

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の解析手法及び共有化システムの構築のための研究」

令和 2 年度分担研究報告書

九州ブロックの菌株解析及び精度管理に関する研究

—IS 型データベースの運用、EHEC 検出状況、集団発生事例の集約及び精度管理 (PFGE、ISPS 及び MLVA) —

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所
研究分担者	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
研究協力者	阿部有利	福岡市保健環境研究所
	藤崎道子	北九州市保健環境研究所
	瀧下恵里子	佐賀県衛生薬業センター
	右田雄二	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
	溝腰朗人	大分県衛生環境研究センター
	前田莉花	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
	宮原聖奈	宮崎県衛生環境研究所
	上村晃秀	鹿児島県環境保健センター
	大山み乃り	沖縄県衛生環境研究所
	カール由起	福岡県保健環境研究所
	片宗千春	福岡県保健環境研究所

要旨

九州ブロックでは、①IS-printing System (以下「ISPS」という。) による IS 型データベースの運用、②腸管出血性大腸菌 (以下「EHEC」という。) 検出状況の解析、③EHEC による集団発生事例の集約及び④精度管理の 4 項目について取り組んだ。

九州ブロックにおける腸管出血性大腸菌 0157 (以下「0157」という。) の IS 型の登録数は、令和 3 年 2 月 10 日現在で 2,157 件であり、令和 2 年度は 101 件の登録であった。令和 2 年度に九州ブロックで収集された EHEC は 385 株であった。その 0 群血清型の内訳は 0157 が 154 株と最も多く、腸管出血性大腸菌 026 (以下「026」という。) が 81 株、腸管出血性大腸菌 0111 (以下「0111」という。) が 14 株の順であった。令和 2 年度の EHEC による集団発生事例は 17 事例であった。その 0 群血清型の内訳は、0157 によるものが 7 事例と最も多く、026 によるものが 6 事例、0103 によるものが 2

事例、腸管出血性大腸菌 0121 によるものが 1 事例、腸管出血性大腸菌血清型別不能によるものが 1 事例であった。精度管理は、パルスフィールド・ゲル電気泳動法（以下「PFGE」という。）を必須項目とし ISPS 及び Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis（以下「MLVA」という。）については、それぞれの地方衛生研究所（以下「地衛研」という。）の実情に合わせて選択項目とした。PFGE、ISPS 及び MLVA の精度管理において、一部誤判定がみられた。今後、EHEC の分子疫学解析手法が MLVA に移行すること、及び地衛研によっては人事異動等で職員の入れ替わりにより技術の継承が困難になっていることを考慮すると、MLVA の継続的な精度管理及び研修が必要と考えられる。

A. 研究目的

食中毒や感染症等の集団発生事例において、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。平成 26 年度以降、0157、026 及び 0111 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、国立感染症研究所から MLVA により情報還元が開始された。令和 2 年 11 月 30 日の時点で、九州ブロックでは MLVA を実施している地衛研は 5 施設であり、ほとんどの地衛研において、EHEC の遺伝子型別解析は PFGE を用いて実施されている。また、九州ブロックでは、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 ISPS 法を用いて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。本研究では、遺伝子型別法の信頼性を確保するため、PFGE、ISPS 及び MLVA の精度管理を実施した。また、EHEC

の検出状況、集団発生事例及び ISPS のデータベースの運用状況についても集約した。

B. 研究方法

B-1. IS 型データベースの運用状況

IS 型は、Insertion sequence の分布に由来する 32 種の増幅バンド（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。また、得られた 36 種類の遺伝子座のコードから BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用いて Minimum spanning tree (MST) 解析を行った。

B-2. 九州ブロックの EHEC 検出状況、集団発生事例及び分子疫学解析法の実施状況

EHEC の検出状況、集団発生事例及び分子疫学解析法の実施状況については、九州ブロックの各地衛研から得られた情報を集約した。

B-3. 精度管理

精度管理は、PFGE を必須項目とし ISPS 及び MLVA については、選択項目とした。本年

度の精度管理は、PFGE と ISPS は同じ電気泳動像を示すが、MLVA では異なる遺伝子型を示す株を確認することを目的とし、0157 の 4 株を参加地衛研に配布した（表 1）。PFGE の精度管理は、配布した 4 株のうちの 1 株に対する関連性を PFGE により明らかにするように問題を作成した（図 1）。結果は問題に対する回答と電気泳動写真の提供を受けた。ISPS の精度管理は、それぞれの遺伝子座の有無と電気泳動写真の提供を受けた。MLVA の精度管理は、それぞれのローカスにおけるリピート数の提供を受けた。試験方法については、各地衛研が通常行っている方法にて行った。

C. 研究結果及び考察

C-1. IS 型データベースの運用状況

平成 22 年 4 月 1 日から令和 2 年 12 月 28 日までの九州ブロックにおける 0157 の IS 型の登録数は 2,157 件であり、平成 29 年度以降は減少傾向にある（表 2）。平成 29 年度以降、ISPS のデータベースに登録する地衛研が減少しているためと考えられることから、今後、ISPS の運用方法について見直す必要があると考えられる。

登録された 2,157 件の 0157 の IS 型数は 402 種類に分類された。最も多く登録されている IS 型は「66324257743」で 218 株（10.1%）が九州ブロックの全ての地衛研から登録された（表 3）。また、MST 解析の結果から、IS 型の 0157 が分離された地域による差は認められなかったが、分離された時期による偏りは確認された（図 2.1、2.2）。

C-2. 九州ブロックの EHEC 検出状況

九州ブロックの地衛研における EHEC の 0 群血清型の検出状況について解析した。

令和 2 年 4 月 1 日から 12 月 28 日までに 385 株の EHEC 菌株が収集され（表 4）、その主な 0 群血清型の内訳は 0157 が 154 株（40.0%）、026 が 81 株（21.0%）、0103 が 50 株（13.0%）、0121 が 25 株（6.5%）、0111 が 14 株（3.6%）であった。九州ブロックで収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年どおり 0157、026、0103、0121 及び 0111 で全体の 8 割を占めていた。

