

厚生労働科学研究（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 28 年度分担研究報告書

関東ブロックの食品・ヒト由来腸内細菌の解析及び精度管理に関する研究

研究分担者	東京都健康安全研究センター	平井 昭彦
研究協力者	茨城県衛生研究所	山本 和則
	栃木県保健環境センター	桐谷 礼子
	群馬県衛生環境研究所	小林 美保
	埼玉県衛生研究所	倉園 貴至
	千葉県衛生研究所	平井晋一郎
	神奈川県衛生研究所	古川 一郎
	横浜市衛生研究所	松本 裕子
	山梨県衛生環境研究所	山上 隆也
	長野県環境保全研究所	井川由樹子
	静岡県環境衛生科学研究所	山田 俊博
	東京都健康安全研究センター	小西 典子、尾畑 浩魅

研究要旨 精度管理は、検査・解析レベルの維持、向上を目的として実施される。平成 28 年度も共通菌株を用いて PFGE 法、IS 法の精度管理を行った結果、いずれも良好な成績であった。しかし、PFGE 法では画像が若干不鮮明なもの、IS 法ではエキストラバンドの報告が無いものがあった。

アンケート調査の結果、各施設では分子疫学解析を行政活用した事例を数多く経験しており、他施設との共同により広域事例を明らかにした事例も多くあることが判明した。

IS 法および MLVA 法の導入と手技の統一を目的として、標準プロトコルの作成について検討を行った。

A. 研究目的

食中毒、食品媒介感染症発生時に重要なことは、原因特定を迅速に行い事件の拡大を防ぐことである。食品の広域流通が行われる現在は、同一食品を原因として散発的に異なる地域で事件が発生することがあり（Diffuse Outbreak）、原因食品、感染経路を

特定するためには、病原体の詳細な解析が必要である。サルモネラや腸管出血性大腸菌（EHEC）による事件は症状も重篤に陥ることがあり、病原体の解析は特に重要となる。

これら病原体の解析は、従来より血清型別試験や薬剤感受性試験が行われているが、

近年は分子疫学解析が多用され、PFGE、MLST、MLVA や EHEC O157 では IS-printing System (IS) も用いられている。

散発事例など広域に亘る事例の場合、異なる検査施設での結果を比較し判定する必要があることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要である。このことから今回、EHEC 共通菌株を使用して PFGE 法と IS 法について各地研の精度管理を実施した。

また、病原体解析に関するアンケートを実施し、解析の現状と方向性について調査した。

さらに、IS 法および MLVA 法の導入と手技の統一を目的として、標準プロトコルの作成について検討を行った。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株を関東ブロックの 11 施設に送付し、PFGE 法および IS 法の精度管理を行った。

1) 供試菌株

2016 年に東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 5 株を用いた (表 1)。

2) PFGE 法

各施設で実施しているプロトコルに従って PFGE を行い、撮影した写真を比較することにより解析を行った。

3) IS 法

各施設で実施しているプロトコルに従って IS を行い、想定されるサイズにバンドが認められた場合を「1」、認められない場合を「0」、判定が困難であった場合を「2」と記載し、その他のエキストラバンドが認められた場合には備考欄に記載し、これらのデータを比較することにより解析を行った。

2. アンケート

PFGE 法、IS 法および MLVA 法について、実施の有無と実施状況についてアンケート調査を実施した。同時に、分子疫学解析が食中毒等の解析に活用され、有用であった事例について調査を実施した。

3. IS 法の実践的プロトコルの作成

IS 法は迅速・簡便に解析を実施でき、施設間のデータ共有も容易であるが、泳動距離や染色濃度などマルチプレックス PCR 特有のコツも存在する。そこで、IS 法の実践的プロトコル作成を検討した。

4. MLVA 法導入に関する試み

昨年度のアンケート調査で、MLVA 法を実施している施設が 36.4%と低かったことから、MLVA 法導入と手技の統一に関する検討を行った。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた精度管理結果

1) PFGE 法

関東ブロック 10 施設で、共通菌株について PFGE 解析を実施した結果、各施設ともバンドの分離は良好であった。PFGE は、画像ファイルを用いて各施設の比較を行ったことから、映像が鮮明なものから若干不鮮明なものまで混在した (図 共通菌株の PFGE 像)。

2) IS 法

関東ブロック 11 施設で、共通菌株について IS 解析を実施した結果、Primer set 2 では全ての施設が同一の結果を報告した。これに対し Primer set 1 では、菌株 2 において 1 施設が判定困難を 1 か所報告した。また、

菌株 5 において、2,000bp より上の位置に非特異バンドが認められるが、記載があった施設は 8 か所であった（表 2 共通菌株の IS-Printing System 成績）。

2. アンケート結果

関東ブロック 11 施設を対象に、遺伝子解析法実施状況に関してアンケートを実施した結果、PFGE 法と IS 法は全ての施設が実施していると回答した。MLVA 法は 6 施設が実施していると回答し、未実施の 2 施設も今後導入に向けた検討を行うと回答した。

実施対象の株については、PFGE 法と IS 法は 6 施設が全ての株を実施、残り 4 施設は疫学的関連性を証明する際など必要に応じて一部の株について実施すると回答した。MLVA 法は 1 施設が全ての株を実施、残り 5 施設は疫学的関連性の証明時や、試験的導入等と回答した。

