

2015年に山口県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症の分子疫学的解析

研究協力者 山口県環境保健センター

亀山光博 尾羽根 紀子 大塚 仁 野村恭晴

研究要旨

2015年5月~12月に、22例の腸管出血性大腸菌 O157 による感染症が発生した。家族内感染事例が3件(F1~F3)及び散発事例が8件(S1~S8)であり、22例から23株が分離された。これらの事例から分離された血清群 O157 株について、IS-printing 法、制限酵素 *Xba* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法及び multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法による解析を実施し、分離株の遺伝的関連を明らかにするとともに、3法の型別能を比較した。

家族内感染事例3件由来株については、それぞれの事例で3法とも同一あるいは極めて類似したパターンを示した。散発事例8件のうち、2件から分離された株については、3法の結果は完全に一致した。これら2件の疫学的関連は不明であったものの、近縁株による感染が示唆された。また、この散発由来2株と同時期に発生した家族内感染事例 F2 由来2株を比較すると、IS パターンは一致、PFGE パターンは極めて類似していたが、MLVA パターンは4領域で異なっていた。このため、これら散発事例由来2株と家族内感染事例 F2 由来2株については、発生時期は重なっているものの、異なる由来株による感染であると考えられた。

MLVA は PFGE 法と同等あるいはそれ以上の型別能を有している。本研究により、IS-printing 法や PFGE 法の結果が一致した株についても MLVA の結果が異なる事例もあったことから、MLVA は分離株の型別法として非常に有効であると考えられた。今後は、MLVA を優先的に実施し、保健所等へ迅速に結果を還元する体制を構築する必要がある。

A. 研究目的

2015年1月~12月に、山口県内では35例の腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症が発生し、そのうち22例が血清群 O157 によるものであった。本研究では、これらの症例から分離された血清群 O157 株について、O157 IS-printing 法、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法及び新たに導入した multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)の3種類の分子疫学的手法を用いて解析を行い、分離株の遺伝的関連を明らかにするとともに、3法の型別能を比較した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2015年5月~12月に山口県内で発生した22例由来 O157 計23株を供試した。

2. 解析方法

(1) DNA 抽出

O157 菌株をトリプトソイ寒天培地(日水製薬)上で純培養後、QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。

(2) IS-printing 法

O157 IS-printing system (東洋紡)を用いて実施した。判定は、2種類の primer set (1st set、2nd set)ごとに、増幅ありを「1」、なしを「0」とし、増幅サイズの大きいバンドから順に3バンドごとに「1」、「2」、「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st set、2nd setの順に並べ、12桁のコードを算出した(ISコード)。

(3) PFGE 法

厚生労働科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業「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17年度総括・総合研究報告書(主任研究者 寺嶋淳)に記載されている九州ブロックマニュアル¹⁾に従って実施した。制限酵素は *Xba*I(Roche)を用い、泳動装置は CHEF-Mapper (Bio-Rad)を使用した。得られた PFGE パターンは BioNumerics ver. 7.1 (Applied Maths)により解析し、UPGMA 法によりデンドログラムを作成した。

(4) MLVA

Izumiya らの方法²⁾に従い実施した。18領域のうち、locus O157-10を除く17領域について解析した。QIAGEN multiplex PCR kit plus (QIAGEN)を使用した PCR 反応後、3500 genetic analyzer (Applied Biosystems)及び Gene Mapper software ver. 4.1 を使用してフラグメント解析を行った。size marker は、Genescan 600 LIZ size standard (Applied Biosystems)を用いた。なお、フラグメント解析により、増幅産物が認められない場合は「-2」と表記した。

C. 研究結果

1. 事例概要

2015年の山口県内での O157 感染症の概要を表1に示す。家族内感染事例が3件(事例 F1~F3)及び散発事例が8件(事例 S1~S8)であった。分離株の血清型はすべて O157:H7 で、VT型は VT1+2 産生株が17株、VT2 産生株が5株及び VT1 産生株が1株であった。なお、散発事例 S7 では、患者1名から VT1+2 産生株と VT2 産生株が同時に分離された(菌株 No. 15Y32、15Y34)。

2. IS-printing 解析結果

表2に示すとおり、23株は11パターンに型別された(IS15_1~11)。家族内感染事例 F1 と F2 については、各々の事例で分離株は同一 IS パターンを示した。事例 F3 の5株のうち、4株は同一 IS パターン(IS15_3)を示したが、1株は主パターンと1カ所異なっていた(IS15_4)。散発2事例(S4、S5)由来2株の IS パターンは一致し、これは家族内感染事例 F2 由来2株のパターンと同一であった(IS15_2)。散発事例 S7 から分離された2株については、まったく異なる IS パターンを示した(IS15_9 及び IS15_10)。

3. PFGE 解析結果

図に示すとおり、23株は11パターンに型別された。このうち、家族内感染事例 F1 と F3 由来株は、それぞれの事例で PFGE パターンは完全に一致した(P15_1 及び P15_6)。事例 F2 由来2株の PFGE パターンは1カ所異なるのみであり、類似度は97.9%であった(P15_3a 及び P15_3b)。散発事例由来株のうち、2事例(S4、S5)由来2株の PFGE パターンは完全に一致し、また事例 F2 由来1株とも一致した(P15_3a)。散発事例 S7 から分離された VT 型の異な

る 2 株は、6 バンド以上異なる PFGE パターンを示した(P15_4 及び P15_5、類似度 85.9%)。

4. MLVA 解析結果

表 2 に示すとおり、23 株は 11 パターンに型別された(ML15_1~11)。家族内感染 3 事例(F1~F3)由来株については、それぞれの事例で MLVA パターンは完全に一致した。また、散発 2 事例(S4、S5)由来株の MLVA パターンは一致したが(ML15_7)、家族内感染事例 F2 由来株とは 4 領域でリピート数が異なっていた。なお、散発事例 S7 から分離された 2 株については、8 領域で MLVA パターンが異なっていた(ML15_9、ML15_10)。

D 考 察

本調査では、2015 年に山口県内で分離された血清群 O157 23 株について、IS-printing 法、PFGE 法及び MLVA の 3 法を用いて解析を実施した。

家族内感染事例 3 件について 3 法を実施した結果、事例 F1 由来株では 3 法の結果は一致していた。事例 F2 と F3 では、3 法のうちいずれか 1 法の結果が異なっていた。ただ、結果の相違は軽微なものであったことから、集団事例の探知には、3 法いずれも有用であると考えられた。

2015 年 8 月末に発生した家族内感染事例 F2 と散発事例 S4 及び S5 由来 4 株について解析した結果、散発 2 事例由来株については、IS パターン及び MLVA パターンは完全に一致し、PFGE パターンは 1 バンド異なるのみであった。しかし、家族内感染事例 F2 由来 2 株と比較すると、IS パターンは一致、PFGE パターンは一致あるいは極めて類似していたものの、MLVA パタ

