

表1 PFGEによる026の解析結果

分離地研	菌株数	PFGE型別分類数
富山県	45	14
名古屋市	30	18
愛知県	30	18
石川県	27	12
岐阜県	24	12
三重県	24	12
福井県	11	9
岐阜市	5	3
196		

表2 各地研で検出された1 PFGE型1株のPFGE型
1 PFGE型1株の型数 / 全PFGE型数 (%)

岐阜	7/12 (58.3)
岐阜市	1/3 (33.3)
三重	9/16 (56.3)
名古屋市	10/17 (58.8)
愛知	7/17 (41.2)
石川	6/6 (100)
福井	4/7 (57.1)
富山	8/14 (57.1)

表3 複数の026が認められたPFGE型とその検出された地研

		PFGE型																		
		4*	7	11	12	18	21	25	29	30*	31	36*	65*	9	23	28*	38	26	33	24
東海	岐阜										●	●		● ²					●	● ²
	岐阜市																			
	三重	●		○	●		●					●				○			●	● ²
	名古屋市				●		●	●											○	● ³
北陸	愛知	●	○					●	○		●				○	○	● ³	○ ³		● ²
	石川																			
	福井			○					○						○					
	富山		○			▲ ²				▲ ²					○	○		○		

PFGE型4から65は1 PFGE型2株、PFGE型9、23、28は1 PFGE型3株、PFGE型38は1 PFGE型4株
PFGE型26、33は1 PFGE型5株、PFGE型24は1 PFGE型6株。

*: 検出年が全て同じPFGE型。右肩数字は菌株数を示す。ただし表記のない記号は1株を示す。

●: 東海地方の地研でのみ検出されたPFGE型。○: 東海、北陸地方で検出されたPFGE型。

▲: 北陸地方でのみ検出されたPFGE型。

表4 解析ソフト「フィンガープリントII」での検体間の相同性 (%) の違い

地研	各検体間の相同性 (%)		
	検体1と3	検体1と2	検体1と4
A	100	71	41
B	86	69	46
C	94	64	57
D	100	78	58

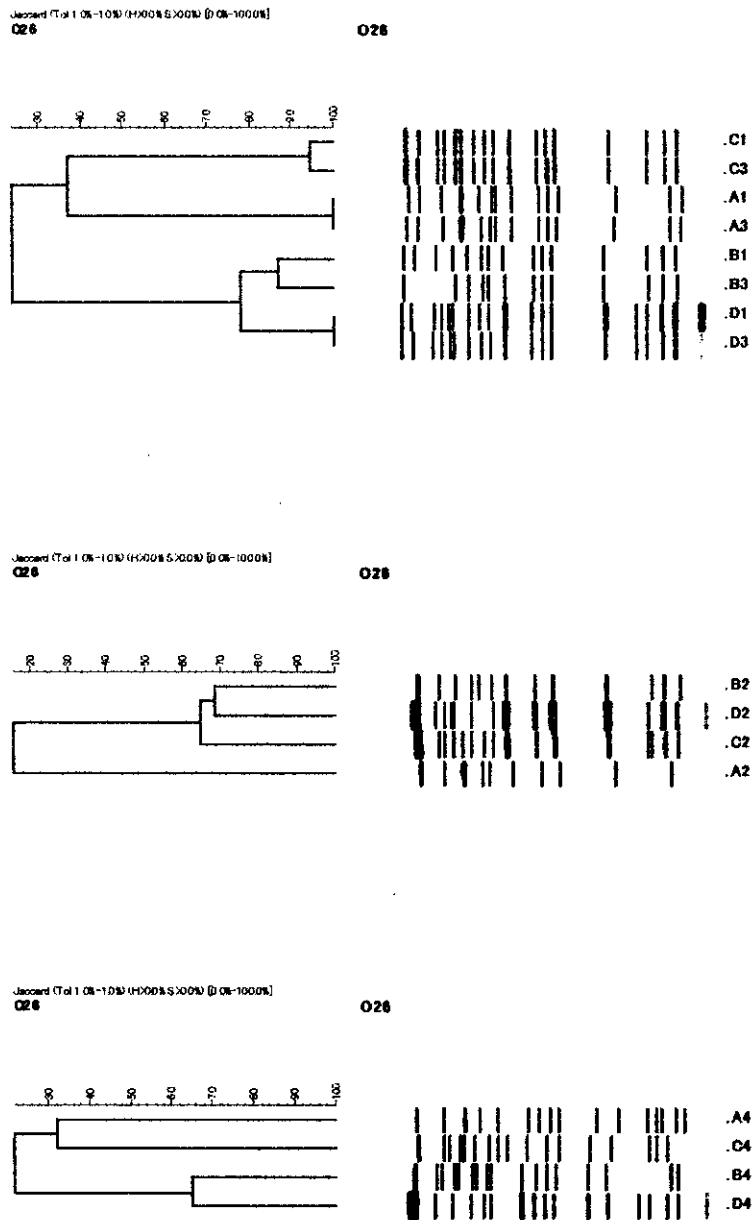
表5 東海・北陸4地研の溶菌過程、制限酵素処理及びPFGE機種種の比較

地研名	A	B	C	D
ブロックの作成				
菌液または菌体浮遊液	菌液	菌体浮遊液	菌液	菌体浮遊液
低融点アガロース濃度	1	2	1.6	2
会社名	Bio-Rad	日本ジーン	日本ジーン	日本ジーン
Lysozyme処理				なし
Lysozyme濃度	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	
0.5M EDTA (pH8.0)	○	○	○	
反応時間	4~5	5	5~6	
会社名	和光純薬	和光純薬	シグマ	
Proteinase K処理				
Proteinase K濃度	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml
0.5M EDTA (pH8.0)+1%Lauroylsarcosine	○	○	○	× (pH9.5)
反応時間	16	16	16	18
会社名	和光純薬	和光純薬	シグマ	和光純薬
制限酵素前処理				
Pefabloc	○		○	
Pefabloc濃度	4		4	
時間 回数	30分、2回		30分、2回	
TE溶液洗浄				
時間 回数	30分、1回		2時間、2回	
PMSF		○		○
PMSF濃度		1		1
時間 回数		30分、2回		60分、1回
TE溶液洗浄				酵素反応用バッファー
分 回数		60分、2回		60分、1回
制限酵素処理				
酵素単位	30	30	30	30
反応時間	16	18	16	18
会社名	ロシュ	タカラ	ロシュ	日本ジーン
PFGE機種	DR-III	DR-III	GENE NAVIGATOR	DR-III
マーカ				
会社名	New England Biolabs	Bio Rad	Bio Rad	Bio Rad
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE

