

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

パルスフィールドゲル電気泳動型別法の施設間における変動について
－平成 13 年度報告－

分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所・公衆衛生部・微生物課長

協力研究者

石川和彦	滋賀県立衛生環境センター	田口 寛	京都府保健環境研究所
竹上修平	京都市衛生公害研究所	中村寛海	大阪市立環境科学研究所
横田正春	堺市衛生研究所	辻 英高	兵庫県立衛生研究所
黒川 学	神戸市環境保健研究所	川西伸也	姫路市環境衛生研究所
井上凡己	奈良県衛生研究所	金澤祐子	和歌山市衛生研究所
田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所		

研究要旨

パルスネット構築に向けた基礎的研究のため、近畿支部 11 カ所の衛生研究所において同一菌株と同一ゲルブロックを用いて PFGE 型別を行い本法の安定性をみた。

近畿支部 11 カ所の衛生研究所では PFGE 解析画像の電送が可能であり、PFGE のネットワークに参加する基盤は整っていた。画像解析ソフトによる解析の結果、各施設間の方法の違いに由来すると考えられる差が認められたため、PFGE 条件の統一と精度管理の必要性が認識された。

A. 研究目的

パルスネット構築に向けた基礎的研究のため、近畿支部 11 カ所の衛生研究所において同一菌株と同一ゲルブロックを用いて PFGE 型別を行い本法の安定性をみた。

腸菌 O157:H7(検体 No. 1:菌株 PV01-44、No. 2:菌株 PV01-162、No. 3:菌株 PV01-227)と、検体 No. 3 を大阪府立公衆衛生研究所で制限酵素 (*Xba*I) 処理したゲルブロック 1 個(検体 No. 4)の 4 検体を用いた。

2. PFGE 法

B. 研究方法

1. 供試検体

PFGE パターンが異なる 3 株の腸管出血性大

検体 No. 1～3 の DNA ブロックの作成と制限酵素 *Xba*I 処理は各施設の方法で実施し、検体 No. 4 はそのまま No. 1～3 と同じアガロースゲ

ルで電気泳動を行った。

電気泳動条件については国立感染症研究所の条件を指定したが、電気泳動装置の設定条件を変更できない場合は、各施設の通常の条件でもよいこととした。そして、それぞれの施設の方法を大阪府立公衆衛生研究所で集約した。

3. PFGE 解析画像の電送

各施設の PFGE 解析画像を、電子メールで大阪府立公衆衛生研究所に送付し、同時に写真も郵送し比較した。

4. 画像解析ソフトによる解析

本研究班配布の画像解析ソフト GelComper II (Applied Maths 社)を用い、大阪府立公衆衛生研究所において Dice の計算式で各菌株間の近似度を計算し、UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) 方式によるクラスター分析によってデンドログラムを作成させた。

C. 研究結果

1. 11 施設の PFGE 条件

ジーンパス試薬キット 6 (BIO-RAD) 使用が 2 施設、CHEF Mammalian Genomic DNA Plug Kit (BIO-RAD) を一部変更して使用が 1 施設、試薬キットを使用していない施設が 8 施設であった。

ゲルブロック作成時の菌の培養は、液体培地使用が 9 施設、寒天培地使用が 2 施設であり、ゲルブロックの最終アガロース濃度は、0.5% が 5 施設、0.6% が 3 施設、0.75%、0.8%、1% がそれぞれ 1 施設であった(表 1)。

Lysozyme 処理と ProtinaseK 処理では 3 施設が試薬をキット使用していた(表 2)。他の 8 施設では、Lysozyme 処理は 1mg/ml の濃度で行い、反応時間は 4 時間から 6 時間までが 7 施設、1 施設が 16 時間であった。ProtinaseK 処理は 7 施設が 1mg/ml、1 施設が 0.5mg/ml で、反応時間は

全施設 Over night であった。

ProtinaseK 失活に 6 施設が Pefabloc SC を使用し、2 施設が PMSF、2 施設がキット付属の試薬を使用した。失活試薬やキットを使用せず自家製の Buffer による洗浄を行っている施設が 1 施設あった(表 3)。

制限酵素処理 *Xba*I の 1 sample plug あたりの濃度は、6 施設が 30u、2 施設が 40u、2 施設が 50u、1 施設が 100u であった(表 3)。100u を使用した施設では 50u 使用との比較を行い、50u 使用時にみられた制限酵素未消化と考えられるバンドが 100 u 使用で消失することを確認した。

電気泳動用のアガロース濃度は全施設 1% であり、使用マーカー(λラダー)は、BIO-RAD 製 9 施設、ロッシュ製 1 施設、BioLas 製 1 施設であった(表 4)。

電気泳動装置は CHEF DRIII (BIO-RAD) が 7 施設、CHEF DRII (BIO-RAD) が 1 施設、Gene Path System (BIO-RAD) が 1 施設、Gene Navigator (Pharmacia) が 2 施設であった(表 4)。CHEF DRIII 使用の施設のスウィッチタイムは、国立感染症研究所の現在の条件と同じであったが、CHEF DRII と Gene Path System 使用施設では BIO-RAD のプログラム 23 を使用した。

Gene Navigator 使用施設では国立感染症研究所が平成 9 年の講習会で示した条件をもとに、現在の国立感染症研究所と同じになるスウィッチタイムを設定した。

電気泳動後のゲルの染色は 30-90 分間行われ、洗浄 1 回が 9 施設、2 回が 2 施設であり、写真撮影はポラロイドを使用が 7 施設、その他が 4 施設であった(表 5)。

2. PFGE 解析画像の電送結果

各施設から電送された PFGE 画像は写真と比較して解像度に差がなく、GelComperII での解析が可能な画質であった(図 1、2)。また、全施

設において検体のレーン(4〜7つのレーン)の両側にマーカー(λラダー)を置いており、画像解析に適したマーカーの泳動方法であった。

3. 検体 No. 1〜3 の PFGE パターン

5施設で90kb付近と600kb以上の位置にやや不明瞭なバンドがみられた。この中の2施設はジーンパス試薬キット6(BIO-RAD)を使用しており、そのうち1施設では制限酵素をキットの説明書の2倍量使用することで不明瞭なバンドが消失した。このことから5施設にみられたこれらのバンドは、何らかの原因で制限酵素未消化になり出現したと考えられた。

レーンによってバンドの濃さが異なった施設が1施設あり、これは菌液の量が不揃いであったためと考えられた。また原因は不明であるがレーン全体が白くなった施設が1施設あった。

4. デンドログラムの作成

検体 No. 1、No. 2、No. 3 と 4 はデンドログラム上でそれぞれクラスターを形成したが、制限酵素未消化と考えられるバンドを含めて解析すると、Similarity が No. 1 では 81〜100%、No. 2 も 81〜100%、No. 3 と 4 は 88〜100%であった(図3)。制限酵素未消化バンドを除いて解析すると Similarity が高くなり、No. 1 では 93〜100%、No. 2 は 92〜100%、No. 3 と 4 は 91〜100%になった(図4)。No. 3 と 4 の PFGE パターンは、目視では各施設内で一致していたが、図4のデンドログラム上で100%一致したのは6施設(施設 B、D、F、G、H、K)のみであった。