C-3. EHEC による集団発生事例

令和元年度の EHEC による集団発生事例は 17 事例であった（表 5）。その 0 群血清型の内訳は、0157 によるものが 7 事例、026 によるものは 6 事例、0103 によるものが 2 事例、0121 によるものが 1 事例、0 型別不能によるものが 1 事例であった。発生場所別は、保育所及び家庭内であり、例年通り保育所での事例が多い傾向は変わらなかった。

C-4. EHEC の分子疫学解析手法の実施状況

九州ブロックの地衛研における EHEC の分子疫学解析手法の実施状況から、PFGE と ISPS は九州ブロックの全ての地衛研で実施されていた。MLVA は令和 2 年 11 月末の段階で 5 地衛研が実施しており、今後、導入予定が 3 地衛研であった（表 6）。導入予定の地衛研に対し、研究班で研修等の支援を行う必要があると考えられる。

C-5. 精度管理（PFGE、ISPS 及び MLVA）

PFGE の精度管理には 12 地衛研が参加した。PFGE の写真から制限酵素による消化が不十分と考えられる地衛研があったが、概ね電気泳動像は明瞭で手技自体は良好に行われていると考えられた（図 3.1 から図 3.12）。問

題に対する回答のうち、同じ泳動像を示す検体1と検体3の関連性については、9地衛研で一致した(表7)。

ISPSの精度管理には、11地衛研が参加した。今回、精度管理に使用した菌株は、Set-1の1-02と1-03の間、Set-1の1-09と1-10の間にエキストラバンドが現れる株を選択した(図4)。ISPSの精度管理の結果、一部の地衛研において、誤判定が認められた(表8.1から表8.4)。誤判定の多くはエキストラバンドの判定であった。判定の精度を上げるためには、エキストラバンドの位置を腸管出血性大腸菌0157 IS-printing system エキストラバンド集^りで確認することが重要である。

MLVAの精度管理には7地衛研が参加した。今回、精度管理の菌株は、全てMLVA型が異なるものを使用した(表9)。一部の地衛研において、EHC-5、EHC-6、EHC-2、0157-34の各ローカスで誤判定が認められた(表10.1から表10.4)。MLVAはPFGEと比較して手技が簡便であるが、使用するキャピラリーやポリマーの管理を厳密に行わなければならないことが知られている。また、各ローカスでの出現ピークの判定に一定の知識が必要であることから、今後、研修を実施し技術レベルの向上に努める必要があると考えられる。

本年度、MLVAの研修を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の流行により研修会を中止した。

D. 結論

九州ブロックにおける0157のIS型のデータベースへの登録数は、令和元年度より減少した。ISPS及びMLVA共にPCRをベースとした手法であるため、分解能が高いMLVAを実

施する地衛研が増えたためと考えられる。今後、ISPSの運用方法について検討する必要がある。

九州ブロックではPFGE、ISPS及びMLVAについて、精度管理を行った。いずれの方法でもほとんどの地衛研において、手技は良好であると考えられた。しかし、一部の地衛研において、人事異動等で職員の入れ替わりによる技術の継承が難しくなっていることから、継続的な精度管理及び研修等が必要と考えられる。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) 腸管出血性大腸菌0157 IS-printing system エキストラバンド集. 厚生労働省 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27-29年度)「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」班作成

表1 令和2年度の精度管理に用いたEHEC

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	毒素型	MLVA型 (感染研)
検体1	19EC076	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0534
検体2	19EC077	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	19m0555
検体3	19EC086	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	20m0034
検体4	19EC031	2019	患者	O157:H7	<i>stx1+stx2</i>	16m0399

事例

管内の施設で腸管出血性大腸菌O157を原因とする集団感染事例が発生した。また、同一地域において、当該施設と関連がないと考えられる患者からも腸管出血性大腸菌O157が検出されている。これらの事例において検出された腸管出血性大腸菌O157の関連性をPFGEにより明らかにして頂きたい。

回答

該当するものを○で囲んでください。検体1と比較して異なるバンドの本数を記載してください。

- 問1 検体1と検体2は（一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致）
その理由：検体1と検体2はPFGEに於いて 本のバンドが異なる。
- 問2 検体1と検体3は（一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致）
その理由：検体1と検体3はPFGEに於いて 本のバンドが異なる。
- 問3 検体1と検体4は（一致・密接に関係・関係する可能性がある・不一致）
その理由：検体1と検体4はPFGEに於いて 本のバンドが異なる。

図1 PFGE精度管理の問題

表2 九州ブロックの地衛研におけるIS型別登録数

地衛研	IS型別登録数											
	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	平成28年度	平成29年度	平成30年度	令和元年度	令和2年度	合計
1	112	48	61	26	28	46	29	26	25	53	37	491
2	50	53	44	24	32	42	35	23	39	37	23	402
3	30	15	12	15	38	46	10	11	20	29	7	233
4	12	12	17	52	28	15	40	23	11	0	0	210
5	23	18	11	28	26	10	25	17	7	27	14	206
6	6	5	4	8	2	7	2	2	2	2	0	40
7	13	16	24	18	11	14	31	14	13	15	14	183
8	16	10	5	30	25	0	0	0	0	0	0	86
9	5	3	7	2	4	5	3	1	4	7	0	41
10	20	17	16	4	3	4	5	1	5	3	2	80
11	19	25	21	15	8	15	16	9	14	11	4	157
12	6	7	7	2	1	0	3	1	0	1	0	28
合計	312	229	229	224	206	204	199	128	140	185	101	2157

