

表1 PFGE供試株一覧(平成12年)

PEFGL-ン	事例	保健所	受付月日	種別	症状	年齢	性別	菌株No
1	1	横手	2000/6/7	患者	不明	不明	女	EC-3592
2	2	本荘	2000/7/27	患者	HUS	2	女	EC-3815
3			2000/7/28	保菌者	なし	8	男	EC-3819
4	3	秋田市	2000/8/8	患者	不明	10代	男	EC-3876
5	4	鷹巣	2000/8/8	患者	血便	4	女	EC-3877
6			2000/8/9	保菌者	なし	6	男	EC-3895
7	5	本荘	2000/8/11	患者	HUS	2	男	EC-3898
8	6	県外	2000/8/23	患者	不明	不明	男	EC-3959
9	7	秋田市	2000/8/30	患者	HUS	10代	女	EC-3990
10	8	横手	2000/9/11	患者	不明	21	女	EC-4053
11	9	秋田市	2000/9/11	患者	HUS	7	女	EC-4060
12	10	秋田市	2000/9/11	患者	血便	14	男	EC-4059
13			2000/9/18	保菌者	なし	48	女	EC-4095
14	13	大曲	2000/12/8	保菌者	なし	56	男	EC-4372
15	11	横手	2000/11/21	患者	不明	不明	女	EC-4278
16			2000/11/22	給食従事者	なし	45	女	EC-4284
17	12	本荘	2000/11/24	保菌者	なし	不明	男	EC-4293
18			2000/11/24	保菌者	なし	80	男	EC-4294
19	13	大曲	2000/12/6	患者	強い腹痛	58	女	EC-4362

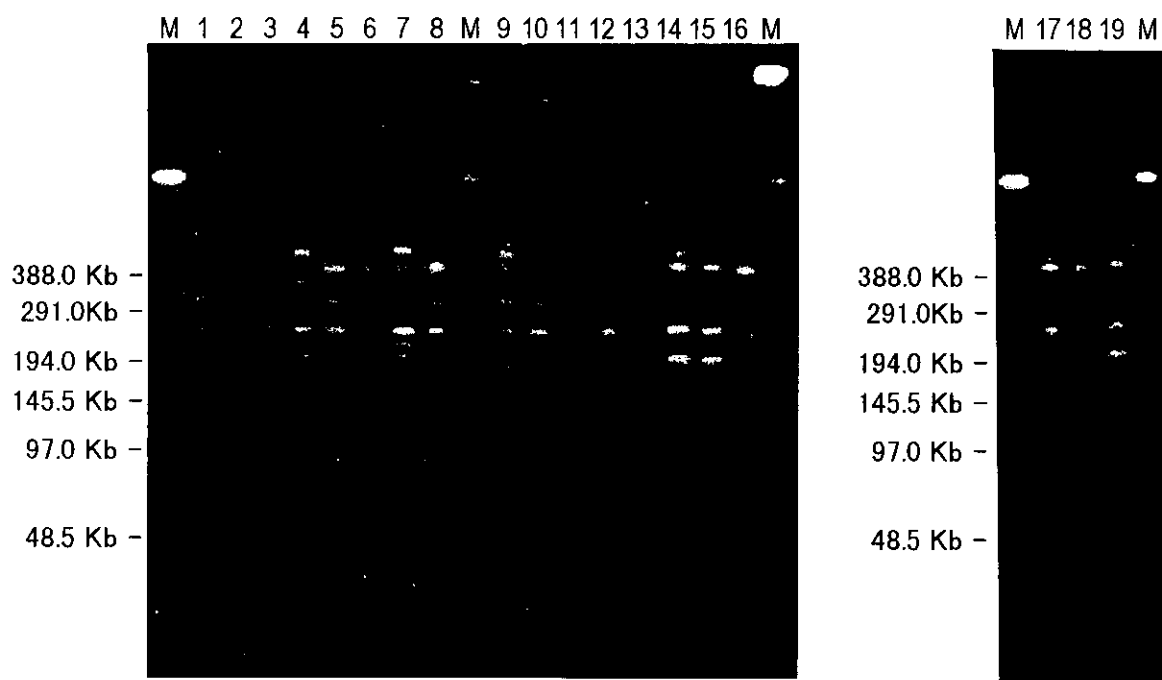


図2 平成12年度秋田県で分離されたEHEC O157:H7(VT-2)のXba I PFGE

表2 PFGE供試株一覧(平成9年)

PEFGL-ン	事例	保健所	受付月日	種別	年齢	性別	菌株番号
1	1	大曲	1997/6/10	患者	1	男	EC-643
2	2	秋田市	1997/7/5	患者	9	女	EC-682
3	3	秋田市	1997/8/20	保菌者	29	女	EC-767
4	4	秋田市	1997/9/21	保菌者	44	女	EC-849

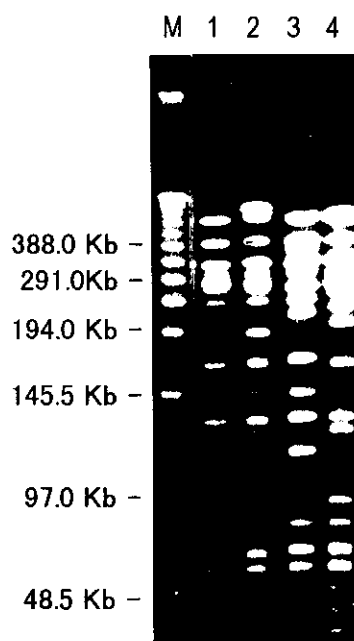


図3 平成9年度秋田県で分離された
EHEC O157:H7(VT-2)のXba I PFGE

パルスフィールドゲル電気泳動法の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

宇佐美 智 岩手県衛生研究所

研究要旨：パルスネット構築にむけて今年度は平成 12 年中に当所で確認した 35 株の腸管出血性大腸菌 O157 についてパルスフィールド電気泳動 (P F G E) を行い検討した。結果は同一事件で複数分離された株は、ほとんど同一の泳動パターンを示し、異なる事件及び散発事例間に同一パターンを示すものはなかった。

A. 目的

全国にパルスネットを構築することにより、各地域での分離株について分子疫学的な情報を把握することにより、流行株の把握、地域流行株の把握、いわゆる Diffuse Outbreak の発見等に資することを目的とする。

B. 研究方法

検査対象は平成 12 年中に確認された腸管出血性大腸菌 O157 とする。当所では 35 株が対象となった。これについて CHEF D R III (B I O R A D) で P F G E を行った。プラグの作成は試薬キット (B I O R A D) の説明書に従って行った。しかし、最初の泳動で分解不完全と思われる泳動像が得られたため、保存していた残りのプラグ (プロテナーS K 処理まで) を再度リゾチームから酵素反応を行った。泳動条件は感染症研究所で現在使用のものとした。すなわち、200 V, 4 to 8 sec 9 hrs, 8 to 50 sec 13 hrs。