表6 PFGE機種種の違いによる検体間の相同性の違い

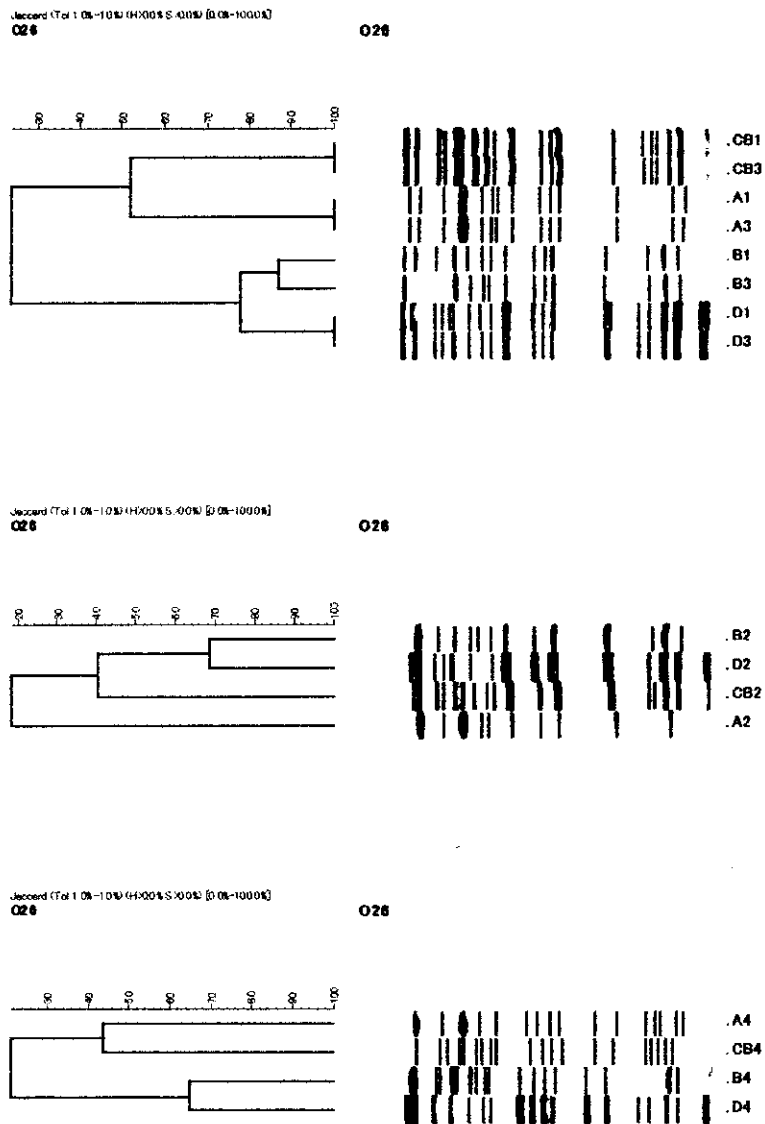
PFGE	各検体間の相同性 (%)		
	検体1と3	検体1と2	検体1と4
Gene Navigator	94	64	57
DR-III	100	84	59

図1 各検体ごとの地研間での相同性の違い



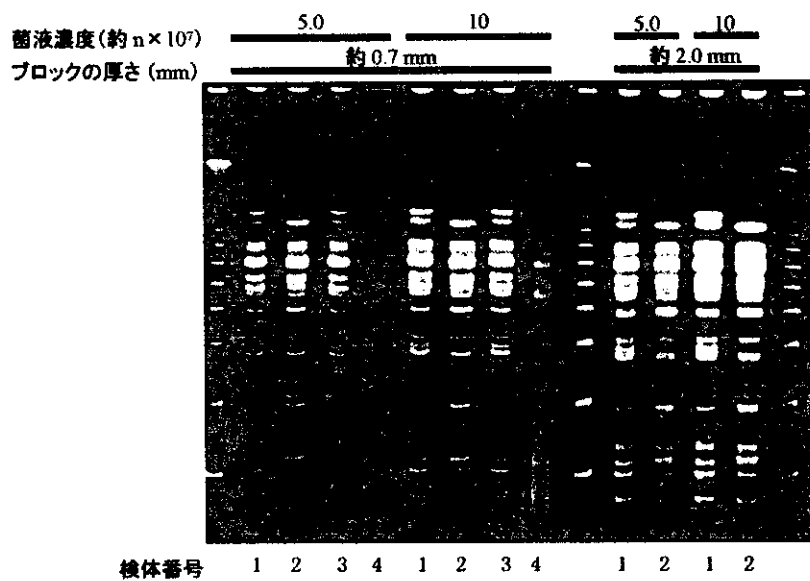
A から D は地研名、1 から 4 は検体名を示す。

図2 地研CがDR IIIを用いた場合の各検体ごとの地研間での相同性の違い



AからDは地研名、ただしCBは地研CがDR IIIを用いた場合を示す。1から4は検体名を示す。

図3 ブロック作成時の菌液濃度とゲルへ挿入するブロックの厚さが PFGE 画質に及ぼす影響



雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
田中大祐他	Molecular epidemiology of group A streptococci T serotype 1	Japanese Journal of Infectious Diseases	55	89-90	2002
松本昌門他	Epidemiological investigation of a fatal case of cholera in Japan by phenotypic techniques and pulsed-field gel electrophoresis	Journal of Medical Microbiology	51	264-268	2002

