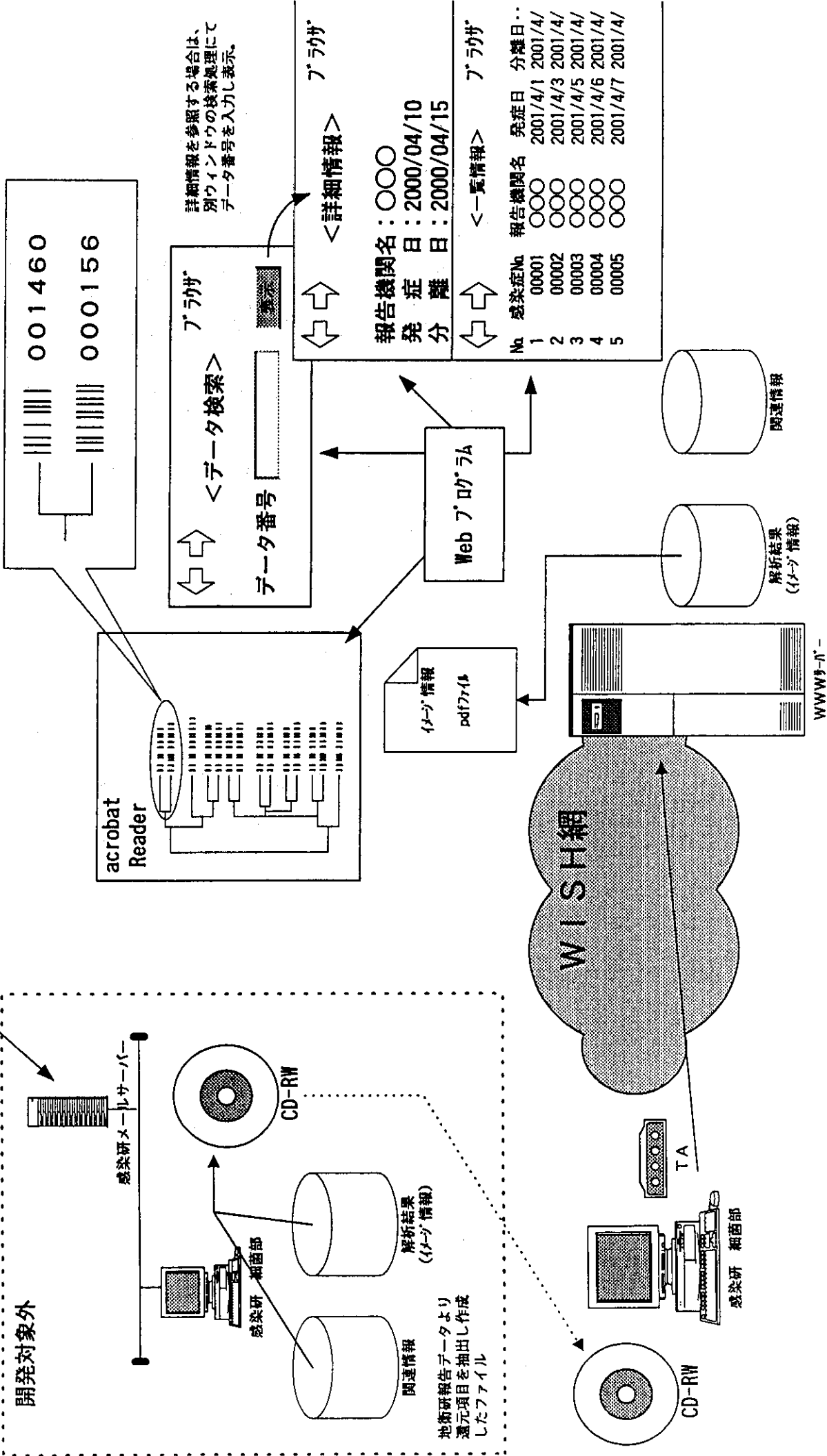


パルスネット還元処理システム業務の流れ

AcrobatReaderの文字列検索、拡大を駆使してデータ関連を確認する。

各地方衛生研究所よりデータ送付



Acrobat Reader

001460

000156

詳細情報を参照する場合は、別ウィンドウの検索処理にてデータ番号を入力し表示。

Webブラウザ

データ検索

データ番号

Webブラウザ

報告機関名: 〇〇〇

発症日: 2000/04/10

分離日: 2000/04/15

報告機関名

No	感染症No	報告機関名	発症日	分離日
1	00001	〇〇〇	2001/4/1	2001/4/1
2	00002	〇〇〇	2001/4/3	2001/4/3
3	00003	〇〇〇	2001/4/5	2001/4/5
4	00004	〇〇〇	2001/4/6	2001/4/6
5	00005	〇〇〇	2001/4/7	2001/4/7

イメージ情報 pdfファイル

WISH網

WWWサーバー

CD-RW

TA

感染研 細菌部

開発対象外

感染研メールサーバー

感染研 細菌部

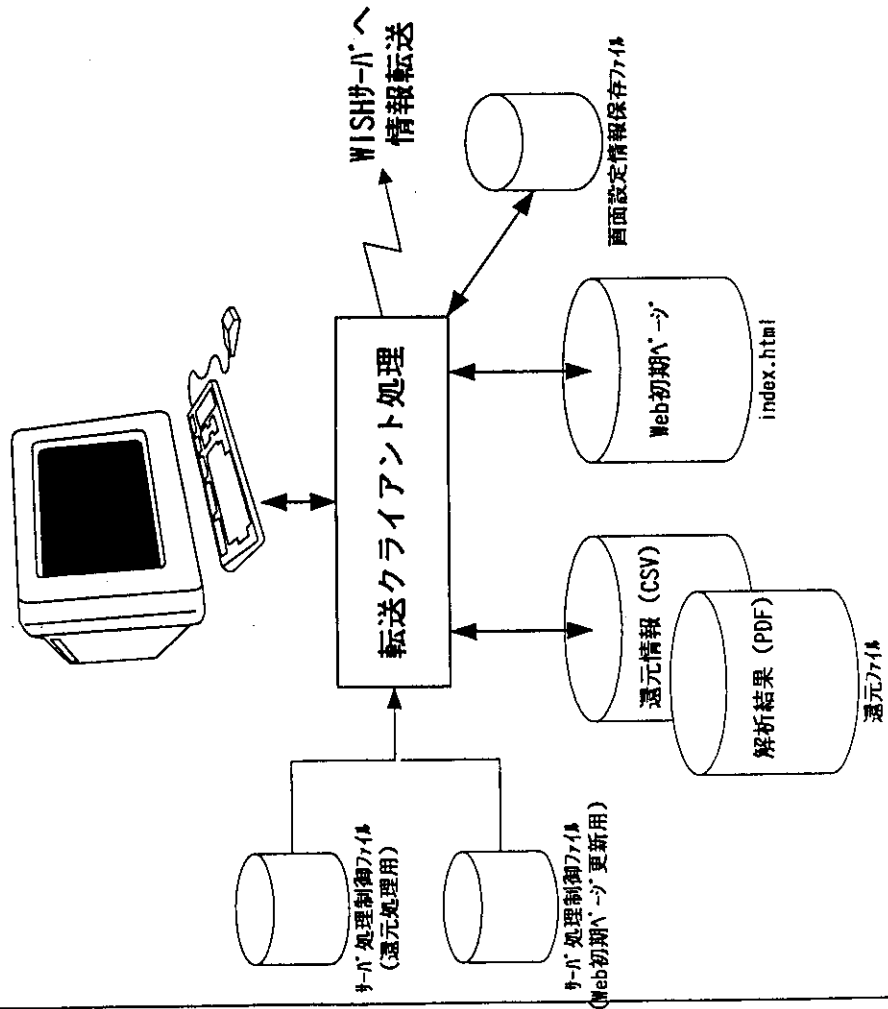
関連情報

解析結果 (イメージ情報)