泳動は血清型と毒素型で大別し、その中で同一事件での複数分離株 (すべて家族内感染事例) は並べてレーンに配置した。表に配列を示す。

C. 研究結果

泳動結果は図 1, 2 のとおり。同一事件から分離された株はそれぞれ同一かほとんど同じパターンを示した。そしてそれぞれ別の事件から分離した株同士間では同一パターンを示すものはなかった。

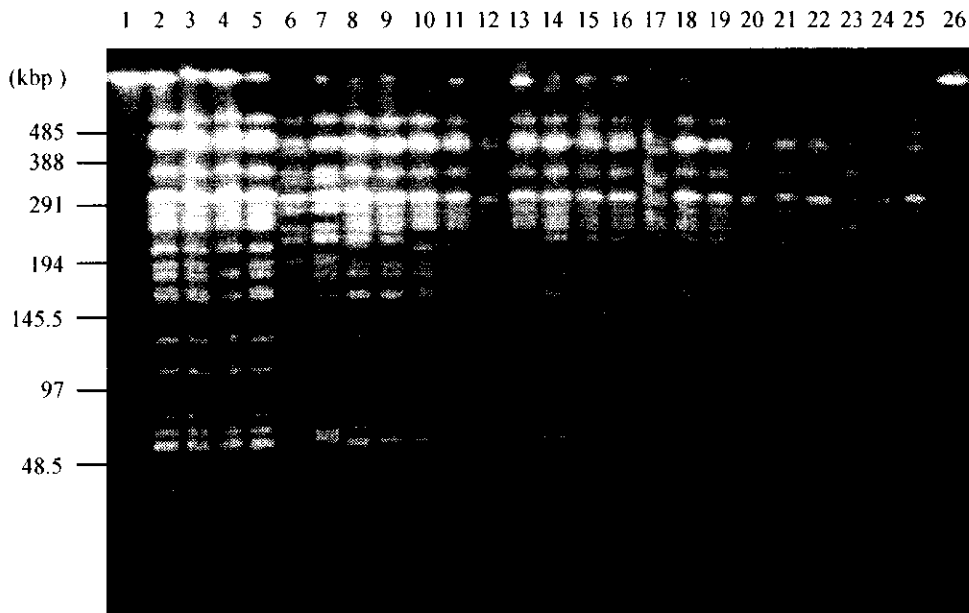
D. 考察

方法のところにも触れているが、最初に泳動したとき最上方に普通はないはずのバンドが現れた。残してあったプラグを再度酵素処理することによりかなり改善したが、バンドの残った株もあった。パルスネットでの比較には泳動パターンがクリアなことが求められるので検討が必要と思われたが、そこまで余裕がなかった。今後の課題としたい。

P F G E の結果から見ると、散発事例ではなかなか感染源を特定できないが、同一県内でも多くのパターンの腸管出血性大腸菌 O157 が分布していると考えられる。中には全国または地域流行のものが混じっているかもしれないのでパルスネットの役割に期待したい。

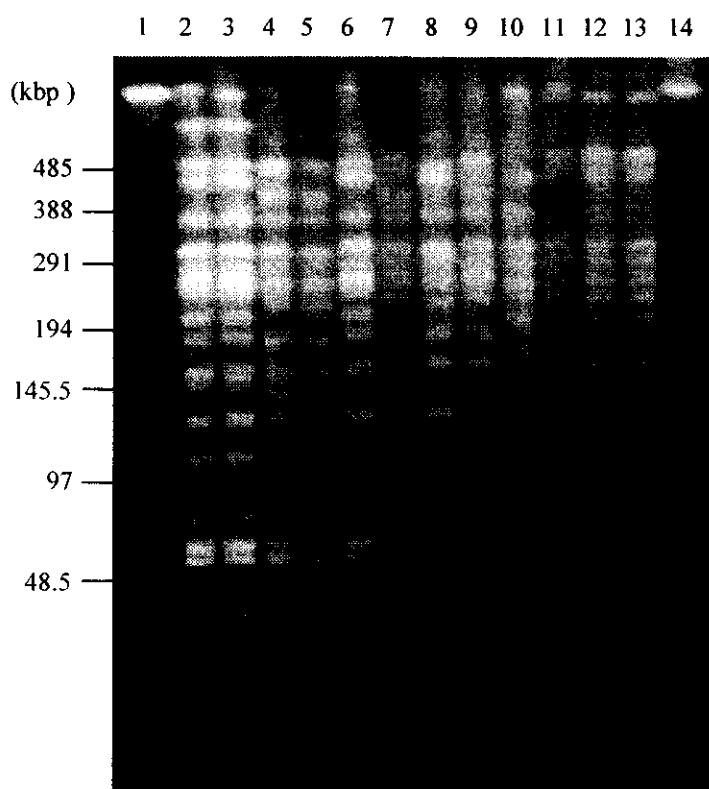
また、予算、時間の関係から特に要請がないものについては菌株を集めてから P F G E を行ってきた。今後パルスネットの構築後は対象菌の同定ごとに速やかな P F G E が必要となるのでかなりの予算が必要になるとと思われる。

図1 腸管出血性大腸菌O157のPFGEパターン(1)



レーンNo.	菌株番号	血清型	毒素型	備考
1	マーカー			
2	ECV000762	O157:H7	Stx1&Stx2	家族1
3	ECV000772	O157:H7	Stx1&Stx2	家族1
4	ECV000775	O157:H7	Stx1&Stx2	家族1
5	ECV000776	O157:H7	Stx1&Stx2	家族1
6	ECV000838	O157:H7	Stx1&Stx2	家族2
7	ECV000887	O157:H7	Stx1&Stx2	家族2
8	ECV001092	O157:H7	Stx1&Stx2	家族3
9	ECV001131	O157:H7	Stx1&Stx2	家族3
10	ECV001184	O157:H7	Stx1&Stx2	家族4
11	ECV001191	O157:H7	Stx1&Stx2	家族4
12	ECV001198	O157:H7	Stx1&Stx2	家族4
13	ECV001199	O157:H7	Stx1&Stx2	家族4
14	ECV001226	O157:H7	Stx1&Stx2	家族5
15	ECV001227	O157:H7	Stx1&Stx2	家族5
16	ECV001228	O157:H7	Stx1&Stx2	家族5
17	ECV000593	O157:H7	Stx1&Stx2	
18	ECV000654	O157:H7	Stx1&Stx2	
19	ECV000935	O157:H7	Stx1&Stx2	
20	ECV001013	O157:H7	Stx1&Stx2	
21	ECV001038	O157:H7	Stx1&Stx2	
22	ECV001050	O157:H7	Stx1&Stx2	
23	ECV001195	O157:H7	Stx1&Stx2	
24	ECV001314	O157:H7	Stx1&Stx2	
25	ECV001372	O157:H7	Stx1&Stx2	
26	マーカー			