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
平成 12 年度～平成 14 年度総合研究報告書（分担報告）

パルスフィールドゲル電気泳動法（Pulsed-Field Gel Electrophoresis, 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

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

研究要旨

パルスネットジャパン構築の基礎的研究として、近畿支部 11 カ所の衛生研究所間で同一菌株と同一ゲルブロックを用いて PFGE 型別を行い、本法の問題点とその解決策について共同で検討した。また集団発生や散发事例の疫学解析に PFGE を適用し有用性を検討した。

PFGE 解析は、同じ集団間の患者由来株の類似性をみるには適した方法と考えられた。また多発流行を迅速に推測して感染拡大を防止するためにはパルスネットジャパンの構築が緊急課題であるが、現状は各施設の画像の質が鮮明なものに統一されておらず、異なる施設間の比較が困難であることから、PFGE 解析法の標準化を図り、精度管理を徹底し、施設間格差を解消する必要があると考えられた。

A. 研究目的

PFGE を用いた感染症の事例解析は、喫食調査や患者発生状況などの疫学調査結果に科学的根拠を提出する有効な方法の一つとして多くの施設で行われている。様々な地域で実施された病原菌の PFGE 解析結果はデータベース化してその動向を監視することにより、多発流行が迅速に発見され防疫対策の施行に役立つと考えられることから、地方衛生研究所と国立感染症研究所の間の全国的 PFGE ネットワーク（パルスネットジャパン）の構築が進められている。

本研究ではパルスネットジャパン構築の基

礎的研究として、近畿ブロック 11 カ所の衛生研究所間で同一菌株と同一ゲルブロックを用いて PFGE 型別を行い、本法の問題点とその解決策について共同で検討した。また PFGE 解析事例データベース構築のため PFGE 解析が疫学調査に有効に利用された事例の調査を行った。

B. 研究方法

平成 12 年度は 4 カ所の衛生研究所において PFGE 解析事例データベース構築のため PFGE 解析が疫学調査に有効に利用された事例の調査を行った。

平成 13 年度は 11 カ所の衛生研究所間で PFGE ネットワーク構築に関する基礎的研究を行い、さらに 3 カ所の衛生研究所において PFGE 解析が疫学調査に有効に利用された事例の調査を行った。

平成 14 年度も引き続き 11 カ所の衛生研究所間で PFGE ネットワーク構築に関する基礎的研究を行い、5 カ所の衛生研究所において PFGE 解析が疫学調査に有効に利用された事例の調査を行った。

PFGE ネットワーク構築に関する基礎的研究と PFGE 解析が疫学調査に有効に利用された事例の調査の方法を以下に示す。

1. PFGE ネットワーク構築に関する基礎的研究 (近畿ブロック 11 地研 13,14 年度報告)

平成 13 年度は 腸管出血性大腸菌 O157:H7 3 株 (検体 No. 1~3) 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 検体について各施設の方法で PFGE 解析を行った。

平成 14 年度は腸管出血性大腸菌 O157:H7 6 株 (検体 No. 1~6) と、検体 No.6 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.7)、そして 3 株の腸管出血性大腸菌 O26:H11(検体 No.8~10) の合計 10 検体について可能な限り統一した方法で PFGE 解析を行った。

13、14 年度ともに各施設の 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、本研究班配布の解析ソフトを用いて解析した。

2. PFGE 解析事例データベースの構築

近畿地区各施設のこれまでの解析事例についてまとめた (表 1)。

腸管出血性大腸菌では、O157による散発ある

いは家族内発生についての3事例 (② ③ ⑨) と、老人保健施設1例 (⑫)、保育園とキャンプ (④) の集団発生事例と、O26による保育園での集団発生3例 (⑥ ⑪ ⑬) について検討した。サルモネラは全国規模で発生がみられたイカ菓子事件 (⑤) の *S. Oranienburg* および *S. Chester* と、長期間にわたり同一県内で検出 (①) した *S. Enteritidis* 菌株についての解析事例、ウエルシュ菌は食中毒2事例 (⑦ ⑩) 由来120株について解析した。またコレラ菌 (⑧) では10年間に検出したコレラ菌 (O1) 47株を用いて地域的、経時的に相違した菌株間の類似性を検討しPFGEの有用性を確認した。

いずれの事例も PFGE の実施方法と菌株間の類似性の判定は各施設の方法で行った。

C. 研究結果と考察

1. PFGE ネットワーク構築に関する基礎的研究

13 年度は各施設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、14 年度は可能な限り統一した条件で PFGE 型別を行った。その結果各施設の画像の質をコントラストの高い鮮明なものに統一する必要があることがわかった。そのためには各施設の技術の向上が必須であるが、さらに PFGE 解析法についても、533.5kb 以上と 48.5kb 以下のバンド認識など現在の方法では施設間の差が大きい問題点の解決を図る必要があると考えられた。

2. PFGE 解析事例データベースの構築

(1) 腸管出血性大腸菌の PFGE 解析 :

和歌山市では全く交流がない3家族6名から O157 が検出され、検出菌の PFGE 型と他の

疫学マーカーが一致したことから同一の感染源が疑われ、調査の結果同一店舗での喫食歴とその店舗のチェーン店での喫食が明らかになった。また散発事例のうち1事例由来の1株は、食肉の流通経路から神奈川県での患者と同じPFGE型であることが証明され、離れた地域において同一菌株による患者発生が確認された。

滋賀県では平成13年にファミリーレストランのビーフ角切りステーキを原因としたO157感染事例が発生した。富山県と奈良県でも同ファミリーレストランのチェーン店利用者からO157が検出されており、それら患者菌株とビーフ角切りステーキ由来菌株のPFGE型が一致した。