ーンは 4 領域で異なっていた。このことから、3 事例についての疫学的関連は不明であったが、散発 2 事例由来株の遺伝的関連性は高いと考えられ、同時期に発生した家族内感染事例 F2 由来株と散発 2 事例由来株については、遺伝的関連性は低いと考えられた。

従来、本県では IS-printing 法と PFGE 法の 2 法により遺伝的関連を調査してきた。この 2 法による調査のみでは 3 事例由来株の遺伝的関連は高いと判断される場所であった。しかし、今年度から導入した MLVA により、これらの事例由来株の関連性は低い可能性があることが判断することができた。MLVA は短時間で結果が得られることから、今後は優先的に MLVA を実施し、結果を行政へ迅速に還元していく体制を構築する必要がある。しかし、我々が以前報告³⁾したように、いずれかの方法を単独で実施した場合、由来の異なる株を同一由来と判断してしまう恐れがあるため、MLVA を実施するとともに、他の方法を併用して解析を実施する必要がある。

散発事例 S7 において、1 名の患者から VT1+2 産生株と VT2 産生株が同時に分離された。2 株について 3 法を用いて解析した結果、すべての結果が異なっていた。このことから、同一由来株の一部の株で VT1 遺伝子の欠失が起こったわけではなく、元々遺伝的関連のない 2 種類の株を保菌していたと考えられた。このようなケースは稀であると考えられるが、今後 EHEC を臨床検体から分離する場合には、より複数の株について検査を行っていく必要があると考えられた。

E 結 論

今年度から新たに MLVA 解析手法を導

入した。MLVA は迅速に結果が得られ、型別能も PFGE と同等であることから、集団事例の探知には非常に有効であることが判った。今後、MLVA 解析を優先的に実施し、結果を迅速に保健所等へ還元する体制を構築する必要がある。

F. 研究発表

1. Kameyama M, Tominaga K, Yabata J, and Nomura Y : Distribution of IS629 and *stx* genotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 isolates in Yamaguchi Prefecture, Japan, 2004-2013. J Vet Med Sci. 2015 ; 77 :

1437-1441.

G. 参考文献

- 1) 寺嶋 淳 : 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(課題番号 : H15-新興-1) 平成 17 年度総括・分担研究報告書 168-185 (2006)
- 2) Izumiya, H. et al. Microbiol. Immunol.54:569-577 (2010)
- 3) 寺嶋 淳 : 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 (課題番号 : H24-新興-一般-005) 平成 24 年度総括・研究分担報告書 153-164 (2013)

表1 2015年に発生した腸管出血性大腸菌O157感染症事例の概要

事例 No.	発生施設等	発生地域	発生時期	感染者数			分離株の血清型 (VT型)	菌株No.
				患者	無症状保菌者	計		
F1	家族内	県東部/中部	5月	4	3	7	O157:H7 (1+2) (有症)15Y05-15Y07, 15Y09 (保菌)15Y08, 15Y10, 15Y11	
F2	家族内	県東部	8月	1	1	2	O157:H7 (1+2) (有症)15Y15 (保菌)15Y16	
F3	家族内	県東部	9-10月	3	1	4	O157:H7 (1+2) (有症)15Y21, 15Y22, 15Y25 (保菌)15Y23*, 15Y26*	
S1	散発	県中部	6月	1	0	1	O157:H7 (2) 15Y12	
S2	散発	県西部	11月	0	1	1	O157:H7 (2) 15Y14	
S3	散発	県中部	8月	1	0	1	O157:H7 (2) 15Y18	
S4	散発	県中部	9月	1	0	1	O157:H7 (1+2) 15Y19	
S5	散発	県西部	11月	1	0	1	O157:H7 (1+2) 15Y20	
S6	散発	県中部	8月	1	0	1	O157:H7 (2) 15Y24	
S7	散発	県西部	11月	1	0	1	O157:H7 (1+2) 15Y32 O157:H7 (2) 15Y34	
S8	散発	県中部	8月	1	0	1	O157:H7 (1) 15Y35	

*15Y23と15Y26は同一人物から分離(事例F3)

**15Y32と15Y34は同一人物から分離されたが、VT型が異なる(事例S7)

表2 事例別O157分離菌株のIS-printing法及びMLVA解析結果

事例 No.	分離株数	ISパターン			MLVAパターン																	
		1st	2nd	Type	O157-34	EHC-1	EHC-2	O157-9	EHC-5	O157-3	O157-25	EH11-8	EH157-12	EH11-14	EH11-11	O157-17	O157-36	O157-19	EHC-6	O157-37	EH26-7	Type
F1	7	307557	211457	IS15_1	11	5	4	8	11	10	4	1	3	-2	2	8	8	6	-2	5	-2	ML15_1
F2	2	717557	611657	IS15_2	13	5	4	15	-2	13	9	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2	ML15_2
F3	4	717575	611657	IS15_3	11	5	4	7	12	14	5	1	4	-2	2	6	10	5	-2	8	-2	ML15_3
	1	716575	611657	IS15_4	11	5	4	7	12	14	5	1	4	-2	2	6	10	5	-2	8	-2	ML15_3
S1	1	114057	303443	IS15_5	9	7	5	14	-2	7	3	-2	1	-2	2	3	7	5	-2	6	-2	ML15_4
S2	1	155047	343443	IS15_6	10	8	6	8	10	-2	5	1	1	-2	2	3	9	6	12	7	-2	ML15_5
S3	1	245457	611242	IS15_7	9	12	4	19	4	9	4	1	6	-2	2	4	10	7	12	7	-2	ML15_6
S4	1	717557	611657	IS15_2	12	5	4	12	-2	8	8	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2	ML15_7
S5	1	717557	611657	IS15_2	12	5	4	12	-2	8	8	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2	ML15_7
S6	1	012057	214442	IS15_8	9	11	5	-2	-2	4	3	1	4	-2	2	5	6	8	-2	5	-2	ML15_8
S7	1	707557	611653	IS15_9	-2	6	4	11	9	11	4	1	5	-2	2	7	10	6	-2	9	-2	ML15_9
	1	317577	611757	IS15_10	-2	6	4	13	12	8	5	1	4	-2	2	8	6	6	-2	7	-2	ML15_10
S8	1	217557	111455	IS15_11	6	8	5	10	-2	3	2	-2	4	-2	2	9	16	6	-2	6	-2	ML15_11