検体 No. 4 の 11 レーンのみでデンドログラムを作成すると、バンドの数はすべてのレーンで同一であり、位置も大きく異ならなかったが、Similarity は 90〜100%であった(図5)。G、B、C、H、K の 5 施設は Similarity が 100%であったが、G と C の機種が CHEF DRIII、B と K が Gene Navigator、H が Gene Path System であり、パルスタイムも3つの機種で異なっていた。

D. 考察

異なる施設間の PFGE 解析画像の比較を行うには、電気泳動像が各施設で均一であることが重要である。今回数カ所の施設で制限酵素未消化バンドがみられ、その原因として被検菌株の菌量が多すぎる、Protenase K 処理後の洗浄が不十分で制限酵素が不活化され DNA が切断されない、エチジウムブロマイド染色後の脱色が不十分であった等の技術的な問題が考えられた。

また、同一施設において検体 No. 3 と 4 の PFGE パターンがデンドログラム上で100%一致しなかった理由として、ゲルブロック作成から制限酵素処理までの方法の違いが考えられ、今後各施設間で差が出ない方法を検討する必要がある。

電気泳動条件の異同をみるために行った検体 No. 4 の解析では、異なる機種を使用しても100%一致した施設があったことから、異なる機種間の成績の比較が可能であることが示された。これに対し同一機種であっても電気泳動中の Buffer 温度の違いや、マーカー(λラダー)の濃度の差によって成績が一致しないことが考えられ、PFGE 条件の統一と精度管理の必要性が認識された。

E. 結論

近畿支部 11 カ所の衛生研究所では PFGE 解析画像の電送が可能であり、PFGE のネットワークに参加する基盤は整っているが、被検菌の培養方法、ゲルブロックの作成方法から電気泳動に至る PFGE 実施の各条件によって判定に相違がみられることから、統一した方法での実施が必要と考えられる。

F. 研究発表

なし。

表1. PFGE条件 (ゲルブロッック作成)

1. 菌の培養、菌液調整				2. アガロースブロッック作成						
施設	使用培地	培養温度, 時間	培養条件	使用菌液量	菌洗浄	菌液作成液最終液量	アガロース名メーカー	濃度 (最終濃度)	溶解液	
A	液体	BHI 36°C 16時間	静置	300μl	PettIV*1 (1回)	PettIV 100μl	InCert Agarose BMA	1.6%	(0.8%)	PettIV
B	液体	BHI 36°C 18時間	静置	400μl	精製水 (2回)	精製水 400μl	Agarose Prep pharmacia	1%	(0.5%)	精製水
C	液体	BHI 37°C 18時間	静置	1ml	蒸留水 (3回)	純水1ml	Low Melt agarose BIO-RAD	1%	(0.5%)	超純水
D	斜面	普通寒天 37°C 18時間	静置		無	100μl	McF#1.0 程度	1%	(0.75%)	純水
E	液体	L-broth 36°C 16時間	振盪 (160rpm/分)	200μl	MilliQ水 (2回)	MilliQ水 200μl	Low Melt agarose BIO-RAD	1%	(0.5%)	MilliQ水
F	液体	TSB 37°C 18時間	静置	300μl	生食水 (1回)	TE 500μl	InCert Agarose BMA	1%	(0.5%)	
G	液体	TSB 37°C 18時間	振盪 (120回/分)	100μl	無	*2 150μl	キットの説 明書通り	1.2%	(0.6%)	*2
H	液体	TSB 37°C 18~20時間	静置	300μl	無	*2 150μl	キットの説 明書通り	1.2%	(0.6%)	*2
I	液体	TSB 37°C 19時間	振盪 (110回/分)	50μl	MilliQ水 (1回)	MilliQ水 100μl	Low Melt agarose BIO-RAD	1%	(0.5%)	MilliQ水
J	平板	TSA 35°C 16~18時間	静置		生食水 (1回)	TE 200μl	McF#1.0 程度	2%	(1%)	MilliQ水
K	液体	L-broth 36°C 18時間	振盪 (120回/分)	100μl	MilliQ水 (1回)	MilliQ水 300μl	Low Melt agarose BIO-RAD	1.2%	(0.6%)	MilliQ水

*1 : 10mM TE (pH8.0), 1M NaCl

*2 : BIO-RADのキット付属品

*3 : Low Melt agaroseとクロモゾーマルグレードアガロースをそれぞれ1%使用

表2. PFGE条件 (溶菌、除蛋白)

3. Lysozyme処理										4. Protienase K 処理									
施設	Lysozyme メーカー名	濃度	溶解液	温度	時間	回数	反応条件	Lysozyme 液洗浄	Protienase K メーカー名	濃度	溶解液	温度	時間	回数	反応条件				
A	ロッシュ	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	4時間	1回	振盪 (100回/分)	無	ロッシュ	1mg/ml	*2	50°C	16時間	1回	振盪 (100回/分)				
B	和光純薬	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	4時間	1回	振盪 (50回/分)	無	和光純薬	1mg/ml	*2	50°C	18時間	1回	振盪 (50回/分)				
C	和光純薬	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	5時間	1回	振盪 (22回/分)	無	和光純薬	1mg/ml	*2	50°C	18時間	1回	振盪 (22回/分)				
D	SIGMA	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	4時間	1回	静置	無	ロッシュ	1mg/ml	*2	50°C	16時間	1回	静置				
E	和光純薬	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	16時間	1回	振盪 (34回/分)	無	和光純薬	1mg/ml	*2	50°C	16時間	1回	振盪 (34回/分)				
F	*1	*1	*1	37°C	2時間	1回	静置	無	*1	*1	*1	50°C	over night	1回	静置				
G	*1	*1	*1	37°C	1.5時間	1回	静置	有*1	*1	*1	*1	50°C	18時間	1回	静置				
H	*1	*1	*1	37°C	1時間	1回	静置	有*1	*1	*1	*1	50°C	16~20時間	1回	静置				
I	和光純薬	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	5時間	1回	振盪 (50回/分)	無	ロッシュ	1mg/ml	*2	50°C	20時間	1回	振盪 (50回/分)				
J	和光純薬	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	6時間	1回	振盪 (57回/分)	無	和光純薬	0.5mg/ml	*2	50°C	16時間	1回	振盪 (57回/分)				
K	生化学工業	1mg/ml	0.5M EDTA	37°C	4時間	1回	振盪 (40回/分)	無	ロッシュ	1mg/ml	*2	50°C	16時間	1回	振盪 (40回/分)				

*1: BIO-RADのキット付属品

*2: 0.5M EDTA, 1%N-lauroylsarcosine加

表3. PFC条件 (制限酵素処理)