O157とO26によるの集団発生では、事例内でPFGE型が一致したことから患者由来株間の類似性が証明され、集団発生であることが裏付けられた。平成12年に大阪府で発生したO26の集団発生事例ではPFGE型が8型に分かれたが、感染者1人につき1株調べるのではなく複数株を検査したことから、全員からDNA断片の相違が2本以内の株が分離され、同一菌による集団発生であることが判明した。PFGE解析時には1名の感染者からPFGE型の異なる菌株が分離される場合があるため、複数株について実施し、他の疫学情報と合わせて検討することが必要であると考えられた。

(2)サルモネラのPFGE解析：

平成11年に発生した「イカ菓子」事件は*S.Oranienburg*と*S.Chester*によるものであり、大阪府下の当該イカ菓子喫食患者由来株と、同時期に発症したがイカ菓子の喫食が不明の患者由来の両血清型菌株を解析した結果、両血清型菌株ともにイカ菓子事件関連菌株に

特徴的なPFGE型であり、以前の菌株や事件後に分離された菌株とは異なっていることが明らかになった。

奈良県では平成12年4月から10月の7カ月間に発生した12例の*S.Enteritidis*集団発生由来株をPFGE解析した結果、同一事例内のPFGE型は完全に一致し、同一感染源が証明された。一方異なる事例間でも同じPFGE型のものがあり、原因食品の鶏卵の流通経路を調査したが、別ルートで販売された例もあり、必ずしも同一経路の*S.Enteritidis*が同じPFGE型を示すという関連性はみられなかった。このことはすでにある特定のPFGE型菌の鶏卵（食品）汚染が高くなっており、流通経路に関係なく同一菌が検出される状況にあることも考えられるのでPFGE型だけの結果をもって判断することに問題があることも多い。従ってこれまでの薬剤感受性やプラスミドプロファイル解析など別の疫学マーカー解析と総合的に判断することが必要と考えられる。

(3)ウエルシュ菌のPFGE解析：

大阪市内で発生したウエルシュ菌食中毒事例由来菌株の解析において、PFGE法の結果は血清型別試験の結果と一致しその有用性が示された。また、PFGE法は市販の血清に該当しないウエルシュ菌の疫学マーカーとして有効であると考えられた。そしてウエルシュ菌食中毒検査において、増菌培養法はPFGE法を用いて分離菌株の解析を行うことにより、原因究明に有用であると考えられた。

(4)コレラ菌(O1)のPFGE解析：

大阪府でのコレラ菌(O1)は60%以上がインドネシア、タイ、フィリピン等と関連がある結果であった。日本国内でみられるコレラ患者の多くは海外旅行などで外国に滞在し、そ

の滞在先でコレラ菌に感染し帰国した人々と考えられることから、複数の国へ旅行した患者の場合の感染国および感染源を特定することは困難な作業となる。そのような場合に、分離菌株間の各種の生物学的疫学マーカーの解析や疫学調査などに加えて、PFGEなどの遺伝学的解析を行うことでより多くの情報が得られ、感染国あるいは感染源の特定に役立つものと考えられる。

D. 結論

PFGE解析は、同じ集団間の患者由来株の類似性をみるには適した方法と考えられた。また地理的に離れた地域、お互いに交流のない家族内発生事例が頻発するような、平常時と異なった患者発生がみられた場合に、それらの菌株についてPFGE解析で菌株の類似性が確認されたならば、潜在的に流行が起きている可能性を考えた対策が必要であり、積極的に疫学調査を行う必要がある。そのためには広域で分離された同種菌株を迅速に比較することが必要で、パルスネットジャパンの構築が緊急課題である。しかし現状は各施設の画像の質が鮮明なものに統一されておらず異なる施設間の比較が困難であることから、PFGE解析法の標準化を図り、精度管理を徹底し、施設間格差を解消する必要があると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) 森野吉晴、山下晃司、金澤祐子、上野美加、太田祐元、北口三知世、岩崎恵子、辻澤恵都子、旅田一衛、牛生レバー喫食後の腸管出血性大腸菌O157感染事例の続発—和歌山市、病原微生物検出情報、

21:164-165(2000).

(2) 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).

(3) 石川和彦、林賢一、梅原成子、山田和枝、杉山信子、児玉弘美、橋本信代、安田和彦：ビーフ角切りステーキを原因食とした散在的集団食中毒事例、病原微生物検出情報、22:166-167(2001)

(4) 大中隆史、横田正春、石津真理子、山内昌弘、中村武、田中智之、山北太郎、木口雅行、岡澤昭子：生レバーが原因食品と考えられる腸管出血性大腸菌O157による食中毒事例—堺市、病原微生物情報、22:291-292(2001).

(5) 横田昇平、徳田幸一、若松久雄、森崎保明、茂籠哲、中西淳子、海老瀬博子、古塩幸子、廣野正子、丹治和美、山下美佳、太田義博、松本秀司、森本芳弘、浦松敬宏、安藤明典、河野通大、田口寛、浅井紀夫、藤原恵子、降井佐太郎、前田知穂：保育園で発生した腸管出血性大腸菌O26の集団感染事例—京都府、病原微生物検出情報、23:16-17(2002).

(6) 姫路市環境衛生研究所、姫路市保健所衛生課・予防課：老人保健施設における腸管出血性大腸菌O157集団感染事例、病原微生物検出情報、23:319-320(2002)

(7) 山内昌弘、石津真理子、横田正春、大中隆史、田中智之：保育園における腸管出血性大腸菌O26:H11の集団発生事例—堺市、病原微生物検出情報、23:321-322(2002).

