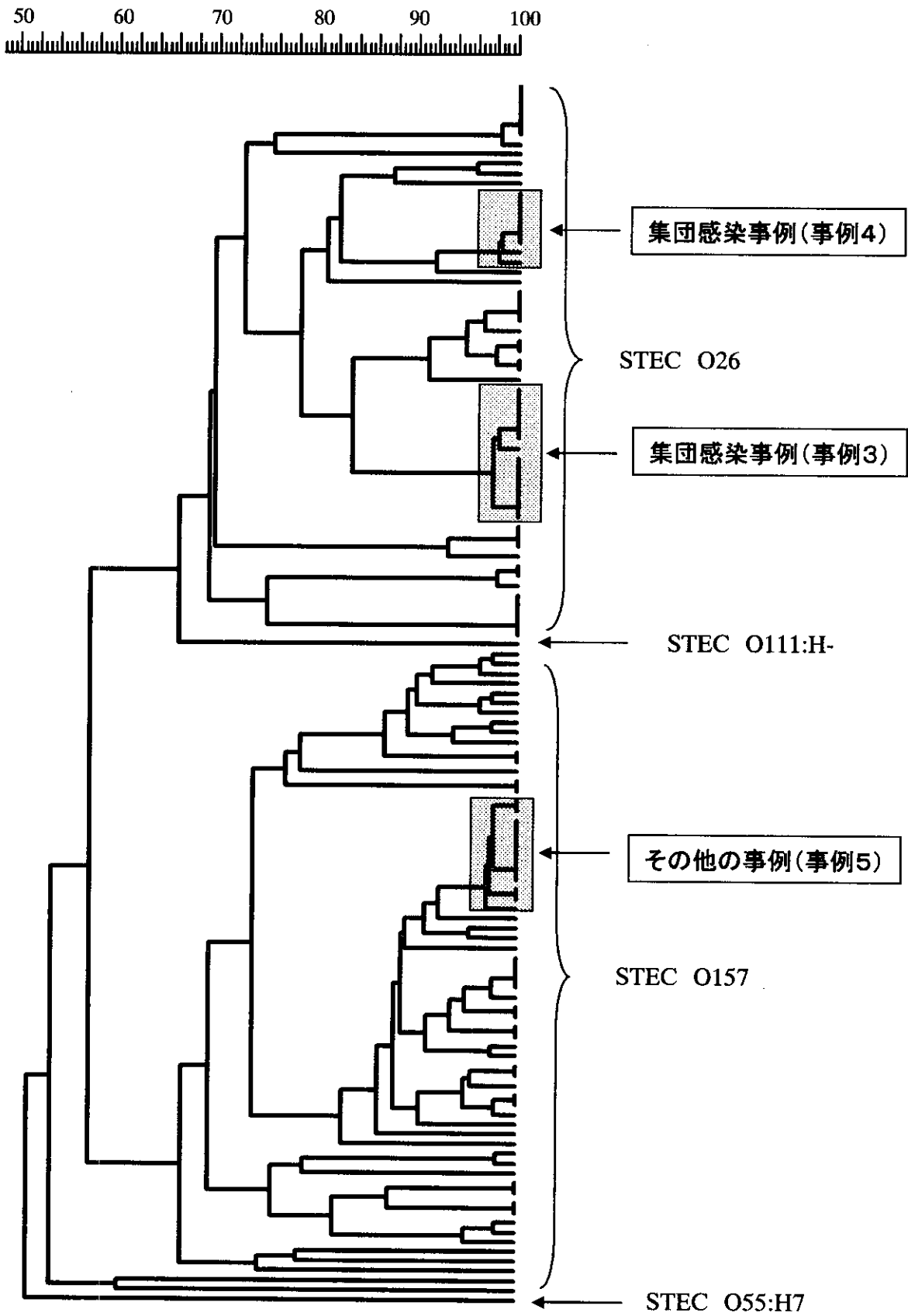


図6 平成13年STECのデンドログラム



厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成13年度 分担研究報告

パルスフィールドゲル電気泳動法（Pulsed-Field Gel Electrophoresis）の標準化に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
パルスネットの有効活用事例

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：現在構築が進められているパルスネットの有効性について、平成13年度に発生した3つの広域感染症の事例で分離された菌株の PFGE 画像及び情報を国立感染症研究所微生物部（感染研）と当センターとの間でやり取りを行い、その結果を通して検証した。4月に全国規模で発生した腸管出血性大腸菌（STEC）O157 感染事例では菌株の PFGE 画像の伝達はシステム作動が必ずしも迅速に行われなかった。しかし、9月に首都圏で流行した O157 感染事例では流行菌株の PFGE 画像が迅速に感染研から各地方衛生研究所（地研）に伝わり流行株の広がり方の状況把握が短期間で実行された。更に11月末、西日本を中心に発生した赤痢感染事例においてはパルスネットを通して PFGE 画像が迅速に伝わり、宮城県内で発生した赤痢菌株の PFGE パターンとの比較が迅速に行われ、その結果が短期間で行政へ伝達され行政対応の助けになった。このように、食品流通の広域化等で感染症が広域に発生した場合にはパルスネットを介して菌株の PFGE 画像等の情報がリアルタイムに伝達可能であることからパルスネットの構築は今後益々多様化する食中毒感染症の解明に必要不可欠であると思われた。

A. 研究目的

近年、食品を介した広域 STEC 感染症あるいはサルモネラ属菌感染症等が相次いで発生している。

平成11年にはサルモネラ・オラニエンブルグによる食中毒事件が全国規模で起こり、宮城県内でも患者が発生した。その折り、各地研あるいは行政機関との間で分離菌株等の情報伝達は電話あるいはファックスによって行われた。しかし、ファックスによる菌株の送信 PFGE 画像は不鮮明であり詳細な画像解析には適していないことが明らかになった。昨年より IT 化の推進が

図られ各地研でもインターネット網の整備が進み、メールによる情報・PFGE 画像が迅速に伝達可能になった。そこで、現在構築が進められているパルスネットがはたして有効に活用できるかを、平成13年度に

宮城県内で発生した STEC O157 感染症及び赤痢感染症事例においてパルスネット介して情報及び PFGE 画像の送受信を行い、検討したので報告する。

B. 研究方法

感染研よりパルスネットを通じて送付さ

れた STEC O157 及び赤痢感染事例由来菌株 PFGE 画像を宮城県内で発生したそれぞれの感染事例由来菌株の PFGE 画像と比較し、菌株間の相同性について検討した。

