

ネットワークにより PFGE パターンを伝送し、中核施設で情報処理とその還元を行うには、そのような設備の導入が大前提である。

ところで、同一の PFGE パターン (SAI-NA3) を示した菌株の中で、1株のみ RAPD 解析において他の株には観察されないようなバンドを認めた。本研究において供試した菌株ではその出現頻度は低かったが、今後、このような現象が多くみられたような場合には検討していかなければならない課題であろう。また、PFGE 像がスメア状となった株が1株存在した。そのような菌株の存在が、志賀毒素産生性大腸菌 O157 で報告されており、原因としてその菌株の高スクレアーゼ活性が考えられている (Izumiya et al, J Clin Microbiol, 35:1675, 1997)。もし、PFGE 像がスメア状になる菌株の分離頻度が増加した場合、PFGE 以外の DNA 型別法も開発する必要がある。

#### 結論

PFGE 法による *V. parahaemolyticus* 血清型 O3:K6 分離株の染色体 DNA の制限酵素切断パターンを解析したところ、*Sfi*I 及び *Not*I 切断パターンの組み合わせが必要と思われた。軽微なバンドパターンの差異をどのように解釈するかは今後の検討課題と考えられた。また、他の血清型についてのデータ集積が必要と思われた。

(共同研究者：荒川英二、村瀬敏之)

表1. *V. parahaemolyticus* O3 : K6供試株の性状

STII	NotI	由来	分離地	分離年	株数	<i>tdh</i>	<i>trh1</i>	<i>trh2</i>	ウレアーゼ	備考
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1998	13	+	-	-	-	
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	A国渡航者
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	B国渡航者
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	C国渡航者
SA1	NA3	ヒト	東京	1998	2	+	-	-	-	
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1997	8	+	-	-	-	
SA1	NA3	ヒト	青森	1997	1	+	-	-	-	
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1997	2	+	-	-	-	A国渡航者
SA1	NA3	ヒト	神奈川	1996	4	+	-	-	-	
SA1	NA3	ヒト	A国	1998	1	+	-	-	-	
SA1	NA6	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	
SA1	NA4	ヒト	青森	1997	1	+	-	-	-	
SA1	NA9	ヒト	神奈川	1997	1	+	-	-	-	
SA1	NA16	ヒト	A国	1998	1	+	-	-	-	
SA2	NA11	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	
SA3	NA10	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	
SA4	NA5	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	
SA5	NA12	環境	青森	1998	1	+	-	-	-	
SA5	NA13	ヒト	青森	1998	1	+	-	-	-	
SA5	NA13	環境	青森	1998	2	+	-	-	-	
SA5	NA14	ヒト	神奈川	1998	3	+	-	-	-	
SA6	NA12	環境	青森	1998	1	+	-	-	-	
SA7	NA15	ヒト	神奈川	1998	2	+	-	-	-	
SA8	NA15	ヒト	青森	1998	1	+	-	-	-	
SA9	NA2	?	D国	1998	1	+	-	-	-	
SA9	NA3	ヒト	神奈川	1998	3	+	-	-	-	
SA10	NA1	?	D国	1998	4	+	-	-	-	
SA11	NA7	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	A国渡航者
SA12	NA3	ヒト	神奈川	1997	1	+	-	-	-	
SA13	NA3	ヒト	神奈川	1996	1	+	-	-	-	
SA14	NA8	ヒト	神奈川	1997	1	+	-	-	-	
SA15	NA15	ヒト	A国	1998	1	+	-	-	-	
SB	NB1	ヒト	神奈川	1981	1	+	-	-	-	
SB	NB2	ヒト	神奈川	1981	1	+	-	-	-	
SB	NB2	食品	神奈川	1981	2	+	-	-	-	
SB	NB3	ヒト	神奈川	1981	1	+	-	-	-	
SB	NB4	ヒト	神奈川	1981	1	+	-	-	-	
SC1	NC1	ヒト	神奈川	1981	1	-	+	-	+	
SC1	NC1	ヒト	神奈川	1984	1	-	+	-	+	
SC2	NC2	ヒト	神奈川	1981	1	-	+	-	+	
SC3	NC1	ヒト	神奈川	1995	1	-	+	-	+	
SC3	NC2	ヒト	神奈川	1996	2	-	+	-	+	
SC5	NC2	ヒト	神奈川	1984	1	-	+	-	+	
SC4	NH	食品	神奈川	1987	1	-	-	-	-	
SC6	NI	ヒト	神奈川	1984	1	-	+	-	+	
SD	ND	環境	神奈川	1982	1	-	-	-	-	
SE	NE	食品	神奈川	1986	1	-	-	-	-	
SF1	NF1	食品	神奈川	1988	1	-	-	-	-	
SF2	NF2	ヒト	神奈川	1985	1	-	-	-	-	
SG	NG	ヒト	神奈川	1983	1	-	-	-	-	
UT*	UT*	ヒト	神奈川	1998	1	+	-	-	-	

