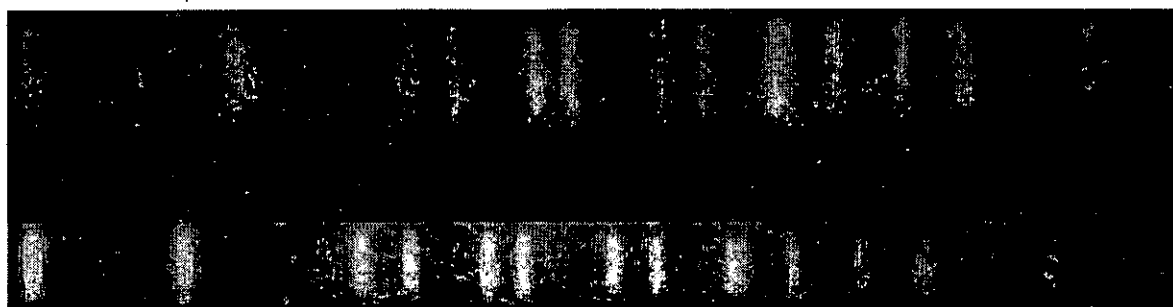


图1

A B



1135 —
668.9 —
452.7 /
398.4 /
336.5 —
310.1 —
244.4 /
216.9 —
173.4 /
167.1 —
138.9 —
104.5 —
78.2 /
76.8 /
54.7 —
33.3 /
28.8 —
20.5 /

(kb)

Salmonella Braenderup H9812 Standard strain After Restriction Digestion with *Xba*I

Pulse time: A ; 2.2 – 54.2 sec
B ; 2.2 – 63.8 sec

1% SeaKem Gold Agarose, 19 h

PFGE of STEC isolates (O157, O26, O111)

1% SeaKem Gold agarose, 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 19h

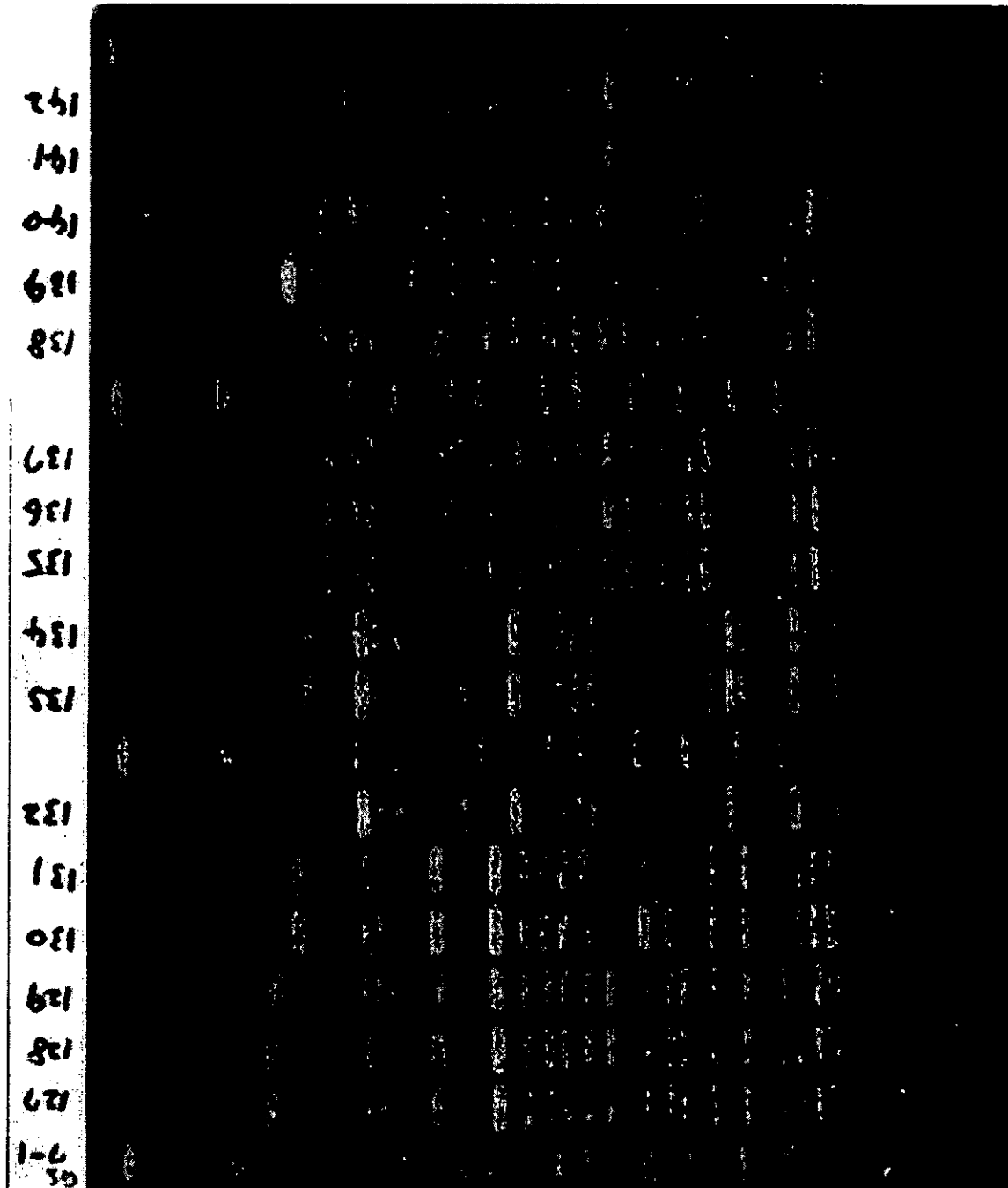
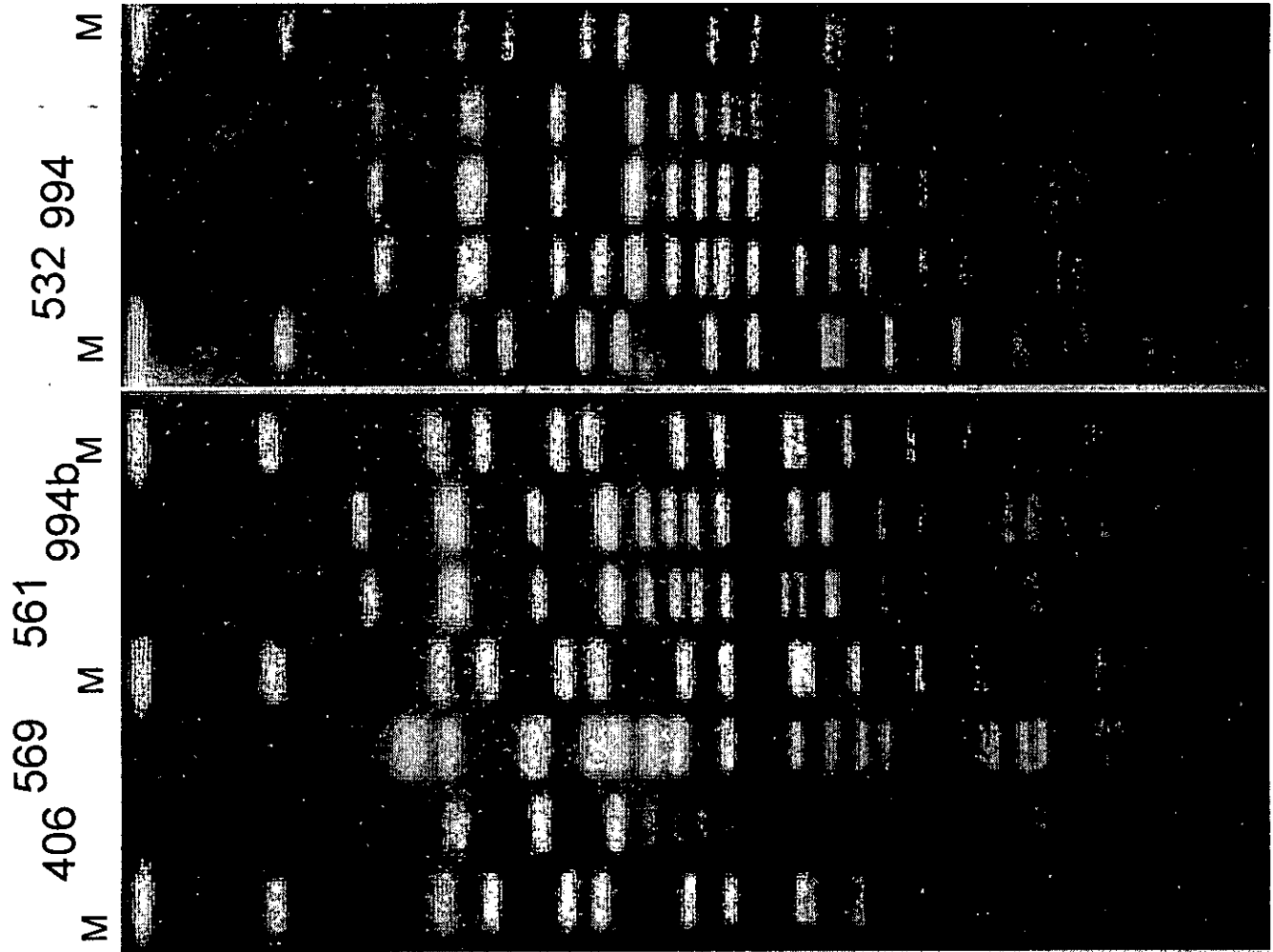


