

るものであり、同じ制限酵素が有効なことは、経済的にも、技術的にも好都合な事である。

ヒトに起病性のある毒素原性大腸菌の血清型は30種類以上に及ぶため、本菌を対象としたPFGE法による解析法を標準化する場合、その「型別(ネーミング)」としては、各々の「血清型」、「毒素型」、「制限酵素」毎に行うのが、その後の検索においても分かり易く有効であろう。その具体的方法については更に検討を要する。

また、毒素原性大腸菌による下痢症の解析にあたっては、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解析成績を総合的に評価する必要がある。

E. 結論

疫学調査に応用することを目的とした毒素原性大腸菌の遺伝子解析においては、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るものであり、経済的にも、技術的にも好都合な方法である。

更に、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」としては、各々の「血清型」、

「毒素型」、「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ると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

甲斐明美, 尾畑浩魅, 他: 毒素原性大腸菌 O169: H41による集団下痢症の多発と分子生物学的解析, 第70回日本感染症学会総会(1996年4月, 東京)

畠山 薫, 甲斐明美, 他: 毒素産生株と非産生株が同時に分離された大腸菌 O169: H41による集団下痢症事例, 第72回日本感染症学会総会(1998年4月, 大阪)

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. 東京都内における毒素原性大腸菌による集団下痢症の発生状況

血清型	毒素型	1966	1970	1975	1980	1985	1990	1995	計*
		'69	'74	'79	'84	'89	'94	'98	
0 6:H16	LT+ST	-	3	5	7	5	6	-	26
0 6:H -	LT+ST	-	2	-	2	1	-	-	5
0148:H28	LT+ST	-	-	1	-	3	-	-	4
★ 0169:H41	ST	-	-	-	-	-	9	6	15
0 27:H 7	ST	3	-	1	6	1	2	1	14
0148:H28	ST	-	-	2	1	2	5	1	11
0159:H20	ST	-	5	1	-	-	-	-	6
0 27:H20	ST	-	2	3	-	-	-	-	5
0 25:H -	ST	-	-	-	-	-	-	3	3
0159:H -	ST	-	1	-	-	1	-	-	2
0 6:H -	ST	-	-	-	-	-	-	1	1
0 11:H27	ST	1	-	-	-	-	-	-	1
0 20:H19	ST	-	-	-	-	1	-	-	1
0 70:H -	ST	-	-	-	1	-	-	-	1
0159:H34	ST	-	-	-	-	-	1	-	1
0 25:H -	LT	-	-	-	-	-	2	1	3
0 17:H18	LT	-	-	-	-	-	1	-	1
0 85:HUT	LT	-	-	-	1	-	-	-	1
0 UT:H27	LT	-	-	-	1	-	-	-	1
計		4	13	13	19	14	26	13	102

* 異なる血清型の毒素原性大腸菌が同一事例から検出された場合があるため、この計は実際の発生事例数よりも多い。

表 2. 集団下痢症より分離された毒素原性大腸菌0169:H41の薬剤耐性
およびパルスフィールド電気泳動パターン

事例 No.	発生年月	発生場所	薬剤耐性 パターン*	PFGEパターン	
				Xba I	Not I
1.	1992年 8月	東京・寿司屋	TC	1	1
2.	1992年 8月	東京・仕出屋	TC	1	1
3.	1983年 8月	北海道・旅館	TC	1	1
4.	1993年 9月	群馬・不明	TC	1	1
5.	1993年 9月	東京・飲食店	TC, ABPC	1	4
6.	1993年11月	群馬・旅館	TC	1	1
7.	1994年 3月	静岡・旅館	TC, ABPC	1a	3
8.	1994年 7月	静岡・仕出屋	TC	1	1
9.	1994年 9月	東京・飲食店	TC	1	1
10.	1996年 8月	東京・仕出屋	TC, SM, ABPC, ST	NT	8
11.	1997年 9月	東京・保育園	TC, SM, ABPC, ST	NT	1
12.	1997年10月	東京・飲食店	TC, ABPC	NT	7
13.	1998年 9月	東京・病院	TC	1	1
14.	1998年11月	東京・飲食店	TC	3	1
15.	1998年12月	東京・飲食店	TC	1a	3

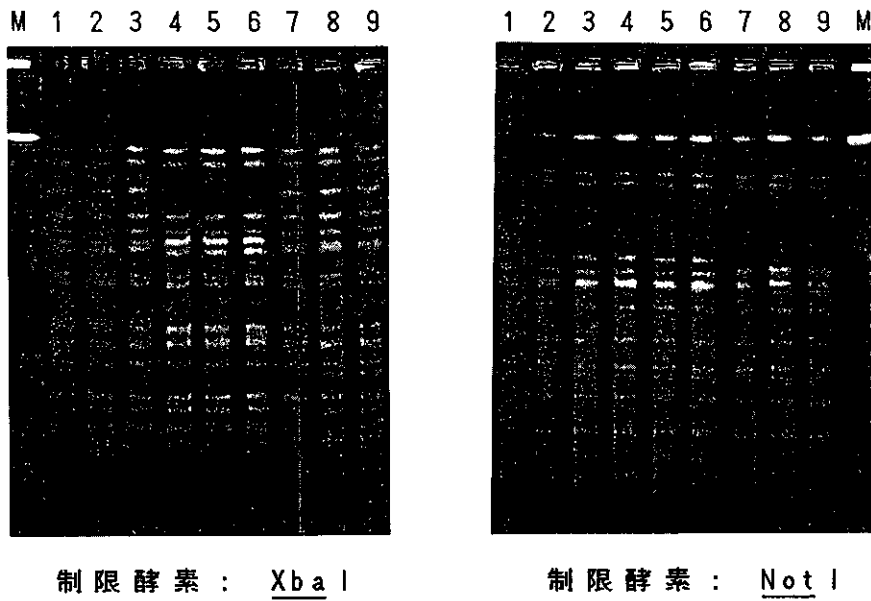
* 使用薬剤： CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFX

表 3. 散発下痢症事例から分離された毒素原性大腸菌0169:H41
の薬剤耐性およびパルスフィールド電気泳動パターン

菌株 No.	薬剤耐性 パターン*	PFGEパターン	
		Xba I	Not I
1.	TC	1	1
2.	TC	1	1
3.	TC	1b	4
4.	TC	1	1
5.	TC	1c	1
6.	TC	1c	1
7.	TC	1	1
8.	TC	1	3
9.	TC	4	5
10.	TC	1a	3
11.	TC	1a	3
12.	TC	1a	3
13.	TC	1a	3
14.	TC, SM, ABPC, ST	2	5
15.	TC	1	3
16.	TC, ABPC, ST	1	3
17.	TC, ABPC, ST	1	NT
18.	TC	1	1
19.	TC	1a	3
20.	TC	1d	6
21.	TC	1	1
22.	TC	3	1

