

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 27～29 年度分担研究報告書

関東ブロックにおける腸管出血性大腸菌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	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	平井 昭彦	東京都健康安全研究センター
研究協力者	山城 彩花	茨城県衛生研究所
	山本 和則	茨城県衛生研究所
	桐谷 礼子	栃木県保健環境センター
	松井 重憲	群馬県衛生環境研究所
	小林 美保	群馬県衛生環境研究所
	中野 剛志	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	佐藤 孝志	埼玉県衛生研究所
	平井晋一郎	千葉県衛生研究所
	古川 一郎	神奈川県衛生研究所
	政岡 知佳	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	植松 香星	山梨県衛生環境研究所
	山上 隆也	山梨県衛生環境研究所
	関口 真紀	長野県環境保全研究所
	井川由樹子	長野県環境保全研究所
	松橋 平太	静岡県環境衛生科学研究所
山田 俊博	静岡県環境衛生科学研究所	
森主 博貴	静岡県環境衛生科学研究所	
小西 典子	東京都健康安全研究センター	
尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター	

研究要旨 異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、各施設の検査・解析レベルが一定以上であることが重要なことから、腸管出血性大腸菌 O157 共通菌株を用いた分子疫学解析法の精度管理を行い、各施設の技術レベルと信頼性向上を図った。PFGE 法、IS 法および MLVA 法について実施した結果、すべての施設で良好な結果であった。

O157 の 230 株を PFGE 法と IS 法で解析した結果、両法の型別能はほぼ同等と考えられた。

IS 法の実践的プロトコールを作成すると共に、地方衛生研究所全国協議会で作成した腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブックについて、執筆協力を行った。また、当該協議会で実施した MLVA 法技術研修会へ、講師および研修生として参加し、MLVA 法普及を目指した。

アンケート調査を実施した結果、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。また関東ブロックの研究協力施設では、すべての施設が PFGE 法と IS 法を実施しており、MLVA 法については実施施設数が年々増加していることが判明した。

A. 研究目的

食品媒介感染症が発生した際に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期解明と感染拡大防止である。腸管出血性大腸菌 (EHEC) やサルモネラによる食中毒では、散発的集団発生 (Diffuse Outbreak) が問題となる可能性があることから、早期解明は重要である。感染経路や原因食材・食品を特定するためには、患者や調理従事者、食材・食品等から分離された病原体の詳細な解析が必要である。EHEC の解析には、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法、IS-printing System (IS) 法や multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法等が用いられている。

Diffuse Outbreak では、自治体をまたがる患者の発生や、他自治体で実施した食品等からの分離株について、各地方衛生研究所での検査結果を比較し判定する必要がある。異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、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。また近年は地研の職員も、異動により部署が変わることが多くあることから、技術水準を一定以上に保つ取り組みが必要とされている。

このことから、各地研の技術向上と技術水準を一定以上に保つことを目的として、共通菌株を用いた定期的な精度管理調査を実施した。また、異動等により職員が変わっ

た際にもこれらの試験法が速やかに習得できるよう、実践的プロトコールやハンドブック作成などの検討を行った。

さらに、分子疫学解析を用いた病原体解析の現状と方向性について検討資料とすることを目的に、解析事例について情報収集すると共に、分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査を行った。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 株を関東ブロックの 11 施設 (2017 年度は 10 施設) に送付し、PFGE 法、IS 法および MLVA 法の精度管理を行った。なお、MLVA 法は 2017 年度から実施し、希望参加型とした。

1) 供試菌株

東京都内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 を、2015 年度と 2016 年度は 5 株、2017 年度は 4 株用いた。

2) PFGE 法

各施設で実施しているプロトコールに従って PFGE 法を行い、撮影した写真をファイル化しメール添付で送付後、目視比較することにより解析を行った。

3) IS 法

キット付属のプロトコールに従って IS 法を行い、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。

4) MLVA 法

地研全国協議会で 2017 年に実施した MLVA 法研修会に参加し、技術水準の一定化を目指した後に各施設で MLVA 法を行った。得られたデータは、リポート数への換算の有無を問わずに収集し、数値を比較することにより解析を行った。

