

## 腸管出血性大腸菌O157食中毒事例と分離菌株の疫学解析法について

平成26年は、東京都において腸管出血性大腸菌（EHEC）による食中毒が5件発生し、全てO157によるものでした。このうち、福島県で発生した馬刺しによるO157食中毒事件では、11都県に渡って患者が発生し、原因究明に菌株の分子疫学解析が貢献しました。

本件では菌株の分子疫学解析法として、従前から行ってきたPulsed-field Gel Electrophoresis法（以下、PFGE法という。）に加えて、IS-printing System法（以下、IS法という。）も用いられました。IS法は、PFGE法と比較して識別能がやや落ちる等のデメリットがあるものの、迅速かつ簡便にO157の型別が可能というメリットがあります。

そこで、事件の内容と共に「IS法」という新しい検査法の概要と特徴について取りまとめましたので、ご紹介します。

### I 馬刺しによる食中毒事件について

#### 1 事件の概要

平成26年4月4日、新潟市から福島県に「腸管出血性大腸菌感染症の発生届出があり、喫食調査を行ったところ、福島県内の食肉処理業者が加工した馬刺しを喫食している。」との連絡があった。同日、新潟県、茨城県、福島県内の医療機関からも同様の発生届又は食中毒疑い事例の連絡があり、福島県が調査を開始した。

同月6日、福島県は当該業者に対し、3月24日以降に加工した製品について自主回収を要請するとともに、出荷・流通販売先自治体に有症苦情の有無等の調査を依頼した。

同月7日、福島県から東京都に「県内の食肉処理業者が加工した生食用の馬肉製品（馬刺し）について、腸管出血性大腸菌O157に汚染されている恐れがあるため、自主回収に着手した。」旨の連絡があったことから、当該品の流通調査とともに販売先の飲食店等の利用者に発症者がいないか調査を行った。また、保菌者検索事業等で把握したO157散发患者について、喫食状況等の調査を行った。

その結果、当該「馬刺し」を喫食していることが判明した都内の腸管出血性大腸菌O157患者について、福島県及び新潟県で発生した患者ふん便由来のO157菌株とともに疫学的性状検査を実施したところ、PFGE型が一致した。また、福島県の依頼により実施したIS法による検査の結果も全て一致した。

以上により、都内においては6グループ14名の患者が確認された。また、福島県が取りまとめた結果、当該施設が加工した馬刺しを喫食し、発症した患者は88名（11都県内）となった。

#### (1) 新宿区内の飲食店について（グループ1：事件番号 No. 23）

4月8日、中野区内の医療機関から中野区保健所に腸管出血性大腸菌感染症の発生届出があった。患者は3月28日に新宿区内の飲食店を2名で利用し、調査協力を得られた1名が3月31日から下痢（粘血便）、腹痛、発熱等を呈していた。

当該飲食店では福島県内の食肉処理業者が加工した「馬刺し」を仕入れており、1パック100g（2名分）の馬肉を注文の都度開封してカットし、薬味（大根のつま、万能ネギ、おろし生姜）を添えて提供していた。他の患者ふん便由来のO157菌株とPFGE型が一致したことから、当該「馬刺し」による食中毒と断定された。

#### (2) 千代田区内の飲食店について（グループ2：事件番号 No. 24）

4月7日、練馬区内の医療機関から練馬区保健所に腸管出血性大腸菌感染症の発生届出があった。患者は3月28日に千代田区内の飲食店を3名で利用し、当人のみが4月1日から腹痛、下痢等を呈していた。

当該飲食店では福島県内の食肉処理業者が加工した「馬刺し」を仕入れており、1ブロックの馬肉を半分に切り分け、これをさらに6枚（1枚約8g）にスライスし、大葉と大根のつまをのせた上に盛り付け、薬味（味噌、おろし生姜、小口切りした万能ねぎ）を添えて提供していた。他の患者ふん便由来のO157菌株とPFGE型が一致したことから、当該「馬