1. 事例と供試菌株

(1) STEC O157 感染事例

平成13年4月にサイコロステーキ関連の O157 感染症が全国規模で、9月には和風キムチ関連の O157 感染症が首都圏を中心に広域で発生した。宮城県内では4月から10月までに12件の O157 患者が発生した。O157 患者とその家族から分離した13菌株を PFGE 解析用供試菌株とした。

(2) 赤痢感染事例

平成13年11月末より西日本で赤痢患者が多数発生し、患者の多くがカキを喫食していたことからカキが原因と考えられた。宮城県内でも11月28日にN町で1名、30日にS町で1名の赤痢患者が発生し両名ともカキを喫食していた。N町の患者が喫食したカキは県内産で県内の施設によって加工されたものであった。更に、青森県内で同施設で加工されたカキ喫食者から1名の赤痢患者が12月2日に発生した。青森患者由来菌を赤痢A株、S町の患者由来菌を赤痢B株、N町患者由来菌を赤痢C株とし、これら3菌株を供試菌株として生化学性状、遺伝子検査及び PFGE 解析を行った。

(3) 赤痢菌株の薬剤感受性試験

赤痢3菌株について微量液体希釈法（栄研化学：ドライブプレート）により16種の薬剤（ABPC, PIPC, CEZ, CTM, CMZ, CZX, CAZ, CCL, LMOX, AZT, GM, AMK, MINO, IPM, OFLX, FOM）に対する感受性試験を実施した。

(4) 菌株の invE 遺伝子検査

赤痢3菌株の invE 遺伝子検査は TAKARA のプライマーを用い、PCR法で常法に従って実施した。

2. PFGE 法

STEC O157 菌株の PFGE 法は、定法に従って DNA ブロックを作成し、Xba I 酵素処理後、感染研で実施している条件で解析を行った。

赤痢菌株の PFGE 法は、ブイヨンで1晩培養した菌液にリゾチームを加え更にアガロスを添加してブロックを作成し、Xba I 酵素処理した。泳動は電圧 6V/cm、5.3sec-34.9sec の条件で19.5時間行った。

C. 研究結果

1. STEC O157 感染事例

平成13年4月から10月までに宮城県内で発生した O157 患者由来の13菌株の概略を表1に、また PFGE パターンを図1に示した。一方、感染研よりパルスネットで4月12日に送付されたサイコロステーキ関連由来菌株（A,B）の画像と9月7日に送付された和風キムチ関連由来菌株（D）の画像を図2に示した。

図1の PFGE パターンにおいて、同じ家族由来（レーン2、3）の菌株は当然ながら同 PFGE パターンを示している。しかし、EC788（8/25届出：レーン11）は EC750（6/6届出：レーン2）、EC751（6/9届出：レーン3）と検出時期及び居住地（N町とF市とは隣接）が異なるにもかかわらず PFGE 画像が全く同じパターンを示している。このことは、この両感染は感染源が同一由来の菌で起きたと考えられる。

次に、図2に示したAの画像と図1のそれぞれの菌株のPFGEパターンとを比較した。図1の13菌株のパターンにはA菌株のパターンと一致するものはなかった。一方、レーン10,11菌株のパターンはB菌株と240Kb以下の領域のバンドパターンが類似しているが242.5-436.5Kbの領域では異なっていた。

2. 赤痢感染事例

平成13年11月末より西日本を中心に発生した赤痢が宮城県内でも発生し、関連調査を含めて3菌株が分離された。表2に3菌株の性状を示すが、その3菌株(赤痢A, B, C)は生化学性状が典型的な赤痢菌の性状を示し、血清型は *Shigella sonnei* I相であった。実施した16薬剤に対してはいずれも感受性を示したが、OFLXに対するMICが赤痢A、赤痢Bは2 μ g/mlであったが赤痢Cは0.5 μ g/m以下であった。更に赤痢A、Bは *invE* 遺伝子を保有していたが赤痢Cは保有していなかった。一方、3菌株のPFGE解析の結果を国立感染症研究所より送付されたPFGEの画像と共に図3に示した。PFGEの泳動条件が異なるので画像に多少ずれがあるが比較は容易に行える。レーン1~4は感染研より送付されたPFGEの画像で西日本の4県で発生した赤痢患者由来菌株、レーン5が赤痢A、レーン6が赤痢B、レーン9が赤痢CのPFGEパターンである。赤痢A及びBは西日本患者由来株と同一のパターンを示しているが赤痢Cは80、200-300Kbの領域のパターンが異なることが確認できた。

D. 考察

我が国において食品は広域に流通しているから、もし食品が強毒菌で汚染された場合にはそれによる感染症も広域で発生する。このような場合、事件発生初期段階に患者あるいは食品等から検出される菌についての正確な情報の公開は重要な意味を持つと考えられる。これまでは、菌株の生化学的あるいは血清学的性状に関する情報伝達が主に行われていたが、細菌遺伝子解析技術の進歩により菌の診断にPFGEが広く使用されるようになってきた。しかし、流行菌株の同一性の確認に適したPFGE画像の迅速な伝達まではほとんどなされていなかった。平成12年からの厚生科学研究費によるパルスネットの構築に関する研究の事業立ち上げによってネット網が整備され、PFGE画像の伝達が容易になってきた。そこで今年度、広域で発生した感染症の事例においてこのパルスネットが効果的に運用できるかを検証した。

1事例目は、平成13年4月にサイコロステーキあるいは9月に和風キムチを原因として発生したSTEC O157感染症で、4月の発生当初、メディアの情報が速く、流行菌株についてのPFGE画像等の情報は遅れてきた。同時期に宮城県内で発生しているO157感染が果たして同一菌株によるものかの判断のため、厚生労働省からの通知もあり昨年度分離した菌株を感染研に送付し、感染研で解析を実施した。9月のO157感染発生時には、パルスネットでの連絡網が整備され、それを通し感染研からリアルタイムに流行株のPFGE画像が送付された。そこで、菌株の感染研への送付と平行して菌株の性状確認試験、PFGE解析が同