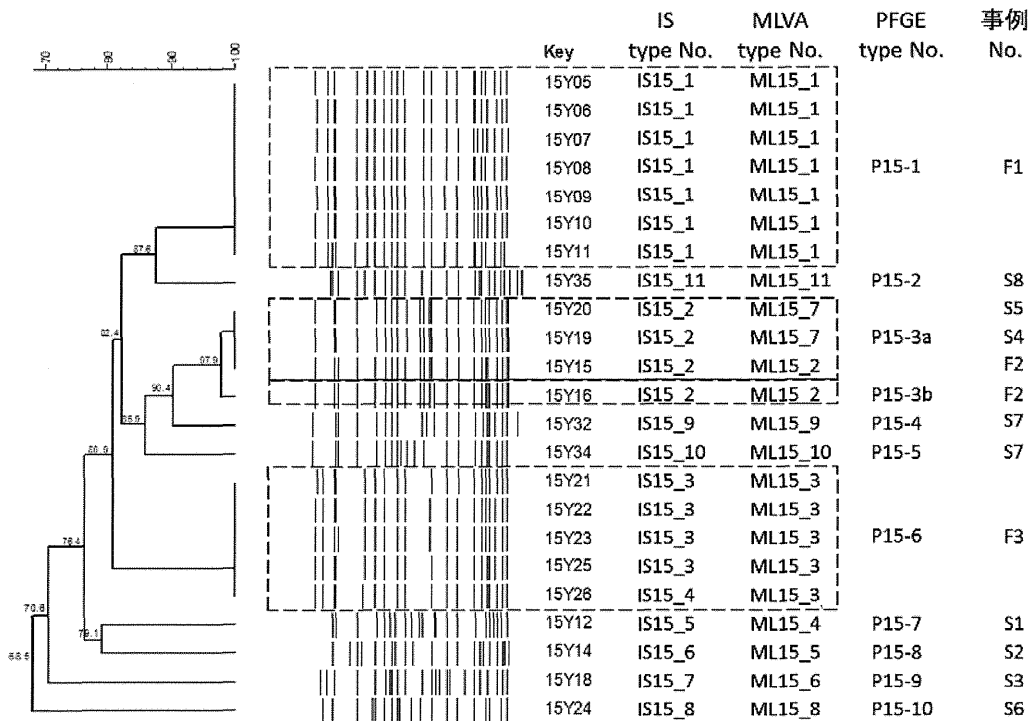


図 EHEC O157 23株のPFGEパターンに基づき作成したデンドログラム

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

内田順子 福田千恵美 岩下陽子 安藤友美

研究要旨

2015年7月に香川県内で発生した4警察署留置施設において提供された共通の弁当の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例についてコアグララーゼ型別及びエンテロトキシン型別、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行った。調査結果より有症者、従事者A、複数の食品が同一由来と推測された。疫学調査において今回はPFGEと血清型は一致したが、型別が同じだけでは遺伝子解析(PFGE)が異なることもあるので由来の推定にはPFGEによる遺伝子解析が必要である。

A. 研究目的

2015年7月、香川県内の4警察署留置施設において提供された共通の弁当の喫食による黄色ブドウ球菌食中毒事例が発生した。施設有症者、弁当製造業従業員、食品より検出された黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型、エンテロトキシン型とPFGEによる遺伝子解析を行い、関連性を調査した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

有症者便2検体、従事者便5検体、ふき取り10検体、使用水1検体及び食品51検体計69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2検体、従事者便3検体、食品24検体から分離された黄色ブドウ球菌29株を対象とした。

2. 方法

1) コアグララーゼ型はブドウ球菌コアグララーゼ型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて分類した。

2) エンテロトキシン型はブドウ球菌エン

テロトックス-F「生研」(SET-RPLA)(デンカ生研)を用いて分類した。

3) また同時に、コアグララーゼ型とエンテロトキシン産生遺伝子についてPCR法を実施した。コアグララーゼ型別はHiroseら¹⁾、SE遺伝子はOmoeら²⁾のプライマーを用いた。コアグララーゼ型遺伝子(I, II, III, IVa, IVb, Va, Vb, VI, VII, VIII, IX, X)とSE遺伝子(*sea, seb, sec, sed, see, seg, she, sei*)検出用プライマーを用い、反応条件は角田らの方法³⁾を参考にし、初期変性94°C2分、増幅反応94°C30秒、55°C30秒、72°C1分を30サイクル、最終伸長72°C5分で実施した。

4) PFGEは滋賀県立衛生環境センターの方法⁴⁾を参考に実施した⁵⁾。

Trypticase Soy Brothで37°C一夜静置培養後、培養液を400μl採り12000rpm2分遠心。上清を捨て200μlの水に再浮遊させ、56°Cに加温後、1% SeaKem Gold Agarose (LONZA) 200μlを混和しサンプラーキャスター0.7mmに流し込み固化。ブロックを5mg/ml Lysozyme(和光)・20μg/ml Lysostaphine(和光) in 0.5M

EDTA(pH8.0) 1ml で 37°C一晩振盪。その後、1mg/ml Proteinase K (Roche)、1%N-Lauroylsarcosine(SIGMA) in 0.5M EDTA 1ml に交換し 50°C一晩振盪。ブロックを 4mm×4.5mm にカットし、4mM Pefabloc SC(Roche) in TE Buffer(pH8.0) 500 μl で Proteinase K を不活化。TE Buffer 1ml で氷上 30 分振盪洗浄を 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) in A buffer 100 μl を加え 37°C一晩振盪を行った。プラグを取り出し、SeaKem Gold Agarose でゲルを作成し、CHEF DRIII(Bio Rad)にて 0.5×TBE Buffer 14°C、電圧 6V/cm、パルスタイム 5.3~34.9 秒の条件で、18 時間泳動。解析は Fingerprinting II (Bio Rad) で行った。

表 1 分離された黄色ブドウ球菌の型別

菌株 No.		食品	生菌数 個/g	コアグラマーゼ 型別	エンテロトキシン型別
101	7/30朝	オムレツ	1,200	IV	A
102	7/30朝	シュウマイ	16,000	IV	A
103	7/30朝	スパゲティーステー	5,000,000	IV	A
104	7/30朝	もやし炒め	8,300	IV	A
106	7/30朝	ポテトサラダ	2,000	IV	A
107	7/30昼	豚キムチ	12,000	IV	A
108	7/30昼	スパゲティーステー	54,000	IV	A
109	7/30昼	キャベツのゆかり和え	660,000	IV	A
113	7/30夕	カニクリームコロッケ	300未満	IV	A*
114	7/30夕	ゆで卵	13,000	IV	A
115	7/30夕	スパゲティーステー	110,000	IV	A
116	7/30夕	南瓜そぼろ煮	320,000	IV	A
119	7/30夕	コロッケ	410	IV	A
123	7/30	ぴり辛わかめ	810	IV	A
125	7/30	スパゲティーステー	4,200,000	IV	A
148	7/29朝	スパゲティーステー	1,900,000	IV	A
153	7/29昼	竜田揚げカレー風味	4,100	IV	A
154	7/29昼	スパゲティーステー	2,800,000	IV	A
155	7/29昼	キャベツソース炒め	300未満	IV	A
156	7/29昼	ブロッコリー梅肉和え	4,100	IV	A
160	7/29夕	竹輪と野菜の煮物	1,800	IV	A
161	7/29夕	スパゲティーステー	3,300,000	IV	A
163	7/29夕	ちんげんソテー	1,200	IV	A
167	7/29	スパゲティーステー	13,000,000	IV	A
12		従事者検便A		IV	A
14		従事者検便B		V	G,I*
16		従事者検便C		II	G,I*
201		有症者検便A		IV	A
202		有症者検便B		IV	A*