表3 九州ブロックで登録数が多いIS型（登録年度別、登録地衛研別）

順位	IS型別	登録数																								合計
		登録年度												登録地衛研												
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	66324257743	22	32	4	11	33	50	9	5	12	35	5	38	39	67	7	15	1	27	6	2	7	8	1	218	
2	57733536074	3	15	23	8	16	10	27	14	10	6	6	23	33	6	19	21	13	12	2	1	5	3	138		
3	30671622280	33	11	1	7	11	2	2	3	2	2	1	31	7	4	1	13	3	2		2	6	6	75		
4	66457435083	6	2	9	10	1	5	9	11		17	3	13	9	4	3	19	1	10		2	4	8	73		
5	56643812046	31	14	3	13	3							19	17	7	3	6	2	8		1	1		64		
6	30653010185	9	4	4	14	6	3	2	4	1	5	3	7	10	4	5	8		4	8		6	2	1	55	
7	57733470538		2	12	1	16	5	4	1	5	4	1	13	7	1	19	6		1		1	2	1	51		
7	57868549067	4		3	2				15	25		2	20	13	3	6	2		3				1	3	51	
9	22081687688	12			2	16			10				15	9	9		3				2	1	1	40		
10	66456320969	1			3	5	10	5	5	6	1	1	12			24	1							37		