図2 腸管出血性大腸菌O157のPFGEパターン (2)



レーンNo.	菌株番号	血清型	毒素型	備考
1	マーカー			
2	ECV000694	O157:H7	Stx2	家族 6
3	ECV000717	O157:H7	Stx2	家族 6
4	ECV000969	O157:H7	Stx2	家族 7
5	ECV000982	O157:H7	Stx2	家族 7
6	ECV000666	O157:H7	Stx2	
7	ECV000909	O157:H7	Stx2	
8	ECV000927	O157:H7	Stx2	
9	ECV000940	O157:H7	Stx2	
10	ECV000983	O157:H7	Stx2	
11	ECV000684	O157:HNM	Stx1&Stx2	家族 8
12	ECV000689	O157:HNM	Stx1&Stx2	家族 8
13	ECV000691	O157:HNM	Stx1&Stx2	家族 8
14	マーカー			

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盤とした分散型システムの有効性に関する研究

福島県衛生公害研究所 加藤一夫

研究要旨：腸管出血性大腸菌（EHEC）0157（以下0157）に係るパルスフィールドゲル電気泳動法（以下PFGE）の検査体制の整備を図るため BIO-RADのジーンパス グループ6 試薬キット(以下キット)を用い検査を試みたが大きな分子量の染色体DNA断片が残り不鮮明な画像となった。これらの問題点を改善するため条件を変え検討を行った結果、特にWash Bufferによる洗浄と*Xba I*の量に問題があることが明らかとなった。さらに、検討を行った結果をもとに*Xba I*の量を説明書の2倍とした条件下で、当県内の散发事例の0157菌株についてPFGEを行ったところ鮮明な画像が得られた。これにより、関連事例以外は全て異なるパターンであり発生源や感染経路等の特定に有用であることが示された。

A. 研究目的

PFGEによる細菌の型別分類は疫学調査の一環として多くの地方衛生研究所で行われている。しかしながら、当所では0157に係るPFGEは取り組んでいなかった。そのため当所での検査体制を考慮にいれキットを用いた方法による技術確保をすると共に、当県内で分離された菌株についてPFGEを実施しこれらの検討を行い、病原菌のPFGEを用いた型別分類に関するネットワークに参加できる体制の整備を図る。

B. 研究方法

使用した菌株は、当県内のEHEC感染者から分離された0157で平成8年度は6株、平成9年度は2株、平成10年度は7株及び平成12年度は9株の計24株を用いた。

それぞれの菌株について性状確認、血清型別を行うとともにRPLA法によりVT1、2毒素型別の保有状況を調べた。

PFGEはキットを用い取扱説明書に従いサンプル調整・電気泳動を行った（別紙キットによるサンプル調整方法）。なお、電気泳動はBIO-RADのCHER-DR III

Pulsed-Field Electrophoresis Systems を使用し、6V/cm、120°、4 to 8 sec 9 hrs、8 to 50 sec 13 hrsの条件で行った。

しかしながら、取扱説明書に記載された調整方法では鮮明な泳動像が得られなかったため、Wash bufferによる洗浄に注意するとともにサンプル量、Lysozyme量及び*Xba I*量を変え比較を試みた。

サンプル調整の検討結果から平成8年度から10年度の菌株について、2倍量の*Xba I*でPFGEを行い得られた画像の比較検討した。なお、平成12年度の菌株については、2回の制限酵素処理を行ったもので比較検討を行った。

C. 研究結果

1 分離菌の性状と菌株比較

使用した24菌株の概要を表1に示した。これら菌株のH血清型は全てH7であり、VT1、2両方産生菌による患者は11人で健康保菌者は4人、VT1産生菌による患者は1人、VT2産生菌による患者は6人で健康保菌者は2人であった。なお、平成10年度に1事例、平成12年度に3事例の家族内感染があった(表1 備考欄に表示)。

2 PFGEの条件検討

取扱説明書に記載された方法で実施した結果、図1の不鮮明な泳動像が得られた。この原因を把握するため図2の下欄に示す方法でサンプル調整・制限酵素処理を行ったが再度図2の不鮮明な泳動像となった。これはWash bufferによる洗浄が不十分なためProteinase Kが残り制限酵素が不活化されたのが原因ではないかと考え、この制限酵素処理を行った同サンプルを再度制限酵素処理(別紙のキットのサンプル調整方法⑧～⑩の操作を再度実施)を行ったところ図3のとおり鮮明な画像が得られた。

3 PFGEの解析

平成8年度から平成10年度までの15株について、Wash bufferの洗浄に注意し2倍量の*Xba I*を用い制限酵素処理を行った結果、図4の画像が得られ、すべて異なるパターンに分類された。

平成12年度の9株のうち菌株番号22から24は取扱説明書の方法でPFGEを行った結果、図2の⑨～⑪のとおりバンドを形成しなかった。残りの菌株については、大きな分子量の染色体DNA断片が残っていたため、2回の制限酵素処理を行ったところ図5の画像が得られた。バンドに若干の相違がみられるものがあるものの保健所の調査と同じく家族内感染を疑わせる同様なPFGEパターンがみられた。

D. 考察

当初PFGEについては、図1のとおり大きな分子量の染色体DNA断片が残り、バンドも不鮮明な画像となっていたが、図2の*Xba I*量を変えたコントロールプラグ(図2の⑫⑬、操作は別紙の⑨より実施)のDNAが鮮明に切断されていることから、試料はWash bufferによる洗浄が不十分なため制限酵素が不活化されDNAが切断さ

れなかったと考えられた。また、このコントロールプラグの結果から大きな分子量の染色体DNA断片を残さないようにするためには2倍量の*Xba I*が必要と考えられた。この考えにより再度制限酵素処理を行った図3の画像をみると、Lysozymeや*Xba I*を2倍量とした試料では、大きな分子量の染色体DNA断片が消え、鮮明に切断されておりWash bufferによる洗浄、制限酵素量及びLysozyme量が関与していることが明らかとなった。

なお、大きな分子量の染色体DNA断片が残った場合図2の⑫と⑬を比較すると⑫は97Kbの部分にバンドが出現しており大きな分子量の染色体DNA断片が残った画像の検討には注意が必要であることが言える。

また、菌量については、菌量を半分にするるとやや薄めのバンドとなりみにくくなるので取扱説明書どおりの量が適量と思われた。

PFGEの条件検討に基づき、平成8年度から10年度の菌株についてWash bufferによる洗浄に注意し制限酵素量を2倍量としてPFGEを実施した結果、図4のとおり大きな分子量の染色体DNA断片もなく鮮明な画像が得られた。これらの画像を比較してみると、菌株番号12と13を除き各菌株は関連のない事例のものであったが、得られた画像も同様な結果となった。しかしながら、関連性があると考えていた(以前に感染症研究所で実施した際に同じ結果となっていたため)12と13の菌株について比較すると、4つのバンドの部分に相違がみられた。原因としては保存時の変異が考えられた。

