

京都府内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例の IS-printing system およびパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた疫学解析

浅井 紀夫 中嶋 智子 柳瀬 杉夫 三谷 亜里子* 河村 絵美** 小嶋 新也**

Examination of the Epidemiological Analysis of *Escherichia coli* O157 Using IS-printing System and Pulsed-field Gel Electrophoresis

Norio ASAI Satoko NAKAJIMA Sugio YANASE Ariko MITANI* Emi KAWAMURA**
Shinya KOJIMA**

要 旨

2009年9月21日に届け出があった腸管出血性大腸菌 O157 患者の父親が、2009年8月から9月に複数の自治体で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例に関連したステーキチェーン店で喫食していたことがわかり、父親、兄からも腸管出血性大腸菌 O157 が分離された。そこで、患者および家族の喫食状況、発症状況の詳細な事例調査を行い、さらに分離株とステーキチェーン関連の患者由来株とをパルスフィールドゲル電気泳動および、IS-printing system を用いて、比較・検討した。その結果、当該事例も同じステーキチェーンが原因と疑われる広域散発事例由来株による感染症事例の一つであり、患者は家族から二次感染した疑いのあることが判明した。さらに、スクリーニング方法として IS-printing system が迅速性、コスト面、操作性において優れていることを確認した。

キーワード：腸管出血性大腸菌 O157、疫学解析、パルスフィールドゲル電気泳動法、IS-printing system

key words : Enterohemorrhagic *Escherichia coli*O157, Epidemiological analysis, pulsed-field gel electrophoresis, IS-printing system.

はじめに

腸管出血性大腸菌感染症発生者数は、1996年に日本国内で腸管出血性大腸菌 O157 が大流行した後も減少することなく、ここ10年間では毎年3～4千人もの腸管出血性大腸菌感染症届出がなされている¹⁾。

2009年8～9月にかけて、ステーキチェーン A との関連が疑われる腸管出血性大腸菌 O157:H7 ベロ毒素 1 およびベロ毒素 2 産生株 (O157 VT1+ VT2+) の感染症事例が、複数の都府県・自治体において発生した。また発症に強く関連していると推測された8月3日製造の角切りステーキ肉が8月17日～26日に中国・四国地方を含む関西方面へ出荷され、8月16日～9月2日に当該ステーキを喫食することによる食中毒事例が奈良県、滋賀県、広島県、広島市、東大阪市においてそれぞれ発生した²⁾。

2009年9月21日付けで医療機関から管轄する保健所に届出があった腸管出血性大腸菌 O157 感染患者の父親、母親、および兄の検便を行ったところ、父親および兄から O157 VT1+ VT2+ が分離された。また、症状のなかった父親が、ステーキチェーン A 関連店舗で喫食していた

(平成22年9月1日受理)

* 京都府山城北保健所

*Kyoto Prefectural Yamashiro Kita Public Health Center

** 京都府山城南保健所

**Kyoto Prefectural Yamashiro Minami Public Health Center

ことがわかった。

そこで、当該事例と広域散発事例との関連性について検討するため、詳細な患者および家族の喫食状況、発症状況等の事例調査を行った。さらに、腸管出血性大腸菌 O157 の標準的解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) および近年開発された IS-printing system を用いて分子疫学解析を行い、奈良県で分離されたステーキチェーン A 関連のヒト由来株3株と当該事例で分離された患者、父親および兄の3株とを比較・検討した。また、IS-printing system についての有用性を考察した。

材料と方法

1. 事例調査

山城南保健所が患者家族に8月～9月にかけての患者および家族のステーキチェーン A 関連店舗来店状況、角切りステーキ喫食状況、および発症状況について聞き取り調査を行った。

2. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

勢戸らの手法³⁾により、Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson 製) で 36℃、一晚培養した表1の菌株を用いて PFGE を行った。XbaI (30 units/sample) (ロッシュ・ダイアグノスティックス製) および BlnI (40 units/sample) (ロッシュ・ダイアグノスティックス製) の制限酵素を用いて、37℃、2時間消化処理を行った。電気泳動は、

表 1. 疫学解析に供した腸管出血性大腸菌 O157:H7 菌株一覧

菌株番号	由来	備考
No1	ヒト糞便	奈良県分離ステーキチェーン A 関連株
No2	ヒト糞便	奈良県分離ステーキチェーン A 関連株
No3	ヒト糞便	奈良県分離ステーキチェーン A 関連株
No4	ヒト糞便	山城北保健所分離患者 (8 才) 株 9/16 採取
No5	ヒト糞便	山城北保健所分離患者父親 (42 才) 株 9/23 採取
No6	ヒト糞便	山城北保健所分離患者兄 (11 才) 株 9/23 採取