2. 学会発表

(1) 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（2000 年 11 月、岐阜市）
- (2) 横田正春、山内昌弘、石津真理子、中村武、吉田永祥、菌輝久、大中隆史、田中智之：河川水及びハエ類からの腸管出血性大腸菌の分離状況、第 5 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、(2001 年 6 月、福岡)
- (3) 山内昌弘、石津真理子、横田正春、菌輝久、大中隆史、田中智之：河川水中の腸管出血性大腸菌の分離状況及び菌学的性状、衛生微生物技術協議会 第 22 回研究会(2001 年 7 月、徳島)
- (4) 石川和彦、林 賢一、梅原成子、山田和枝、杉山信子、児玉弘美、橋本信代：ビーフ角切りステーキを原因食として発生した腸管出血性大腸菌食中毒事例の疫学的検討、第 6 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2002 年 6 月、東京)
- (5) 中村寛海、小笠原準、長谷 篤、門間千枝、鈴木 浩、甲斐明美、春木孝祐：増菌培養法により分離されたウェルシュ菌の解析、第 23 回日本食品微生物学会 (2002 年 9 月、東京)
- (6) 田口真澄、小林一寛、竹上修平、横田正春、辻 英高、黒川 学、井上凡己、金澤祐子：パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 型別法の施設間における変動について、第 45 回日本感染症学会中日本地方会総会 (2000 年 11 月、大阪)

F. 研究協力機関および協力者

- 滋賀県立衛生環境センター
石川和彦、林 賢一
- 京都府保健環境研究所
藤原恵子、田口 寛、浅井紀夫、
降井佐太郎
- 京都市衛生公害研究所
竹上修平
- 大阪市立環境科学研究所
中村寛海、小笠原準、長谷 篤
- 堺市衛生研究所
横田正春、山内昌弘、横田正春、大中隆史、
石津真理子、中村 武、田中智之
- 兵庫県立健康環境科学研究所
辻 英高
- 神戸市環境保健研究所
黒川 学
- 姫路市環境衛生研究所
川西伸也、高 美恵子、藤本寿郎、
山根竹二郎
- 奈良県保健環境研究センター
中山章文、井上凡己、青木喜也、吉田 哲、
市川啓子
- 和歌山市衛生研究所
金澤祐子、森野吉晴、山下晃司、
上野美知、太田裕元、北口三知世、
岩崎恵子、辻澤恵都子、旅田一衛
- 大阪府立公衆衛生研究所
田口真澄、勢戸和子、河原隆二

表1 PFGE 解析事例報告 (近畿ブロック平成12~14年度)

報告年度	No.	タイトル	報告機関	報告者名
12年度	①	<i>Salmonella</i> Enteritidis による食中毒事例の パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝 学的解析	奈良県保健環境 研究センター	青木喜也、吉田 哲、 市川啓子
	②	滋賀県における腸管出血性大腸菌の分子生 物学的疫学解析	滋賀県立衛生環 境センター	石川和彦、林 賢一
	③	パルスフィールドゲル電気泳動法による腸 管出血性大腸菌 O157 の解析に関する研究	和歌山市衛生研 究所	森野吉晴、山下晃司、 金澤祐子、上野美知、 太田裕元、北口三知世、 岩崎恵子、辻澤恵都子、 旅田一衛
	④	腸管出血性大腸菌 O157 集団発生事例の遺伝 学的解析	大阪府立公衆衛 生研究所	田口真澄、勢戸和子、 河原隆二、小林一寛
	⑤	散発下痢症患者由来サルモネラの分子疫学 的解析	大阪府立公衆衛 生研究所	田口真澄、勢戸和子、 河原隆二、小林一寛
13年度	⑥	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	京都府保健環境 研究所	田口 寛、浅井紀夫、 藤原恵子、降井佐太郎
	⑦	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	大阪市立環境科 学研究所	中村寛海、小笠原準、 長谷 篤
	⑧	コレラ菌(<i>Vibrio cholerae</i> O1)のパルスフイ ールドゲル電気泳動法による解析	大阪府立公衆衛 生研究所	田口真澄、勢戸和子、 河原隆二、小林一寛
14年度	⑨	パルスフィールド電気泳動法 (pulse-field gel electrophoresis, PFGE) を用いた腸管出血性 大腸菌における diffuse outbreak の監視に 関する研究	滋賀県立衛生環 境センター	石川和彦、林 賢一
	⑩	ウェルシュ菌食中毒事例のパルスフイ ールドゲル電気泳動法を用いた解析	大阪市立環境科 学研究所	中村寛海、小笠原準、 長谷 篤
	⑪	病院内保育園における腸管出血性大腸菌 O26:H11 感染症原因菌株の疫学的解析に関 する研究	堺市衛生研究所	山内昌弘、横田正春、 大中隆史、石津真理子、 中村 武、田中智之
	⑫	腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例におけ る PFGE の活用について	姫路市環境衛生 研究所	川西伸也、高 美恵子、 藤本寿郎、山根竹二郎
	⑬	腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例の疫学 マーカー解析	大阪府立公衆衛 生研究所	勢戸和子、田口真澄、 河原隆二、小林一寛

別紙5 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
森野吉晴、山下晃司、 金澤祐子、上野美加、 太田祐元、北口三知 世、岩崎恵子、辻澤恵 都子、旅田一衛	牛生レバー喫食後の 腸管出血性大腸菌 O157 感染事例の続発 —和歌山市	病原微生物 検出情報	21	164-165	2000
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
石川和彦、林 賢一、 梅原成子、山田和枝、 杉山信子、児玉弘美、 橋本信代、安田和彦	ビーフ角切りステー キを原因食とした散 在的集団食中毒事例	病原微生物 検出情報	22	166-167	2001
大中隆史、横田正春、 石津眞理子、山内昌 弘、中村武、田中智之、 山北太郎、木口雅行、 岡澤昭子	生レバーが原因食品 と考えられる腸管出 血性大腸菌 O157 によ る食中毒事例—堺市	病原微生物 検出情報	22	291-292	2001
横田昇平、徳田幸一、 若松久雄、森崎保明、 茂籠哲、中西淳子、海 老瀬博子、古塩幸子、 廣野正子、丹治和美、 山下美佳、太田義博、 松本秀司、森本芳弘、 浦松敬宏、安藤明典、 河野通大、田口寛、浅 井紀夫、藤原恵子、降 井佐太郎、前田知穂	保育園で発生した腸 管出血性大腸菌 O26 の集団感染事例—京 都府	病原微生物 検出情報	23	16-17	2002
姫路市環境衛生研究 所、姫路市保健所衛生 課・予防課	老人保健施設におけ る腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例	病原微生物 検出情報	23	319-320	2002
山内昌弘、石津眞理 子、横田正春、大中隆 史、田中智之	保育園における腸管 出血性大腸菌 O26:H11 の集団発生事例—堺 市	病原微生物 検出情報	23	321-322	2002