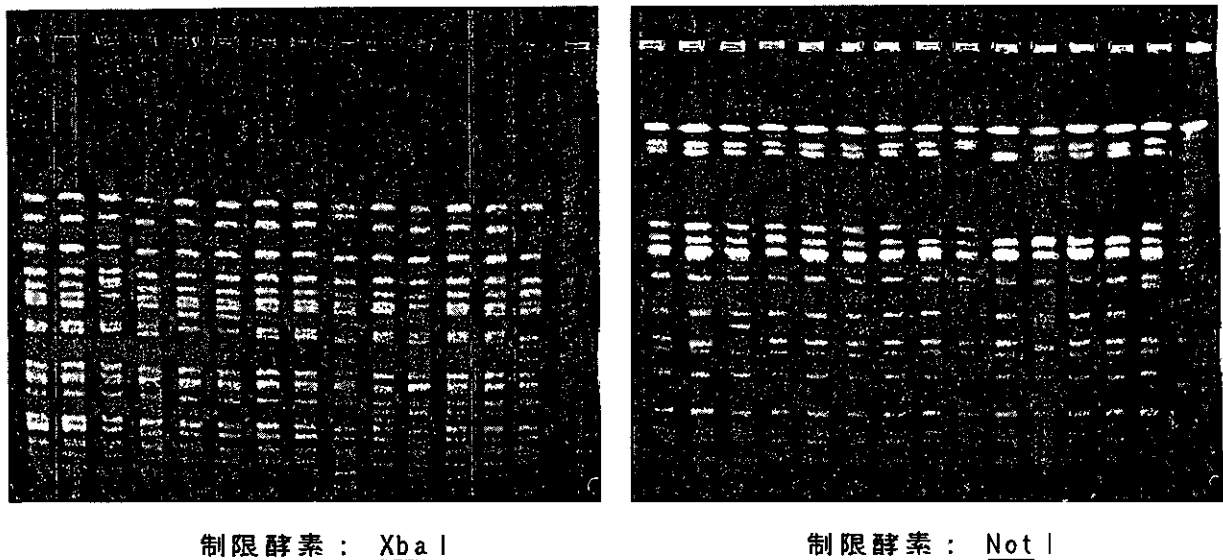
* 使用薬剤： CP, TC, SM, KM, ABPC, ST, NA, FOM, NFX

図 1. 毒素原性大腸菌 0169:H41の PFGEパターン



1-3 : 集団事例 No.13 の患者由来株
 4-6 : 集団事例 No.14 の患者由来株
 7-9 : 集団事例 No.15 の患者由来株

図 2. 散発下痢症事例由来毒素原性大腸菌 0169:H41の PFGEパターン



左から順に 散発下痢症事例 No. 1 - No.14由来株

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

わが国におけるパルスネット構築のための緊急研究 <サルモネラ>

分担研究者 仲西 寿男（神戸市環境保健研究所）

研究要旨

幼稚園内で発生した S Enteritidis (SE) による集団食中毒事例では、原因食と推定されたタマゴサンドと患者由来株はともにフェージ型 1 で、これらは単一遺伝子型を示した。また、病院給食に起因すると推測される SE による食中毒事例の患者および食品由来株（タマゴとじ）で同一フェージ型の菌株も単一遺伝子型菌による感染で、フェージ型別と PFGE 型別の結果は一致した。いっぽう、原因と推測される食品から分離されたの SE のフェージ型が患者由来株と異なったパルスフィールドゲル電気泳動法の結果は同一パターンを示し、同一クローン由来であることが示された。PFGE 法はクローンを推測するうえで有用であることが示唆された。

海外渡航者由来の SE 感染事例の一部から幼稚園および病院給食事例と同一遺伝子型の菌株が検出された。すなわち、これらの菌株は同一クローンに由来し、タマゴを原因食品と推定するならば、そのクローンは種鶏の輸出国である英国に由来するものと考えられる。イカ菓子による S Oranienburg 食中毒では、神戸市内、東京都衛生研究所、千葉県衛生研究所および神奈川県衛生研究所で分離されたイカ菓子および患者由来株の PFGE パターンは全て一致した。まさに diffuse outbreak であったことが証明された。同時にこれらの施設より送付された泳動写真は、同一制限酵素およびマーカ（λ-Ladder）を用いた群別では、泳動条件および泳動装置の違いにかかわらず、容易に比較可能であった。泳動条件の標準化によって、菌株をわざわざリファレンスセンターへ送付することなく、遺伝子型判定が可能であることが実証された

(A) 研究目的

1989 年以降、わが国では S Enteritidis による集団および散发事例が多発し、それが鶏卵汚染に由来することが明らかにされている。集団発生におけるサルモネラの患者数は年間 1 万人を上回り、腸炎ピブリオ、腸管出血性大腸菌のそれを上回っている。また、1999 年はじめから、S Oranienburg で汚染されたイカ珍味菓子

による事例が全国規模で発生し、患者数は 1,500 名を超えている。このように多発するサルモネラ症の疫学を解明し、予防対策を確立することが急務であるが、その解明には分離菌株の解析が必須となる。解析法として、フェージ型別法 (PT)、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)、プラスミドプロファイルなどが用いられているが、それぞれ長所および短所があ

る。

今回は、PFGE を用いた遺伝学的解析法を用いて、いくつかのサルモネラ集団食中毒事例から分離された同一血清型の菌株について、感染源の究明における PFGE の有用性を評価し、また市販食品および環境から分離される菌株と患者株との遺伝子型の異同をしらべ、早急な予防対策に活用することを目的とする。

同時に本解析法の標準化を図り、その結果をオンラインで情報交換することにより、全国規模での流行予測、さらに農場から食卓までの食品の安全性確保に資することが期待される。

(B) 研究方法

(1) S. Enteritidis 集団食中毒事例の解析

(a) 飲食店事例で患者株 7 (ファージ型 34)、食品株 1 (ファージ型 4)、食品株 1 (ファージ型不明)、およびフキトリ株 1 (ファージ型 34) の合計 10 株。

(b) 幼稚園内で 54 名から SE (ファージ型 1) が分離されたタマゴサンドを原因とする集団事例での患者由来 12 株およびタマゴサンド由来株。

(2) イカ菓子における S. Oranienburg による食中毒事例の解析

神戸市内でイカ菓子を喫食した患者由来 6 株、問診によりイカ菓子を喫食していないと推測される患者株由来 2 株、イカ菓子 (おやつちんみ) 由来 1 株、および東京都衛生研究所、千葉県衛生研究所と神奈川県衛生研究所で分離された患者由来 6 株とイカ菓子由来 6 株について検討する。また、東京都立衛生研究所から送付されたイカ菓子から分離された S. Chester 3 株についても同様に検討する。