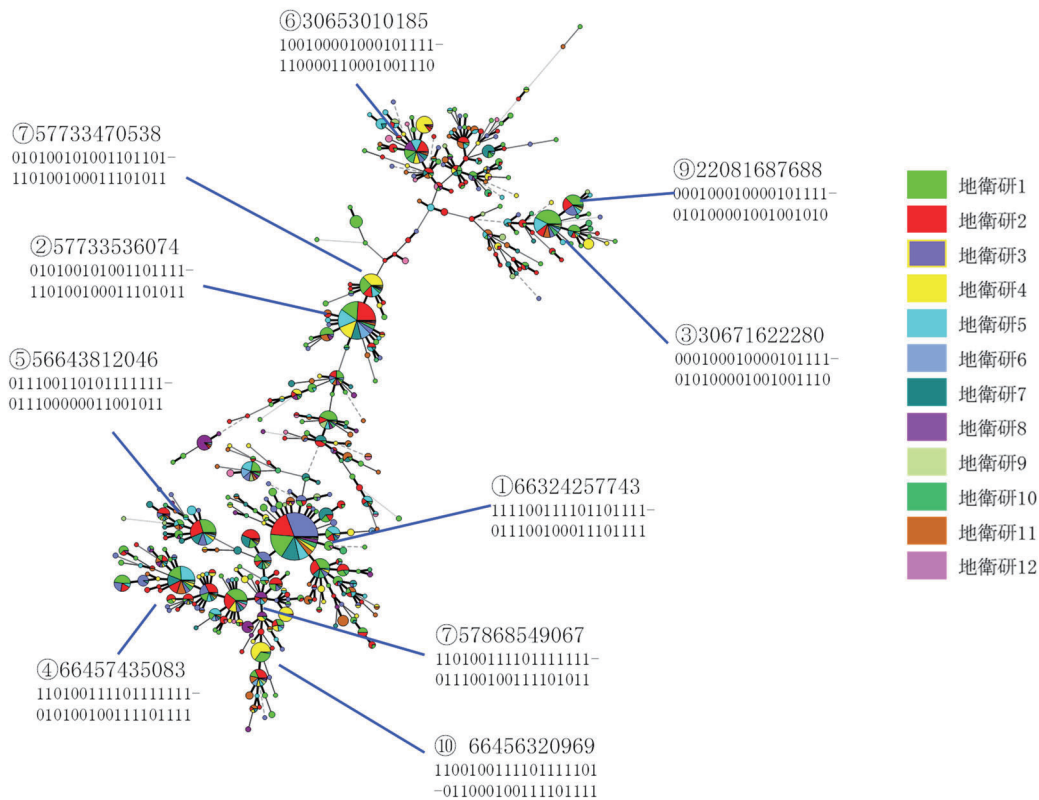


図2.1 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree（地衛研別）

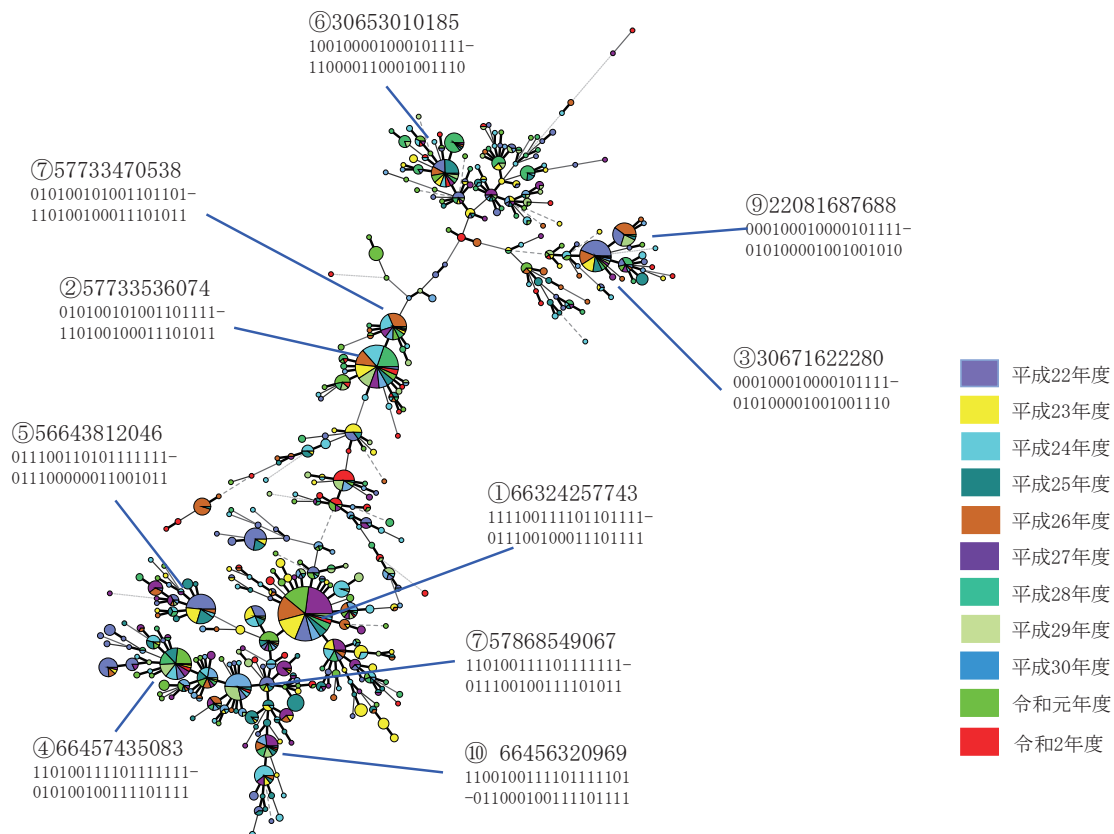


図2.2 平成22年度以降の九州ブロックのISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 令和2年度に九州ブロックの地衛研で収集されたEHEC株数の集計

地衛研	O血清型別の分離菌株数													計
	0157	026	0111	0103	0121	091	0115	0145	0146	0128	0183	08	05その他	
1	37	8	2	1						1		3	4	56
2	23	24	1	2	4	2	1				1		1	64
3	7	4	2	2	1			1				1		18
4	11	1		5									10	27
5	48	1	5	24	2		1				1		6	88
6		6				17								23
7	14	4		6									7	31
8	7	5												12
9	1	7	1	1		1	1		1	1			2	16
10	2	6					1						1	10
11	4	2	1	1	1			1					2	12
12	0	13	2	8				1					2	28
合計	154	81	14	50	25	3	4	3	1	2	2	4	3	385

表5 令和2年度に九州ブロックの地衛研で確認されたEHEC集団発生事例数

地衛研No.	事例No.	血清型	毒素型	発生場所	被験者数	陽性者数
1	1	0157	<i>stx₂</i>	保育所	100	13
2	1	026: H11	<i>stx₁</i>	保育所	141	17
5	1	0157: H-	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	105	4
	2	0157: H7	<i>stx₂</i>	保育所	121	23
	3	0157: H7	<i>stx₂</i>	保育所	108	8
	4	0103: H2	<i>stx₁</i>	保育所	179	14
6	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	4	2
	2	026: H-	<i>stx₁</i>	保育所	160	4
	3	0121: H19	<i>stx₂</i>	保育所	145	16
7	1	OUT	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	39	4
	2	0157	<i>stx₁+stx₂</i>	保育所	93	2
8	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	34	2
	2	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	5	2
	3	0157: H7	<i>stx₂</i>	家族内	33	3
	4	0157: H7	<i>stx₂</i>	家族内	5	2
12	1	026: H11	<i>stx₁</i>	家族内	2	2
	2	0103: H2	<i>stx₁</i>	家族内	2	2