刺し」による食中毒と断定された。

事件番号	No. 2 3	No. 2 4	No. 2 5	
発生期間	3月31日（時刻不明）	4月1日23時から	4月2日11時から 同月5日9時まで	
原因施設	飲食店（一般）	飲食店（一般）	飲食店（一般）	
患者数 ／喫食者数	1／1	1／3	6／7	
発症率	100.0%	33.3%	85.7%	
原因食品	馬刺し	馬刺し	馬刺し	
病因物質	腸管出血性大腸菌O157 (VT1, VT2産生性)	腸管出血性大腸菌O157 (VT1, VT2産生性)	腸管出血性大腸菌O157 (VT1, VT2産生性)	
検査結果	拭き取り	0／8 食中毒菌及び ウイルス（－）	0／13 食中毒菌（－）	0／7 食中毒菌（－）
	食品 (参考品)	0／4 食中毒菌及び ウイルス（－）	1／3 Sta(+)	0／5 食中毒菌及び ウイルス（－）
	患者 ふん便	1／1 EHEC O157 (VT1, VT2産生性)	1／1 EHEC O157 (VT1, VT2産生性)	3／7 EHEC O157 (VT1, VT2産生性)
	従事者 ふん便	0／4 食中毒菌及び ウイルス（－）	0／20 食中毒菌（－）	0／21 食中毒菌及び ウイルス（－）
症 状	おう吐	0名	0名	0名
	下痢	1名(100.0%) 〔回数〕 不明 〔便の性状〕 粘血便	1名(100.0%) 〔回数〕 10回以上 〔便の性状〕 血便	5名(83.3%) 〔回数〕 3回：2名 5回：2名 10回以上：1名 〔便の性状〕 水様：4名 粘液：1名 粘血：1名 軟便：1名
	発熱	1名(100.0%) 37℃	0名(0.0%)	2名(33.3%) 〔体温〕 37℃未満：1名 37.0～37.4℃：1名
そ の 他 の 症 状	腹痛	1名(100.0%)	1名(100.0%)	5名(83.3%)
	吐き気	0名(0.0%)	0名(0.0%)	0名(0.0%)
	頭痛	0名(0.0%)	0名(0.0%)	0名(0.0%)
	ふるえ	0名(0.0%)	0名(0.0%)	0名(0.0%)
	しぶり腹	1名(100.0%)	0名(0.0%)	2名(33.3%)
	倦怠感	0名(0.0%)	0名(0.0%)	1名(16.7%)
	脱力感	0名(0.0%)	0名(0.0%)	1名(16.7%)
	寝込んだ	1名(100.0%)	1名(100.0%)	1名(16.7%)
	寒気	1名(100.0%)	0名(0.0%)	2名(33.3%)
	げっぷ	0名(0.0%)	1名(100.0%)	0名(0.0%)
その他	0名(0.0%)	胃の具合が悪くなった 1名(100.0%)	0名(0.0%)	

(3) 港区内の飲食店について（グループ3：事件番号 No. 25）

4月10日、飲食店の営業者から港区みなと保健所に、以下の報告があった。

当該営業者の系列店では自主回収の対象となっている福島県内の食肉処理業者が加工した「馬刺し」を取り扱っており、系列の別店舗の利用客から腸管出血性大腸菌による患者が発生した。そこで、各系列店舗で「馬刺し」を提供した予約客に問い合わせたところ、当該店舗の利用者に発症者がいることが判明した。

調査の結果、当該店では、仕入れた馬モモ肉を1切れ約8gに切り分け、1人前2切れ及び鯛の刺身を盛り合わせ、味噌だれを添えて提供していた。

3月31日に当該店舗を利用した1グループ7名のうち6名が4月2日から5日にかけて、腹痛、下痢、発熱等を呈していた。患者ふん便6検体のうち3検体からO157を検出し、他の患者ふん便由来のO157菌株とPFGE型が一致したことから、当該「馬刺し」による食中毒と断定された。