图3



Isolates of STEC O157:H7
for Dendrogram No. 1

Dendrogram No. 1

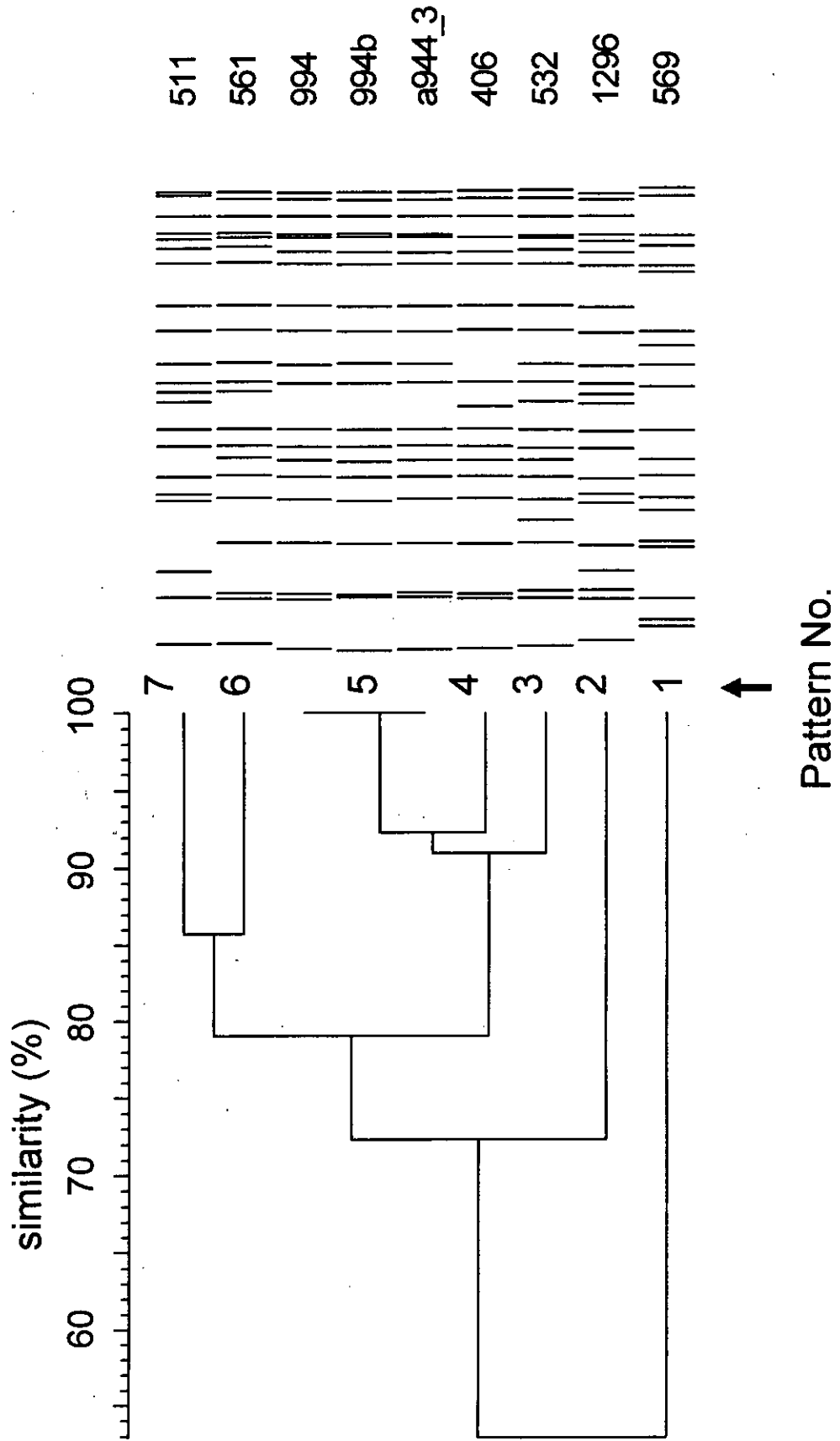
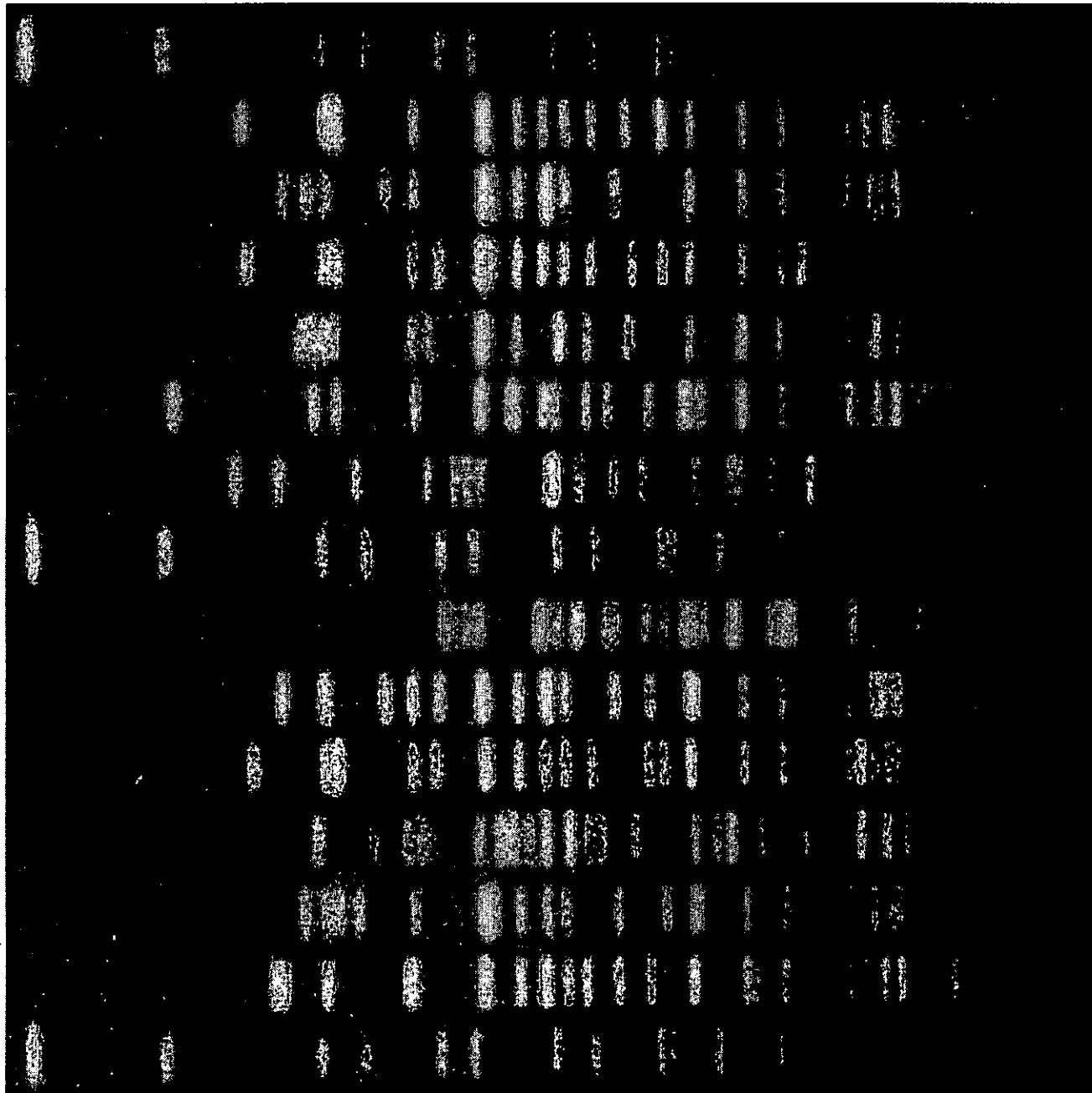