表6 EHECの分子疫学解析手法の実施状況（地衛研数）

	実施	全株実施	一部の株 に実施	導入予定
PFGE	12	0	12	0
ISPS	12	5	7	0
MLVA	5	4	1	3

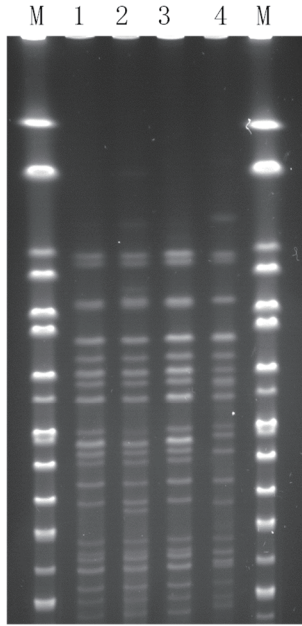


図3.1 地衛研1のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

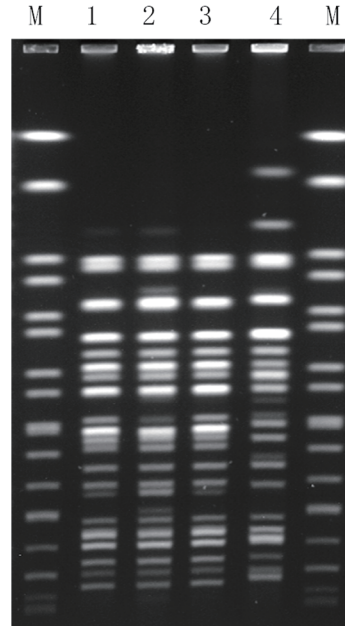


図3.2 地衛研2のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

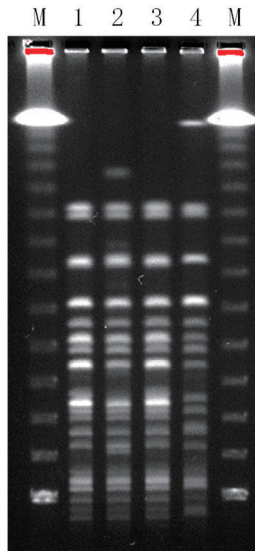


図3.3 地衛研3のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

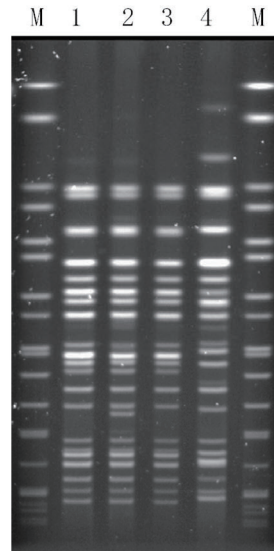


図3.4 地衛研4のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

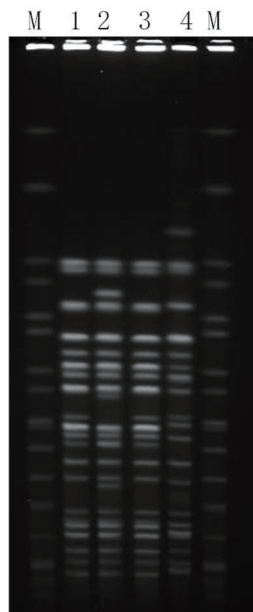


図3.5 地衛研5のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

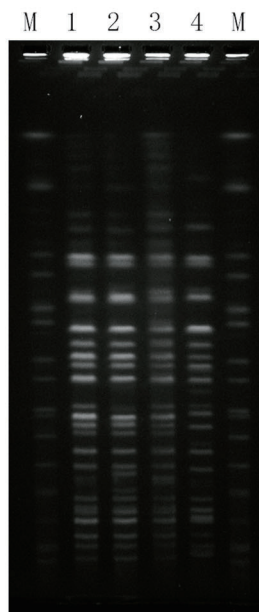


図3.6 地衛研6のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

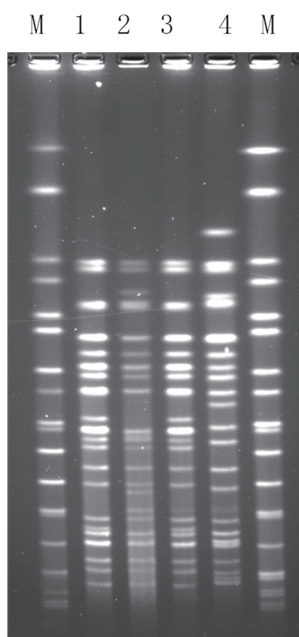


図3.7 地衛研7のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

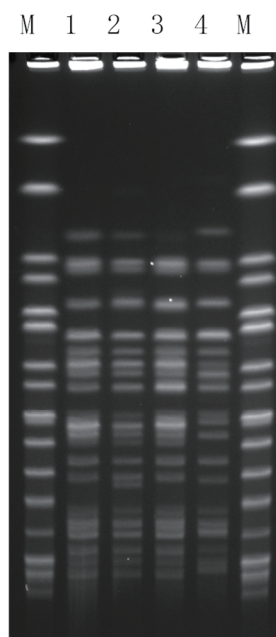


図3.8 地衛研8のPFGE電気泳動写真
 M：サイズマーカー、レーン1:
 検体1、レーン2：検体2、レー
 ン3：検体3、レーン4：検体4

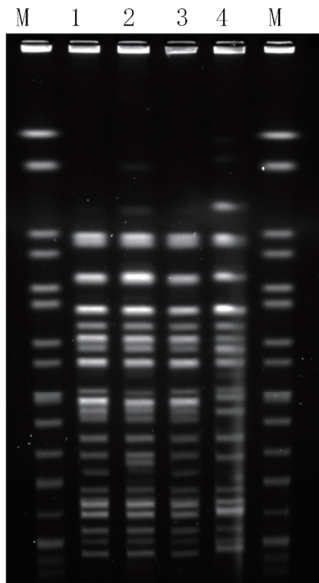


図3.9 地衛研9のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

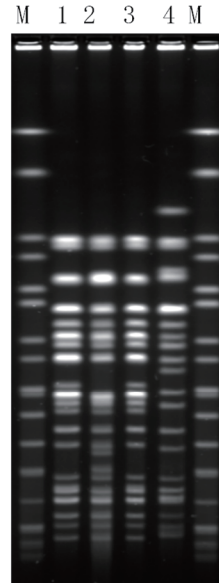


図3.10 地衛研10のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

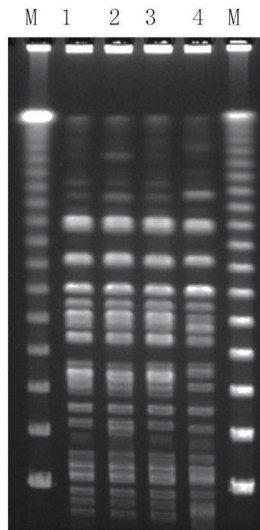


図3.11 地衛研11のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

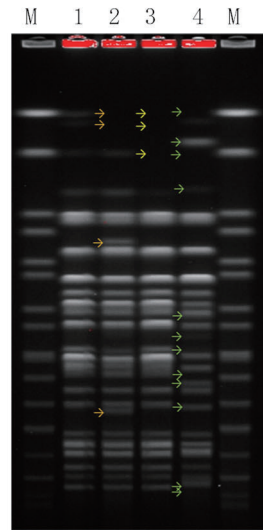


図3.12 地衛研12のPFGE電気泳動写真

M：サイズマーカー、レーン1：
検体1、レーン2：検体2、レー
ン3：検体3、レーン4：検体4

表9 精度管理に使用した菌株のMLVA型

検体	MLVA型	EH111	EH111	EH111	EH157	EH26	EHC	EHC	EHC	EHC	EHC	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157
		-11	-14	-8	-12	-7	-1	-2	-5	-6	-3	-34	-9	-25	-17	-19	-36	-37
菌株1	19m0534	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3
菌株2	19m0555	2	-2	1	4	-2	6	6	11	11	-2	9	16	3	10	7	5	3
菌株3	20m0034	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3
菌株4	16m0399	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6