*) SET-RPLA法では陰性

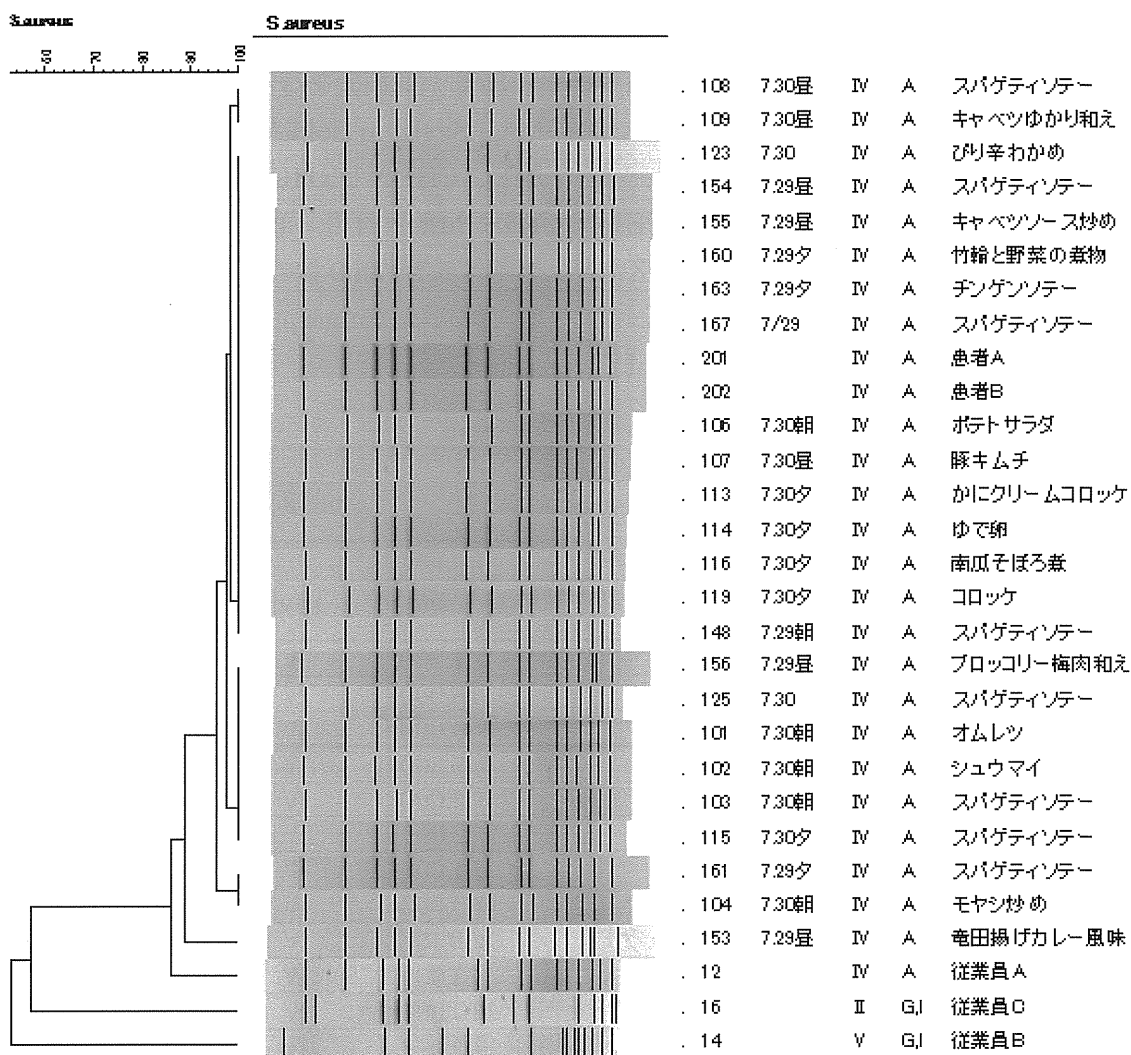


図1 分離された黄色ブドウ球菌のデンドログラム

C. 研究結果

コアグラ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。

- 1) 免疫血清を用いたコアグララーゼ型は菌株 No.14 はV、No.16 はIIとなり、この2株を除く27株は全てIVであった。
- 2) SET-RPLA法でのエンテロトキシン型は菌株 No.14,16,113,202の4株が検出できず、残り25株はAが検出された。
- 3) PCR法でのコアグララーゼ型は免疫

血清と同じ結果となった。エンテロトキシン型は菌株 No.14,16 よりG,Iが検出され、その他27株はAが検出された。

- 4) PFGEによる結果を図1に示す。コアグララーゼ型IV、エンテロトキシン型Aの27菌株は6パターンを示したが、1本バンド違いで95%、あとは86%以上の類似度であった。No.14,16はそれぞれ違うパターンを示した。

D. 考察

複数施設において提供された共通の弁当の食品 24 品と有症者 A・B、従事者 A より黄色ブドウ球菌コアグララーゼ型 IV、エンテロトキシン型 A が検出された。従事者 B よりコアグララーゼ型 V・エンテロトキシン型 G, I が、従事者 C よりコアグララーゼ型 II・エンテロトキシン型 G, I が検出された。エンテロトキシン型は SET-RPLA 法では従来型の A～E のみ検出可能であり、PCR 法では新型 G,H,I も検出できるため、より詳細に短時間で分類でき疫学調査に有用であった。

PFGE を実施した結果、型別が同じであった弁当の食品と有症者 A・B と従事者 A は類似度 86% で同じ由来と推測された。型別が同じだけでは遺伝子解析(PFGE)が異なることもあるので PFGE による遺伝子解析が必要である。

7 月 29 日と 30 日の各種弁当にスパゲティソテーが入っており一般細菌数も 54,000～13,000,000 個/g と多く、食中毒の原因に関与していると思われる。

E 結論

1. コアグララーゼ型 IV、エンテロトキシン型 A であった弁当の食品と有症者 A・B と従事者 A は類似度 86% で同じ由来と推測された。
2. 黄色ブドウ球菌食中毒事例において、エンテロトキシン検出 PCR 法は 8 種類の遺伝子型が分類できるため疫学調査に役立つと思われる。
3. 疫学調査において、今回は PFGE と血清型は一致したが、型別が同じだけでは遺伝子解析(PFGE)が異なることもあるので由来の推定には PFGE に