(3) 菌株と同時に東京都立衛生研究所、千葉県衛生研究所と神奈川県衛生研究所から送付された泳動パターンを比較し、すでに他施設で解析された結果との比較が

可能であるかの検討。

(4) 海外渡航者由来の SE 7 株と、神戸市内で発生した、タマゴに起因する SE 食中毒事例とのクロス解析によって、海外渡航先での SE 感染事例とわが国での感染事例との関連を調査する。

(5) ゲルプラグの調整方法、制限酵素 BlnI および XbaI を用いて、最適制限酵素の選択および消化後のフラグメントサイズから泳動条件を算出する。

(C) 研究結果

(1) S. Enteritidis 集団事例の解析

(a) 幼稚園での事例 タマゴサンドを原因とする幼稚園での SE による食中毒事例では、54 名より SE を分離した。分離菌はすべて PT1 で、BlnI による制限酵素切断パターンは、すべて同一であった。

(b) 飲食店での事例 患者由来株のファージ型はすべて 34 型、パルスフィールド型は Ia で、両者は一致した。しかし、食品株は PT4 型を示したが、PFGE は Ia' 型で患者由来株と類似した。推定原因食品由来株はいずれも患者株と異なる PT であったが、フキトリ由来株は、患者株と同一 PT であったが、PFGE では Ia' で、食品株と同一であった。この Ia' 型の菌株は、再検をおこなっても泳動パターンがスメアーを呈し、バンドパターンを観察することができなかった。これは、Proteinase-K 耐性のヌクレアーゼ産生菌と考えられるが、CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit (BIORAD) でゲルプラグの作成をおこなうことで、不明瞭ではあるがバンドパターンが観察された。

(2) イカ菓子における S. Oranienburg による食中毒事例の神戸市の患者由来 8 株およびイカ菓子 (おやつちんみ) 由来 1 株では、BlnI および XbaI による制限酵素切断パターンは、それぞれすべて同一であった。神戸市内、東京都衛生研究所、千

千葉県衛生研究所および神奈川県衛生研究所で分離された患者由来の5株とイカ菓子由来の4株において、制限酵素切断パターンは同一であった。このことから diffuse outbreak であったことが証明された。また、神戸市内でイカ菓子を喫食していないと思われる患者2名からも S Oranienburg が分離されたが、その PFGE パターンはイカ菓子と同一型であった。しかし推定原因食品は不明であった。東京都立衛生研究所で同じイカ菓子から分離された S Chester 3株も、BlnI および XbaI による制限酵素切断パターンは、それぞれすべて同一であった。

(3) 菌株と同時に東京都立衛生研究所、千葉県衛生研究所および神奈川県衛生研究所から送付された泳動写真は、同一制限酵素およびマーカー(λ -Ladder)を用いたものでは、泳動条件および泳動装置の違いにもかかわらず、容易に比較が可能であった。すなわち、泳動条件の標準化によって、菌株をわざわざリファレンスセンターへ送付することなく、遺伝子型判定が可能であると考えられる。

(4) SE による病院給食に起因すると推測される食中毒事例の制限酵素 BlnI によるパターンを比較した。病院給食で出されたタマゴと同じ患者から分離された SE 株は同一遺伝子型を示した。

さらに、海外渡航先での SE 感染事例の一部からも、病院給食事例の由来5菌株と同一遺伝子型の菌株が検出された。前述の神戸市内の幼稚園内で発生したタマゴサンドによる集団事例由来株ともパターンは完全に一致した。以上の成績から、これらの菌株は同一クローンに由来し、タマゴを原因食品と推定するならば、そのクローンは英国に由来するものと考えられる。

(5) 泳動条件の検討

(a) 試料 DNA の調整および電気泳動

条件

(i) 寒天平板上のサルモネラをあらかじめ 40°C に保温した 200 μ l のイオン交換水に A550 075 (MacFarland 3.0) に懸濁させる。

(ii) 精製水で低融点アガロース (InCert Agarose: TaKaRa) を 16% に加温溶解して、40°C に保温する。

(iii) 菌液と等量のアガロースを加えてよく攪拌後、インサートモールド内に 100 μ l ずつ分注する。

(iv) 4°C で1時間以上放置。

(v) インサートモールド内のゲルプラグを 1 ml の Lysozyme 溶液を加えたファルコンチューブ (10 ml) に加えて、37°C 4時間振とう培養する。

(vi) Lysozyme 溶液を捨てて、つぎに 1 ml の Proteinase-K 溶液を加えて、60°C 一晩振とう培養する。

(vii) Proteinase-K 溶液を捨てて、つぎに 1 ml の 1 mM PMSF を含む TE バッファーを加えて、60°C 30分振とう培養する。これを二回繰り返して Proteinase-K を除去する。

(viii) 溶液を捨てて、1 ml の x 0.1 TE を加えて、4°C で1時間放置する

(ix) 0.2 ml の制限酵素反応バッファーと交換して、4°C で1時間放置する。

(x) バッファーをすてて、つぎに、30 U/100 μ l の制限酵素をバッファーに加えた、反応溶液を 100 μ l 加える。

(xi) 37°C で振とうしながら一晩、制限酵素 (BlnI, XbaI) で消化をおこなう。

(xii) 1% アガロースゲル (Pulse Field Certified Agarose BIORAD) を用いて x0.5 TBE バッファー中で Initial SW Time 0.5 sec, Final SW Time 50 sec, 6V/cm 14°C で22時間泳動 (CHEF-DR III: BIORAD)。

(xiii) 1mg/L EtBr 溶液中で染色して、UV 光源下で観察する。

Lysozyme 溶液: 1mg/ml Lysozyme, 0.5% N-

Lauroyl Sarcosine, 0.5% Brij 35, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 7.5

Proteinase-K 溶液 : 1mg/ml Proteinase-K, 1% N-Lauroyl Sarcosine, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8.0

(b) 最適制限酵素の選択

BlnI および XbaI 切断後の泳動パターン

では、10k ~ 1Mbp 位のフラグメントが観察された。どちらも良好な解像度を示したが、XbaI は、ややフラグメント数が多い傾向が認められたこと、さらに本酵素は、メチル化による認識部位の消失の可能性もあることから、BlnI が推奨される。