图5

1405 17 21 23 24 29 38 43 49 51 57 59



Isolates of STEC
O157:H7
for Dendrogram
No. 2

6

Dendrogram No. 2

Pattern No. 001 - 019

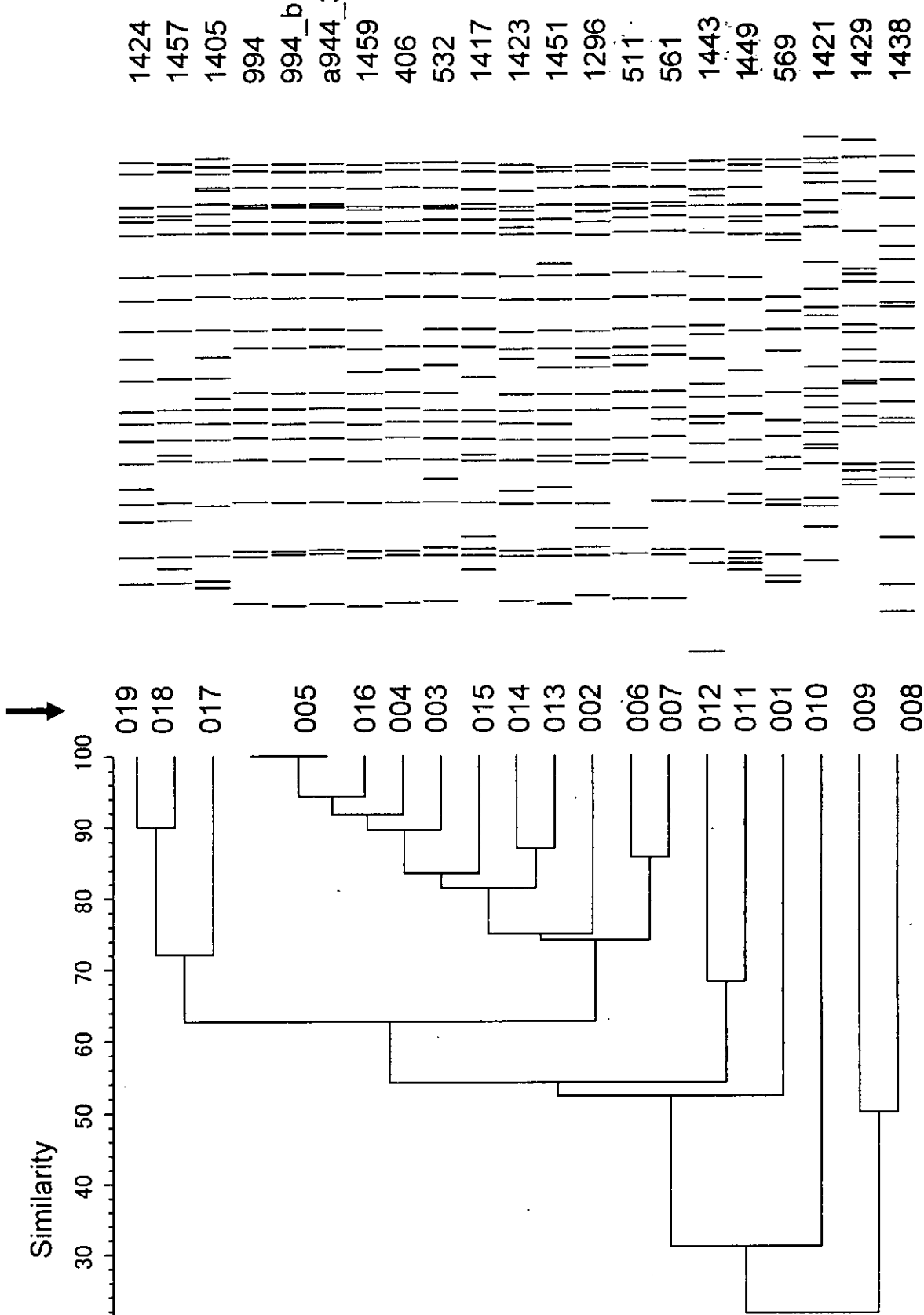
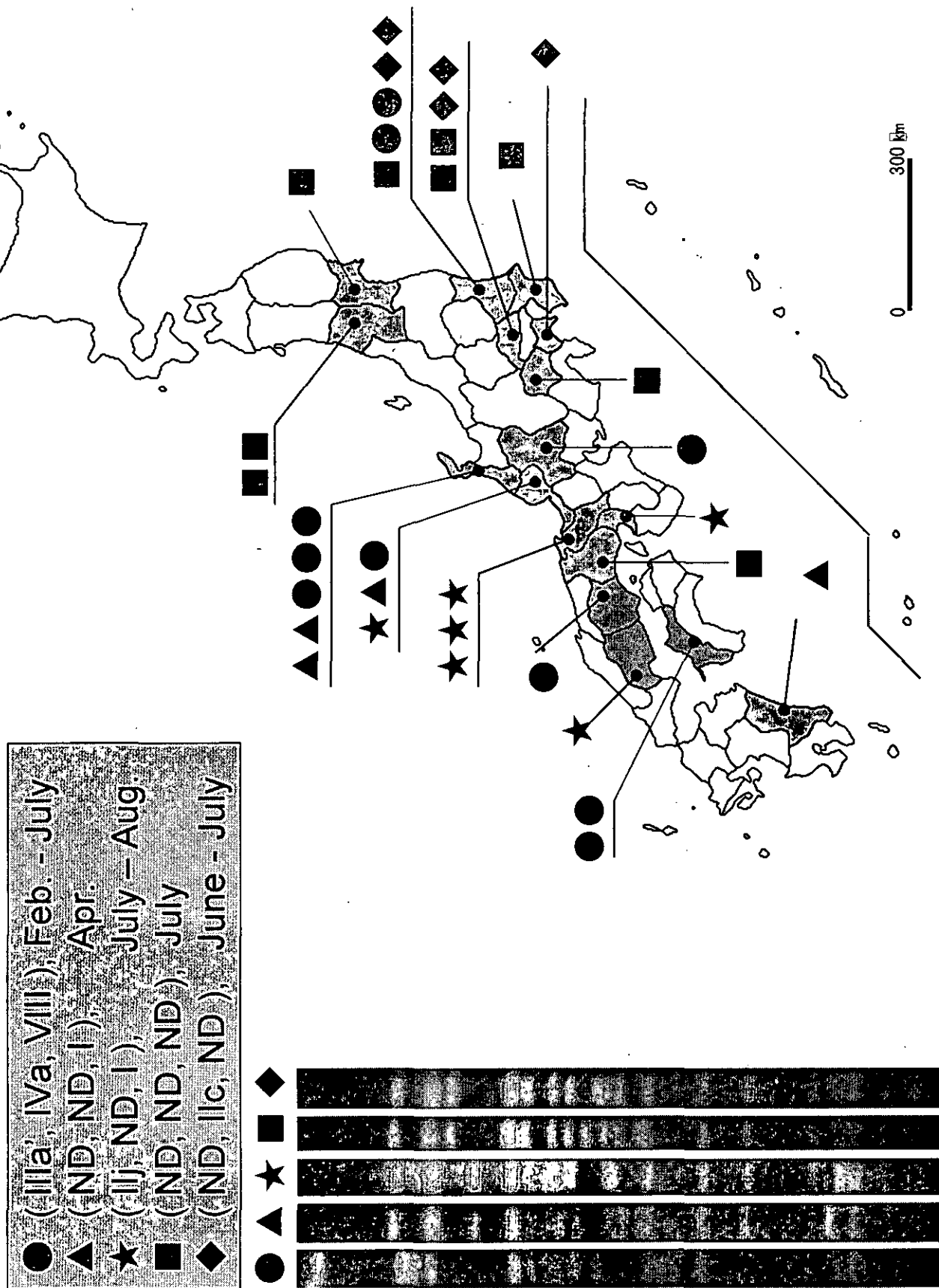


図7 PFGEパターンの一致している事例の分布図、2003



課題名：志賀毒素産生性大腸菌の新規血清型 O177:H-による感染事例

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所・細菌第一部
協力研究者 伊豫田淳 国立感染症研究所・細菌第一部
田村和満 国立感染症研究所・細菌第一部
寺嶋 淳 国立感染症研究所・細菌第一部
勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所・感染症部
小林一貫 大阪府立公衆衛生研究所・感染症部

研究要旨

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の血清型の解析結果から、市販の抗血清セットでは同定出来ない新規血清型 (O177:H-) の STEC による HUS 発症を伴う重篤な感染事例が起きていることが判明した。これまでのところ、計 4 株の STEC が O177:H- に型別されることが判明すると共に、これらの株はいずれも、多くの O157 株と同様にソルビトール非または遅発酵性を示し、*stx2*、*eaeA*、*ehxA* の各病原性遺伝子を保有していることが判明した。PFGE による解析から、これらの分離株は単一のクローンではないことが判明した。

A. 研究目的

志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の血清型別は、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析と共に、各菌株を特徴付ける重要な指標の一つである。国立感染症研究所・細菌第一部では、市販の抗血清では型別出来ない血清型を含む、現在入手可能なすべての標準菌株を用いた自家抗血清を調製し、血清型別を行っている。これまで O 血清群としては O1-O173 までが知られていたが、デンマークの血清学研究所 (Statens Serum Institute : SSI) から新たに O174-O181 までの抗血清調製用大腸菌標準菌株を入手し、当該抗

血清を調製した。本研究では、これらを用いた血清型別を過去に単離された STEC の OUT (O untypable) 株を含めて解析すると共に、それらの解析を通じて抗血清の品質管理を行うことを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 供試菌株：全国の衛生研究所または保健所を経由して送付された EHEC 株のうち、市販の抗血清で型別不能な菌株について血清型別を行った。
- 2) 血清作製用大腸菌標準株：デンマークの SSI から購入した O174-O181 抗血清調製用大腸菌標準株を用いた。
- 3) 抗血清の調製：入手した大腸菌標

