

(厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

研究代表者 寺島 淳

国立感染症研究所 細菌第一部

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

(課題番号:H21-新興-一般-003)

平成 21 年度総括・分担研究報告書(平成22(2010)年4月)

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み  
— IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について —

研究分担者	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	財津修一	福岡市保健環境研究所
	久保田 勉	北九州市環境科学研究所
	西 桂子	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
	松本一俊	熊本県保健環境科学研究所
	岩永貴代	熊本市環境総合研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	上野伸広	鹿児島県環境保健センター
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	大岡 唯祐 <sup>1</sup> 、林 哲也 <sup>1,2</sup>	宮崎大学・ <sup>1</sup> 医学部、 <sup>2</sup> フロンティア
	江藤良樹、市原祥子、	福岡県保健環境研究所
	濱崎光宏、小野塚大介、	
	村上光一、竹中 重幸	

研究要旨 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、平成 21 年度は 1) IS-printing System に関する応用研究、2) 研修(新規遺伝子解析法:大腸菌の病原性因子の検査とその解析法)、3) 事例検討の 5 課題について実施した。本稿では 1) について以下報告する。

九州ブロックでは IS-printing System を用いて各地研で分離された O157 について解析を行い、その有用性を検討した。また、O157 の DNA を配布し、各地研で IS-printing System による解析を実施することにより、IS 手技に関する精度管理を行った。

#### A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段である。しかし、異なるゲルで泳動され

た DNA パターンを比較するには、「安定した PFGE マーカーの泳動、良好な PFGE および良好な画像の保存」などが必須である。また、PFGE は解析結果を得るまでに最短 3 日を要し、

迅速性に欠ける。これらの理由からPFGE実施前にスクリーニングとして使用可能な細菌学的疫学情報が望まれている。

宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157株のゲノム構造多型を利用し、デジタル化可能な検査結果を得ることの出来る菌株識別システムの開発が行われた。現在、IS-printing System Ver. 2として、東洋紡から市販されている。

九州ブロックではISを用い、各地研で分離されたO157について解析を行い、その有用性を検討した。また、O157のDNAを九州地区地研に配布し、IS手技に関する精度管理を行った。

## B. 研究方法

### 1. IS-printing System の使用条件

解析にはIS-printing System Ver. 2(東洋紡、以下IS)を用い、九州ブロック各地研の実施状況は、下記のとおりである。

#### 1) Template DNA の作製

O157コロニー釣菌用の培地は、普通寒天4、BHI寒天2、TSA寒天2、およびLB寒天、HI寒天、クロモアガーO157、SMAC寒天が各1地研で使用されていた(表1)。Template DNAは、これらの培地からシングルコロニーを釣菌し、アルカリ抽出法により作製した。

表1. Template DNA の作製

地研番号	Temperate DNA		
	培地名	コロニー数	培養時間
1	LB寒天	大1	20h
2	HI寒天	大1	20h
3	普通寒天	1mm	20h
4	BHI寒天	1mm	20h
5	TSA寒天	大1	18h
6	普通寒天	大1	20h
7	クロモアガーO157	大1	20h
8	TSA寒天	小1	18h
9	SMAC寒天	1mm	18h
10	普通寒天	1コロニー	24h
11	BHI寒天	1mm	18h
12	普通寒天	1コロニー	20h

### 2) 機器・機材

PCR機器は、ABI GeneAmp 9700が6、同2720 Thermal Cyclerが1、同GeneAmp 2700が1、BIO-RAD iCyclerが1、ASTECC PC320が2およびMJ Research DNA engine TETRAD 2が1地研で使用されていた(表2)。泳動槽は、ADVANCE社のMupidシリーズが10、ELCHROM SCIENTIFIC社、東洋紡が各1地研で用いられていた。画像の取り込みは、写真をスキャナー等で取り込んでいる地研が2で、残りの10地研はゲルから直接取り込みを実施し、使用機器はBIO-RADが6、BioImageが2、東洋紡とATTOが各1地研であった(表2)。

### 3) 電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

泳動時間は各地研でPCR産物の分離能を勘案した最適時間(60分~125分)で行った(表2)。泳動用バッファーは、すべて0.5×TBEであった(表3)。サイズマーカーは、それぞれの地研で使用しているものを使用し、Loading Dyeは、2地研がキット添付品では不足するため別品を使用していた(表3)。Loading Dyeの違いは、泳動距離に微妙な影響を与えるので、添付品の増量が望まれる。

### 4) 結果の判定

各菌株の電気泳動により得られた36本の遺伝子増幅産物の出現パターンを2進数(1,0)で表現した後に10進数に変換し、11桁の挿入配列の組み合わせ、固有の番号とした。

### 5) 解析

解析方法は、Matching法による近似度計算を行い、NJ法にて系統樹解析を行い、TreeView(<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)を用いて描画した。

## 2. 精度管理

各地研にはO1574株から抽出したDNAを配布し、それぞれの施設でISを使用して、PCR、電気泳動および結果判定を実施した(図1)。

### 3. 九州地区分離株の解析

各地研で保存され、国立感染症研究所へ送付し PFGE 型が判明している 311 株の O157 を対象とした。

#### C. 結果および考察

##### 1. 精度管理結果

4 株(A、B、C および D)から抽出した DNA を IS にて解析した結果を図 2-5 に示した。A および B の IS 結果は、11 地研全て一致していた。しかし、C および D は、各 1 地研で異なる結果であった。C は 2nd set で Extra band を 987 bp として判定したものであった。D は 1st set プライマーセット 1-06 の PCR 産物(サイズ 561 bp)が増幅されていなかった。添付されている Control DNA でも同様に増幅されていなかった。この 2 点についての対策として、施設内におけるサーマルサイクラーの検討および分子量判定方法の工夫、並びに IS キットに含まれる primer の改善が必要と考えられた。

