

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
平成 27 年度分担研究報告書

堺市内保育施設における無症状病原体保有者を主とした
腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) 感染症の集団発生事例

研究協力者 下迫純子、福田弘美、岩崎直昭 堺市衛生研究所
横田正春、杉本光伸、小林和夫 堺市衛生研究所

研究要旨

平成 27(2015)年 1 月末に端を発した大阪府堺市内 A 保育園の腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 感染症の集団発生事例を報告する。家族を含め感染者は 37 名であった。下痢や血便など有症状者は 10 名(0 歳児:7 名、3 歳児:1 名、5 歳児:2 名)であったが、溶血性尿毒症症候群、脳症や死亡などの重症例はなかった。さらに、感染者の約 73%、27 名(園児 13 名、家族 14 名)は無症状であった。初期の患者らの発症日が近く、分子疫学解析の結果から、同一感染源による感染が疑われる事例であった。しかし、給食保存食(1/26~1/30)から EHEC の検出はなかった。また、近畿 IS-printing System (IS) および国立感染症研究所 Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) のデータベースにおいて、現在までに集積された菌情報で本事例菌株と同じ IS コード、MLVA 型を示す菌株はなかった。感染源の特定には至らなかったが、感染経路としてヒト-ヒト伝播が強く示唆された。

A. 研究目的

感染者 37 名中 35 名から分離した EHEC 36 菌株(1 名から 2 菌株分離:陰性確認後、約 2 週間後に再度陽性)(表 1)について EHEC の性状(ベロ毒素、薬剤感受性)を解析した。加えて、EHEC の分子疫学に関し、堺市衛生研究所で IS 法、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法を、また、国立感染症研究所(感染研)において MLVA を実施・解析したので報告する。

糞便を CT-SMAC に直接塗抹培養と mEC で増菌後塗抹および免疫磁気ビーズ法による集菌後塗抹による 3 方法で、すべての検体の菌分離を行った。生化学的性状と血清型別は定法により確認した。毒素産生能は、ベロ毒素(VT)の産生性を免疫クロマト法(NH イムノクロマト VT1/2:日本ハム)で確認し、VT 遺伝子(*stx*)の保有を核酸増幅:ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で確認した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2. 薬剤感受性試験

BD センシディスクの抗菌薬 12 種類

(ABPC, CTX, KM, GM, SM, TC, CP, CPF, NA, NFLX, FOM, ST) について K-B 法により感受性試験を行った。

3. 分子疫学解析

(1) IS 法 (東洋紡)

取扱説明書に従って実施した。近畿 IS-printing system データベースにて IS コードを検索した。

(2) PFGE 法

「PFGE New Protocol-Kinki」の方法に基づいて実施した。制限酵素は *Xba* I を使用し、泳動像は、画像解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD) にて類似度の解析を行った。解析条件は、類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

(3) MLVA 法

感染研において分子疫学解析した。

C. 研究結果

1. EHEC の性状 (毒素、抗菌薬感受性)

分離した EHEC 36 菌株は全て VT2 遺伝子を保有し、VT2 産生性を示した。また、12 薬剤すべてに感受性であった。

2. 分子疫学解析

(1) IS 法

35 菌株は同一の泳動像を示した (図 1)。近畿 IS データベースによりコードは「68207 68238」となった (表 2)。陰性確認後に再度菌陽性を呈した感染者から再分離した 1 菌株は、IS 法では 1-16 バンドおよび 1-extraband で 1,300bp の欠落を認めた

(表 2 : 「68205 68238」、図 2)。

(2) PFGE 法

36 菌株の泳動像を Fingerprinting II (BIO-RAD) により類似度解析を行った (図 3)。35 菌株は 100% の類似度を示した。再分離の 1 菌株は 2 バンドを異にしたが、35 菌株と比較した場合、97.44% と高い類似度を示した。

(3) MLVA 法

36 菌株すべて MLVA 型が「15m0001」となり集団事例関連株と考えられると判定された。

さらに、近畿 IS および感染研データベースにおいて、集積された菌情報には、本事例菌株と一致している菌株データはなかった。

D. 考察

初期の EHEC 患者ら 5 名が同じ医療機関から感染症発生届が提出され、これらは A 保育園児とその家族であったため、関連性を疑い、喫食調査、菌の性状 (血清型、ベロ毒素、抗菌薬感受性) や分子疫学を実施した。喫食調査として給食保存食から EHEC を検出しなかった。感染者便由来 36 菌株はすべて O157:H7 であり、PCR による *Stx2* 遺伝子の保有と免疫クロマト法によるベロ毒素産生を確認し、全ての菌株が 12 種類の抗菌薬に感受性を示した。

さらに、菌の分子疫学では IS 法、PFGE および MLVA 結果から本事例の原因として同一菌株が示唆された (図 1、表 2、図 2、図 3)。特に、スクリーニング分子疫学解析として迅速、簡便な IS 法の有用性が示され

た事例であった。

初期の患者らの発症日が近く、菌の性状や分子疫学解析からも同一の感染源が疑われる事例であったが、共通な喫食歴や行動は認められず、感染源の特定はできなかった。本事例では、0歳児クラス関連の感染者が21名であり、感染経路として、おむつ替えなどによるヒトからヒト、または、おもちゃなど物品を介して二次感染が起こった可能性が考えられた。さらに、無症状病原体保有者が多かったことも感染者の発見や対策に支障を来し、感染の拡大要因の1つと考えられる。

近年のEHEC感染症集団発生事例は保育施設、ヒト→ヒト感染が主であり（病原微生物検出情報 36: 73-74、2015）、予防や感染拡大の防止に手洗いの励行や衛生管理が重要である。

E. 結論

1. 無症状病原体保有者が多く（表1）、重症例はなかった。

2. 全て血清型 O157、VT2 および抗菌薬感受性を示した。分析した EHEC 36 菌株は陰性確認後に再分離した 1 菌株を含め、分子疫学的に 36 菌株すべて一致した。近畿 IS および感染研データベースにおいて、集積された菌情報には、本事例菌株と一致している菌株データはなかった。

3. 感染源の特定はできなかったが、主な感染経路や拡大要因として、ヒト→ヒト感染が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 事例概要