2. EHEC の PFGE 法による解析

2015 年に東京都内で分離された O157 の 233 株、O26 の 49 株を供試し、国立感染症研究所プロトコールにより PFGE 法を行った。電気泳動後、100kb 以上のバンドを対象として目視で型別を行った。

3. EHEC O157 の IS 法による解析

2015 年に東京都内で分離され PFGE 解析を実施した O157 株のうち 230 株を供試し、IS 法により型別を行った。

4. IS 法の実践的プロトコール作成

IS 法は迅速・簡便に解析を実施できるが、マルチプレックス PCR を用いることから、テンプレート DNA の作製や電気泳動方法等について多少の工夫が必要となる。2014 年に、関東ブロックの研究協力施設で実施したアンケート調査結果を基に、IS 法の実践的プロトコール作成を検討した。さらに、電気泳動後のバンドの有無を判定しやすい条件について、泳動時間、泳動温度、分子量マーカーの位置等について検討を行った。

5. MLVA の実践的プロトコール作成 (執筆協力)

2017 年に地研全国協議会で、MLVA 法の実践的プロトコール(ハンドブック)の作成を企画していたことから、執筆と内容の校正について協力を行った。

6. MLVA 法の普及啓発 (研修会への参加)

地研全国協議会で、作成したハンドブックを用いた MLVA 法研修会を企画していたことから、研修講師として協力を行うと共に、関東ブロックの研究協力者を研修生として参加させ、MLVA 法の普及を試みた。

7. 集団事例、散発事例など、分離された菌株の分子疫学解析を実施した事例について情報収集

分子疫学解析を活用して解析した事例について、関東ブロック内の研究協力施設へ情報収集を行った。

8. 分子疫学解析の実施状況についてアンケート調査

PFGE 法、IS 法および MLVA 法の実施状況について、関東ブロック内の研究協力施設へアンケートを行った。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた PFGE 法、IS 法、MLVA 法の精度管理結果

1) PFGE 法

共通菌株を用いて PFGE 法を行った結果、3 年間ともいずれの施設もシャープなバンドが得られていた。しかしながら、画像ファイルで若干不鮮明なものも毎年散見した。元画像の問題かファイル解像度の問題と考えられた。(図 1)

2) IS 法

IS法の解析を実施した結果、3年間ともいずれの施設も良好な結果であった。しかし、2015年には *hly* 遺伝子が検出できない施設が1施設あり、またエキストラバンドを誤判定した施設が毎年1~2施設あった。

3) MLVA 法

2017年に、希望参加としてMLVA法も精度管理を実施したところ、8施設が参加した。参加施設すべてが良好な結果であった。(表1)

2. EHEC の PFGE 法による解析

PFGE解析を行った結果、O157の233株は86パターンに分類され、O26の49株は25パターンに分類された。

3. EHEC O157 の IS 法による解析

IS法解析を行った結果、O157の230株は75パターンに分類された。

4. IS 法の実践的プロトコール作成

電気泳動方法について検討を行った結果、分子量マーカーとしてTraclIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen) を用い、キシレンシアノール(青色色素)の位置がアガロースの下から約2cmのところまで泳動を終了すると、判定しやすいバンド感覚が得られることが判明した。

アンケート調査結果を集計し、実践的プロトコールの作成を行った。(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ール」)

5. MLVA の実践的プロトコール作成 (執筆協力) 結果

関東ブロック2施設が、「PCR反応物のシ

ーケンサーを用いた電気泳動」と「MLVA型別における異同判定の考え方」部分の執筆を行った。また、全体の校正について関東ブロック2施設が協力を行った。これらの協力の結果、「腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック (O157、O26、O111 編)」が完成し、2017年10月13日に実施された研修会で使用されると共に、11月30日には地研ネットワークのホームページへアップされた。

(<http://www.chieiken.gr.jp/index.html>)

6. MLVA 法の普及啓発 (研修会への参加) 結果

2017年10月13日に、地研全国協議会、保健疫学情報部会により東京都健康安全研究センターで開催された「平成29年度腸管出血性大腸菌 MLVA 技術研究会」に、本研究班の研究代表者と、関東ブロック2施設が研修講師として協力を行った。また、関東ブロック8施設の研究協力者が研修生として参加し、MLVA法について普及啓発が行われた。研修会終了後、共通菌株を用いたMLVA法精度管理を関東ブロックで実施したところ、8施設の参加があった。

