

表1. 平成12年に和歌山市を中心とした地域で発生した腸管出血性大腸菌O157感染事例

事例No.	発生日	形態	年齢	性別	症状	発病日	H型	stx型	薬剤耐性パターン	備考	
1	1月	散発	50	F	有	1/10	7	1&2			
2	3月	家族内	8	M	有	3/31	7	1&2		A 焼肉店 3/28 喫食	
			10	M	無	-	7	1&2			
3	5月	家族内	33	F	有	5/6	7	1&2			
			63	F	有	?	7	1&2			
			58	M	有	5/6	7	1&2			B 焼肉店 4/30 喫食
			14	F	有	5/5	7	1&2			
			18	M	有	5/5	7	1&2			
4	5月	家族内	9	F	有	5/7	7	2			
			37	F	無	-	7	2		C 焼肉店 5/4 喫食	
5	5月	家族内	62	F	無	-	7	2			
			?	F	無	-	7	2		C 焼肉店 5/3 喫食	
6	5月	家族内	7	M	有	5/11	7	2		D 焼肉店 5/7 喫食	
			?	F	無	-	7	2		(事例4及び5のC焼肉店と同一チェーン店)	
7	5月	家族内	7	F	有	5/17	7	1&2	ABPC・SM・TC	E 焼肉店 5/13 喫食	
			36	F	無	-	7	1&2	ABPC・SM・TC		
8	6月	家族内	2	M	有	6/18	7	1&2	ABPC		
			34	M	有	6/18	7	1&2	ABPC		
			2M	F	無	-	7	1&2	ABPC	F 焼肉店 6/17 喫食	
			39	M	無	-	7	1&2	ABPC		
			32	F	無	-	7	1&2	ABPC		
10	6月	散発	7	M	有	6/27	7	1&2	ABPC		
11	7月	散発	20	F	有	7/19	7	1&2	ABPC・SM		
12	7月	散発	57	F	有	7/25	7	2	ABPC		
13	8月	散発	23	F	有	8/4	7	1&2	ABPC		
14	8月	散発	22	M	有	8/8	-	2	ABPC		
15	8月	散発	22	M	有	8/15	7	2	ABPC	G 焼肉店 8/9 喫食	
16	11月	散発	24	M	有	11/10	7	2	ABPC・SM・TC	H 焼肉店 11/7 喫食	
17	11月	散発	23	M	有	11/30	7	2	ABPC		

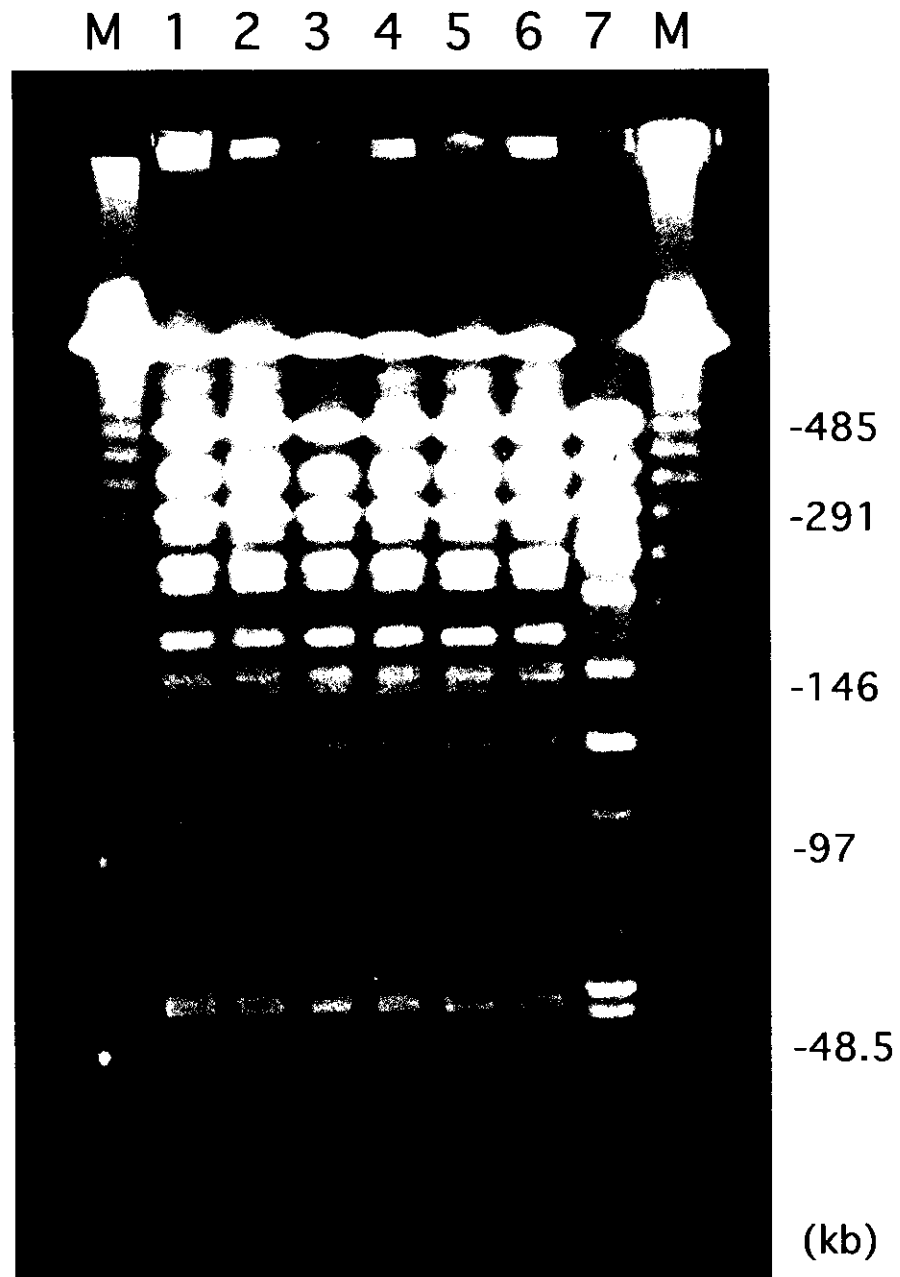


図1 Diffuse Outbreakであると推定された事例のPFGEパターン

レーン1～3：事例4

レーン4, 5：事例6

レーン6：事例5

レーン7：対照株（平成10年の集団感染事例由来）

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

腸管出血性大腸菌 O157 集団発生事例の遺伝学的解析

協力研究者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課主任研究員  
勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課主任研究員  
河原隆二 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課研究員  
分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課長

研究要旨

2000年に大阪府下で発生した2例のEHEC O157:H7の集団発生事例を、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と他の疫学マーカーで解析した。

事例1は、同一保育園の園児とその家族が散発的に発症したことから、集団発生とは考えられなかったが、検出された菌株の疫学マーカーが一致していたことにより、由来の同じ菌による集団発生であることが明らかとなった。

事例2は、キャンプの参加者13名中10名と不参加の家族1名からEHEC O157:H7が検出され、検出菌は症状の有無に関係なく疫学マーカーが一致する菌であったことから、感染源はキャンプの食材あるいは環境汚染が疑われた。家族の感染は発症時期が遅れており、キャンプ参加者からの二次感染と考えられた。PFGEを用いた遺伝学的解析法は菌株間の類似度を詳細に検討できるため重要であると考えられる。

A.研究目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)O157発生時に検出菌株の疫学マーカー解析を行うことは、菌株間の関連性をみるために重要である。本研究では2000年に大阪府下で発生した以下に示す2例のEHEC O157:H7の集団発生事例を、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と他の疫学マーカーで解析した成績を報告する。

事例1は、4月から5月にかけて、大阪府下のH保育園において園児4名と園児の家族4名からEHEC O157:H7が検出された事例であり、約4週間にわたって散発的に患者発生がみられたことから、患者相互の関連を考えるため分離された菌株について疫学マーカー解析を行った。

事例2は、8月にガールスカウト団が行

ったキャンプに参加した10歳の女児からEHEC O157:H7が検出されたことから、他の参加者12名と家族および接触者を調査したところ、他の参加者9名と、家族1名からEHEC O157:H7が検出され、初発患者を含めて11名の感染が明らかになった。このうち有症者は団員3名と家族1名で、7名は無症状であった。11名のEHEC感染の原因がキャンプであるかを確認するため、検出された菌株の疫学マーカー解析を行った。