##### 2. 九州地区分離株の解析

解析を行った 311 株は、IS 型が 74 タイプ、PFGE が 158 タイプに分類された。PFGE の分類は、IS の分類の約 2 倍であった。この比率は、昨年九州地区で 219 株について解析した結果とほぼ同じであった。

PFGE 型と IS 型が同じ株は、10 グループであった(表 4)。各地研に結果を返し、詳細情報を再収集したところ、PFGE 型【e537】で IS 型【66324257743】は、福岡県で発生した集団食中毒事例と同時期に福岡市でこのタイプによる患者の発生があることが分かった(表 5)。PFGE 型【b664】で IS 型【66324265923】は、大分県、福岡県および宮崎県の患者で、福岡県と大分県のグループは同時期に大分市内の焼肉店を利用していることが判明した(表 6)。

次に PFGE 型が同じで IS 型が異なる株は、3 グループであった(表 7)。PFGE 型 a256 は 1 地研 8 株で IS が 3 種、b664 は 5 地研 15 株で IS が 3 種、e169 は 2 地研 2 株で IS が 2 種であった。このうち b664 の大分県と福岡県の株は表 6

の関連株であった。同一県内あるいは隣接した県市が多かったが、疫学的な因果関係は認められなかった。

IS 型が同一で PFGE 型が異なる菌株群は、32 グループであった(表 8)。各グループ内の患者住居地が同一県や市であり、同一家族や同一保育所の関連株である場合も多かった。また、患者居住地別にみると九州北部 3 県、南部 3 県にグループ分けできる傾向にあり、生活圏を反映しているものと考えられる。

今年度の調査からも継続的に IS 解析を行うことは、見逃されていた疫学情報の再調査の重要な手がかりとなることが分かった。また、人手と時間を要する PFGE 検査のスクリーニングとしても有用であると考えられる。

##### 3. IS を利用した感染源を早期に探知する取り組み

九州ブロックでは、各地研で得られた IS 解析結果について、ある地研のサーバーにアクセスして同一 IS パターンを示す O157 の存在を確認するシステムを構築する準備を行っている。この場合、アクセス権と個人情報を含まない菌株情報の整理など今後整備すべき点は多い。しかし、この取り組みが実現することにより、O157 による食中毒事件の早期探知が可能となる。

#### D. まとめ

IS の精度管理では、比較的良好な結果が得られた。過去 3 年間に IS に関する種々検討を各地研で行ったことにより、技術の習得がなされたものと考えられた。しかし、2nd set の Extra band の誤判定や、1st set の 1-06 の DNA 増幅が見られなかった例がそれぞれ 1 例ずつあり、IS 利用者が再現性のある結果を得るためには、これらの点が改善されなければならない。

IS で得られた結果は、ID コード化が容易であり、他の機関や過去の結果と普遍的に比較することが容易である。また、IS は 1 日で結果が得られ、迅速性が求められる公衆衛生分野での応用が期待される。ただし、恒常的に正確な結果を得るためには、他の検査と同様に機器および

試薬等の管理を厳しく行わなければならない。  
また、定期的な IS の精度管理や PCR マシンの保守管理などを徹底することにより、細菌学的な疫学情報源としての正確性が担保される。

IS は、PFGE とは異なる原理を用いた遺伝子解析手法であり、地研の管轄内だけにとどまらず、九州地区の地研が IS 型と最小限の患者情報をともなった O157 菌株情報の登録を行うことにより、似通った食習慣を持つ隣接した生活圏内での早期事件探知・解明の糸口を見いだせるものと考えられる。一方で、菌株の早期搬入が望まれる。

謝辞 腸管出血性大腸菌の調査にあたられた行政機関および分離株を分与頂いた検査機関関係各位並びに PFGE 型別を実施して頂いた国立感染症研究所細菌第一部の皆様に深謝致します。

#### E. 研究発表

1) 江藤 良樹、市原 祥子、濱崎 光宏、村

上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、「腸管出血性大腸菌検査の現状と遺伝子解析について」、第 35 回九州衛生環境技術協議会(2009.10.8-9)。

2) 中村 祥子、江藤 良樹、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌について、福岡県保健環境研究所年報、2008、35、59-64。

#### F. 文献

1) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, and Hayashi T: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J. Clin Microbiol 2009, 47:2888-94.

表 2. IS-printing System に使用した周辺機器

地研 番号	PCR機種名		泳動槽			画像取り込み装置	
	メーカー	型式	メーカー	型式	泳動時間	メーカー	型式
1	ABI	GeneAmp 9700	コスモバイオ	Mupid-2	60分	BIO-RAD	Gel Doc XR
2	ABI	GeneAmp 9700	ELCHROM SCIENTIFIC	SEA 2000	125分	BIO-RAD	Gel Doc EQ
3	ASTEC	PC320	ADVANCE	Mupid	70-80分	BIO-RAD	Gel Doc 2000
4	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	120分	BIO-RAD	Gel Doc XR
5	BIO-RAD	iCycler	ADVANCE	Mupid	95分	ATTO	Printgraph typeCX
6	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	65分	TOYOBO	FAS-III
7	ASTEC	PC320	ADVANCE	Mupid- $\alpha$	70分	BIO-RAD	Gel Doc XR
8	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid-2 plus	70分	BiImage	Gel Print INFINITY
9	ABI	GeneAmp 2700	東洋紡	GelMate2000	85分	POLAROID	MP-4
10	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE Co.,Ltd.	Mupid	65分	ハイオイメージ	Gel Print 2000i
11	ABI	2720 Thermal Cycler	ADVANCE	Mupid	65分(一部70分以上)	CANON	CanoSCAN LiDO200
12	MJ Research	DNA engine TETRAD 2	ADVANCE	Mupid-ACE	60分	BIO RAD	GEL Doc