CD-RW

地研報告データより還元項目を抽出し作成したファイル

モジュール構成図



処理概要

当処理プログラムの機能としては

1. 感染症研細菌部にて地衛研より収集したデータをWISH Webサーバへ転送し、還元データを更新する。
2. Web初期画面 (index.html) 内の「感染症研からのお知らせ」の内容を更新し、サーバ側のHTMLファイルを更新する。

である。

□各機能において、WISH Webサーバへ転送するファイルの組み合わせは、

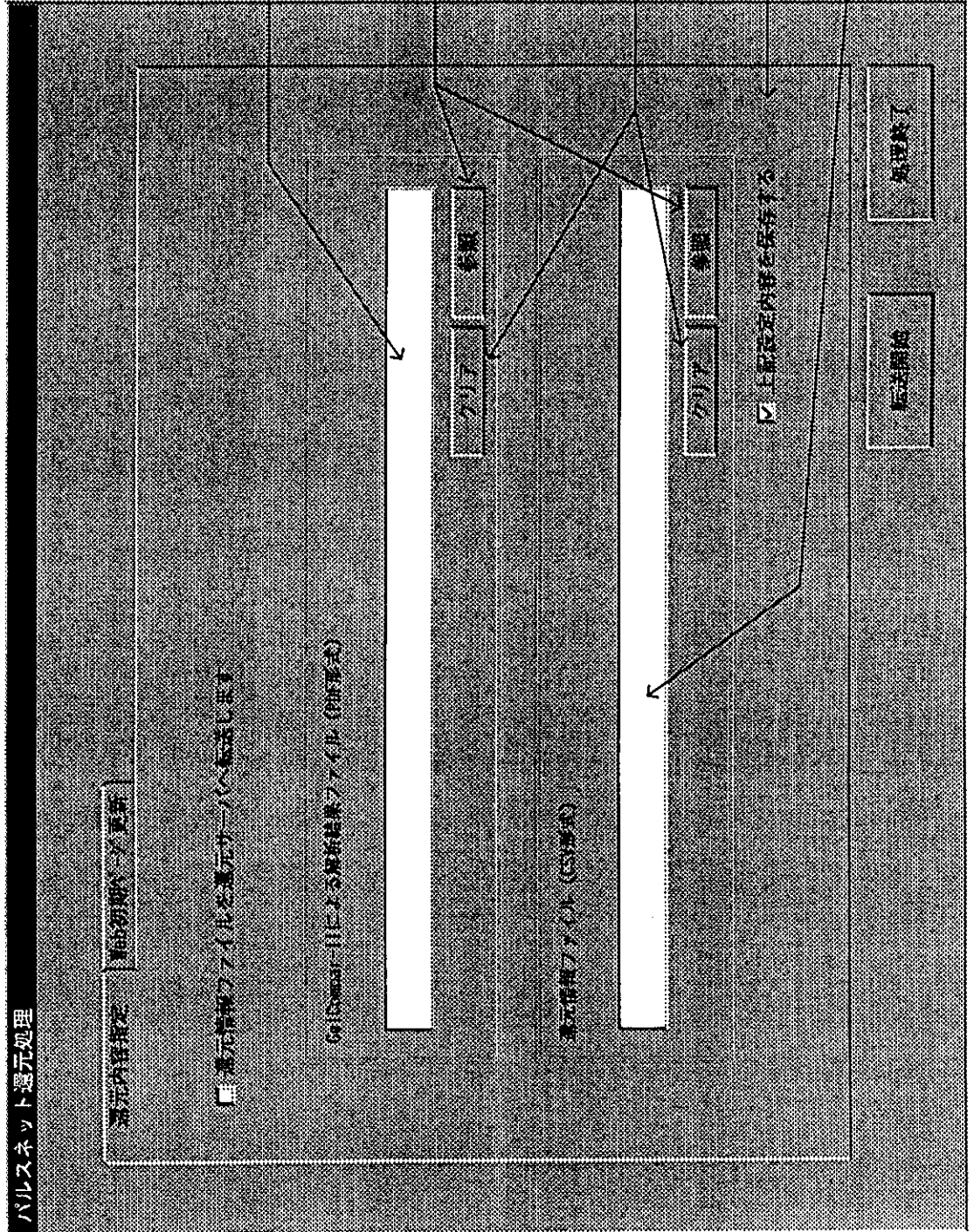
- 還元データ更新： 還元データ1 (PDFファイル)
還元データ2 (CSVファイル)
還元処理用サーバ制御ファイル