B.研究方法

供試菌株は、事例1では園児4名由来の5検体(1名のみ2検体検査)と家族4名の4検体より分離した19株、事例2ではガールスカウト団員(小学生)7名、引率者(大人)3名、団員の妹(5歳、キャンプ不参

加) 由来の 11 株を使用した。

PFGE 法は、ゲルブロックの作成と電気泳動の条件は和田ら (和田昭仁 他: 細菌学誌 1997;52:763-775.) の方法で行った。DNA の切断には *BlnI* と *XbaI* を用い、電気泳動装置は Gene Navigator System (ファルマシア) で行った。

志賀毒素型別は、PCR 法と VTEC-RPLA キット (デンカ生研) で実施し、薬剤感受性試験は ABPC、SM、TC、CPFX、KM、CTX、CP、ST、TMP、GM、NA、FOM の 12 薬剤についてセンシディス (BBL) を用いて KB 法で行った。さらに付着に関与する遺伝子の *eaeA* の有無を PCR 法で確認した。プラスミドプロファイル型は、Kado and Liu 法の変法でプラスミド DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動後のパターンを比較した。

### C. 研究結果

事例 1 の 19 株はすべて志賀毒素 1+2 型で、薬剤に感受性、*eaeA* を保有し、プラスミドプロファイルは約 90、60、2.3kb を保有する型であった。PFGE の結果 (図 1) は、*XbaI* 切断で初発患者株 (レーン 1) と同じパターンの株が全員から検出されたが、3 名からは 1 ~ 3 バンド異なる株も同時に検出されていた。*XbaI* 切断で異なった株も *BlnI* 切断では全株同じパターンであり、他の性状も一致していることから区別のできない菌株であると考えられた。

事例 2 の 11 株はすべて志賀毒素 2 型で、薬剤に感受性、*eaeA* を保有し、プラスミドプロファイルは約 90、60kb を保有する型であった。PFGE の結果は (図 2) キャンプに参加した団員と引率者由来の 10 株は全く同一のパターンを示し、団員の妹由来株 (レーン 11) は、*XbaI* 切断でやや大きいサイズ (バンド a) が 1 本多く、*BlnI* 切断でバンド b が多くバンド c がみられなかったこと以外は同じパターンを示した。

### D. 考察

事例 1 は、初発患者の発症から 8 人目の感染者 (園児の家族) の発症までの 4 週間間に断続的に患者発生があり、集団発生とは考えられなかったが、検出された EHEC O157:H7 の疫学マーカーが一致していたことにより、由来の同じ菌による集団発生であることが明らかとなった。

事例 2 は、キャンプの参加者 13 名中 10 名から EHEC O157:H7 が検出され、検出菌は症状の有無に関係なく疫学マーカーが一致する菌であったことから、感染源はキャンプの食材あるいは環境汚染が疑われた。家族 1 名の感染は、発症時期が遅れており、キャンプに参加して感染した姉からの二次感染と考えられた。

### E. 結論

複数の患者発生時に、検出菌株の疫学マーカー解析により得られた成績は、患者相互の関連を推察するための有用な情報となる。特に PFGE を用いた遺伝学的解析法は菌株間の類似度を詳細に検討できるため重要であると考えられる。

### F. 研究発表

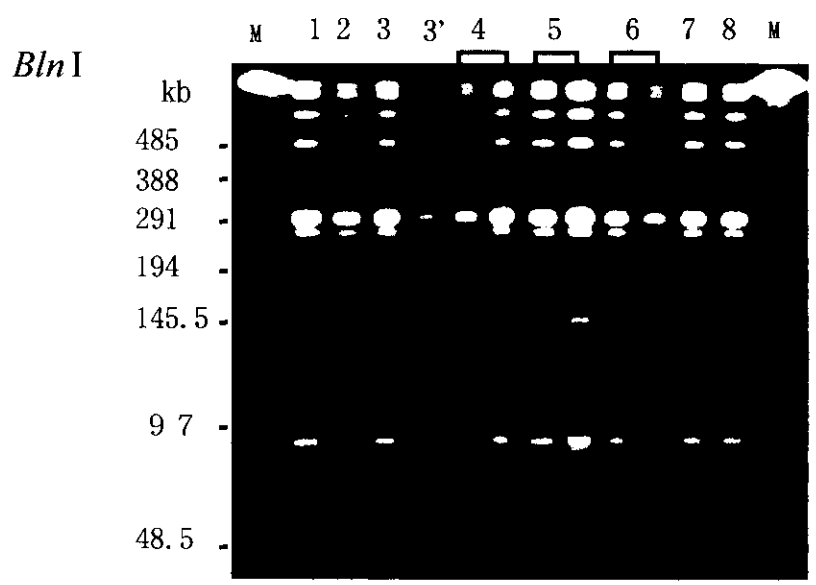
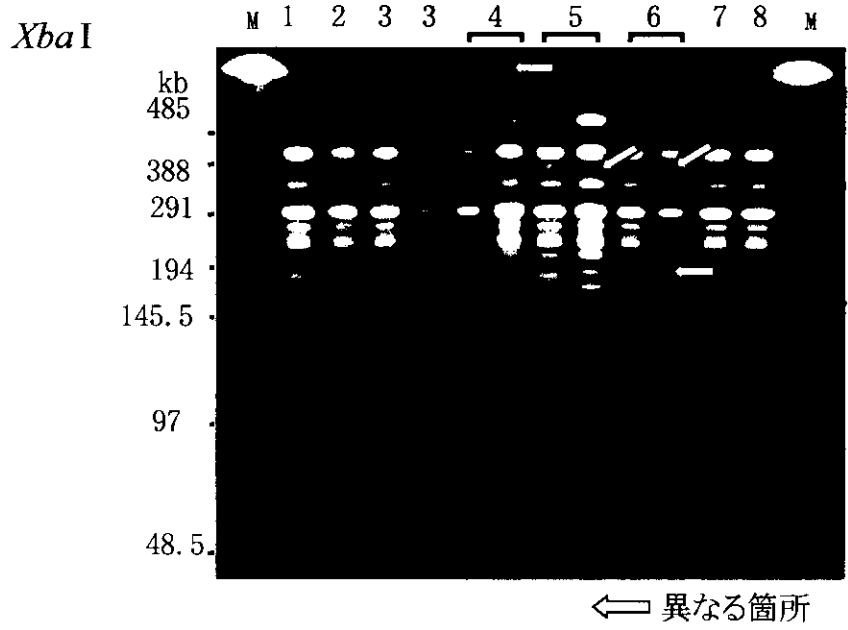
#### 1. 論文発表

勢戸和子、田口真澄、河原隆二、小林一寛 : ガールスカウト夏期キャンプにおける腸管出血性大腸菌 O157:H7 の集団発生事例、病原微生物検出情報、21:271-272 (2000)