6. XbaI による制限酵素処理														
5. Protenase K失活														
施設	失活試薬名	濃度	温度 時間	回数	反応条件	洗浄	洗浄条件	XbaI メーカー	濃度 /plug	温度	時間	反応条件	Buffer	BSA 添加
A	Pefabloc SC	4mM in TE	50°C 30分	3回	振盪 (100回/分)	TE, 4°C 30分1回	静置	タカラ	30u	37°C	16時間	振盪 (100回/分)	Mbuffer (タカラ)	有(0.01%)
B	Pefabloc SC	4mM in TE	50°C 60分	2回	振盪 (50回/分)	TE, 氷上 60分1回	振盪 (50回/分)	ロツシユ	30u	37°C	6時間	振盪 (50回/分)	Hbuffer (ロツシユ)	有(100 µg/ml)
C	PMSF	1mM	50°C 30分	2回	振盪 (22回/分)	TE, 氷上 30分1回	振盪 (22回/分)	タカラ	30u	37°C	18時間	振盪 (22回/分)	Mbuffer (タカラ)	有(100 µl/ml)
D	Pefabloc SC	4mM in TE	50°C 30分	2回	静置	TE, 氷上 30分1回	静置	タカラ	50u	37°C	20時間	静置	Mbuffer (タカラ)	有(0.01%)
E	Pefabloc SC	4mM in TE	50°C 30分	2回	振盪 (34回/分)	TE, 氷上 30分1回	振盪 (34回/分)	ロツシユ	40u	37°C	12時間	振盪 (34回/分)	Hbuffer (ロツシユ)	無
F	PMSF	1mM	42°C 30分	4回	振盪 (120rpm)	TE, 42°C 15分4回	振盪 (120rpm)	タカラ	30u	37°C	over night	振盪 (60rpm)	Mbuffer (自家製)	有(100 µg/ml) TritonX100(0.01%加)
G	*1					*1, 室温 30分5回	振盪 (30回/分)	BIO-RAD	100u	37°C	18時間	静置	*1	
H	*1					*1, 室温 30~60分3回	振盪	BIO-RAD	50u	37°C	16~20時間	静置	*1	
I	Pefabloc SC	4mM in TE	50°C 50分	2回	振盪 (50回/分)	TE, 氷上 40分1回	振盪	ロツシユ	30u	37°C	19時間	振盪 (50回/分)	Hbuffer (ロツシユ)	無
J						*2	振盪 (57回/分)	ロツシユ	30u	37°C	16時間	振盪 (57回/分)	Hbuffer (ロツシユ)	無
K	Pefabloc SC	4mM in TE	50°C 30分	2回	振盪 (40回/分)	TE, 氷上 30分1回	振盪 (40回/分)	ロツシユ	40u	37°C	4時間	振盪 (40回/分)	Hbuffer (ロツシユ)	有(100 µg/ml)

*1: BIO-RADのキット付属品

*2: 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA-Na2 (pH8.0) 中で氷上、2時間、振盪を2回、その後で氷上、1時間、振盪を1回

表4. PFGE条件 (電気泳動)

7. 電気泳動用アガロースとマーカー(スラダー)		8. 電気泳動装置									
施設	アガロース名	濃度	マーカーの名称	マーカーの加熱	装置メーカー	機種	バンプアー 温度	電圧	スイッチタイム*2	泳動時間	
A	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	45°C、5分	BIO-RAD	CHEF	DR111	10°C	6V/cm	①	22時間
B	Agarose NA (pharmacia)	1%	Biolabs	無	Pharmacia	Gene Navigator		7°C	200V	③	22時間1分
C	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	45°C、10分	BIO-RAD	CHEF	DR111	12°C	6V/cm	①	22時間
D	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	42°C、5分	BIO-RAD	CHEF	DR111	12°C	6V/cm	①	22時間
E	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	ロジシュ		BIO-RAD	CHEF	DR11	14°C	6V/cm	②	20時間
F	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD		BIO-RAD	CHEF	DR111	14°C	6V/cm	①	22時間
G	*1(BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	45°C、10分	BIO-RAD	CHEF	DR111	12°C	6V/cm	①	22時間
H	*1(BIO-RAD)	1%	BIO-RAD		BIO-RAD	Gene Path System		12°C	6V/cm	②	20時間
I	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	44.5°C、4分	BIO-RAD	CHEF	DR111	12°C	6V/cm	①	22時間
J	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	45°C、15分	BIO-RAD	CHEF	DR111	11°C	6V/cm	①	22時間
K	PFCアガロース (BIO-RAD)	1%	BIO-RAD	50°C、2分	Pharmacia	Gene Navigator		7°C	200V	③	22時間1分

*1: BIO-RADのキット付属品

*2: ① 4~8秒 (リニア) 9時間
8~50秒 (リニア) 13時間
② BIO-RADのプログラム23
4~8秒 (リニア) 11時間
8~50秒 (リニア) 9時間
③ 4~8秒 4.5時間
8~4秒 1分
4~8秒 4.5時間
8~50秒 13時間
Interpolate設定

表5. PFGE条件 (ゲルの染色、写真撮影)

9. ゲルの染色									
施設	エチジウム・プロマイド濃度	染色時間	洗浄液	洗浄時間, 回数	トランスイルミネーター名	UV波長	使用フィルム	露出時間	
A	0.5 μ g/ml	30分	水道水(流水)	3時間, 1回	(家田貿易)	312nm	ポラロイドT677 IS03000	3秒	
B	0.2 μ g/ml	30分	蒸留水	1時間, 1回と一夜, 1回	(フナコシ)	不明	ポラロイドT677	15秒	
C	0.2 μ g/ml	90分	精製水	1回	(POLAROID)	312nm	ポラロイドT677 IS03000	1秒	
D	0.5 μ g/ml	30分	純水	30分, 1回	UVPウルトラバイオレットベンチ トップトランスイルミネーター	254nm	Fujiフオトラマ FP-3000B	4秒	
E	0.17 μ g/ml	30分	蒸留水	30分, 1回	TW-20 (フナコシ)	312nm	フナコシ DS-300	1秒	
F	0.2 μ g/ml	60分	MiliQ水	2回	ULTRA-VIOLET TM20 (フナコシ)	312nm	ポラロイドT677	1秒	
G	1 μ g/ml	45分	イオン交換水	2時間, 1回	InstablocII (BIO-RAD)	302nm	SONY UPC-3010		
H	0.5 μ g/ml	30分	蒸留水	1時間, 1回	Model SL-800G (フナコシ)	312nm	ポラロイドT677	80秒	
I	0.15 μ g/ml	30分	蒸留水	40分, 1回	CSF-20BC (コスモバイオ)	254nm	ポラロイドT677	1秒	
J	0.5 μ g/ml	60分	蒸留水	1時間, 1回	DT-20MCP (アトー)	254nm	ポラロイドT677	1秒	
K	0.2 μ g/ml	30分	蒸留水	30分, 1回	TP-15MP (アトー)	312nm	SONY UPP-110HD	1秒	