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 12 年度～平成 14 年度総合研究報告書（分担報告）

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

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	谷尾進司	鳥取県衛生研究所
	保科 健	島根県衛生環境科学研究所
	榊美代子	広島県保健環境センター
	河本秀一	広島市衛生研究所
	橋渡佳子	広島市衛生研究所
	安岡富久	高知県衛生研究所
	芝 美和	愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨：細菌性食中毒・感染症等の疫学調査におけるパルスフィールド電気泳動（PFGE）の有効性と PFGE により解析された菌学的情報システム（パルスネット）構築のための基礎的資料を得る目的で、PFGE 解析が食中毒事例等において有効に活用された事例を調査し、その有効性を明らかにした。さらに、中・四国地区の 6 地方衛生研究所の共同研究として、赤痢菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 の菌株を統一した条件で PFGE を実施し、その精度を比較検討したところ概ね一定の画像精度が得られていた。しかし、技術的問題から一部の施設の画像には他施設の画像と差異が認められた。今後、この技術的問題点解決のため、PFGE 技術の標準化とそれに伴う精度管理が必要と思われた。

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(地研)と国立感染症研究所(感染研)間で、その情報を迅速かつ正確に解析・検討すること(いわゆる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 PFGE 解析が有効に活用された事例について調査し、その概要について記述し

た。また、PFGE 技術の信頼性を確認するため、中・四国地区の 6 地研が赤痢菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌 O157 の共通した菌株で PFGE 解析し、各施設の画像を比較検討した。

B. 研究方法

1. PFGE 解析が有効に活用された事例

集団食中毒事例等のうち、PFGE 解析により疫学調査がなされた事例について、その発生状況、臨床症状、原因細菌、感染源、感染経路等を調査し、考察を加えた。

2. 各施設における PFGE 技術の精度

1) 同一の赤痢菌株による PFGE 画像の比較

平成 12 年度の研究として、6 地研で同一の赤痢菌(ソネ菌)を使用し、できる限り統一した方法で PFGE を実施した。その画像精度を目視で比較検討した。

2) 特定のサルモネラ及び腸管出血性大腸菌 O157 菌株による PFGE 画像の比較

平成 13 年度の研究として、高知県と愛媛県の両県にまたがって発生した同一感染源(氷菓)によるサルモネラ食中毒事例において、分離された菌株(*S. Enteritidis*)の PFGE 解析を両県で行った。その画像を画像解析ソフト(GelComper II)で解析し、デンドログラム上の類似度から画像精度を比較検討した。さらに、3 地研が作成した 2001 年に分離された O157:H7 の PFGE 画像のうち、感染研の PFGE 型別で II a II a I type577 とされた菌株の画像を画像解析ソフトで解析し、特定の菌株に対する各施設間の類似度を調べた。

3) 同一の腸管出血性大腸菌 O157 菌株による PFGE 画像の比較

平成 14 年度の研究として、4 地研で同一の腸管出血性大腸菌 O157:H7 を使用し、従来からの PFGE マニュアルに改良を加え(統一マニュアル法)、PFGE を実施した。その画像を画像解析ソフトで解析し、同一の菌株に対する各施設間の類似度を調べた。また、市販の PFGE 検査キットとの比較検討も行った。

C. 結果

1. PFGE 解析が有効に活用された事例

1) イカ菓子食中毒事例に関与した *S.Oranienburg* と *S.Chester* によるサルモネラ感染症の細菌学的検討

1999 年のイカ菓子食中毒事件の原因となった *S.Oranienburg* と *S.Chester* の愛媛県における侵淫状況を知るため、1998 年 1 月から 1999 年 5 月までの期間に県下 7 ヶ所の病院、臨床検査所で分離されたサルモネラの中から *S.Oranienburg* と *S.Chester* の検索を行った。その結果、1999 年 1 月以降、12 歳以下の下痢症患者を中心に *S.Oranienburg* が 18 株、*S.Chester* が 6 株分離されていた。これらの血清型菌は、便以外に血液や尿からも分離された。さらに、イカ菓子由来株と患者由来株について、生化学的性状検査、薬剤感受性試験、PFGE 解析を実施したところ、いずれの菌株とも同一パターンを示した。これらのことから、愛媛県においても、イカ菓子食中毒事件に関与したと推定される *S.Oranienburg* と *S.Chester* による diffuse outbreak が確認された。(詳細は日本食品微生物学会雑誌 Vol.18 No.4 に掲載)

2) 寿司店を感染源とした赤痢の集団発生事例

2000 年 10 月に愛媛県今治市で寿司店を感染源とした赤痢の集団発生があった。患者の届

出数は61名(県内43名、県外8府県18名)であった。衛生研究所において愛媛他5県で分離された菌株のPFGEを実施した結果、いずれも同一パターンであり、同研究所が保存している海外からの菌株や同時期に国内で発生した赤痢患者からの菌株のPFGEパターンとは異なっていた。(詳細は病原微生物検出情報 Vol.22 No.2に掲載)

3) 病院で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団発生事例

2001年、松山市の重度痴呆者収容病院で O157 による集団発生事例があった。入院患者707名、職員454名、業者等の関係者218名の検便において、入院患者25名と医療従事者1名から O157 が分離された。PFGE では、4つのパターンに解析されが、その類似性から同一の感染源に由来すると推察された。(詳細は病原微生物検出情報 Vol.23 No.1に掲載)

4) 氷菓を原因としたサルモネラ食中毒事例

2001年10月に高知県と愛媛県において、*S. Enteritidis* による集団食中毒が発生した。喫食調査等により原因食品は氷菓と判明したが、患者および原因食品から分離された菌株と液卵製造工場の液卵から分離した菌株を PFGE 解析することにより、感染経路を追求することができた。(詳細は第23回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集に掲載)