#### 2. 学会発表

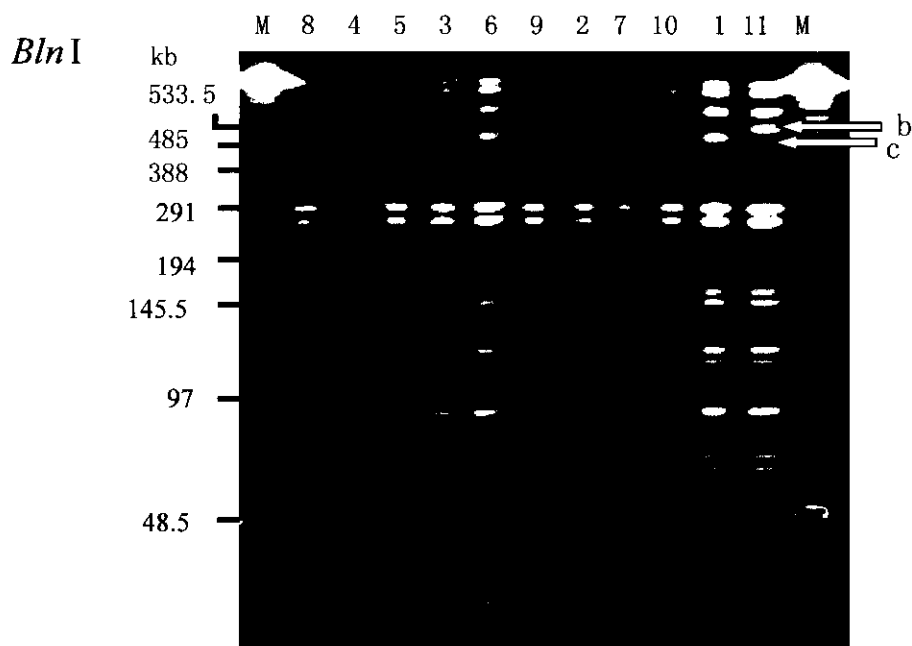
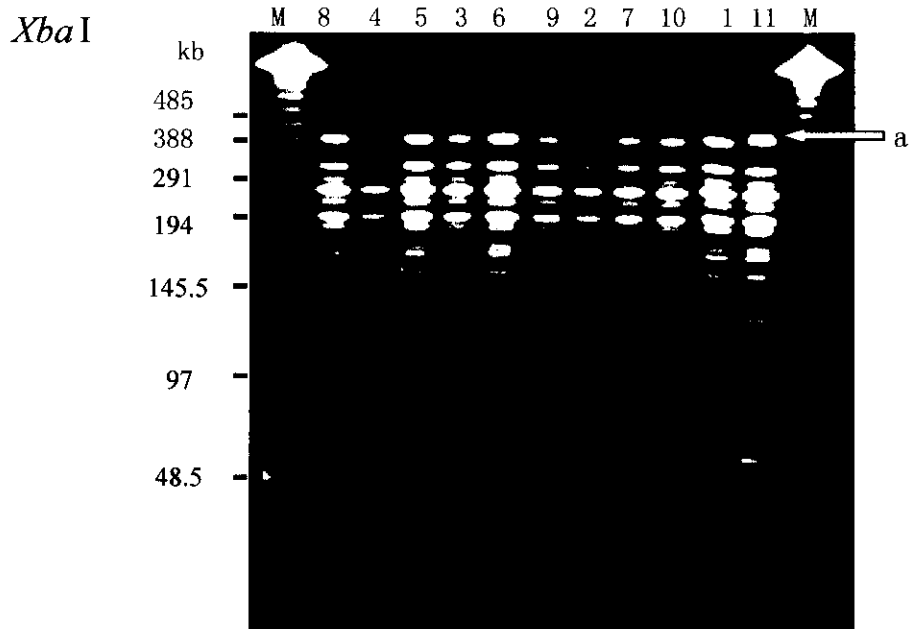
勢戸和子、田口真澄、河原隆二、小林一寛 : STEC O157 および O26 集団発生事例の疫学解析、第 43 回日本感染症学会中日本地方会総会 (2000 年 11 月、岐阜)

田口真澄、勢戸和子、河原隆二、小林一寛 : 腸管出血性大腸菌 O157 と O26 集団発生事例の遺伝子解析、第 40 回感染性腸炎研究会総会 (2001 年 3 月、東京)



- 1,3,5,7 : 園児由来株
- 2,4,6,8 : 家族由来株
- 3' : 園児3の2回目検出株
- M : Lambda ladder

図1 事例1のPFGEパターン



← 異なる箇所

- 1 : 初発患者由来株
- 2-7 : 団員由来株
- 8-10 : 引率者由来株
- 11 : 家族由来株
- M : Lambda ladder

図2 事例2のPFGEパターン

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

散発下痢症患者由来サルモネラの分子疫学的解析

協力研究者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課主任研究員  
勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課主任研究員  
河原隆二 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課研究員  
分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所 微生物課長

研究要旨

イカ乾製品を原因とするサルモネラ食中毒事例が全国で発生する以前に、散発下痢症患者の調査では食中毒の原因菌である*S.Oranienburg*と*S.Chester*の検出数が増加しており、これらの散発事例由来株と食中毒事例の関連をみるためPFGE法による解析を実施し、また食中毒の発生時期と異なる時期に分離した菌株との比較を行った。その結果、1998年12月から1999年5月に分離された両血清型菌は食中毒関連菌株と同一であることが明らかとなり、散発事例株もイカ乾製品を原因とする食中毒に関与した菌株であると推察された。また過去に分離された菌株や、食中毒が終息した後に分離された菌株とは異なっていた。

A. 研究目的

イカ乾製品を原因とするサルモネラ食中毒が1999年3月の川崎市での発生に端を発し、全国各地で患者発生がみられ、調査の結果*S.Oranienburg*と*S.Chester*の複数菌による感染であることが明らかになった。当所の散発下痢症患者の調査では1998年12月に*S.Chester*が検出され、1999年になり同血清型の増加とともに*S.Oranienburg*の検出数も増加しdiffuse outbreakの可能性が考えられた。そこで散発事例由来の2血清型菌株について食中毒事例との関連をみる目的でパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による解析を行い、さらに食中毒発生以前に分離された菌株と、以後に分離された菌株との比較も行った。

B. 研究方法

供試菌株：1999年1月から5月に発生した散発事例由来*S.Oranienburg* 20株（イカ乾製品喫食4、不明16）、1998年12月から1999年5月に発生した散発事例由来*S.Chester* 21株（イカ乾製品喫食1、不明20）と、1999

年4月の集団発生由来*S.Oranienburg* 10株、そして1998年10月以前に分離された*S.Oranienburg* 7株と*S.Chester* 5株、1999年9月以降に分離された*S.Oranienburg* 2株（1株は海外渡航者由来）と*S.Chester* 1株（海外渡航者由来）の合計66株を用いた（表1）。PFGE法：ゲルブロックの作成は和田ら（和田昭仁 他：細菌学誌1997;52:763-775.）の方法で行い、DNAの切断には*BlnI*と*XbaI*を用いた。電気泳動装置はGene Navigator System（ファルマシア）を使用し、1%アガロース、200V、パルスタイム5～50秒で22時間電気泳動した。

生物学的解析方法：生化学的性状、薬剤感受性試験を実施した。薬剤感受性試験はABPC、SM、TC、CPFX、KM、CTX、CP、ST、TMP、GM、NA、FOMの12薬剤についてセンシディスク（BBL）を用いてKB法で行った。

C. 研究結果

*S.Oranienburg*：供試した39株は薬剤に感受性であった（表2）。1999年1月から5月に分離された集団発生由来10株と散発事例

由来 20 株は、イノシット非分解で *BlnI* 消化した PEGE 型は同一 (SOB-1、図 1 レーン 8,9 のパターン) であった。*XbaI* 消化の PFGE 型では 30 株中集団発生由来株を含む 23 株が同一 (SOX-1、図 2 レーン 8,9 のパターン) であり、7 株の散発事例由来はそれに約 580kb のバンドが 1 本付加された型 (SOX-1a、図 2 レーン 12) を示した。

1998 年 10 月以前の 7 株は、1 株がイノシットを分解し、PFGE 型は 7 株とも他の株と異なっていた (図 1,2 レーン 1~7) が、1992 年に分離されたレーン 4 の菌株は、1999 年の集団発生株と *BlnI* 消化で、約 350kb と 620kb、*XbaI* 消化で約 60kb と 620kb のバンドのみの違であり、パターンが類似していた。また 1999 年 9 月以降の 2 株のうち 1 株はイノシットを分解し、2 株とも PFGE 型は集団発生株と異なっていた (図 1,2 レーン 10,11)。

*S.Chester* : 供試した 27 株は薬剤に感受性であった (表 3)。1998 年 12 月から 1999 年 5 月に分離された 21 株はリジン脱炭酸陰性というサルモネラの例外的な性状を示し、*BlnI* 消化の PEGE 型は同一 (SCB-1、図 3 レーン 6~9 のパターン) であった。*XbaI* 消化の PFGE 型ではイカ乾製品喫食歴のある患者由来株を含む 18 株が同一 (SCX-1、図 4 レーン 6 のパターン) で、他の 3 株のうち 2 株はバンドが 1 本付加された型 (SCX-1a、SCX-1b、図 4 レーン 7,8) であった。もう 1 株は約 150kb と 250kb のバンドが欠損し、400kb のバンドが多い型 (SCX-1c、図 4 レーン 9) であった。これに対し 1991 年から 1992 年と 1999 年 9 月の株は、リジン脱炭酸陽性で、PFGE 型も異なっていた (図 3,4 レーン 1~5,10)。

#### D. 考察

1998 年 12 月から 1999 年 5 月に分離された両血清型菌のうち *XbaI* 消化の PFGE 型で 1 バンドの付加がみられた株が *S.Oranienburg* で 7 株、*S.Chester* で 2 株認められた。これらの菌株は *BlnI* 消化では同時期に分離された菌株と違いがなく、生化学的性状も一致し