(E) 結論

SEによる集団事例におけるファージ型別との比較では、ファージ型が異なるにもかかわらず、同一遺伝子型、すなわち同一クローン由来であることが PFGE の結果から判明した。このことは、分離菌のクローンを特定することによって、感染源および感染経路を推測するうえで有用である。また、標準化された PFGE 条件下で実施された PFGE の結果であれば、わざわざ菌株を送付しなくとも、施設内で実施した PFGE のパターンのみをリファレ

ンスセンターへ送付するだけで、解析結果を得ることが可能と考えられる。また、画像データとしてコンピューター化されたデータであれば、インターネットなどを介して瞬時に解析結果を得ることも可能と考えられる。

(F) 研究発表

1. 論文発表

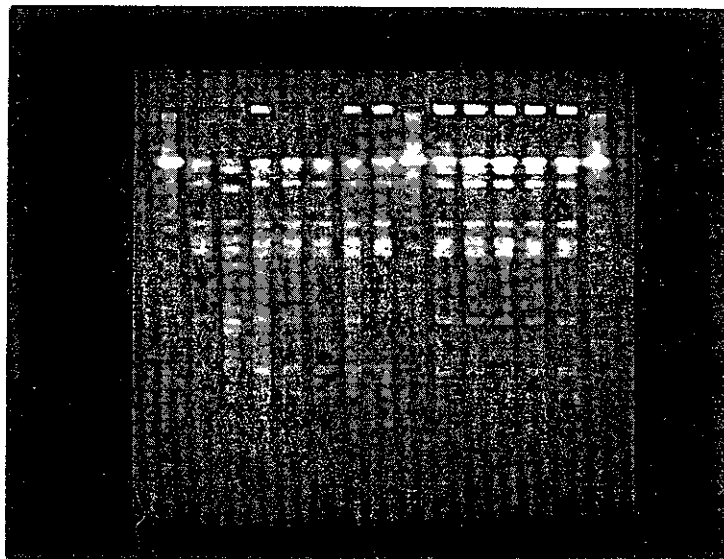
- (1) 村瀬 稔 & 仲西 寿男: タマゴとサルモネラ 食品と微生物 1992; 8: 181-187.
- (2) 仲西 寿男: サルモネラ症の疫学食衛誌 1994; 35: 585-592.
- (3) 村瀬 稔: サルモネラ, とくに Enteritidis 下痢症の現状 食品と微生物 1994; 10: 181-184.

2. 学会発表

- (1) M. Murase & H. Nakanishi: Present status of S. Enteritidis in Japan. 32nd Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting 1997, Osaka, Japan. United State-Japan Cooperative Program on Development & Utilization of Natural Resources.

S. Enteritidisの海外渡航者由来株および病院給食による感染事例

M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 12 M



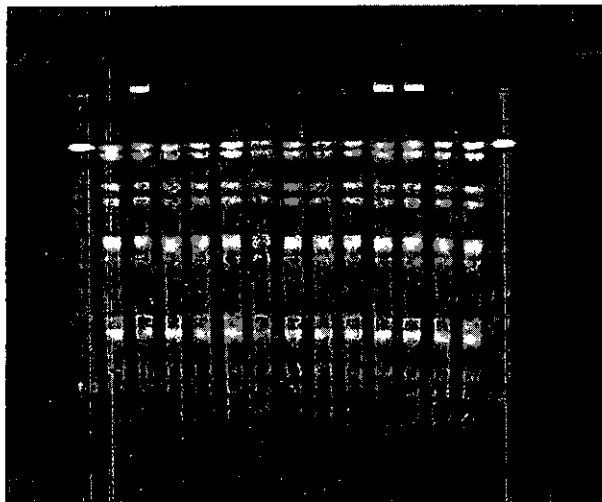
制限酵素 : Bln I

Lane M: λ Ladder

- 1: 海外渡航者 (シンガポール)
- 2: 海外渡航者 (バリ島)
- 3: 海外渡航者 (バリ島)
- 4: 海外渡航者 (バリ島)
- 5: 海外渡航者 (タイ)
- 6: 海外渡航者 (香港)
- 7: 海外渡航者 (インドネシア)
- 8: 病院給食 (蒸し魚)
- 9: 病院給食 (タマゴとじ)
- 10: 患者
- 11: 患者
- 12: 患者

イカ菓子によるS.Oranienburgによる食中毒事例

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

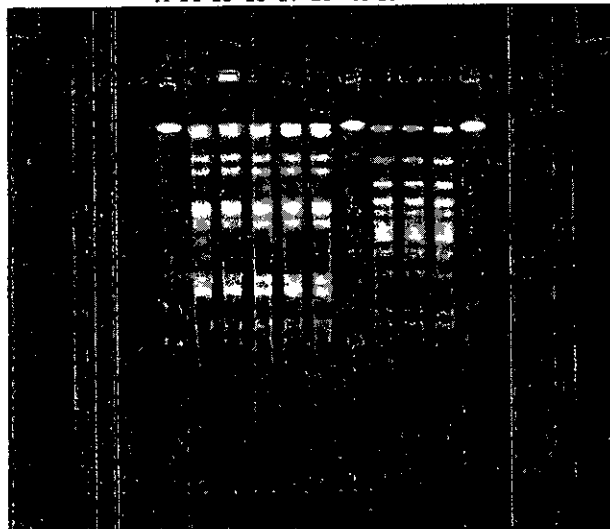


制限酵素 : Xba I

Lane M: 入 Ladder

- | | | |
|---------------|---------------|---------------|
| 1: おやつちんみ | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 2: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 3: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 4: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 5: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 6: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 7: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市 |
| 8: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市: イカ菓子は非喫食 |
| 9: 患者 | S.Oranienburg | 神戸市: イカ菓子は非喫食 |
| 10: お好みIKAYAN | S.Oranienburg | 神奈川県衛生研究所 |
| 11: 患者 | S.Oranienburg | 神奈川県衛生研究所 |
| 12: バリバリイカ | S.Oranienburg | 千葉県衛生研究所 |
| 13: 患者 | S.Oranienburg | 千葉県衛生研究所 |