7. 集団事例、散発事例など、分離された菌株の分子疫学解析を実施した事例について 情報収集結果

分子疫学解析を活用した事例については、毎年PFGE法、IS法およびMLVA法を行政活用した事例が報告され、各施設は多くの事例を経験していることが判明した。(一部事例を別紙「分子疫学解析が有効に活用された事例集」に後述)

8. 集団事例、散発事例など、分離された菌株の分子疫学解析を実施した事例について

アンケート調査結果

アンケートの結果、PFGE法とIS法は3年間とも全施設が実施していることが判明した。MLVA法は2015年が4施設、2016年が6施設、2017年が7施設と実施施設が増加した。実施規模については、全菌株を実施している施設と一部菌株を実施している施設数が年により変動した。(表2)

D. 考察

2015年から2017年の3年間で、研究協力施設11施設のうち担当者の変更があったものは6施設あり、このうち2施設は毎年担当者の変更があった。近年は地研の職員も、異動により部署が変わることが多くあり、技術レベルを一定以上に保つための取り組みが必要と考えられた。特に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。

そこで本研究では、各地研の技術向上と技術水準を一定以上に保つことを目的として、関東ブロックの研究協力施設で共通菌株を用いた精度管理を実施した。

菌株は、東京都で各年に分離された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法の結果は概ね良好であったが、画像が若干不鮮明なものが認められた。元画像の問題か、ファイル解像度の問題かは不明であったが、PFGE法は画像ファイルを用いて解析を行うことから、バンドの分離が確認できる映像が必要と考えられた。

IS法の結果も各施設良好であった。しかしながら、*hly* 遺伝子が検出できなかった施設

や、エキストラバンドを誤判定した施設、またエキストラバンドの報告が無い施設等があった。

MLVA法の精度管理試験を施行した結果、8施設の参加があり、結果は各施設とも良好であった。

EHECをPFGE法およびIS法で解析した結果、O157株はPFGE法では86パターンに、IS法では75パターンに分類されたことから、両者の型別能はほぼ同等であることが判明した。

各施設でIS法について実施している方法についてのアンケート調査結果を集計し、実践的プロトコルの作成を行った。

MLVA法普及を目的として、ハンドブックの作成と研修会への協力を実施した。両者とも地研全国協議会で企画された事業であった。当研究班で、ハンドブックの執筆・校正に協力し、現場で活用可能なハンドブックを完成させた。またこのハンドブックを用いた研修会へ、研修講師として、あるいは研修生として参加し、MLVA法の普及と技術レベルの向上を行った。

アンケート調査の結果、分子疫学解析を有効に活用した事例では、他自治体で発症した患者由来株との比較などに有効に活用されていることが判明した。

また、関東ブロック内ではPFGE法とIS法は全施設が実施しており、MLVA法は2015年には4施設(11施設中)であったものが2017年には7施設(10施設中)へと増加していることが判明した。

E. 結論

共通菌株を用いた精度管理により、PFGE法、IS法およびMLVA法の検査・解析レベルが一定以上であることが判明した。

IS 法の実践的プロトコール作成を行った。
MLVA 法ハンドブックの作成に執筆協力を、研修会へ講師および研修生として参加を行い、MLVA 法の普及を図った。

アンケート調査の結果、分子疫学解析を行政活用した事例を各施設で経験していることが判明した。MLVA 法実施施設数が増加していることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) 市川健介、小西典子、甲斐明美他：生サラダが原因と推定されたチフス菌による食中毒事例—東京都、病原微生物検出情報 (国立感染症研究所)、36、162-163、2015
- 2) 関口真紀、笠原ひとみ、粕尾しず子、中沢春幸：知的障害者施設においてインフルエンザウイルスおよび肺炎球菌による重複感染が認められた集団事例、第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016 年 2 月、静岡県
- 3) 松下明子、倉園貴至、砂押克彦、青木敦子：2015 年に発生した腸管出血性大腸菌 O26 について、第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会、2016 年 2 月、静岡県
- 4) 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
- 5) Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Taku Wakui, Taichiro Ishige, Masaki Nakamura :

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 subclade 8b strains in Chiba Prefecture, Japan, produced larger amounts of Shiga toxin 2 than strains in subclade 8a and other clades. PLOS ONE. 2018. 13(1): e0191834.