(4) その他、都内で発生した食中毒患者について

ア 4月9日、練馬区内の医療機関から練馬区保健所に、腸管出血性大腸菌感染症の発生届出があった。患者は3月29日に自宅においてスーパーで購入した馬刺しを家族3名とともに喫食し、当人のみが4月1日から腹痛、下痢等を呈して受診、溶血性尿毒症性症候群(HUS)を発症して入院していた。

スーパーの仕入れ状況及び遡り調査により、当該店舗では特段の加工行為を行っていないこと、患者が喫食した馬刺しは福島県内の食肉処理業者が加工した「馬刺し」であることが判明し、他の患者ふん便由来のO157菌株とPFGEが一致したことから、当該「馬刺し」による食中毒と断定された。（グループ4）

イ 4月12日、世田谷区内の医療機関から世田谷区世田谷保健所に、腸管出血性大腸菌感染症の発生届出があった。患者は3月28日から4月5日まで、家族5名で母親の実家の福島県に帰省しており、3月29日に実家近くの販売店で購入した馬刺しを喫食した。当人を含む4名が4月2日から5日までに下痢、腹痛、発熱等を呈しており、当人は、HUSを呈して入院していた。

福島県の調査により患者が喫食した馬刺しは、福島県内の食肉処理業者が加工した「馬刺し」であることが判明し、他の患者ふん便由来のO157菌株とPFGEが一致したことから、当該「馬刺し」による食中毒と断定された。（グループ5）

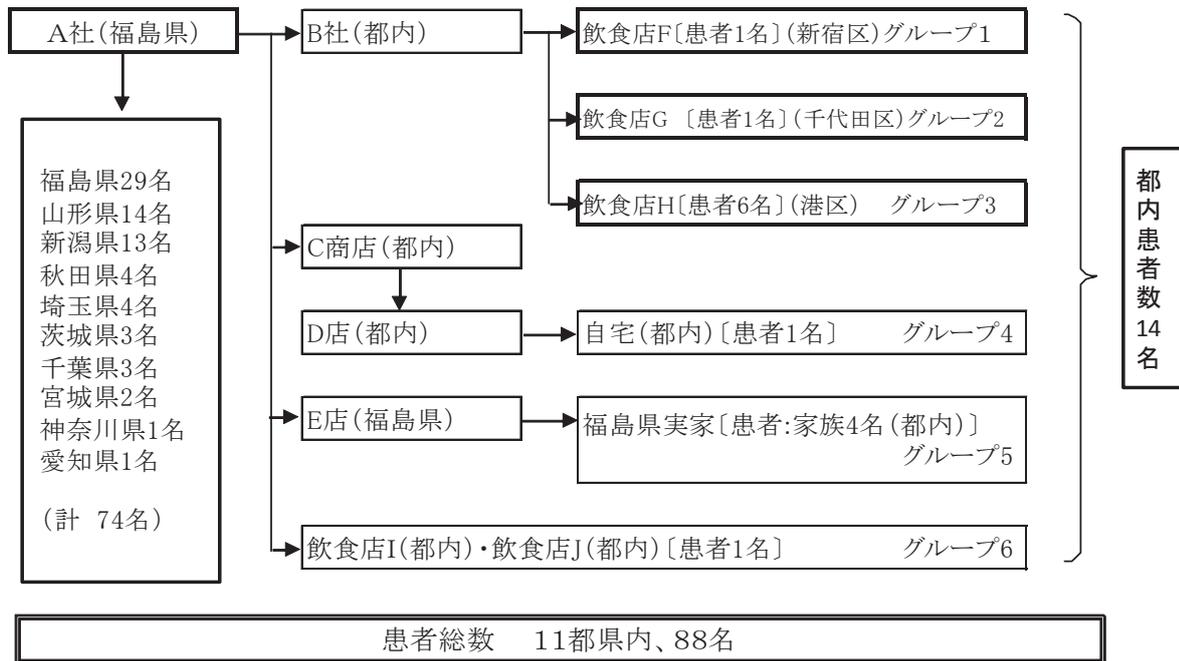
ウ 4月9日、文京区内の医療機関から文京区文京保健所に、腸管出血性大腸菌感染症の発生届出があった。患者は千代田区及び中央区内の飲食店のマネージャーで、3月22日から4月2日までに両店舗で複数回勤務し、その際に客に提供する馬刺しを味見しており、4月2日から下痢、腹痛を呈して受診、入院していた。