表10.1 菌株1に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111	EH111	EH111	EH157	EH26	EHC	EHC	EHC	EHC	EHC	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	備考
	-11	-14	-8	-12	-7	-1	-2	-5	-6	-3	-34	-9	-25	-17	-19	-36	-37		
1	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
5	2	-2	1	4	-2	6	6	11	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
6	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
9	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
10	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
11	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
12	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		

表10.2 菌株2に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111	EH111	EH111	EH157	EH26	EHC	EHC	EHC	EHC	EHC	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	備考
	-11	-14	-8	-12	-7	-1	-2	-5	-6	-3	-34	-9	-25	-17	-19	-36	-37		
1	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
5	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
6	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
9	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
10	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		
11	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	-2	-2	9	16	3	10	7	5	3		
12	2	-2	1	4	-2	6	6	-2	11	-2	9	16	3	10	7	5	3		

表10.3 菌株3に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111	EH111	EH111	EH157	EH26	EHC	EHC	EHC	EHC	EHC	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	備考
	-11	-14	-8	-12	-7	-1	-2	-5	-6	-3	-34	-9	-25	-17	-19	-36	-37		
1	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3		
5	2	-2	1	4	-2	6	6	11	11	-2	9	10	3	10	7	5	3		
6	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3		
9	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3		
10	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3		
11	2	-2	1	4	-2	6	6	12	-2	-2	9	10	3	10	7	5	3		
12	2	-2	1	4	-2	6	6	12	11	-2	9	10	3	10	7	5	3		

表10.4 菌株4に対する各地衛研のMLVA結果

地衛研	EH111	EH111	EH111	EH157	EH26	EHC	EHC	EHC	EHC	EHC	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	0157	備考
	-11	-14	-8	-12	-7	-1	-2	-5	-6	-3	-34	-9	-25	-17	-19	-36	-37		
1	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6		
5	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6		
6	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6		
9	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6		
10	2	-2	1	4	-2	5	5	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6		
11	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	-2	12	7	7	6	3	6		
12	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	9	12	12	7	7	6	3	6		

令和 2 年度分担研究報告書

毒素原性大腸菌 O159 による集団食中毒事例について

長崎県環境保健研究センター 保健衛生研究部 保健科
○右田雄二、増輪文治、蔡国喜、浦川美穂、田栗利紹

長崎県五島保健所 衛生環境課
石原雅行、山下綾香、吉松嗣晃

要旨

2019 年 10 月、医療機関から研修会の際に提供された仕出し弁当を喫食した 10 名中 5 名が下痢症状を呈しているとの情報を保健所が探知した。検便検査の結果、有症者 3 名および調理従事者 1 名から耐熱性エンテロトキシン (ST) 産生性の毒素原性大腸菌 (ETEC) O159 が分離された。PFGE 電気泳動による遺伝子型別は完全に一致していた。本事例は飲食店を原因施設とする集団食中毒事件と判断された。

A. 事例の概要

2019 年 10 月 19 日、五島保健所管内の医療機関から食中毒疑いの通報があった。同保健所の調査によると、10 月 9 日に当該医療機関で開催された研修会の際に提供された仕出し弁当を喫食した後、10 月 11 日～13 日にかけて 10 名中 5 名が下痢症状を呈した。衛生検査所の検査結果では、1 名の患者から病原性大腸菌 O159 を検出したとの情報を得た。

これより保健所は有症者 4 名及び調理従事者 2 名の検便検査を開始した。保健所では、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌および腸炎ビブリオにつ

いて、当所ではノロウイルス、下痢原性大腸菌、カンピロバクター属菌及びウエルシュ菌の検査を実施した。検食については保存されていなかった。

検査の結果、有症者 3 名および調理従事者 1 名から ST 毒素産生性の ETEC O159 が分離された。その他の病因物質は検出されなかった。その後、O159 株間の関連性を確認するためにパルスフィールドゲル (PFGE) 電気泳動による制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析を実施した。

B. 検査方法

1) 遺伝子スクリーニングおよび培養

下痢原性大腸菌の検査は、保健所と当所とで連携して検査した。即ち、搬入前日に保健所で糞便をトリプチケースイブロス（TSB）に接種した検体を当所に持ち込み、37℃、6 時間程度培養した後、アルカリ熱抽出した増菌液の沈査を用いて PCR 法による *Stx1*、*Stx2*、*invE*、*ST* および *LT* 遺伝子の保有の有無をスクリーニングした。

腸管内に常在する大腸菌と識別困難な下痢原性大腸菌の検査方法は、糞便および増菌培養液を X-MG 培地および DHL 培地で 37℃ 20 時間培養後、平板上に形成された大腸菌様コロニーをディスプレイで釣菌し、調製済み PCR 反応液に直接加える Colony-direct PCR 法により検出を試みた。

2) 生化学性状試験

CLIG、TSI、LIM、VP、シモンズクエン酸培地にて 37℃ 18 時間培養し鑑別試験を実施した。

3) 血清型別試験

O 群別試験および H 型別試験は病原大腸菌免疫血清「生研」により実施した。

4) PFGE 電気泳動による RFLP 解析

被検菌および *Salmonella* Braenderup H9812 株を TSB に接種し、増菌液を九州ブロックマニュアルに準じてサンプル調製を行った。泳動は CHEFDR-III を用いて電圧 6 V/cm、パルスタイム 2.2 – 54.2 sec、泳動時間 18 時間、バッファー温度 14℃ の条件で実施した。

C. 検査結果

TSB 増菌液による遺伝子スクリーニング試験の結果、有症者 4 名中 3 名および調理従事者 2 名中 1 名から *ST* 遺伝子が検出されたため、毒素原性大腸菌（ETEC）の存在が強く疑われた。そのため *ST* 遺伝子陽性者の糞便および増菌液を培養した X-MG および DHL 平板上の大腸菌様コロニー（X-MG：濃緑～青紫色、DHL：赤色）について、Colony-direct PCR 法による *ST* 遺伝子の検出を行った。有症者 3 名については、それぞれ 16 コロニーを検査した中で *ST* 遺伝子陽性株を検出したが、調理従事者 1 名については検出するまでに 132 コロニーを検査した。