- 6) 平井晋一郎、横山栄二、涌井拓、石毛太一郎、中村正樹、蜂巢友嗣、遠藤幸男、村上覚史：腸管出血性大腸菌 O157 の subclade 8b における高病原性菌株について、第 38 回 日本食品微生物学会学術総会 (2017)
- 7) 小西典子、畠山薫、原田幸子、神門幸大、尾畑浩魅、赤瀬悟、森功次、門間千枝、平井昭彦、甲斐明美、貞升健志：遡り調査で明らかとなった VT2f 産生 *Escherichia albertii* による集団事例と散发事例からの検出状況、第 21 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2017、鹿児島県

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 共通菌株の PFGE 像

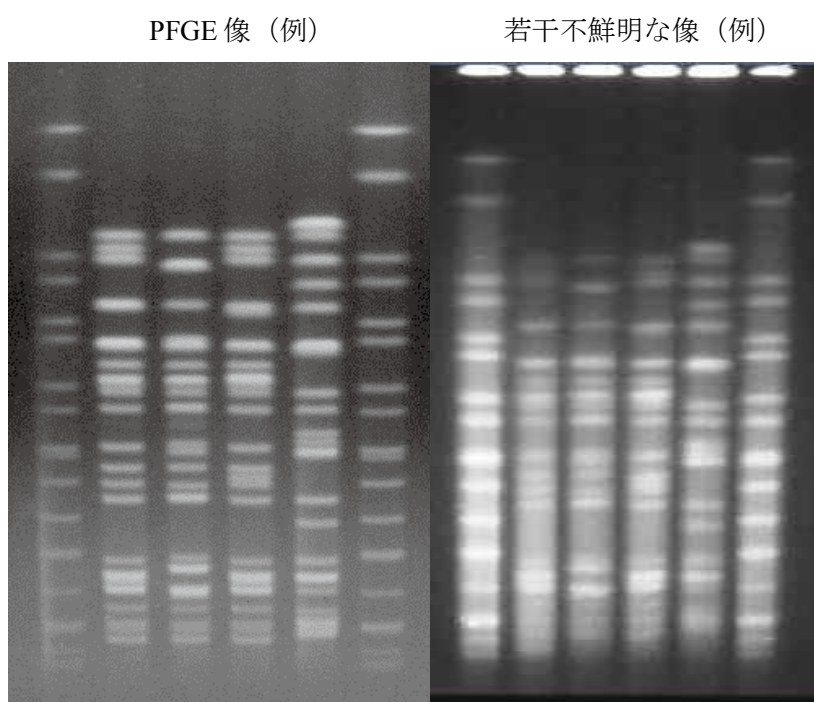


図2 共通菌株の IS 像

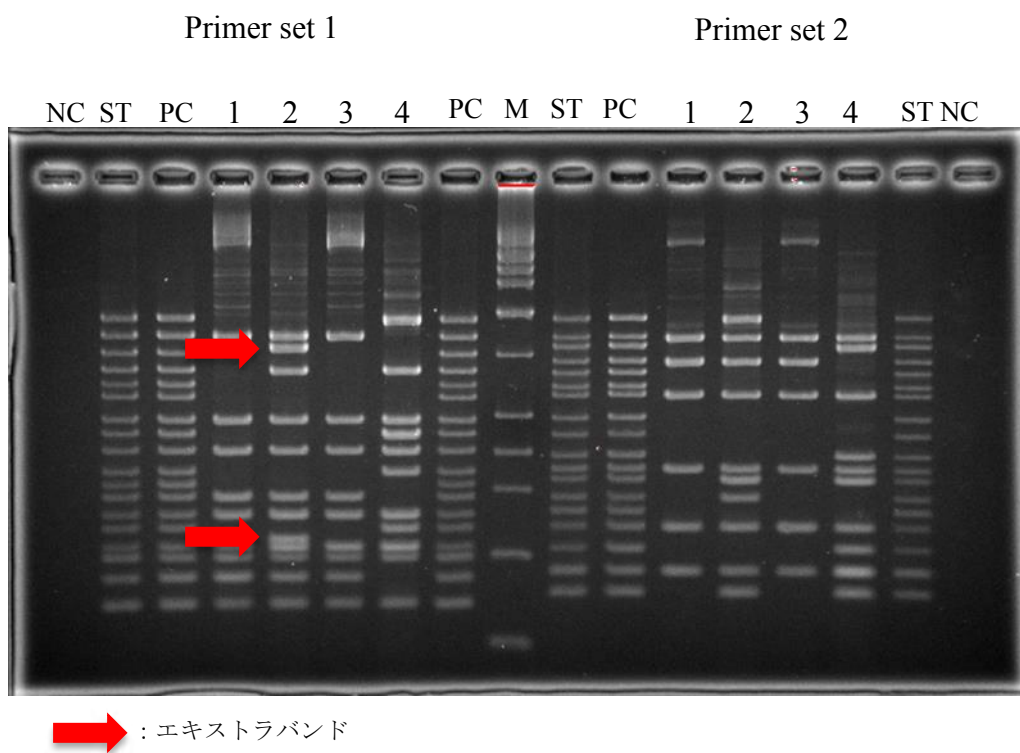


表1 共通菌株の MLVA 成績
菌株 1

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	9	9	9	9	296.00	257.8, 297.6	9	9	9
EHC-1	70-210	VIC	緑	11	11	11	11	134.44	135.6	11	11	11
EHC-2	220-460	VIC	緑	5	5	5	5	239.20	240.1	5	5	5
O157-9	480-600	VIC	緑	13	13	13	13	538.18	537.8	13	13	13
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	11	11	11	11	383.41	386.6	11	11	11
O157-25	120-200	PET	赤	4	4	4	4	132.33	132.6	4	4	4
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.21	235.6	1	1	1
EH157-12	400-470	PET	赤	6	6	6	6	439.36	444.7	6	6	6
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	422.47	427.8	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	4	4	4	4	137.56	142.3	4	4	4
O157-10	370-700					20	20	465.49				
O157-36	120-240	NED	黄	9	9	9	9	160.53	161.1	9	9	9
O157-19	260-340	NED	黄	7	7	7	7	307.82	310.2	7	7	7
EHC-6	400-650	NED	黄	null	-2	0	-	-	567.6	0	-2	
O157-37	80-240	PET	赤	6	6	6	6	114.69	117.2	6	6	6
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-		0	-2	

菌株 2

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	10	10	10	10	312.16	315.4, 365.0	10	10	10
EHC-1	70-210	VIC	緑	5	5	5	5	98.37	99.9	5	5	5
EHC-2	220-460	VIC	緑	5	5	5	5	239.43	239.9	5	5	5
O157-9	480-600	VIC	緑	9	9	9	9	515.36	514.5	9	9	9