当該飲食店では福島県内の食肉処理業者が加工した「馬刺し」を提供していたことが判明し、他の患者ふん便由来のO157菌株とPFGEが一致したことから、当該「馬刺し」による食中毒と断定された。（グループ6）

以上により、都内においては6グループ14名の患者が確認された。

<資料 1 >

福島県内の食肉処理業者（A社）が加工した「馬刺し」の流通状況及び患者の発生状況等について  
 <販売先等> <喫食場所>



2 発生原因等

都内飲食店の調査の結果、3施設を原因とする食中毒となった。この3施設は系列店で、同じ営業者を介して当該馬刺し用の肉を仕入れ、店内において簡易な加工、調理工程を経て客に提供していた。このことから、馬肉を加工、調理した調理器具類の殺菌消毒、マニュアル等の改正及び従事者への徹底等、被害拡大の防止措置及び再発防止対策を講ずるため、営業停止等の不利益処分が行われた。

(1) 食肉処理関連施設の調査結果

福島県内のと畜場及び食肉加工施設の調査結果の概要は次のとおりであった。

ア と畜場の調査結果

- ・と畜場は、生食用食肉（馬肉）の衛生基準に合致していた。
- ・当該と畜場では、豚と馬に限定した処理を行っており、両者の処理については、処理エリア及び処理時間で区別している。
- ・と畜場内のふき取り（4月7日実施）33か所の検査の結果、O157を検出しなかった。
- ・当該と畜場で処理された枝肉について、他の搬送先には同様の苦情はなかった。

イ 食肉加工施設の調査結果

- ・当該処理業者は、馬肉のみを加工し、生食用と加熱調理用いずれも取り扱っていた。
- ・包装された部分肉の開封洗浄作業は共通した部屋（前処理室）で行われているが、これ以降の生食用部分肉を取り扱うラインと加熱加工用部分肉を取り扱うラインとは別室の独立した専用ラインで、従事者も区別されていた。
- ・患者が喫食した馬刺しの加工日は3月24日及び25日の2日間に限定されたが、他の加工日と異なる特記すべき事象は確認されなかった。
- ・従事者の作業分担は固定されており、作業シフト表によると、汚染区での作業後に生食用馬肉のカットを行ったものはいなかった。また、従事者で反芻動物と接触するような農場等への出入りを行った者はいなかった。

### 3 汚染経路

福島県内の食肉加工施設について、下記のとおり、各工程の作業実態における衛生管理が不十分であったこと、管理マニュアルに不備があったこと、記録すべき事項が不足していたこと、規定された記録（枝肉の検収、殺菌用の塩素水の残留塩素濃度、温湯の温度等）が欠落していたことが明らかになり、適切な汚染防止対策が講じられていたとは確認できなかった。

しかしながら、O157の汚染源については特定に至らなかった。

- (1) 長靴の使い分けが徹底されておらず、と畜場の枝肉の搬出口のプラットホームについて、豚枝肉の搬出経路と交差する場所があり、従事者が荷台専用の長靴のままプラットホームに降りたりして枝肉を汚染させた可能性がある。また、枝肉を搬送する車両荷室の洗浄、消毒手順が順守されていなかったことから搬送車両内で枝肉の汚染を拡げた可能性がある。
- (2) 製品の加工中に、従事者が洗浄室、内臓肉処理室等の汚染区域に出入りし、履物やエプロンの交換、手洗い消毒が不十分であったために、生食用馬肉加工室内に汚染を持ち込んだ可能性がある。
- (3) 枝肉の受入れ時の検収、塩素水での洗浄手順についてマニュアルが不十分であったため、汚染物の除去や塩素水による洗浄が不足し、枝肉に残存したまま解体され、部分肉に移行した可能性がある。
- (4) 部分肉から分割し、柵取りする工程は手作業が多く、作業中の手洗い消毒の頻度が少ないことから、手指を介して汚染が起り得る状況であった。
- (5) 肉の分割、トリミングの仕上げに使用するスキンナーについて、作業途中での洗浄消毒が適切に行われていなかったことから、スキンナーを介して汚染が起り得る状況であった。
- (6) トリミング、柵取りのラインのシンク給湯栓の一つが十分な湯量が出ない状態であったため、まな板、包丁の殺菌が徹底されていなかった。