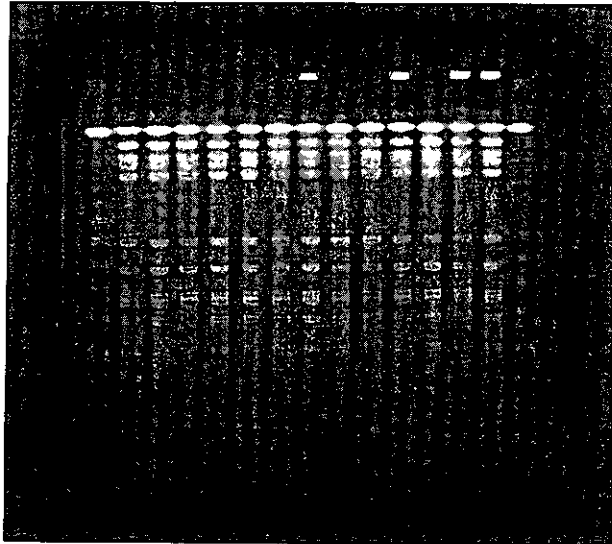
M 14 15 16 17 18 M 19 20 21 M



- | | | |
|------------|---------------|----------|
| 14: おやつちんみ | S.Oranienburg | 東京都衛生研究所 |
| 15: バリバリイカ | S.Oranienburg | 東京都衛生研究所 |
| 16: 患者 | S.Oranienburg | 東京都衛生研究所 |
| 17: 患者 | S.Oranienburg | 東京都衛生研究所 |
| 18: 患者 | S.Oranienburg | 東京都衛生研究所 |
| 19: おやつちんみ | S.Chester | 東京都衛生研究所 |
| 20: バリバリイカ | S.Chester | 東京都衛生研究所 |
| 21: 患者 | S.Chester | 東京都衛生研究所 |

イカ菓子によるS. Oranienburgによる食中毒事例

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

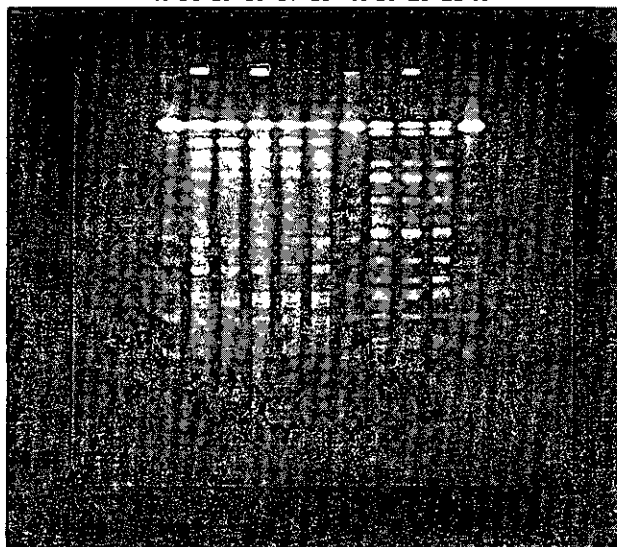


制限酵素 : Bln I

Lane M: λ Ladder

1: おやつちんみ	S. Oranienburg	神戸市
2: 患者	S. Oranienburg	神戸市
3: 患者	S. Oranienburg	神戸市
4: 患者	S. Oranienburg	神戸市
5: 患者	S. Oranienburg	神戸市
6: 患者	S. Oranienburg	神戸市
7: 患者	S. Oranienburg	神戸市
8: 患者	S. Oranienburg	神戸市: イカ菓子は非喫食
9: 患者	S. Oranienburg	神戸市: イカ菓子は非喫食
10: お好み IKAソーメン	S. Oranienburg	神奈川県衛生研究所
11: 患者	S. Oranienburg	神奈川県衛生研究所
12: バリバリイカ	S. Oranienburg	千葉県衛生研究所
13: 患者	S. Oranienburg	千葉県衛生研究所

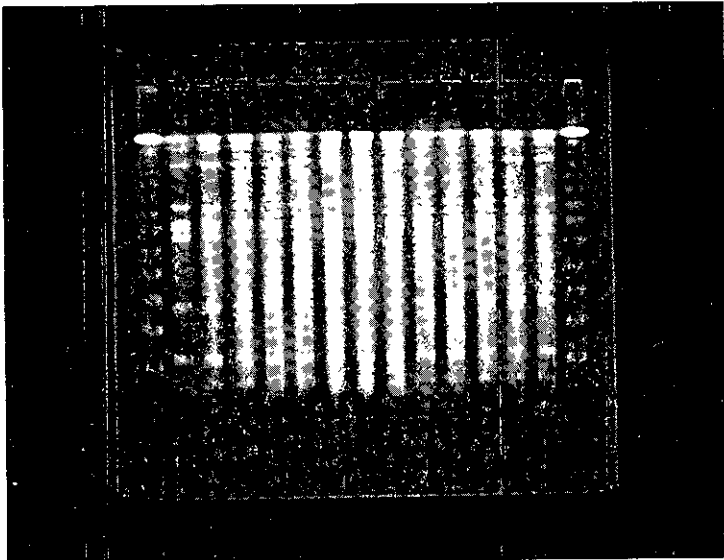
M 14 15 16 17 18 M 19 20 21 M



14: おやつちんみ	S. Oranienburg	東京都衛生研究所
15: バリバリイカ	S. Oranienburg	東京都衛生研究所
16: 患者	S. Oranienburg	東京都衛生研究所
17: 患者	S. Oranienburg	東京都衛生研究所
18: 患者	S. Oranienburg	東京都衛生研究所
19: おやつちんみ	S. Chester	東京都衛生研究所
20: バリバリイカ	S. Chester	東京都衛生研究所
21: 患者	S. Chester	東京都衛生研究所

