材料となったニシ貝はメキシコ産で、産地工場にてむきみの状態から内臓を除去、水洗しブランチング後、包装、凍結、梱包されていた。ニシ貝仕入れ後、「ニシ貝スライス」への加工段階での加熱不足や消毒不十分により、除去できなかった病原菌が味付け加工段階、輸送流通時や提供時の温度管理の不備により、発症菌量にまで増殖したと考えられる。いわゆる冷凍食品ではない、冷凍で流通する食品には規格基準がない。今後、冷凍で流通する食品の安全確保に向けた取り組みの必要性を感じた。

表 1. *V. cholerae*の特異的遺伝子

プライマー	標的遺伝子	塩基配列 (5'–3')	増幅される断片のサイズ(bp)
VCatpA-F VCatpA-R	<i>atpA</i>	AATGGGTCCATACGCGGAT TGGTGAAGTYTGTTTTGCACC	160bp

表 2. コレラ菌関連遺伝子 (O1 および O139 特異遺伝子, コレラ毒素遺伝子)

プライマー	標的遺伝子	塩基配列 (5'–3')	増幅される断片のサイズ(bp)
O1-up O1-down	O1	GTTTCACTGAACAGATGGG GGTCATCTGTAAGTACAAC	192bp
O139-up O139-down	O139	AGCCTCTTTATTACGGGTGG GTCAAACCCGATCGTAAAGG	449bp
CT-up CT-down	CT	ACAGAGTGAGTACTTTGACC ATACCATCCATATATTTGGGAG	308bp