時に実施可能で、本県検出菌株と流行株の画像比較解析が容易にかつ迅速に実施可能であった。その結果、県内で発生したた菌株には広域で発生した O157 と同一の菌株は検出されず、県内に流行株の浸淫はなかったことが判明した。

2事例目は11月に発生した赤痢感染症である。カキを原因とする赤痢患者が西日本を中心に発生し、宮城県内でも11月末に2名発生（N町 12/3 届出、S町 12/10 届出）、更に青森県で宮城県内産のカキを喫食して12月2日（12/7 届出）に1名発生した。県内で検出した菌株は感染研に直ちに送付し同時に当センターでもそれぞれの菌株について性状試験、invE 遺伝子検査及び PFGE 解析を実施した。12月14日、西日本で流行している赤痢菌株の PFGE 画像送付をパルスネットを介して感染研へ依頼したところ、同日に画像が送付されてきた。直ちに当センターで実施した PFGE 画像と比較が出来た。その結果、薬剤感受性及び invE 遺伝子保有状況の点で青森県患者由来株（赤痢A）とN町患者由来株（赤痢B）とは一致したが、S町患者由来株（赤痢C）とは明らかに異なっていた。更に、感染研の PFGE 画像との比較においても赤痢A、Bは西日本での流行株と PFGE パターンが一致するが、赤痢Cは異なることが判明した。この結果を12月17日に行政側に報告した。このように、菌株の搬入から1週間で全国との菌株とのリアルタイムな画像比較が出来ることは地研にとって画期的なことである。

パルスネットの適切な運用にはまだまだ数多くの問題点があると考え、1つ1

つの事例での反省点を積み上げて行くことでより良いパルスネット網が完成すると思われた。

E. 結論

平成13年度広域で発生した感染症の流行株の PFGE 画像をパルスネットを介して感染研と送受信し、パルスネットの有用性を検証した。当初の STEC O157 感染症2事例ではシステムがうまく活用できなかったが、3事例目の赤痢感染症では迅速に対応でき、県内検出菌株と流行株との比較検討が PFGE 画像で容易に可能となった。更に、その結果が行政対応の資料として有効に活用可能となった。

このように、感染研及び各地研間でのパルスネット整備の必要性が改めて再認識された。

F. 共同研究者

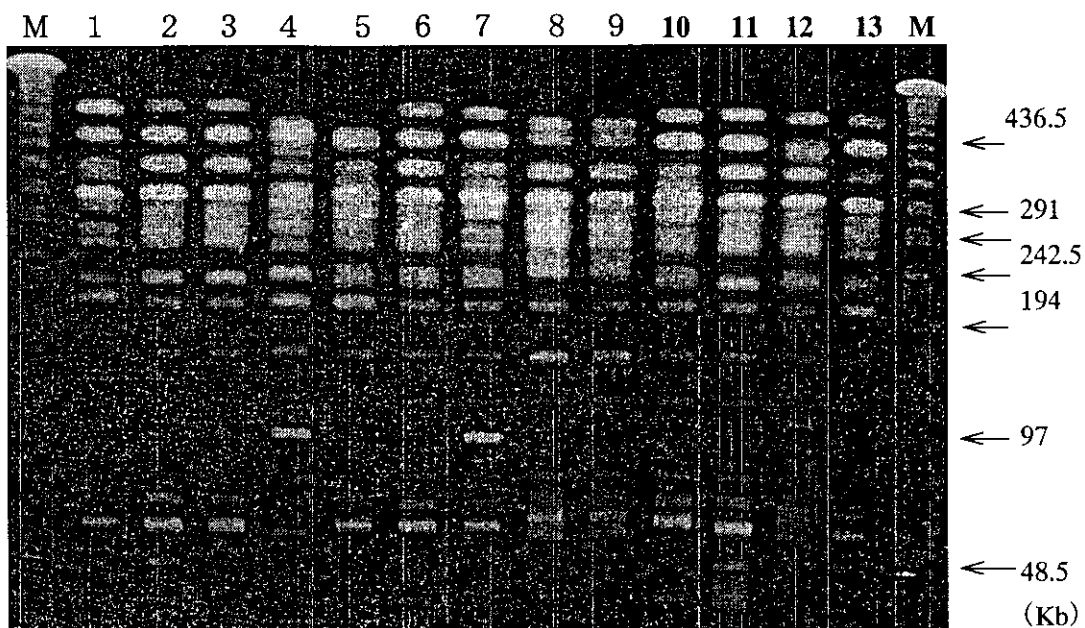
宮城県保健環境センター微生物部：
佐々木美江、山口友美、渡邊節、白石廣行

表1. 腸管出血性大腸菌の発生状況と菌株のベロ毒素型

番号	菌株	届出月日	発生地	ベロ毒素型	備考
1	EC749	5月30日	S市	VT1, 2	
2	EC750	6月6日	N町	VT1, 2	
3	EC751	6月9日	N町	VT1, 2	No1の弟(患者)
4	EC752	6月7日	I市	VT2	
5	EC758	7月7日	Ko町	VT1, 2	
6	EC759	7月11日	N市	VT1, 2	
7	EC761	7月24日	Ka町	VT1, 2	
8	EC768	8月3日	R町	VT2	
9	EC769	8月6日	R町	VT2	No8の妹(保菌者)
10	EC774	8月13日	N町	VT1, 2	
11	EC788	8月25日	F市	VT1, 2	
12	EC813	9月11日	F市	VT1, 2	
13	EC812	9月10日	S町	VT1, 2	

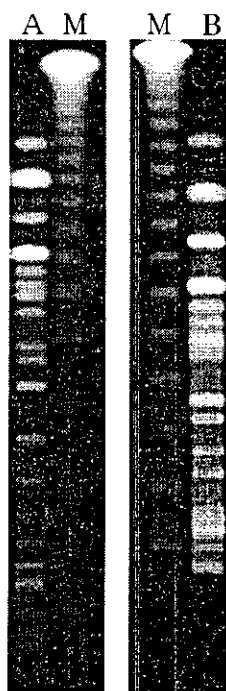
表2. 赤痢の発生状況と分離菌株の性状

番号	菌株	発症月日	発生地	血清型	invE	OFLXへのMIC
1	赤痢A	12月7日	青森県	S. sonnei I	+	2 μ g/ml
2	赤痢B	11月28日	N町	S. sonnei I	+	2 μ g/ml
3	赤痢C	11月30日	S町	S. sonnei I	-	< 0.5 μ g/ml