S. Enteritidisによる幼稚園内で発生したタマゴサンドを原因とする食中毒事例

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



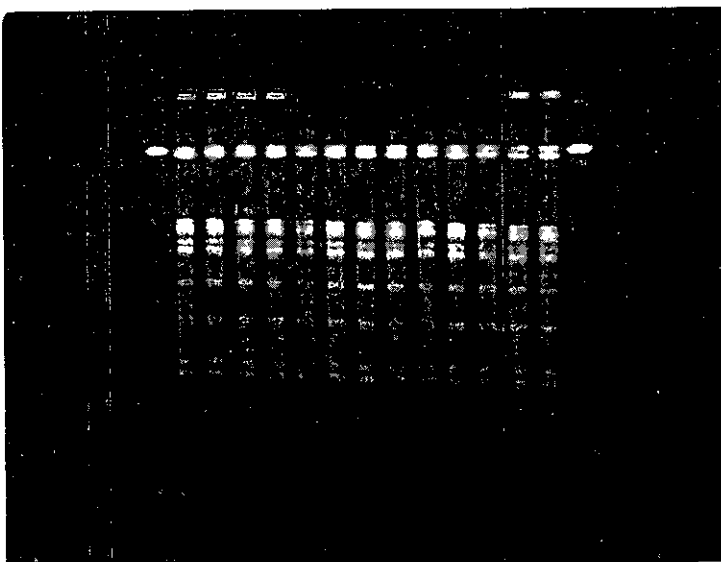
制限酵素 : Bln I

Lane M: λ Ladder

1~12: 患者由来株

13: タマゴサンド由来株

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



制限酵素 : Xba I

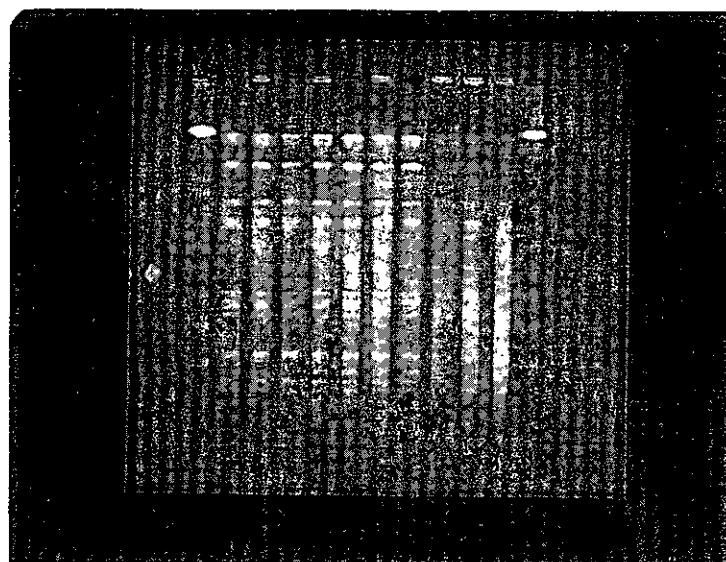
Lane M: λ Ladder

1~12: 患者由来株

13: タマゴサンド由来株

S. Enteritidisによる集団食中毒事例

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



制限酵素 : Bln I

Lane M: λ Ladder

1~7: 患者由来株 (PT 34)

8: 食品由来株 (PT 4)

9: 食品由来株 (PT 不明)

10: ふきとり由来株 (PT 34)

厚生科学研究費補助金(厚生科学特別研究事業)

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(A群レンサ球菌)

分担研究者 水口康雄(千葉県衛生研究所)

共同研究者 小岩井健司, 内村眞佐子, 小倉誠, 三瓶憲一, 市村博(千葉県衛生研究所)

研究要旨

様々な病状を示し、その感染形態も多様であるA群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) のパルスフィールド電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、疫学調査に非常に有用と考えられる。本研究では、食中毒様の発症形態をとった事例由来のA群レンサ球菌を対象に、PFGE法による解析条件の標準化の基礎的条件と分子疫学的解析の有用性を検討した。

3事例から分離されたA群レンサ球菌39株は、制限酵素 *Sma* I と *Sfi* I を使用した場合に良好なPFGEの泳動パターンを得ることができた。しかしながら、1つの制限酵素では軽微な差しか認められない事例があったことから、*Sma* I と *Sfi* I の2種類の制限酵素を組み合わせて解析することが望ましいものと考えられた。

異なる方法で試料DNAを調製しても同一のPFGEパターンが得られ、また、泳動条件を変えた場合も泳動パターンの比較は可能であったが、パルスネット等で泳動パターンを比較するためには泳動条件の標準化と、さらに多くの菌株を解析した基礎資料が必要と考えられた。

A. 研究目的

A群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は咽頭炎や扁桃炎等の原因菌であるとともに、多臓器不全や軟部組織の壊死等を起こし急激な病態を惹起する劇症型感染症起因菌として知られている。

一方、本菌が飲食物を汚染し、その飲食物を喫食したヒトが咽頭痛、発熱等の臨床症状を呈する、いわゆる食中毒様の感染形態をとることも報告されており、わが国では1969年に埼玉県(T12)、1983年に東京都(T13)でその発生が確認されている。これ

以後、このような感染形態をとった事例の報告はほとんどみられていなかったが、1997年に福岡県(患者数943名)と高知県(患者数77名)で、1998年には茨城県(患者数342名)でそれぞれ発生が報告された。

このように様々な病状を示し、その感染形態も多様であるA群レンサ球菌のパルスフィールド電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、疫学調査に非常に有用と考えられるが、由来も血清型も多様である本菌の解析には、多くのデータを蓄積していく必要がある。

本研究では、食中毒様の発症形態をとった事

例由来のA群レンサ球菌を対象を絞り、PFGE法による解析条件の標準化の基礎的条件と分子疫学的解析の有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 供試株

1997年5月に福岡県、1997年7月に高知県及び1998年8月に茨城県で発生した集団感染症由来株、計39株を用いた。この内訳は、福岡市環境保健研究所分与株9株(患者由来3株、食品由来2株、製造業者由来3株、いずれもTB3264及び製造業者由来T1, 1株)、高知県衛生研究所分与株6株(患者由来3株、従業員由来3株、いずれもT22)、茨城県衛生研究所分与株13株(患者由来6株、食品由来3株及び従業員由来3株、いずれもT22)と同事例で千葉県衛生研究所で分離した患者由来12株(T22)である。

2) サンプルDNAの調製

PFGEに使用するサンプルDNAは、当所で現在実施している方法と以前実施していた2つの方法(図1)で調製し、異なる調製法によるPFGEパターンの差を比較した。

3) 制限酵素処理

ゲルを1/2に切断し、TE_{0.1}200 μ l中で30分放置後、制限酵素処理(30U/100 μ l)を適温で4時間以上行った。

4) 電気泳動

電気泳動装置はCHEF-DR III (BIORAD)を使用し、泳動はゲル濃度1%、0.5 \times TBEを用いて次の①の条件で実施したが、他の3つの条件によるPFGEパターンも比較検討した。

- ① 電圧6V/cm, スイッチングタイム1-40秒, 泳動時間20時間, 泳動温度10 $^{\circ}$ C

- ② 電圧4.5V/cm, スイッチングタイム3-60秒, 泳動時間24時間, 泳動温度14 $^{\circ}$ C
- ③ 電圧6V/cm, スイッチングタイム30-90秒, 泳動時間23時間, 泳動温度10 $^{\circ}$ C
- ④ 電圧6V/cm, スイッチングタイム4-8秒, 12時間, 8-50秒, 10時間, 泳動温度10 $^{\circ}$ C

泳動後、エチジウムブロマイド染色を行い、紫外線下で観察した。

C. 研究結果

1) 各事例由来株の *Sma*I 及び *Sfi*I による切断パターン

福岡県事例由来9株中、患者、食品及び製造業者由来7株(TB3264)の泳動パターンは同一であったが、同じTB3264でも製造業者由来1株は異なったパターンを示す株であった。また、同時に分離されたT1株もTB3264とは異なった泳動パターンを示した。

高知県事例由来6株はいずれも同一パターンを示した。図2にこれらの結果の一部を示す。

茨城県事例の千葉県患者由来12株は *Sma*I によって11本のバンドが得られた。このバンドは一見するとほとんど同一のパターンに見えるが、242.5kb付近の移動度にやや差が認められた(図3)。これらの株の *Sfi*I による切断パターンは明らかに2種類に分類された。図には示さないが茨城県分離株でも2種類が確認された。