準菌株を用いて、0174-0181 に対するウサギ抗血清を定法により調製した。

C. 研究結果

1) 血清型別

2003 年に国内で単離された STEC の血清型について表 1 にまとめた。単離数が多い三大血清群 0157, 026, 0111 は過去 6 年にわたって (1997 年以降) 同じ傾向が見られる。それに続く、0121, 0103, 091 の血清群も毎年上記以外の血清群の中で比較的多くの分離例が報告されている。単離数の少ない血清群のうち、散発事例の HUS 患者から単離された 2 株は、市販の抗血清セットに凝集しなかったため、0174-0181 の抗血清によって型別を試みたところ、いずれも 0177 に型別されることが判明した。さらに、2003 年より以前に国内で単離され、OUT:H- とされていた STEC OUT:H- の 36 株についてさらに解析を行ったところ、このうち、2002 年に単離された 2 株が 0177 に型別されることが判明した。それらの菌株情報について表 2 にまとめた。4 株中 3 株は重篤な臨床症状を示す患者由来であったが、一株は無症状保菌者由来であることが判明した。

2) STEC 0177:H- の遺伝学的・生化学的性状

上記 0177:H- の 4 株全てが、多くの 0157 株と同様に、ソルビトール非または遅発酵性を示したが、一方で 0157 株とは異なり、 β -グルクロニダーゼ陽性を示すことが判明した。PCR による病原性遺伝子の解析から、ベロ毒素

遺伝子、接着因子、およびエンテロヘモリジンをそれぞれコードする *stx2*, *eaeA*, および *ehxA* を保有することが判明した。さらに、RPLA 法を用いた解析から実際に Stx2 の産生性が確認された。

3) PFGE による解析

これまでの解析から、これら 4 株は疫学的な関連性は薄いものの、単一のクローンに由来する可能性が考えられた。そこで PFGE を用いて解析を行ったところ、*XbaI* による切断パターンは異なることが判明した (図 1)。

4) 他の血清型について

0177 と同様に新規に調製した抗血清 0176 に凝集を示す菌株が 2 つ存在したが、依然として OUT は 16 株存在した (表 1)。

D. 考察

新しく単離された 0177:H- の STEC の病原性については現在のところ不明な点が多いが、本研究から、これまでに国内で単離された血清型 0177:H- の STEC 株は *eaeA* 遺伝子を保有し、典型的な 0157 株と同様な宿主腸管上皮細胞への接着形態を示すものと考えられる。

WHO の Escherichia and Klebsiella Centre の集計によれば、これまでに 32 株の 0177 STEC が分離されており、そのうち 26 株が H-、運動性を示す菌株のうち、H11 が 5 株あったことが確認されている。さらに、0177 の感染により、少なくとも 6 人の患者が確認されており、そのうち、血便および HUS

を示した例がそれぞれ一例ずつ確認されている（以上、F. Scheutz (SSI) 私信）。これまでに我々が行ったさかのぼり調査では非運動性を示す STEC 株だけを対象としたため、上記以外にも血清群 0177 に属する STEC が存在する可能性がある。今後の動向についても注意深く調査する必要がある。

腸管出血性大腸菌感染症. 化学療法の領域. 2003 20(2):56-59.

E. 結論

- ・血清型 0177:HNM に属する STEC による STEC 感染症事例が過去 2 年間において少なくとも 4 例存在した。
- ・これらの 4 株はいずれも多くの 0157 株と同様にソルビトール非または遅発酵性を示すが、0157 とは異なり、 β -グルクロニダーゼ陽性を示す。
- ・これらの 4 株はいずれも *stx2*, *eaeA*, *ehxA* の病原性遺伝子を保有する。
- ・これらの 4 株の PFGE パターンは異なることから、単一のクローンではないと考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

Watanabe H, Terajima J, Izumiya H, and Iyoda S.

Molecular typing methods for STEC. Methods Mol Med. 2003 73: 55-65. Review

- ・伊豫田淳, 渡辺治雄. 志賀毒素産生性大腸菌食中毒. 臨床検査. 2003 47(5):459-465.
- ・伊豫田淳, 渡辺治雄.

表 1. 2003 年に単離された STEC の
血清型

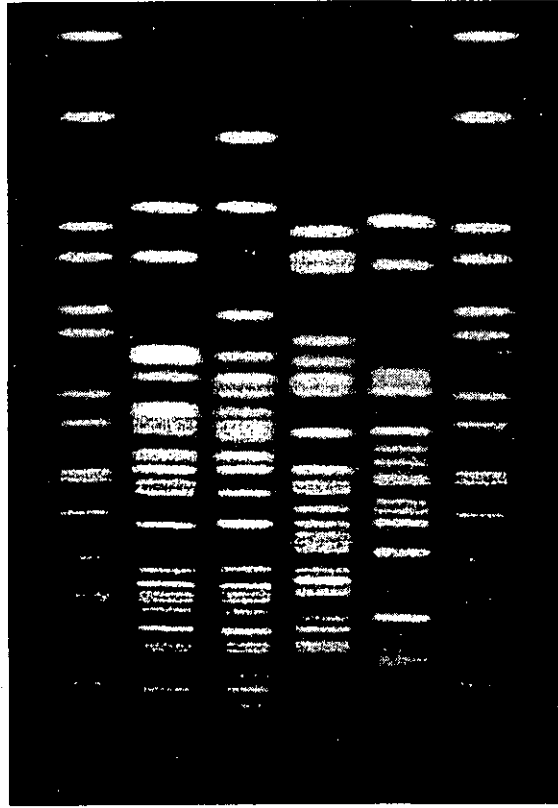
0	H	Stx1	Stx2	Stx1+2	不明	合計	0	H	Stx1	Stx2	Stx1+2	不明	合計
157	7	8	495	730	1	1234	118	16	1				1
157	—	5	29	83	2	119							
							119	4	1				1
26	11	224	5	10		239	119	7	1				1
26	—	49				49							
26	UT		1			1	128	2	1				1
111	—	37				37	128ab	7	1				1
							128ab	12		1			1
121	19		15			15							
121	—		3			3	145	2		1			1
121	UT		1		1	2							
							146	—			1		1
103	2	8				8							
							161	—	1				1
91	14	5				5							
91	—	1				1	168	45				1	1
91	Aag			3		3							
							169	—		1			1
1	15	1				1							
							176	2				1	1
17	35				1	1	176	18		1			1
42	16		1			1	177	—		2			2
48	24				1	1	UT	1	1				1
48	—			2		2	UT	2	2				2
							UT	11	1				1
62	11		1			1	UT	21	1	1			2
							UT	33	1	1			1
63	6		1			1	UT	—	4	4	1		9
74	—	1				1	R	—	1				1
78	16		1			1							計1758株

表2. O177:H-による散発事例

菌株番号	患者情報		発症日 または検出日
030896	2歳 女	水溶性下痢、血尿、嘔吐、出血斑、腹痛、HUS	7/28/03 大阪市
031272	4歳 男	下痢、腹痛、血便、発熱、HUS	8/3/03 大阪府
021649	3歳 男	嘔吐、下痢、血便	7/31/02 千葉県
022223	61歳 男	無症状保菌者	9/21/02 鹿児島県