ていたことから同時期の他の株と同一であると考えられた。

Tenover ら (Tenover FC et al. J.Clin.Microbiol. 1995;33:2233-2239.) は、集団発生事例の解析を想定し、原因となった菌株から生じる PFGE パターンの変化の例を示して、菌株の関連性を判断する方法を提案している。*S.Chester* の *XbaI* 消化で 3 バンド異なった菌株の解釈を Tenover らの提案に従うと、約 400kb のバンド上に存在する *XbaI* を認識する部位の消失によってバンドが切断されず残ったため、2 つの小さなバンドが認められなくなったと推定され、同時期に分離されている菌株との区別はできないと考えられた。またこの菌株も、*BlnI* 消化では同時期の分離株と差がなく、リジン脱炭酸陰性の性状を示していたことから、同時期の株と同一であると考えられた。

*S.Oranienburg* で 1992 年分離株と、1999 年の集団発生株の PFGE パターンが類似していたが、分離年に差があり関連があるとは考えられなかったが、PFGE 以外の疫学マーカーを用いてより詳細に検討する必要がある。このようなサルモネラの疫学マーカーによる解析には遺伝学的解析方法と、生物学的解析方法を組み合わせて行い、疫学調査成績との整合性をはかり総合的に判断することが重要である。

#### E. 結論

PFGE 法による解析結果から、1998 年 12 月から 1999 年 5 月に分離された *S.Oranienburg* と *S.Chester* は同一であることが明らかとなり、散発事例由来の両血清型はイカ乾製品を原因とする食中毒に関与した菌株であると推察された。そして、過去に分離されていた菌株や、食中毒が終息した後に分離されている菌株とは関連がないと考えられた。

#### F. 研究発表

なし。



表1 供試菌株

患者発生月	<i>S. Oranienburg</i>		<i>S. Chester</i>		合計	
	患者・保菌者	食品	患者・保菌者	食品		
1991年～				1		
1998年10月	7		4	(鶏肉)	12	
1998年	12月		1		1	
1999年	1月	1	1		2	
	2月	2	4		6	
	3月	16*	10		29	
	4月	6	4	3*	10	
	5月	2	1		3	
1999年9月以降		2	1		3	
合計		36	3	26	1	66

\*集団発生事例由来株を含む（患者7株，おやつちんみ3株）

表2 *S. Oranienburg* の性状

検出年	菌株数 (イカ菓子喫食歴)	イノシット 分解	薬剤 感受性	PFGE		
				<i>BlnI</i>	<i>XbaI</i>	
1999年 (1～5月)	集団発生	10				
	散発(あり)	4	陰性	感受性	SOB-1	SOX-1
	散発(不明)	9				
	散発(不明)	7				SOX-1a
1991～98年	6	陰性				
	1	陽性	感受性	SOB-1	SOX-1	
1999年9月以降	1	陰性		と異なる	と異なる	
	1	陽性				

表3 *S. Chester* の性状

検出年	菌株数 (イカ菓子喫食歴)	リジン 脱炭酸	薬剤 感受性	PFGE		
				<i>BlnI</i>	<i>XbaI</i>	
1998年12月～	散発(あり)	1			SCX-1	
	散発(不明)	17				
1999年5月	散発(不明)	1	陰性	感受性	SCB-1	SCX-1a
	散発(不明)	1				SCX-1b
	散発(不明)	1				SCX-1c
1991～1992年	5					
1999年9月	1	陽性	感受性	SCB-1	SCX-1	と異なる と異なる