食中毒等の解析に分子疫学解析が活用され、有用であった事例についてアンケートを実施した結果、複数の施設から回答が寄せられた。内容として、他自治体にまたがる事例の解析時に効果があったとする報告が多かった（一部事例を後述する）。

3. IS 法の実践的プロトコルの作成

IS 法を実施している施設にアンケートを行い、操作時の注意点等について情報を収集した。これらを基に、IS 法実践的プロトコルの作成を行った（別添参照）。

4. MLVA 法導入に関する試み

MLVA 法は、感染研で作成されたプロトコルにより実施されている。今回、このプロトコルを基に、MLVA 法実施時に手元において確認しながら操作を実施できるよ

うなハンドブックの作成を検討した。関東ブロックで既に MLVA 法を導入している施設に、執筆および内容の確認を依頼することとし、今年度は作業分担について確認を行った。

D. 考察

病原体の分子疫学解析では、異なる検査施設での結果を比較し、判定する必要も出てくることから、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることは重要である。そこで、関東ブロック 11 施設全てで実施されている PFGE 法、IS 法について、今年度も共通菌株を用いた精度管理を実施した。菌株は、東京都で 2016 年に分離された O157 株を使用し、IS 法でエキストラバンドが少ない株と、特徴的エキストラバンドが出る株を取り混ぜて配布した。

PFGE 法の結果は、各施設ともバンドの分離は良好であったが、画像ファイルで比較を行うことから、画像の鮮明さでは若干不鮮明なものも認められた。

IS 法の結果、Primer set 1 の No.5 プライマーで、1 施設が判定困難の「2」と報告した（他 10 施設は「0」）。また、菌株 5 において、Primer set 1 では 2,000bp より上の位置にエキストラバンドが認められるが、記載があった施設は 8 か所であり、3 施設は報告が無かった。

アンケート調査の結果、昨年は 4 施設であった MLVA 法実施施設が、今年は 6 施設へと増加しており、未実施の内 2 施設も今後導入を検討すると回答した。IS 法や MLVA 法においては、検査結果が数値で表現可能なことから、別施設での検査結果をそのまま用いて判定することが可能で、PFGE 法の場合必要となる菌株の受け渡し

が不要である。平成 28 年 7 月から 8 月にかけて発生した「サトウキビジュース」による O157 感染事例のように、原因施設と患者が遠く離れている場合の疫学解析などに有用と考えられた。

平成 28 年度は高齢者施設でキュウリのゆかり和えにより、死者 10 名を出す O157 事件が千葉県と東京都で発生した。これら 2 つの事件は、同一の給食業者が同一メニューを提供していたことから同じ事件と推測され、分離菌株の分子疫学解析から同一と証明された。分子疫学解析が行政に活用された事例であるが、両検査施設での解析法が異なり、緊急で菌株の受け渡しが必要となったことから、今後に課題を残すものとなった。

E. 結論

共通菌株を用いた精度管理により、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが判明した。

アンケート調査の結果、各施設では分子疫学解析を行政活用した事例を数多く経験しており、他施設との共同により広域事例を明らかにした事例も多くあることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 平井晋一郎、横山栄二：腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8a 及び 8b における Stx2 産生性の比較、第 20 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 28 年 11 月、富山県

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

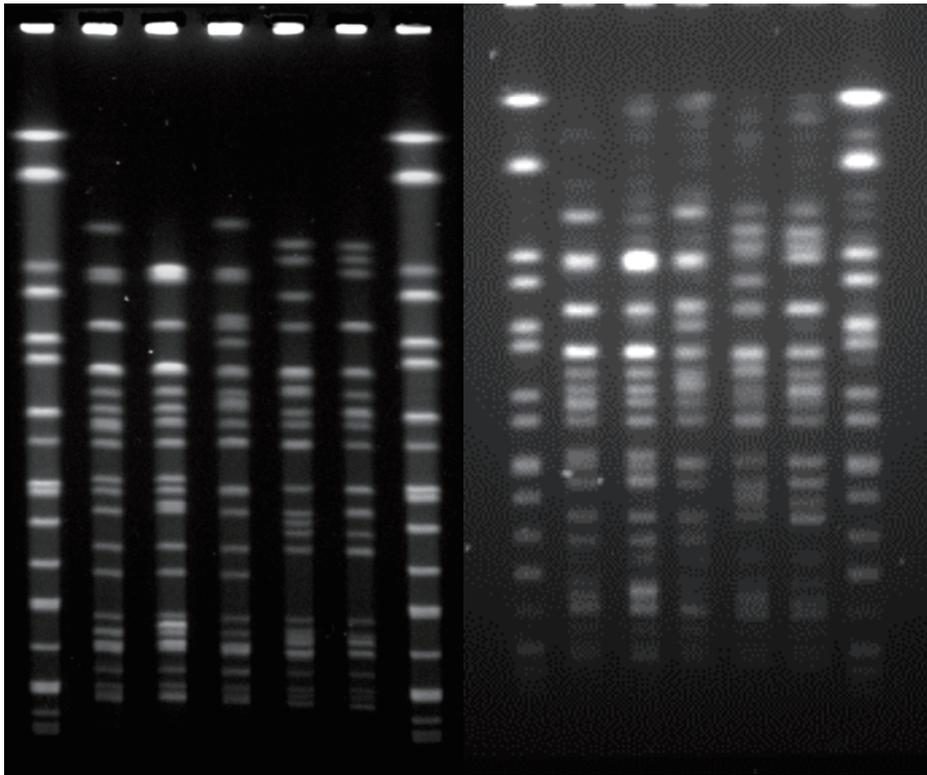
表 1 共通供試菌株 (2016 年分離腸管出血性大腸菌 O157 株)