図 1. STEC O177:H-株の PFGE による解析

1 2 3 4 5 6



レーン 1, 6 : Marker; レーン 2: 021649;
レーン 3: 022223; レーン 4: 030896;
レーン 5: 031272

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」
平成15年度分担研究報告書

北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）の施設間差

分担研究者	長野秀樹	北海道立衛生研究所
研究協力者	武士甲一、若森吉広	北海道立衛生研究所
	広地敬	札幌市衛生研究所
	大野譲治	青森県環境保健センター
	八柳潤、齋藤志保子	秋田県衛生科学研究所
	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	畠山敬、山口友美	宮城県保健環境センター
	牛水真紀子	仙台市衛生研究所
	大谷勝実	山形県衛生研究所
	須釜久美子	福島県衛生研究所
	佐々木寿子	新潟県保健環境科学研究所

研究要旨：北海道・東北・新潟ブロック内の衛生研究所においてパルスフィールドゲル電気泳動法（Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE）に関する施設間差について検討した。供試菌株は腸管出血性大腸菌 O157 菌 4 株を用いた。そのうちの 2 株については、菌株を配布すると同時に、北海道立衛生研究所で調製したサンプルプラグを配布した。これらを同時に泳動する事によって、サンプル調製の部分と泳動用機種などの泳動条件とでは、泳動パターンに影響を与える要素としてどちらが重要であるかを検討することができる。その泳動像を比較すると双方ともに高い類似度が得られ、全体的なレベルアップが図られていることが示された。また、解析レベルでの施設間差を検討する目的で、同一の画像を 2 施設で解析し比較検討した。両者で解析した結果得られた類似度に大きな違いは認められなかった。

A. 目的

1996 年に腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 による大規模でかつ広域にわたる集団食中毒事例が発生して以来、迅速な感染源調査と感染ルートの解明が求められている。さらに、「イクラ醤油漬け」を原因物質とした複数の自治体に波及した分散型集団発生事例（diffuse outbreak）も確認されており、こうした事例についても迅速に探知する必要がある。そのためには、患者情報を含めた的確な疫学調査と分離菌の細菌学特性を連結し、科学的根拠に基づい

た調査が必要になる。細菌学的特性については、従来からの血清型別および生物学的特性に加え、最近の分子生物学的手法の進展により、DNA レベルでの解析手法を用いることができる。現在、この目的に最も合致した手法はパルスフィールドゲル電気泳動（Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE）で、実際にいろいろな細菌種について応用されている。また、本法を基礎として、国立感染症研究所（感染研）を中心とした全国の地方衛生研究所を結んだネットワークを構築することにより、diffuse

outbreak に対する迅速対応が可能となる。しかし、本法は泳動装置や温度などの諸条件を一致させないと泳動パターンに微妙な違いが生じ、そのために同一菌株を泳動しても必ずしも100%の類似性がえられないという欠点を持っている。この欠点を補うために、PFGEの泳動諸条件を統一したうえでの継続的な精度管理が必要である。本年度は、このことを目的として泳動パターンの施設間差についての比較検討と解析者による違いについて検討した。また、各地方衛生研究所における PFGE を用いた事例解析についても実施した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

昨年度、感染研から分与を受けた4株のEHEC O157菌株を用いた。使用した4菌株の毒素型等については表1に示した。菌株3aおよび4aについては、ともに菌株3および4と同一で、サンプルプラグの調製、酵素処理等を北海道立衛生研究所で行い、泳動のみを各施設で実施した。菌株1～4については北海道立衛生研究所から菌株を各施設に送付し、個々の施設でサンプル処理から実施した。

2. PFGE 法

サンプルプラグの調製、酵素処理は米国疾病管理センター (CDC) のよる方法に準拠した感染研から提示された方法に従った。プレート上のコロニーを掻き取り、200 μ lの滅菌蒸留水に懸濁した ($OD_{610nm}=0.5 - 0.6$)。200 μ lの1% Seakem Gold agarose を混ぜ合わせサンプルプラグキャストへ流し込み室温で10-15分間固化させた。固まったプラグを1mlのプロk溶液 (1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5M EDTA, pH 8.0) に入れ、50 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。プラグを取り出し、泳動時の大きさにカットした後、500 μ lのTE buffer

で調製した4mM Pefacloc SC (AEBSF)に移し、50 $^{\circ}$ C、20分以上の洗浄を2回実施した。TE buffer に変えて氷上で20分以上平衡化した。酵素用 buffer に変えて (200 μ l/sample) 氷上で20分以上平衡化した。酵素を含む buffer 100 μ l (30units/sample) に変え、37 $^{\circ}$ C最低2時間振盪しながらインキュベートした後、酵素処理の終わったサンプルは0.5 x TBEに液交換した。泳動は0.5 x TBE で調製した1% Seakem Gold agarose で行い、6.0V/cm、2.2-54.2 s (linear ramp)、19時間、14 $^{\circ}$ Cの条件で実施した。泳動終了後、0.2-0.5 μ g/mlのethidium bromideで20-30分間染色し、蒸留水で30分以上脱色し、トランスイルミネーター上でバンドを観察した。

3. 電送とファイル形式

最終的に得られたPFGE画像は、実際にパルスネットを運営するときの条件を考慮し、なるべく電子化したものを北海道立衛生研究所に送付した。送付はメールの添付ファイル形式を採用した。ファイル形式については、解析ソフトがtiffファイルしか読み込めないため、その形式で電送することとした。しかし、tiffへの変換が困難な施設については可能なファイル形式で電送し、北海道立衛生研究所でtiffに変換した上で解析に供した。

4. PFGE パターン解析

PFGEパターンの解析は、Fingerprint II (日本語バージョン、Bio-Rad社)を用いて、トランス1.2%の条件で行った。今回の調査では、2施設での解析結果を比較する目的で、北海道立衛生研究所に集められたPFGE画像をもう一方の施設へ電送し、同じ条件で解析した。

C. 研究結果

1. PFGE 画像

今回のPFGE精度管理は札幌市衛生研究所、青森県環境保健センター、秋田県衛生科学研究

所、岩手県環境保健研究センター、宮城県保健環境センター、仙台市衛生研究所、山形県衛生研究所、福島県衛生研究所、新潟県保健環境科学研究所の9施設と北海道立衛生研究所の10施設で実施した。泳動条件は基本的に感染研から提示されたプロトコールに従った。各施設の泳動像を比較すると、その泳動距離に多少の違いが見られた。そこで、北海道立衛生研究所において、感染研提示の19時間泳動と、18時間泳動を実施した(図1)。CDCの方法に則り、今後分子量マーカーは *Salmonella* Braenderup を用いるが、その最も低分子量のバンド(図中の指記号)が19時間泳動の写真ではゲルの最下端にかろうじて観察された。一方、18時間泳動では容易に観察することができた。このような現象は施設A, B, C, Jにみられた(図2)が、このなかで、施設Aについては解析の際に支障を来した。

菌株No.3と3aは同一菌株であるが、そのPFGEパターンを比較すると3aにはないバンドが菌株3に出現した(図2のアスタリスク参照)。これは施設A, F以外の全施設に認められた。