	感染者数	クラス 年齢	有症状者数	無症状者数	備 考
A 保育園	23 (無症状者 14)	0歳児	7	3	
		1歳児		2	
		2歳児		2	
		3歳児	1	3	0歳児クラスの家族 1名
		4歳児		1	
		5歳児	1	3	0歳児クラスの家族 2名
家族	14 (無症状者 13)	5歳	1	1	0歳児クラスの家族 2名
		9歳		1	
		12歳		1	
		12歳 <		10	0歳児クラスの家族 6名
計	37名		10名 (27%)	27名 (73%)	0歳児クラス関連：計21名

表 2 IS 法判定および近畿 IS データベース IS コード

set 1	1_1	1_2	1_3	1_4	1_5	1_6	1_7	1_8	1_9	1_10	1_11	1_12	1_13	1_14	1_15	eae	1_16	hl	yA	set 1_ extraband	set 1 コード
35菌株	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	220 , 1300	68207
1菌株	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	220	68205
set 2	2_1	2_2	2_3	2_4	2_5	2_6	2_7	2_8	2_9	2_10	2_11	2_12	2_13	2_14	2_15	2_16	stx2	stx1	set 2_ extraband	set 2 コード	
35菌株	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	140 , 790	68238
1菌株	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	140 , 790	68238

100bp set 1 set 2 set 2 100bp
 マーカー DNA テンプレート DNA テンプレート マーカー

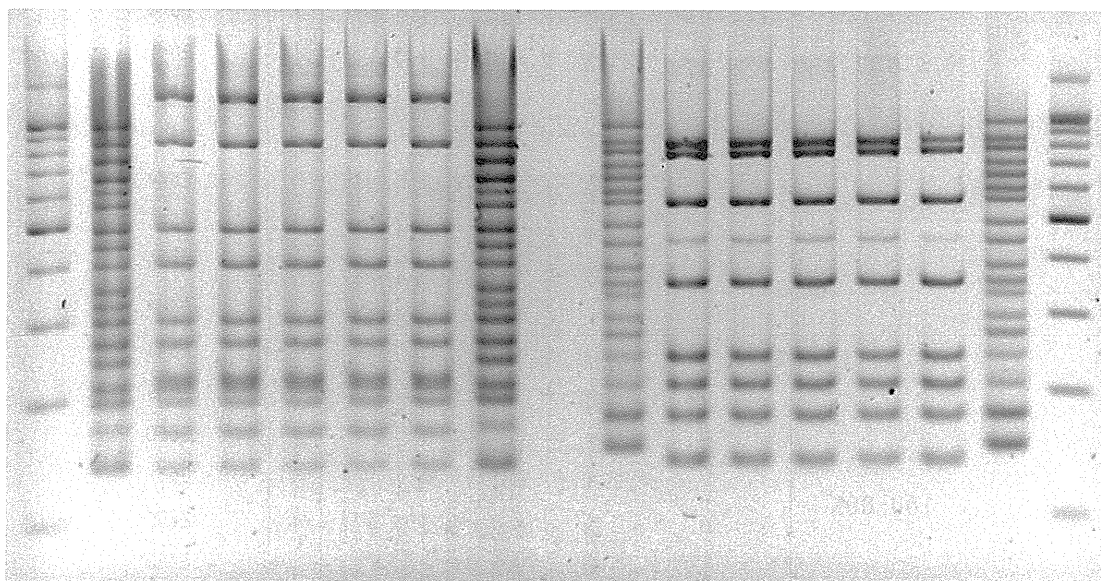


図 1 IS 法 泳動像(35 株同一パターン)

100bp set 1 set 2 set 2 100bp
 マーカー DNA ↓ テンプレート DNA テンプレート マーカー

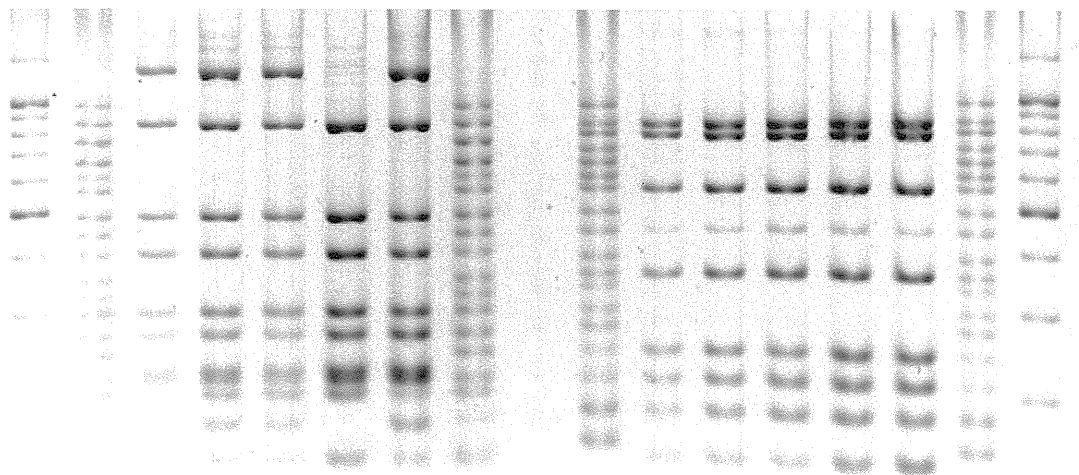


図 2 IS 法 泳動像(矢印:バンド欠落の 1 菌株)