No.	菌株No.	血清型	毒素型
1	EH5277	O157:H7	VT1+VT2
2	EH5353	O157:H7	VT1+VT2
3	EH5487	O157:H7	VT1+VT2
4	EH5572	O157:H7	VT2
5	EH5586	O157:H7	VT2

図 共通菌株の PFGE 像

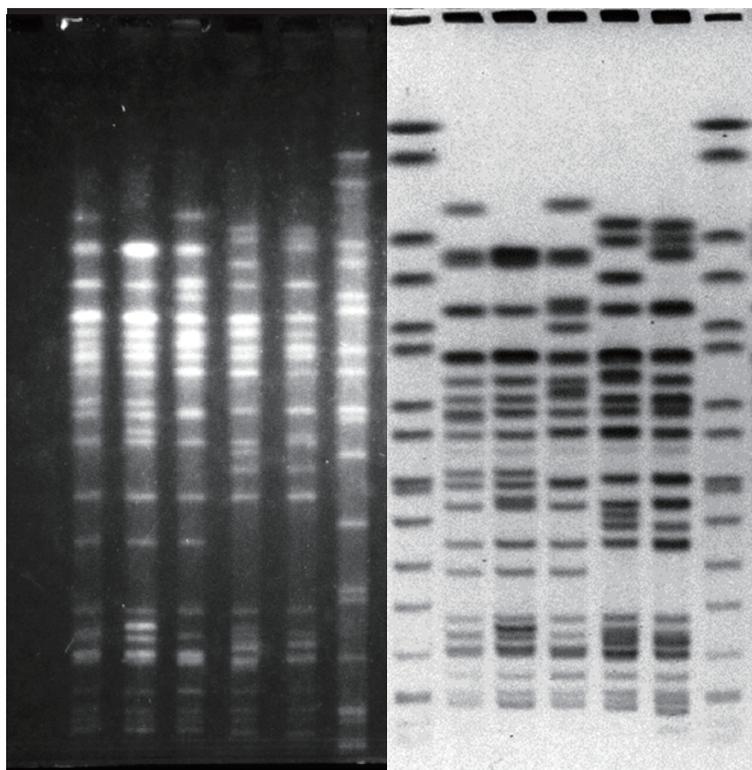
施設 A

施設 B



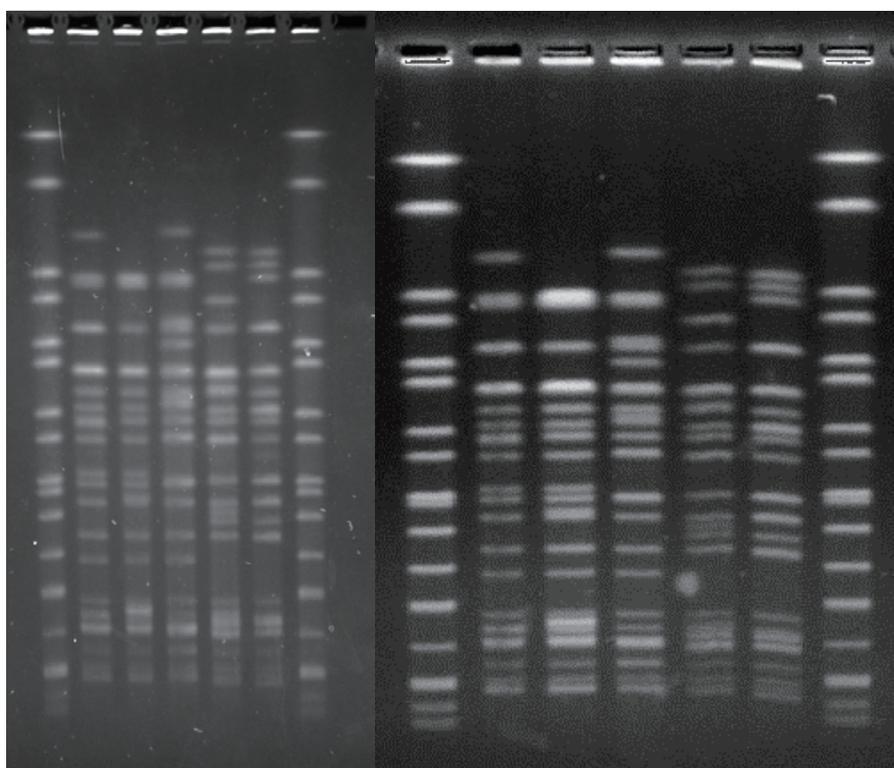
施設 C

施設 D



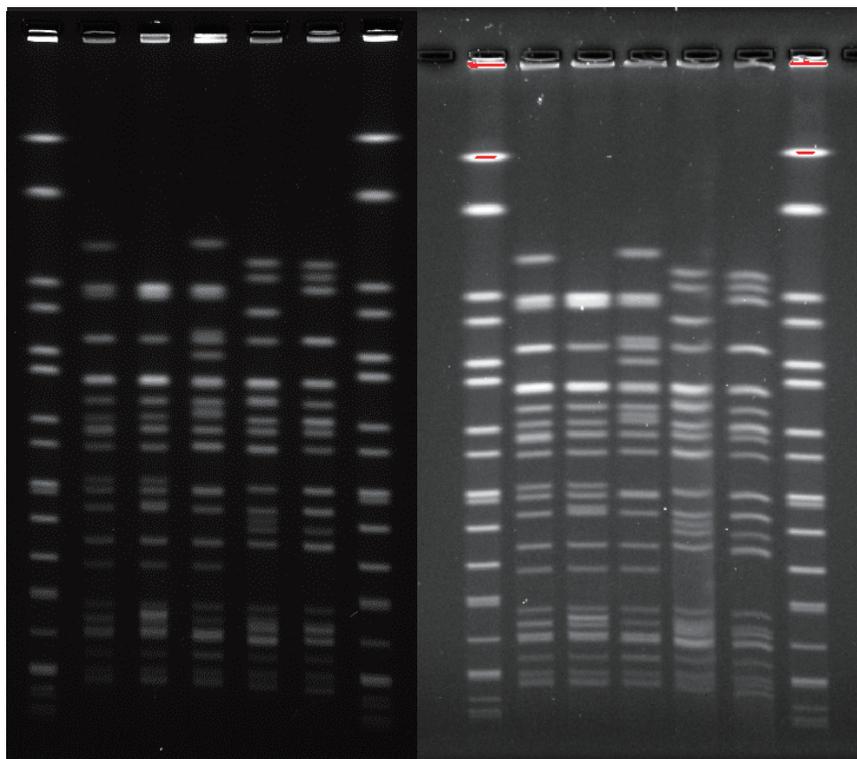
施設 E

施設 F



施設 G

施設 I



施設 J

施設 K

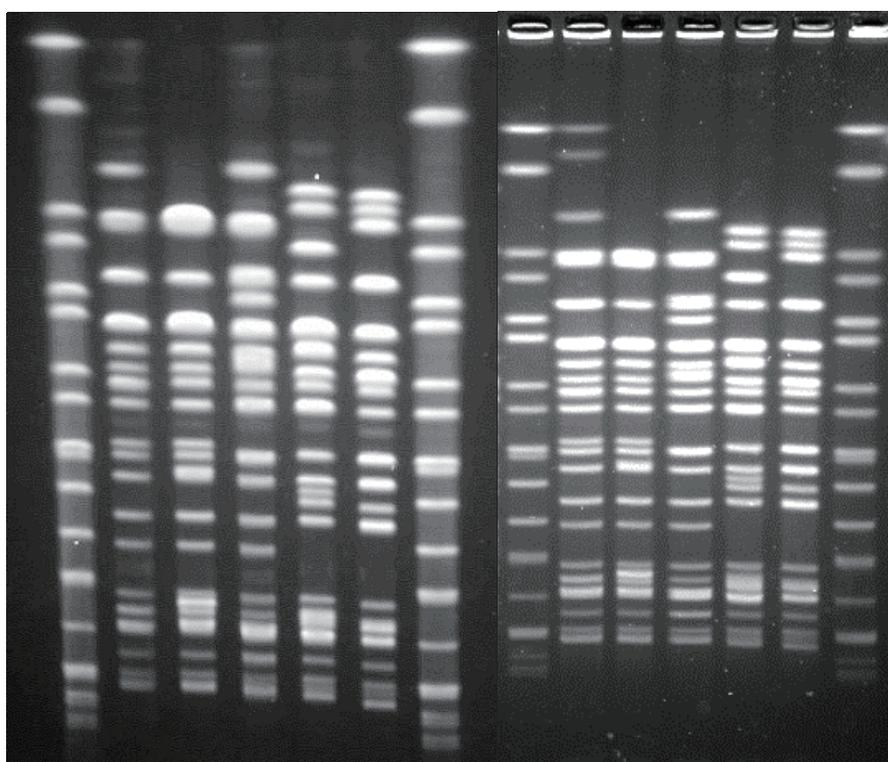


表2 共通菌株の IS-Printing System 成績

Primer set 1

菌株 1 から 3

施設	Primer No. 菌株No. (Accession)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	非特異 バンド	備考
		1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137		
A	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
B	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
C	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
D	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
E	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
F	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
G	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
H	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
I	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
J	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
K	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
施設	Primer No. 菌株No. (Accession)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	非特異 バンド	備考
		1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137		
A	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
C	2	1	0	1	1	2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
E	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
F	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
G	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
H	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
I	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
J	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
K	2	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		
施設	Primer No. 菌株No. (Accession)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	非特異 バンド	備考
		1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137		
A	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
B	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
C	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
D	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
E	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
F	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
G	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
H	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
I	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
J	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
K	3	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		