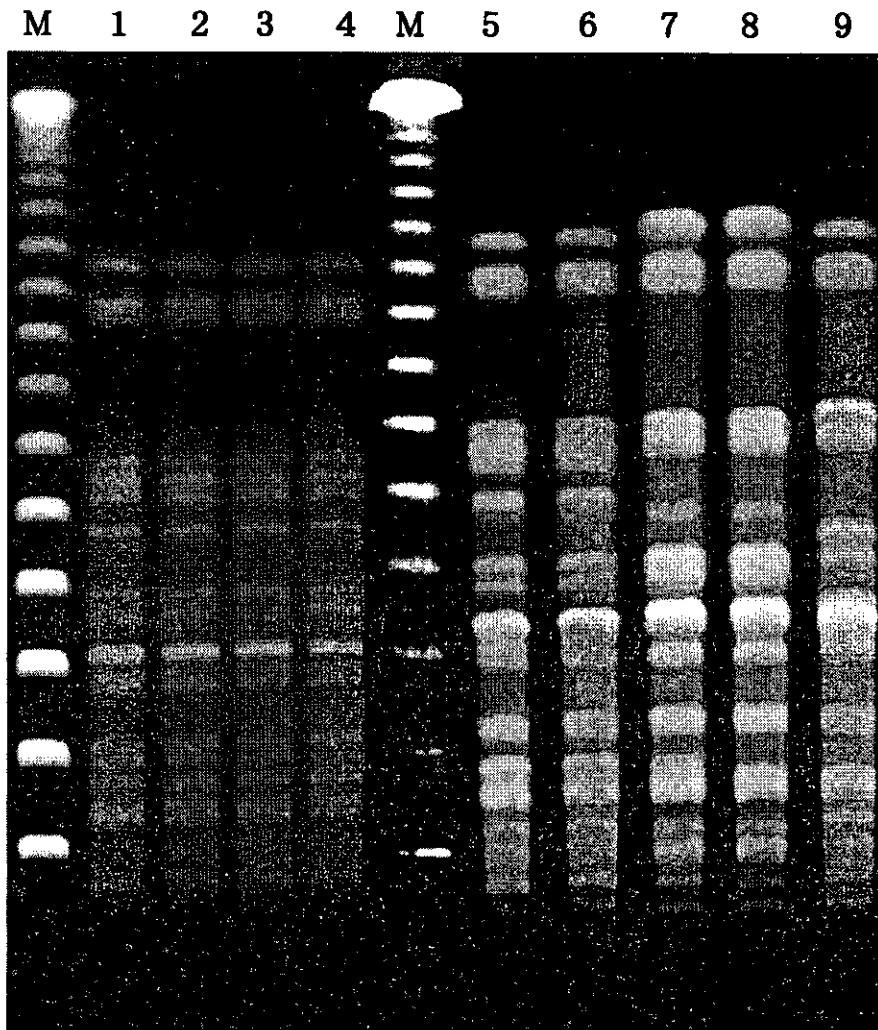
1 : EC479 2 : EC750 3 : EC751 4 : EC752 5 : EC758 6 : EC759 7 : EC761
 8 : EC768 9 : EC769 10 : EC774 11 : EC788 12 : EC813 13 : EC812
 M : マーカー (λラダー)

図 1. 宮城県内で分離された STEC O157 菌株の PFGE パターン



A : 4月流行株
 B : 9月流行株
 M : λ ladder

図 2. 国立感染症研究所より送付された STEC O157 菌株 PFGE 画像



1～4：西日本流行株（国立感染症研究所より送付された画像）
 5：青森県分離株　　6：宮城県（大崎保健所管内）分離株
 7：宮城県（仙南保健所管内）分離株　　M：マーカー（λラダー）

図3. 赤痢菌株の PFGE パターン

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

青森県環境保健センター 対馬 典子

研究要旨：13年3月末、青森県黒石市在住の下痢、発熱症状を呈した5才の男児から志賀毒素産生性大腸菌（STEC）O157 (*stx1, stx2*) が検出された。患者の接触者には感染者は認められなかったが、疫学調査により患児は家族とともに豚レバーを喫食していたことが判明したことから、保存されていた「豚レバ刺し」を検査したところ、O157 が検出された。パルスフィールドゲル電気泳動法（以下、PFGE）による遺伝子解析を実施したところ、患者由来菌株と「豚レバ刺し」由来菌株の遺伝子パターンが一致し、「豚レバ刺し」が感染経路にあったと推測された。しかし、豚レバーの生産、流通、販売過程で牛肉との相互汚染の可能性も示唆された。

A. 目的

13年3月末に発生したO157 感染事例に関し、患者と感染源又は感染経路としての豚レバーとの間の関連性をみるために患者由来菌株および食品由来菌株についてPFGEを行った。

B. 研究方法

検査対象は平成13年3月末に発生した食中毒事件において分離された患者（5才、男児）由来菌株1株、保存されていた『豚レバ刺し』から分離された2株（保健所分離・環境保健センター分離）、そしてこの事件前後の人由来4株、の計7株とした。また、PFGEはCHEF-DR III (BIO-RAD) を用いて実施した。プラグの作成から制限酵素処理までの一連の操作は、試薬キット (BIO-RAD社) の説明に原則的に従って行った。泳動条件は、国立感染症研究所の条件(200V、4 to 8 sec 9 hours、8 to 50 sec 13 hours)で行った。

C. 研究結果

泳動結果は図1のとおりである。

患者由来菌株と豚レバーから分離された株は同一パターンを示した。

なお、保健所では、豚レバーの入手先について遡り調査を実施したが、その結果、青森県内の販売店及びと畜場に至るまでの過程で牛肉との相互汚染の可能性が浮上したが、それを立証するまでには至らなかった。

D. 考察

PFGEにより、豚レバーが直接の原因食品と認められたが、豚におけるSTEC汚染状況は低いとされていることから、豚レバーの処理工程・流通販売過程での牛肉との相互汚染が示唆された。