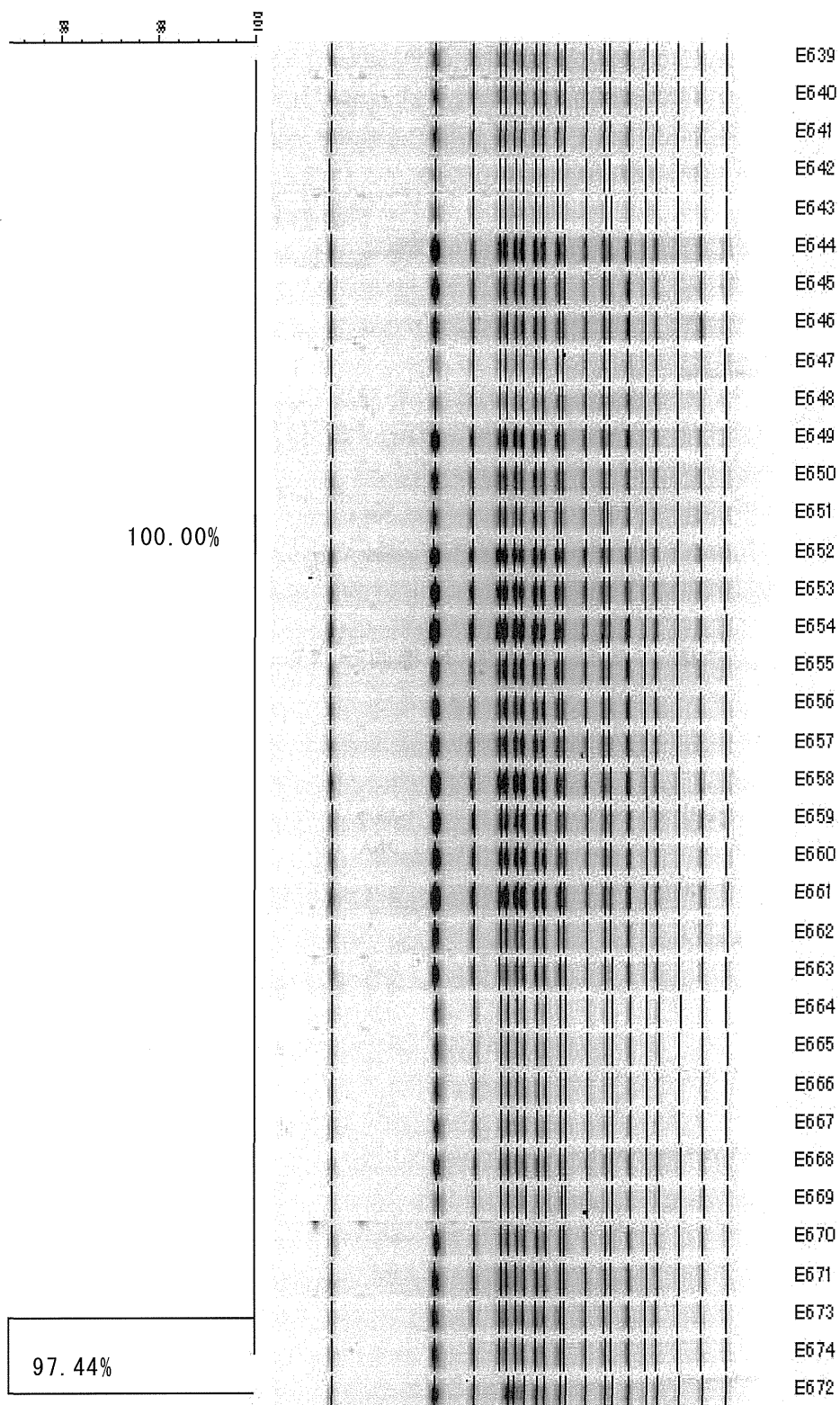


図 3 PFGE 像の Fingerprinting II による解析結果

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
平成 27 年度分担研究報告書

市内宿泊施設で発生した食中毒事件における腸管毒素原性大腸菌
の分子疫学的検討について

研究協力者 西山貴士、金澤祐子、太田裕元 和歌山市衛生研究所
廣岡真理子、江川秀信、森野吉晴 和歌山市衛生研究所

研究要旨

平成 26 年 3 月、和歌山市内の宿泊施設で腸管毒素原性大腸菌（以下「ETEC」という。）O6:H16 及びサポウイルス（以下「SV」という。）による食中毒事件が発生した。患者の共通食は当該施設で提供した会席料理であり、喫食した 258 名のうち 123 名が腹痛、下痢、嘔吐等の食中毒様症状を呈した。調査の結果、患者及び調理従事者の便から ETEC 及び SV が検出され、検食からも患者及び調理従事者と同一の血清型の ETEC が検出されたことより、これらを病因物質と断定した。また、ETEC の分離菌株（調理従事者便由来、患者便由来、食品（検食）由来）についてパルスフィールドゲル電気泳動法（以下「PFGE」という。）により比較検討したところ、全てが同一起源であると推定された。

A. 研究目的

ETEC は、途上国における乳幼児下痢症の最も重要な原因菌であり、先進国においてはこれらの国々への旅行者に見られる旅行者下痢症の主要な原因菌である。途上国における ETEC の感染は糞便に汚染された水を介しての感染が主体であるが、わが国を含めて上水道等の整備された先進国においては水を介する ETEC 下痢症は多くないと考えられる。しかしながら、わが国においても ETEC による散发下痢症や食中毒が発生している¹⁾。

平成 26 年 3 月に和歌山市内の宿泊施設で ETEC 及び SV を病因物質とする食中毒事件が発生した。この事件の原因究明のために実施した検査において、ETEC について分子疫学的検討を実施したので報告する。

【事件の概要】

発生年月日：平成 26 年 3 月 8 日

発生場所：和歌山市内の宿泊施設

摂食者数：258 名（17 グループ）

患者数：123 名（13 グループ）

死者数：なし

原因食品：会席料理（平成 26 年 3 月 8 日及び平成 26 年 3 月 9 日に当該施設で提供された食事）

病因物質：ETEC（O6:H16）、SV

患者 123 名中、ETEC は検査を実施した 6 グループ 34 名のうち 3 グループ 19 名（55.9%）から検出され、SV は 10 グループ 52 名のうち 10 グループ 36 名（69.2%）から検出された。なお、患者 10 名からは ETEC 及び SV の両方が

検出された。検食は30検体中（3月8日分15検体、3月9日分15検体）、3月8日に提供された会席料理4検体（サーモン刺身、マグロ刺身、カジキ刺身、ウツボ）からEPECが検出された。また、検査を実施した従業員22名中1名からEPEC及びSVの両方が検出され、1名からEPECのみが検出された。

B. 研究方法

1. 材料

従業員（調理従事者）便由来株：2株、食品（検食）由来株：4株、患者便由来株：19株（Aグループ12株、Bグループ6株、Cグループ1株）のEPEC計25株を用いた。