平成12年度のPFGEの結果について比較してみると、図2及び図4のとおり、同一家族内の感染の疑われた菌株(菌株番号：16～18、20～21、22～24)については、菌

株16～18は16の菌株に一部違いがあり、また、22～24はすべてバンドを形成していないもののPFGE画像としてはほぼ同一パターンを示し、血清型と毒素型によるH7:VT1,2、H7:VT1、H7:VT2、の3種の分類に対しこの方法は分類能が高く疫学調査に有用であることが示された。

E. 結論

キットを用いた場合、Wash bufferによる十分な洗浄や適切な量のLysozymeや制限酵素を使用しないとDNAが切断されず期待されないバンドができると考えられた。

平成8年度から平成12年度までの24菌株に対するO157のPFGEの結果からこの方法は分類能が高く疫学調査に有用であることが示された。

F. 研究発表

なし

キットによるサンプル調整方法

- ① 0157をTSB培地で37°C, 一夜振とう培養
↓
- ② 菌液60 μ lを遠心, 上清を捨てて沈査にCell Suspension bufferを150 μ l加え, 菌液を懸濁し, 菌液は50°Cに保温
↓
- ③ 1.2%Embedding Agaroseを溶解し, 52°Cで保温
↓
- ④ 菌液150 μ l, Lysozyme6 μ l及び1.2%Embedding Agaroseを150 μ l加えよく攪拌, プラグモルト内に100 μ lずつ分注
↓
- ⑤ 室温で試料を固める. (15分から20分)
↓
- ⑥ プラグモルト内の試料をチューブに入れ, Lysis buffer500 μ l及びLysozyme 20 μ lを加えて37°Cで1時間インキュベート
↓
- ⑦ Lysozyme溶液を抜き取り, 各チューブに1 \times Wash buffer 1ml加え, 試料を洗浄する. Wash bufferを抜き取り, ProteinaseK buffer 500 μ l及びProteinaseK20 μ lを加え, 50°Cで16~20時間インキュベート
↓
- ⑧ 1 \times Wash bufferによる洗浄(3回以上)によってProteinaseKを不活化
↓
- ⑨ 0.1 \times Wash bufferによる洗浄及びXba I bufferによる洗浄(各々30~60分)
↓
- ⑩ 各チューブにXba I buffer 300 μ l制限酵素Xba I 5 μ l加え, 37°Cで16~20時間インキュベートより染色体DNAを切断
↓
- ⑪ 制限酵素溶液を抜き取り, 1 \times Wash buffer 1ml加える.
↓
- ⑫ 電気泳動

表1 対象としたO157感染者及び分離菌の性状

番号	月日	保健所	年齢	性別	症状	区分	H血性型	VT型	備考
1	8.8.23	D地区	1	男	軟便	患者	7	2	
2	8.8.24	B地区	3	男	血便	患者	7	2	
3	8.8.29	B地区	0.8	女	発熱、血便	患者	7	1, 2	
4	8.9.4	F地区	1	男	下痢	患者	7	2	
5	8.9.4	D地区	51	女	下腹痛、水様血便	患者	7	2	
6	8.9.5	E地区	78	女	下痢、血便	患者	7	1, 2	
7	9.5.5	C地区	2	女	下痢、血便	患者	7	1, 2	
8	10.1.31	D地区	11	男	下痢	患者	7	1, 2	
9	10.6.25	G地区	32	女	腹痛、発熱、下痢、血便	患者	7	1, 2	
10	10.7.6	F地区	29	男	腹痛、下痢、頭痛	患者	7	2	
11	10.7.23	G地区	18	男	下痢、血便	患者	7	1, 2	
12	10.8.11	D地区	35	男	腹痛、下痢	患者	7	1, 2	○
13	10.8.24	D地区	62	男	無症状	保菌者	7	1, 2	○
14	10.10.2	G地区	81	男	腹痛、下痢、血便	患者	7	1, 2	
15	10.10.13	A地区	16	女	下痢、血便	患者	7	1, 2	
16	12.6.13	A地区	37	女	下痢	保菌者	7	2	△
17	12.6.13	A地区	2	女	無症状	患者	7	2	△
18	12.6.13	A地区	65	男	下痢、腹痛	保菌者	7	2	△
19	12.8.24	F地区	12	女	腹痛、水様血便	患者	7	1	
20	12.11.13	B地区	47	女	無症状	保菌者	7	1, 2	□
21	12.11.13	F地区	15	男	血性下痢、腹痛	患者	7	1, 2	□
22	13.1.19	E地区	2	女	下痢、嘔吐、発熱	患者	7	1, 2	◎
23	13.1.19	E地区	21	男	無症状	保菌者	7	1, 2	◎
24	13.1.19	E地区	0.6	男	無症状	保菌者	7	1, 2	◎

注: 備考欄の同じ印は同一家族を表す。

M 1 2 3 4 5 6 M (菌株番号)