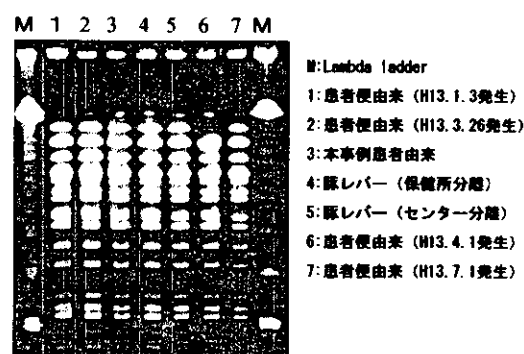


図1 O157 PFGE電気泳動像

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 13 年に発生した EHEC 感染事例由来 O157:H7(VT-2、VT-1&2)、O26 (VT-1)、O91(VT-1)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 13 年に秋田県で発生した腸管出血性大腸菌 (EHEC)感染事例 33 事例のうち、EHEC O157:H7 感染事例 14 事例に由来する 29 株 (VT-1,2+ 11 事例 26 株、VT-2+ 3 事例 3 株)、EHEC O26 感染事例 5 事例に由来する 6 株、牛糞便から分離された 1 株、EHEC O91 感染事例 4 事例に由来する 4 株について PFGE パターンを比較した。EHEC O157:H7 (VT-1,2+)感染事例 11 事例のうち 1 事例は老人保健施設の集団発生事例であり、分離 16 株はすべて PFGE パターンが一致した。それ以外の 10 事例のうち、2 事例間で PGEF パターンが一致し、疫学調査の結果からも患者が同一焼肉店で食事をしていた事実が確認されたことから、当該焼肉店が原因施設とされ衛生指導が実施された。EHEC O26(VT-1+) 感染事例については 6 月と 9 月に発生した散発事例由来株と 7 月に採取した牛糞便由来株のパターンがお互いに極めて類似していた。このことから、牛が保菌している EHEC が食品を介したヒトの感染事例の発生とどのように関連しているかについて更なる検討が必要と考えられた。

EHEC 感染症の疫学的背景を解明する際には、分離株の PFGE パターンの解析結果と従来行われてきた疫学調査の成績が補完し合うことが重要と考えられた。また、感染症の広域発生を探知するために、より多くの地方衛生研究所がこのパルスネットシステムに参加する必要があると考えられた。

A. 目的

県内で発生した EHEC O157:H7 (VT-1,2+)、O157:H7 (VT-2+)感染事例由来株、non-O157 事例で複数の事例の発生がみられた EHEC O26(VT-1+)感染事例由来株、および給食従事者検査で複数例分離された EHEC O91(VT-1+)感染事例由来株について PFGE を行い、そのパターンを比較し、事例間の関連に関する分子疫学的情報を得ることを目的とした。

B. 方法

1) 供試株

表 1 に示す、平成 13 年に秋田県内で発生した EHEC O157(VT-1,2+) 散発事例 10 事例由来 10 株、1 集団事例由来 16 株、EHEC O157(VT-2+)散発事例 3 事例由来 3

株、EHEC O26(VT-1+)家族内感染事例 1 事例由来 2 株、散発事例 2 事例由来 2 株、給食従事者等感染 2 事例由来 2 株、および県内産牛糞便由来 1 株、いずれも給食従事者から分離された EHEC O91 (VT-1+) 4 事例由来 4 株、計 23 事例由来 40 株を PFGE パターンの比較に供した。

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 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 °C。制限酵素は Xba I を使用した。

C. 結果および考察

EHEC O157:H7(VT-1,2+) 散発事例 10 事例由来 10 株中、秋田市保健所管内において 7 月に発生した 2 事例の原因菌の PFGE パターンが同一であることが判明した (図 1、レーン 1、2 / 図 3、レーン 1、2)。疫学調査の結果、これら 2 事例の患者は同一焼肉店を利用していたことが判明し、分離株の PFGE パターンの成績と併せて当該焼肉店が原因施設と考えられ、当該施設に対する衛生指導が実施された。一方、EHEC O157:H7(VT-2+) 散発患者由来株 3 株 (図 3、レーン 12、13、14) のうち、同一日に異なる保健所管内で確認された患者から分離された 2 株の PFGE パターン (レーン 13、14) の違いがバンド 1 本のみであることが判明した。しかし、これらの患者について、共通の感染源の解明につながる情報は得られなかった。

老人施設において、秋田県では初めての EHEC O157:H7(VT-1,2+) を原因とする集団感染事例が発生した。患者、および無症状保菌者から分離された合計 16 株の PFGE パターン (図 1、レーン 5-7、9、11-18、図 2 レーン 1-7) は全て同一であることが判明した。なお、当該施設においては、入所者の食事は全て給食施設において調理されていることから、原因は入所者に提供された食事と考えられ、保存検食の検査を実施したが、原因食品を特定することはできなかった。

7 月に発生した事例 No. 4、および 10

月に発生した事例 No. 11 の分離株の PFGE パターンが平成 13 年に国内で広域発生したキムチ関連事例の原因菌と同一の IIa IIa I 型であることが判明したが、これらの事例にキムチが関与していたかどうかは不明であった。

Non-O157 EHEC については、EHEC O26 (VT-1+) と EHEC O91 (VT-1+) について解析を実施した。1 月から 10 月に発生した 5 事例に由来する EHEC O26 (VT-1+) と、7 月に採取した県内産牛の糞便から分離された EHEC O26 (VT-1+) の PFGE パターン (図 4、レーン 1-7) を比較した結果、6 月と 9 月に異なる保健所管内で発生した散発事例において分離された株のパターンが牛由来株と極めて類似し (レーン 4、5、7) その違いはバンド 1-2 本程度であることが判明したが、その疫学的関連について検討することはできなかった。

EHEC O91 は秋田県で毎年、主として給食従事者の定期検査において分離されている。平成 13 年は 7 月から 9 月にかけて 4 事例の感染事例が確認された。これらの事例に由来する 4 株の PFGE パターン (図 4、レーン 8-11) はいずれも異なることが確認された。このことから、EHEC O157 と同様の解析条件により EHEC O91 の解析が実施可能であることが確認され、EHEC O91 の分子疫学的多様性が示された。

以上のように、平成 13 年は大規模な Diffuse Outbreak が発生しなかったものの、7 月に秋田市保健所管内で発生した EHEC O157:H7 (VT-1,2+) 感染事例 2 事例において、2 名の患者が同一の焼肉店を利用しており、分離株の PFGE パターンが一致し、また、当該焼肉店で食事をした患者家族などが血清診断により O157 感染が確認されたことから、この事例は小規模な Diffuse outbreak に該当するものと考えられた。小