このようにして得られた分離株 4 株（有症者：3 株、調理従事者：1 株）の生化学性状は、CLIG、TSI、LIM、VP およびシモンズクエン酸培地において典型的な大腸菌の生化学性状を示した。

O 群別試験および H 型別試験では、いずれの株も O159:H20 と同定された。

PFGE 電気泳動による RFLP 解析の結果（図 1）では、4 株とも同じ泳動パターンを示した。

D. 結論および考察

2009 年から 2013 年までの国立感染症研究所の下痢原性大腸菌の集計結果¹⁾によると、ETEC は O159、O6、O169 および O148 で全体の 8 割を占め、多様な血清型が報告されている。本事例では、衛生検査所の検査結果で有症者 1 名から O159 が報告されたが、ETEC の産生毒素（*ST* および *LT*）の保有の有無は不明で

あった。よって、保健所および当所では ETEC を含む食中毒病因物質の検査を実施した。

本調査の結果、患者 3 名および調理従事者 1 名から ST 毒素産生性の ETEC O159:H20 が分離され、RFLP 解析において同じ泳動パターンを示した。Tenover²⁾ の分類基準によると同一の感染事例として扱われる。

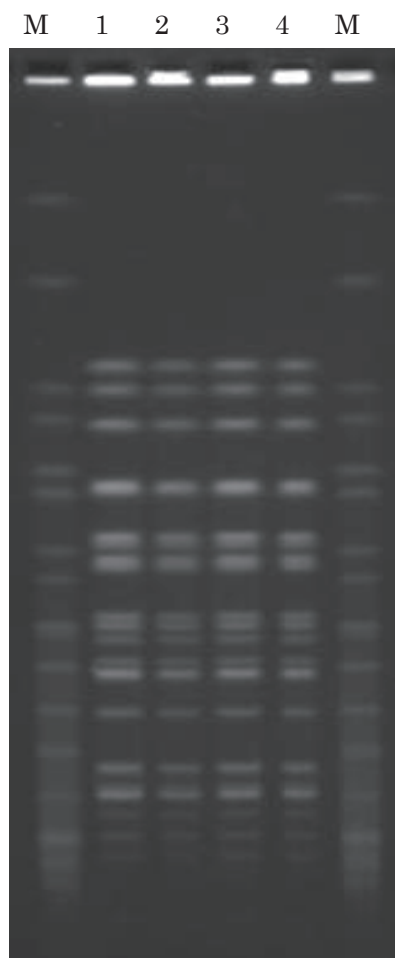
保健所の聞き取り調査によると、仕出し弁当を提供した店舗において調理したものを喫食した他グループには有症者はみられなかった。さらに O159 が検出された調理従事者 1 名は日頃から軟便を呈しており、常在的に本菌を保有していた可能性がある。

以上のことから、本調理従事者が仕出し弁当を作る際に手指を介して O159 を伝搬させた可能性が高いと考えられた。

E.文献

1) 第 34 回衛生微生物技術協議会レファレンスセンター関連会議⑤「大腸菌」資料 (2013 年 7 月、名古屋)

2) Tenover FC et al.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing . J Clin Microbiol 1995 ;



Lane 1-3 : 有症者

Lane 4 : 調理従事者

M : マーカー (*Salmonella* Braenderup H9812)

図 1 O159 の RFLP 解析結果 (Xba I 消化)

令和 2 年度分担研究報告書

長崎市で発生したウエルシュ菌食中毒事例

長崎市保健環境試験所

江原裕子、島崎裕子、仁位和加奈、片上隼人

要旨

2019 年 9 月長崎市内の介護老人保健施設の敬老会においてウエルシュ菌を原因とする食中毒事件が発生した。当該施設が製造した弁当を喫食した 313 人中 80 人が下痢・腹痛等の症状を呈した。検査した 62 人中 43 人の糞便からウエルシュ菌検出またはウエルシュ菌エンテロトキシン遺伝子が検出された。共通食である弁当からもウエルシュ菌が検出されたが、市販の免疫血清では血清型別は確定できなかった。パルスフィールド電気泳動（P F G E）を実施し、検出菌株の同一性を検索し、疫学解析の指標とすることができた。

A. 事例の概要

2019 年 9 月 21 日、長崎市内の介護老人保健施設の敬老会に参加した施設入所者、スタッフ、来賓、および慰問団体スタッフが腹痛・下痢等の症状を呈した。共通食は当該施設が製造した弁当のみであった。有症者及びスタッフの便 62 検体、検食 19 検体、ふきとり 7 検体の細菌検査を実施した。初日に搬入された有症者 8 人についてはノロウイルス検査を実施したが陰性であった。

B. 検査方法

1. 分離培養検査

便は 0.5%塩化ナトリウム加 1%ペプトン水で 10%乳剤とし、チオグリコール酸培地、カナマイシン含有 CW 寒天培地

を使用し、ウエルシュ菌の分離を行った。アネロパックケンキ（スギヤマゲン）を用いて 18~20 時間嫌気培養した CW 寒天培地からレシチナーゼ反応による黄色を帯びた白濁環をもつ乳黄色の集落を釣菌した。検食は、10 g 採取したものに PBS90ml を加え、ホモジナイズして試料とした。

2. 血清型別試験

分離された菌の血清型別試験は、耐熱性 A 型ウエルシュ菌免疫血清（デンカ生研）を用いた。

3. エンテロトキシンの検出およびエンテロトキシン遺伝子の検出

有症者糞便を生理食塩水で 10 倍乳剤とした遠心上清について、PET-RPLA（デ

ンカ生研)を用いて、ウエルシュ菌エンテロトキシンの検出を試みた。また、ウエルシュ菌毒素遺伝子検出用プライマーセット CPE (タカラ)を用いて、ウエルシュ菌エンテロトキシンの遺伝子の確認を行った。