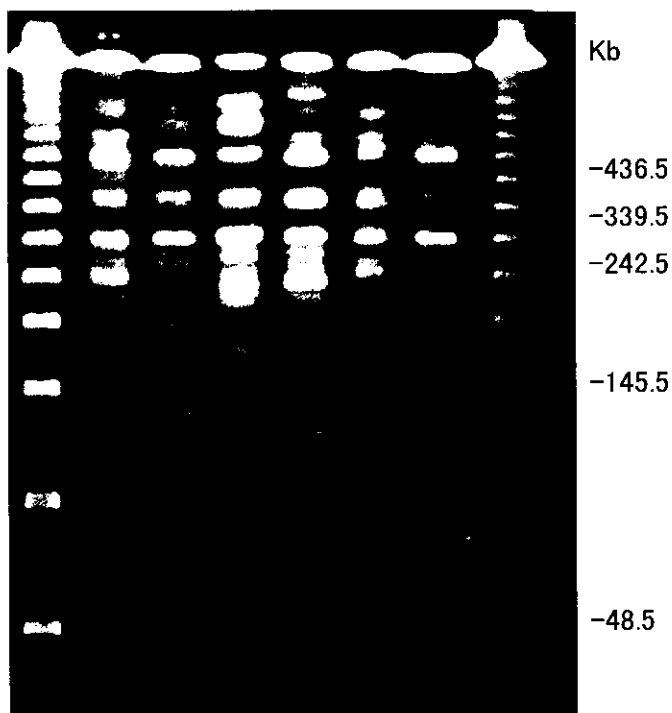


図1 平成8年度のO157のPFEG

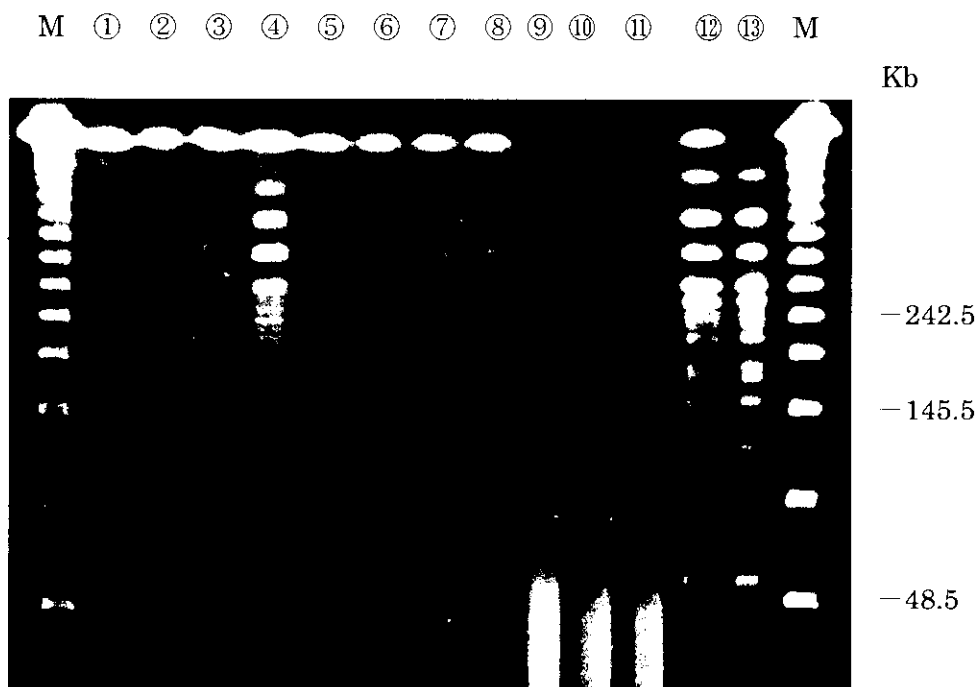


図2 PFGE の条件検討

M：λラダー

①：菌株番号 20 を取り扱い説明書どおりの処理したもの

②：菌株番号 20 を Lysozyme による温浴処理を 1 時間から 2 時間に延長したもの

③：菌株番号 20 を 2 倍量の Lysozyme で処理したもの

④：菌株番号 20 を 2 倍量の制限酵素で処理したもの

⑤～⑧：⑤は①、⑥は②、⑦は③、⑧は④と同じ方法であるが菌量を半分としたもの

⑨～⑩：⑨～⑩は菌株番号 23～24 を説明書どおりの処理したもの

⑫：キットに添付されたプラグを取り扱い説明書どおりの処理したもの

⑬：キットに添付されたプラグを 2 倍量の制限酵素で処理したもの

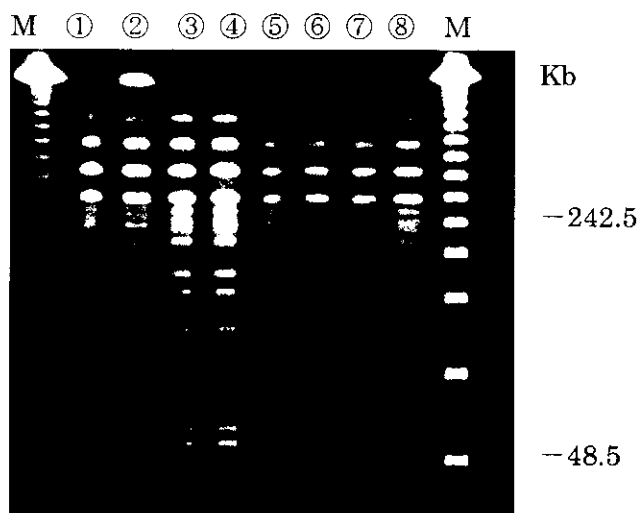


図3 図2の①～⑧を再度制限酵素処理した画像

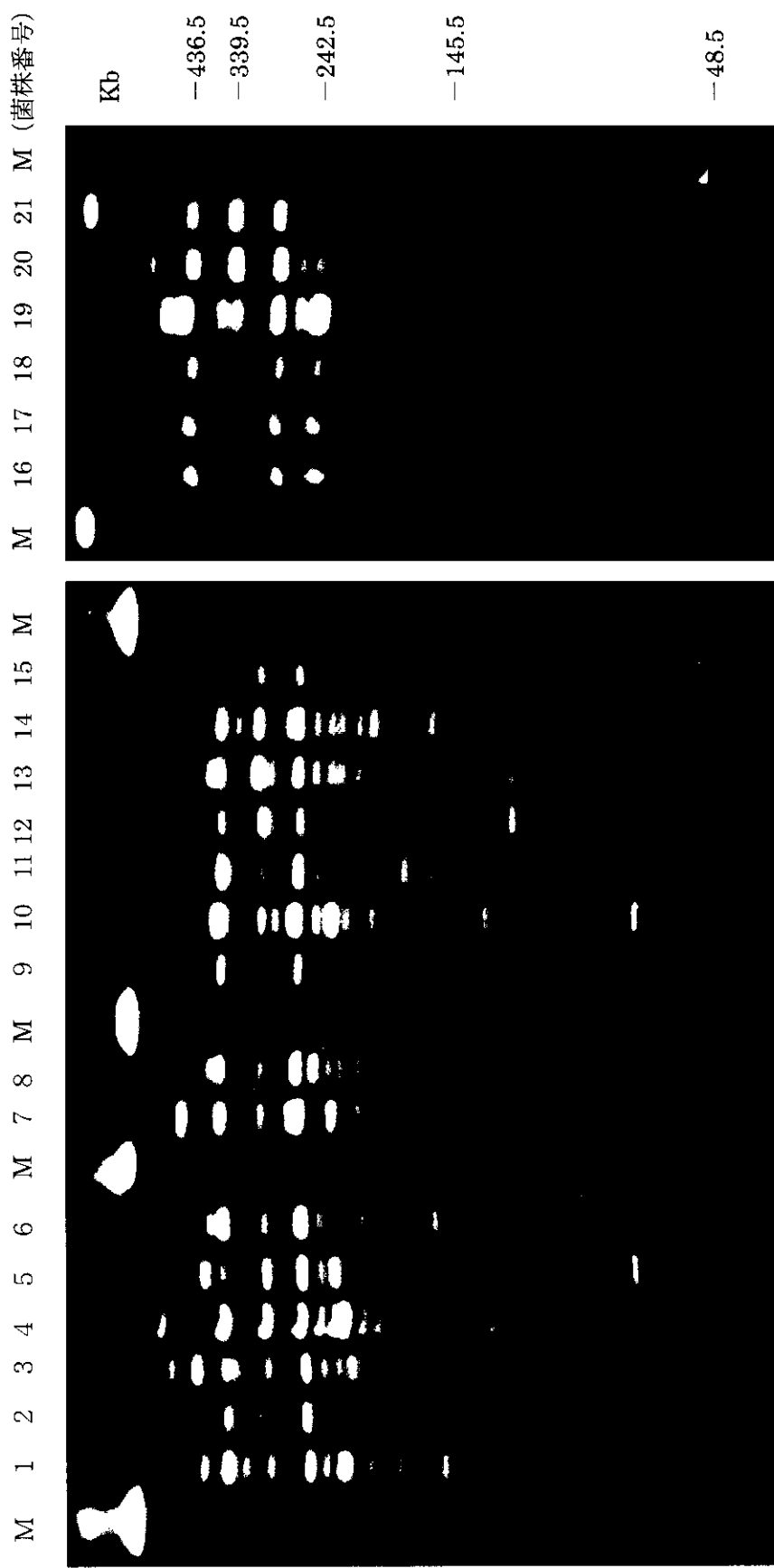


図4 平成8年度から平成10年度のO157のPFGE

図5 平成12年度のO157のPFGE

厚生科学研究費補助金（厚生科学研究費新興感染症研究事業）

分担研究報告書

STEC のペロ毒素遺伝子保有と PFGE パターン

分担研究者 齋藤 紀行 宮城県保健環境センター 微生物部

研究要旨：パルスネットの構築には、多くの事例の PFGE 解析データ蓄積が必要であり、我々は宮城県で発生した STEC O157 感染事例から分離した菌株について PFGE 解析を行ってきた。家族内 STEC 感染において菌株の生化学性状分析と PFGE 解析から同一菌による感染であると断定された事例が多くあったが、それだけでは断定できない事例もあり、PFGE 解析をより有効な分子疫学調査の手法とするためには、PFGE 解析以外の遺伝子解析法との併用が効果的であると考えられた。そこで、我々はペロ毒素遺伝子（stx）に着目し、PFGE 解析に菌株の stx 保有状況分析を加えて分子疫学調査を実施した。

その結果、PFGE 解析では同一菌由来と特定されなかった 3 件の散発事例が、stx 遺伝子解析を加えたことで同一菌由来の diffuse outbreak であることが明らかとなった。このことから、パルスネットのデータには、PFGE 解析のみならず他の分子遺伝子解析の結果も併せて集積する必要があると考えられた。

A. 研究目的

集団感染事例の感染源調査には患者等から分離した菌株の血清型、ファージ型、薬剤感受性などの表現型を解析する方法が主流であったが、分子生物技術の進歩によって遺伝子型の解析へと移行してきた。遺伝子解析法の 1 つに、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法があり、機器および試薬は高価であるが比較的簡便に行える解析法として特に集団発生時の感染源特定に有効であると高く評価されている。我々も PFGE の有用性を STEC O157 家族集団感染事例及びサルモネラ集団

食中毒事例について報告した。しかし、同一菌株由来による家族内感染と考えられた事例で、家族から分離した 3 菌株のうち 1 菌株の PFGE パターンのバンドが他の 2 菌株と一部異なることから PFGE 解析の結果だけでは同一菌由来による感染であると確証できないケースを経験した。そこで、より正確な感染源調査には PFGE 解析の他に別の分子遺伝学的検査を併用する必要性があると思われた。