Primer set 1

菌株 4 と 5

施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	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	eae	1-16	hly	非特異 バンド	備考
		974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137		
A	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
C	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
E	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
F	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
G	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
H	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
I	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
J	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
K	4	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	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	eae	1-16	hly	非特異 バンド	備考
		974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137		
A	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
B	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	2900bp
C	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
D	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-06 無いワ ト →初案(D)	
E	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
F	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
G	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	>1000bp	
H	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
I	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	(>974bp)	
J	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1-01の上	
K	5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	大 1本	

Primer set 2

菌株 1 から 3

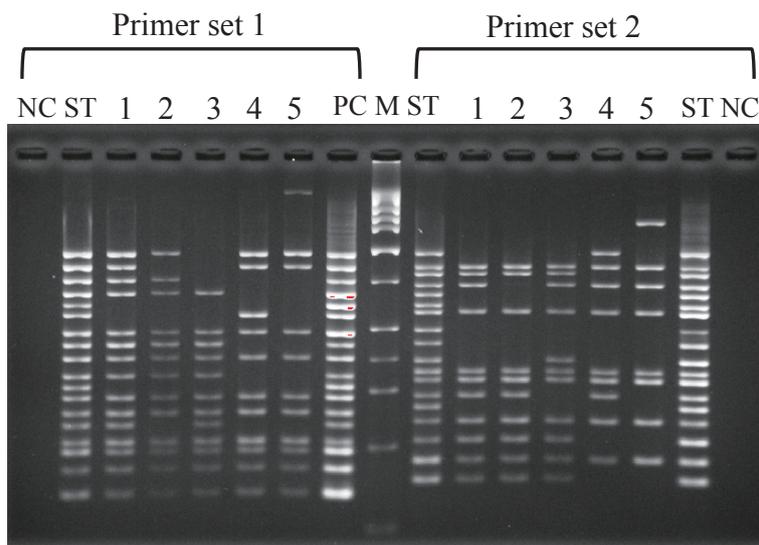
施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1	非特異 バンド	備考
		987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
A	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
B	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
C	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
D	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
E	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
F	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
G	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
H	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
I	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
J	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
K	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	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	非特異 バンド	備考
		987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
A	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
B	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
C	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
D	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
E	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
F	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
G	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
H	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
I	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
J	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
K	2	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	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	非特異 バンド	備考
		987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
A	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
B	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
C	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
D	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
E	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
F	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
G	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
H	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
I	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
J	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		
K	3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1		

Primer set 2

菌株 4 と 5

施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	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	非特異 バンド	備考
A	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
B	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
C	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
D	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
E	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
F	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
G	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
H	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
I	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
J	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
K	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		
施設	Primer No. 菌株No. (菌株)	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	非特異 バンド	備考
A	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0		01の上 にエキ ストラ ン ドあり。
B	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1370bp
C	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	>1000bp にあり	
D	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	2-01の 上	
E	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	2-01の 上	
F	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	有り	
G	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	>1000bp	
H	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	2-01の上	
I	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1(>987)	
J	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	2-01の上	
K	5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	大 1本	

図 共通菌株の IS 像



分子疫学解析が有効に活用された事例集

事例 1. 焼肉店で発生した食中毒疑い事例

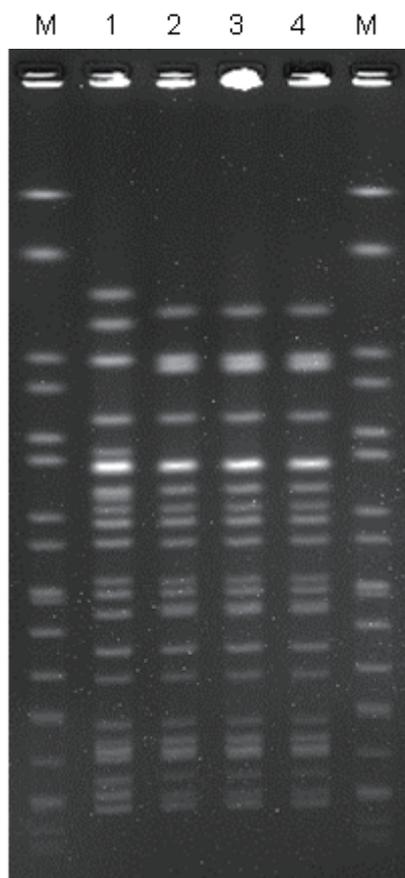
患者① 7月28日 Y市保健所に腸管出血性大腸菌感染症の届出が出された。患者は成人男性で、O157 (VT1&2 産生) が検出されており、血便を呈していた。この患者が市内の焼肉店を7月16日に利用していることが判明した。

患者② 8月3日 他自治体の保健所に腸管出血性大腸菌感染症の届出が出された。患者は小児で、O157 (VT1 産生) が検出されており、溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症していた。この患者が、患者①が利用した焼肉店を7月24日に利用していることが判明した。

この焼肉店について、食品12検体 (カルビ、レバー、ホルモン、ナムル等)、フキトリ14検体、調理従事者等糞便21検体について、腸管出血性大腸菌 O157 の検索を行ったところ、従業員2人から EHEC O157 : H7 (VT1&2 産生) が分離された。