規模な Diffuse outbreak は昨年も焼肉店を原因として発生していることから、秋田県においてその発生は稀ではないと考えられる。このような事例が Diffuse outbreak に該当するかどうかを判断するためには、分離株の PFGE パターンの解析と併せて、患者の行動調査、喫食調査など、従来から行われてきた疫学調査の成績を考慮することが非常に重要と考えられる。実際、8月に発生した EHEC O157:H7(VT-2+)を原因とする2事例においては、2株が分子疫学的性状から密接に関連していることが認められたものの、患者2名が異なる保健所管内で発生したこと、および患者が発生した時点で分離株の PFGE パターンの関連が判明していなかったことなどにより、患者の行動や喫食状況に関して、共通の感染源を追求するという立場に立った調査が実施されず、2名の患者の発生に関する疫学的背景を明らかにすることができなかった。このように、EHEC 感染事例の発生に係る疫学的背景を解明する際には、分離株の PFGE パターン比較成績だけでは情報として不十分であり、従来から行われてきた疫学調査により得られた情報と分離株の PFGE パターンの情報が補完することが重要と考えられた。一方、PFGE パターンの比較の意義のうち、広域発生感染症をより迅速・確実に探知するためには、より広い地域における分離株のパターンを比較する必要がある、パルスネットはその具現化につながるシステムである。従って、今後、より多くの地方衛生研究所が本システムに参加する必要があると考えられた。

EHEC O26(VT-1+)のヒト由来株に、牛糞便由来株と非常に類似したパターンを示す株が存在することが確認された。秋田県では過去に、ヒトが牛から EHEC に感染したと考えられる EHEC 感染事例が2事例発生している。今回の結果も牛が直接ヒ

トの感染源になり得る可能性を示すものと考えられる。今後もこのようなデータを蓄積することにより、牛の取り扱いに関する衛生指導に関する科学的根拠が得られるものと考えられた。一方、現在の食肉生産過程は HACCP により厳しく管理されていることから、牛が仮に EHEC を保菌していたとしても食肉が製造過程で EHEC に汚染される可能性は非常に低いと考えられるが、安全性の更なる確認のため、県内産牛の EHEC 汚染調査、および分離株の分子疫学的性状について検討する必要があると考えられた。

E. 結論

- ・ EHEC 感染事例の発生に係る疫学的背景を解明する際には、従来から行われてきた疫学調査により得られた情報と、分離株の PFGE パターンの情報が補完することが重要と考えられた。
- ・ 感染症の広域発生をより効率良く探知するために、今後、より多くの地方衛生研究所がパルスネットに参加する必要があると考えられた。
- ・ 牛が EHEC を保菌している事実が、食品を介したヒトの EHEC 感染症の発生に関してどのような意義を持つのかという点を解明するための更なる検討が必要と考えられた。

表1 PFGE供試株一覽(平成13年)

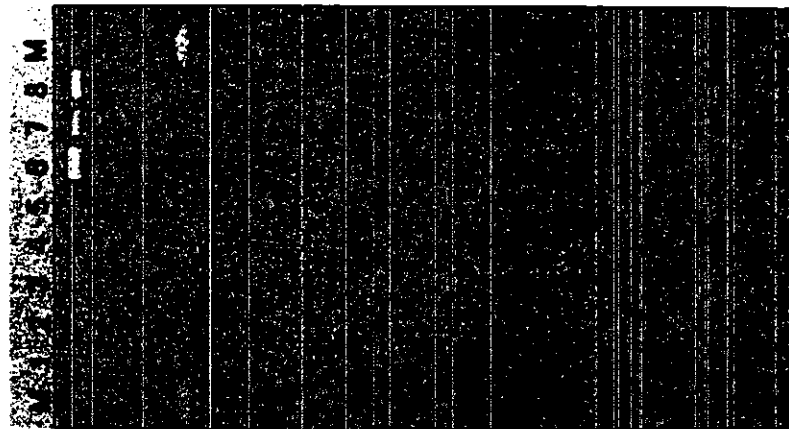
血清型	事例		保健所	株No	受付月日	感染者 種別	図-レーンNo	PFGEパターン	
	No	種別						当所	感染研
O157 (VT-1,2)	1	散発	秋田市	1	2001/7/6	患者	1-1/3-1	○	II a ND I
	2	散発	秋田市	2	2001/7/7	患者	1-2/3-2	○	II a ND I
	3	散発	本荘	3	2001/7/9	患者	1-3/3-3	△	ND II c I
	4	散発	大曲	4	2001/7/23	患者	1-4/3-4	□	II a II a I
	5	集団	本荘	5	2001/8/8	患者	1-5/3-5	◎	I VaVb ND
	6			6	2001/8/8	患者	1-6	◎	I VaVb ND
	7			7	2001/8/8	患者	1-7	◎	I VaVb ND
	8			8	2001/8/10	患者	1-9	◎	I VaVb ND
	9			9	2001/8/10	保菌者	1-11	◎	I VaVb ND
	10			10	2001/8/10	保菌者	1-12	◎	I VaVb ND
	11			11	2001/8/10	保菌者	1-13	◎	I VaVb ND
	12			12	2001/8/10	保菌者	1-14	◎	I VaVb ND
	13			13	2001/8/10	保菌者	1-15	◎	I VaVb ND
	14			14	2001/8/10	保菌者	1-16/2-1	◎	I VaVb ND
	15			15	2001/8/10	保菌者	1-17/2-2	◎	I VaVb ND
	16			16	2001/8/10	保菌者	1-18/2-3	◎	I VaVb ND
	17			17	2001/8/10	患者	2-4	◎	I VaVb ND
	18			18	2001/8/10	保菌者	2-5	◎	I VaVb ND
	19			19	2001/8/10	保菌者	2-6	◎	I VaVb ND
	20			20	2001/8/11	保菌者	2-7	◎	I VaVb ND
	6	散発	大曲	21	2001/8/9	患者	1-8/3-6	▲	ND II c ND
	7	散発	秋田市	22	2001/8/10	患者	1-10/3-7	◇	II a II b ND
	8	散発	秋田市	23	2001/8/15	患者	2-8/3-8	▽	II g II b I
	9	散発	本荘	24	2001/8/30	患者	3-9	▲	ND II c ND
	10	散発	本荘	25	2001/9/27	患者	3-10	●	II a ND ND
	11	散発	横手	26	2001/10/17	患者	3-11	□	II a II a I
O157 (VT-2)	12	散発	秋田中央	27	2001/6/9	患者	3-12	☆	ND ND III
	13	散発	横手	28	2001/8/18	患者	3-13	★	III b IV IV
	14	散発	秋田中央	29	2001/8/18	患者	3-14	★'	III b IV IV
O26 (VT-1)	15	家族	大曲	30	2001/1/18	患者	4-1	A	
				31	2001/1/19	保菌者	4-2	A	
	16	給食従事者	横手	32	2001/6/6	保菌者	4-3	B	
	17	散発	秋田中央	33	2001/6/22	患者	4-4	C1	
	18	施設職員	本荘	34	2001/9/28	保菌者	4-5	C2	
	19	散発	横手	35	2001/10/4	患者	4-6	D	
		牛糞便		36			4-7	C3	
O91 (VT-1)	20	給食従事者	秋田市	37	2001/7/17	保菌者	4-8	イ	
	21	給食従事者	大曲	38	2001/8/11	保菌者	4-9	ロ	
	22	給食従事者	能代	39	2001/9/8	保菌者	4-10	ハ	
	23	給食従事者	大館	40	2001/9/19	保菌者	4-11	ニ	