#### <資料2>

患者便由来菌株の疫学的性状検査結果一覧

グループ	患者	血清型 O	血清型 H	毒素型	PFGE 型	IS プリンティング	薬剤耐性パターン ※
1	a	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
2	b	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
3	c	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
	d	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
	e	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
4	f	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
5	g	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
	h	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
	i	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
	j	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
6	k	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
福島県の患者	l	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-
新潟県の患者	m	157	7	1,2	T-1408	2014-1	-

※薬剤耐性パターン:以下の薬剤に対して感受性試験を行い、すべてに感受性の場合は「-」と記載

《供試薬剤》

アンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、スルファメトキサゾール・トリメプリーム、テトラサイクリン、カナマイシン、ナリジクス酸、ホスホマイシン及びノルフロキサシン

## II 分子疫学解析法の比較

本事件では菌株の分子疫学解析法として、従前から行ってきたPFGE法に加えて、IS法が用いられた。IS法は宮崎大学・林哲也教授らによって開発された手法であり、東洋紡株式会社がキットを販売している。

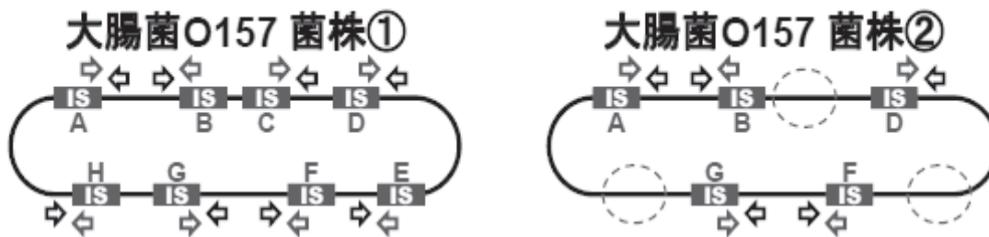
### 1 Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) 法

この検査法は、現在最も広く用いられている方法である。方法は①菌をアガロースゲルに包埋し、DNAを抽出する、②DNAを制限酵素で切断し、短いDNAの断片を作る、③DNA断片を電気泳動する、④電気泳動によって得られた各菌のDNA断片像（バンド）を相互に比較するという工程で行う。同じ由来の菌株では、DNA断片像が同じパターンになることから各菌株が同じ由来であるか調べることができる。

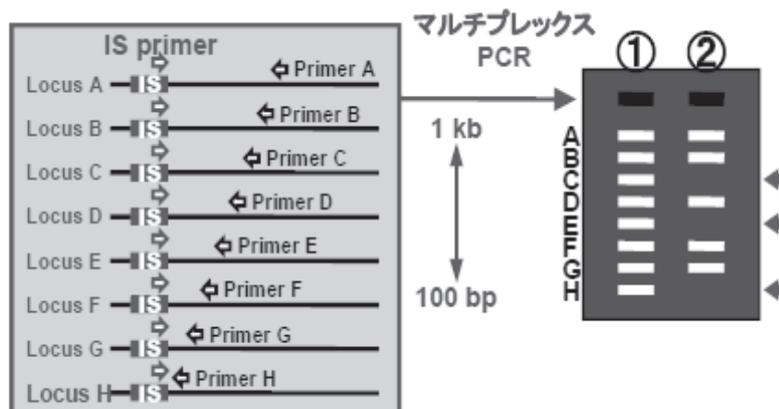
### 2 IS-printing System法

ISとはInsertion Sequence（挿入配列）の略で、大腸菌のゲノム上を移動するDNA配列のことである。ゲノム上のISはある程度の期間で変化していくが、一定期間は保持され、同じ系統の菌では同じ配列となる。腸管出血性大腸菌O157のゲノム上には複数の挿入配列（IS629）が存在しており、そのうち32か所のISの有無を比較することで菌株間の相同性を比較することができる。