なお、前出の患者菌株2名分について菌株を収集し、血清型及び毒素型を確認したところ、いずれも EHEC O157 : H7 (VT1&2 産生) であることが判明した。

これら4菌株について制限酵素 *Xba* I を用いて PFGE を行ったところ、患者①を除き同一の泳動パターンを示した。



- | | | |
|---|-------|--------|
| 1 | 患者① | (Y市) |
| 2 | 従業員 A | |
| 3 | 従業員 B | |
| 4 | 患者② | (他自治体) |

事例 2 - 1. 千葉県 I 市内の老人ホームで発生した EHEC O157 による集団食中毒

(平成 28 年 8 月 27 日)

I 市内の老人ホーム職員から管轄保健所に『先月 27 日から複数の入所者が下痢や血便等の症状を呈している。』と連絡あった。管轄保健所は、有症者の共通食が一つの給食施設が提供した食事に限られていたこと、有症者の便から EHEC O157 菌株が分離されたことから、当該給食施設を原因とする食中毒と判断した。

(9 月 1 日)

提供された給食に含まれていたキュウリの紫蘇和えからも EHEC O157 菌株が分離されたことから、この食品が原因だと明らかになった。同日、千葉県衛生研究所に、感染者由来の 9 菌株及びキュウリの紫蘇和え由来の 1 菌株の EHEC O157 が搬入され、これら菌株が Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA 法) で解析された。

(9 月 4 日)

感染者由来の 7 菌株とキュウリの紫蘇和え由来の 1 菌株は、解析した全ての遺伝子座位でリピート数が一致した。感染者由来の 2 菌株は、キュウリの紫蘇和え由来の菌株と 1 つの遺伝子座位のみでリピート数が異なっていた。しかし、同一食中毒由来の菌株であっても、僅かな遺伝子変異が認められる場合があることから、キュウリの紫蘇和えが原因食品であることが裏付けられた。

(9 月 10 日～12 日)

9 月 1 日、東京都が『東京都 H 市の老人ホームでも、当該給食施設が提供したキュウリの紫蘇和えにより EHEC O157 の集団食中毒が起きている。』と報道発表した。9 月 10 日、千葉県衛生研究所は、東京都の老人ホームで感染者及びキュウリの紫蘇和えから分離された EHEC O157 菌株の分与を受けた。9 月 12 日、これら菌株について MLVA 法を行ったところ、千葉県で分離された菌株と同一であることが確認された。なお、本事例における千葉県での最終的な感染者数は 44 名であった。

事例 2-2. 東京都 H 市内の有料老人ホームで発生した O157 食中毒について

2016 年 8 月 28 日、都内高齢者施設から「8 月 27 日から入居者 12 名が下痢、発熱、おう吐等を呈している」との連絡が保健所にあった。

発生年月：2016 年 8 月

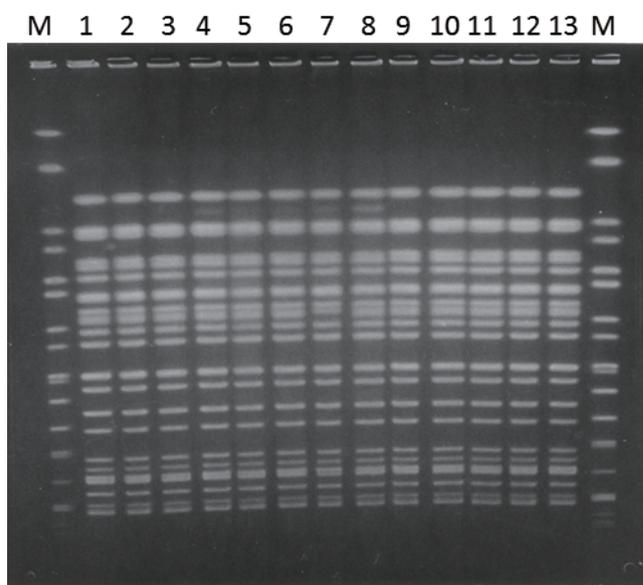
患者数：32 名

死亡者数：5 名

原因施設：高齢者施設

原因食品：きゅうりのゆかり和え（8 月 22 日夕食）

原因菌：腸管出血性大腸菌 O157 : H7（VT1+VT2 産生）



- 1~3 : 患者由来(東京都)
- 4 : きゅうりのゆかり和え由来(東京都)
- 5~7 : 千葉県患者由来
- 8 : きゅうりのゆかり和え由来(千葉県)
- 9~13 : 患者由来(東京都)