10. 写真撮影

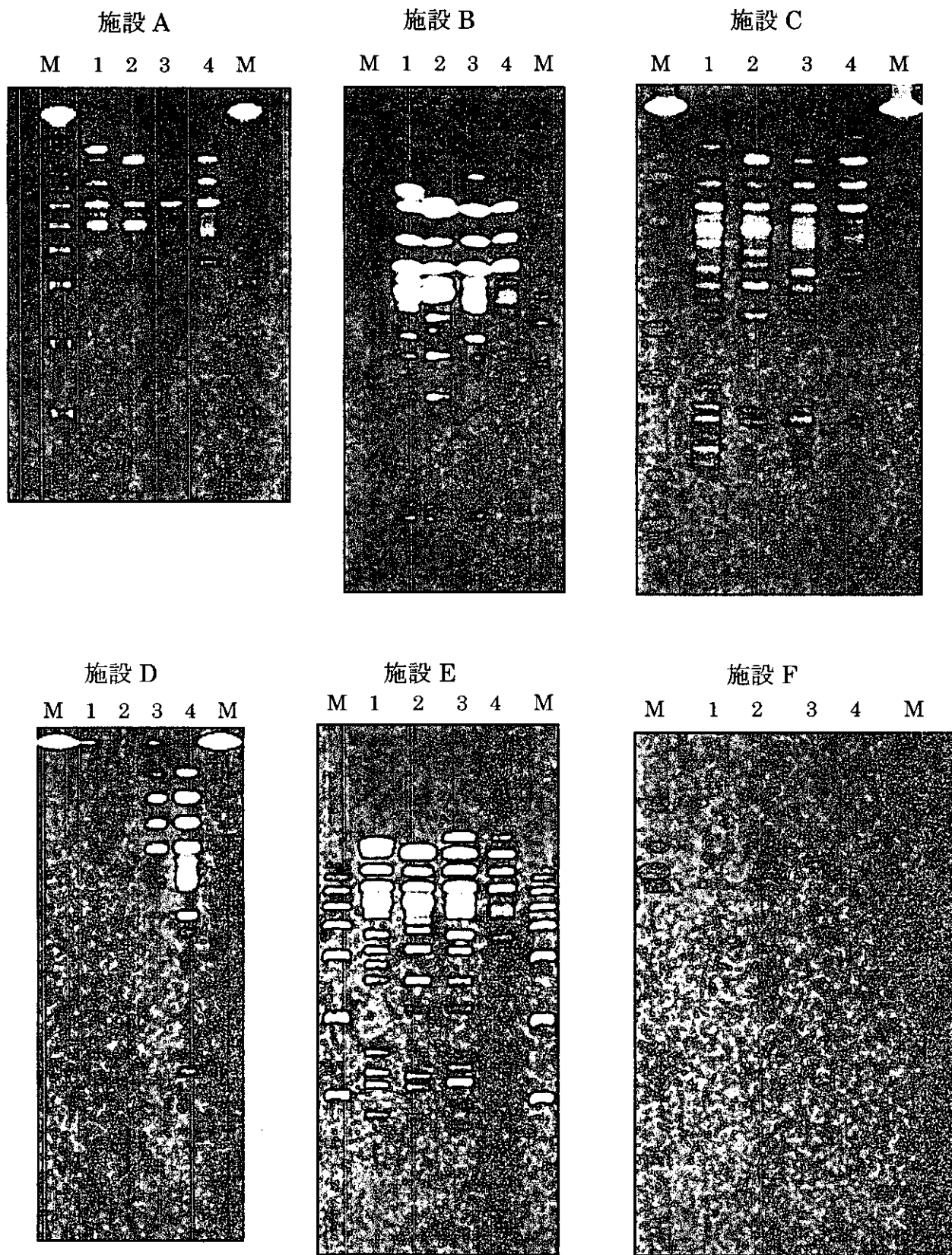


図 1. 施設 A から F の PFGE 画像

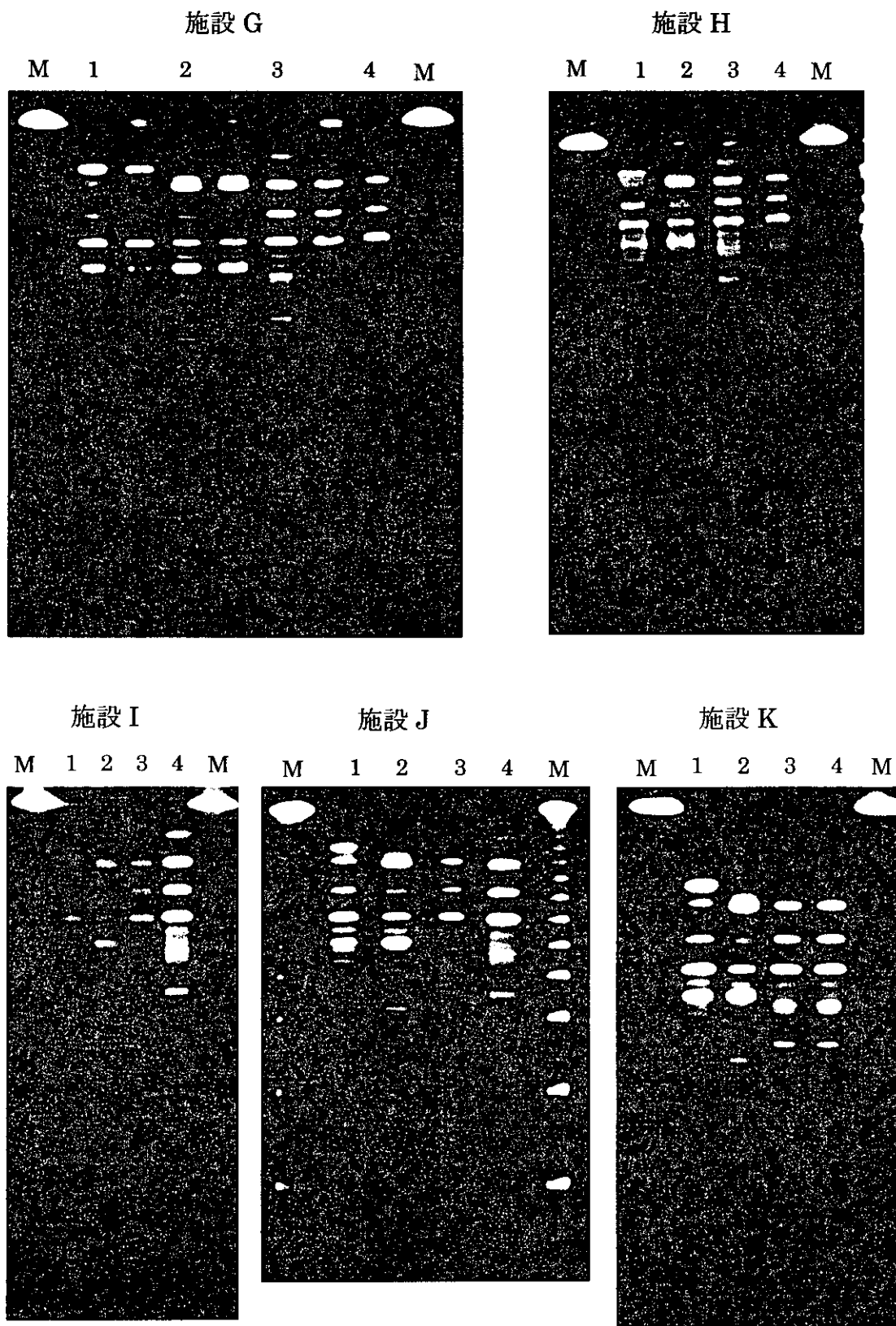


図 2. 施設 G から K の PFGE 画像

Dice (Td 1.2%-1.2%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