よる遺伝子解析が必要である。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Hirose M et al. ; Identificaition of Staphylocoagulase Genotypes I - X and Discrimination of Type IV and V Subtypes by Multiplex PCR Assay for Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* : Jpn.J.Infect.Dis., 63, 257-263, 2010
- 2) Omoe K et al ; Detection of *seg,seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* Isolates and Determination of the Enterotoxin Productivities of *S.aureus* Isolates Harboring *seg,seh* or *sei* Genes : J.Clin.Microbol., 40, 857-862, 2002
- 3) 角田由紀子ら ; Multiplex PCR 法による黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型別とエンテロトキシン産生遺伝子の検出 : 新潟県保健環境科学研究所年報、28, 68 - 72, 2013
- 4) 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に関する研究 平成 16 年度 総括・分担研究報告書 125-129 (2005)
- 5) 福田千恵美ら ; 香川県内で発生した黄色ブドウ球菌有症苦情事例 : 香川県環境保健研究センター所報、13, 67 - 69, 2014

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
「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」

平成 27 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、精度管理（ISPS、PFGE）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	岩佐奈津美	福岡市保健環境研究所
	中村悦子	北九州市環境科学研究所
	塘由香	佐賀県衛生薬業センター
	浦山みどり	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
	成松浩志	大分県衛生環境研究センター
	原田誠也	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
	水流奈己	宮崎県衛生環境研究所
	穂積和佳	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
	西田雅博	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
	重村洋明	福岡県保健環境研究所
	江藤良樹	福岡県保健医療介護総務課

要旨

九州地区では、1. IS-printing System（以下、ISPS 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）検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. 精度管理（ISPS、PFGE）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。

九州地区における腸管出血性大腸菌 0157（以下 0157EHEC）の IS 型別の登録数は平成 27 年 12 月現在で 1376 件（平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件、平成 26 年度 206 件及び平成 27 年度 179 件）であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。九州

地区で平成 27 年度に収集された EHEC は 456 株であった。その内訳は、0157EHEC が 214 株、0103 EHEC が 86 株、026 EHEC が 73 株、0111 EHEC が 25 株、0121 EHEC が 14 株、0145 EHEC が 10 株、091 EHEC が 10 株、その他の血清型が 13 株及び血清型別不能が 11 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率 50.7%であり、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。平成 27 年度の 0157EHEC 及び 非 0157EHEC による集団発生事例は 9 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 6 事例で、非 0157EHEC によるものは 3 事例で、026EHEC によるものが 1 事例、0121EHEC によるものが 1 事例、0103EHEC によるものが 1 事例であった。精度管理では昨年度に引き続き ISPS、PFGE について実施した。ISPS では、エクストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数で、全 4 株一致した地衛研はなかった。ほとんどの地衛研が正解目安と 0~3 本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた。一致しなかったのは、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

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）は、国立感染症研究所（以下、感染研）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。平成 26 年度からは、0157EHEC、026EHEC 及び 0111EHEC に対しては、迅速性と分解能の両立を目指した遺伝子型別解析方法として、Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) により情報

還元が開始された。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

ISPS は、IS-printing system (東洋紡(株)) を使い、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。

ISPS については、平成 26 年度に配分した「IS-printing 電気泳動マニュアル(最終版)-九州パルスネット ver.2」により実施した。PFGE については各地衛研が通常行っている方法にて行った。0157EHEC 4 菌株(A-D; ISPS で明瞭なエクストラバンドをもつ株を含む)を参加地衛研に配布した(表 1)。

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 22 年 4 月から平成 27 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 27 年 12 月現在で 1376 件(平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件、平成 26 年度 206 件及び平成 27 年度 179 件)であり、毎年 200 件前後の登録で推移している(表 2)。

平成 22~27 年度に登録された 1376 件の 0157EHEC の IS 型別は 257 型に分類された。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 152 株(18.8%)が 11 地衛研から、登録された(表 3、図 1)。また、6 年間で 20 株以下しか登録が無い 0157EHEC の IS 型別は 244 型(95.0%)で、それに属する株は合計 737 株(53.6%)であった。そのうち 1~5 株登録されている 0157EHEC の IS 型別が最も多い 215 型であった。

ISPS は操作が簡便で迅速性に優れた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、

ISPS の精度管理等で解析能力の向上に努める必要がある。ISPS 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 0 群血清型別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 27 年 4 月から 12 月までに 456 株の EHEC 菌株が収集され(表 4)、その内訳は 0157EHEC が 214 株(46.9%)、非 0157EHEC が 231 株(50.7%)及び 0 群血清型別不能 EHEC が 11 株であった。非 0157EHEC は 14 種類の 0 群に型別され、その内訳は 0103 EHEC が 86 株(18.9%)、026 EHEC が 73 株(16.0%)、0111 EHEC が 25 株(5.5%)、0121 EHEC が 14 株(3.1%)、0145 EHEC が 10 株(2.2%)及び 091 EHEC が 10 株(2.2%)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、0103EHEC、026EHEC、0111EHEC、0121EHEC 及び 0145EHEC など、全体の 9 割を占めている。九州地区は本研究で 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。

3. EHEC による集団発生事例数

平成 27 年度の EHEC による集団発生事例は 9 事例であった(表 5)。その内訳は、0157EHEC によるものが 6 事例で、非 0157EHEC によるものは 3 事例で、026EHEC によるものが 1 事例、0121EHEC によるものが 1 事例、0103EHEC によるものが 1 事例であった。発生場所別に見ると、保育園、家庭内、飲食店、老人ホー

ムであった。集団発生事例は、保育園など、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。

4. 精度管理 (ISPS、PFGE)

昨年と同様に ISPS の精度管理を、九州ブロック 12 地衛研を対象に実施した。併せて PFGE の精度管理も同 10 地衛研で行った。A と B は PFGE が同一で ISPS が異なる菌株、C は無作為に選択した菌株、D は ISPS において 1st セットの 1-02 と 1-03 の間、及び、1-14 と 1-15 の間にエクストラバンドが現れる株を選択した。

ISPS の精度管理の結果、エクストラバンドのない A-C については全施設で正しく判定された。しかし、2 つのエクストラバンドを含む D については、4 地衛研で誤判定がみられた(図 2.1～2.4)。ゲル下部のエクストラバンド(1-14・1-15 間)については、1-15 のバンドと重なるため、注意深く判定を行う必要がある。さらに泳動が非常に綺麗に行われないと本物のバンドとの識別は困難であり、担当者により判定が異なっていた。

一方、PFGE については、泳動は概ね良好に行われていたが(図 3.1-5)、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった(図 4.1～4.4、表 6.1)。ほとんどの地衛研が正解目安と 0～3 本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた(表 6.2)。一致しなかった原因として、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

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 22～27 年度に登録された 1376 株の 0157EHEC の IS 型別は 257 型に分類され、6 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 13 型(5.1%)でそれに属する株は合計 639 株(46.4%)であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 152 株(11.0%)が 11 地衛研から、登録された。