なお、他県より分与された患者便由来株は全て血清型O6:H16でLT遺伝子及びST遺伝子を保有する株であった。

2. 方法

2.1 大腸菌の分離

(1) 便（従業員）

検体をトリプチケースソイブロス（日本ベクtonディッキンソン）（以下「TSB」という。）に接種し、さらにDHL寒天培地（日水製薬）に画線し35℃で24時間培養後、TSB培養液から下痢原性大腸菌のスクリーニングPCRを実施した。PCR陽性検体について、DHL寒天培地から大腸菌を疑うコロニーを釣菌しTSI寒天培地、LIM培地及びECブルー100（全て日水製薬）に滅菌蒸留水100mLを加え溶解後無菌的に1mLずつ分注した培地で、35℃、24時間培養し、性状を確認した。

(2) 食品

検体に9倍量の緩衝ペプトン水（関東化学）

を加え、35℃で24時間培養し、培養液から下痢原性大腸菌のスクリーニングPCRを実施した。PCR陽性検体について、DHL寒天培地に画線し、35℃で24時間培養後、大腸菌を疑うコロニーを釣菌し、便と同様の方法で性状を確認した。

2.2 大腸菌の血清型別

病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ生研）を用いて、O型別及びH型別を実施した。

2.3 大腸菌の病原性試験

下痢原性大腸菌のスクリーニング及びLT遺伝子とST遺伝子の検出には、伊藤らの方法²⁾でPCRを実施した。さらに、ST遺伝子（STh、STp）の型別には、腸管毒素原性大腸菌STh遺伝子検出用Primer Set（タカラバイオ）、腸管毒素原性大腸菌STp遺伝子検出用Primer Set（タカラバイオ）を用いて、PCRを実施した。泳動にはDNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置（島津製作所）を用い、試薬キットはDNA-500（島津製作所）を使用した。

また、腸管毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン（LT）の検出には、細菌毒素検出キット：VET-RPLA「生研」（デンカ生研）を用い、耐熱性エンテロトキシン（ST）の検出には、大腸菌耐熱性エンテロトキシン検出キット：コリスト「生研」（デンカ生研）を用いて実施した。

患者便由来株についてはST遺伝子（STh、STp）の型別、易熱性エンテロトキシン（LT）の検出及び耐熱性エンテロトキシン（ST）の検出は、グループごとでPFGEパターンの異なるもの8株について実施した。

2.4 PFGEによる比較検討

菌体処理、泳動条件等はPulseNet研究班平成

15 年度近畿ブロック統一法に準じて実施した。制限酵素については *Xba* I、*Bln* I の 2 種類を用いた。泳動結果は、Fingerprinting II ver.3.0 (Bio-Rad) を用い、Dice 法 (最適化 0.5%、トランス 1.5%) により、相似係数を算出し、平均距離法 (UPGMA) により系統樹を作成し解析した。

C. 研究結果

1. 潜伏期間

潜伏期間を図 1-1、1-2 に示す。

2. 血清型及び病原性試験

患者便由来株 3 グループ 19 名は全て血清型 O6:H16 で、LT 遺伝子及び STh 遺伝子を保有していた。そのうち PFGE パターンに相違の認められた 8 株全てにおいて、LT 産生性及び ST 産生性が認められた (表 1)。また、従業員 (調理従事者) 便由来株 2 株及び食品 (検食) 由来株 4 株は全て血清型 O6:H16 で LT 遺伝子及び ST 遺伝子を保有し (図 2)、STh 遺伝子及び LT 産生性、ST 産生性も認められた (表 1)。

3. PFGE 解析結果

患者便 3 グループ由来株と従業員 (調理従事者) 便由来株、食品 (検食) 由来株 PFGE 解析結果を図 3 (*Xba* I)、図 4 (*Bln* I) に示す。

Xba I の切断では、全ての株が近似度 96.66% 以上の相同性を示した。*Bln* I による切断では、患者便由来株 5 株の近似度は 86.28%~94.12% とやや低かったが、それ以外は 100% の相同性を示した。

D. 考察

今回の事件においては、検食として当該施設に保管されていたのは調理済み食品のみであったため、仕入れた食材が元々 ETEC に汚染されていたと仮定すると調理過程で除去できなかった可能性は否定できない。しかしながら、従業員便、患者便、検食 (食品) から検出された ETEC が全て同一の血清型であったこと、病原性試験の結果において、全て LT 遺伝子及び STh 遺伝子を保有しており、さらに LT 産生性及び ST 産生性が認められたこと、PFGE において *Xba* I 切断、*Bln* I 切断ともにバンド数に 1~2 本異なる株はあったが相同性の高いパターンを示したことから同一起源であると考えられた。このことより、この事件は、ETEC を保菌した調理従事者が調理に従事したため、手指等を通じ食品を汚染したことが原因である可能性が高いと強く推察された。

本事件の平均潜伏期間は 55.4 時間であり (図 1-1)、ETEC が検出された患者の平均潜伏期間は 63.8 時間であった (図 1-2)。これは、ETEC の一般的な潜伏期間である 12~72 時間¹⁾ と一致していた。

検出された ETEC の LT 産生性は、全て凝集価が <1:4 であった。菌体のポリミキシン B 処理を行っても結果はほとんど変わらなかったため、菌が保有する LT 産生性が弱かったと推察された。

患者は 3 月 8 日、9 日の 2 日間に当該施設において、グループにより、1 回から複数回様々なメニューを喫食していた。また、ETEC を検出した食品は、調理従事者が直接手を触れる食品であり、検査した検食以外の食品も汚染していた可能性も考えられた。ETEC は発症菌量が多いとされているが、今回 ETEC が検出された

食品の大腸菌の定量試験を行ったところ、いずれの検体も<3.0MPN/g と菌量は少なかった。このことより、食材の加熱工程もないため除去できず調理中から提供するまでの間に菌が増殖する機会を与えてしまったか、或いは少ない菌量で患者が発症したことが推察された。

E. 結論

今回の調査の結果、調理従事者からの二次汚染が原因で引き起こされた食中毒事件である可能性が高いため、調理従事者の食品・調理器具類の取り扱い、衛生管理等、調理従事者の衛生意識を高めることの重要性を感じた。本事件では、当該施設が検食を保管していたことにより原因食品を特定することができた。汚染源や汚染経路を特定することにより再発防止のための改善点が明確にできるため、検食を保管しておくことは食中毒事件の原因を究明する材料として非常に有用であると考えられる。今後、飲食店等への更なる周知徹底を図っていくことが重要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 謝辞