 NH-1

NH-1

施設 検体
 No.

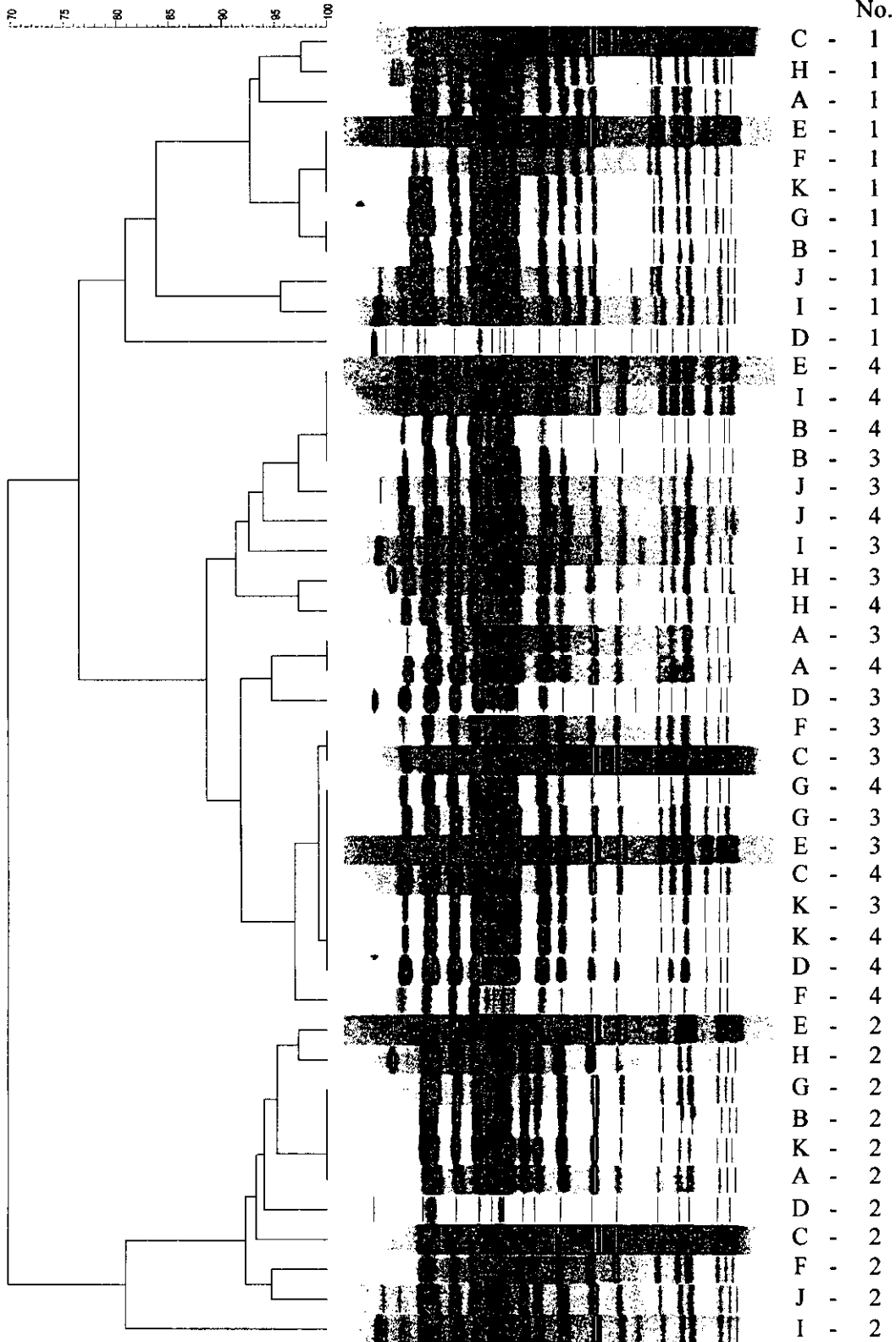


図 3. 検体 No.1~4 のデンドログラム (未消化バンドを含む)

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
NIH-1

NIH-1

施設 検体
No.