UT\*, untypable. PFGE像がスメア状となりバンドパターンを得られなかった。

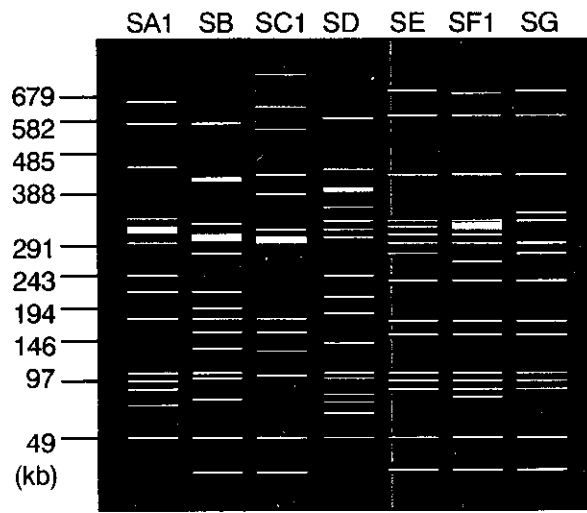


図 1. *SfiI* 切断パターンのタイプ分け

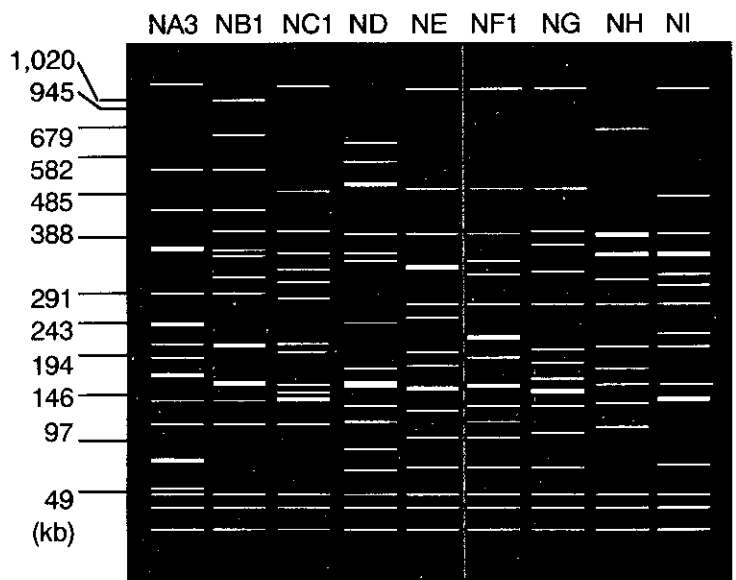


図 2. *NotI* 切断パターンのタイプ分け

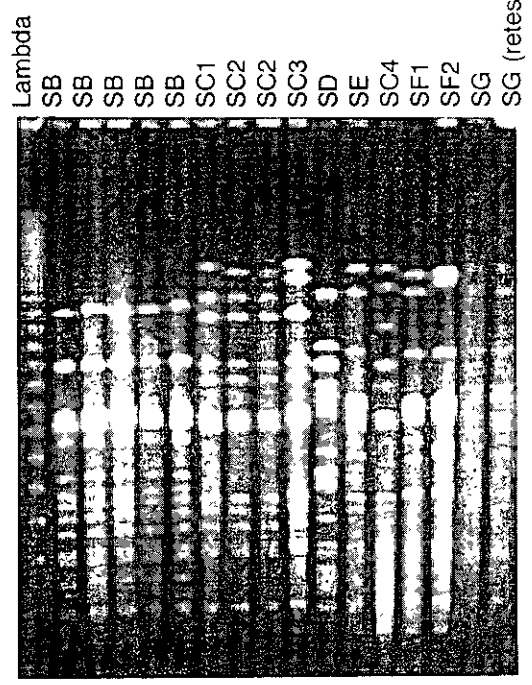
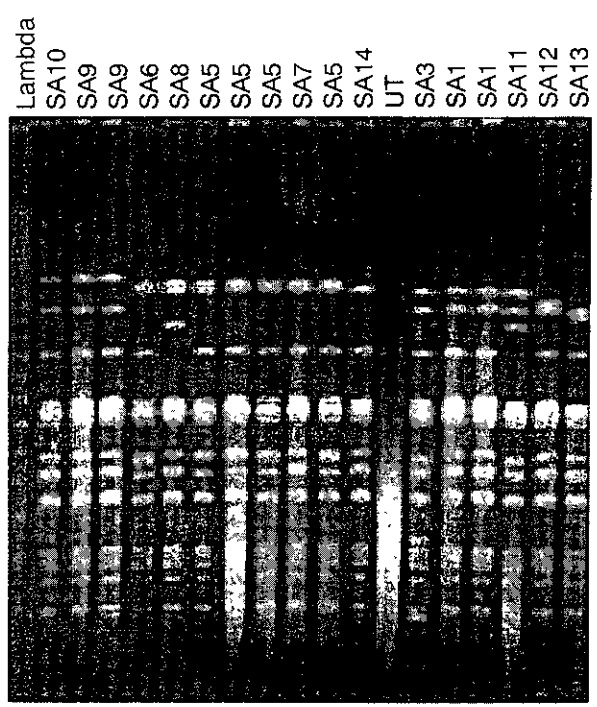
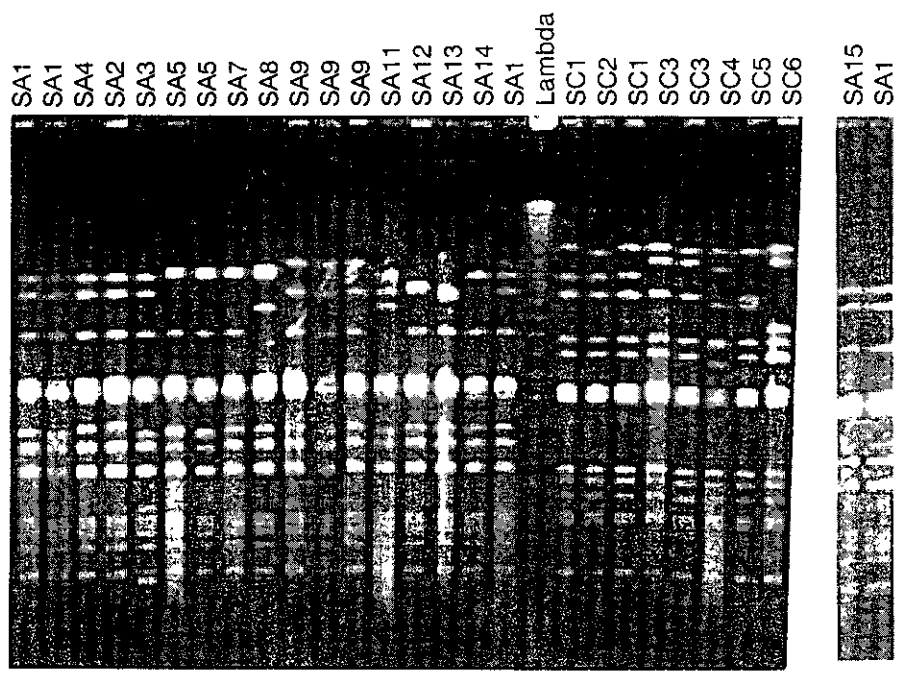


図 3. *V. parahaemolyticus* O3:K6分離株の *SfiI* 切断パターン.  
 各レーン上部にパターン名を記した.  
 UT, untypable; Lambda, lambda DNA ladders.

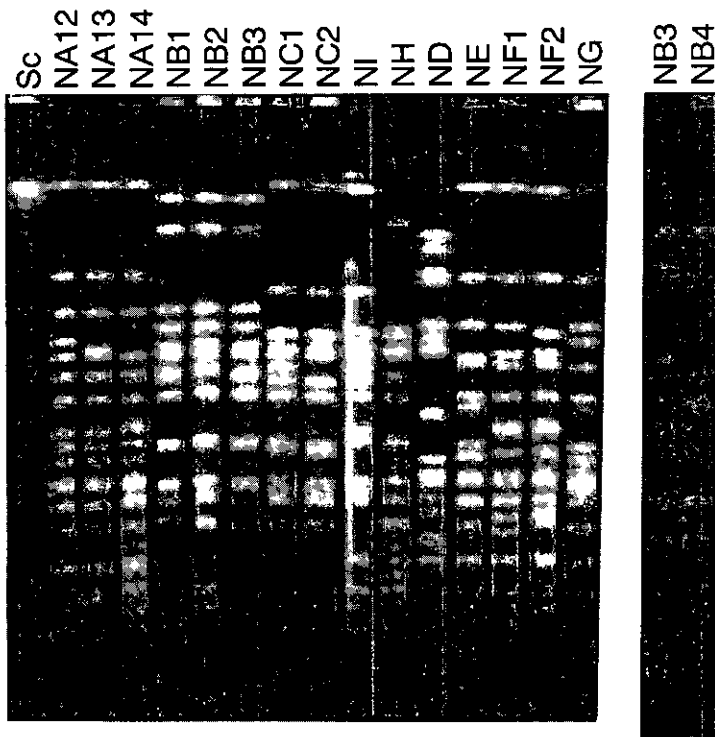
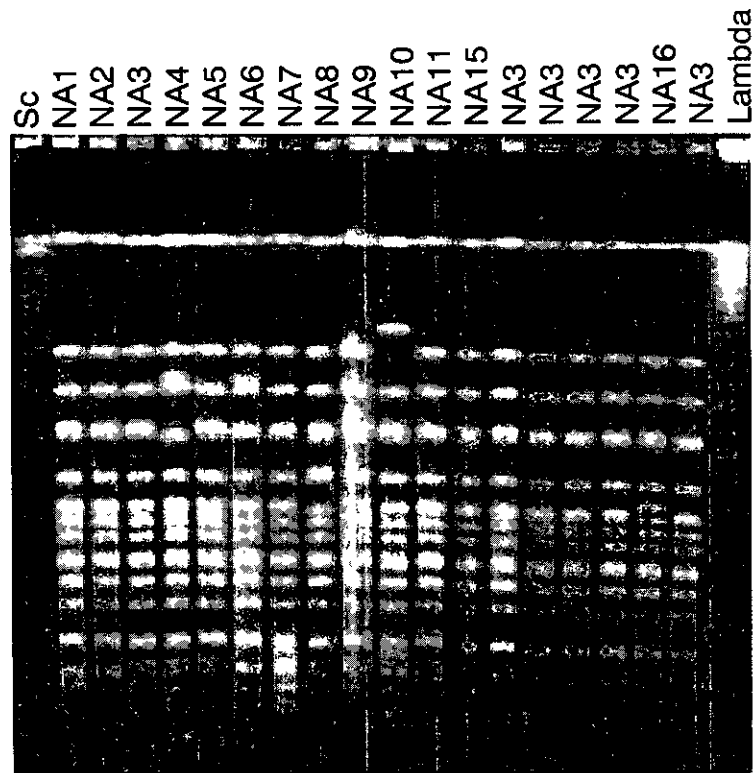