図3に記したように2種類に分類された株を仮にC1型、C2型に型別した場合、高知県事例由来T22株は、C2型と同一の泳動パターンを示す株と考えられた。

このようにA群レンサ球菌のPFGEには少なくとも2種類の制限酵素を用いて比較することが有用と思われた。

2) 他の制限酵素による切断パターンの比較

今回使用した株の一部について *Aat*II, *Sal*

I, *Sac*II, *Bss*HII, *Xba*I, *Swa*I, *Xho*I, *Nur*I 及び *Nae*I を使用して切断パターンを比較した。*Sac*II, *Bss*HII などでは情報を得ることが可能と思われたが、通常は *Sma*I あるいは *Sfi*I を用いれば適切な情報を得られるものと考えられた。

3) ゲルプラグの調製法の違いによる PFGE パターンの比較

千葉衛研で過去に行っていた調製法と現在行っている調整法でサンプル DNA の調製を行い、PFGE パターンの比較を行った。その結果を図4に示すが、双方に違いは認められず、DNA 調製法の違いによる泳動パターンへの影響はほとんどないものと考えられた。

4) 泳動条件の違いによる PFGE パターンの比較

*Sma*I 及び *Sfi*I 消化後の DNA を、異なる泳動条件で泳動した場合の PFGE のパターンを比較した。図5はバンドの本数が多い *Sma*I による切断パターンの比較を示す。千葉県分離株を①6 V/cm, パルスタイム1~40秒, 泳動時間20時間, 泳動温度10°Cと②4.5V/cm, パルスタイム3~60秒, 泳動時間24時間, 泳動温度14°Cで泳動を行ったところ、ともに11本のDNAのバンドが得られたが①の方がDNAのバンドの間がやや広くなる傾向が認められ、194kb付近のバンドの分離度がやや優れていた。一方③の条件では分子量が小さい部分のバンドが近接しすぎ、また、④の0157で使用される条件でもバンドの比較は可能であったが、大きな分子量の方でバンドが近接する傾向が認められた。

D. 考察

多彩な病状を示し、その感染形態も多様である A 群レンサ球菌の PFGE 解析を行う

場合、当然ながら様々な由来、血清型について解析していく必要があり、本研究でも多くの菌株について解析することが望ましいものと思われる。しかしながら、今回の研究では他の研究者が分担する菌種が食水系感染症起因菌を主としているので、A群レンサ球菌のPFGE解析も、食中毒様の発症形態をとった事例由来の株を対象を絞って、PFGE法による解析条件の標準化の基礎的条件と分子疫学的解析の有用性を検討した。

A群レンサ球菌のPFGE解析で使用される制限酵素は *Sma*I が多く用いられ、解析が行われている (J. Infect. Dis., 992-1000, 1997; J. Infect. Dis., 723-726, 1997; 感染症誌, 283-286, 1996)。今回の供試株も *Sma*I を用いることにより明瞭なバンドを得ることができた。さらに *Sfi*I を併用することにより、より正確な解析が可能となった。特に図3の *Sma*I による解析の場合のように、バンドの違いが小さな菌株の場合に *Sfi*I による解析が重要であった。

*Sma*I, *Sfi*I 以外の制限酵素はあまり有用とは思われなかった。

このことから、A群レンサ球菌のPFGEには *Sma*I と *Sfi*I の2種類の制限酵素を用いて比較することが望ましいものと思われた。

次にPFGEの標準化を考える場合、試料用DNAの調製法が問題となるものと思われる。出血性大腸菌0157は国立感染症研究所における技術研修で、DNA調製はかなり統一されたものと思われるが、それでも様々な方法が行われているのが現状である(平成10年度厚生科学特別事業研究報告書、地方衛生研究所と国立試験研究との機能分担・機能連携のあり方に関する研究, 56-58, 1999)。そこで2つの調製法により試料DNAを準備し、同一の泳動条件で泳動を行い、泳動パターンの比較を行った。その結果、泳動パターンは同一であり、試料調製法による影響はあまり考慮する必要がないものと考えられ

た。ただ、今回は同一施設で試料を調製しているため、厳密な比較とはいえないかも知れない。しかし、先述の地方衛生研究所と国立試験研究との機能分担・機能連携のあり方に関する研究に記された0157の結果をみても、通常の方法と変わった方法を導入した施設の技術的な習熟度等の問題を除けば、試料調製方法による差は泳動像にあまり影響を及ぼさないものと思われる。

最後に泳動条件を変えた場合のPFGEパターンについて検討した。当所で実施している条件以外に3つの条件で泳動を行った(*Infect. Immun.* 994-1003, 1995; *感染症誌*, 283-286, 1996)。その結果、泳動条件を変えてもほとんどの場合泳動パターンの比較は可能と考えられたが、泳動条件によってはパターンの比較にやや支障を来すと思われた。パルスネット等で泳動パターンを比較するには、泳動条件の標準化を考慮する必要がある。

今後、A群レンサ球菌のPFGEによる解析をさらに発展させるためには、より多くの血清型についての基礎資料の集積が望まれる。

E. 結論

食中毒様の発症形態をとったA群レンサ球菌感染症由来株についてPFGEの基礎的条件を検討した。その結果、供試39株は、制限酵素 *Sma* I と *Sfi* I を使用した場合に良好なPFGEの泳動パターンを得ることができた。しかしながら、1つの制限酵素では軽微な差しか認められない事例があったことから、*Sma* I と *Sfi* I の2種類の制限酵素を組み合わせることで解析することが望ましいものと考えられた。

試料DNAの調製法を変えてPFGEを実施し、

PFGEパターンの比較を行ったところ、同一の泳動パターンを得ることが可能であった。

泳動条件を変えた場合も泳動パターンの比較は可能であったが、泳動条件が極端に異なる場合はパターンの比較はやや困難と思われ、パルスネット等で泳動パターンを比較するためには泳動条件の標準化が必要と考えられた。