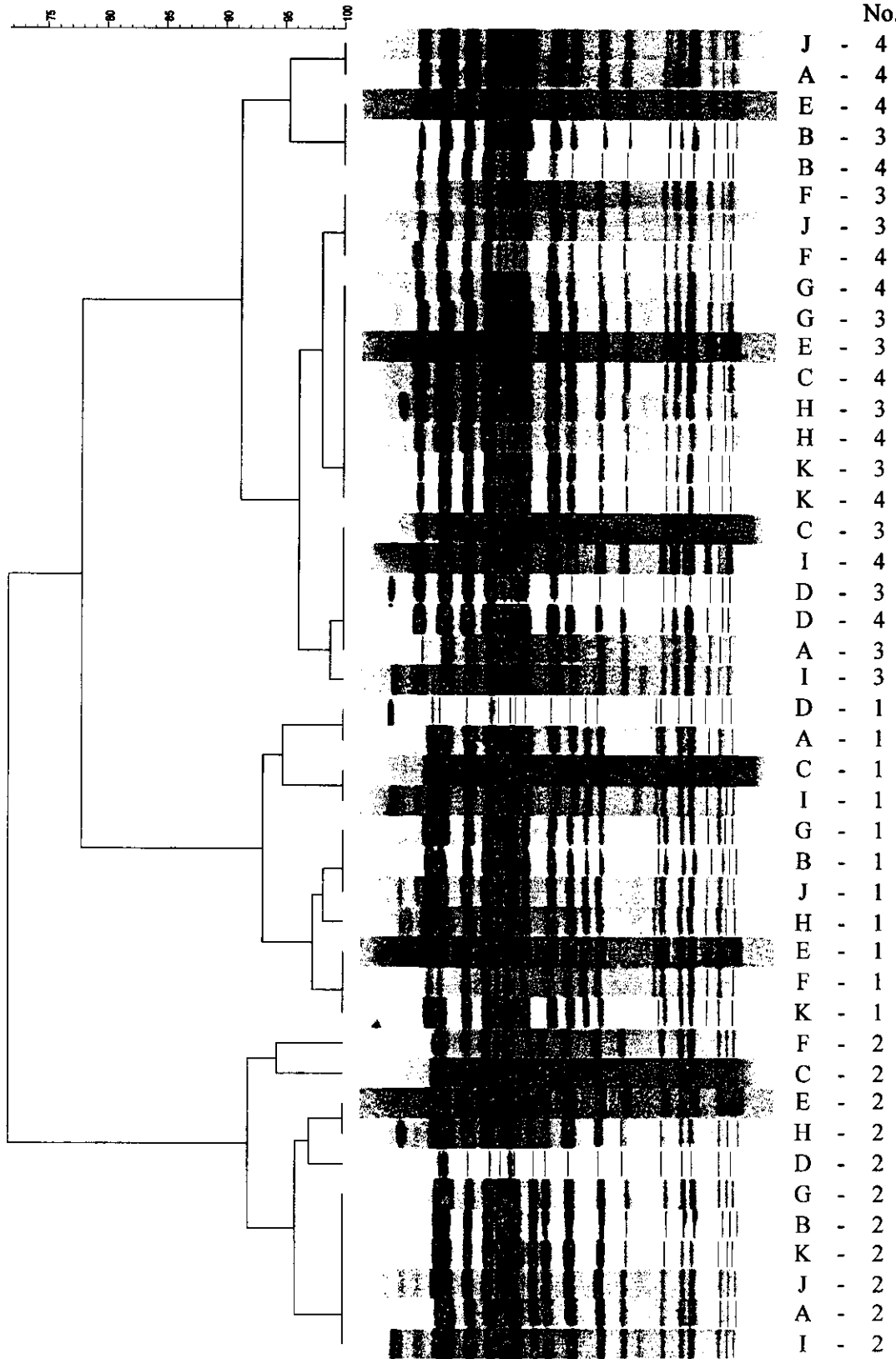


図4. 検体1~4のデンドログラム (未消化バンドを除く)

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (I>0.0% S>0.0%) (0.0%-100.0%)
NH-1

NH-1

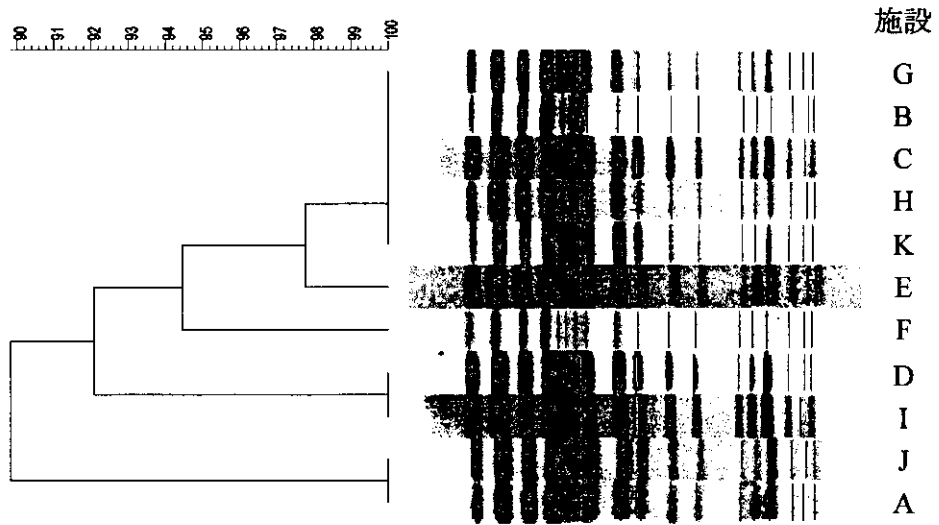


図 5. 検体 No.4 のデンドログラム

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

大阪市内で分離されたウェルシュ菌のパルスフィールド
電気泳動法による解析

協力研究者 中村寛海 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課研究員
小笠原準 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課研究主任
長谷 篤 大阪市立環境科学研究所 微生物保健課研究主任

研究要旨

1996年から2001年の間に大阪市内で発生した食中毒4事例から分離された32株のウェルシュ菌についてパルスフィールド電気泳動(PFGE)法による解析を行った。その結果、PFGEパターンが得られなかった4株(12.5%)を除くと同一血清型の菌株は同一のPFGEパターンを示した。ウェルシュ菌食中毒事例由来菌株の解析においてPFGE法の結果は菌株の血清型別試験の結果と一致し、その有用性が示された。PFGE法は市販の血清に該当しない菌株の比較においても有用であった。

A.研究目的

ヒトの腸内常在菌であり、環境中に広く存在するウェルシュ菌を食中毒の原因微生物と判断するためには、患者および食品由来株を比較し、同一であることを確認しなければならない。ウェルシュ菌株の比較には血清型別試験が行われる。しかしながら、90型以上といわれているHobbsの血清型はわずか17型しか市販されていない。また、食中毒起因ウェルシュ菌であっても、これらの血清型に該当しないことが多い。Hobbsの血清型以外に東京都立衛生研究所(都衛研)が提唱しているTWの血清型があるが、現在のところ市販に至っていない。

そこで、大阪市内で発生した食中毒事例により分離されたウェルシュ菌株の比較をPFGE法を用いて行い、その有用性について検討したので報告する。

B.研究方法

1.使用菌株

1996年から2001年の間に大阪市内で発生したウェルシュ菌が原因と疑われる食中毒事例由来株(表1)およびウェルシュ菌の標準菌株であるATCC13124株を使用した。

2.ウェルシュ菌の検出

糞便はカナマイシン加CW寒天平板培地(KMCW)(ニッスイ)に直接塗抹し、常法

に従ってウェルシュ菌を分離、同定した。食品は GAM 半流動高層培地 (ニッスイ) あるいはチオグリコール酸培地 II(ニッスイ) に接種した後 KMCW に塗抹し、常法にしたがってウェルシュ菌を分離、同定した。

3. ウェルシュ菌の血清型別試験

ウェルシュ菌と同定された菌株は市販の血清(耐熱性A型ウェルシュ菌免疫血清「生研」)(デンカ生研)により Hobbs の血清型別を行い、これらに該当しないものを Hobbs 型別不能 (untypable, UT) とした。HobbsUT 株の一部は、都衛研に依頼し TW の血清型別を実施した。

4. エンテロトキシン (*cpe*) 遺伝子の検出

ウェルシュ菌と同定された菌株について *cpe* 遺伝子の検出を行った。*cpe* 遺伝子の検出は、PCR 法により行った。すなわち、市販されているウェルシュ菌毒素検出用プライマー CPE-1 および 2 (TaKaRa) を使用し、添付の説明書にしたがって PCR 法を実施した。PCR 増幅産物は、3%NuSieve3:1 Agarose(BMA)で泳動後、0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で染色した。PCR 増幅産物として 456bp のバンドが検出されたものを *cpe* 遺伝子保有株とした。