図4. *V. parahaemolyticus* O3:K6株のNotI切断パターン  
 各レーン上部にパターン名を記した。  
 Sc, *Saccharomyces cerevisiae* 染色体DNA;  
 Lambda, lambda DNA ladders.



レーン1, O4:K8  
 2, O6:K46  
 3, O8:K41  
 4, O3:K48  
 5, O4:K68  
 6, O3:K6 (パターンSA1-NA3)  
 7, O3:K6 (パターンSA4-NA5)  
 λ, Lambda DNA ladders  
 Sc, *Saccharomyces cerevisiae* 染色体DNA

図5. *V. parahaemolyticus* (O3:K6以外) のPFGEパターン  
 O4:K68のパターン (レーン5) はO3:K6で観察されたパター  
 ンSA1-NA3に酷似している.

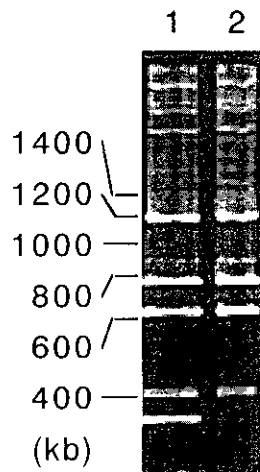


図6. *V. parahaemolyticus* O3:K6株のRAPDパターン  
 PFGEパターンSA1-NA3に分離された36菌株のうち  
 35株はレーン2のRAPDパターンを示したが、1株は  
 レーン1のパターンを示した。

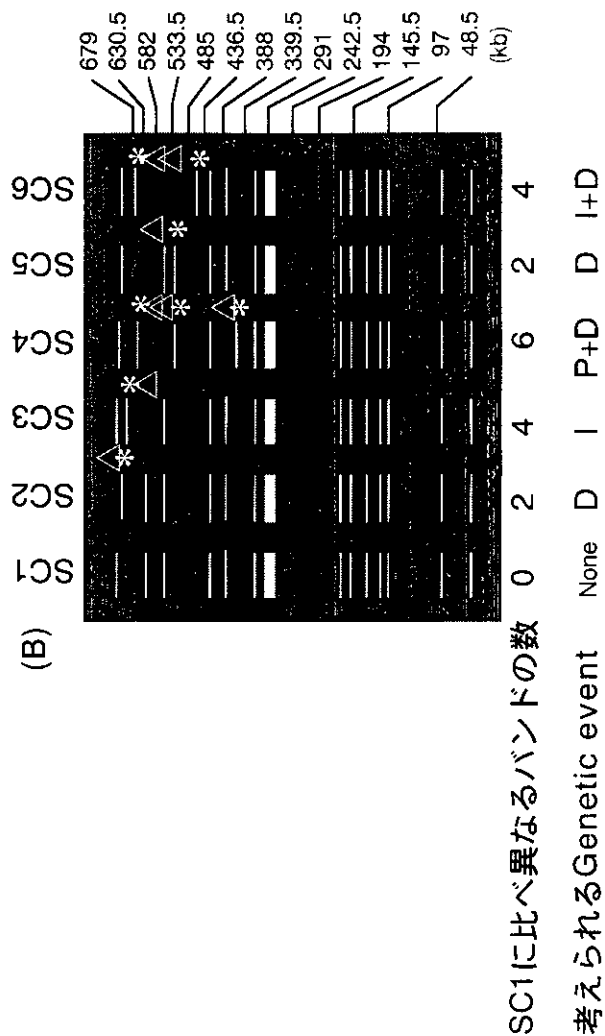
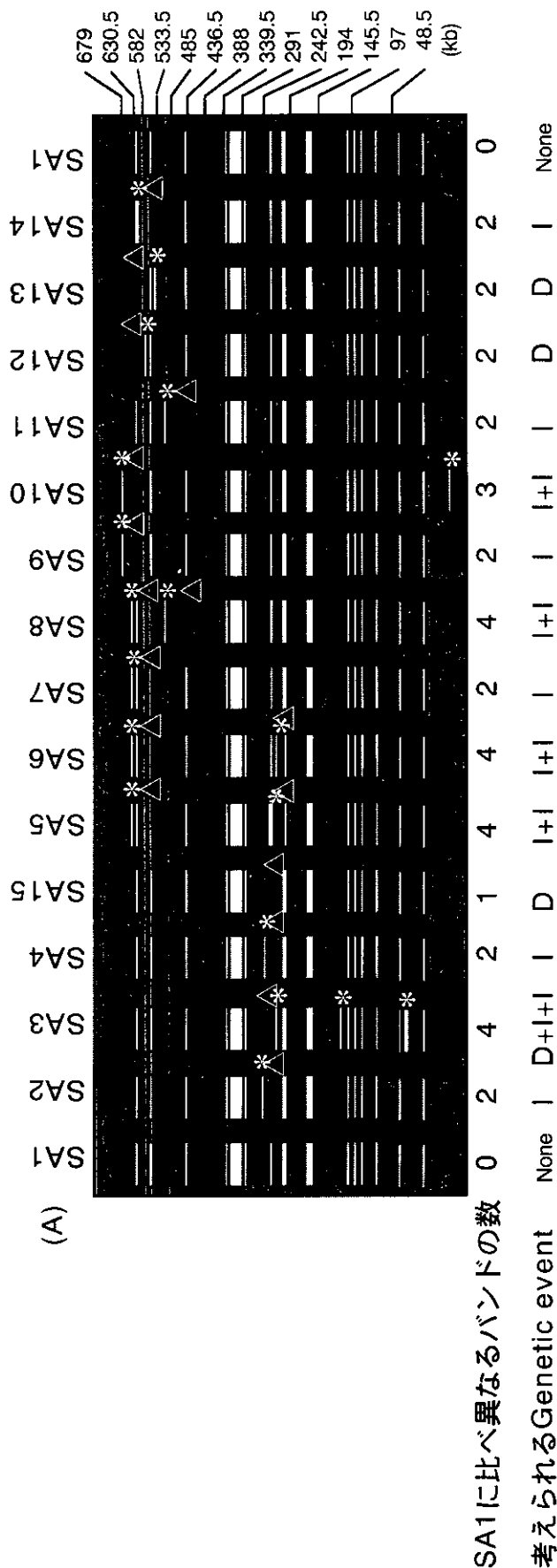