表 3. 電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

地研 番号	TBE Buffer			サイズマーカー			
	メーカー	品番	使用濃度	メーカー	品番	Loading Dye	
1	日本ジーン	318-90041	×0.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
2	invitrogen	15581-044	×0.5	Promega	G829B	-	-
3	ナカライテスク	35432-41	×0.5	SIGMA	MBMA 100BP-S	TOYOBO	RE-DYE
4	SIGMA	T4415-11	×0.5	コスモバイオ	SM0321	コスモバイオ	×6 Loading Buffer
5	BIO-RAD	161-0733	×0.5	BIONEXUS	BN2050	TOYOBO	RE-DYE
6	BIO-RAD	161-0733	×0.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
7	日本ジーン	318-90041	×0.5	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO	RE-DYE
8	TAKARA	T905	×0.5	TOYOBO	DNA-035	TOYOBO	RE-DYE
9	TaKaRa	T905	×0.5	TaKaRa	3407A	TaKaRa	×6 Loading Buffer
10	日本ジーン	318-90041	×0.5	TaKaRa	3407B	TOYOBO	RE-DYE
11	日本ジーン	318-90041	×0.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
12	BIO-RAD	16-10733	×0.5	-	-	TOYOBO	RE-DYE

表 4. IS-printing System の型と PFGE 型が同じグループ

IS-printing	PFGE	福岡県	福岡市	北九州市	佐賀県	長崎県	長崎市	大分県	熊本県	熊本市	宮崎県	鹿児島県	沖縄県	総計
27384601163	e377		2				1					3		5
56643812046	c356	1						6						7
65382642633	a206		1							2				3
66324257743	d240							1				1		2
66324257743	d92	2	2				1	1						5
66324257743	e537	28	4											32
66324265923	b664	3						7			1			11
66456318921	e313	4	1	1										6
66456318921	e556		1	1										2
66457435083	c293	2						1		1	1			5

表 5. PFGE 型【e537】で IS-printing System 型【66324257743】

IS-printing	PFGE	感染研番号	地研菌株番号	血清型	VT1	VT2	Type No.	地研名	その他疫学上の重要なコメント
66324257743	e537	092244	09E057	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月7日にA店にて焼肉を喫食。
		092245	09E058	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E057の家族。9月7日にA店にて焼肉を喫食。
		092246	09E060	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月20日A店にて焼肉等を喫食。
		092249	09E061	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月22日にA店に焼肉等を喫食。
		092251	09E062	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月23日にA店にて喫食。
		092255	09E064	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。
		092257	09E068	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。9月30日にA店で夕飯。
		092258	09E069	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。9月28日にA店にて夕飯。
		092259	09E070	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。
		092260	09E071	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員(アルバイト)。
		092261	09E072	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。
		092262	09E073	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。
		092263	09E074	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。A店におろしている業者の従業員。
		092242	09E075	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E066の家族。9月11日または12日にA店にて焼肉を喫食。
		092265	09E076	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月16日にA店にて焼肉を喫食。
		092256	09E077	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。
		092264	09E078	O157:H7	+	+	e537	福岡県	A店従業員。
		092247	09E079	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E060の家族。9月20日にA店にて焼肉を喫食。
		092248	09E080	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E060、09E079の家族。9月20日にA店にて焼肉を喫食。
		092252	09E081	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E062の家族。9月23日にA店にて焼肉を喫食。
		092253	09E082	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E062の家族。9月23日にA店にて焼肉を喫食。
		092250	09E083	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E061の家族。9月23日にA店にて焼肉を喫食。
		092275	09E088	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E101の家族。家族内感染？
		092266	09E093	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月23日にA店(焼肉)にて喫食。職場の定期検便で判明。
		092268	09E097	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月19日にA店にて喫食。09E096の家族。
		092282	09E098	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E094(HUS発症)の家族。
		092269	09E099	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月25日にA店にて焼肉を喫食。
		092284	09E104	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E100の家族。
		092057	20091002	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内
		092058	20091003	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内、092057の姉
092059	20091004	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内、092057の姉		
092060	20091005	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内、092057の兄		

表 6. PFGE 型【b664】で IS-printing System 型【66324265923】

IS-printing	PFGE	感染研番号	地研菌株番号	血清型	VT1	VT2	Type No.	地研名	その他疫学上の重要なコメント
66324265923	b664	092210	09E023	O157:H7	+	+	b664	福岡県	7/30に焼肉を喫食(別府)。09E022,024,037の家族。
		092211	09E024	O157:H7	+	+	b664	福岡県	7/30に焼肉(別府)を喫食。09E022,023,037の家族。
		092212	09E037	O157:H7	+	+	b664	福岡県	7/30に焼肉を喫食(別府)。09E022,023,024の家族。
		091724	大分-09-034	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091725	大分-09-035	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091728	大分-09-038	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091729	大分-09-039	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091730	大分-09-040	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091731	大分-09-041	O157:H	+	+	b664	大分県	患者(大分09039)宅冷蔵保管されていたキムチ(開封済み)
		091734	大分-09-044	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		100196	9587	O157:H7	+	+	b664	宮崎県	

表 7. PFGE 型が同じで IS-printing System 型が異なるグループ

PFGE	IS-printing	福岡県	福岡市	北九州市	佐賀県	長崎県	長崎市	大分県	熊本県	熊本市	宮崎県	鹿児島県	沖縄県	総計
a259	56642763470							1						1
	56643812042							2						2
	56643812046							4						4
b664	27384076875								1					1
	27384601163											3		3
	66324265923	3						7			1			11
e169	57733536074							1						1
	57733536078			1										1