5. PFGE 法

卵黄 GAM 寒天平板培地 (ニッスイ) に発育したウェルシュ菌について Canard ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1989;86:6676-6680) の方法に従ってプラグを作製し、20U の *Sma*I (NEB) で 18~20 時間処理した。電気泳動は CHEF DRIII (BIO-RAD) により、電圧 6V/cm、パルスタイム 0.5-40 秒で 0.5xTBE を使用し

14 $^{\circ}$ C で 20 時間泳動を行った。泳動後 0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイド溶液で染色し、写真を撮影した。

C. 研究結果

図 1 にウェルシュ菌の血清型と PFGE パターンを示した。32 株のうち 4 株 (12.5%) の PFGE パターンは得られなかった (レーン 8、12、15、37)。これらを除くと、同一血清型の菌株は全て同一の PFGE パターンを示した。

事例 1 では 7 株の患者由来株のうち 5 株が 3 つの血清型 (TW61、TW62、Hobbs13) に分類され、残りの 2 株は Hobbs および TW の血清型に該当しなかった。血清型が TW61 と TW62 に分類された 3 株の PFGE パターンは同一であったが、残り 4 株の PFGE パターンは異なっていた (レーン 3~9)。

事例 2、3 において、同一血清型のウェルシュ菌は同一の PFGE パターンを示した。事例 2 の食品由来 1 株の血清型は TW12 であったが、この菌株の PFGE パターンは得られなかった (レーン 15)。事例 4 では、患者由来 9 株のうち 8 株の血清型は HobbsUT であった。これら 8 株のうち 6 株の PFGE パターンは同一であった (レーン 31~33、35、36、38)。残りの 2 株は異なる PFGE パターンを示した (レーン 30、34)。血清型が Hobbs13 に分類された 1 株の PFGE パターンは得られなかった (レーン 37)。ATCC13124 株は血清型別試験の結果、HobbsUT であった。この菌株の PFGE パターンは事例 1 と 4 の HobbsUT 株のパターンとは異なっていた (レーン 2)。

D. 考察

事例2、3は患者由来株の血清型が同一で、食品由来株にも同一の血清型が存在し、すべての菌株が *cpe* 遺伝子を保有していたことから、それぞれ血清型が TW1 および Hobbs1 のウェルシュ菌による食中毒と考えられた。これらの事例において、同一血清型に分類された菌株の PFGE パターンは同一であった。これに対して患者由来株がすべて *cpe* 遺伝子を保有していなかった事例1においては、菌株の血清型と同様、PFGE パターンも多種類を示し、この事例の原因微生物をウェルシュ菌と判断するのは困難であると考えられた。このようにウェルシュ菌食中毒事例由来株において PFGE 法の結果は血清型別試験の結果と一致し、PFGE 法は血清型別試験と同様に有用な方法であった。4 事例のうち市販の血清で患者および食品由来株を Hobbs1 に分類することが可能であったのは事例3のみであった。事例4では HobbsUT 株のうちで *cpe* 遺伝子を保有し、食中毒の原因と考えられる6株は同一の PFGE パターンを示した。また、*cpe* 遺伝子を保有しない2株の PFGE パターンは6株のパターンと異なっていた。同様に事例1の HobbsUT 株も *cpe* 遺伝子を保有せず、その PFGE パターンも異なっていた。このように、PFGE 法は市販の血清に該当しない菌株の比較においても有用であると考えられた。

E. 結論

大阪市内で発生した食中毒事例由来菌株の解析において、PFGE 法の結果は血清型別試験の結果と一致し、その有用性が示された。

PFGE 法は市販の血清に該当しない株の比較においても有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