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	18	18	18	18	426.95	428.4	18	18	18
O157-25	120-200	PET	赤	2	2	2	2	118.78	121.2	2	2	2
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.26	235.5	1	1	1
EH157-12	400-470	PET	赤	4	4	4	4	422.22	427.4	4	4	4
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	422.63	427.7	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	12	12	12	12	188.01	192.0	12	12	12
O157-10	370-700					25	25	495.67				
O157-36	120-240	NED	黄	4	4	4	4	124.71	126.8	4	4	4
O157-19	260-340	NED	黄	7	7	7	7	307.86	310.2	7	7	7
EHC-6	400-650	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-37	80-240	PET	赤	7	7	7	7	120.60	123.1	7	7	7
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-		0	-2	

菌株 3

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	9	9	9	9	296.48	297.6	9	9	9
EHC-1	70-210	VIC	緑	11	11	11	11	134.47	135.6	11	11	11
EHC-2	220-460	VIC	緑	5	5	5	5	239.18	240.1	5	5	5
O157-9	480-600	VIC	緑	12	12	12	12	532.64	532.0	12	12	12
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	11	11	11	11	383.94	386.6, 428.6	11	11	11
O157-25	120-200	PET	赤	4	4	4	4	130.54	132.5	4	4	4
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.34	235.6	1	1	1
EH157-12	400-470	PET	赤	6	6	6	6	441.62	444.9	6	6	6
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	425.95	427.9	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	4	4	4	4	136.93	142.2, ※ 522	4	4	4
O157-10	370-700					21	21	473.24				
O157-36	120-240	NED	黄	9	9	9	9	160.56	161.1	9	9	9
O157-19	260-340	NED	黄	7	7	7	7	309.99	310.3	7	7	7
EHC-6	400-650	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-37	80-240	PET	赤	6	6	6	6	117.00	117.2	6	6	6
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-		0	-2	