BioRad CHEFF-DRII (BioRad 製) を使用し、TBE Buffer (0.5M Tris, 0.45M Boric acid, 0.005M EDTA) を用いて、6 V/cm, スイッチングタイム 2.0-54.2 秒、泳動時間 18.0 時間、12.5℃ の条件で実施した。泳動終了したゲルをエチジウムブロマイド染色し、紫外線照射下でバンドを検出した。結果は写真から検体ごとの泳動パターンを比較・検討した。分子量マーカーは *Salmonella* Braenderup H9812 を *XbaI* により同様に処理して用いた。

3. IS-printing system

大岡ら⁴⁾により開発された IS-printing system (version2) (TOYOBO) を用い、キット添付の取扱説明書に従って試験を行った。DNA の抽出には、表 1 の菌株を SMac 寒天培地 (OXIOD 製) に画線塗抹し、36℃、24 時間培養したコロニーを用いた。電気泳動は説明書の推奨どおり 3% アガロース (NuSieve GTG Ararose (Lonza 製)、Seakem GTG Agarose (Lonza 製) を重量比 2:1 で使用) ゲルを用い、約 1 時間泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下でバンドを検出した。各検体について規定分子量サイズ位置でのバンドがあれば 1、なければ 0 として、セットごとに 18 桁数字を分子量サイズの大きい順にら列して結果を示した。

結果と考察

事例調査及び 2 種類の検査法による検査結果と考察について

当該事例の詳細な事例調査結果を表 2 に示す。患者は父親と兄の 3 人でステーキチェーン店に来店し、その際、患者と兄のそれぞれが角切りステーキの肉片を一口喫食していた。また、母親は 3 人とは別の日に同じステーキチェーン店で角切りステーキを喫食し、その 4 日後から軽い下痢等の症状を呈していた。しかし、通常は腸管出血性大腸菌 O157 の潜伏期は 3~5 日程度であるにもかかわらず⁵⁾、患者は喫食後 2 週間してから発症したこと。また、O157VT1+ VT2+ の検出された兄も喫食後 10 日間発症は見られず、さらに喫食後下痢を呈した母親からは O157 VT1+ VT2+ を検出しなかったことから、患者の発症の原因が喫食した角切りステーキそのものによる可能性について事例調査のみでは判断できないと結論した。

腸管出血性大腸菌 O157 は PFGE 等の遺伝子学的手法を用いることにより高い確率で菌株の関連性を議論できる⁶⁾。本ステーキチェーン関連事例についても PFGE の泳動パターンは一致することが報告されている²⁾。また、大岡ら⁴⁾により開発された IS-printing system は菌株間のゲノム構造多型に大きく関与している挿入因子の分布の

表 2. 患者および家族のステーキチェーン A 関連店舗への来店状況、角切りステーキ喫食状況および発症状況

月 日	患者	父親*	母親	兄**
8 月 28 日			ステーキチェーン店来店 (角切りステーキ喫食)	
8 月 30 日	ステーキチェーン店来店 (角切りステーキ口喫食)	ステーキチェーン店来店 (角切りステーキ喫食)		ステーキチェーン店来店 (角切りステーキ口喫食)
9 月始め			3~4 日下痢	
9 月 9 日			回復	下痢
9 月 11 日				回復
9 月 13 日	腹痛・下痢・発熱			
9 月 14 日	受診・整腸剤処方			
9 月 16 日	血便、再受診、検便			
9 月 20 日	O157 VT1+ VT2+ 検出 届出、保健所調査、 家族検便実施			
9 月 26 日				O157 VT1+ VT2+ 検出
9 月 27 日		O157 VT1+ VT2+ 検出	O157 VT1+ VT2+ 検出せず	