表 8. IS-printing System 型が同じで PFGE 型が異なるグループ

IS-printing	PFGE	福岡県	福岡市	北九州市	佐賀県	長崎県	長崎市	大分県	熊本県	熊本市	宮崎県	鹿児島県	沖縄県	総計
21764233539	d224	2												2
	d402											1		1
	e544		4											4
	e75											1		1
22284073678	e141	1			1									1
	e250													1
	e317			1										1
23373797731	c374	2												2
	e320			1										1
	e541		1											1
	e558					2								2
27384601163	b664											3		3
	e377		2				1					3		5
	e605						1							1
30652748041	e728										1			1
	e729										1			1
30652944713	e530										1			1
	e727										1	1		1
	e730										1			1
30653010241	c796							1						1
	e125											2		2
30653010249	d836									1				1
	e384											1		1
	e434							2						2
	e76											1		1
30671556744	e121											1		1
	e437							1						1
	e447							2						2
	e448							1						1
	e588	3												3
30671622280	e120											1		1
	e122											2		2
	e135	4												4
	e248				1									1
	e253				1									1
	e254				1									1
	e572	1												1
	e580	1												1
	e581	1												1
	e582	1												1
56643812046	a259							4						4
	c356	1						6						7
	d482				2									2
	e140	1												1
	e251				1									1
	e306			1										1
	e307			1										1
	e308			6										6
	e314			1										1
	e315			1										1
	e316			1										1
	e436							1						1
	e441							1						1
	e442							1						1
	e449							1						1
	e45			2										2
	e593	1												1
	e596	1												1
	e597	2												2
	e711			1										1
57733536078	e169			1										1
	e584	1												1
65012745561	e433							3						3
	e715			1										1
65382642633	a206		1							2				3
	c876		10											10
66324192207	e408					1						2		2
	e463							1						1
	e600							1						1
	e601	3												3
66324257743	d200											1		1
	d240							1				1		2
	d300						1							1
	d751	3												3
	d92	2	2				1	1						6
	e249				1									1
	e349		2											2
	e350		2											2
	e537	28	4											32
	e540											1		1
	e587	2												2
	e598	1												1
	e599	3												3
	e602							1						1
66324265923	b664	3						7			1			11
	d604											1		1
	e445							1						1
	e578	1												1
	e712			1										1
66455335881	e119											1		1
	e594	1												1
66456318921	b184					1								1
	e313	4	1	1										6
	e556	1	1	1										2
66457435083	b142										1			1
	c293	2						1		1	1			5
	c483			1										1
66458483659	d839									1				1
	e403							1						1
	e603						1							1
	e713			1										1



**精度管理用報告形式**

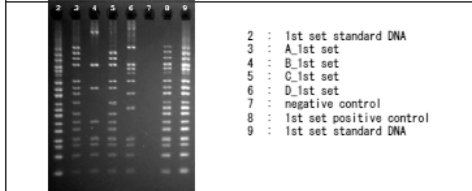
PCR増幅バンドの判定表

機関名 福岡県保健環境研究所

1. 各表 (1st, 2nd) の下の枠内に、泳動写真を貼り付けてください。
2. PCR増幅バンドの有無を(有=1, 無=0)で記入してください。
3. 配布したソフトを用いて一致する菌株名を最終判定結果として表に記入してください

菌株番号	1st set																	2nd set																		
	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	esa	1-16	hly <sub>v</sub>	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	atx2	atx1
A	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
B	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
C	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
D	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1

泳動時間 70 分



泳動時間 70 分

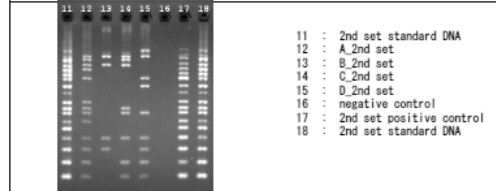
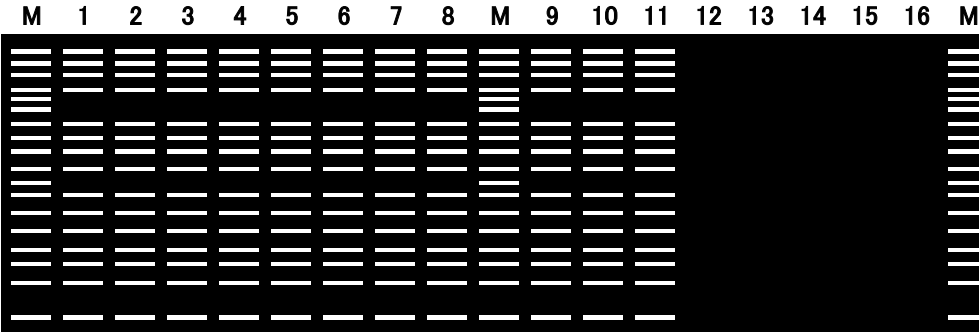


表 最終判定結果

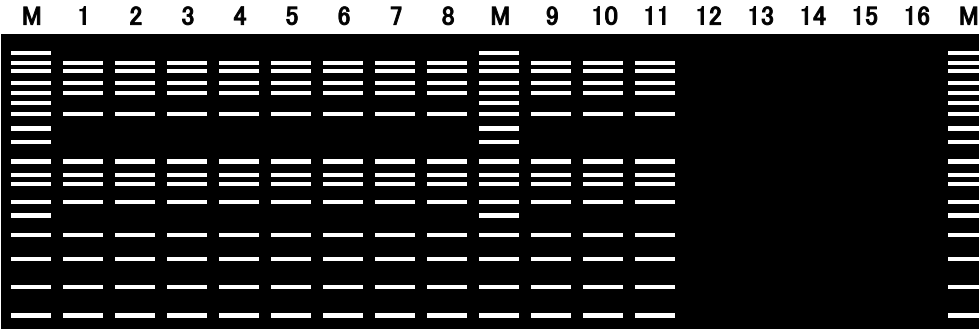
菌株番号	一致した菌株名
A	sakai strain_RIMD0509952
B	09E036
C	09E009
D	09E116