本事件の原因究明のため患者菌株をご提供いただいた奈良県保健研究センター、西宮市保健所、並びに大津市保健所に深く感謝いたします。また、本事件の情報をご提供いただいた和歌山市保健所食品衛生監視員の皆様に感謝い

たします。

H. 参考文献

- 1) 寺嶋淳：食中毒予防必携第2版，社団法人日本食品衛生協会，101-102，(2007)
- 2) 伊藤文明 他：日本臨床，50，特別号，343-347，(1992)

I. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西山貴士、金澤祐子、太田裕元、廣岡真理子、江川秀信、森野吉晴：市内宿泊施設で発生した食中毒事件における腸管毒素原性大腸菌の分子疫学的検討について、和歌山市衛生研究所報、第19号：36-40 (2015)

2. 学会発表

- 1) 西山貴士、金澤祐子、太田裕元、廣岡真理子、江川秀信、森野吉晴：市内宿泊施設で発生した腸管毒素原性大腸菌及びサポウイルスによる食中毒事件について、第42回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会 (2015年11月、滋賀)
- 2) 西山貴士、金澤祐子、太田裕元、廣岡真理子、江川秀信、森野吉晴：市内宿泊施設で発生した腸管毒素原性大腸菌及びサポウイルスによる食中毒事件について、第31回和歌山県公衆衛生学会 (2016年1月、和歌山)

J. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

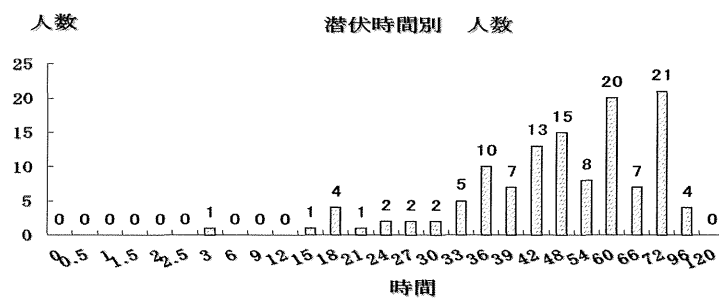


図1-1 本事件の潜伏期間

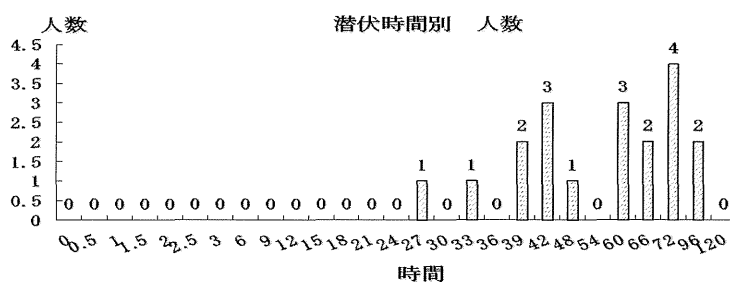


図1-2 ETEC 検出患者の潜伏期間

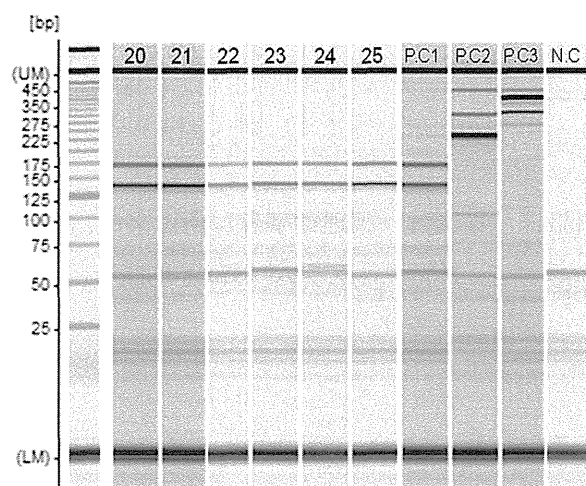


図2 混合プライマーを用いた PCR による下痢原性大腸菌の各病原遺伝子増幅結果

No. 20、21 : 従業員 (調理従事者) 便由来株

No. 22~25 : 食品 (検食) 由来株

P. C1 : ETEC (LT 遺伝子 130bp、ST 遺伝子 171bp)

P. C2 : EHEC (VT 遺伝子 228bp)

P. C3 : EIEC (*invE* 遺伝子 382bp)

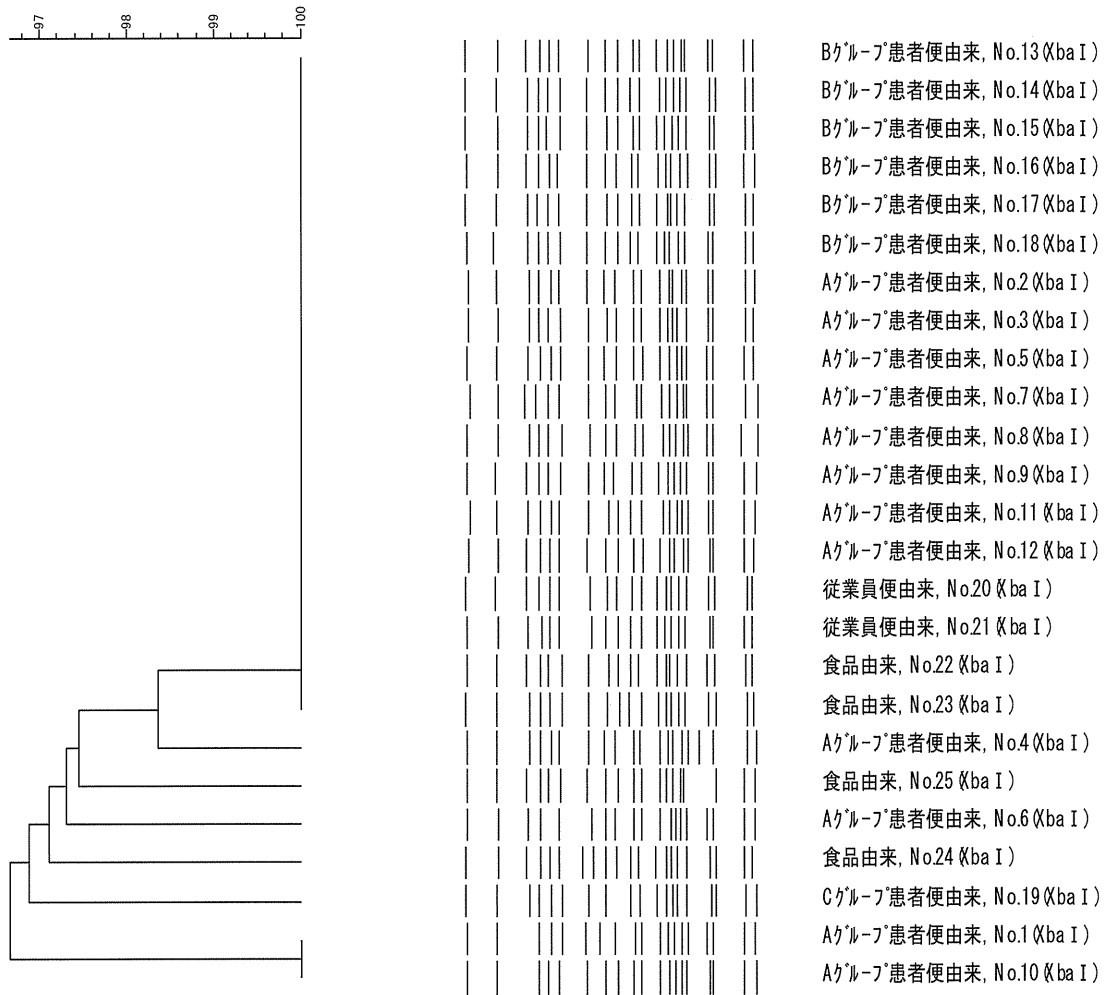


図3 患者便由来株、従業員（調理従事者）便由来株、食品（検食）由来株の
デンドログラム（Xba I 切断）

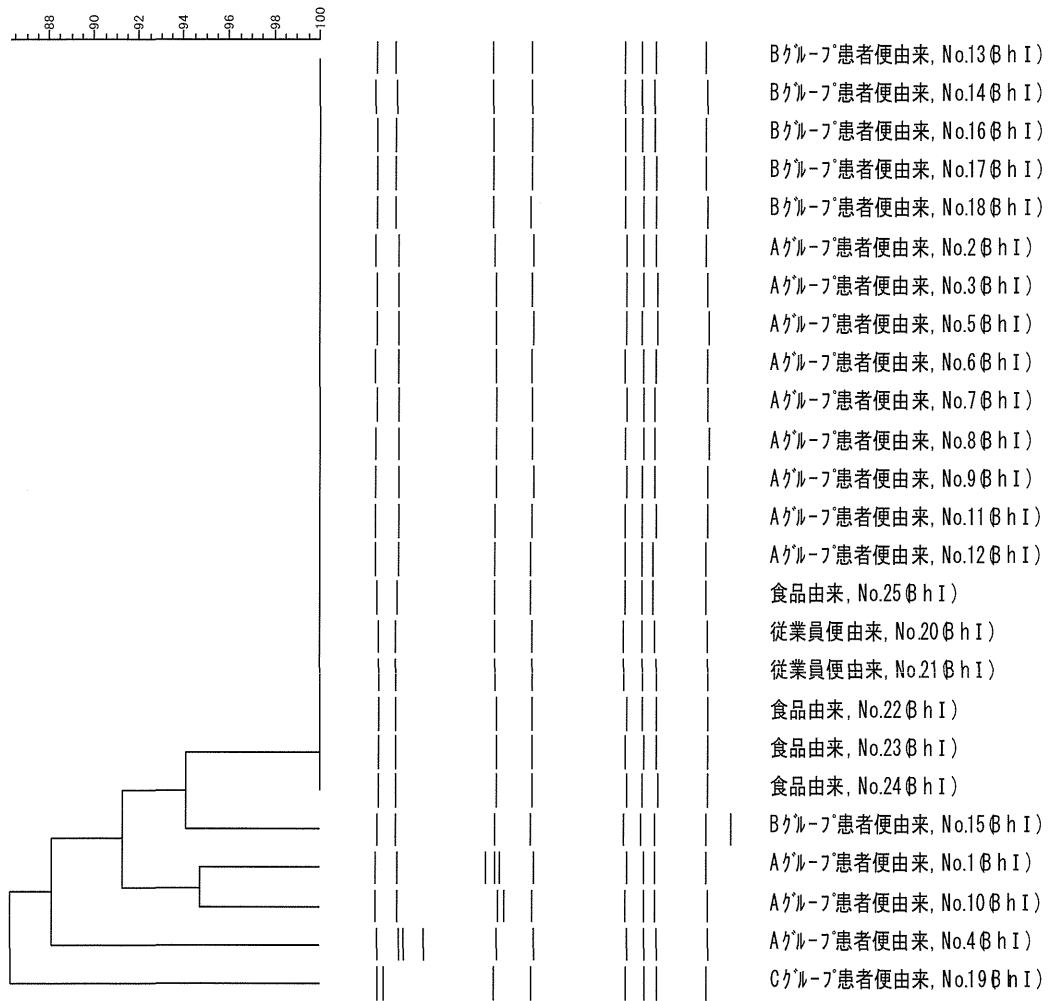


図4 患者便由来株、従業員（調理従事者）便由来株、食品（検食）由来株の
 デンドログラム (Bln I 切断)

表1 患者便由来株、従業員（調理従事者）便由来株、食品（検食）由来株の
病原性試験結果

菌株 番号	由来		遺伝子				毒素産生性	
			LT	ST	STh	STp	LT	ST
No. 1	患者便	Aグループ	+	+	+	-	+	+
No. 2			/	/				
No. 3			/	/				
No. 4			+	+				
No. 5			/	/				
No. 6			+	+				
No. 7			/	/				
No. 8			/	/				
No. 9			/	/				
No. 10			+	+				
No. 11			/	/				
No. 12			+	+				
No. 13		Bグループ	+	+	+	-	+	+
No. 14			/	/				
No. 15			+	+				
No. 16			/	/				
No. 17			/	/				
No. 18			/	/				
No. 19		Cグループ	+	+	+	-	+	+
No. 20	従業員便		+	+	+	-	+	+
No. 21			+	+	+	-	+	+
No. 22	食品	サーモン	+	+	+	-	+	+
No. 23		マグロ	+	+	+	-	+	+
No. 24		カジキ	+	+	+	-	+	+
No. 25		ウツボ	+	+	+	-	+	+