5) 平成14年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例由来株 O157:H7、O26:H11/−の PFGE による解析とパルスネットの活用について

平成14年に広島市で分離した腸管出血性大腸菌 O157:H7 および O26:H11/−感染症11事例由来14株について、PFGE 泳動像を遺伝

子解析用ソフト GelCompar II で解析するとともに、パルスネットシステム上で本市分離株9株と全国の地研の分離株とを比較・解析した。

O157:H7 を原因とする5事例の内、2事例が同一性70%であった。O26:H11/−を原因とする6事例も2事例が同一性90%、4事例が76%~85%の同一性であったが、家族内2事例の事例内分離株間は100%の同一性を示した。11事例とも全て泳動パターンは異なり、関連性を認めなかった。

パルスネット上での本市分離の8事例9株と全国の地方衛生研究所の分離株との比較解析では、同じ泳動パターンをしめした分離株はなかったが、O26:H−の3事例で本市近隣の広島県H市患者由来株が約80%の同一性、広島県K市患者由来株が、90%と95%以上の同一性でクラスターを形成し、遺伝子学的な近縁性を示唆していた。(詳細は平成14年度の報告書に記述)

2. 各施設における PFGE 技術の精度

1) 同一の赤痢菌株による PFGE 画像の比較

6施設で実施した PFGE の画像を比較したところ、2施設の画像は DNA の分離、泳動が十分でなく、他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あったため比較することができたが、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。また、バンドのパターンに1本程度の差異が認められる場合もあった。(詳細は平成12年度の報告書に記述)

2) 特定のサルモネラ及び腸管出血性大腸菌 O157 菌株による PFGE 画像の比較

高知県と愛媛県の両県にまたがって発生し

た同一感染源(氷菓)によるサルモネラ食中毒事例において、高知県の施設と愛媛県の施設で実施したサルモネラの PFGE 画像を解析ソフトにより愛媛県の施設で解析したところ、同一の感染源に由来すると推定された。菌株は95%以上の類似度で一致した。一方、3施設の画像から感染研の PFGE 型別で $\Pi a \Pi a I$ type577 とされた菌株の画像を選び出し、デンドログラム上で類似度を比較したところ、DNA断片の濃度が濃く、バンドの位置が明確に判定できない画像等があったため、施設間に差異が生じた。各施設間の類似度は約80～95%であった。(詳細は平成13年度の報告書に記述)

3) 同一の腸管出血性大腸菌 O157 菌株による PFGE 画像の比較

4 施設が統一マニュアル法で作成した画像は従来の画像より良好で、施設間で画像を比較することができた。また、統一マニュアル法で作製した各施設の PFGE 画像をもとに画像解析ソフトでデンドログラムを作成し、施設間の差異を確認した結果、3施設の画像では同一菌株が同じクラスターを形成した。しかし、1施設の4株は独自のクラスターを作った。一方、統一マニュアル法と市販の検査キット(コーム厚0.7mmの試料プラグを使用)を用いて作成した PFGE 画像は各施設とも概ね判読可能な画像であった。(詳細は平成14年度の報告書に記述)

D. 考察

PFGEによるDNA解析は食中毒をはじめとする細菌性感染症の疫学調査に広く用いられている。また、この PFGE によって解析された情報のネットワークであるパルスネットの

構築が感染研を中心に進められている。一方、最近の食中毒として、多府県にまたがった大規模な事例や患者が長期的かつ散発的に発生する事例が見られている。特に、行政単位を越えて患者が散発的に発生する *diffuse outbreak* の多くは疫学調査を詳細に行うことができにくいため、感染源、感染経路を特定することは難しい。今回、中・四国地区に発生し、本研究にも記述したイカ菓子や氷菓によるサルモネラ食中毒事例では PFGE 解析を行うことにより、同一の感染源であることが示唆され、喫食調査の結果を裏付けることができた。特に高知県と愛媛県にまたがって発生し氷菓を原因とするサルモネラ食中毒事例では、PFGE を行い、その情報を2施設間で交換することで、起因菌の特定、原因食品の特定、潜在的食中毒患者の検出、感染源の推察など発生の実態をより詳細に把握することができた。しかし、各施設の PFGE 解析技術は一様ではなく、PFGE 画像の一部には不明瞭なバンドやマーカの乱れなどが認められた。また、特定の PFGE 型とされた菌株画像の類似度も施設間で差異が生じた。これらは技術的な問題に起因するものと推察されるが、パルスネットを構築し、円滑に運用するためには、施設間の技術的信頼性を高めるとともに解析者のトレーニング等も含めた PFGE 解析技術の標準化と、それに伴う精度管理の必要があると考える。

E. 結論

PFGE 画像を画像解析ソフトにより解析することは、食中毒・感染症の疫学調査において有効な手法となることが示唆された。一方、パルスネットを構築し、その信頼性を維持するには、PFGE の解析技術の標準化と精度管理が必要と思われる。

F. 研究発表

1. 発表論文

1) 田中 博ほか：イカ菓子食中毒事件に関与した *S. Oranienburg* と *S. Chester* によるサルモネラ感染症の細菌学的検討

食品微生物学会雑誌 Vol.18 .135-140 2001

2) 田中 博ほか：寿司店を感染源とした赤痢の集団発生事例

病原微生物検出情報 Vol.22 .35 2001

3) 田中 博ほか：病院で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団感染事例

病原微生物検出情報 Vol. 23 .15 2002

2. 学会発表

1) 松本紀子ほか：氷菓における *S. Enteritidis* 食中毒事例

第 23 回日本食品微生物学会学術総会、東京都、2002

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)

分担研究報告書

九州 12 機関におけるパルスネット構築に向けた基礎的研究
－腸管出血性大腸菌 O157 事例における PFGE の方法及び画像解析について－

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所

尾崎 延芳, 真子 俊博 (福岡市保健環境研究所)