図1 精度管理に使用した菌株と IS-printing System の結果

1st set



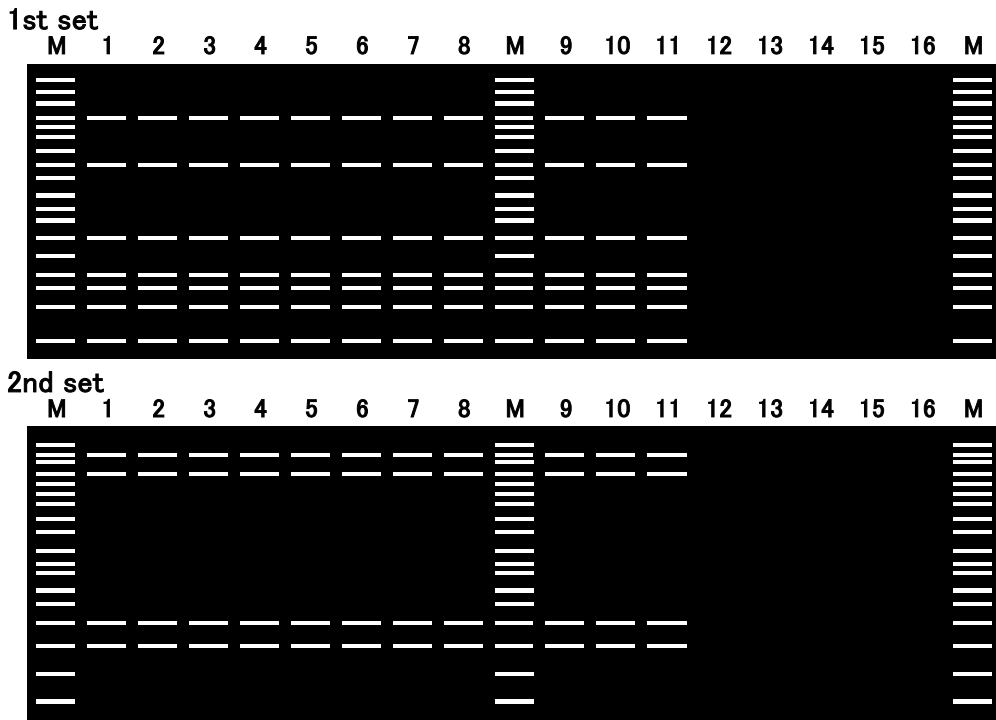
2nd set



1: 2A

9: 10A

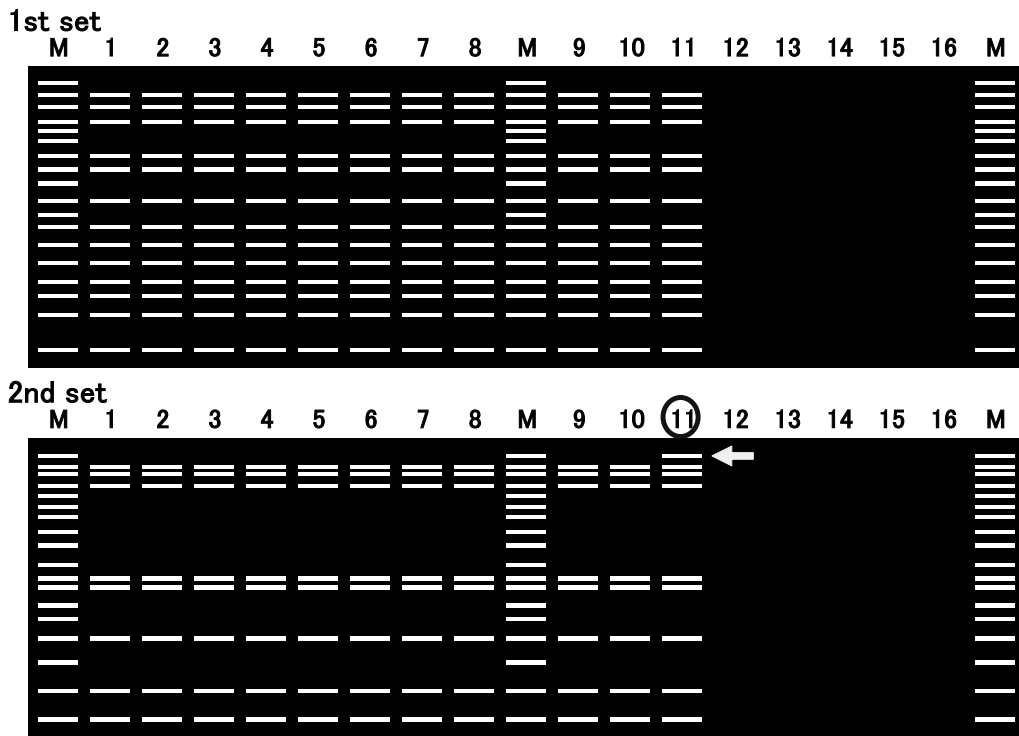
図2 精度管理株 A



1: 2B

9: 10B

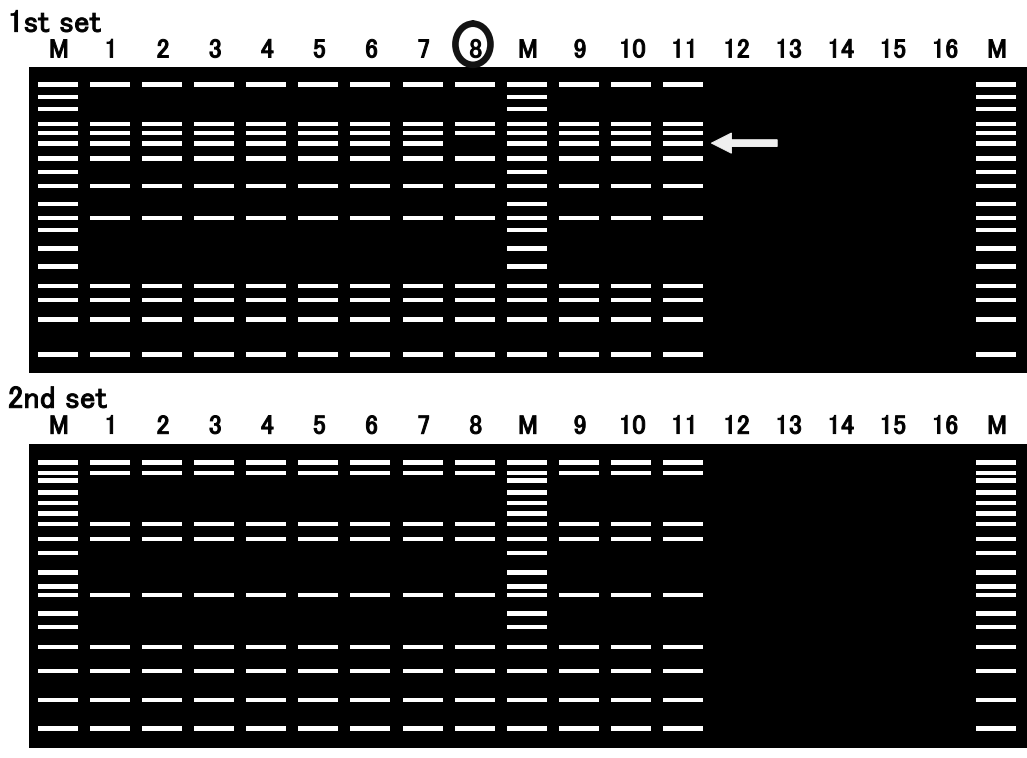
图3 精度管理株 B



1: 2C

9: 10C

图4 精度管理株 C



1: 2D

9: 10D

图5 精度管理株 D

(厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

研究代表者 寺島 淳

国立感染症研究所 細菌第一部

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

(課題番号:H21-新興-一般-003)

平成 21 年度総括・分担研究報告書(平成22(2010)年4月)

平成 21 年 5 月に発生した腸管出血性大腸菌感染 O157:H7(VT1&2 陽性)を  
原因とする食中毒事件について

北九州市環境科学研究所 久保田 勉, 清水寧, 村瀬浩太郎, 下原悦子  
北九州市保健所保健予防課 境 美津枝, 永富あかね, 小川真由美, 佐藤 優  
北九州市保健所東部生活衛生課 刀根誠一, 北村尚男, 太田宏一, 稲富英敏

## 要旨

平成 21 年 5 月に大腸菌 O157:H7(VT1&2 陽性)を原因とする 10 件の腸管出血性大腸菌感染症の届出が相次ぎ、原因菌が同一由来である可能性が考えられたので、患者からの分離株 10 株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行いその異同を調べた。その結果 PFGE パターンがほぼ一致し、このうち患者 4 名については、疫学調査の結果を加味することで、同一感染源を原因とする食中毒と断定できた。また後日実施した IS-printing System と薬剤感受性試験の結果も PFGE 同様、4 名からの分離株が同じ由来であることを示唆する結果であった。

### A. 目的

平成 21 年 5 月、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 による同感染症の届出が相次ぎ、患者への聴き取り調査で全員が牛レバー刺身や焼肉を摂食後に発症していることが判明し、同一の感染源を有する食中毒である可能性が示唆された。そこで、感染源を特定するため、摂食状況、食材の流通経路などの詳しい疫学調査を実施するとともに、患者の糞便から分離された EHEC O157(VT1&2) について、その異同を調べるため、パルスフィールドゲル電気泳動(以下 PFGE)を行った。また後日 IS-printing System による遺伝子解析及び薬剤感受性試験を追加した。