- Web画面更新： Web初期ページ (Index.html)
ページ更新用サーバ制御ファイル

となる。

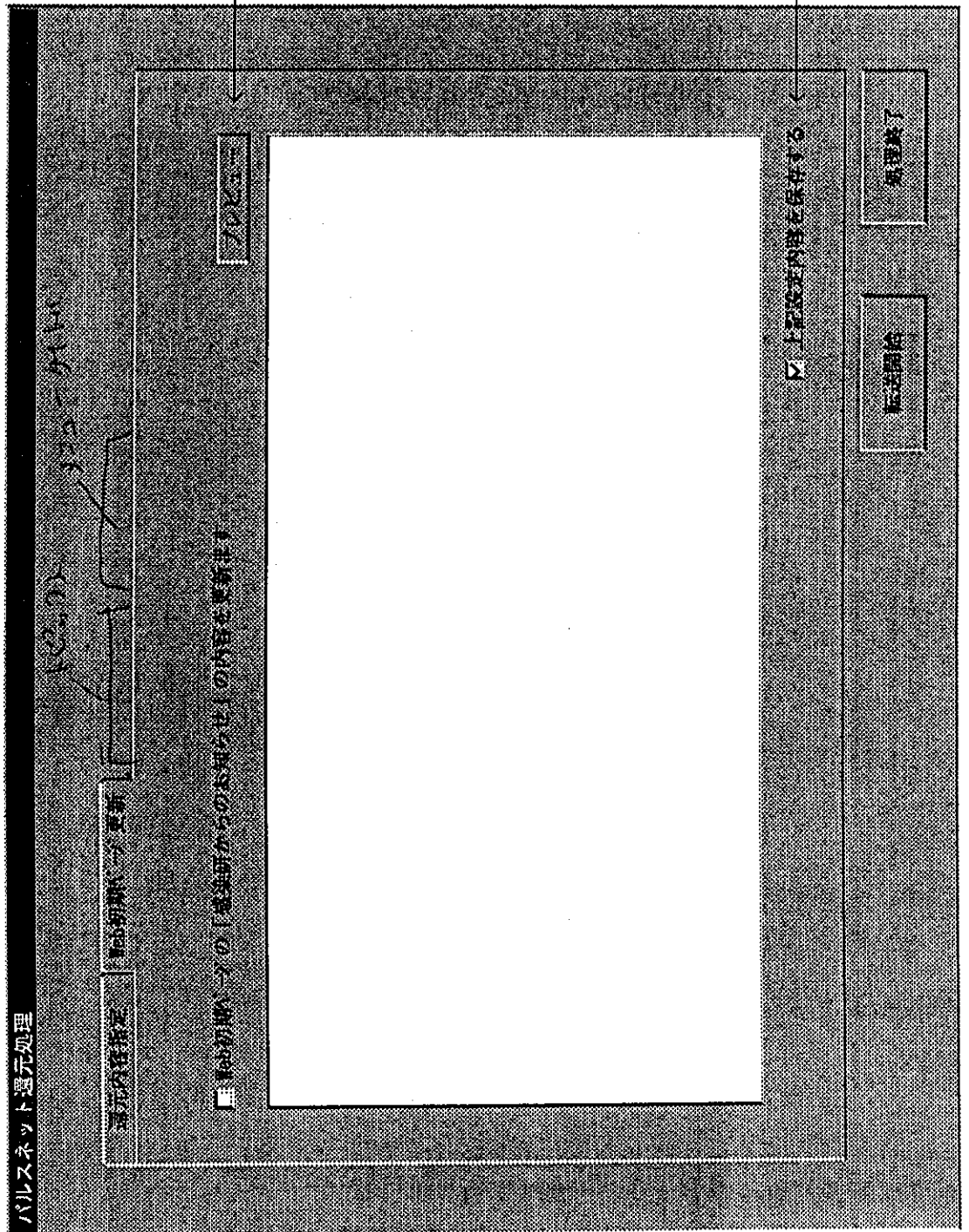
パルスネット還元 クライアント処理

別紙 --5



パルスネット還元 クライアント処理

別紙 --6

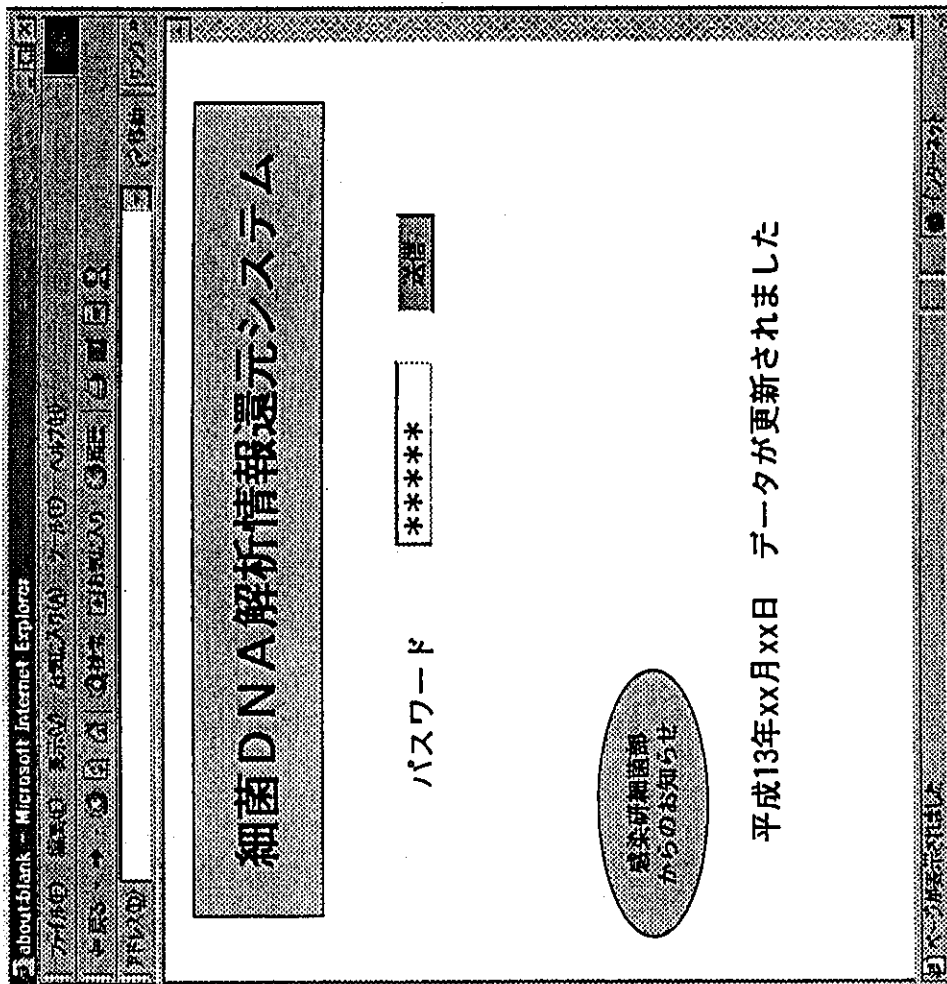


テキスト枠内の入力
結果をindex.htmlに
埋め込んだ後、html
をブラウザにて表示

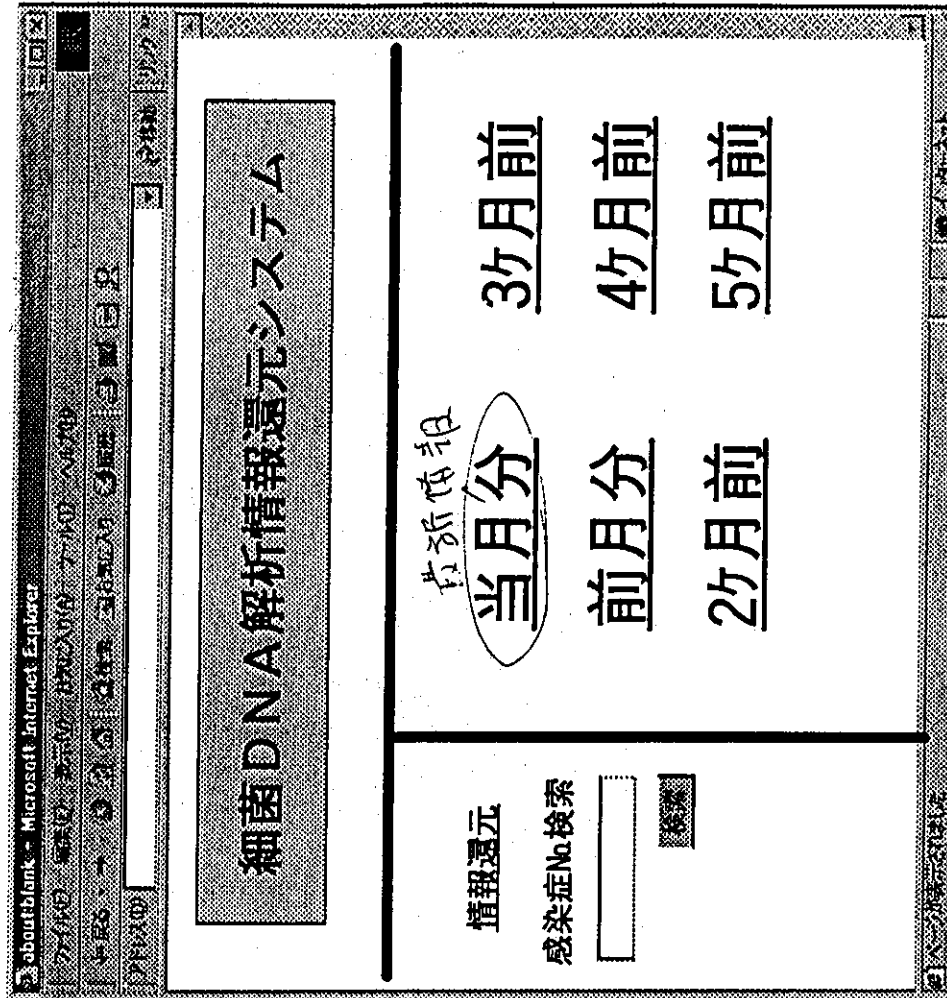
画面設定情報保存
ファイルに書き込む

細菌DNA解析情報還元システム Web画面推移

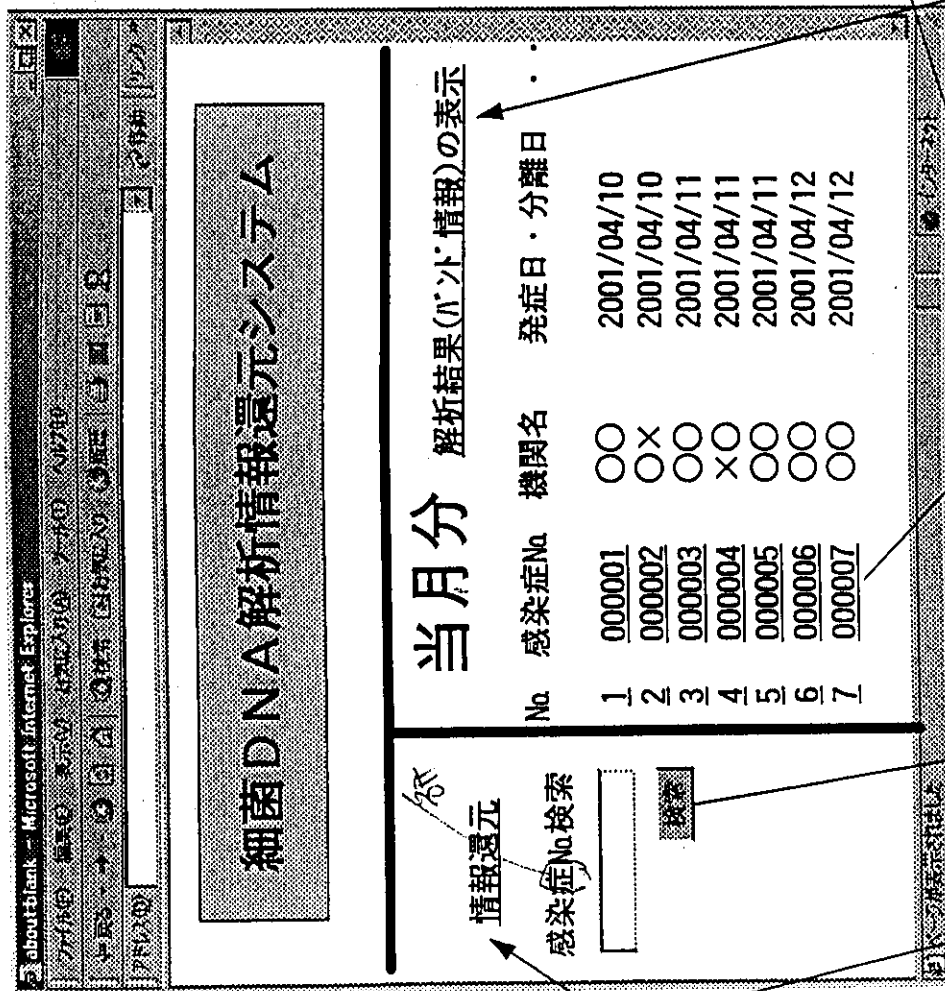
①利用者認証画面



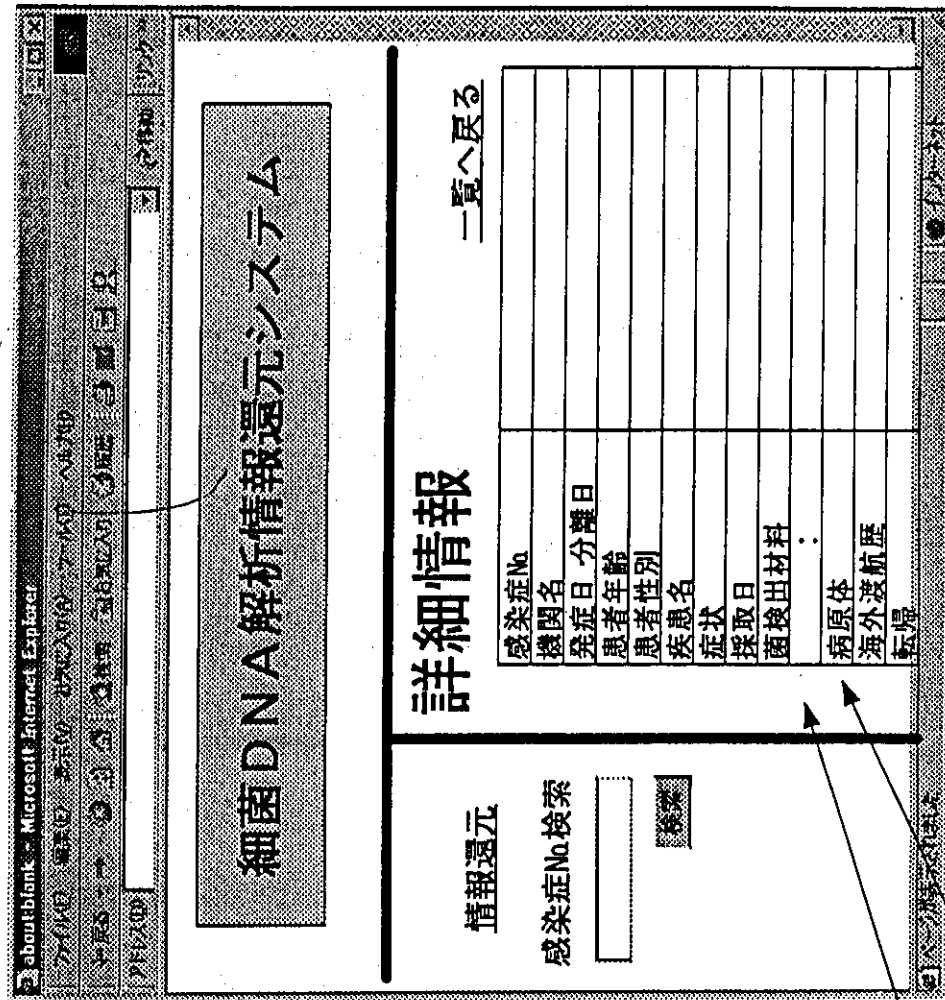
②初期メニュー画面



③一覽表示画面



④詳細情報表示画面



別ウィンドウにてPDF
ファイル(解析結果)を
表示

クリックにより表示

検索により表示

画面②へ

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

パルスフィールド電気泳動法（Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE）標準化及び
画像診断を基礎とした分散型システムの有効性に関する研究

分担研究者 矢野昭起 北海道立衛生研究所
研究協力者 齋藤紀行 宮城県保健環境センター