謝辞 菌株を分与して頂いた茨城県衛生研究所、福岡市環境保健研究所ならびに高知県衛生研究所の方々に深謝致します。

F. 研究発表

1 学会発表

小岩井健司：千葉県でも患者がみられた食中毒様A群レンサ球菌感染症について、第37回千葉県公衆衛生学会，1999

<p>【旧調製法】</p> <p>4 mlのTodd Hewitt Brothに菌を接種し, 37°Cで16-20hr培養</p> <p>▶</p> <p>160~180 μlを遠心分離(10,000rpm, 5分), 上清除去後, 200 μlのPettIV溶液で1回洗浄, 100 μlのPettIV溶液を加え, 懸濁</p> <p>▶</p> <p>100 μlの1.6%Low melt agarを加え, プラグモールドに100 μlずつ分注(ゲル2個作成)</p> <p>▶</p> <p>室温で10分, 4°Cで30分放置しアガロースを固化</p> <p>▶</p> <p>ゲル2個を40 μlのLyso-staphin/Lysozymeを加えた1 mlのEC Lysis入れ, 37°Cで一夜穏やかに振とう</p> <p>▶</p> <p>反応液を1 mlのESP溶液に変え, 50°Cで2日間穏やかに振とう</p> <p>▶</p> <p>反応液を1 mlのTE Bufferと10 μlの100mM PMSFに変え, 室温で1時間静かに振とう</p> <p>▶</p> <p>1 mlのTE Bufferで洗浄(室温で1時間, 3回)</p> <p>▶</p> <p>ゲルを1/3に切断し, TE, 100 μl中で30分放置後, 制限酵素処理(30 U/sample), 4時間以上</p> <p>▶</p> <p>電気泳動(ゲル濃度 1%, 0.5 × TBE)</p>	<p>【現在の調製法】</p> <p>3 mlのTodd Hewitt Brothに菌を接種し, 37°Cで16-20hr培養</p> <p>▶</p> <p>160~180 μlを遠心分離(10,000rpm, 5分), 上清除去後, 100 μlのSE bufferと8 μlのLyso-staphin/Lysozymeを加える</p> <p>▶</p> <p>100 μlの1%Low melt agarを加え, プラグモールドに100 μlずつ分注(ゲル2個作成)</p> <p>▶</p> <p>室温で10分, 4°Cで30分放置しアガロースを固化</p> <p>▶</p> <p>ゲル2個を40 μlのLyso-staphin/Lysozymeを加えた1 mlのLysis Bufferに入れ, 37°Cで1~2hr穏やかに振とう</p> <p>▶</p> <p>反応液を1 mlのProteinase K Bufferと40 μlのProteinase K溶液に変え, 50°Cで16hr-20hr穏やかに振とう</p> <p>▶</p> <p>反応液を1 mlのIE bufferと10 μlの100mM PMSFに変え, 室温で30分間静かに振とう</p> <p>▶</p> <p>1 mlのIE bufferで洗浄(室温で30分間, 3回)</p> <p>▶</p> <p>ゲルを1/2に切断し, TE, 200 μl中で30分放置後, 制限酵素処理(30 U/sample), 4時間以上</p> <p>▶</p> <p>電気泳動(ゲル濃度 1%, 0.5 × TBE)</p>
<p>【試薬】</p> <p>PettIV溶液: 10mM Tris-HCl (pH7.6), 1 M NaCl</p> <p>EC Lysis: 1 M NaCl, 100mM EDTA, 6mM Tris-HCl (pH7.6), 0.2% Deoxycholate, 0.5% N-Lauroyl sarcosine, 0.5% Brij58</p> <p>Lyso-staphin/Lysozyme 2 mg/ml・25mg/ml</p> <p>ESP溶液 0.5M EDTA (pH9.0~9.5), 1% N-Lauroyl sarcosine, 0.1% Proteinase K</p> <p>PMSF・Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</p>	<p>【試薬】</p> <p>SE Buffer: 25mM EDTA (pH7.4), 75mM NaCl</p> <p>Lysis Buffer: 1 M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.2% Deoxycholate, 0.5% N-Lauroyl sarcosine, 0.5% Brij58</p> <p>Lyso-staphin/Lysozyme: 2 mg/ml・25mg/ml</p> <p>Proteinase K Buffer: 0.25M EDTA (pH8.0), 1% N-Lauroyl sarcosine</p> <p>Proteinase K: 25mg/ml</p>

図1 A群レンサ球菌用試料DNAの調製法

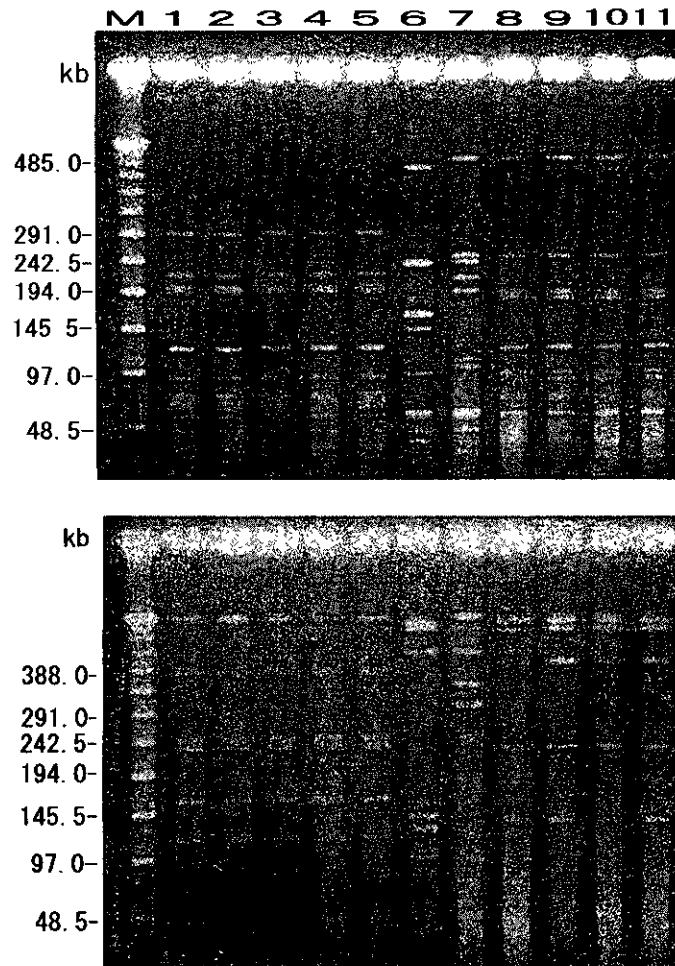


図2 福岡県(TB3264)及び高知県(T22)分離株の Sma I (上段) 及び Sfi I (下段) による PFGE パターン

- | | | |
|--------------|-----------------|-------------|
| M : λ Ladder | 5 : 福岡県製造業者 | 10 : 高知県従業員 |
| 1 : 福岡県患者 | 6 : 福岡県製造業者 | 11 : 高知県従業員 |
| 2 : 福岡県患者 | 7 : 福岡県製造業者(T1) | |
| 3 : 福岡県食品 | 8 : 高知県患者 | |
| 4 : 福岡県食品 | 9 : 高知県患者 | |