### B. 材料と方法

#### 1. 供試菌株

平成 21 年 5 月 15 日から 26 日の間に発症し、

腸管出血性大腸菌感染症として届け出があった患者 10 名からの O157 分離株 10 株を供試菌株とした。なお、これらはすべて民間の検査機関で分離され、O 型別と毒素型が判明した菌株で、国立感染症研究所に送付するため、保健所が分与を受けたものである。

#### 2. PFGE

当所での PFGE は、国立感染症研究所の方法をもとに作成した「大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 九州ブロックマニュアル(2005)」により実施した。制限酵素は *Xba* I を用い、泳動は電圧 6.0V/cm、パルスタイム 2.2~54.2 秒、バッファー温度 14°C、泳動時間 19 時間の条件で行った。また供試菌株は、後日国立感染症研究所細菌第一部において PFGE 型のサブタイプ名が付与された。

### 3. IS-printing System

IS-printing System による解析は、東洋紡績(株)の試薬キット「IS-printing System」(Ver. 2)を用い、添付のプロトコールに準じて実施した。各菌株の遺伝子の増幅産物をアガロースゲル電気泳動した後、得られたバンドの出現の有無を2進数(1,0)で表現し、さらに10進数に変換して11桁の挿入配列の組み合わせに固有のIDコード番号を付与した。

### 4. 薬剤感受性試験

分離株10株の薬剤感受性試験をセンシ・ディスク(BD BBL)を用い、KB法により実施した。供試薬剤は、アンピシリン(AM)、セフトキシム(CTX)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(K)、ストレプトマイシン(S)、テトラサイクリン(TE)、シプロフロキサシン(CIP)、クロラムフェニコール(C)、ナリジクス酸(NA)、スフファメキサゾール/トリメプリム(STX)、ノルフロキサシン(NOR)、ホスホマイシン(FF)の12種である。

## C. 結果及び考察

### 1. 疫学調査結果

表1に疫学調査の結果を示す。

10名の患者は、個別に届出があったが、摂食状況から8つのグループに分けられた。そしてグループG2、G3、G4、G7の患者であるNo. 3、4、5、6、9の5名には次のような共通点があった。