今回、過去 5 年間に宮城県内で発生した STEC O157 感染事例から分離した

菌株について PFGE 解析と保有するベロ毒素遺伝子 (stx : stx1, stx2, stx2v) 型の分析を同時に行い、両者を併用した遺伝子解析法の有用性について検討した。

B. 研究方法

宮城県内で 1996 年から 2000 年の 5 年間に発生した STEC 感染事例から分離された STEC O157 菌株について、CHEF Mapper (BIO-RAD 社製) を用いて PFGE を行った。制限酵素は Xba I を使用し、PFGE の電気泳動は国立感染症研究所で設定した条件で行った。stx の保有状況は stx1、stx2、STX2 バリエーション (stx2v) を検出できるプライマーを用い PCR 法と PCR-RFLP 法で確認した。

C. 研究結果

1. 分離菌株のベロ毒素遺伝子状況による分類

5 年間に発生した STEC 感染事例から分離された菌株について PCR 法あるいは PCR-RFLP 法で stx 種類の保有状況を分析し、stx1+stx2、stx2、stx1+stx2v、stx2v、stx2+stx2v の 5 のタイプに分類した (表 1)。菌株間の PFGE 解析にこれらの分類を考慮して検討した。なお、宮城県内で検出された stx2v は PCR 生成物の遺伝子解析の結果、全ての株が同じ塩基配列であっ

たことから分離された全ての stx2v 菌株の遺伝型は同じであると考えられた。

2. 飼育牛が感染源と考えられた 2 事例の解析

(1) A 事例 :

平成 12 年 7 月加美郡内の 1 歳の男子が STEC で発症、患児から STX1,2 産生 STEC O157 が検出された。感染源調査の結果、家族 2 名と飼育牛 1 頭と環境 (拭き取り検体) から同型の STEC が 4 菌株検出され、ベロ毒素遺伝子解析から 5 菌株全てが stx1+stx2v 保有であった。図 1 に PFGE パターンを示したが、5 菌株とも同じ PFGE パターンを示している。菌株の PFGE 解析の結果と患児の行動等の聞き取り調査から感染源は飼育牛と考えられた。

(2) B 事例 :

平成 12 年 7 月登米郡内の 1 歳の女の子が発症、患児から非運動性の STX1,2 産生 O157 が検出された。感染源調査の結果、家族 1 名と飼育牛 1 頭から同型の STEC が検出され、遺伝子解析からベロ毒素の遺伝子型は 3 菌株全て stx1+stx2v 保有であった。図 2 に PFGE パターンを示したが、それぞれは約 120kb 付近のバンドが欠落した共通の特徴を持つ菌株であった。A 事例同様、PFGE 解析の結果と聞き取り調査等から感染源は飼育牛と考えられた。

2. diffuse outbreak と考えられた散発事例

(1) 平成12年は7月から8月に10件(A~J事例)のSTEC O157感染事例が発生し、そのうち2件は飼育牛が関係した事例(前出 A,B)であった。残りの8件は感染源が特定されなかった事例であった。それらの事例から分離した菌株のベロ毒素遺伝子型等を表2に、PFGEパターンを図3に示した(他2事例K, Lも含む)。PFGE解析から8事例はC, Dのグループ、E, H, I, Jのグループ、及びF, Gのグループの3グループに分類された。保有ベロ毒素遺伝子型は前者2グループがstx1+stx2でF, Gの1グループはstx2であった。以上のことから、8事例は別々に発生した事例であるがグループ内で何らかの接点があった可能性を示唆していた。