2. 画像の電送

全施設が電子ファイルで画像を電送した。ファイル形式については、1施設がGIF、1施設がJPEG、他の7施設はtiffファイルで送付された。しかし、同じtiffファイルでも5施設がインデックスカラーのモードで送付されたため、グレースケールに変換する必要があった。画像サイズについては、100kバイト未満が2施設、100~300kバイトが2施設、300~400kバイトが3施設、残りの2施設は800kバイト以上であった。

3. マーカーバンドの比較

各泳動画像を *Salmonella* Braenderup を基準として標準化し、同時に泳動したラダーの泳

動像を比較した(図3)。結果としてほぼ同じ位置に移動されているように見えるが、バンドの濃度によってその面積が異なり、バンド位置を認識する際の正確性に影響を与えているように思われる。また、標準化の基準となる *Salmonella* Braenderup では、ほぼ同じ位置に移動されていた。しかし、全体的な泳動距離の違いにより、特に施設Aでは低分子量のバンドが欠失していた(図4)。

4. 各施設で調整したサンプルのPFGE像の比較

菌株1についてのFingerprint IIを用いた解析結果を図5に示した。その類似性は86.5%であった。デンドログラムでは、施設Aがやや離れたところに位置しているように見られるが、これは、施設Aの泳動距離が長いために低分子量のバンドをソフト上で認識できなかったことが原因であると考えられる。

菌株2についての解析結果を図6に示した。この菌株の類似性は84.3%であった。これは施設Dにおけるバンドの輝度が低いために認識できなかったことによる。

菌株3についてはその類似性は92.8%(図7)、菌株4の類似性は85.5%(図10)であった。菌株3についてはほぼ満足のいく結果であったが、菌株4では、やはり泳動距離の影響が現れ、施設Aの低分子量バンドが認識できなかった。

5. 北海道立衛生研究所で調製したサンプルプラグのPFGEパターンの比較

菌株3aの解析結果を図8に示した。北海道立衛生研究所で調製したプラグの菌濃度が低かったためにバンドの輝度が低下し、それが菌株3(類似性;92.8%)に比べて低い類似性(88.3%)の原因となった。菌株4aでは90.7%の類似性を示し、各施設で調製したサンプル間で比較したときよりも良好な結果が得られた。

しかし、その泳動像をみる限りにおいて、各バンドの位置が若干上方へシフトしているように思われる施設もあった(図11)。

菌株3と3a(菌株3-3a)、菌株4と4a(菌株4-4a)を一緒に解析すると、菌株3-3aでは、菌株3のエキストラバンドのために3と3aに収束する傾向が見られた(図9)。菌株4-4aでは、菌株4および4aはほぼ分散していたが、泳動距離の影響は拭えなかった(図12)。

6. 2施設での解析の比較

図13から図20に2施設での解析の比較のための各菌株毎のデンドログラムを示した。また、表2にそれぞれの施設で算出された類似性を示した。デンドログラムの比較では、菌株1(図13)、菌株3a(図16)で全く同一のパターンが得られた。類似性の比較では、菌株4以外はほぼ同じ値が得られた(表2)。

表2 2施設での解析結果

菌株	Similarity (%)	
	施設 E	施設 J
1	86.2	86.5
2	82.4	84.3
3	92.8	92.8
3a	88.4	88.3
4	81.5	85.5
4a	88.7	90.7
3-3a	90.3	91.0
4-4a	85.3	84.6

D. 考察

今年度の調査の結果から、泳動手技の格段の向上がみられた。すなわち、昨年度の調査では、同一菌株で比較した場合、統一マニュアルに基づいて実施されていても、その類似性は63.9%から82.4%の範囲内であった。さらに、10菌

株中80%を越えたのは1菌株のみで、60%代が2菌株、残りは70%代であった(パルスフィールド電気泳動法[Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE]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、平成14年度総括研究報告書参照)。これに比べ、今年度ではすべての菌株で80%以上の類似性を示した。また、電気泳動用の機種などの諸条件が泳動パターンに与える影響を調べる目的で、北海道立衛生研究所で作製したプラグを配布しそれぞれの施設で泳動を実施した。この目的に用いた菌株3a、4aについても90%前後の類似度が得られた。これらのことから、大腸菌、特にEHECのPFGEについては完成度が高いと思われる。しかしながら一方では、今回の泳動距離の違いに起因すると思われる泳動パターンの違い(類似度の低下)も看過できない。PFGEでは機種の違いによってもパターンが異なることが指摘されており、泳動時間の設定については、その施設によって自由度があっても良いのかも知れない。

解析ソフトの使い方(バンドの認識)によって、解析結果に影響を与えることが予想されるので、今年度は2施設で同一画像を用いて解析結果を比較した。その結果、2施設間では大きな違いは認められなかった。パルスネットの運営を考えると、ソフトを所有し、自施設で解析が可能な衛研ではその解析結果を報告するようになるものと思われる。従って、今後はより多くの施設で解析結果を比較する必要がある。

PFGEパターンの解析において、どれだけ正確にバンドを認識できるかがその成否を左右する。従って、バンドの輝度が極端に濃い場合や、薄い場合にはバンド位置の正確性が保持されない可能性がある。濃すぎるバンドはバンドの正確な位置からずれる可能性があり、薄い場合にはその認識すらできない。このことから、最初の菌濃度が重要な要素になるが、再現性を果たせるためには、培地上のコロニーを掻き取

るよりも液体培地による一夜培養の方が均一な濃度の菌液を得ることができるように思われた。

菌株3にみられたエキストラバンドについては、その原因として、HI 寒天培地の穿刺培養菌を室温で長期間（1 ヶ月程度）放置したために生じたものと推測される。このことは、PFGEのスタンダードとして用いるサルモネラ菌の保存についても十分に注意を払う必要があることを示唆している。

E. 結論

PFGEの精度管理では、すべての供試菌株において80%以上の類似度が得られたが、泳動距離の違いによる類似度の低下もみられた。各施設で調製したサンプルでも、北海道立衛生研究所で調製したサンプルにおいてもその類似度に大差はなく、泳動条件がそのパターンに与える影響が大きいことが示唆された。同一画像を2施設で解析し、その結果を比較したが、2施設間での大きな違いはなかった。