菌株 4

Locus	size	Dye	色	A	B	C	D		E	F	I	J
O157-34	140-520	FAM	青	12	12	12	12	348.33	351.5	12	12	12
EHC-1	70-210	VIC	緑	5	5	5	5	98.45	100.0	5	5	5
EHC-2	220-460	VIC	緑	4	4	4	4	232.90	233.9	4	4	4
O157-9	480-600	VIC	緑	17	17	17	17	561.97	561.3	17	17	17
EHC-5	120-240	NED	黄	null	-2	0	-	-		0	-2	
O157-3	330-470	NED	黄	9	9	9	9	371.88	327.3, 374.6	9	9	9
O157-25	120-200	PET	赤	5	5	5	5	136.21	138.3	5	5	5
EH111-8	230-350	PET	赤	1	1	1	1	236.32	235.5	1	1	
EH157-12	400-470	PET	赤	4	4	4	4	421.94	427.6	4	4	4
EH111-14	150-170	FAM	青	null	-2	0	-	-		0	-2	
EH111-11	420-450	FAM	青	2	2	2	2	426.00	427.8	2	2	2
O157-17	130-220	VIC	緑	8	8	8	8	166.68	167.2	8	8	8
O157-10	370-700					25	25	497.44				
O157-36	120-240	NED	黄	7	7	7	7	144.92	147.2	7	7	7
O157-19	260-340	NED	黄	6	6	6	6	304.15	304.4	6	6	6
EHC-6	400-650	NED	黄	20	20	20	20	555.09	557.7	20	20	20
O157-37	80-240	PET	赤	3, 15	3	3	15	169.37	98.9, 170.9	3	3	15
EH26-7	270-430	PET	赤	null	-2	0	-	-	※ 520.2	0	-2	

表2 分子疫学解析実施施設数

	実施施設数		
	2015年	2016年	2017年
PFGE法	11 (100%)	11 (100%)	10 (100%)
IS法	11 (100%)	11 (100%)	10 (100%)
MLVA法	4 (36.4%)	6 (54.5%)	7 (70.0%)

	全株について実施 (施設数)		
	2015年	2016年	2017年
PFGE法	6 (54.5%)	6 (54.5%)	3 (30.0%)
IS法	6 (54.5%)	6 (54.5%)	6 (60.0%)
MLVA法	2 (18.2%)	1 (9.1%)	3 (30.0%)

	一部の株について実施 (施設数)		
	2015年	2016年	2017年
PFGE法	5 (45.5%)	5 (45.5%)	7 (70.0%)
IS法	5 (45.5%)	5 (45.5%)	4 (40.0%)
MLVA法	2 (18.2%)	5 (45.5%)	4 (40.0%)

(別紙) 分子疫学解析が有効に活用された事例集

事例 1 - 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

(2016 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 1 - 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