図7. *V. parahaemolyticus* O3:K6染色体DNAのSfiI切断パターンにみられたバリエーションの模式図  
 タイプSA (A)及びタイプSC (B)に分類された菌株のなかで、パターンSA1及びSC1に対し欠失(△)或いは出現(\*)したバンドを各パネル中に示した。各レーン下に、SA1及びSC1に比べ異なるバンドの数及びその差異を引き起こすと考えられたGenetic eventを記した。I及びD、DNA断片のinsertion及びdeletion。  
 P、point mutationによるSfiI切断部位の変異を表わす。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究

分担研究者 濱端 崇 国立国際医療センター研究所 細菌感染研究室長

研究要旨：1992年インドに端を発した0139コレラの大流行は、瞬く間に近隣諸国へ広がった。カルカッタでは翌1993年の1月から半年間、それまで猛威を振るっていた01コレラ菌が全く分離されなくなり、0139コレラ菌のみが分離された。そして同年秋には再び01コレラ菌が再流行し始め、0139コレラ菌は分離されなくなった。我が国におけるパルスネット構築に際し、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）によるコレラ菌の分子疫学的解析が可能かつ有効かを知るため、0139流行前後の01コレラ菌をPFGEにより解析しその由来を調べた。その結果0139コレラ菌流行以後に分離された01コレラ菌は0139流行前の01コレラ菌とは異なるルートから派生したことが示唆された。またインドで分離された0139コレラ菌と東南アジア諸国で分離された0139コレラ菌をPFGEにより解析したところ、これらの0139コレラ菌は単一クローン由来であることが示唆された。これらの結果からコレラ菌の分子疫学解析にPFGEが適用可能かつ有効であることが示された。

A. 研究目的

PFGEを用いた病原細菌のDNA制限酵素断片多型（Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP）の比較解析は、特に病原細菌の由来の疫学的調査に有用であると考えられる。米国ではすでに代表的病原細菌のPFGEによるRFLPパターンのオンラインデータベース（パルスネット）が疾病管理センター（Center for Disease Control; CDC）を中心に運用されている。本研究では我が国におけるパルスネット構築に際し、PFGEによるコレラ菌の分子疫学的調査が可能かつ有効であるか否かを調査し、その解析手法の迅速化・標準化をはかることを目的とする。

B. 研究方法

PFGEは常法に従って行った。対数増殖期（ $OD_{600}=0.8\sim 1.0$ ）のコレラ菌培養液1mlにクロラムフェニコール（終濃度50 $\mu$ g/ml）を

加え1時間培養した後遠心により集菌し、0.5mlの10mM Tris-HCl（pH 7.2）/20mM NaCl/50mM EDTAに懸濁し50 $^{\circ}$ Cに保温した。これに50 $^{\circ}$ Cに保温しておいた2%低融点アガロース溶液0.5mlを混合し、プラグモールドに流し込み固化させた。固化したプラグをリゾチーム溶液（1mg/ml lysozyme / 10mM Tris-HCl（pH 7.2）/ 50mM NaCl / 0.2%（w/v）Na-deoxycholate / 0.5%（w/v）Na-laurylsarcosine）で37 $^{\circ}$ C、2時間処理し、滅菌蒸留水で2回リンスした後、プロテイナーゼK溶液（1mg/ml proteinase K / 100mM EDTA（pH 8.0） / 0.2%（w/v）Na-deoxycholate / 1%（w/v）Na-laurylsarcosine）で50 $^{\circ}$ C、オーバーナイト処理した。プラグをWashing溶液（20mM Tris-HCl（pH 8.0）/ 50mM EDTA）で1時間、1mM PMSFを含むWashing溶液で1時間、さらに再度Washing溶液で1時間2回洗浄し、10倍希釈したWashing溶液で30分処理したのち、1mlのH-buffer（50mM



Tris-HCl (pH 7.5) / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 1 mM DTT / 100 mM NaCl) で 1 時間処理し、30 unit の *Not* I を含む H-buffer 0.6 ml に移し、37 °C、オーバーナイト消化した。消化後、プラグを Washing 溶液で 1 時間洗浄し、0.5x TBE (10 mM Tris / 10 mM Boric acid / 0.2 mM EDTA) で 30 分リンスした。1% アガロースゲル (PFGE grade) のウエルに上記のプラグをセットし、さらに少量の低融点アガロースでウエルを封入した。電気泳動は 0.5x TBE、14 °C で、CHEF-Mapper (Bio-Rad) を用い 42 時間行った。終了後、ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (0.5 μg/ml) で染色し、水で十分に弁色した後、紫外線下で写真を撮影した。

上述の方法により、1. インドのカルカットで 1992 年の 0139 コレラ流行以降に分離された 01 コレラ菌を、0139 コレラ流行以前に分離された 01 コレラ菌、Wachsmuth らによって分類された代表的 01 コレラ菌および 0139 コレラ菌と RFLP パターンを比較した。2. 1992 年インドで分離された 0139 コレラ菌とその後近隣東南アジア諸国で分離された 0139 コレラ菌の RFLP パターンを比較した。

### C. 研究結果

1. 0139 コレラ流行以降に分離された 01 コレラ菌の代表菌株である C0457 (レーン 6 ; 図 1) の RFLP パターンは、Wachsmuth ら (J. Infect. Dis. 167:621-626, 1993) によって分類された 4 つの代表菌株、オーストラリアの患者由来株 2463-88 (レーン 1 ; 図 1)、米ルイジアナの患者由来株 2164-78 (レーン 2 ; 図 1)、第 7 次コレラ大流行時にルーマニアで分離された C7754 株 (レーン 3 ; 図 1)、ペルーで分離された C6706 株 (レーン 4 ; 図 1) のどれとも一致せず、また 0139 コレラ流行以前にインド・カルカットで分離された 01 コレラ菌 VC2 株 (レーン 5 ; 図 1) のパターンとも全く異なっていた。また 0139 コレラ流行

時にカルカットで分離された代表的 0139 コレラ菌 SG29 系統 (レーン 8 ; 図 1) や 0139 コレラ菌の ATCC 標準菌株である M045 (レーン 7 ; 図 1) のパターンとも似ていなかった。このことから 0139 コレラ菌流行以降の 01 コレラ菌はそれ以前に流行した 01 コレラ菌が再び流行したのではなく、全く別な経路から発生した 01 コレラ菌であることが示唆された。

2. ネパールで分離された KM01 (レーン 1 ; 図 2)、中国で分離された 0003/93 (レーン 4 ; 図 2)、マレーシアで分離された 359/13980 (レーン 6 ; 図 2) の 0139 コレラ菌の RFLP パターンは、インドで 1992 年に分離された 0139 コレラ菌 M045 (レーン 2 ; 図 2) のそれと完全に同一であった。またバングラデッシュで分離された A11837 (レーン 3 ; 図 2)、タイで分離された TH166 (レーン 5 ; 図 2) の RFLP パターンも、約 400 kb 付近のバンドが若干短くなっているが、その他のバンドパターンは全く同一であった。このことから、インドで発生した 0139 コレラ菌の単一クローンが東南アジア全土に広がった可能性が考えられた。

### D. 考察

用いた全てのコレラ菌系統においてクリアな電気泳動像を得ることができ、各コレラ菌系統の RFLP パターンを容易に比較することができた。上述したように、同じカルカットで分離された 01 コレラ菌でも 0139 流行以前と以後では全く由来が違うこと、あるいは別の場所で分離された 0139 コレラ菌が単一クローン由来であることが PFGE を用いることにより初めて明らかになった。このように PFGE はコレラ菌においては、流行菌株の由来や伝播ルートを探る上で極めて有効であることが示された。但しこの手法は結果が出るまでにおよそ 1 週間を要するため、疫学調査上迅速な判断が求められるケースを考慮すると、さらなる手法の簡便化・迅速