研究要旨：パルスフィールド電気泳動（PFGE）を用いた菌の型別のための全国的なネットワーク（パルスネット）の構築に向けて、北海道・東北地方における腸管出血性大腸菌 O157 菌の PFGE を用いた DNA 解析を各地方衛生研究所で実施した。その結果、家族内感染等の関連した事例から得られた複数の菌株の PFGE パターンはほとんど一致していた。また、関連性のない事例に由来する菌株の PFGE パターンはそのほとんどが独立した PFGE パターンを示した。このことから、PFGEにより菌の詳細な型別が可能であることが示された。

A. 目的

集団発生時における迅速な原因究明や同一クローンによる広域集団発生（diffuse outbreak）の早期の探知、あるいは分子疫学データの蓄積等のためには全国的なパルスネットの構築が不可欠である。このネットワークの構築にあたり、パルスフィールド電気泳動（PFGE）の分解能（菌株の異同を区別する能力）を検証する必要がある。今回は、北海道・東北地方に於ける腸管出血性大腸菌 O157 感染症の実態把握と本症例に対する PFGE の応用例を収集し、さらに、同地区での O157 菌の分布状況を把握することを目的とした。また、これらの成績はパルスネットの構築に向けた基礎資料として利用することが出来る。

B. 研究方法

当該県で発生した腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 菌の感染事例について、PFGE を用いた DNA 解析を実施した。サンプル調整方法については、各衛生研究所の方法で実施し、泳動条件については国立感染症研究所の条件に準じて実施した。すなわち、電圧は 6V/cm、パルスタイムは 4-8 秒 9 時間、8-50 秒 13 時間、アングルは 120°、泳動バッファーは 0.5 x トリスホウ酸緩衝液（TBE）、バッファー温度 14℃の条件で泳動した。