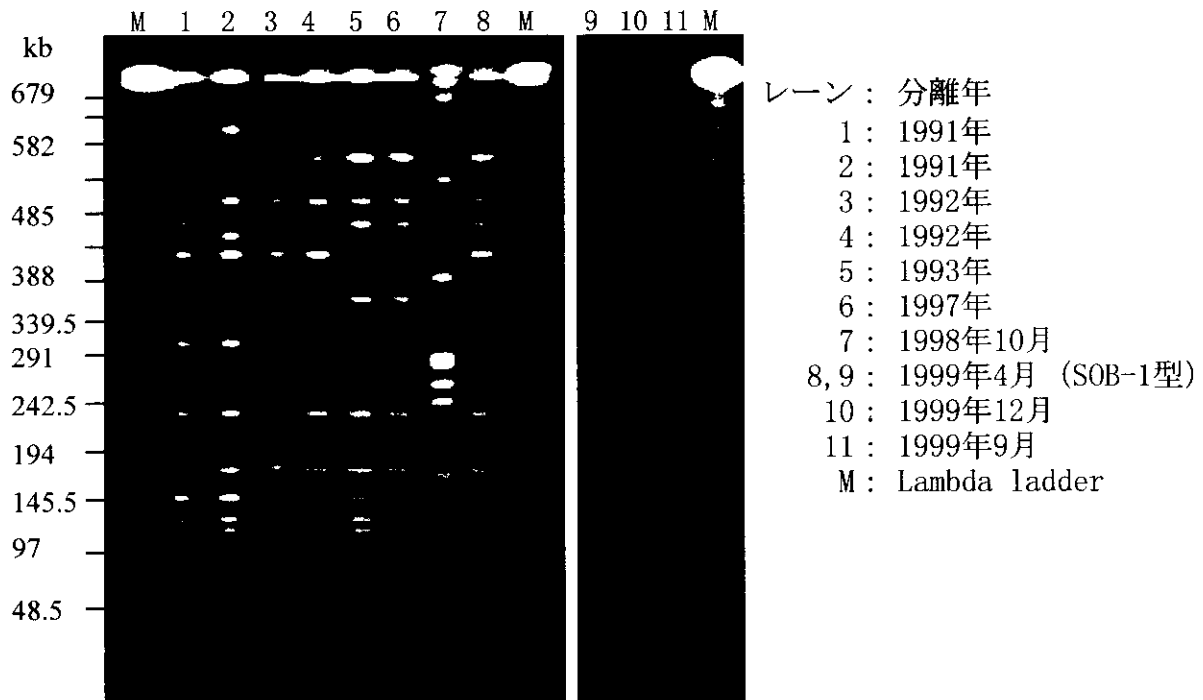


図1 *S. Oranienburg* の *BlnI* 切断パターン

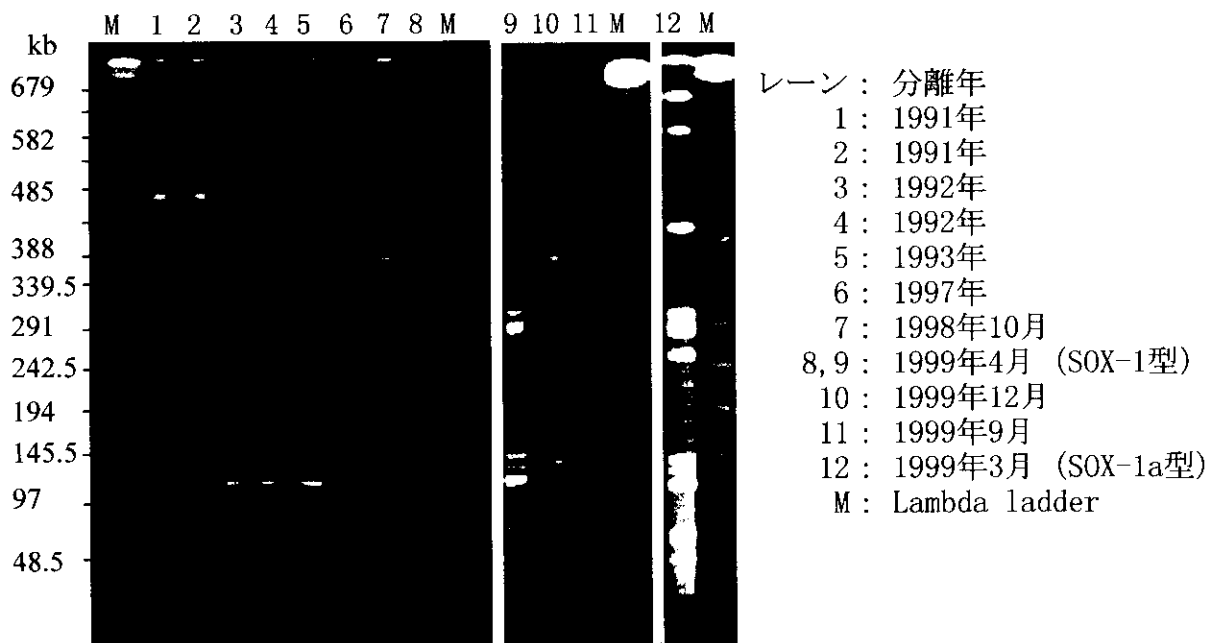


図2 *S. Oranienburg* の *XbaI* 切断パターン

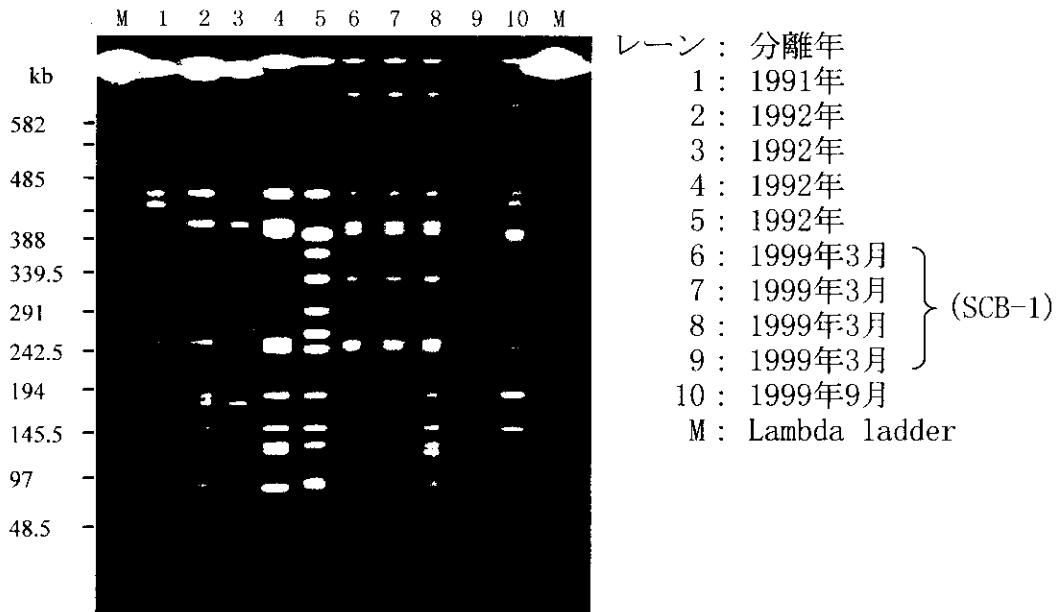


図3 *S. Chester* の *Bln*I 切断パターン

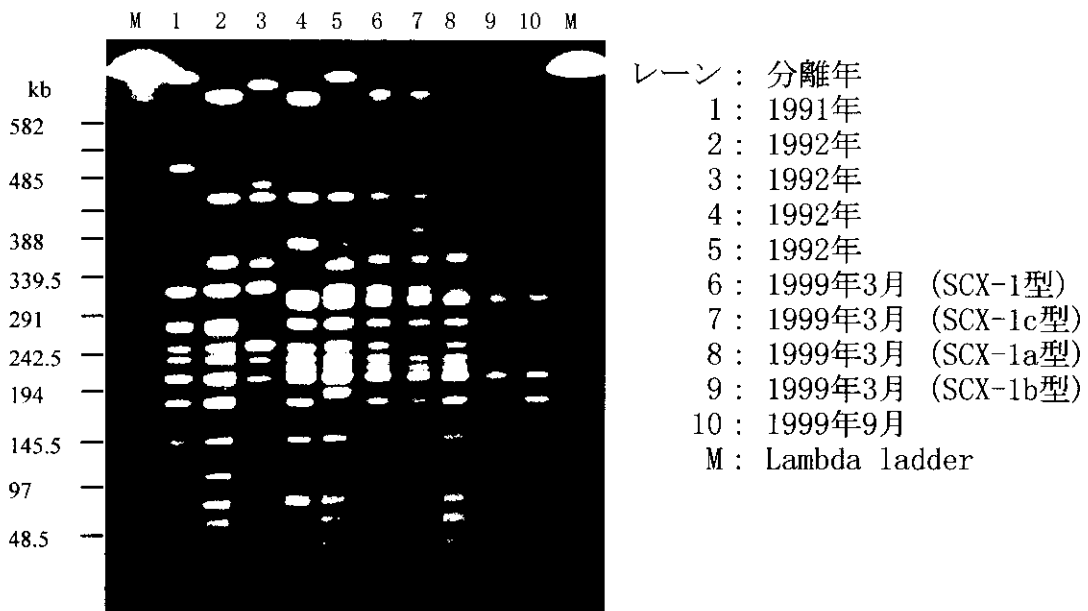


図4 *S. Cester* の *Xba*I 切断パターン

## 分担研究報告書

### パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) の標準化及び画像診断を基盤 とした分散型システムの有効性に関する研究 —平成 12 年度の成績—

分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所

#### 研究要旨

2000 年 10 月に愛媛県今治市の寿司店を感染源とし、西日本各地に患者の発生が認められたソネ菌による集団赤痢に際して、本事例の疫学調査を目的として、PFGE による DNA 解析を行った。その結果、PFGE による DNA 解析は赤痢菌においても、由来を異にする分離株の比較に有用であることがわかった。

さらに、パルスネットシステム構築のための基礎的資料を得るため、6 ヶ所の地方衛生研究所において、同一の赤痢菌株を統一した方法により PFGE を実施し、その画像を比較検討したところ、4 施設では概ね同様な画像が得られた。しかし、2 施設の画像は比較することができなかつた。また、同一菌株の画像でも施設により差異が認められるケースもあり、今後、さらに技術の均一化を図る必要があると考えた。

#### A. 研究目的

PFGE による細菌の DNA 解析は感染症の疫学調査に有効な手段であり、わが国では、腸管出血性大腸菌 O157 に汚染されたイクラやサルモネラに汚染されたイカ菓子による散在的集団発生事例 (diffuse outbreak) の感染源究明調査に応用され、その有用性が広く知られるところとなった。一方、この PFGE により解析された DNA パターンの画像をコンピューターに取り込み、インターネットにより地方衛生研究所と国立感染症研究所間で、その情報を迅速かつ正確に解析、検討すること (PFGE のネットワーク化、パルスネットシステム) は、diffuse outbreak の拡大防止に役立つことが期待できるため、パルスネットシステムの構築が考えられている。

本研究では、2000 年 10 月に愛媛県今治市

の寿司店を感染源として、西日本を中心に患者の発生がみられた赤痢の集団発生事例に際して、赤痢菌における PFGE 解析法の有用性を確認するため、従来から行われている疫学的検査 (血清型別、コリシン型別、薬剤耐性パターン) に加えて、PFGE による DNA 解析を実施した。さらに、パルスネットシステム構築のための基礎的資料を得ることを目的に、赤痢患者発生県の衛生研究所と連携して、各施設における PFGE の精度を比較検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 集団赤痢の概要

愛媛県越智郡内の専門学校の生徒 7 名が平成 12 年 10 月 16 日夜半から 17 日未明にかけ

て発熱、下痢、腹痛、全身倦怠感を訴え、10月17日、今治市内の医院を受診(3名が入院)した。診察した医師は、患者全員が市内の寿司店で寿司を食べていたことより食中毒の疑いが高いと判断し、保健所に通報した。保健所は、発症した学生4名(入院患者を除く)と寿司店従業員2名の喫食状況等の調査や検便を行うとともに寿司店の調査を実施した。10月18日、保健所は食中毒(疑い)が発生したことを公表、10月19日には学生、従業員の計6名から赤痢菌(ソネ菌)が分離されたので、同店を起因とした集団食中毒と断定した。

患者の発症状況等から暴露日は14日から19日(16日休業)の5日間と推測し、10月1日以降の同店での喫食者の把握と検便及び二次感染防止対策を講じた。その結果、13日までの喫食者から発症者は認められなかった。14日から19日の5日間に寿司店で寿司を食べた人数は205名で、患者数は103名であった。一方、感染症法に基づく赤痢患者等の届け出は10月19日から10月28日までに61名あり、その内訳は県内在住者43名、県外在住者18名(愛知県1、大阪府1、兵庫県3、島根県4、岡山県2、広島県5、高知県1、大分県1の1府7県)であった。この61名の内訳は、赤痢患者37名、疑似症患者17名(うち4名については診断後に菌検出)。無症状保菌者7名であった。患者等の発生状況、喫食調査、細菌学的検査の結果から、赤痢菌に感染した寿司店従業員の握った寿司を喫食することにより拡大したことが判明したが、従業員への感染経路については特定することができなかった。