(2) 平成11年10月から11月に登米郡、栗原郡と塩釜市でSTEC感染症が散発に発生したが、それらの患者及び家族は明瞭な接触はなかった。患者から分離した4菌株(O事例: EC626、EC629、P事例: EC631、Q事例: EC639)についてPFGE解析、生化学性状、薬剤感受性試験及び保有遺伝子解析を行った。それぞれの菌株の性状を表3に、PFGEパターンを図4に示した。なお、M, N事例からの分

離菌を対照とした。3事例からの4分離菌株はラフィノース非分解性、薬剤感受性試験でMINOにやや耐性から耐性を示す特徴を有し、また保有病原遺伝子としてstxの他にeae及びEAST遺伝子が確認された。PFGEパターンでは250-300bp領域でEC639が他の菌株と微妙に異なるが他の領域は全く同じパターンを示していた。更に、保有ベロ毒素遺伝子型は4菌株全てがstx2+stx2vでありSTX2のプロトタイプとバリエーションの遺伝子を同時に保有する特異的な菌株であった。以上のことから、1菌株のPFGEパターンが一部異なっていたが4菌株は同一菌株由来の可能性があると考えられた。

D. 考察

平成11年、全国規模で発生したイカ菓子によるサルモネラ食中毒事件は、分子遺伝学的解析法としてPFGEが感染源疫学調査に有用であることを示した事例であった。しかし、各自治体を越え広域で散発的に発生するdiffuse outbreakの多くは、発生の実態が把握されず、感染源調査も充分されていない。そこで、広域で散発的に感染症が発生した場合、感染の拡大防止のため迅速な感染源調査には広域的な情報交換が必要となる。現在、感染事例で検出された菌株のPFGE情報交換を各衛生研究所、国立感染症研究所の

間で可能にするパルスネットの整備が進められている。その一環として、国立感染症研究所の寺島らは STEC 及び赤痢菌の PFGE 解析条件の標準化を行い、PFGE パターンから菌株の分類を試みてきた。しかし、年々分離される STEC は当初分類したパターンに当てはまらないものが増加し、新たな分類設定が必要になってきている。

我々は、飼育牛が感染源と特定できた STEC 感染 2 事例を含む STEC 散発感染事例からの分離菌株について PFGE 解析とベロ毒素遺伝子の保有状況調査を行った。その結果、前者の 2 事例においては PFGE 解析だけでも充分分離菌株の同一性が証明できた。また、平成 12 年に発生した 8 散発事例が PFGE 解析によって 3 グループの diffuse outbreak であることも明らかになった。しかし、平成 11 年に発生した 3 件の散発事例が PFGE 解析では diffuse outbreak であると明言できない結果であったが、分離菌株の生化学性状等が同じであったことと 1 菌株に stx2, stx2v の 2 種類の STX2 遺伝子を保有する特異的な菌株であったことから 3 事例は同一菌株由来の感染であると考えた。

集団感染事例等から分離した菌株について PFGE 解析を行った場合、まれに PFGE パターンのバンドが 1 あるいは 2 本異なることがあるとされてい

る。このように僅かに異なる PFGE パターンを示す菌株に対して、今回我々が示した遺伝子の解析法を追加実施することで菌株の異同を明確に判別可能であると思われた。今後、STEC の分子疫学調査には PFGE 解析の他に我々が用いた遺伝子解析法を導入することで PFGE 解析がより有効に活用されると考える。

E. 結論

PFGE 解析による分子疫学調査は集団あるいは家族内 STEC 感染症の感染源調査に有用であることからパルスネットの早急な構築が望まれる。

PFGE 解析に他の分子遺伝子解析手法を組み合わせることでより正確な疫学調査が可能であると確信した。

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

(共同研究者：野池道子、佐々木美江、山口友美、畠山敬、白石廣行)

表 1. 宮城県内で発生したstx2STEC感染事例のベロ毒素遺伝子型による分類

遺伝子型	平成8年	平成9年	平成10年	平成11年	平成12年	総計
stx1+stx2	4	3	8	3	8	26
stx2	1	1	0	3	2	7
stx1+stx2v	0	0	2	1	2	5
stx2v	1	2	1	1	2	7
stx2+stx2v	1	1	0	3	1	6
合計	7	7	11	11	15	51

表 2. 分離した菌株のベロ毒素遺伝子

No	事例	居住地	区分	発症日	菌株	ベロ毒素遺伝子
1	C	気仙沼市	患者	7/12	EC683	stx1+stx2
2	D	古川市	患者	7/10	EC684	stx1+stx2
3	E	名取市	患者	7/31	EC702	stx1+stx2
4	F	村田町	患者	8/1	EC703	stx2
5	G	村田町	患者	8/9	EC706	stx2
6	H	大衡村	患者	8/17	EC716	stx1+stx2
7	H	大衡村	家族		EC717	stx1+stx2
8	I	大河原町	患者	8/19	EC718	stx1+stx2
9	J	色麻町	患者	8/31	EC722	stx1+stx2
10	J	色麻町	家族		EC723	stx1+stx2
11	K	小牛田町	患者	8/31	EC724	stx2v
12	L	蔵王町	患者	9/9	EC730	stx1+stx2v
13	L	蔵王町	家族	9/10	EC731	stx1+stx2v

表 3. 分離菌株の性状

No	事例 (間柄)	菌株	薬剤感受性 (16種類)	病原遺伝子			フィブリン分解	
				stx	eae	EAST		
1	M	患児	EC581	感受性	1, 2	+	-	+
2		父	EC582	感受性	1, 2	+	-	+
3	N	患児	EC613	感受性	2	+	+	+
4		母	EC614	感受性	2	+	+	+
5		弟	EC616	感受性	2	+	+	+

6	O	患児	EC626	中度耐性 (MINO)	2v	+	+	-
7		姉	EC629	中度耐性 (MINO)	2v	+	+	-
8	P	患児	EC631	中度耐性 (MINO)	2v	+	+	-
9	Q	患児	EC639	耐性 (MINO)	2v	+	+	-