化が求められる。またパルスネット構築に際しては、再現性の高い結果を得るための手法の標準化も重要であり、この2点が今後の課題である。

#### E. 結論

コレラ菌においては、常法に従いPFGEを行うことにより分子疫学的解析が可能でありかつ有効であることが示された。今後パルスネット実現に向け手法の標準化・迅速化が必要である。

#### F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

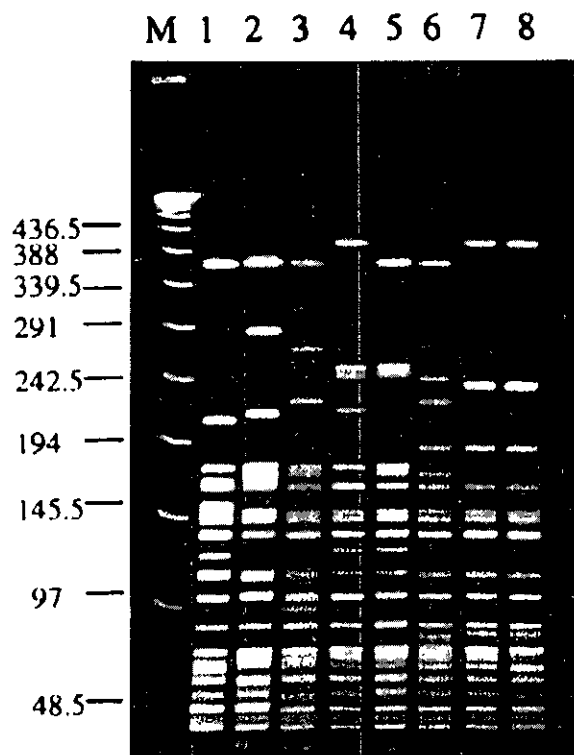


図1. 0139 コレラ菌流行前後に分離された 01 コレラ菌、Wachsmuth らによって4種類に分類されたエルトル型 01 コレラ菌および代表的 0139 コレラ菌の菌体 DNA の *Not* I 消化による RFLP パターンの比較。レーン1 : 2463-88、レーン2 : 2164-78、レーン3 : C7754、レーン4 : C6706 (以上 Wachsmuth らによって類されたエルトル型 01 コレラ菌)、レーン5 : 0139 流行以前の代表的 01 コレラ菌 VC2、レーン6 : 0139 流行以降の代表的 01 コレラ菌 C0457、レーン7 : ATCC 標準 0139 コレラ菌 M045、レーン8 : 代表的 0139 コレラ菌 SG29。M : サイズマーカー (ラムダラダー)、左の数字は Kbp。

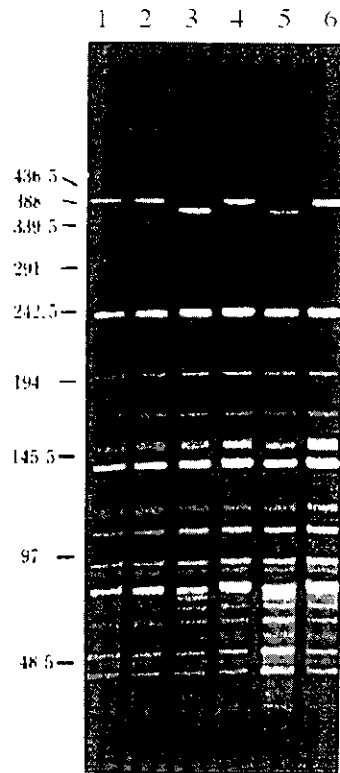


図2. インド及び東南アジア諸国で分離された O139 コレラ菌の菌体 DNA の *Not* I 消化による RFLP パターンの比較。レーン 1 : ネパールでの分離株 KM01、レーン 2 : インドでの分離株 M045、レーン 3 : ハングラデッシュでの分離株 AI1837、レーン 4 : 中国での分離株 0003/93、レーン 5 : タイでの分離株 TH166、レーン 6 : マレーシアでの分離株 359/13980。左側の数字はサイズマーカー（ラムダラダー）の DNA サイズ、単位 Kbp。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（分担）研究報告書

我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究

（分担）研究者 伊藤喜久治：東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授  
甲斐明美、横山敬子：東京都立衛生研究所 主任研究員

研究要旨：カンピロバクターのパルスフィールド電気泳動法を用いた遺伝子解析が可能であるのかどうか、また可能であればどのような条件で行うかについて検討した。現段階ではさらに多くの事例での解析が必要であるが、疫学調査でのデータベースとして使用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

*Campylobacter jejuni*の疫学調査は易熱性抗原(HL)を用いたLiorの血清型別や東京都衛生研究所で開発したTCKシステム、耐熱性抗原(HS)を用いたPennerの血清型別が行われてきたが、限られた施設でしか行えないこと、血清型別が疫学上の菌株どうしの関連性を明きらかにできるだけの細かい識別が行えないなどの理由から1995年に英国で開催された*Campylobacter*関連の国際会議で、血清型別に代わるタイピング法として遺伝子型別を国際的標準法として用いることができるかどうかを検討する事となった。その後カンピロバクターの遺伝子解析法はPFGEを含めRFLP, AFLP, RAPDなどの方法が報告されているが、どのような方法が疫学調査に有効であるかは十分な確信が得られていない。PFGEについても疫学上の有用性について意見が分れている。ニワトリの腸内を通過しただけでPFGEパターンが変化するとの報告もあり、*Campylobacter*は遺伝子が不安定であり容易に変化しやすいとされている。また、AFLPが疫学調査にPFGEより適しているとの報告もなされている。

*Campylobacter*感染症では集団発生例よりも散発例、特に1997年以降患者数は大きな変化は見られないが事件数は著しい増加が見られる。また、一つの集団発生例でも異なるタイプの菌株が多く分離され、PFGEパターンの変化と発症例ごとの原因菌のタイプの違いがどのように認識されるかについても疑問が持たれている。

そこで本研究ではいくつかの血清型の明らかになっている分離株を用いて基本的なPFGEパターンの違いについて検討した。

B. 研究方法

菌株は1992-1999年に東京都内で患者が発生した集団下痢症21事例52株と1999年3月に都立病院から送付された6株（全てLior血清型LI028/TCK26）の計58株を用いた。

制限酵素は*Sma*I, *Kpn*I, *Sca*IIの3種を用いた。PFGEの泳動条件はCHEF-Mapper (Bio-Rad)を使用し、1%PFC agarase (Bio-Rad), 0.5xTBE (14°C), 電圧 6.0v/cm, パルス角度 120°, スイッチタイム 0.47-44.69秒 (*Sma*I, *Sca*II), 0.49-35.38秒 (*Kpn*I)、泳動時間 20時間で行った。

### C. 研究結果

21事例の内3事例を除いて、分離された株の血清型とPFGEパターンは事例ごとに同一であったが、事例が異なると同一の血清型でもPFGEパターンは違いが見られた(表1)。事例10と11は血清型、PFGEパターンも全て同一であった。これは数日の違いで同一宿泊施設に宿泊した修学旅行生の二つの学校での事例で、血清型、PFGEパターンとも同一であり、同じ汚染源であると推測された。