- ① 利用施設はすべて焼肉料理店であった。
- ② 患者は全員牛レバー刺身を摂食していた。
- ③ 患者が摂食した牛レバーの処理・流通ルートが同一であった。

即ち、摂食した焼肉店は異なるものの、同じ5月15日に処理された牛レバー刺身を摂食しており、その牛レバーの仕入れ先もすべて同じKという取扱業者であった。これらから、肉料理(焼肉・牛レバー刺身等)を原因食品とする同一の感染源による細菌性食中毒であることが強く疑われた。

その他のグループについては、焼肉や牛レバー刺身を摂食していることで食中毒の疑いがあっ

たが、上記の5名との共通点が明らかではなかった。

### 2. 遺伝子型の比較

患者10名のO157分離株のPFGEの結果を図1に示す。10株のうち、1株(No.9)を除く9株はほぼ同じパターンであった。No.9の株は、他の株とバンド2本の位置の違いが見られた。PFGE解析の結果からは、10株が同一由来であることが示唆された。

一方、後日実施したIS-printing Systemの結果は、図2及び表2に示すように10名全員が同じIDコード番号「56643812046」となった。

### 3. 薬剤感受性

分離株の12種類の抗生物質に対する感受性を調べた。その結果、患者No.1由来の1株を除き、残り9株がほぼ同じ薬剤感受性パターンを示した。このNo.1由来の1株だけがSとTEに感受性を示したが、他の9株は両薬剤に耐性を示した。SとTEを除く他の薬剤については、10株すべてが感受性を示した。

以上の結果をまとめたものを表3に示す。

疫学状況から、食中毒を強く疑った4グループ5名の株に限ってみると、患者No.3、4、5、6の4名はPFGEパターンがほぼ同一であったこと、及び疫学情報から肉料理(焼肉・牛レバー刺身等)を原因食品とする同一の感染源による集団食中毒事件と断定された。なお患者No.9については、これと同じ食中毒であることが強く示唆されたが、行政処分までには至らなかった。

一方、患者No.1、2、7、8、10については、食中毒事例とほぼ同じPFGEパターンであったことから、双方の関連性が示唆されたが、摂食状況に関する聴き取り調査に協力が得られなかったり、レバーの仕入れ日や取扱業者が異なる、摂食日が異なるなど若干の疫学状況の違いがあり、集団食中毒事件と断定するまでには至らなかった。

## E. まとめ

今回、O157による腸管出血性大腸菌感染症の

中から、遺伝子解析を行うことにより、疫学調査の結果を裏付け、3 件の食中毒事件を見つけ出すことができた。

また PFGE や IS-printing System のような遺伝子解析法は、食中毒の可能性が否定できない場合や摂食から探知までに長くかかって検査のための食材が得られない場合などに、原因菌検査や疫学調査の結果を補強あるいは裏付けるものとして、その有用性が非常に高いことがわかった。

事例発生時には PFGE と IS-printing System の両方を同時併行することが望まれるが、原理の違いから解析結果が一致しないことも多く、今後も事例ごとにデータを積み重ねて検討することで、それぞれの特性を活かした活用方法が選定されてくると思われる。

謝辞 分離株を分与くださった関係者の皆様、また PFGE 型別を実施してくださった国立感染症研究所細菌第一部の関係者の皆様に深謝いたします。

表 1 腸管出血性大腸菌感染症の発生状況（平成21年5月）

グループ	患者No	年齢	性別	発症日	症 状	摂食状況		摂食日	レバーの仕入れ日と取扱業者	会食者数	牛レバー刺身の摂食者数	有症者数	特記事項
						焼肉店	生レバー刺身摂食						
G1	1	8	M	5/17	腹痛、下痢	市内	○	5/12	不明	不明	不明	2	家族
	2	33	F	不明	腹痛、下痢		○						
G2	3	10	M	5/20	腹痛、下痢、血便、その他	S	○	5/15	5/15 K	4	2	1	
G3	4	6	M	5/18	腹痛、嘔吐、発熱(37°C)、下痢、血便、その他	A	○	5/15	5/15 K	8	7	1	
G4	5	24	F	5/19	腹痛、下痢、血便	Y	○	5/16	5/16 K	17	9	2	同一グループレバーの処理は5/15
	6	59	F	5/20	腹痛、発熱(37°C)、下痢、血便		○	5/16	5/16 K				
G5	7	52	F	5/19	腹痛、下痢、血便	知人宅でバーベキュー		5/14	/	不明	不明	1	同系列の食肉販売店で購入の肉
						自宅で焼肉		5/16		2	不明		
G6	8	10	M	5/19	腹痛、嘔吐、発熱(37.6°C)、下痢、血便	O	○	5/16	5/12 F	4	4	1	
G7	9	8	M	5/19	腹痛、発熱(39°C)、下痢、血便	T	○	5/17	5/15 K	7	6	1	
G8	10	7	F	5/26	腹痛、下痢、血便	市外	○	5/17	5/12 J	2	3	1	