C. 結果

北海道立衛生研究所では家族内感染が疑

われる例、患者由来株と同患者宅の拭き取り由来株について PFGE のバンドパターンを比較したところ、それぞれの関連事例に由来した株ではそのパターンが一致した。札幌市衛生研究所では、健康保菌者とその保菌者が喫食した鹿肉の刺身から分離された O157 菌について PFGE による DNA 解析と実施したところ、同じパターンを示し、その鹿肉が原因食品であると断定した。秋田県衛生科学研究所においては、各事例の菌株について PFGE 解析を実施したところ、6、7 及び 9 月の 5 事例から得られた菌株の DNA パターンが一致し、この株が秋田県内に侵淫していたことを示唆した。岩手県衛生研究所における PFGE 解析では、同一事例から得られた菌株は同一のパターンを示し、異なる事例及び散発事例間では同じパターンを示すものはなかった。福島県衛生公害研究所では、PFGE のサンプル処理の際に制限酵素量を上げることにより鮮明な泳動像を得ることが出来ることを示し、さらにこの方法を各事例に応用し、関連事例由来株以外は異なるバンドパターンを示すことを明らかにした。宮城県保健環境センターは、PFGE による DNA 解析とベロ毒素遺伝子（*stx*）の保有パターンを統合することにより、より感度よく diffuse outbreak を見いだすことが可能であることを示した。山形県衛生研究所では、分離菌株の PFGE パターン分析と同時に病原因子のうち *eaeA* と *astA* の解析を行った。PFGE による DNA 解析により散発事例 23 株が 16 種類に分類

され、本法の分解能の高さが示された。また、PFGE でスメアになるタイプの菌株については、*astA* を保有しており、この因子を解析することにより菌株の特徴付けがなされた。

D. 考察

パルスネットの構築にあたり、北海道・東北地方における EHEC O157 の感染状況並びに PFGE を用いた DNA 解析により菌株の分布状況を調べた。各地方衛生研究所で分離された菌株を PFGE を用いて解析したところ、関連事例由来株はほぼ同一のバンドパターンを示し、それ以外の散発事例については、異なったパターンを示すものが多かった。このことから、PFGE が高い分解能をもち、そのパターンから菌の異同を判断することが妥当であることが示された。また、一部のデータから、解析する要因をさらに増やすことによりその精度が向上することが示唆された。このように、感染源の究明や菌の分子疫学的データの集積には PFGE は有効な方法であることが示された。このことから、本法を用いた diffuse outbreak の早期検出や、蔓延防止のために、本法を基礎とした全国的なネットワークの早急な構築が望まれる。

E. 結論

北海道・東北地方の各地方衛生研究所における PFGE の DNA 解析により、本法が株間の多様性をよく反映していることが示された。このことから、地方レベルでの即時的 DNA 解析と同時に、各事例について全国レベルでの比較検討が可能であるネットワーク作りが必須であると思われる。

F. 研究発表

1. 学会発表

STEC 感染事例での PCR-RFLP 法による Stx2 のタイピング(2000)、日本細菌学会 東北支部・北海道支部合同学術集会。

2. 札幌市衛生研究所報

G. 協力研究者

1. 北海道立衛生研究所：長野 秀樹（研究職員）、森本 洋（研究職員）、熊田 洋行（医療検査専門員）。

2. 札幌市衛生研究所：川合 常明、広地 敬、

坂本 裕美子。

3. 秋田県衛生科学研究所：齊藤 志保子（副主幹）、八柳 潤（専門研究員）、伊藤 功（副主幹）

4. 岩手県衛生研究所：熊谷 学（上席専門研究員）、齋藤 幸一（上席専門研究員）

5. 福島県衛生公害研究所：力田 正二（専門薬剤技師兼細菌科長）、広瀬 昌子（主任医療技師）、須釜 久美子（主任医療技師）

6. 宮城県保健環境センター：白石 廣行（副所長兼微生物部長）、齋藤 紀行（上席主任研究員）、畠山 敬（副主任研究員）、山口 友美（技師）、佐々木美江（技師）、野池 道子（技師）

7. 山形県衛生研究所：大谷 勝実（研究企画専門員）、土屋 裕美子（研究員）、須藤 正英（専門研究員）、村山 尚子（研究主幹兼微生物部長）

パルスフィールドゲル電気泳動法の標準化および画像診断を基礎とした
分散型システムの有効性に関する研究

矢野 昭起 北海道立衛生研究所

研究要旨：北海道における平成12年の腸管出血性大腸菌感染症の事例数は101例（札幌市、旭川市、小樽市、函館市を含む）であり、その内O157菌感染事例は58例（患者38例、無症状保菌者20例）であった。このO157菌感染事例のなかで当所が菌株を入手することが出来た36菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いたDNA解析を実施した。その結果、家族内感染が疑われる事例、患者とその自宅の拭き取り検査から得られた菌株、あるいは聞き取り調査からその関連性が強く疑われる事例については、そのバンドパターンは一致した。このことから、疫学調査とPFGEを用いたDNA解析の結果がよく相関し、PFGEの有用性が示された。

A. 目的

集団感染事例が発生した場合、その原因究明、あるいは感染ルートの探索には、従来分離菌株の生化学的性状、血清型別、薬剤感受性パターンの分析など、表現型を解析する方法が主流であった。しかしながら、近年、分子生物学的手法を取り入れた方法が発達し、表現型的手法に取って代わりつつある。そのなかで、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いたDNA解析は、高価な機器を必要とするものの、その手技の容易さと再現性の高さから、分子疫学的方法として最も広く用いられている。今回は、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157菌株に関するパルスネットの構築に向けて、北海道で平成12年に分離された本菌株のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）バンドパターンを解析し、データベースを作成するための基礎資料として供することを目的とした。

B. 研究方法

平成12年に北海道で分離されたEHEC O157菌株36株についてPFGEによるDNA解析を実施した。PFGEのためのサンプル処理については、終濃度で0.6%アガロースブロックに包埋した細菌をリゾチーム、プロテイナーゼK処理後、ペファブロックSCで本酵素をブロックした後、50単位のXbaI（ロッシュ・ベーリンガー社製）で消化した。1%PFCアガロース（Bio-Rad社）で、

14℃、6 V/cm、アングル120°、パルスタイム4-8秒9時間、8-50秒13時間の条件で、CHEFF-DRIII（Bio-Rad社）を用いて泳動した。

C. 結果

1. EHEC感染者数

北海道における平成12年のEHEC感染者数を表1に示した。札幌市、旭川市、小樽市、函館市を含めて101名の感染例があった。また、その約半数（58名）がO157菌による感染であった。その内訳は患者38名、無症状保菌者20名であった。次に多かったのがO26菌感染者で、31名（患者19名、無症状保菌者12名）であった。O111は9名から分離され、O91も1名から分離された。

2. PFGEによるDNA解析

今回DNA解析に供したEHEC O157菌株36株についての疫学情報を表2に示した。そのなかで非運動性の株は3株のみで他の菌株のH抗原はすべて7であった。また、VT2単独産生株が8株で他の株は全てVT1&2産生株であった。これらの株についてのXbaI消化によるPFGEのバンドパターンを図1に示した。図には示されていないが、7株（19.4%）に関しては泳動像がスミア状態になる、いわゆるdegradation型の株であり、解析不可能であった。

3. 事例A

事例Aについては、札幌市内で発生した

家族内感染事例であり、当初、民間の臨床検査センターから、当該菌のベロ毒素産生性に関する試験依頼が疫学部細菌科にあり、当該科においてベロ毒素の産生性が PCR と RPLA で確認された。これら 3 株の PFGE バンドパターンは完全に一致した。

4. 事例 B

本事例に関する詳細な疫学データは不明であり、患者の菌検査も民間の検査センターでなされたものである。後日、菌株が当所に搬入され、PFGE を実施したところ、そのバンドパターンは一致した。この株については、分離された時期のギャップはあるものの、同地域内での発生でもあることから、この事例について何らかの関連性が示唆された。