4. P F G E による遺伝子解析

分離株を GAM ブイオンで 35℃一晩培養後、培養液 1000 μ l を PBS で洗浄し、精製水 500 μ l に懸濁した。等量の 1% Seaken Gold Agarose を加えてアガロースブロックを作成した。1mg/ml Lysozyme で 37℃1 時間溶菌、1mg/ml ProteinaseK で処理後、PefablocSC で不活化し、制限酵素 Sma I で 30℃16 時間酵素処理を行った。電圧 6.0V/cm、Initial 0.5 秒、Final 40.0 秒、19 時間の条件で泳動した。サイズマーカーは、Salmonella BraenderupH9812 を使用し、Xba I で処理した。

C. 検査結果

有症者便 36 検体中 34 件、無症状であったが弁当を喫食していたスタッフ便 26 検体中 13 件より、CW 培地でウエルシュ菌様のコロニーが確認された。ウエルシュ菌様のコロニーをスワイプして、滅菌精製水にとりウエルシュ菌エンテロトキシンの遺伝子検査を実施したところ、有症者便 33 件 (92%)、無症状者便 10 件 (38%) にエンテロトキシンの遺伝子が確認できた。さらに、スワイプで陽性となった検体から単独コロニーを数個ずつ純培養し、これについてもエンテロトキシンの遺伝子の確認を行った。また、有症者便の 10% 乳剤を、PET-RPLA を用いてウエルシュ菌エンテロトキシンの検査を

実施し、10 検体中 9 件についてエンテロトキシンの確認できた。

検食として、原因と疑われた弁当が搬入されたが、盛り付けられた弁当のまま冷凍されたものであった。19 食品に分けて検査を実施したところ、エビ、レンコン、鮭、鴨、かまぼこ、卵焼き、煮物、もみじふなど多数の検食から、エンテロトキシンの遺伝子が検出された。食品は盛り付け時に接触しているものも多く、解凍時のドリップに浸っている状態であった。検便からウエルシュ菌が検出され、当初原因食品として煮物が疑われたが、2,000cfu/g と汚染菌量が低く、原因食品の特定には至らなかった。

ふきとり検体からは食中毒菌は検出されなかった。

また、便や検食より分離されたウエルシュ菌を市販のキットにより Hobbs 型による血清型別を試みたが、型別不能であった。

介護老人保健施設入所者 2 名、スタッフ 2 名、同一敷地内にあるグループホーム入所者 1 名、余興を行った慰問団体スタッフ 1 名、検食 2 検体について、P F G E による遺伝子解析を実施した。P F G E パターンは、検食 1 検体 (No8) を除きすべて同一であった。(図 1)

D. 結論

健康者でも耐熱性ウエルシュ菌を腸管内に 15~25% と高率に保菌しており、本菌による食中毒と決定するには注意が必要である。

患者便から高率 (92%) にウエルシュ菌エンテロトキシンの遺伝子が確認できたこと、糞便中からエンテロトキシンの証

明できたこと、弁当と患者便から検出されたウエルシュ菌が P F G E により同一のパターンを示したことなどから、何らかの要因により、ウエルシュ菌に汚染された弁当を原因とする食中毒であると断定した。

本事例では、市販の免疫血清で、血清型別を確認できなかったが、P F G E により、検食と患者便のウエルシュ菌の同一性が推察でき、疫学解析の指標とすることができた。

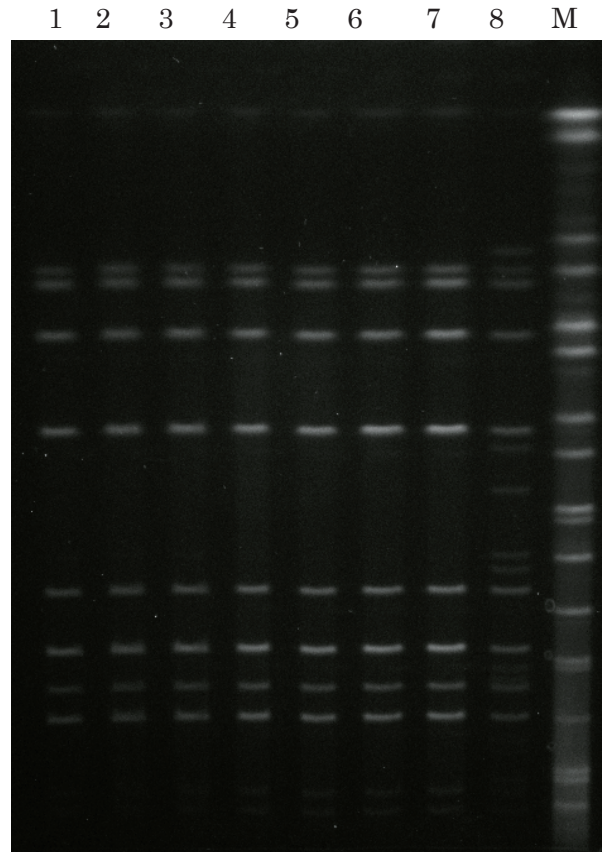


図1 ウエルシュ菌の PFGE 写真

レーン 1. 老人保健施設入所者 A

レーン 2. 老人保健施設入所者 B

レーン 3. 老人保健施設スタッフ A

レーン 4. 老人保健施設スタッフ B

レーン 5. グループホーム入所者

レーン 6. 慰問団体スタッフ

レーン 7. 検食（車海老旨煮）

レーン 8. 検食（紅茶鴨ジャンボ博多巻）

M. サイズマーカー *S. Braenderup* H9812