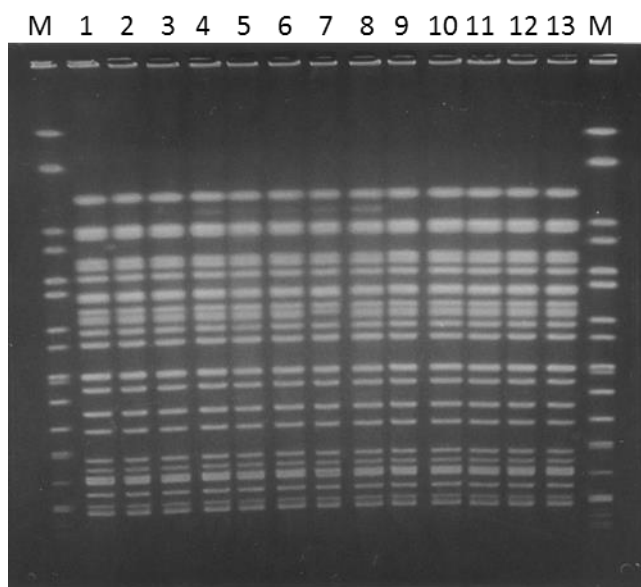
患者数：32 名

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

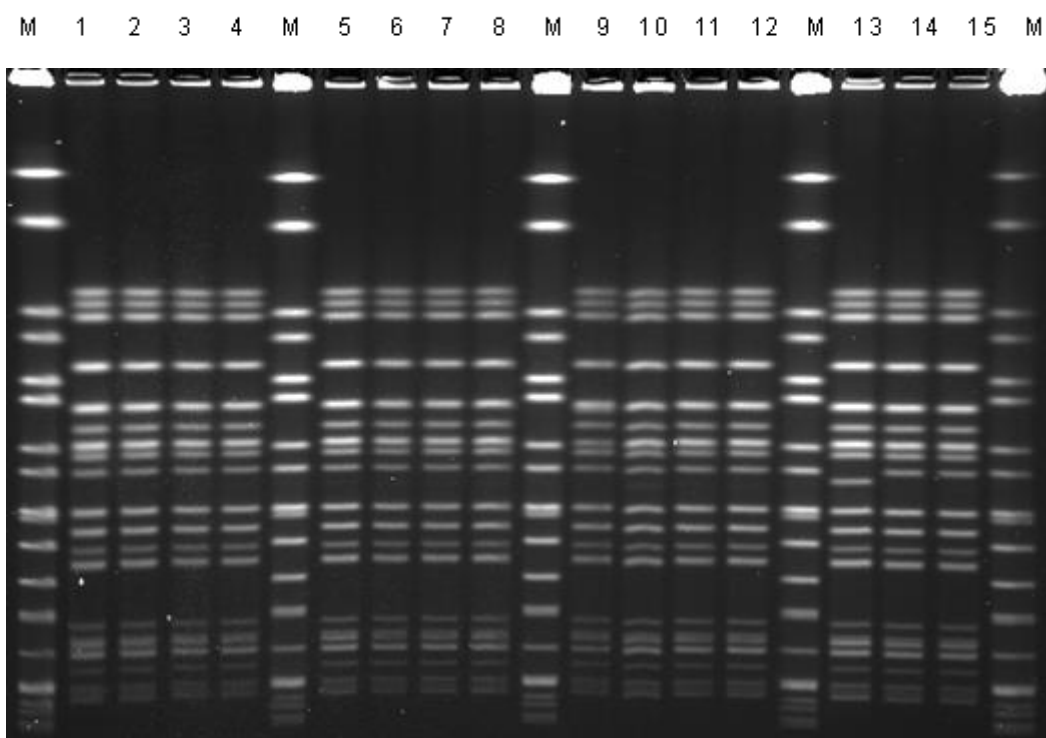
事例 2-1. メンチカツを原因とした食中毒事例（横浜市）

平成 28 年 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 2-2. 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

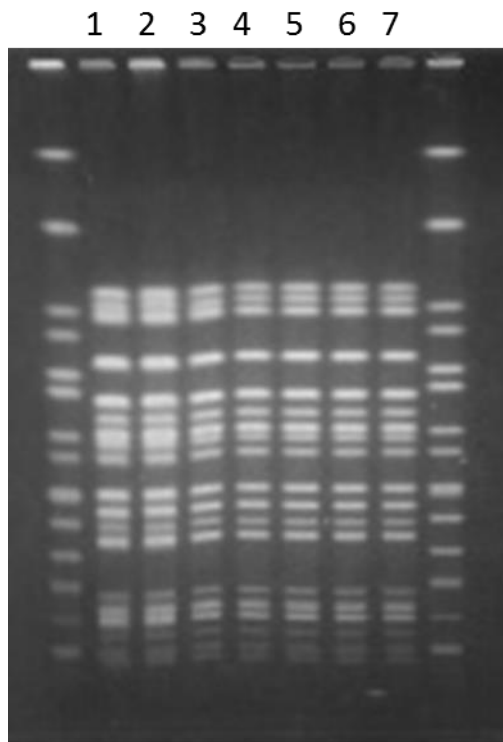
事例 1: 患者数 2 名

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 2-3. 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ール

IS-printing System は Primer, Master mix 等がキット化されており, 添付の取扱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 beffer 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。