藤田 景清, 森下 正人, 内尾 俊博 (北九州市環境科学研究所)

森屋 一雄 (佐賀県衛生薬業センター)

山口 仁孝, 野口 英太郎 (長崎県衛生公害研究所)

海部 春樹 (長崎市保健環境試験所)

徳永 晴樹, 宮坂 次郎 (熊本県保健環境科学研究所)

松岡由美子, 藤井 幸三 (熊本市環境総合研究所)

成松 浩志, 阿部 義昭, 瀧 祐一 (大分県衛生環境研究センター)

上野 伸広, 吉國 謙一郎 (鹿児島県環境保健センター)

久高 潤 (沖縄県衛生環境研究所)

村上 光一 (福岡県保健環境研究所)

研究要旨 パルスネット構築に向けた基礎的研究について、九州地区 12 地方衛生研究所の参加により実施した。平成 12 年度は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 標準株 5 株及び各機関で分離された O157 についてパルスフィールド電気泳動 (PFGE) を行い、福岡県保健環境研究所に写真及び画像ファイルを送付し、標準株について同一性の比較と各事例株の総合的比較解析を行い、PFGE 条件や方法に関する多くの問題点を提起した。13 年度は、12 年度で判明した問題点を改善するため、PFGE の方法を詳細に検討し、方法を統一し、EHEC O157 標準菌株 5 株及び各機関の分離株 5 株について、12 年度と同様に PFGE 画像を比較検討した。その結果 13 年度は 12 年度に比べ、マニュアルを統一した成果及び精度管理の成果が現れたことを確認した。しかし、同一株の PFGE 像が同一にならない原因について明確に証明することができなかった。さらに画像の相互交換に必要な通信関連では、画像送信及びダウンロードにおける改善並びに整備が必要であることが分かった。14 年度は各機関での PFGE の問題点が、プラグ作成時にあるのか、泳動時にあるのかを明確にする目的で、1 機関で作成した同一プラグを郵送し各機関で泳動し泳動像を比較する実験、また各機関で作製したプラグを郵送し単一機関で泳動し泳動像を比較する実験を実施した。さらに PFGE 方法の検討の一環として、迅速法をマニュアル化し、それにより各機関で実施した PFGE 画像を、通常法と比較した。その結果、同一プラグの相互交互泳動により、各機関での PFGE の問題点は、プラグの作成時にあるのではなく泳動にあることが分かった。また、各地研で作成・泳動した標準株の PFGE 像の類似度を比較した結果、過去 2 年間より良好な結果が得られた。さらに O157 の PFGE プラグ作成迅速法は各機関共に従来法と遜色ない泳動像が得られ、迅速法はルーチンワークに使用可能であることが分かった。

A. 研究目的

パルスフィールド電気泳動法(PFGE)による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に最も有用な手段であり、現在、地方衛生研究所(地研)と感染症研究所(感染研)の間の全国的なPFGEネットワーク(パルスネット)構築の準備が急がれている(図1)。平成8年度に全国的に腸管出血性大腸菌(EHEC)O157が発生し、その後菌株間の関連性を比較するため、各機関ともにPFGE機器の導入が図られた。しかし、各機関での整備状況については明確ではなかった。またPFGEの手法については、平成9年5月に感染研において研修がなされ、感染研の方法に拠って実施している機関や従来から文献等に従い実施しているところなどあり、統一した方法は実施されていなかった。しかし、パルスネットは、異なる機関でPFGEを実施しDNAパターンを比較しなければならない。そのためには同一の菌株をどこの機関でPFGEを実施しても同一として認識される条件設定が急務となる。そこで九州地区ではパルスネットの構築を行うため、全12地研が参加し、検討を行った(図2)。平成12年度及び13年度には、①O157標準菌株による精度管理の実施、②各地研分離株の比較解析の作業の中から問題点を明確化し改善を行った。平成14年度は画像解析に支障をきたすのはPFGE検査のどこの部分であるかを特定することを試みた。また、同時にパルスネットは迅速性も最重要課題であるためPFGEの迅速化についても検討を行った(図3)。

B. 研究方法

1. 研究方針(図3)

平成12年度：PFGE環境の調査

1) 標準株による精度管理

図4に示す菌株についてPFGEプラグ作成及び泳動はできるだけ感染研O157PFGEマニュアルに遵守して実施するようにし、実験は図5に示

す方法で行った。

2) 各地研分離株の検討

1999年、2000年に分離されたEHEC O157株を各機関約10株を選び、PFGEに供試した。12機関で用いた菌株の合計は119株であり、血清型はO157:H7 115株、O157:HNM 1株、O157:NT 1株、O111:HNM 2株であった。PFGE実施方法は1)と同様に実施した。

平成13年度：PFGE検査方法の統一

1) 標準株による精度管理

図4に示す菌株について統一マニュアル(図6)に従い実施した。

2) 各地研分離株の検討

2001年に分離されたEHECO157株を各機関約5株選び、PFGEに供試した。菌株は予め感染研でPFGEが実施されそのパターンが判明しているO157菌株のうち、特に2001年夏に全国各地で分離された型である[IIa, IIa, I]、或いは[IIa, ND, I]のPFGE型を対象とした。参加12機関で用いた菌株は合計60株で、50株は感染研のDNA解析の結果、[IIa IIa I]型、[IIa, ND, I]型と判明し、その他10株は感染研で型別が実施されていなかった。

PFGEの実施方法は1)と同様に実施した。

平成14年度：画像解析の試行準備

1) 通常法と迅速法との比較

図4に示した5菌株について、通常法(統一マニュアル法、図6)と迅速法(図7)によりPFGEを実施し、泳動像を福岡県保健環境研究所へ集積し、比較・解析した。

2) 同一プラグを使用した各機関での泳動像の比較

福岡県保健環境研究所で作製した菌株No. 2のプラグを各機関へ送付し、各機関で泳動後、泳動像を福岡県保健環境研究所に集積し、泳動像を比較することにより、泳動における問題点を検討した。