九州地区 12 地衛研にて平成 27 年 4 月から 12 月までに 456 株の EHEC 菌株が収集され、その内訳は 0157EHEC が 214 株(46.9%)、非 0157EHEC が 231 株(50.7%)及び 0 群血清型別不能 EHEC が 11 株であった。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、0157EHEC、0103EHEC、026EHEC、0111EHEC、0121EHEC 及び 0145EHEC などで、全体の 9 割を占めていた。

平成 27 年度の EHEC による集団発生事例は 9 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 6 事例で、非 0157EHEC によるものは 3 事例で、026EHEC によるものが 1 事例、0121EHEC によるものが 1 事例、0103EHEC によるものが 1 事例であった。発生場所別に見ると、保育園等、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。

精度管理では、昨年度に引き続き ISPS、PFGE について行った。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった。ほとんどの地衛研が正解目安と 0～3 本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた。バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが

原因と考えられた。

表1 精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子	IS型別
A	7E006	2007	保菌者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	66324257743
B	7E032	2007	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	66458474955
C	8E048	2008	患者	O157:H7	<i>stx</i> ₂	22081687690
D	13E079	2013	患者	O157:HNM	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	57733470538

表2 九州地区地衛研におけるIS型別登録数

地衛研	IS型別登録数							合計
	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	平成26年度	平成27年度		
1	112	48	61	26	28	46	321	
2	50	53	44	24	32	37	240	
3	30	15	12	15	38	45	155	
4	12	10	17	51	28	11	129	
5	23	18	11	28	26	10	116	
6	6	5	4	8	2	7	32	
7	13	16	24	18	11	14	96	
8	16	10	5	30	25	0	86	
9	5	3	7	2	4	5	26	
10	20	17	16	4	3	4	64	
11	19	25	21	15	8	0	88	
12	6	7	7	2	1	0	23	
合計	312	227	229	223	206	179	1376	

表3 九州地区での登録数が多いIS型別(年度別、地衛研別)

No.	IS型別	登録数																		合計
		登録年度						登録地衛研												
		22	23	24	25	26	27	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	66324257743	22	32	4	11	33	50	26	15	59	7	9		14	6	2	5	8	1	152
2	57733536074	3	15	23	8	16	9	13	15	4	12	12	10	1	2	1	4			74
3	56643812046	31	14	3	13	3		19	17	7	3	6	2	8			1	1		64
4	30671622280	33	11	1	7	11		31	5	3		11	3	1		1	6	2		63
5	30653010185	9	4	4	14	6	2	6	5	3	2	7		2	8		5		1	39
6	27384601163	26	3		7			8	1	4		8	6		2	3	2	2		36
7	57733470538		2	12	1	16	4	10	4			17	2		1		1			35
8	66457435083	6	2	9	10	1	5	10	6	3	1	1	1	4			3	4		33
9	22081687688	12			2	16		9	7	8		3				2	1			30
9	66323217359	10	8	8	4			4	14	1	1			9				1		30

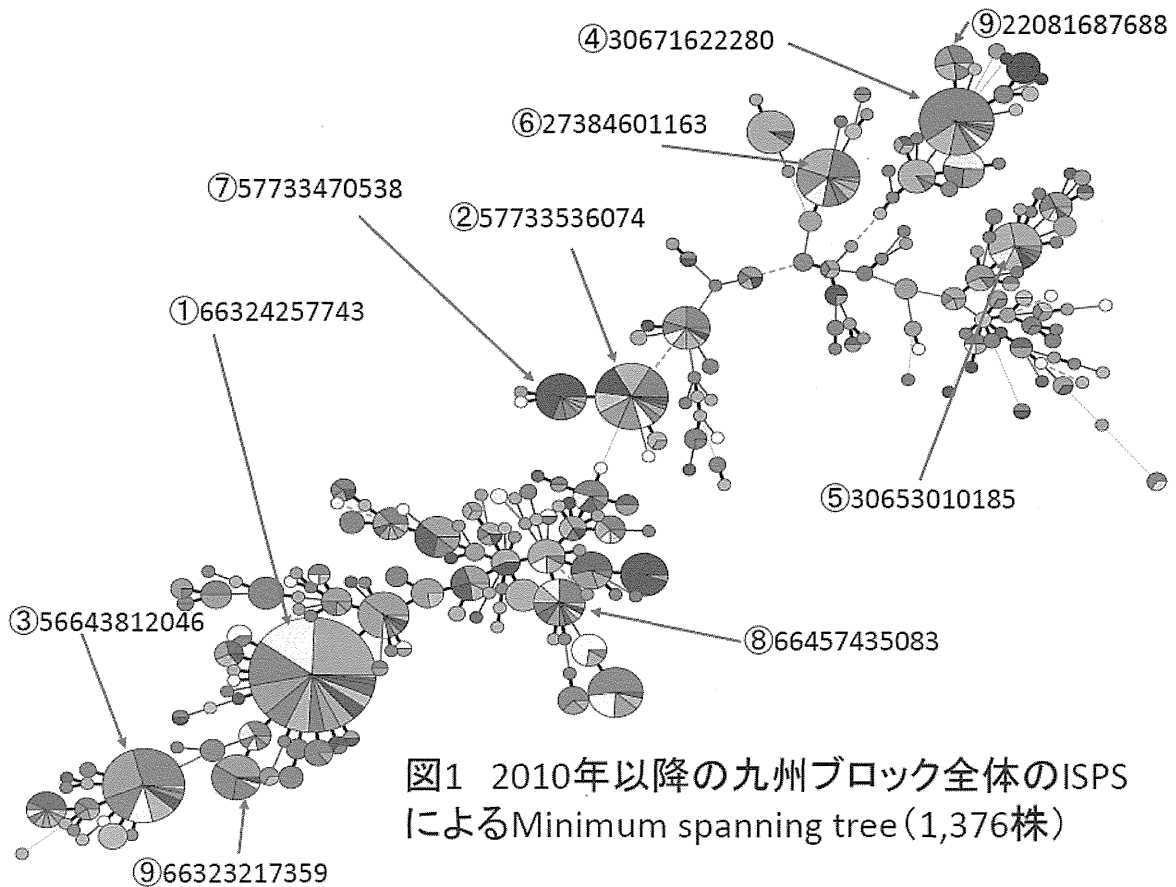


図1 2010年以降の九州ブロック全体のISPS
によるMinimum spanning tree (1,376株)

表4 平成27年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

地衛研	O血清型別の分離菌株数																	計	
	O157	O26	O111	O103	O121	O91	O145	O183	O115	O136	O55	O128abc	O152	O4	O6	O5	O119		OUT
1	46	4		1		4	4		1									4	64
2	37	7		1	1		1			1					1			3	52
3	45	5	2	2			1											1	56
4	24	10	2													2		1	39
5	10	6	10	10	1						1							1	39
6	7	4																	11
7	14		3			2													19
8	7	20		1															28
9	5																		5
10	8	5	2	71	0	3	0	0	3										92
11	11	9	6			1			1					1				2	31
12	0	3	0	0	12	0	4						1						20
合計	214	73	25	86	14	10	10	0	5	1	1	0	1	1	1	2	1	11	456