## 2. PFGEによる赤痢菌のDNA解析

### 1) 供試菌株

*Shigella sonnei*のうち上記集団発生事例に関連した愛媛県内在住者から分離された6株(今治159, 今治163, 今治164, 今治165, 今治168, 今治171)、および県外在住者から分離され5株(高知192, 広島県200, 島根207, 広島市211, 岡山227)。

上記集団発生事例とほぼ同時期に静岡県と福岡県で発生した集団赤痢患者から分離された*Shigella sonnei* 2株(静岡197, 福岡205)。

1996年から1998年にかけて東南アジア方面から帰国した下痢患者から分離された*Shigella sonnei* 5株(愛媛180, 愛媛181, 愛媛179, 愛媛70, 愛媛126)。

### 2) 血清型別

市販の赤痢菌免疫血清(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。

### 3) コリシン型別

福岡県保健環境研究所へ依頼し、実施した。

### 4) 薬剤耐性試験

アンピシリン(ABPC)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、シプロフロキサシン(CPFX)、カナマイシン(KM)、セフトキシム(CTX)、クロラムフェニコール(CP)、ST合剤(ST)、トリメトプリム(TMP)、ゲンタマイシン(GM)、ナリジクス酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)の12薬剤に対する耐性試験をKB法により行った。

### 5) PFGEによるDNA解析

PFGEによるDNA解析は制限酵素 *Xba*I (ベーリンガー)、*Bln*I (ベーリンガー)、*Sfi*I (ベーリンガー)を用い、感染研によって示

された腸管出血性大腸菌O157の解析法（腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術研修会マニュアル）に準拠して実施した。泳動はCHEF-Mapper(Bio-Rad)を使用し、6V/cm, 4・8sec 12時間, 8・50sec 10時間（感染研によって示されたO157解析の条件）と6V/cm, 5・50sec 21時間（我国におけるパルスネット構築のための緊急研究で寺嶋によって示された赤痢菌解析の条件）の2つの泳動条件を設定した。

### 3. 各施設でのPFGE精度の比較検討

パルスネットシステム構築にあたり、その技術的問題点を検討するため、6ヶ所の地方衛生研究所間で同一の赤痢菌菌株を用いて、できるかぎり統一した方法でPFGEを実施し、精度を検討した。

#### 1) 供試菌株

愛媛県立衛生環境研究所から次の6株を各施設に送付し、PFGEを実施した。

今治 163 : *Shigella sonnei* II相（寿司店従事者由来株）

今治 165 : *Shigella sonnei* I相（県内在住患者由来株）

愛媛 70 : *Shigella sonnei* I相（海外帰国者由来株）

愛媛 126 : *Shigella sonnei* I相（海外帰国者由来株）

愛媛 179 : *Shigella sonnei* I相（海外帰国者由来株）

愛媛 180 : *Shigella sonnei* I相（海外帰国者由来株）

#### 2) PFGEの実施条件

PFGE装置は、各施設の既設のものを用いたが、供試菌株の菌量の調製、制限酵素、泳動条件については統一した方法により実施し

た。それ以外の試薬、検査手技等は感染研によって示されたO157の解析法に準拠した。菌量の調製

トリブチックソイブイオンに接種後、37°Cで一昼夜培養、培養液100ulをチューブにとり遠心、遠心後、上清を除き蒸留水50ulを加え均一にする。この菌液に1%アガーローズ（Chromosomal Grade Agarose, Bio-Rad）50ulを加え懸濁し、plug moldに流しこみ、冷蔵庫で固まらせた。

#### 制限酵素

ベリーリンガー製の*Xba*I、*Bln*Iを使用した。

#### 泳動条件

泳動条件は電圧6V/cm、パルスタイム5・50sec、21時間後、温度12°Cに設定した。泳動後、画像を写真撮影し、目視により解析、比較した。

## C. 研究結果

### 1. 分離株の菌学的特性

今回の集団赤痢で県内在住者から分離された6株はすべてソンネ菌であった。そのうち2株（今治163, 今治171）はII相菌であったが、他はI相菌であった。また、コリシン型はすべて13Aに型別され、薬剤耐性試験でも同一パターン（TC, SM, TMP, STの4剤耐性）であった。一方、今回の集団赤痢と関連性があるとされた県外在住者から分離された菌株の血清型、薬剤耐性パターンを調べたところ、県内在住者由来株と同一パターンを示した。しかし、同時期に静岡県と福岡県で分離されたソンネ菌（静岡197, 福岡205）では、薬剤耐性試験において福岡株が愛媛株と同じであったものの、静岡株は5剤耐性菌（ABPC,

TC, SM, TMP, ST 耐性) であり、コリシン型でも両菌株は 9A (静岡株)、14 (福岡株) であった。海外帰国者由来菌については、コリシン型別を実施していないが、薬剤耐性試験では 4 剤耐性菌 (TC, SM, TMP, ST 耐性) 2 株 (愛媛 179, 愛媛 70) と 3 剤耐性菌 (SM, TMP, ST 耐性) 2 株 (愛媛 180, 愛媛 181) であった。

## 2. PFGE による DNA 解析

県内在住者由来株 6 株と海外帰国由来株 5 株の DNA 解析画像を図 1 に示した。制限酵素 *Xba*I と *Bln*I を用いて、O157 の泳動条件で実施した PFGE パターンである。海外帰国者由来株はそれぞれ異なった PFGE パターンを示したが、集団赤痢に関連がある県内在住者由来の 6 株はほぼ同一のパターンであった。

上記供試菌株のうちから 4 株 (愛媛 180, 愛媛 179, 今治 163, 愛媛 70) を選び、3 種類の制限酵素 (*Xba*I, *Bln*I, *Sfi*I) を用いて、寺嶋によって示された泳動条件で PFGE を実施した結果を図 2 に示した。この泳動条件でもソネ菌はそれぞれ異なったパターンを示し、DNA 解析が可能であることがわかった。また、2 種類以上の制限酵素を用いることにより類似した菌株間でのバンドの差異が明確になった。

一方、県外在住者由来株と県内在住者由来株の DNA 解析画像を図 3 に示した。高知県、広島県、島根県、広島市、岡山県で分離された菌株は県内在住者由来株と同一の PFGE パターンを示したが、静岡県および福岡県で分離された各施設間での PFGE 精度の比較検討菌株はパターンを異にした。

## 3. 各施設間での PFGE 精度の比較検討

6 施設で実施した PFGE の画像を図 4~9 に示した。B 施設の画像 (図 5) は DNA の分離、泳動が十分でなく、F 施設の画像 (図 9) では、DNA は分離されているもののバンドがゲルからはみ出る現象が見られ、他の 4 施設の画像と比較することができなかった。4 施設の画像は概ね同様なパターンで比較できたが、菌株および施設によりバンドのパターンに差異が認められる場合があった。たとえば、C 施設において今治 163 を *Bln*I で切断した場合の画像 (図 6, ライン 4) では、他の施設で認められないバンドが出現した。また、A 施設において愛媛 179 を *Bln*I で消化した場合の画像 (図 4, ライン 7) では他の施設で認められたバンドが出現しなかった。さらに、非常に接近したバンドや薄いバンドでは間隔が不明瞭となり比較しにくい場合もあった。これらの差異は技術的な問題によるものと考えられた。一方、喫食調査や他の疫学的解析結果から同一由来と考えられる今治 163 と今治 165 の菌株間では D 施設の *Xba*I での PFGE において、今治 163 にバンド 1 本程度の欠損があった (図 7, ライン 6, 7)。このことは A 施設の PFGE でも見られた。この原因として、今治 163 は II 相菌に変異しており、変異により差異が生じたものと推察された。

## D. 考察

ソネ菌による赤痢の疫学調査では、従来から疫学マーカーとしてコリシン型や薬剤耐性パターンが用いられている。しかし、コリシン型はプラスミット支配のため疫学マーカーとして信頼性が少なく、薬剤耐性パターンは偏りがあるため、疫学調査には限界があるといわれている。今回、これら従来からの