* 父親は無症状病原体保有者

** 兄は病原体検出時点では症状無し

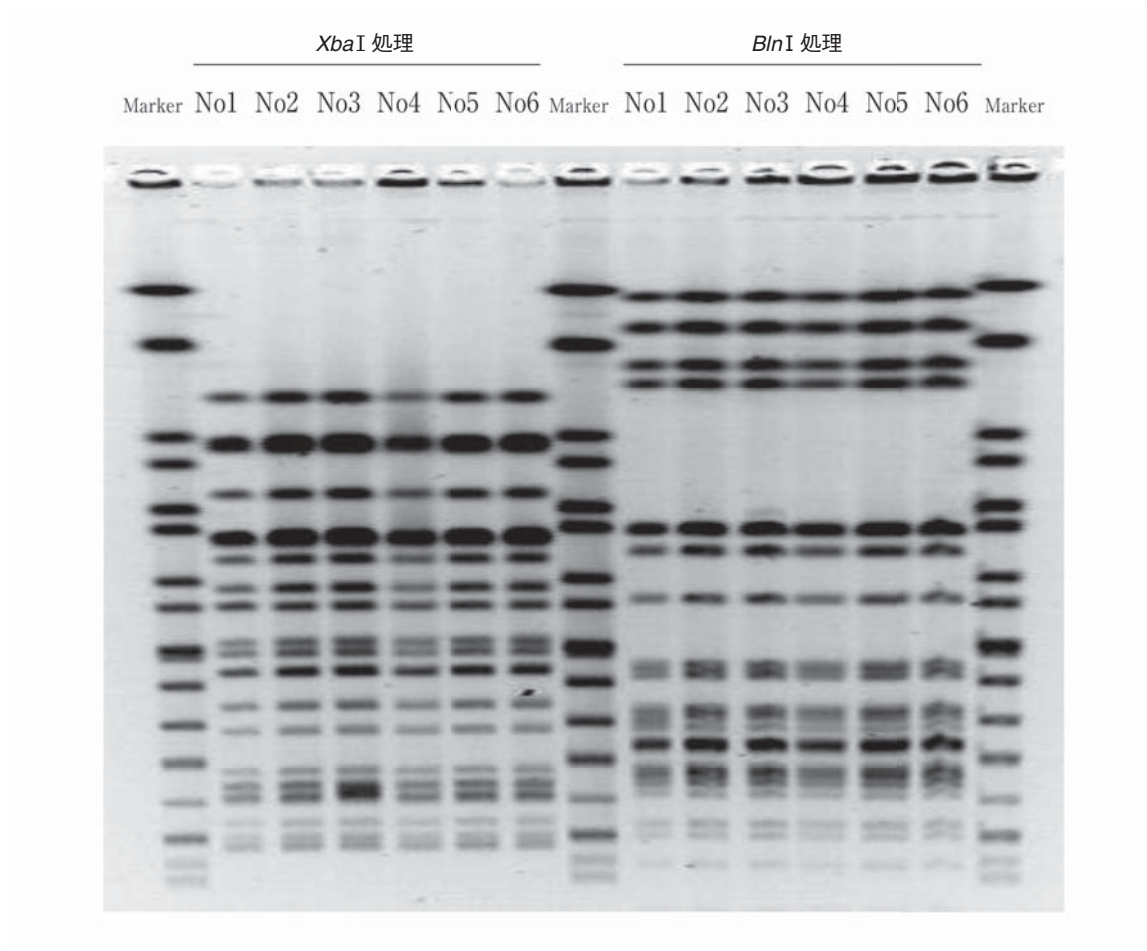


図1 腸管出血性大腸菌 O157 菌株のパルスフィールドゲル電気泳動パターン
XbaI 処理、*BlnI* 処理ごとにレーン番号は表1の菌株番号を示す。(Marker は *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた)

表3. IS-printing system による解析結果

菌株番号	1 st set のバンド番号																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
No1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
No2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
No3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
No4	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
No5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
No6	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1

菌株番号	2 nd set のバンド番号																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
No1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
No2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
No3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
No4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
No5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
No6	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

菌株番号は表1のとおり
 (規定分子量サイズにバンドがある場合を1、無い場合を0と表記)

違いを利用した腸管出血性大腸菌 O157 解析方法であり、実用上優れた分子疫学解析法と評価されている。末永ら⁷⁾や金子ら⁸⁾は PFGE と IS-printing system との解析結果が異なるケースを報告し、清水ら⁹⁾は PFGE と IS-printing system を併用することにより、更に詳細な疫学解析が可能であるとしている。本事例においても PFGE および IS-printing system を併用した遺伝子解析を行った。ステーキチェーン A 関連ヒト由来株 No1 ~ No3 の 3 株および、当該事例で分離した No4 ~ No6 の 3 株について、*XbaI* および *BlnI* で処理した PFGE の結果を図 1 に示す。また、IS-printing system の結果を表 3 に示す。*XbaI*、*BlnI* いずれの制限酵素で処理した場合も No1 ~ No6 の各バンドの数および位置は同一であり、6 株の泳動パターンは完全に一致した。さらに、IS-printing system 解析では、1st set primer mix の系は 6 株全て 110100111100111101 になり、また、2nd set primer mix の系でも 6 株全て 011100100111101111 となった。