表5 平成27年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

地衛研	O血清型別のEHEC集団発生事例							
	O157	(概要)	O26	(概要)	O103	(概要)	O121	(概要)
1	2	(家庭内) × 1、(飲食 店) ×1						
2	1	(高齢者福 祉施設)						
3								
4								
5								
6								
7	1	(飲食店)						
8	2	(家庭内)	1	(保育園)				
9								
10					1	(保育園)		
11								
12							1	(保育園)
合計	6		1		1		1	

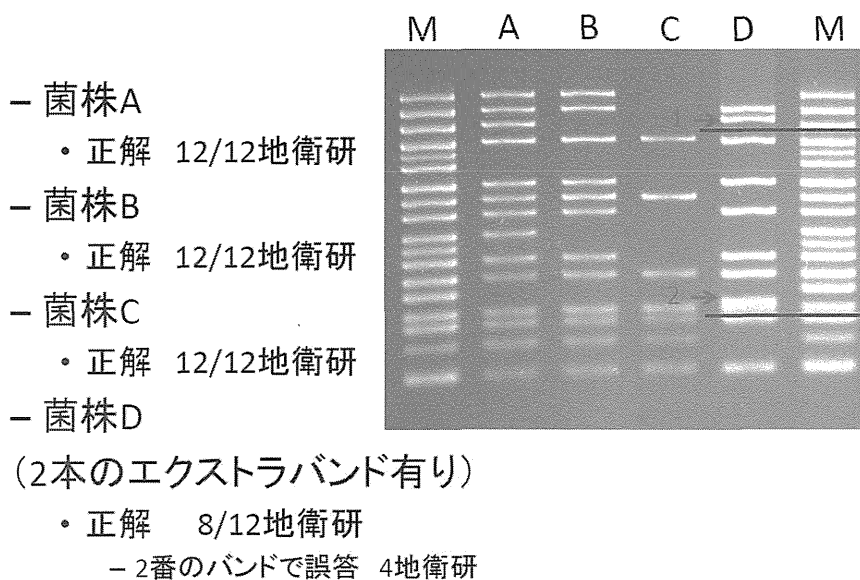


図2.1 ISPSの結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できた例(正答)

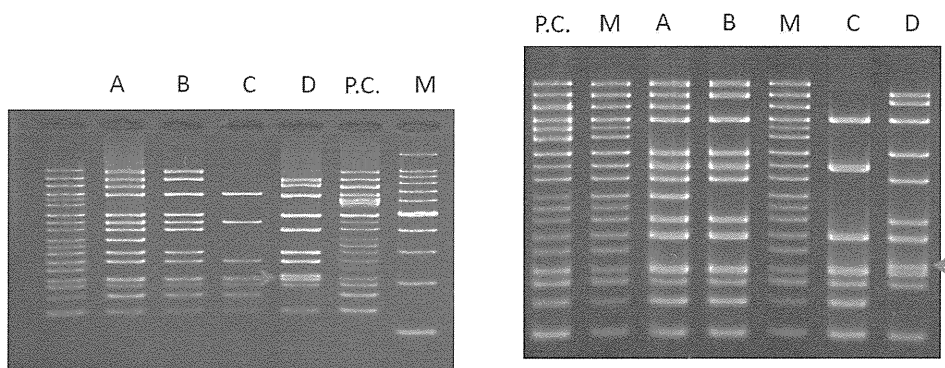


図2.2 ISPSの結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できなかった例(誤答)

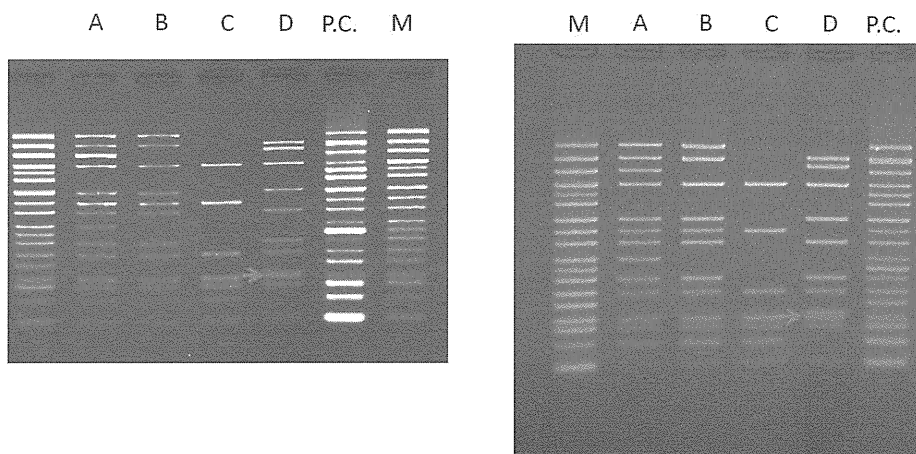


図2.3 ISPSの結果

エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に分離できなかった例(誤答)