5. 事例 C

本事例は、同一人物から、経時的に分離された菌株についての PFGE のパターンを比較したものである。図に示したとおりそのバンドパターンは一致した。

6. 事例 D 及び事例 E

本事例は、美幌町で発生した家族内感染事例（姉妹）である。事例 D と E は同一家族内で、レーン 10 とレーン 13、レーン 11 とレーン 14 はそれぞれ同一人物であるが、事例 D と E はそれぞれ民間の検査センターと当該保健所に保存されていた株であり、それぞれ別の時期に PFGE を実施したものである。図に示したとおり、そのバンドパターンは 4 レーンとも一致した。

7. 事例 F

本事例は旭川市内で発生した散発事例であるが、患者由来株と患者宅のトイレの拭き取り由来株について比較したものである。図に示すように、そのバンドパターンは一致した。

8. 事例 G

本事例は旭川市内で発生した事例で、レーン 21 は患者由来で、レーン 27 はその接触者調査で患者と同じ保育園の園児から分離された株であり、この幼児については症状が確認されていない。この 2 株の PFGE バンドパターンは一致した。

9. 事例 H

本事例は北見市で発生した家族内感染事

例で、この 2 株の PFGE バンドパターンは一致した。

10. 事例 I

本事例は旭川市で発生した家族内感染事例である。1 名（レーン 28）が患者で、他の 2 名は無症状であった。これらの PFGE バンドパターンは一致した。

11. 事例 J

本事例は富良野市で発生した事例で、これら 3 名からの分離株の PFGE バンドパターンは一致した。また、疫学調査から、この 3 名は同じミニバスケットクラブに所属し、同じ飲食店で喫食した事実が確認されている。しかし、その近隣で下痢症状を示した患者は探知されなかった。

D. 考察

平成 12 年の北海道における EHEC の感じ例数は例年どおりであり、O157 菌による感染事例数についても例年と大差なく、大きな増減は認められなかった。このことは、EHEC に対する関心がまだ高く、菌の検索が高いレベルに保たれていることを物語っている。

今回は、平成 12 年に当所で入手できた O157 菌について *Xba*I による PFGE パターン分析を試みた。図には示していないが、3 歳の幼児が溶血性尿毒症症候群（HUS）を発症し、長期入院を強いられたという感染事例があった。この例では、患者由来株と患者宅の拭き取りサンプル由来株が得られたが、そのどちらもがサンプル処理の途中で DNA が損壊され、その結果 PFGE 像がスメアになるという、いわゆる degradation 型であり、解析不能であった。また、7 月から 8 月にかけて、滝川市で発生した事例と、8 月に北見市で発生した事例についても同様な degradation であった。これらは株数にすると 7 株で全体の 19.4% に相当するものであった。このように PFGE によって解析する場合、同様な degradation 型を呈する株の存在が知られており、今後これらの菌株に対処する必要があると思われる。

今回 PFGE 解析に供し、バンドパターンが得られた菌株について、そのパターンを比較したところ、散発事例については、独自のパターンを示し、関連した事例に由来

する菌株についてはそれらが同一クローンであることが示された。

E. 結論

EHEC感染事例の分子疫学調査において、家族内感染、あるいは患者由来株と推定感染源由来株、または環境由来株のクローナリティを調べるとき、PFGE の有用性が強く示唆された。また、近年広域にわたるいわゆる diffuse outbreak が示唆されるケースがあることから、日本全域にわたるパルスネットの構築を急ぐ必要があると思われる。

F. 研究発表

なし

G. 研究協力者

長野秀樹（研究職員）、森本洋（研究職員）、熊田洋行（医療検査専門員）

表1 平成12年における腸管出血性大腸菌感染者の状況

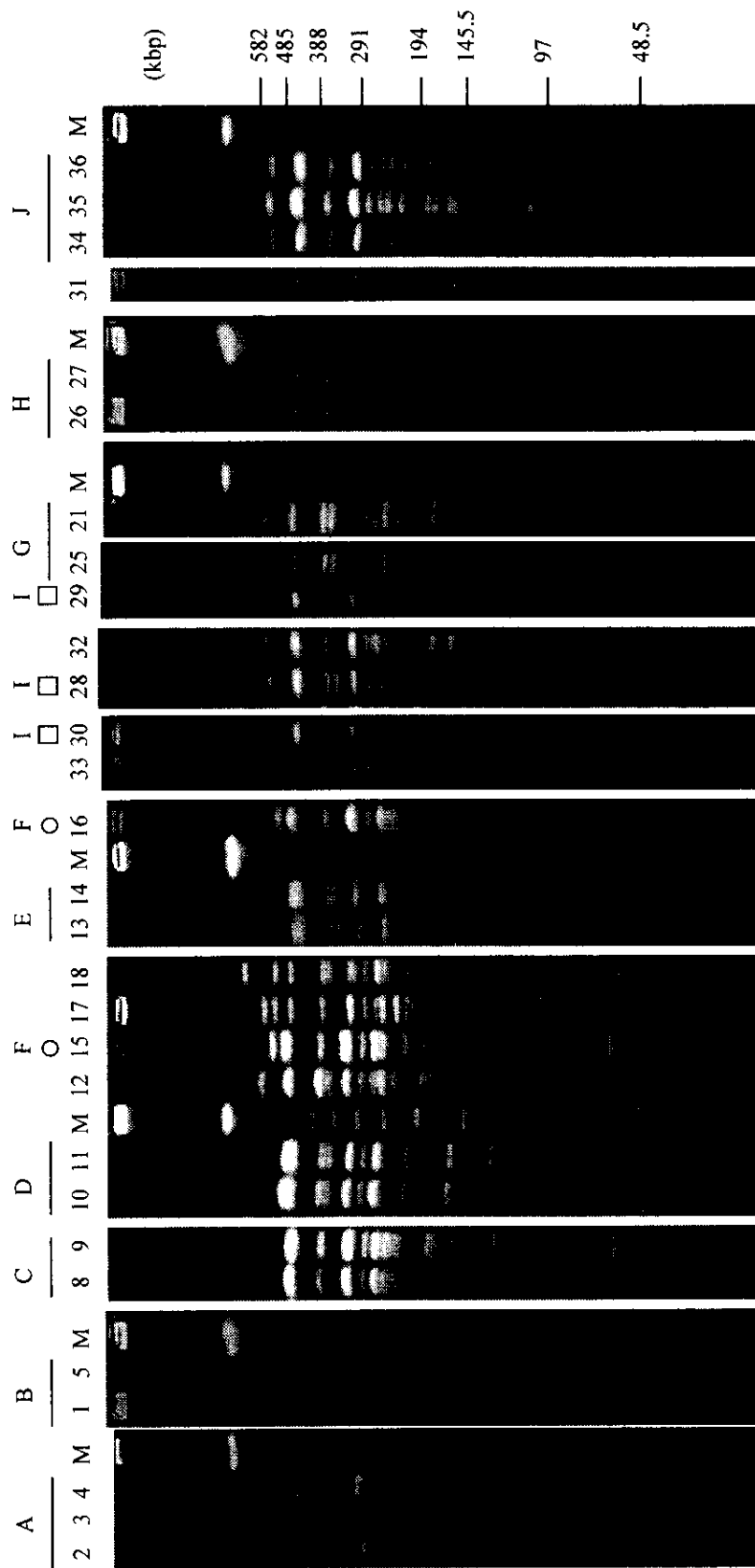
	血清群					合計
	0157	0111	026	091	判別不能	
患者	38	7	19	-	-	64
無症状保菌者	20	2	12	1	2	37
計	58	9	31	1	2	101