疫学マーカーを調べる方法に加えて、より詳細な疫学的解析を目的に、PFGEによるDNA解析を行った。PFGEで使用した制限酵素はO157の解析に現在使用されている *Xba*I に加えて *Bln*I を用い、泳動条件も O157 の条件の他に、寺嶋によって示された方法を設定したところ、いずれの制限酵素、泳動条件でも PFGE パターンは 10 数本以上のバンドが観察され、菌株間の比較が可能であった。その結果、海外帰国者由来株はすべて異なった PFGE パターンを示し、今回の集団赤痢に関連したとされる患者から分離された菌株は、県内在住者由来株、県外在住者由来株ともほぼ同一のパターンであった。また、同時期に静岡県と福岡県で分離された菌株は PFGE パターンを異にすることから、両県の集団赤痢と愛媛県の事例とは関連性がないと推察された。以上のようなことから、PFGE による DNA 解析は赤痢の疫学調査にも有用であることが確認された。

瀬戸内海に掛る本四架橋の開通以来、本州と四国の間には人の移動、物の流れが瞬時に行われるようになった。今回の集団赤痢も愛媛県を含め 1 府 8 県に 62 名の患者が発生した。このように広域的に患者が発生した事例では PFGE を用いたパルスネットシステムが発生の早期発見に役立つと考える。しかし、パルスネットシステム構築のためには、各施設の技術的均一化を図る必要があるため、今回 6 施設で同一菌株を用いて PFGE を実施し、その精度を検討した。PFGE の画像が比較できなかった B 施設の画像では DNA の分

離、泳動が十分でなかったと思われ、F 施設の画像では泳動条件の設定、泳動装置に問題があったのではないかと推察された。4 施設の画像はおおむね比較できたが、施設や菌株によりバンドのパターンに差異が認められる場合や不明瞭なバンドパターンを生じる場合が見られた。菌株の変異によると推察されるバンドの差異の場合には、PFGE 以外の疫学的解析法を加味することで補うことができると思われるが、技術的な問題によるバンドの差異をなくすためには、PFGE の均一化とそれに伴う精度管理を行うことで解決しなければならないと考える。

#### E. 結論

制限酵素 *Xba*I と *Bln*I を用いた PFGE による DNA 解析は、赤痢菌 (ソネ菌) の疫学的解析手法として有用であることが確認された。また、パルスネットシステムを構築するには、PFGE の標準化とその精度管理が必要と考えた。

#### F. 研究発表

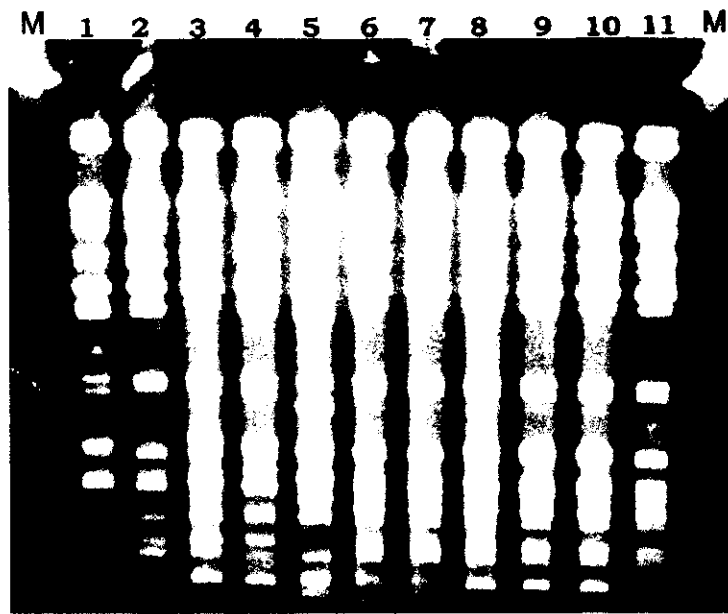
本研究の内容は未発表

#### G. 研究協力者

島根県衛生環境科学研究所	保科 健
広島県保健環境センター	榎 美代子
広島市衛生研究所	河本 秀一
高知県衛生研究所	安岡 富久
愛媛県立衛生環境研究所	芝 美和
福岡県保健環境研究所	堀川 和美



XbaIによるPFGE



BlnIによるPFGE

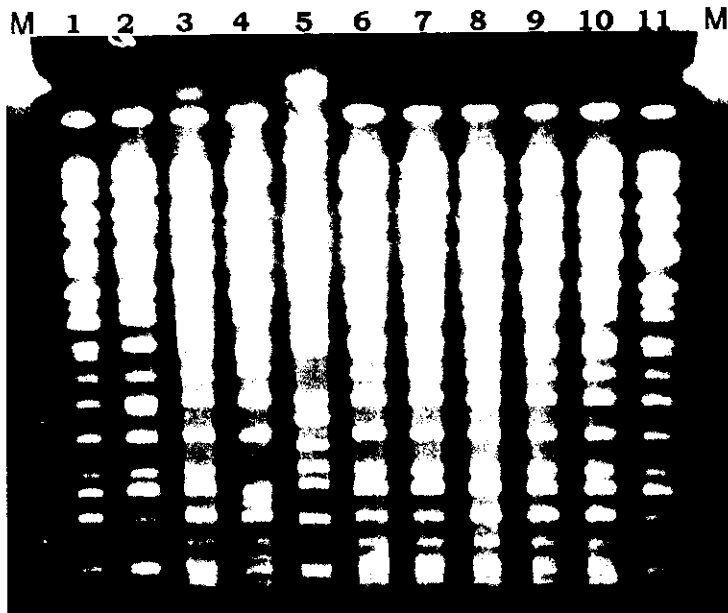


図1 海外帰国者由来株と県内在住者由来株のPFGEパターン

供試菌株

M: λ Ladder	6:今治 159(患者)
1:愛媛 180(ミャンマー 98)	7:今治 163(すし店従事者)
2:愛媛 181(タイ 98)	8:今治 164(すし店従事者)
3:愛媛 179(タイ 97)	9:今治 165(患者)
4:愛媛 70(インド 96)	10:今治 168(患者)
5:愛媛 126(インド、ネパール97)	11:今治 171(患者)

泳動条件

感染研によって示されたO157の泳動条件

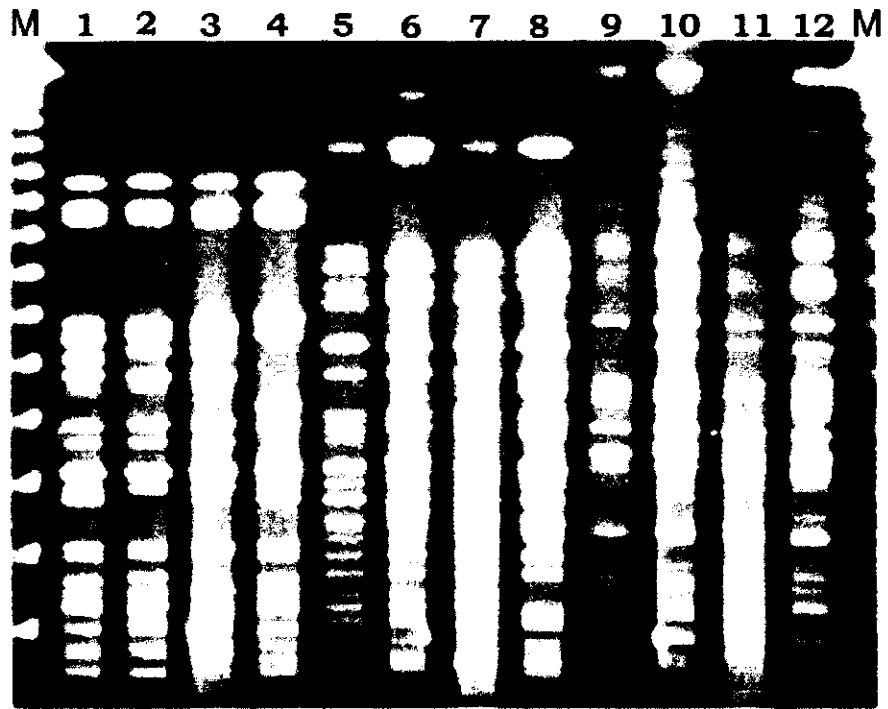


図2 3種類の制限酵素を用いて寺嶋の泳動条件でPFGEを実施した時のパターン  
供試菌株

M:  $\lambda$  Ladder

1:愛媛 180	5:愛媛 180	9:愛媛 180
2:愛媛 179	6:愛媛 179	10:愛媛 179
3:今治 163	7:今治 163	11:今治 163
4:愛媛 70	8:愛媛 70	12:愛媛 70