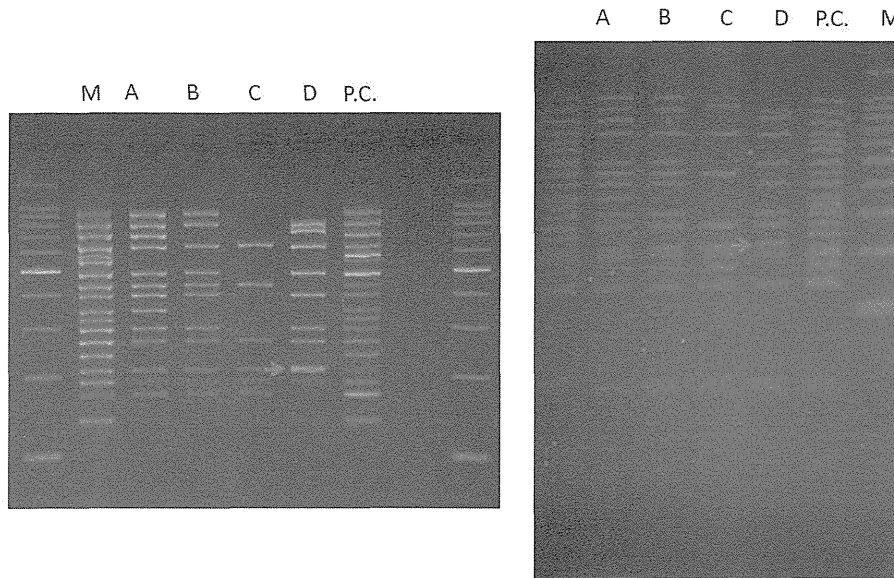


図2.4 ISPSの結果

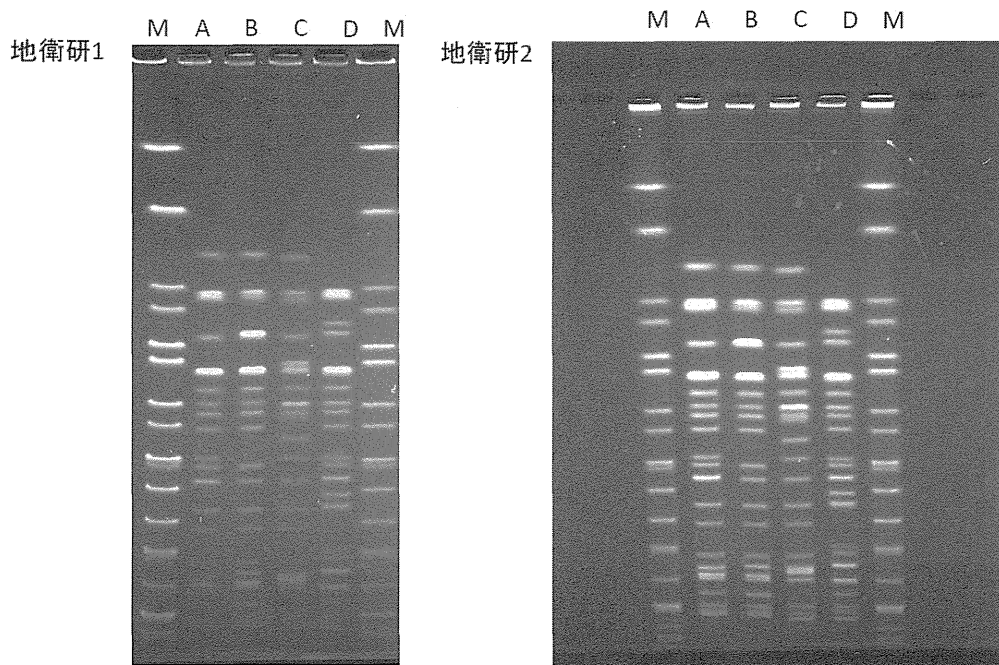


図3.1 各地衛研のPFGEの結果

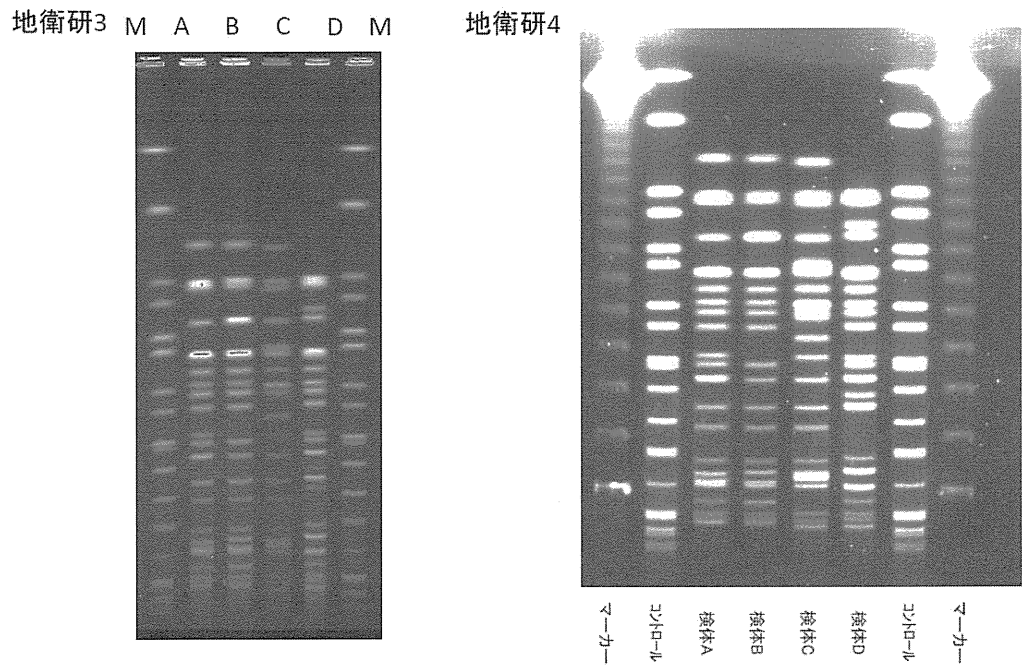


図3.2 各地衛研のPFGEの結果

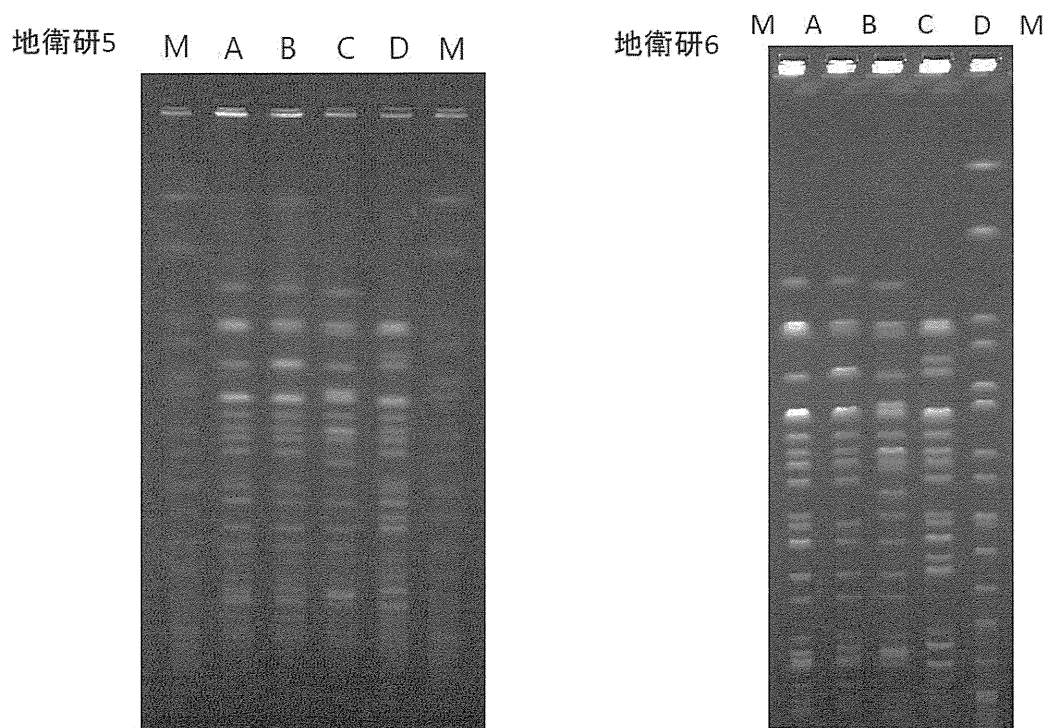


図3.3 各地衛研のPFGEの結果