表2 平成12年北海道で分離されたEHEC O157菌株

事例	菌株No.	菌検出日	所在地	年齢	性別	O抗原	H抗原	毒素型	区分	症状	メモ
B	1	2000.1.11	石狩市	24	男	157	7	1&2	患者		
A	2	2000.2.8	札幌市	3	女	157	7	1&2	患者		家族内
A	3	2000.2.9	札幌市	1	男	157	7	1&2	患者		家族内
A	4	2000.2.9	札幌市	31	女	157	7	1&2	患者		家族内
B	5	2000.3.2	石狩市	72	男	157	7	1&2	患者		
	6	2000.4.17	浜頓別町	3	女	157	7	1&2	患者	HUS	散発
	7	2000.6.1	浜頓別町	拭き取り		157	7	1&2	No.7の自宅		Deg.
C	8	2000.5.1	音更町	10	男	157	NM	1&2	患者		
C	9	2000.5.9	音更町	10	男	157	NM	1&2	患者		
D	10	2000.6.12	美幌町	10	女	157	7	2	患者		
D	11	2000.6.14	美幌町	6	女	157	7	2	患者		
	12	2000.6.15	北見市	10	男	157	7	1&2	患者		
E	13	2000.6.18	美幌町	10	女	157	7	2	患者	腹痛、下痢	家族内
E	14	2000.6.18	美幌町	6	女	157	7	2	患者	腹痛、下痢	家族内
F	15	2000.6.23	旭川市	13	男	157	7	2	患者	腹痛、下痢、血便	散発
F	16	2000.6.24	旭川市	拭き取り		157	7	2	No.16の自宅		
	17	2000.7.4	小樽市	69	男	157	NM	2	患者		
	18	2000.7.10	札幌市	12	男	157	7	2	患者		
	19	2000.7.23	赤平市	8	女	157	7	1&2	患者	腹痛、発熱、下痢	散発
	20	2000.7.28	滝川市	9	女	157	7	1&2	患者	腹痛、発熱、血便	散発
G	21	2000.8.1	旭川市	1	男	157	7	1&2	患者	腹痛、下痢、血便	
	22	2000.8.2	北見市	1	男	157	7	1&2	患者	腹痛、血便、発熱	家族内
	23	2000.8.4	北見市	30	女	157	7	1&2	無症状		家族内
	24	2000.8.4	北見市	6	女	157	7	1&2	患者	腹痛、下痢	家族内
G	25	2000.8.8	旭川市	1	女	157	7	1&2	無症状		
H	26	2000.8.13	北見市	1	女	157	7	1&2	患者	腹痛、血便、発熱	家族内
H	27	2000.8.15	北見市	3	女	157	7	1&2	無症状		家族内
I	28	2000.8.16	旭川市	14	男	157	7	1&2	患者	腹痛、発熱、血便	家族内
I	29	2000.8.21	旭川市	45	女	157	7	1&2	無症状		
I	30	2000.8.22	旭川市	70	男	157	7	1&2	無症状		
	31	2000.8.26	真狩村	2	男	157	7	1&2	患者	嘔吐、血便	散発
	32	2000.9.11	恵庭市	31	男	157	7	1&2	患者	軟便	散発
	33	2000.9.22	旭川市	10	男	157	7	1&2	患者	腹痛、血便	散発
H	34	2000.11.22	富良野市	12	女	157	7	1&2	患者	腹痛、下痢	散発
H	35	2000.11.29	富良野市	12	女	157	7	1&2	無症状		散発
H	36	2000.12.1	富良野市	12	女	157	7	1&2	無症状		散発

Deg.: 泳動像がスメア状になり解析不能であった例。

図1 2000年に分離された腸管出血性大腸菌O157菌株のPFGEパターン



レーンNo.は表の菌株No.に対応している。また、Mは入ラダーを用いた分子量マーカーである。菌株No.の上に記してある棒線、丸、四角はそれぞれ家族内感染によるものかあるいはPFGEの結果から何らの関係が示唆された菌株である。

パルスフィールドゲル電気泳動法の標準化および画像診断を基礎とした 分散型システムの有効性に関する研究

札幌市衛生研究所 藤田 晃三

研究要旨：小樽市保健所で探知された腸管出血性大腸菌 O157 を保有する無症状保菌者が、札幌市内の飲食店において鹿肉の刺身を喫食していたことが判明した。同飲食店に冷凍保存されていた鹿肉からも O157 が検出され、*Xba*I 消化によるパルスフィールド電気泳動を実施したところ、鹿肉由来株および保菌者由来株のバンドパターンが一致した。本結果と聞き取り調査の結果を総合し、原因食材は同飲食店で提供された鹿肉であると断定した。

A. 目的

集団発生時における迅速な原因究明と、分子疫学データの蓄積のためには全国的なパルスネットの構築が不可欠である。このパルスネットの構築にあたり、パルスフィールド電気泳動 (PFGE) の菌株の異同を区別する能力を検定する必要がある。また、実際の感染事例においてその原因究明にどの程度 PFGE が役立つのかを知る必要がある。今回は、原因食品から分離された菌株と当該食品を喫食した事実のある保菌者由来株との DNA レベルでの異同を PFGE を用いて検討した。

B. 研究方法

無症状保菌者の菌株は民間の検査センターから分与された。鹿肉からの分離は、TSB 培地に 37℃で6時間前増菌し、次にノボピオシン加mEC培地に42℃で18時間増菌した後、ビーズ法で集菌し、CT-SMAC 培地に定法どおり塗布した。乳白色コロニーを釣菌し、O 抗原、ペロ毒素産生を RPLA で確認出来たものを O157 とした。PFGE 用サンプルの調製は、Bio-Rad 社の GenePath 試薬キット6を用いて行った。PFGE の泳動条件は国立感染症研究所の方法に従った。

C. 結果

1) 事例の概要

平成12年11月13日に小樽市保健所管内に於ける職場の検便検査を民間の検査センターで実施したところ、VT1 & 2 産生性の腸管出血性大腸菌 O157 が分離され、無症状保菌者 (保菌者) と確認された。同保菌者の関連調査においてこの保菌者が札幌市内の飲食店で同月7日に鹿肉の刺身を喫食

していたことが判明した。このため、この飲食店に冷凍保管されていた鹿肉の検査を実施したところ、VT1 & 2 産生性の腸管出血性大腸菌 O157 が検出された。

当該鹿肉は11月5日にハンター8名が日高地方で捕獲解体したものの一部であった。ハンターは各自が鹿肉約1.5?2kgを持ち帰り、このうちの1名が6日にその鹿肉を飲食店に提供したものであった。同飲食店では6日から11日までの間に、保菌者の他9名の客に鹿肉を刺身で提供していたが、いずれの客も症状はなく、また、検便検査の結果 O157 の陰性が確認された。

飲食店における鹿肉の取り扱いは適切であり、鹿肉が飲食店内で O157 に汚染された可能性は極めて低いと考えられた。また、調理人については検便により O157 の陰性が確認された。

2) 分離株の性状

保菌者由来株1株および鹿肉由来株2株 (別々の肉塊から分離された株) は血清型 O157:H7、ペロ毒素型 VT1 & 2、生化学的性状 ソルビット陰性、βグルクロニダーゼ陽性であった。

3) PFGE による DNA 分析

保菌者由来株1株、鹿肉から分離された2菌株および Bio-Rad 社のコントロールプラグの PFGE バンドパターンを図1に示す。分子量マーカーには Bio-Rad 社の入ラダーを用いた。このバンドパターンは保菌者由来株と鹿肉由来株が同一クローンに属することを示した。