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

平成 27 年度 分担研究報告書

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	竹内 功二	鳥取県衛生環境研究所
	川上 優太	島根県保健環境科学研究所
	川瀬 遵	//
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	河合 央博	//
	檀上 博子	//
	秋田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田 加奈子	//
	平塚 貴大	//
	千神 彩香	広島市衛生研究所
	青田 達明	//
	田内 敦子	//
	坂本 綾	//
	石村 勝之	//
	野村 恭晴	山口県環境保健センター
	亀山 光博	//
	尾羽根 紀子	//
	大塚 仁	//
	石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
	内田 順子	香川県環境保健研究センター
	福田 千恵美	//
	岩下 陽子	//
	安藤 友美	//
	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	園部 祥代	//
	金山 知代	高知県衛生研究所
	高橋 とみよ	//

研究要旨

中四国地域で食品由来感染症の広域事例が発生した場合等においては、各施設の分子疫学解析結果等を共有する必要がある。このため、各施設における分子疫学解析手法の維持と解析精度の向上、さらにこのデータを用いたデータベースの構築を目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 菌株を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)及び IS-printing System による精度管理を、実施した。その結果、ほとんどの施設は良好な解析結果であったが、一部施設では解析法の習熟が必要と思われた。

中四国地域の EHEC O157 による感染事例について、IS-printing system 等による解析データや疫学情報を収集し解析した結果、7 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。このうち、疫学的に関連のある株については、MLVA 法による結果も一致していた。広域発生事例の疫学解析に重要な分子疫学情報等のデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になるものと思われる。

A. 研究目的

本研究班は、食品由来感染症の広域事例発生時に、疫学解析に必要な解析技術の維持と解析精度の向上に向けて、各ブロックで解析手法の精度管理を実施している。さらに、解析したデータの共有と、そのために必要なデータベースの構築を行っている。平成 27 年度は、中四国ブロックの遺伝子解析法の維持・向上のため、パルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法と言う)、IS-printing System、multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis(以下、MLVA 法と言う)による腸管出血性大腸菌(以下、EHEC と言う)O157 株の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

精度管理：岡山県で平成 27 年度に分離されたヒト由来 EHEC O157 株 (No1872:H7,VT2、No1873:H-,VT1,2、No1878:H7,VT1,2、No1882:H7,VT1,2、No1884:H7,VT1,2) の 5 株を使用した。

事例解析：岡山県で平成 27 年度に分離された EHEC O157 株 39 株の解析結果と、中四国地域で発生した事例の解析結果を収集し、比較検討した。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) PFGE 法

PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、画像解析ソフト(BioNumerics)を使用して泳動像の解析を行った。

(2) IS-printing System

IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット(Api)の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を区分毎に足してコード化し、コードによる解析を行った。

(3)MLVA 法及び型別

MLVA 法は、実施可能な 4 施設で行った。また、MLVA 型別は、すべての施設が菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(4) 精度管理

平成 27 年度は、10 施設が参加して実施した。PFGE 法は 9 施設(A,C~J)、IS-printing System は 10 施設(A~J)、MLVA 法は 4 施設(D~F,I)が参加した。精度管理用に送付した菌株 5 株について、PFGE 法、IS-printing System 及び MLVA 法を実施した。PFGE 法は、解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを、IS-printing System は、1st 及び 2nd set primer の増幅産物によるコードを、それぞれの泳動像とともに回収し解析した。MLVA 法はターゲットとする遺伝子座のリピート配列数を比較解析した。

3. 疫学情報の収集と解析

データベース構築に向けた試行として、中四国地域で発生した患者由来 EHEC O157 菌株について、IS-printing system や MLVA 法による解析結果を、疫学情報とともに収集し、解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) PFGE 法による解析

中四国ブロックの 10 施設中 9 施設が参加して実施し、各施設の泳動像とデンドログラム解析結果を、図 1-1 に示した。また、結果をまとめて、図 1-2 と表 1 に示した。本年度はほとんどの施設が良好な PFGE 泳動像を示したが、A 施設は No1878 株のみスメアーとなり、解析不能であった。デンドログラム解析の結果は、パターン類似度の最大値は 90.9%、最小値は 53.0%で、

No1872 が No1878, 1884, 1882 に類似度の高いグループ(a)と、No1873 に類似度の高いグループ(b)に分かれた。

(2) IS-printing System による解析

IS-printing System の精度管理は、中四国ブロックの 10 施設が参加して実施した。各施設の泳動像は図 2-1 に、IS コードによる解析結果は表 2 に、泳動像の比較は図 2-2a、2-2b に示した。多くの施設の結果は一致したが、3 施設(施設 A, G, H)では IS コードの一部が他の施設と異なっていた。泳動像は、1st 及び 2nd primer set の低分子量のバンドが薄い施設(A, C, E, F, G, H, I, J)と、低分子量のバンド領域が濃くはっきりしていた施設(B,D)に分かれ、泳動像がややスメアーになった施設もあった(施設 H)。

(3) MLVA 法による解析

中四国ブロックの 4 施設で実施した。3 施設は O157 株の 17 遺伝子座を、1 施設は 9 遺伝子座について、リピート数を解析した。その結果を、表 3 に示した。No,1873,1878,1884 は各施設の結果が一致していたが、No1872 は O157-9 が 1 施設(施設 D)で、No1882 は O157-17, O157-36, O157-19, O157-37 が 1 施設(施設 F)で他の施設と結果が異なっていた。

2. 中四国地域の発生状況と解析結果

中四国地域で平成 27 年度に発生した EHEC O157 による感染事例について、各県の施設で実施した患者等由来株の IS-printing System による解析結果と、MLVA 型を含む疫学情報を収集した。このうち、7 種類の IS コードについては同一 IS コードの株が複数の県から分離され、その解析結果を表 4 に示した。集団事例あるいは同一施設関連の発生事例が 3 事例あり、