図1 O157:H7(VT-1,2)分離株のPFGEパターン



レーンNo	事例 No	保健所	株No	受付月日	パターン
1	1	散発	秋田市 1	2001/7/6	○
2	2	散発	秋田市 2	2001/7/7	○
3	3	散発	本荘 3	2001/7/9	△
4	4	散発	大曲 4	2001/7/23	□
5	5	集団	本荘 5	2001/8/8	◎
6	5	集団	本荘 6	2001/8/8	◎
7	5	集団	本荘 7	2001/8/8	◎
8	6	散発	大曲 21	2001/8/9	▲
9	5	集団	本荘 8	2001/8/10	◎
10	7	散発	秋田市 22	2001/8/10	◇
11	5	集団	本荘 9	2001/8/10	◎
12	5	集団	本荘 10	2001/8/10	◎
13	5	集団	本荘 11	2001/8/10	◎
14	5	集団	本荘 12	2001/8/10	◎
15	5	集団	本荘 13	2001/8/10	◎
16	5	集団	本荘 14	2001/8/10	◎
17	5	集団	本荘 15	2001/8/10	◎
18	5	集団	本荘 16	2001/8/10	◎

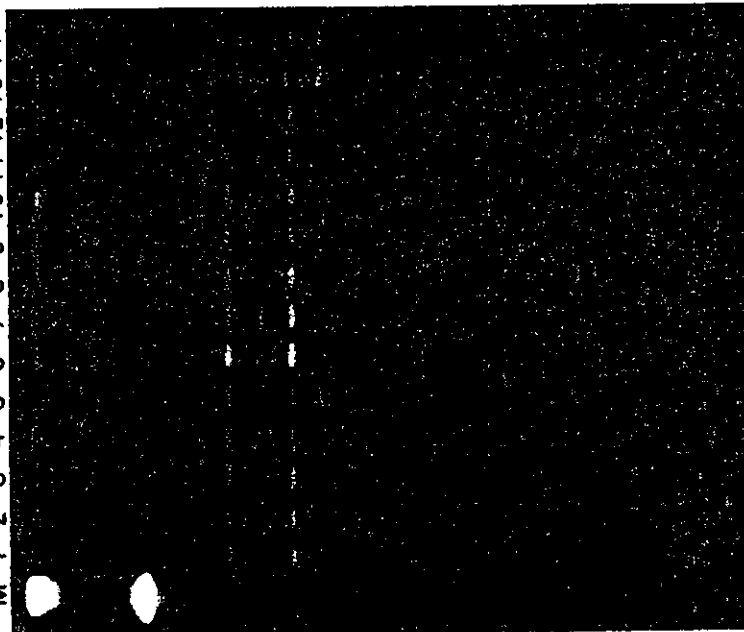
図2 O157:H7(VT-1,2)分離株のPFGEパターン



レ-ンNo	事例 No	種別	保健所	株No	受付月日	パターン
1	5	集団	本荘	14	2001/8/10	◎
2	5	集団	本荘	15	2001/8/10	◎
3	5	集団	本荘	16	2001/8/10	◎
4	5	集団	本荘	17	2001/8/10	◎
5	5	集団	本荘	18	2001/8/10	◎
6	5	集団	本荘	19	2001/8/10	◎
7	5	集団	本荘	20	2001/8/11	◎
8	8	散発	秋田市	23	2001/8/15	▽

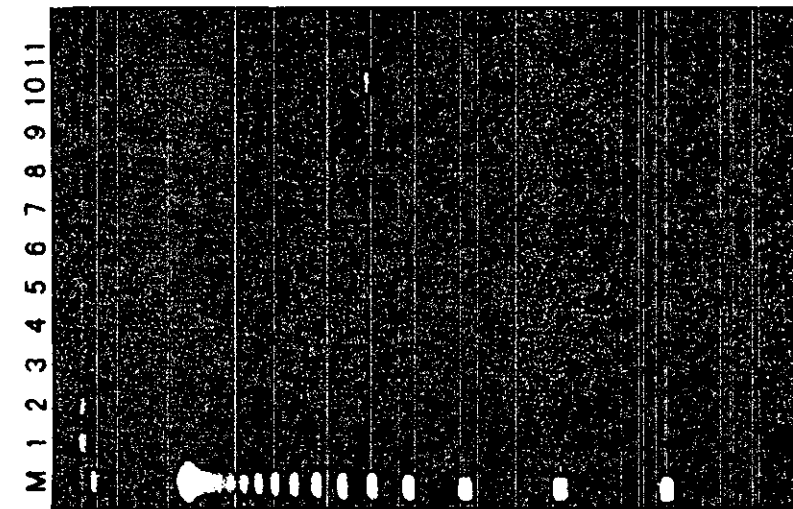
図3 O157:H7(VT-1,2、VT-2)分離株のPFGEパターン

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



レーンNo	事例 No	種別	保健所	株No	受付月日	パターン	毒素型
1	1	散発	秋田市	1	2001/7/6	○	VT-1,2
2	2	散発	秋田市	2	2001/7/7	○	VT-1,2
3	3	散発	本荘	3	2001/7/9	△	VT-1,2
4	4	散発	大曲	4	2001/7/23	□	VT-1,2
5	5	集団	本荘	5	2001/8/8	◎	VT-1,2
6	6	散発	大曲	21	2001/8/9	▲	VT-1,2
7	7	散発	秋田市	22	2001/8/10	◇	VT-1,2
8	8	散発	秋田市	23	2001/8/15	▽	VT-1,2
9	9	散発	本荘	24	2001/8/30	▲	VT-1,2
10	10	散発	本荘	25	2001/9/27	●	VT-1,2
11	11	散発	横手	26	2001/10/17	□'	VT-1,2
12	12	散発	秋田中央	27	2001/6/9	☆	VT-2
13	13	散発	横手	28	2001/8/18	★	VT-2
14	14	散発	秋田中央	29	2001/8/18	★'	VT-2