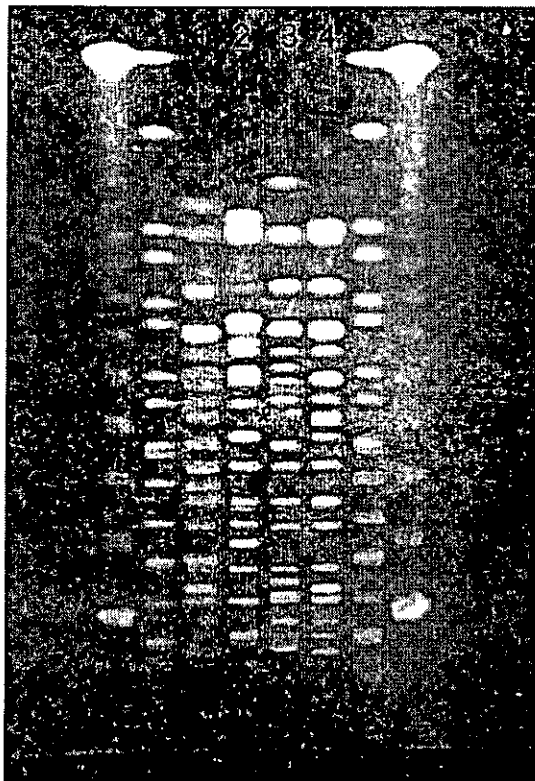
F. 健康危機情報

なし。

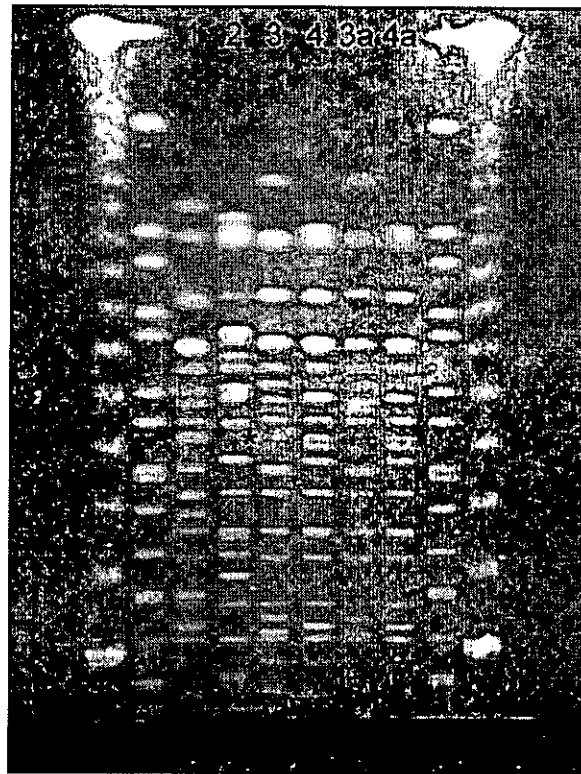
G. 研究発表

1. 加藤一夫、須釜久美子、平澤恭子、長沢正秋、渡部啓司. *Salmonella* Enteritidis のパルスフィールド電気泳動法による解析. 福島県医師会報 66(2) : 28-32。

図1 泳動時間による低分子量バンドの解像度



18時間泳動



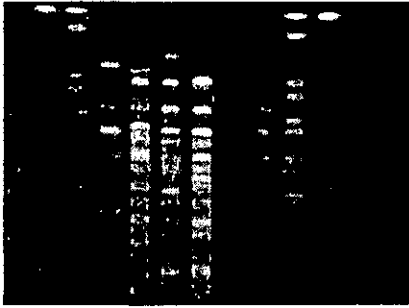
19時間泳動

表1 供試菌株

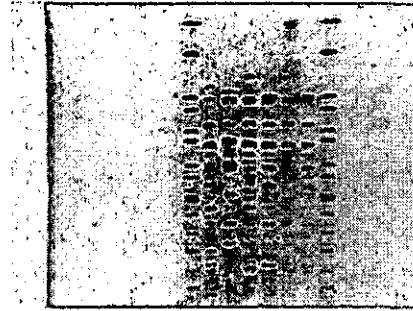
No.	感染研No.	血清型	毒素型	PFGE型
1	020021	O157:H7	2	VII, ND, III
2	020049	O157:H7	2	Va, ND, ND
3	020095	O157:H7	2	IIIa, ND, III
4	021533	O157:H7	1&2	IIa, IIa, I
3a	020095	O157:H7	2	IIIa, ND, III
4a	021533	O157:H7	1&2	IIa, IIa, I

1～4; 各衛研でプラグを調製、3a, 4a; 北海道衛研にてプラグを調製し、各衛研に配布。

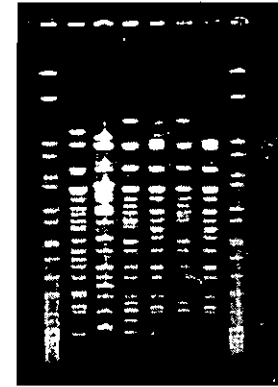
図2 PFGE画像の原画(これらの画像を加工し解析に供した)



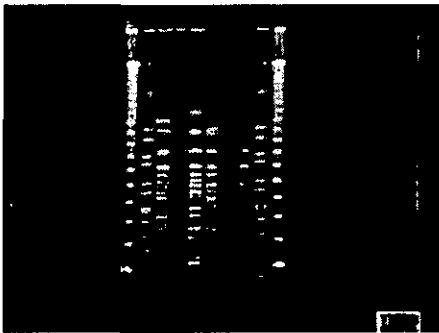
施設A



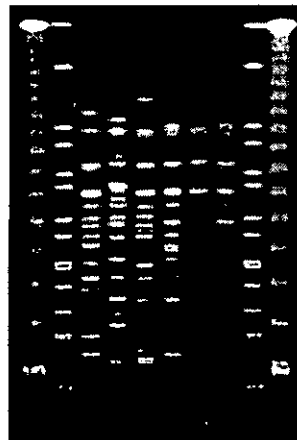
施設 B



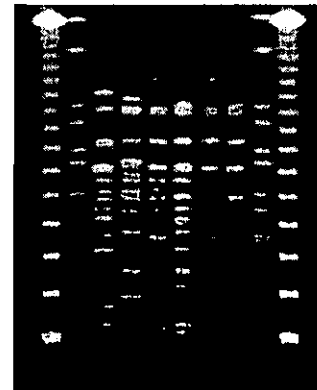
施設 C



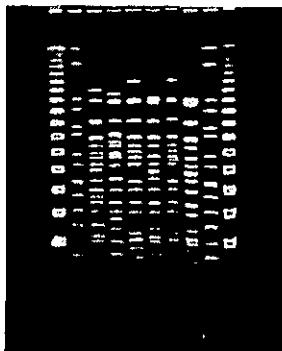
施設 D



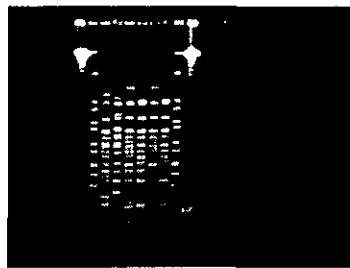
施設 E



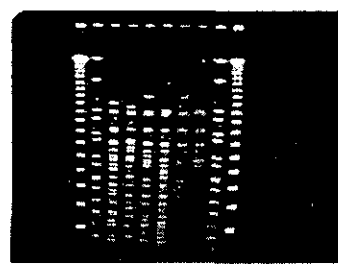
施設 F



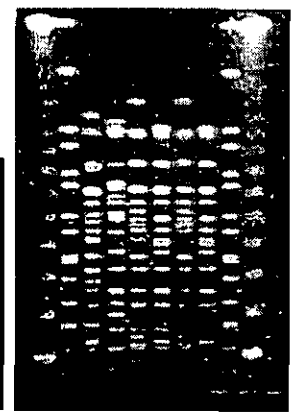
施設 G



施設 H



施設 I



施設 J