事例17は患者、食品、従業員から分離されたもので、患者と食品から分離された株は血清型、PFGEパターンとも同一であったが、従業員からの分離株はこれらとは異なるものであった。事例2と事例17の患者、食品由来株は血清型、PFGEパターンが同一であったが、この2例の関連性については不明である。

表2は1999年3月に発生した散発例のうち同一血清型LI028/TCK26の菌株6株のPFGEパターンは同一のものが2組見られ、これらの患者は何らかの共通点があったことが推測された。

表3は同一血清型ごとに集計したものであるが、LI07の群を除いて同じ血清型でも事例が異なることでPFGEパターンが異なることが明らかである。

### D. 考察

今回の結果から、同一事例から分離される血清型とPFGEパターンは極めてよく一致したが、同一血清型でも事例が異なることでPFGEパターンが異なることから、PFGEパターンは血清型よりも詳細に型別が可能であると考えられ

る。これらは“*C. jejuni*のタイピングは始めに血清型別を行い同一群内での株識別に遺伝子タイピングが有効である”との認識を支持するものと考えられる。さらに、PFGEによる型別は血清型別とほぼ同一となり、血清型別以上の識別は難しいとする報告とは異なる結果であった。また、制限酵素を1種類で行った場合LI07の群に見られるように事例ごとのタイプの違いを識別できず、少なくとも2種類以上の制限酵素を使用する必要があることが示唆された。

*C. jejuni*による食中毒例では食品中で菌が増殖する可能性が低く、患者から複数のタイプが検出されることがあることから、一事例中でのタイプのバラツキをPFGEパターンでどこまで識別できるか、また他の事例との関係を明らかにすることができるかなどさらに多くの事例でのPFGEパターンを検討する必要があるが、パルスネット構築のためのデータベースとして使用することが可能であると考えられる。

今回検査した株のうちPFGEで識別可能な株は*Sma*Iで4/58と少なかったが、識別不能株が多いとの発表もあり、菌の培養条件、酵素処理条件などの標準化の検討も必要と考える。また、血清型別なしの遺伝子型別法を確立するには、PFGE以外の遺伝子解析法も含めた検討が必要である。

### E. 結論

*Campylobacter*の疫学調査のための遺伝子型別法としてPFGEは使用可能であると考えられる。

表1. *C. jejuni* による集団下痢症事例のPFGEパターン

: 事例ごとのまとめ

事例No.	菌株No.	Lior血清型	Sma I	Kpn I	Sac II	
1	CP92-12	L10 11	Sm-21	Kp-16	NT	
1	CP92-13	L10 11	Sm-21	Kp-16	NT	
2	CP93-20	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3'	
2	CP93-24	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3'	
3	CP93-46	TCK 1	Sm-20	Kp-10	Sa-9'	
3	CP93-48	TCK 1	Sm-20	Kp-10	Sa-9'	
4	CP94-51	L10 7	Sm-1	Kp-3	Sa-3	
4	CP94-53	L10 7	Sm-1	Kp-3	Sa-3	
5	CP94-139	L10 2	Sm-4	Kp-7	Sa-7	
5	CP94-142	L10 2	Sm-4	Kp-7	Sa-7	
6	CP94-189	L10 11	Sm-5	NT	NT	
6	CP94-191	L10 11	Sm-5	NT	NT	
7	CP94-251	L10 27	Sm-6	Kp-4	Sa-4	
7	CP94-253	L10 27	Sm-6	Kp-4	Sa-4	
8	CP94-255	TCK 1	Sm-7	Kp-9	Sa-9	
8	CP94-257	TCK 1	Sm-7	Kp-9	Sa-9	
9	CP96-7	L106/L1050	スメア	NT	NT	
9	CP96-9	L106/L1050	スメア	NT	NT	
10	CP96-61	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
10	CP96-64	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
11	CP96-127	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
11	CP96-129	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
12	CP96-236	L10 2	Sm-2	Kp-5	Sa-5	
12	CP96-239	L10 2	Sm-2	Kp-5	Sa-5	
13	CP96-323	L10 2	Sm-3	Kp-6	Sa-6	
13	CP96-325	L10 2	Sm-3	Kp-6	Sa-6	
14	CP97-11	L10 7	Sm-1	Kp-1	Sa-1	
14	CP97-15	L10 7	Sm-1	Kp-1	Sa-1	
15	CP99-49	TCK 26	Sm-22	Kp-11	NT	
15	CP99-51	L10 7	Sm-1	Kp-12	NT	
15	CP99-54	L104/TCK26	Sm-23	Kp-13	NT	
15	CP99-57	L10 4	Sm-23	Kp-13	NT	
16	CP99-91	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
16	CP99-94	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
16	CP99-97	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
16	CP99-100	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
17	CP99-115	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3	参考食品
17	CP99-112	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3	患者
17	CP99-117	L10 19	Sm-9	Kp-15	NT	従業員
18	CP99-79	UT	Sm-10	NT	NT	サシネリによる食中毒
18	CP99-85	UT	Sm-11	NT	NT	サシネリによる食中毒
18	CP99-88	UT	Sm-12	NT	NT	サシネリによる食中毒
19	CP98-54	L106/L1050	スメア	NT	NT	
19	CP98-55	L106/L1050	スメア	NT	NT	
19	CP98-56	TCK 12	Sm-13	NT	NT	
19	CP98-57	TCK 1	Sm-14	NT	NT	
20	CP98-79	L10 4	Sm-15	Kp-8	Sa-8	
20	CP98-81	L10 4	Sm-15	Kp-8	Sa-8	
20	CP98-83	L10 4	Sm-15	Kp-8	NT	
21	CP98-95	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-10	
21	CP98-97	L10 7	Sm-1'	Kp-3	NT	
21	CP98-99	L10 7	Sm-1'	Kp-3	NT	

NT: Not tested

表2. *C. jejuni* による散発下痢症事例のPFGEパターン

菌株No.	Lior血清型	Sma I	Kpn I	Sac II	
HP8943	L1028/TCK26	Sm-16	Kp-16	NT	99.3 都立病院株
HP8948	L1028/TCK26	Sm-17	Kp-17	NT	99.3 都立病院株
HP8950	L1028/TCK26	Sm-18	Kp-18	NT	99.3 都立病院株
HP8951	L1028/TCK26	Sm-19	Kp-19	NT	99.3 都立病院株
HP8954	L1028/TCK26	Sm-18	Kp-18	NT	99.3 都立病院株
HP8955	L1028/TCK26	Sm-17	Kp-17	NT	99.3 都立病院株

NT: Not tested

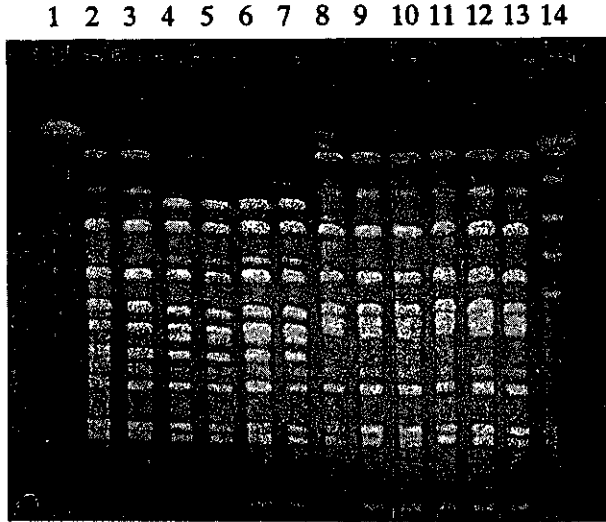
表3. *C. jejuni* による集団下痢症事例のPFGEパターン  
血清型ごとのまとめ