具体的には①菌株からDNAを抽出、②2種類のプライマーセットを用いたマルチプレックスPCR、③電気泳動、④アガロースゲルの染色、⑤写真撮影、⑥結果の判定という行程で行う。



ISは大腸菌ゲノムの中を移動する配列で、系統ごとに挿入されている位置が異なります。上図の例では、菌株①ではA～HのローカスにISが挿入されているのに対し、菌株②ではC,E,GのISが消失あるいは検出不能のローカスに移動しています。各ローカスのISが判別できるように長さの違うプライマーでマルチプレックスPCRを行うと、菌株①は下図レーン①、菌株②からは下図レーン②のようなバンドパターンが得られます。バンドパターンの違いにより、系統を判別します。



引用元：東洋紡株式会社ホームページ

大腸菌O157タイプングシステム≫IS-printing system<研究用試薬>

<http://www.toyobo.co.jp/seihin/dsg/QCIS.pdf>

### (1) PCRによるDNAの増幅

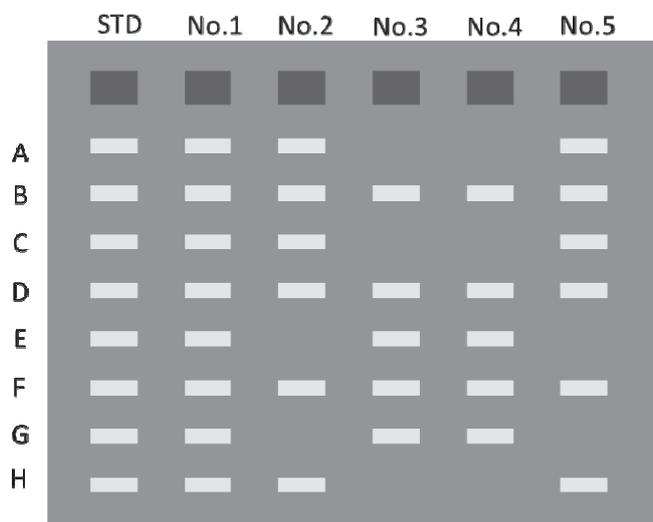
IS法ではO157が持つ32か所のISを増幅するプライマー及び4種類の病原性関連遺伝子を増幅するプライマーの計36種類の遺伝子を増幅させるためのプライマーを使用する。東洋紡のキットでは、2種類のプライマーセット（1<sup>st</sup>セット、2<sup>nd</sup>セット）に分かれており、各プライマーセットを使用することで、18種類の遺伝子を見ることができる。各プライマーセットは、撮影時に泳動距離の差が出るように、増幅後の分子量がそれぞれ異なるように設計されている。

### (2) バンドの有無の数値化

Standard DNA(ポジティブコントロール)では電気泳動後、1つのプライマーセットにつき18本のバンドが検出される。これと比較して、バンドが検出されたら「1」、バンド検出されなかったら「0」として判定を行う。

下図に示した電気泳動後の写真(模式図)の例では、菌株「No.1」はStandard DNAと比較して同じバンドを検出したため「11111111」、「No.2」と「No.5」はStandard DNAと比べてバンドE及びGにバンドが検出されないことから「11110101」、「No.3」と「No.4」は同様に「01011110」と数値化される。

図 電気泳動後の写真(模式図)



バンドの有無を数値化

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
A	1	1	0	0	1
B	1	1	1	1	1
C	1	1	0	0	1
D	1	1	1	1	1
E	1	0	1	1	0
F	1	1	1	1	1
G	1	0	1	1	0
H	1	1	0	0	1