図4 O26(VT-1)、O91(VT-1)分離株のPFGEパターン



レーンNo	事例 No	保健所	株No	受付月日	パターン
1	15	家族	大曲 30	2001/1/18	A
2		種別	31	2001/1/19	A
3	16	給食従事者	横手 32	2001/6/6	B
4	17	散発	秋田中央 33	2001/6/22	C1
5	18	施設職員	本荘 34	2001/9/28	C2
6	19	散発	横手 35	2001/10/4	D
7		牛糞便	36	2001/7/13	C3
8	20	給食従事者	秋田市 37	2001/7/17	イ
9	21	給食従事者	大曲 38	2001/8/11	ロ
10	22	給食従事者	能代 39	2001/9/8	ハ
11	23	給食従事者	大館 40	2001/9/19	ニ

厚生科学研究報告書

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盤とした 分散型システムの有効性に関する研究

研究協力者 岩手県環境保健研究センター細菌担当

研究要旨 パルスネット構築にむけて今年度は平成 12 年度に続き、平成 13 年中に当所で確認した 50 株の腸管出血性大腸菌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、異なる事件及び散发事例間に同一パターンを示すものはなかった。

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。

方法 検査対象は平成 13 年中に確認された腸管出血性大腸菌とする。このうち 50 株について CHEF DR 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。ただし、制限酵素は O157 については X b a I、O26 については N o t I を使用した。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、200V, 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 (家族内感染事例及び集団感染事例) は並べてレーンに配置するようにした。表に配列を示す。ある程度菌株を集めてから P F G E を行っているので必ずしも発生順とはなっていない。

結果 泳動結果は写真 1～6 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。事件同士で同一パターンを示すものはなかった。

考察 P F G E の結果から見ると、散发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が分布していると考えられる。今年、県内では家族内感染例と思われていた O157 の事例の P F G E パターンが後に全国で流行したものと一致する事例がみられた。原因が同一かどうかは不明である。パルスネットの構築の必要性を痛感した。ただ、解析ソフトが高額なため、購入がむずかしいのでパルスネットを国の事業化して全国一律に配布されるようにしてもらいたいと思っている。

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思われる、こちらのほうも事業化とともに配算されるようになってもらいたい。

平成13年度腸管出血性大腸菌P F G E一覽表

S01001	O157	Stx1&Stx2	家族1	写真1—1
ECV010367	O157	Stx1&Stx2	家族1	写真1—2
ECV010368	O157	Stx1&Stx2	家族1	写真1—3
ECV010369	O157	Stx1&Stx2	家族2	写真2—1
ECV010370	O157	Stx1&Stx2	家族2	写真2—2
ECV010371	O157	Stx1&Stx2	家族2	写真2—3
ECV010372	O157	Stx1&Stx2	家族2	写真2—4
ECV010373	O157	Stx1&Stx2	家族2	写真2—5
S01005	O26	Stx1	家族3	写真3—1
ECV010383	O26	Stx1	家族3	写真3—2
S01007	O26	Stx1		写真3—3
S01009	O26	Stx1		写真3—4
ECV010384	O26	Stx1	家族4	写真3—5
ECV010385	O26	Stx1	家族4	写真3—6
ECV010386	O26	Stx1	家族4	写真3—7
ECV010387	O26	Stx1	家族4	写真3—8
S01008	O26	Stx1	家族4	写真3—9
ECV010388	O26	Stx1	4井戸水	写真3—10
ECV010389	O26	Stx1	集団	写真4—1
ECV010390	O26	Stx1	集団	写真4—2
ECV010391	O26	Stx1	集団	写真4—3
ECV010392	O26	Stx1	集団	写真4—4
ECV010393	O26	Stx1	集団	写真4—5
ECV010394	O26	Stx1	集団	写真4—6
ECV010395	O26	Stx1	集団	写真4—7
ECV010396	O26	Stx1	集団	写真4—8
ECV010397	O26	Stx1	集団	写真4—9
ECV010398	O26	Stx1	集団	写真4—10
ECV010399	O26	Stx1	集団	写真4—11
ECV010400	O26	Stx1	集団	写真4—12
ECV010401	O26	Stx1	集団	写真4—13

ECV010402	O26	Stx1	集団	写真4-14	
ECV010403	O26	Stx1	集団	写真4-15	
ECV010404	O26	Stx1	集団	写真4-16	
ECV010405	O26	Stx1	集団	写真4-17	
ECV010406	O26	Stx1	集団	写真4-18	
S01010	O26	Stx1	集団	写真4-19	
S01011	O26	Stx1	集団	写真4-20	
S01012	O26	Stx1	集団	写真4-21	
ECV010407	O26	Stx1		写真5-1	
ECV010408	O26	Stx1		写真5-2	
ECV010409	O26	Stx1		写真5-3	同一株からの再分離
ECV010409	O26	Stx1		写真5-4	同一株からの再分離
ECV010411	O26	Stx1&Stx2	家族6	写真5-5	
S01013	O26	Stx1&Stx2	家族6	写真5-6	
ECV010412	O26	Stx1		写真5-7	
ECV010410	O157	Stx2	家族5	写真6-1	
S01014	O157	Stx2	家族5	写真6-2	
ECV990866	O157	Stx2		写真6-3	比較対象
ECV010413	O157	Stx2		写真6-4	
S01015	O157	Stx1&Stx2		写真6-5	
S01016	O157	Stx1&Stx2		写真6-6	