IS 法結果

1st set : 000100111101111111

2nd set : 011100100111001111

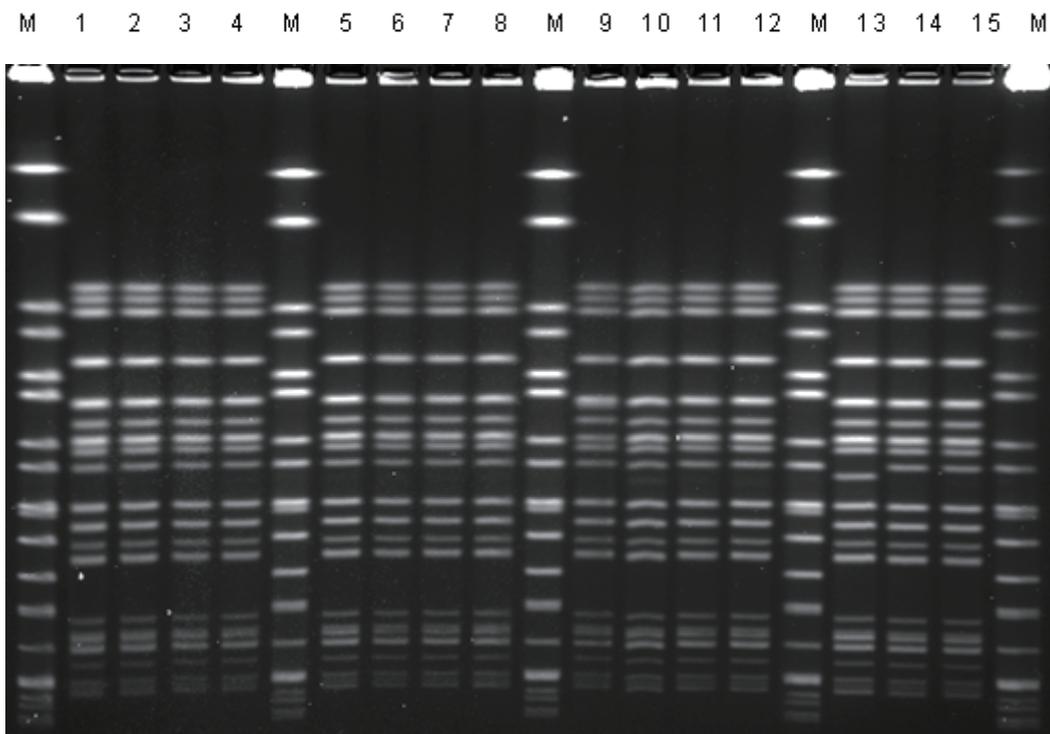
事例3-1. メンチカツを原因とした食中毒事例（横浜市）

10月31日 神奈川県衛生研究所より、県域でメンチカツの喫食歴がある EHEC O157 患者が増加しているとの情報提供があった。VT2 産生株が検出された患者は共通して、特定のメンチカツの喫食歴があるとのことで、IS-printing のコードおよび PFGE 画像を電子メールで提供していただいた。市内にも同一メーカーのメンチカツが販売されていることから10月に分離された EHEC O157（VT2 産生）株について IS-printing を行ったところ1人が同一の IS-printing type であった。この患者はメンチカツを喫食していることが後から判明した。

その後、このメンチカツについて、神奈川県で報道発表を行ったことから市内でも患者が増え、最終的にメンチカツ3検体と患者等12人から EHEC O157（VT2 産生）が検出された。

これら15菌株について制限酵素 *Xba* I を用いて PFGE を行ったところ、メンチカツ1検体は若干バンド位置が異なるものの15株は、ほぼ同一の泳動パターンを示した。

近隣の自治体と日頃から情報提供を行っていることから迅速に IS-printing と、PFGE への対応ができた事例であった。



1～12	患者、無症状病原体保有者
13～15	メンチカツ

事例3-2. メンチカツを原因とした食中毒事例（東京都）

東京都での患者発生状況

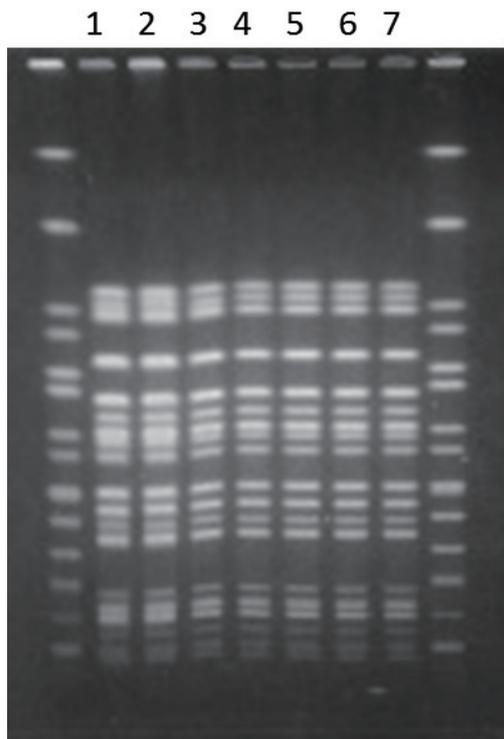
事例1： 患者数2名

藤沢市の実家で冷凍メンチカツを喫食後発症

2名から O157（VT2）を検出

事例2： 患者数1名 10月27日喫食

事例3： 患者数1名 HUS発症 O157に対する血中抗体価の上昇で診断（O157は検出せず）自宅に残されていた冷凍メンチカツから O157 検出



1. 散発患者
2. 散発患者
3. 散発患者
4. メンチカツ関連事例(事例2)
5. 冷凍メンチカツ由来
6. 神奈川県患者由来
7. 神奈川県食品由来

菌株：O157:H7(VT2産生)