菌株「No.3」は「01011110」となる。

### 3 2法の比較

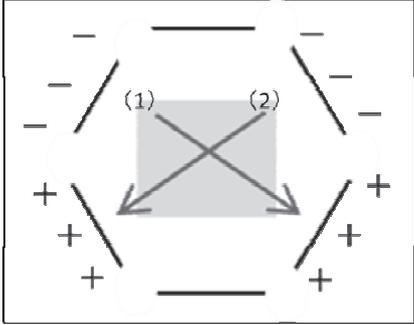
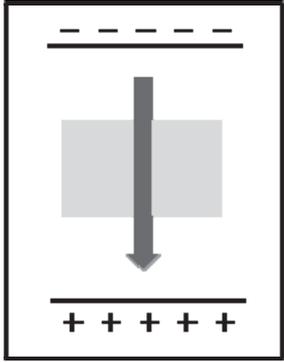
2法の概要及び比較を表にまとめた。

PFGE法は、大腸菌に限らずサルモネラや赤痢菌など多くの病原菌を解析の対象とすることができるため汎用性が高く、識別能力も高い等のメリットがある。一方で、検査結果判明までに約4日間かかること、多数の検体を一度に比較することが困難等のデメリットがある。

IS法は、操作が比較的簡便で6時間程度で結果が得られること、検査結果が「1」と「0」のデジタル表記になるため、菌株を1カ所に集めなくても結果の比較が可能等のメリットがある。一方で、解析の対象が腸管出血性大腸菌O157に限られること、PFGE法と比較すると識別能が低いこと等のデメリットがある。

今後、データをさらに蓄積しそれぞれの特徴を活かした有効な活用方法を見出していくことが期待される。

表 2法の比較

検査法		PFGE 法	IS 法
		アガロースゲル内にO157等を包埋し、溶菌によってDNAを抽出	アルカリ溶解法などにより、O157からDNAを抽出
		制限酵素 ( <i>Xba</i> I) によってDNAを切断	PCR反応液を調製 →PCR法によるDNAの増幅
電気泳動	泳動時間	約22時間	約90分間
	泳動槽と電流の方向	<p>電流を2方向から流す。</p>  <p>(1) 1方向から電流を流す。 (2) 一定時間後に、別の方向から流す。 (1) (2)をくりかえして、電流を交互に流していく。</p>	<p>電流を1方向から流す。</p> 
染色		エチジウムブロマイド、Gelred など	
写真撮影		紫外線照射下で撮影	
結果判定		検出したバンドのパターンを菌株間で比較する。	Standard DNA(ポジティブコントロール)と比較して、バンドの有無を1と0に置き換えて数値化し、菌株間で比較する。
メリット		<ul style="list-style-type: none"> <li>大腸菌に限らず、サルモネラや赤痢菌など多くの病原菌の解析に用いることができる。</li> <li>PFGEパターンが一致した場合、疫学的に高い関連が認められる。</li> <li>再現性に優れ、識別能力が高い。</li> <li>世界中で最もよく用いられている。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>迅速に型別が可能(6時間程度)</li> <li>PCR法を原理としているので、大掛かりな設備投資の必要がない。</li> <li>操作が簡便である。</li> <li>検査に必要な試薬がキット化されている。</li> <li>結果が「1」と「0」のデジタル表記されるため、自治体間での比較が容易である。</li> </ul>
デメリット		<ul style="list-style-type: none"> <li>結果判明までに時間がかかる。(約4日間)</li> <li>技術のトレーニングが必要</li> <li>同じゲル上のパターンについては比較が容易だが、条件が異なる場合は比較が難しい。</li> <li>多数の検体を一度に比較することが困難である。</li> <li>機器の設置に費用がかかる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>腸管出血性大腸菌O157のみの解析に対応している(他の血清型菌の型別はできない)。</li> <li>PFGE法と比較すると識別能がやや落ちる。</li> <li>多くのデータを解析する方法を検討する余地がある。</li> <li>国際的な方法ではない。</li> </ul>