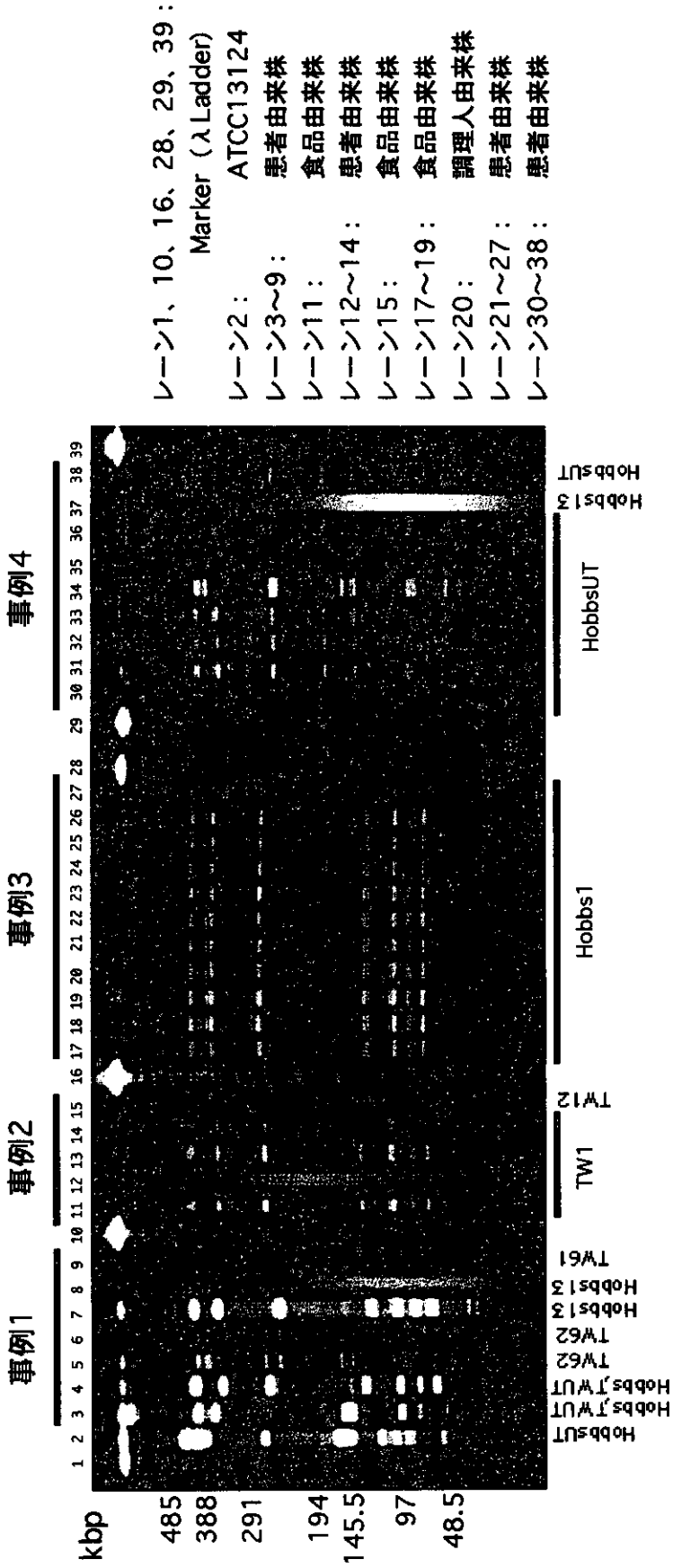
表1 使用したウエルシュ菌株

事例 No.	年	由来	菌株数	血清型 ¹⁾ (菌株数)	エンテロトキシン (cpe) 遺伝子 ²⁾ (菌株数)
事例 1	1996	患者	7	Hobbs および TWUT(2)	cpe 遺伝子- (2)
				Hobbs13(2)	cpe 遺伝子- (2)
				TW61(1)	cpe 遺伝子- (1)
				TW62(2)	cpe 遺伝子- (2)
事例 2	1997	患者	3	TW1(3)	cpe 遺伝子+ (3)
			2	TW1(1)	cpe 遺伝子+ (1)
				TW12(1)	cpe 遺伝子+ (1)
事例 3	1999	患者	7	Hobbs1(7)	cpe 遺伝子+ (7)
			3	Hobbs1(3)	cpe 遺伝子+ (3)
		調理人		1	Hobbs1(1)
			事例 4	2001	患者
	Hobbs13(1)	cpe 遺伝子- (1)			
計			32		

1) UTは血清型に該当しない株

2) PCR法によるエンテロトキシン遺伝子の検出。+はcpe遺伝子を保有、-はcpe遺伝子を保有しないことを示す。

図1 ウェルシュ菌の血清型とPFGEパターン



厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

京都府における腸管出血性大腸菌の分子生物学的疫学解析

協力研究者	田口 寛	京都府保健環境研究所	主任研究員
	浅井 紀夫	京都府保健環境研究所	主任
	藤原 恵子	京都府保健環境研究所	技師
	降井 佐太郎	京都府保健環境研究所	課長

研究要旨

2001年早春に明らかとなった保育園でのEHEC O26の集団感染事例とその前後に発生したEHEC O26事例との関連性をパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を中心とした疫学マーカーを用いて調査した。

集団発生事例については、すべて同一のPFGE泳動パターンを示した。また、治療後の検査で分離された菌株も疫学マーカーが一致したことから新たな感染でないと考えられた。

前年に発生したEHEC O26感染事例3例とは、1例に上記と同じ疫学マーカーを示した事例があり、関連性があることが判明した。

以降の事例については、疫学マーカーが一致しなかったことから、関連性が否定された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）をはじめ各種の検出された病原菌について、疫学マーカー解析を行い菌株間の関係を調査することは、原因究明や予防に重要となってきた。

2001年2月から3月にかけて京都府下の保育園でEHEC O26の集団感染事例が発生した。同一感染源によるもの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実施した。また、その前後において検出された他事例から分離されたEHEC O26についても同様の解析を行い、それらの関連性について調査した。

B. 研究方法

供試菌株は、保育園での集団感染事例にお

ける園児17名由来の19菌株と、この事例以前の2000年秋季に分離された4株、そして、以後の2001年の夏季に分離された5株を使用した。それぞれの概要を表1に示した。

PFGE法は、ゲルブロックの作成は和田ら（和田昭仁ほか：細菌学誌1997,52:763）の方法で行い、電気泳動の条件は国立感染症研究所で実施している方法に従った。DNAの切断はXba IとBln Iを用い、電気泳動装置はGene Navigator System（アマシャムファルマシア）で行った。

志賀毒素型別は、PCR法とVTEC-RPLA（デンカ生研）で実施し、薬剤感受性試験はAM（アンピシリン）、CTX（セファキシム）、K（カナマイシン）、GM（ゲンタマイシン）、S（ストレプトマイシン）、TE（テトラサイクリン）、C（クララムフェニコール）、CIP（シプロフロキサシン）、FF（ホスホマイシン）、

TMP(トリメプロリム)、NA(ナリジク酸)、SXT (スルファトキザール+トリメプロリム)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。

プラスミドプロファイル型は、田口ら(田口真澄ほか:感染症学誌 1992, 66:1067)の方法で実施した。対象菌株とした *S. Enteritidis* L-156 と *E. coli* K12CSH-2 NR1) は大府立公衆衛生研究所から分与されたものを用いた。

C. 研究結果

事例1において分離された菌株は 19 株あったが、そのうちの 17 株は、集団感染事例が確認されたときのもので、すべて志賀毒素 1 型であり、AM,K,S,TE に薬剤耐性を示し、またプラスミドプロファイルも 約 100kbp、90kbp 及び 5kbp を保有する同一パターンを示した。PFGE についても、*Xba* I と *Bln* I による切断パターンは同一であった。また、2 株は、治療完了後の 4 月に実施した確認検査時に検出された菌株であるが、3 月に分離された菌株と薬剤感受性、プラスミドプロファイル、及び、図 1 に示したように *Xba* I と *Bln* I 切断による PFGE も同じパターンであった。

この事例の前年に分離された EHEC O26 の 4 株について、志賀毒素はすべて同じ 1 型であったが、3 株については、プラスミドプロファイルは約 100kbp を保有せず、また、薬剤耐性も事例 1 とは異なったパターンを示した。残りの 1 株については、集団感染事例と同じパターンを示した。PFGE についても、*Xba* I と *Bln* I による切断パターンは 3 株が異なり、1 株は事例 1 と同じ泳動パターンを示した。

以後に発生した 5 株については、すべて志賀毒素は同じ 1 型で、プラスミドプロファイルは 2 株が事例 1 と同一パターンを示したが、薬剤耐性が事例 1 と異なっていた。また、PF

GE については、図 3 に示したように 5 株とも *Xba* I と *Bln* I による切断パターンが事例 1 と異なっていた。

D. 考察及びまとめ

保育園での EHEC O26 による事例は、PFGE 他による疫学マーカーが同じであったことからすべて同じ菌に由来する集団発生であることが明らかとなった。また、治療後の検査で分離された菌株の疫学マーカーが事例発生時と同じであったこと及び、園内の拭き取り調査等で O26 が検出されなかったことから新たな感染ではなく再排菌の可能性が大きいと考えられた。

前年に発生した EHEC O26 感染事例とは、1 例から分離された菌株と疫学マーカーが一致したことから、関連性があることが判明した。

集団発生後に発生した府内の EHEC O26 感染事例とは、疫学マーカーが一致していなかったことから関連性がないものと考えられた。

PFGE による解析は、他の薬剤感受性試験等や疫学調査と併行して行うことで、患者相互の関連を調べるだけでなく、感染源や原因食材の調査に有効であると考えられる。

PFGE 並びにプラスミドプロファイルに関し、菌株の分与とご指導下さいました大阪府立公衆衛生研究所小林一寛先生、田口真澄先生にお礼申し上げます。

E. 研究発表

1 論文発表

横田昇平ほか: 保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 の集団感染事例、病原微生物検出情報、23:16-17(2002)