事例 3-3. メンチカツを原因とした食中毒事例（千葉県）

平成 28 年 10 月 31 日、神奈川県が『ある製造業者が販売した冷凍メンチカツを調理して喫食した者から EHEC O157 菌株が分離され、分離疫学的解析法によりこれら菌株の遺伝子型が一致した。また、当該冷凍メンチカツの販売店は千葉県にもある。』と報道発表をした。

10 月 18 日、千葉県 I 市で、当該冷凍メンチカツを調理・喫食した者から EHEC O157 菌株が分離された。11 月 7 日に千葉県衛生研究所に当該菌株が搬入され、11 月 8 日に MLVA 法の解析が終了した。同日、国立感染症研究所に、神奈川県内で分離された EHEC O157 菌株の MLVA 法のレポート数を照会したところ、千葉県内で分離された菌株のレポート数と一致した。

以上より、千葉県の事例についても、冷凍メンチカツが感染源であることが明らかとなった。

別添

IS-printing System (TOYOBO) による腸管出血性大腸菌 O157 の解析法の 実用的プロトコル

IS-printing System は Primer, Master mix 等がキット化されており, 添付の取扱
い説明書に従って実施すれば解析結果を出すことが可能である。しかし, 判定
しやすいきれいな電気泳動像を得るためには, テンプレート DNA の作製方法や
泳動方法に関して多少の工夫が必要である。2014 年にパルスネット研究班関東
ブロックで実施した「IS-printing System 解析に関するアンケート結果」から各施
設で実施している方法を紹介し, 判定しやすい泳動像を得るためのコツをまと
めた。

1. PCR 用 Template の調製

1) 推奨法 (取扱説明書) : アルカリ溶解法

- (1) 大きさ 1mm 程度の菌体コロニーを 50 μ L の 25mM NaOH 水溶液に懸濁
- (2) 95°C で 5 分間加熱
- (3) 4 μ L の 1M Tris-HCl (pH7.0~8.0) を加えて中和
- (4) 12,000rpm で 5 分間遠心し, 上清 1 μ L を PCR のテンプレートとする

2) 都健安研法

- (1) TSB で 37°C 18~20 時間培養する
- (2) 菌液を滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈する
- (3) 100 μ L を 12,000rpm, 10 分間遠心し, 上清を除く
- (4) 100 μ L の 25mM NaOH 水溶液を加え懸濁
- (5) 100°C 10 分間加熱
- (6) 2/25M Tris-HCl (pH7.0~8.0) を 100 μ L 加えて中和
- (7) 12,000rpm 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) その他の DNA 濃度の調製方法

- (1) OD 値を測定
- (2) 滅菌 D.W. 100 μ L に 1~2 集落を懸濁

2. PCR 反応液の調製 (取扱説明書のとおり)

1) 1st set

滅菌蒸留水	20-x μ L
1 st primer set	5 μ L
2×Master mix	25 μ L

Template DNA	x μ L
合計	50 μ L
2) 2 nd set	
滅菌蒸留水	20-x μ L
2 nd primer set	5 μ L
2×Master mix	25 μ L
Template DNA	x μ L
合計	50 μ L

3. PCR サイクル条件 (取扱説明書のとおり)

96°C	2分	} 20 サイクル
96°C	20秒	
64°C	30秒	
68°C	1分	

4. 電気泳動

1) 電気泳動用アガロース

(1) 推奨法 (取扱説明書)

NuSieve GTG (2%) + SeaKem GTG (1%)

(2) その他の電気泳動用アガロース

- NuSieve GTG (1%) + SeaKem GTG (1%), 最終濃度 2%
- SeaKem Nusieve3.1 (3%)

2) 電気泳動用アガロースの作製方法

buffer は 0.5×TBE を使用

分離能を良くするために、劣化したアガロースは使用しないほうがよい。基本的には用時調整を推奨するが、やむをえない場合は作製してから数日間以内のものを使用する。

3) 電気泳動装置

泳動距離を長くしたほうが 1kb 付近のバンド間の距離が長くなり判定しやすくなる。通常の PCR 用アガロースゲルより大きいサイズを使用するなどの工夫をするとよい。

- Mupid
- Pico-2
- GelMate2000 など

4) 電気泳動時間

泳動距離を長くするためには、できるだけ長く泳動する。場合によっては泳動途中で電圧を切り変えることによってバンドの間隔をあけることもできる。

- ・ 45分～90分
- ・ 100分（50V50分，100V50分） など

泳動時の buffer の温度や室温によって泳動距離が変化するので，使用する Loading Dye の泳動位置を覚えておき，毎回一定の距離まできたら止めるようにする。

5) 電気泳動時の buffer の温度

あらかじめ冷やした buffer を使用することによってシャープなバンドを得ることができる。また泳動装置のまわりを氷で冷やしながら泳動を行っても判定しやすいバンドを得ることができる。しかし buffer に温度差が生じてしまい（周辺部は温度が低く，中心部は温度が高くなる），泳動像が歪んでしまう場合もあることから，注意が必要である。

6) 染色液

エチジウム・ブロミドの他，生体に対してより安全な GelRed や GelGreen も使うことができる。