事例No	菌株No	Lior血清型	Sma I	Kpn I	Sac II	
5	CP94-139	L10 2	Sm-4	Kp-7	Sa-7	
5	CP94-142	L10 2	Sm-4	Kp-7	Sa-7	
12	CP96-236	L10 2	Sm-2	Kp-5	Sa-5	
12	CP96-239	L10 2	Sm-2	Kp-5	Sa-5	
13	CP96-323	L10 2	Sm-3	Kp-6	Sa-6	
13	CP96-325	L10 2	Sm-3	Kp-6	Sa-6	
15	CP99-57	L10 4	Sm-23	Kp-13	NT	
20	CP98-79	L10 4	Sm-15	Kp-8	Sa-8	
20	CP98-81	L10 4	Sm-15	Kp-8	Sa-8	
20	CP98-83	L10 4	Sm-15	Kp-8	NT	
15	CP99-54	L10 4/TCK26	Sm-23	Kp-13	NT	
2	CP93-20	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3'	
2	CP93-24	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3'	
4	CP94-51	L10 7	Sm-1	Kp-3	Sa-3	
4	CP94-53	L10 7	Sm-1	Kp-3	Sa-3	
10	CP96-61	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
10	CP96-64	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
11	CP96-127	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
11	CP96-129	L10 7	Sm-1	Kp-2	Sa-2	
14	CP97-11	L10 7	Sm-1	Kp-1	Sa-1	
14	CP97-15	L10 7	Sm-1	Kp-1	Sa-1	
15	CP99-51	L10 7	Sm-1	Kp-12	NT	
17	CP99-115	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3	参考食品
17	CP99-112	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-3	患者
21	CP98-95	L10 7	Sm-1'	Kp-3	Sa-10	
21	CP98-97	L10 7	Sm-1'	Kp-3	NT	
21	CP98-99	L10 7	Sm-1'	Kp-3	NT	
1	CP92-12	L10 11	Sm-21	Kp-16	NT	
1	CP92-13	L10 11	Sm-21	Kp-16	NT	
6	CP94-189	L10 11	Sm-5	NT	NT	
6	CP94-191	L10 11	Sm-5	NT	NT	
17	CP99-117	L10 19	Sm-9	Kp-15	NT	従業員
7	CP94-251	L10 27	Sm-6	Kp-4	Sa-4	
7	CP94-253	L10 27	Sm-6	Kp-4	Sa-4	
9	CP96-7	L106/L1050	スメア	NT	NT	
9	CP96-9	L106/L1050	スメア	NT	NT	
16	CP99-91	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
16	CP99-94	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
16	CP99-97	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
16	CP99-100	L106/L1050	Sm-8	Kp-14	NT	
19	CP98-54	L10 6/L1050	スメア	NT	NT	
19	CP98-55	L10 6/L1050	スメア	NT	NT	
3	CP93-46	TCK 1	Sm-20	Kp-10	Sa-9'	
3	CP93-48	TCK 1	Sm-20	Kp-10	Sa-9'	
8	CP94-255	TCK 1	Sm-7	Kp-9	Sa-9	
8	CP94-257	TCK 1	Sm-7	Kp-9	Sa-9	
19	CP98-57	TCK 1	Sm-14	NT	NT	
19	CP98-56	TCK 12	Sm-13	NT	NT	
15	CP99-49	TCK 26	Sm-22	Kp-11	NT	
18	CP99-79	UT	Sm-10	NT	NT	カモネリによる食中毒
18	CP99-85	UT	Sm-11	NT	NT	カモネリによる食中毒
18	CP99-88	UT	Sm-12	NT	NT	カモネリによる食中毒

NT Not tested

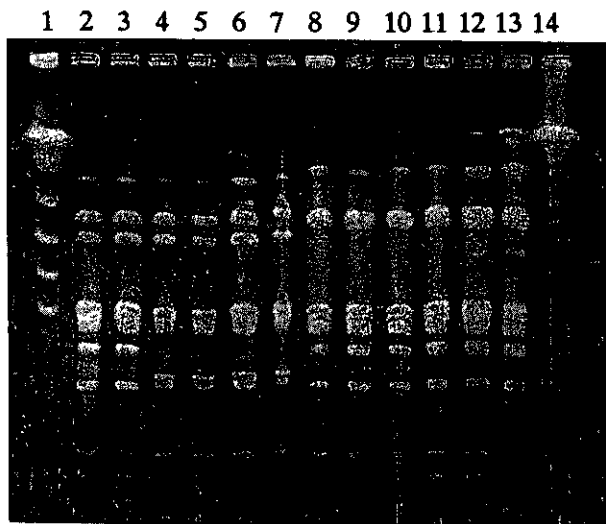


食中毒由来 *C.jejuni* の PFGE パターン  
(制限酵素 : *Kpn I*)



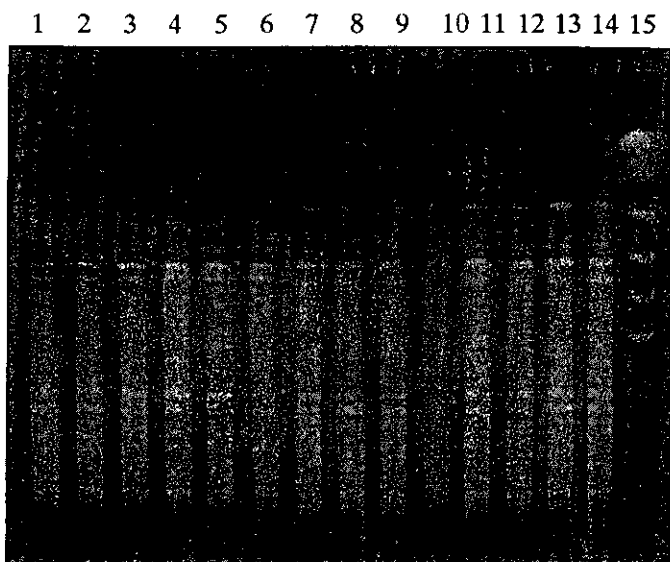
事例	血清型	PFGE パターン
1:	M	Lambda
2:	14	LIO 7 Kp-1
3:	14	LIO 7 Kp-1
4:	10	LIO 7 Kp-2
5:	10	LIO 7 Kp-2
6:	11	LIO 7 Kp-2
7:	11	LIO 7 Kp-2
8:	4	LIO 7 Kp-3
9:	4	LIO 7 Kp-3
10:	17	LIO 7 Kp-3
11:	17	LIO 7 Kp-3
12:	2	LIO 7 Kp-3
13:	2	LIO 7 Kp-3
14:	M	Yeast

食中毒由来 *C.jejuni* の PFGE パターン  
(制限酵素 : *Sac II*)