図 1 事例 A 分離菌株の PFGE パターン

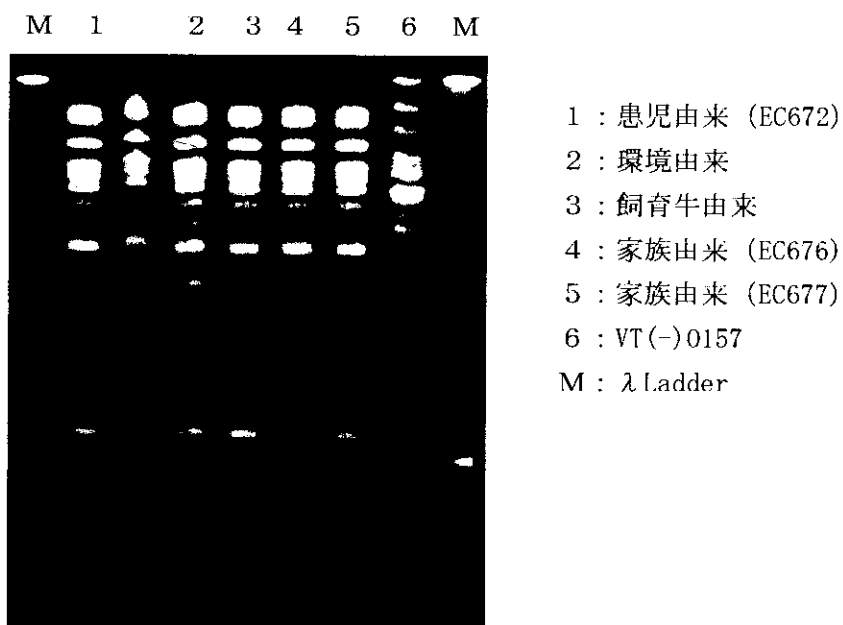


図 2 事例 B 分離菌株の PFGE パターン

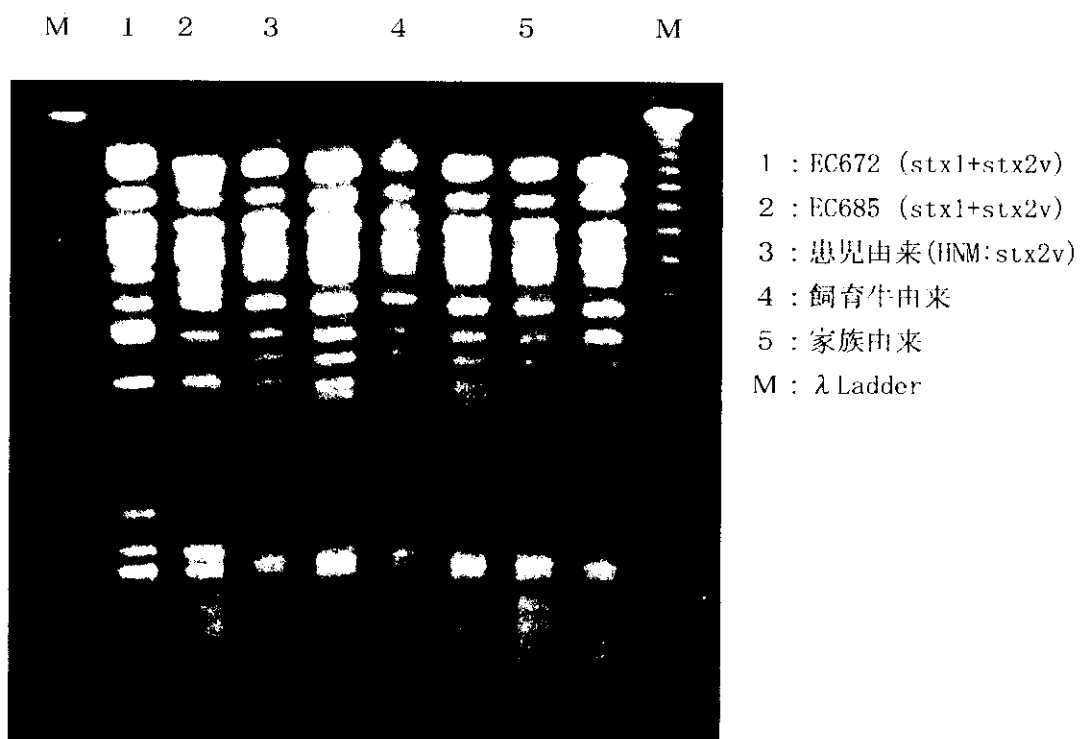
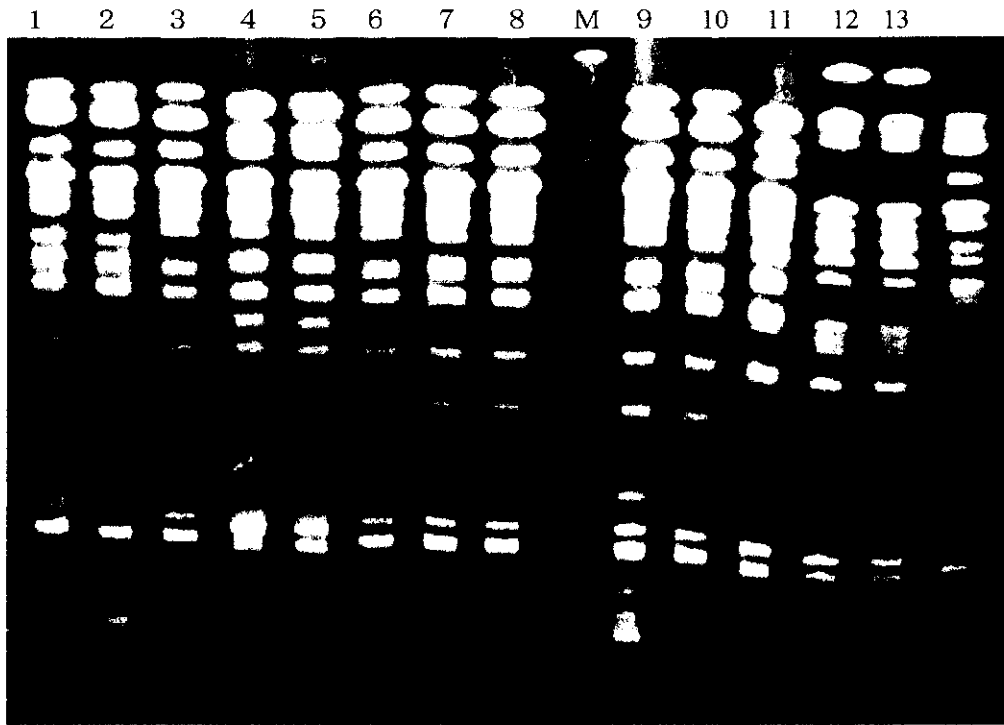


図3 STEC 0157菌株のPFGEパターン



- | | | |
|------------------|----------------------|------------------|
| 1 : C事例 (EC683) | 2 : D事例 (EC684) | 3 : E事例 (EC702) |
| 4 : F事例 (EC703) | 5 : G事例 (EC706) | 6 : H事例 (EC716) |
| 7 : I事例 (EC717) | 8 : I事例 (EC718) | 9 : J事例 (EC722) |
| 10 : J事例 (EC723) | 11 : K事例 (EC724) | 12 : L事例 (EC730) |
| 13 : L事例 (EC731) | M : λ Ladder | |