制限酵素

*Xba*I (1~4)

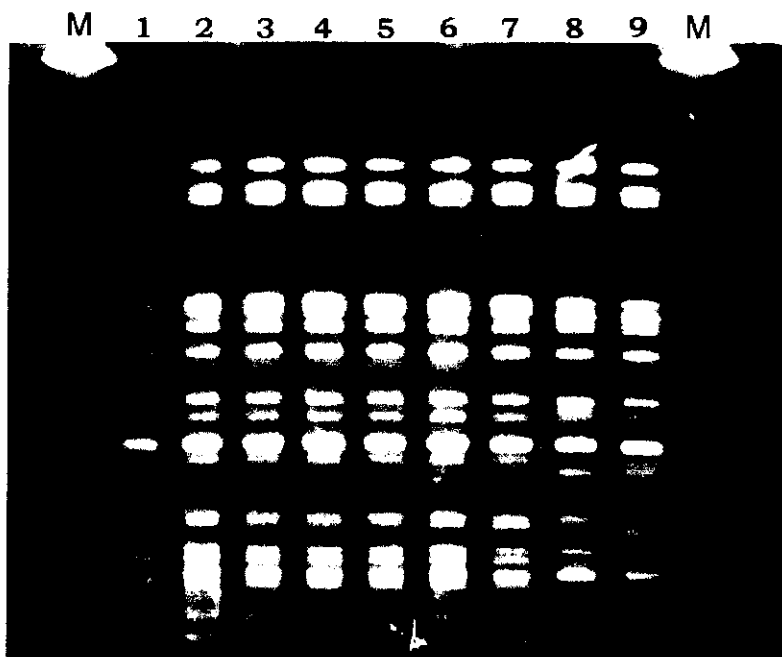
*Bln*I (5~8)

*Sfi*I (9~12)

泳動条件

寺嶋によって示された赤痢菌の泳動条件

XbaIIによるPFGE



BlnIIによるPFGE

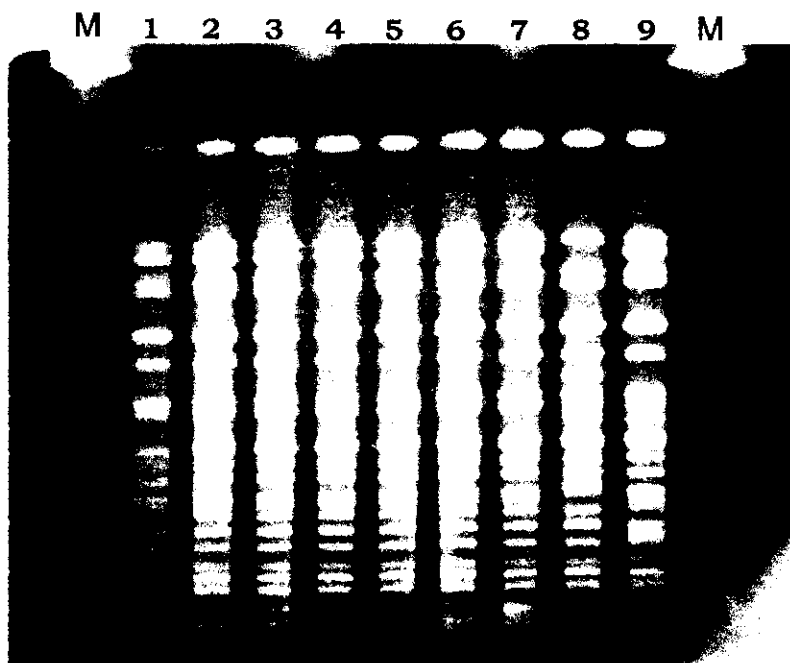


図3 県内在住者由来株と県外在住者由来株のPFGEパターン

供試菌株

M: λ Ladder

1:今治 163

2:今治 165

3:高知 192

4:広島県 200

5:島根 207

6:広島市 211

7:岡山 227

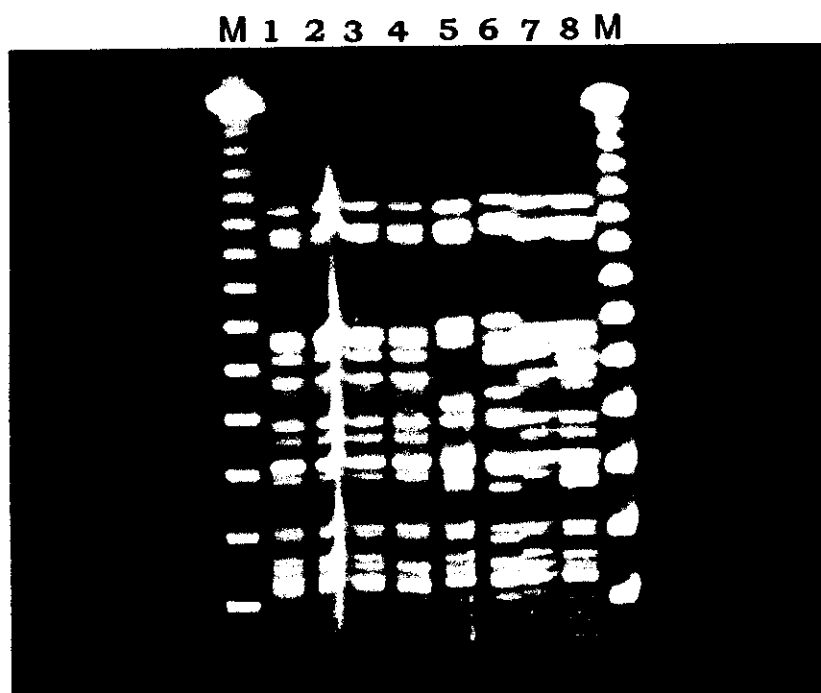
8:静岡 197

9:福岡 205

泳動条件

寺嶋によって示された赤痢菌の泳動条件

XbaIでのPFGE



BlnIでのPFGE

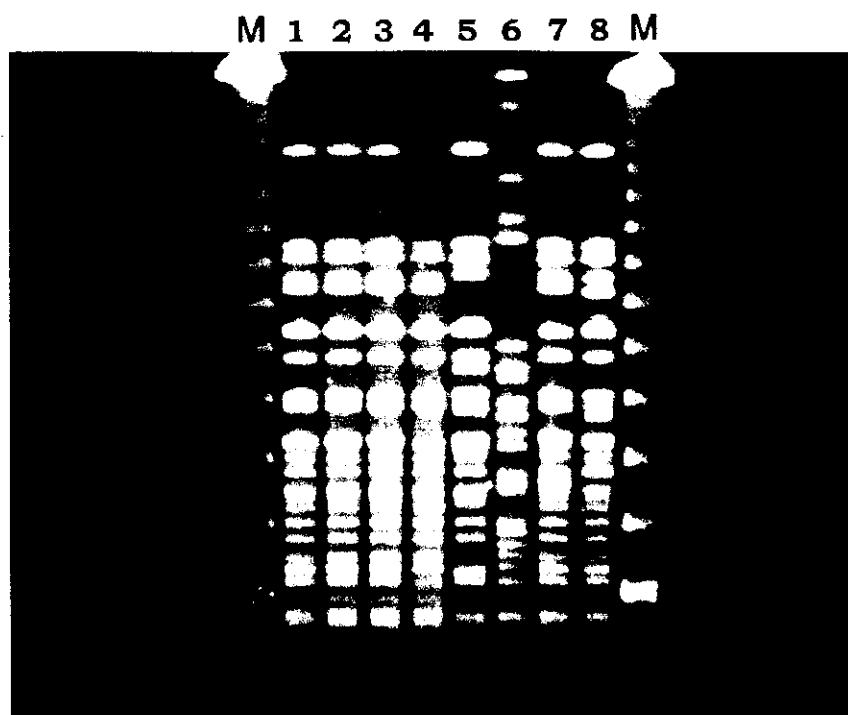


図4 A施設で実施したPFGEの画像

供試菌株

M:  $\lambda$  Ladder

1:A1 (今治関連株)

2:A2 (今治関連株)

3:今治 165

4:今治 163

5:愛媛 70

6:愛媛 126

7:愛媛 179

8:愛媛 180