D. 考察

鹿肉を原因食品とする保菌者の事例を経験し、PFGE がヒト由来株と食品や他の環境

由来株との異同を調べる上で極めて有効であることが示された。

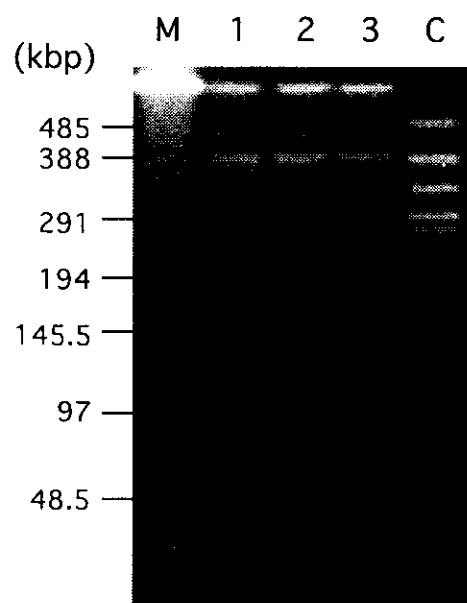
E. 結論

食材由来株とヒト由来株との PFGE パターンが合致し、疫学調査と併せて総合的に判断して原因食品を断定することが出来た。

F. 研究発表

札幌市衛生研究所年報

図1 腸管出血性大腸菌O157菌のPFGEパターン



レーンM : λ -ラダー

レーン1 : 健康保菌者由来

レーン2 : 鹿肉1

レーン3 : 鹿肉2

レーンC : コントロールプラグ (Bio-Rad社)

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE)の標準化および画像診断を基盤とした
分散型システムの有効性に関する研究

秋田県において平成12年に発生したEHEC事例から分離された
O157:H7(VT-2)のPFGEパターンの比較について

秋田県衛生科学研究所 微生物部細菌担当

研究要旨：平成12年度に秋田県で発生した腸管出血性大腸菌感染事例は49事例であり、O157事例は24事例（分離株33）であった。そのうちO157:H7(VT-2)による事例が13事例（分離株19）と多かったことから事例由来株についてPFGEを行いその関連について検討した。その結果、非常に類似したものを含め9種類のパターンがみられたが、6月の1事例、7月の1事例、9月の3事例計5事例（6株）のDNAパターンが一致し、平成12年にこの株が広く県内に侵淫したものと考えられた。

A. 目的

県内で発生したEHEC O157:H7(VT-2)感染事例の分離株についてPFGEを行い、そのパターンを比較し、事例について疫学情報を得ることを目的とした。

B. 方法

1) 供試株

平成12年に秋田県内で発生したEHEC O157 VT-2 感染事例13事例由来19株をPFGEパターンの比較に供した。（表1）

2) パルスフィールド電気泳動 (PFGE)

：被検菌のDNA包埋アガロースプラグは、BIO-RAD製CHEFバクテリアルDNAプラグキットを使用して調製した。なお、キット中のアガロース溶液とCell suspension bufferの代わりにLMT Agarose (BIO-RAD) 1%溶液と滅菌精製水をそれぞれ使用した。泳動装置にはCHEF DR II (BIO-RAD)を使用し、ゲルには1% PFCアガロース (BIO-RAD)、泳動バッファーには×0.5 TBEを使用した。泳動パラメーターは次のとおりとした；Block 1: 電圧 0.6V/cm、パルスタイム4 Sec.-8 Sec.、泳動時間9時間、Block 2: 電圧6V/cm、パルスタイム8 Sec.-50 Sec.、泳動時間13時間、バッファー温度14℃。制限酵素はXbaIを使用した。

C. 結果

秋田県における平成8年度(1996年)から12年度(2000年)のEHEC感染事例発生状況を図1に示した。O157:H7(VT-2)による感染事例は毎年数事例発生しているが、平成12年度(2000年)は13事例と発生数が多く、全体の事例中3割近くを占めた。また表1に示すように平成12年度のO157:H7(VT-2)感染者は19名確認され、12名が患者であったが、そのうち4名の患者がHUSを併発していた。このようにO157:H7(VT-2)感染事例が多発したことから、その疫学解析のため13事例由来19株についてPFGEを行い、そのDNAパターンを比較した。

PFGEの結果は図2に示すとおりである。レーンNo.1(事例No.1)、No.3(事例No.2)、No.10(事例No.8)、No.11(事例No.9)、No.12,13(事例No.10)はPFGEパターンが一致した。レーンNo.15(事例No.11)とNo.14,19(事例No.13)は写真上48.5以下の小さいバンドの部位で1本異なるように見えるのみでほとんど一致していた。事例2においては事例由来2株のPFGEパターンが異なっていた。前述したようにレーンNo.3の症状のなかった家族由来株は12年に主流

だったパターンと同一であったが、レーンNo.2血便の後HUSを併発した患者由来株は300Kb以上でも100Kb以下でも主流パターンのレーンNo.3の株と異なっていた。これ以外の6事例は事例ごとにそれぞれパターンが異なっており、家族内感染により複数の株が分離された事例No.4と12では家族から分離された株は事例内でそれぞれ同一パターンを示した。

D. 考察

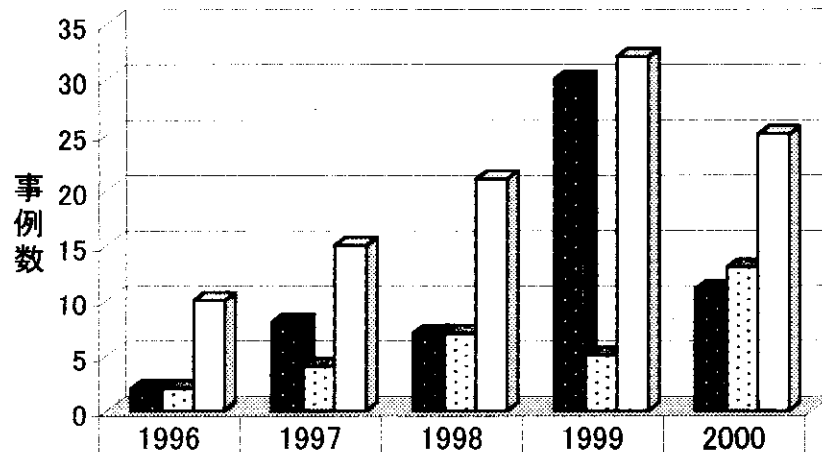
平成9年度の成績(図3)に示すように、これまでO157:H7(VT-2)感染事例において同一事例由来株以外、事例間で同一のパターンを示したことはなかったが本年度は6月の1事例(事例No.1)、7月の1事例(事例No.2)、9月の3事例(事例No.8,9,10)で同じパターンがみられた。9月の事例は2事例が秋田市、1事例が横手保健所管内で発生したものであったが、横手保健所管内の患者も秋田市内に勤務しており、患者の行動調査成績から感染源として某焼き肉店が疑われたが疫学的証拠が不十分であったことから感染源究明のための当該店への行政対応はなされなかった。6月、7月の事例は9月の3事例と同一パターンとはいえ発生時期がかなりはなれており、関連については全く不明であるが、起源を同じくする菌が時期的にも広範囲に県内に侵淫したと考えられた。

同一事例由来株2株のPFGEパターンが異なっていた事例No.2については、家庭で牛を飼育しており複数の起源の菌が存在した可能性が考えられた。事例No.11と事例No.13については発生時期に半月の間隔があったが発生地域は近隣であり、同一起源の菌を感染源にするものと推定された。その他の6事例についてはパターンが異なることから、過年度と同様にO157:H7(VT-2)の感染源は多岐にわたっていると考えられた。

E. 結論

平成12年度に秋田県で発生した腸管出血性大腸菌O157 VT-2感染事例13事例由来株19株についてPFGEを行いその関連について検討した。その結果、非常に類似したものを含め9種類のパターンがみられた。O157 VT-2の感染源は多岐にわたり存在するとおもわれたが、本年度は5事例(6株)のDNAパターンが一致し、平成12年にこの株が広く県内に侵淫したものと考えられた。

図1 年度別EHEC事例数(秋田県)



	1996	1997	1998	1999	2000
■O157 VT-1,2	2	8	7	30	11
▨O157 VT-2	2	4	7	5	13
□Non-O157	10	15	21	32	25