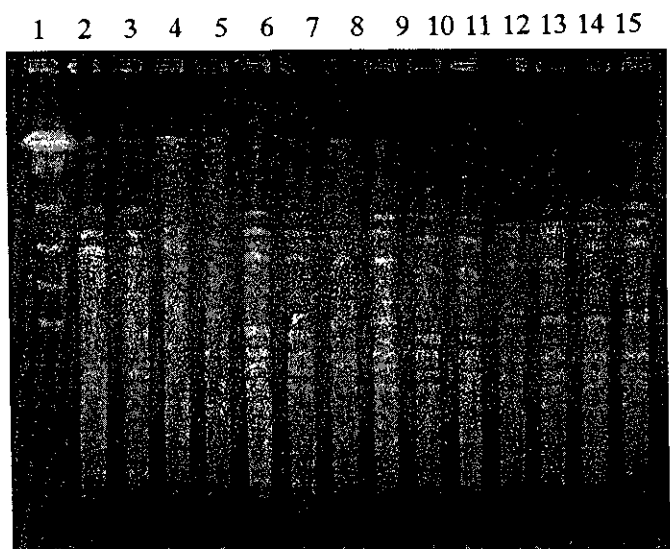


事例	血清型	PFGE パターン
1:	M	Yeast
2:	14	LIO 7 Sa-1
3:	14	LIO 7 Sa-1
4:	10	LIO 7 Sa-2
5:	10	LIO 7 Sa-2
6:	11	LIO 7 Sa-2
7:	11	LIO 7 Sa-2
8:	4	LIO 7 Sa-3
9:	4	LIO 7 Sa-3
10:	17	LIO 7 Sa-3
11:	17	LIO 7 Sa-3
12:	2	LIO 7 Sa-3'
13:	2	LIO 7 Sa-3'
14:	M	Lambda

食中毒由来 *C.jejuni* の PFGE パターン  
(制限酵素: *Sma* I)



事例	血清型	PFGE パターン
1:	14	LIO 7 Sm-1
2:	14	LIO 7 Sm-1
3:	10	LIO 7 Sm-1
4:	10	LIO 7 Sm-1
5:	11	LIO 7 Sm-1
6:	11	LIO 7 Sm-1
7:	4	LIO 7 Sm-1'
8:	4	LIO 7 Sm-1'
9:	17	LIO 7 Sm-1' (鶏由来)
10:	17	UT (鶏由来)
11:	17	LIO 7 Sm-1'
12:	17	LIO 7 Sm-1'
13:	2	LIO 7 Sm-1'
14:	2	LIO 7 Sm-1'
15:	M	Yeast



事例	血清型	PFGE パターン
1:	M	Yeast
2:	7	LIO 27 Sm-6
3:	7	LIO 27 Sm-6
4:	9	LIO 6 / LIO 50 スメア
5:	9	LIO 6 / LIO 50 スメア
6:	12	LIO 2 Sm-2
7:	12	LIO 2 Sm-2
8:	13	LIO 2 Sm-3
9:	13	LIO 2 Sm-3
10:	5	LIO 2 Sm-4
11:	5	LIO 2 Sm-4
12:	6	LIO 11 Sm-5
13:	6	LIO 11 Sm-5
14:	8	TCK 1 Sm-7
15:	8	TCK 1 Sm-7

厚生科学研究費補助金（厚生省新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究（毒素原性大腸菌）

分担研究者 甲斐 明美 東京都立衛生研究所・微生物部

研究要旨

毒素原性大腸菌による集団下痢症の原因菌として、最近最も多く検出され、注目されている血清型であるO169:H41を中心に、O6:H16、O25:NM、O148:H28の集団及び散発下痢症由来株を対象に、パルスフィールド電気泳動(PFGE)法による解析を試みた。その結果、制限酵素 Xba I, Not I で処理後、PFGE法で解析した場合、各々の血清型菌内で型別する事が出来、疫学解析に有効であることが明らかとなった。

毒素原性大腸菌を対象としたPFGE法による解析法を標準化する場合、「PFGE型(ネーミング)」としては、各々の「血清型」、「毒素型」、PFGE用試料調製に用いる「制限酵素」毎に行うのが、その後の検索も含めて、分かり易く有効であろう。

また、毒素原性大腸菌による下痢症の解析は、喫食状況等の疫学調査成績と併せて、分離株の血清型、毒素型、薬剤感受性、PFGE型等の各種疫学マーカーを総合的に評価する必要がある。

A. 研究目的

毒素原性大腸菌による集団食中毒は、我が国では年間30～50件発生し、サルモネラ、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌やカンピロバクターに続いて重要な原因菌である。また、海外旅行者下痢症の原因菌としても最も重要である。そこで、遺伝子レベルの疫学解析にパルスフィールド電気泳動(PFGE)法を応用することを目的として、毒素原性大腸菌のPFGE法による遺伝子解析の標準化のための解析方法

の検討を行った。

B. 研究方法

供試菌株は、毒素原性大腸菌の中でも集団下痢症の原因菌として、過去10年間に最も多く検出され、注目されている血清型であるO169:H41の内、東京都内で発生した15集団下痢症事例由来の61株及び散発下痢症由来の22株である。更に、O6:H16/NM(3集団事例由来の6株)、O25:NM(6集団事例由来の12株)、O148:

H28(4集団事例由来の8株)の分離株も供試した。

PFGE用のDNAブロックは、トリプチケース・ソイ・ブロスで、37°C、18~20時間培養した菌を用いて、常法に従って作製した。このDNAブロックを、制限酵素 Sam I、Xba I、Not I で処理後、PFGE法による解析を実施した。電気泳動は、CHEF-Mapper システムおよびCHEF-DR II (Bio Rad)を用い、以下の条件で行った。

アガロース : 1% PFC(Bio Rad)  
バッファー : 0.5 x TBE, 14°C  
電圧 : 6 V/cm, 200V  
パルス角度 : 120°  
スイッチタイム : リニア  
Xba I ; 0.47 ~ 44.69秒  
Not I ; 0.49 ~ 35.38秒  
泳動時間 : 20 時間

### C. 研究結果

東京都内では、過去33年間(1966~1998年)に167件の大腸菌による集団下痢症が発生しているが、その内の94件(56%)は、毒素原性大腸菌によるものであった。その原因菌の血清型は19種類に及ぶが、検出頻度の高いものは、O6:H16、O169:H41、O27:H7、O148:H28等であった。特に、血清型O169:H41は1992年に最初の発生が確認されて以来急増し、1990~1994年の5年間には26件中9件、1995~1998年の4年間では13件中6件が本血清型であった(表1)。これらの傾向は、全国的にも同じである。

血清型O169:H41菌について、15集団下痢症由来の61株と散発下痢症由来の22株を対象に、制限酵素 Sam I、Xba I、Not Iの各々で処理後、PEFG法による解析を試みた。その結果、Sam Iでは、DNAの切断部位が多すぎるために疫学解析には不適であった。一方、Xba Iでは4型(1, 2, 3, 4)と4亜型(1a, ab, 1c, 1d)に、Not Iでは8型に分類され、疫学的解析に有効な方法であることが示唆された(表2, 3)。

更に、血清型O6:H16/NM(3集団事例由来の6株)、O25:NM(6集団事例由来の12株)、O148:H28(4集団事例由来の8株)の各分離株についても同様の方法で検討した結果、制限酵素 Xba I、Not Iで処理後、PFGE法で解析した場合、各々の血清型内で事例毎にそのパターンは異なり、疫学解析に有効であることが明らかとなった。

### D. 考察

毒素原性大腸菌の内、集団下痢症や散発下痢症の原因菌として最も多く検出され、注目されている血清型であるO169:H41を中心に、O6:H16、O25:NM、O148:H28の各分離株について検討した結果、制限酵素 Xba I、Not Iで処理後、PFGE法で解析した場合、各血清型菌内で事例毎にそのパターンは異なり、疫学解析に有効であることが明らかとなった。これらの制限酵素は、腸管出血性大腸菌O157の解析にも現在使用されてい