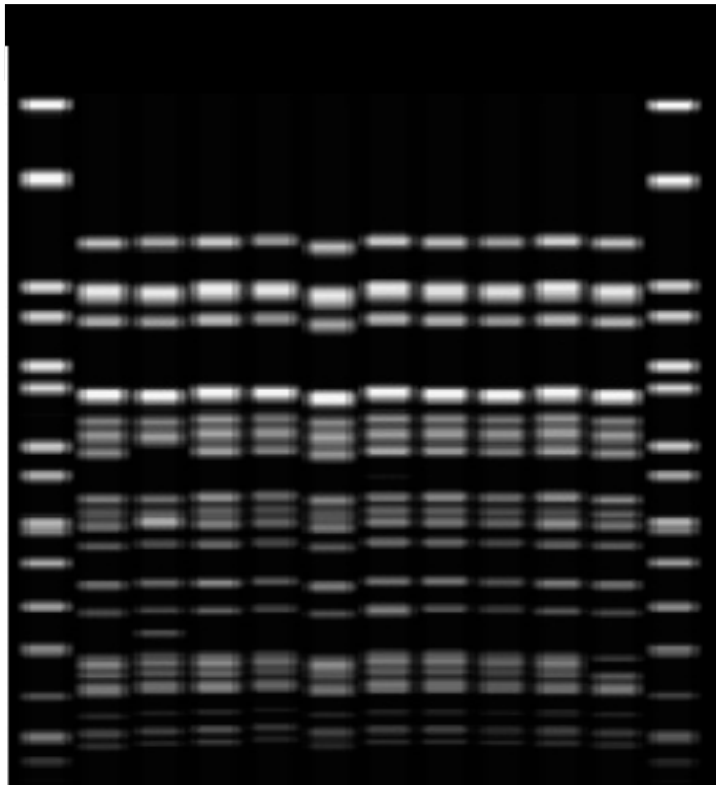
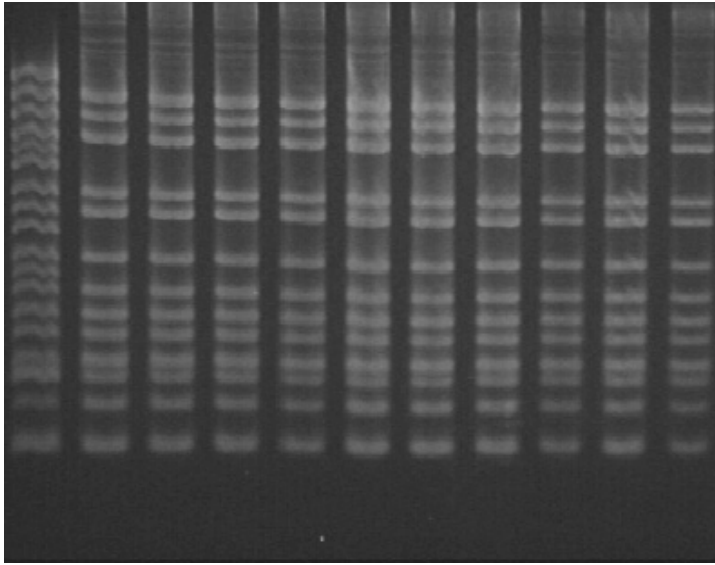


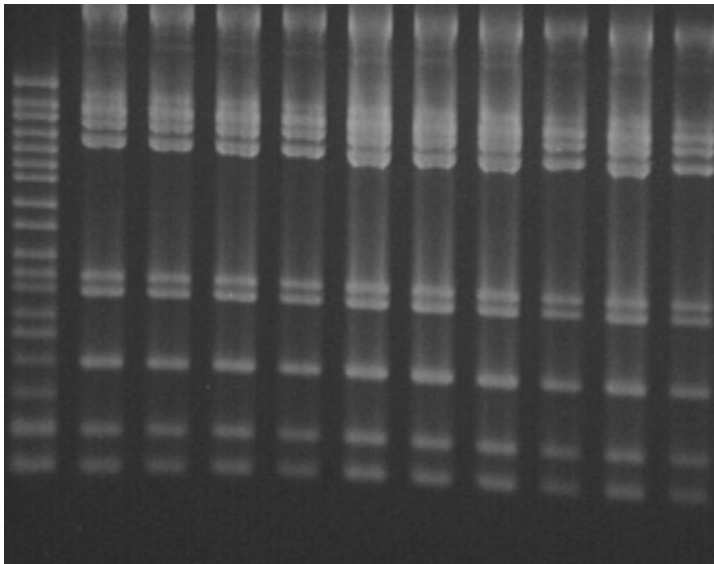
図1 分離株の PFGE パターン

St 1 2 5 3 6 4 7 8 9 10



1st primer set

St 1 2 5 3 6 4 7 8 9 10



2nd primer set

図2 患者分離株の IS-printing System の結果



表2 IS-printing System のまとめ

primer 15 : eae primer 17 : hlyA primer 34 : stx2 primer 35 : stx1

統合結果

Name	10進数	Results																																			
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
2	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
3	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
4	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
5	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
6	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
7	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
8	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
9	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
10	56643812046	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1

1st set

2nd set

表3 O157分離株についての遺伝子解析と薬剤感受性試験のまとめ

グループ	患者No	PFGE コメント (感染研による)	感染研 PFG E型	IS-printing Systemの コード番号	薬剤感受性			摂食日	レバーの 仕入れ日と 取扱業者	特記事項	備考
					S	TE	SとTE 以外				
G 1	1	No 2と1本違い	e307	566438 12046	○	○	○	5/12	不明	家族	散発
	2		e308	同上	×	×	○	5/12			散発
G 2	3	No 2と同じ	e308	同上	×	×	○	5/15	5/15 K		食中毒
G 3	4	No 2と1本違い	e45	同上	×	×	○	5/15	5/15 K		食中毒
G 4	5	No 2と同じ	e308	同上	×	×	○	5/16	5/16 K	同一グループ レバーの処理 は5/15	食中毒
	6	No 5と3本違い	e306	同上	×	×	○	5/16	5/16 K		
G 5	7	No 4と同じ	e45	同上	×	×	○	5/14 5/16		同系列の食 肉販売店で 購入の肉	散発
G 6	8	No 2と同じ	e308	同上	×	×	○	5/16			5/12 F
G 7	9	No 2と2本違い	e316	同上	×	×	○	5/17	5/15 K		散発
G 8	10	No 2と同じ	e308	同上	×	×	○	5/17	5/12 J		散発

○:感受性あり ×:耐性あり

北九州市環境科学研究所報

第37号

〒804-0082

北九州市戸畑区新池一丁目2番1号

北九州市環境科学研究所

電話(093)882-0333 FAX(093)871-2535

e-Mail [kan-kenkyuu@city.kitakyushu.lg.jp](mailto:kan-kenkyuu@city.kitakyushu.lg.jp)