IS コードが 307557-211457 及び 717577-611657 の事例は、MLVA 型 15m0034 と MLVA 型 15m0140 及び MLVA complex 15c032 で、事例内の株同士は一致していた。IS コードが 012057-214442 の事例は、MLVA 型が 15m0201、15m0202、15m0203、15m0204 の複数の型に型別されたが、これらの株も MLVA complex はすべて 15c041 で同じであった。家族内感染事例については、すべての事例で IS コードと MLVA 型、あるいは MLVA complex が一致していた。IS コードが 717577-611657 の事例は、MLVA 型が 15m0138 と 15m0139 に型別されたが、MLVA complex は 15c032 で一致していた。散発事例については、IS コードが 317577-211756 と 012057-214442 の株は、MLVA 型及び MLVA complex がそれぞれ 13m0625 及び 15c020 と 15m0201 及び 15c041 で一致したが、疫学的な関連は不明であった。これら以外の株では、MLVA 型及び MLVA complex が異なっていた。

D 考 察

平成 27 年度に、PFGE 法、IS-printing System 及び MLVA 法による EHEC O157 株を用いた精度管理を実施したが、多くの施設で解析結果は良好であった。しかし、一部の施設が他施設と異なった結果を報告しており、解析技術に習熟し、精度を維持・向上させる必要があると思われた。PFGE 法及び IS-printing system とも、正確な解析結果は、鮮明で判別可能な泳動像により得られるため、検査法の工夫や条件設定の見直しなどが必要と考える。IS-printing system の泳動像において、多くの施設では、低分子量のバンド領域でバンドが薄くなる傾向が見られるが、一部の施設では、高分

子量のバンド領域に比べ、低分子量の領域の方が濃いか同程度にはっきりした結果が示された。この理由は現状では不明であるが、来年度の IS-printing system のマニュアル化に向けて、今後、施設毎の詳細な解析条件の収集・検討が必要である。また、PFGE 法においては、DNA 抽出処理、制限酵素処理などを確実に実施できるように、検査法に習熟することが重要である。MLVA 法は中四国ブロックでは現在 4 施設のみが実施しており、感染研での EHEC の主な遺伝子解析手法が、PFGE 法から MLVA 法へ移行したことから、今後実施施設が増えてくると思われる。しかしながら、機器の整備や高額な試薬の購入、さらに解析技術への習熟など、実際の事例解析に対応できるようになるには、かなりの期間を要すると思われる。このため、感染研やすでに実施している施設と連携し、技術的なサポートを受けながら、検査態勢を整えていく必要がある。

中四国地域で本年度発生した事例の情報を収集し、分子疫学的な解析を行った。その結果、7 種類の IS コードの株が、複数の県から分離された。同一の IS コード株のうち、疫学的に関連性のある事例においては、同じ MLVA 型かあるいは MLVA complex を示したが、異なった MLVA 型を示した株は、人から人への感染の過程での遺伝子変異によるものと思われた。散発事例では、同一 IS コードで MLVA 型も一致する株があったが、疫学的な関連は不明であり、詳細な疫学情報の収集と、それに基づく解析が必要であると思われた。

E 結 論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 株を用い

て、PFGE 法、IS-printing System 及び MLVA 法による精度管理を実施した。

2. いずれの方法においても、参加した施設の多くが同じ結果を示したが、一部の施設では結果が異なっていた。

3. PFGE 法及び IS-printing System による解析では、鮮明な泳動像を得ることが重要であり、検査技術への習熟と検査法の工夫が必要である。

4. 中四国地域で同一 IS コードの株が複数の県から分離された事例では、疫学的に関

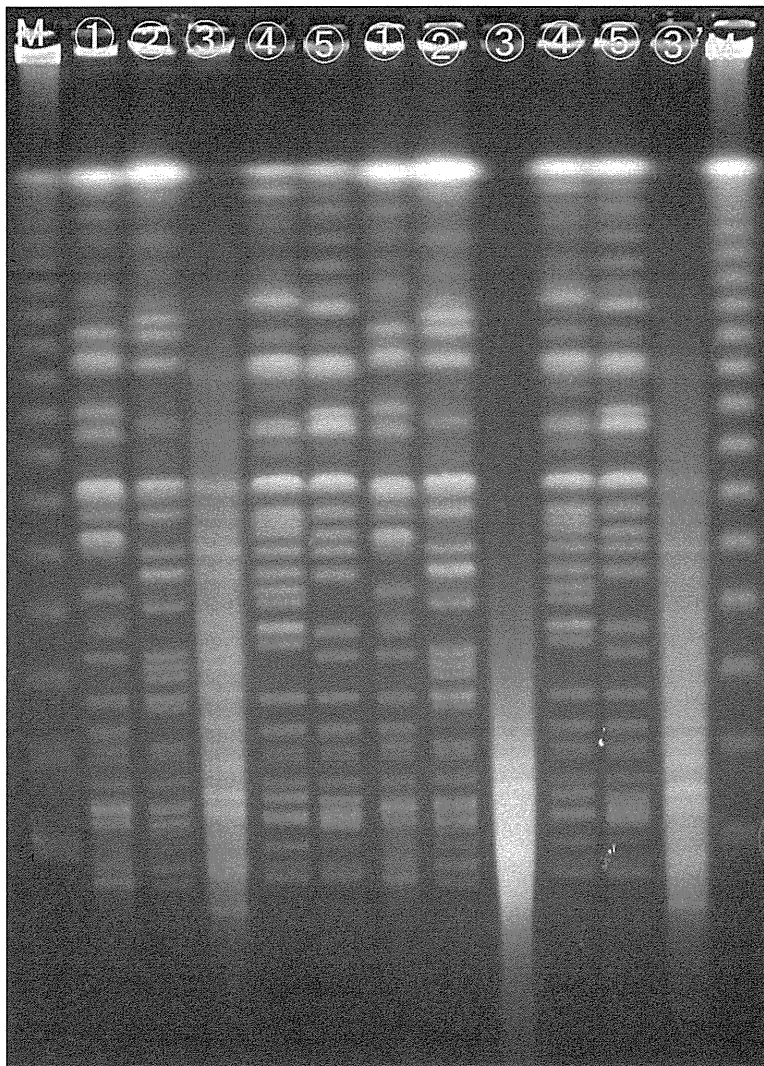
連のある株の MLVA 型や MLVA complex は、一致していた。

5. 分子疫学解析においても、疫学情報に基づいた解析が重要である。

F. 研究発表

なし。

(A)



菌株 ① STEC 1872 O157:H7
 ② STEC 1873 O157:H-
 ③ STEC 1878 O157:H7
 ④ STEC 1882 O157:H7
 ⑤ STEC 1884 O157:H7

M : マーカー