いずれの解析方法によっても 6 株は全て同じ関連の株であると判定できる。したがって、当該事例もステーキチェーン A で提供された角切りステーキが原因食品と疑われる広域散発事例の一つであると判断した。しかし、事例調査の結果を考慮すると、患者の発症は本人が食した角切りステーキが直接の原因ではなく、家族からの二次感染によると考察するほうが妥当と考えられる。母親の症状が回復した直後、兄が下痢を呈し、兄が回復した 2 日後に患者が発症した。また、患者の発症は母親の回復した 5 日後にも当たる。一般に発症時に排菌量が多くなる¹⁰⁾ことから、本事例においては母親から兄に感染し、兄から患者へ感染したか、あるいは、母親から直接感染したものと考えられる。いずれにせよ家族内感染の疑いが残る事例である。

本調査研究における遺伝子解析には PFGE および IS-printing system を用いた。いずれの解析方法を用いても 6 株が同一由来であるとする結果が得られた。

PFGE ではゲルブロック作製から結果判明までに 24 時間以上の時間を要するが、IS-printing system は DNA の抽出開始から約 4 時間後に結果が得られる。また、通常の PCR 装置があれば実施可能であり、結果はバンドの有無のみで判断できること等から、本事例のように PFGE で解析を行っても IS-printing system で解析を行っても同じ結論が得られるケースでは、迅速な感染経路解明が望まれる腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例のスクリーニング手段として IS-printing system が有用であると考えられる。

謝辞

本研究にあたり菌株をご提供いただいた奈良県保健環境研究センターおよび関係医療機関の皆様へ深謝いたします。

引用文献

- 1) 寺嶋淳, 伊豫田淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎, 石原朋子, 大西真. 2010. <特集>腸管出血性大腸菌感染症 2010年5月現在. 病原微生物検出情報(月報) 31, 152-156.
- 2) 古宮伸洋, 具苛明, 八幡裕一郎, 砂川富正. 2010. ステーキチェーン A で発生した腸管出血性大腸菌感染症 O157 広域散発事例. 病原微生物検出情報(月報) 31, 156-157.
- 3) 勢戸和子, 石川和彦, 藤原恵子, 竹上修平, 小笠原準, 横田正春, 西海弘城, 黒川学, 川西伸也, 中山章文, 金澤祐子, 田口真澄, 小林一寛. 2003. 近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)型別法の施設間変動について. 「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」(渡辺治雄 編), pp95-104, 平成 15 年度総括・分担研究報告書(厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業). 東京.
- 4) Tadasuke Ooka, Jun Terajima, Masahiro Kusumoto, Atsushi Iguchi, Ken Kurokawa, Yoshitoshi Ogura, Md Asadulghani, Keisuke Nakayama, Kazunori Murase, Makoto Ohnishi, Sunao Iyoda, Haruo Watanabe and Tetsuya Hayashi. 2009. Development of a Multiplex PCR-Based Rapid Typing Method for Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 Strains. Journal of Microbiology, 2888, 47.
- 5) 寺嶋淳. 2004. 腸管出血性大腸菌感染症. 「感染症の事典」(国立感染症研究所学友会 編), pp155-157, 朝倉書店, 東京.
- 6) 和田昭仁, 寺嶋淳, 渡辺治雄. 1997. パルスフィールド電気泳動法(PFGE)による分子疫学同定法. 日本細菌学雑誌, 763, 52.
- 7) 末永朱美, 田中寛子, 花木陽子, 毛利好江, 蔵田和正, 石村勝之, 池田義文, 笠間良雄. 2009. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学解析の比較. 広島市衛生研究所年報, 28, 37-40.
- 8) 金子紀子, 大谷勝美, 青木敏也. 2008. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の PFGE および IS-printing system による分子疫学解析. 山形県衛生研究所年報, 41, 29-31.
- 9) 清水俊一, 森本洋, 駒込理佳, 山口敬治. 2009. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動システム(PFGE)と IS-printing system の比較検討. 北海道衛生研究所年報, 59, 67-71.
- 10) 工藤泰雄, 津野正朗, 大橋誠. 1987. 一般的検査体系. 細菌・真菌検査, 第 3 版(微生物検査必携編集委員会 編), B2-B13, 日本公衆衛生協会, 東京.