

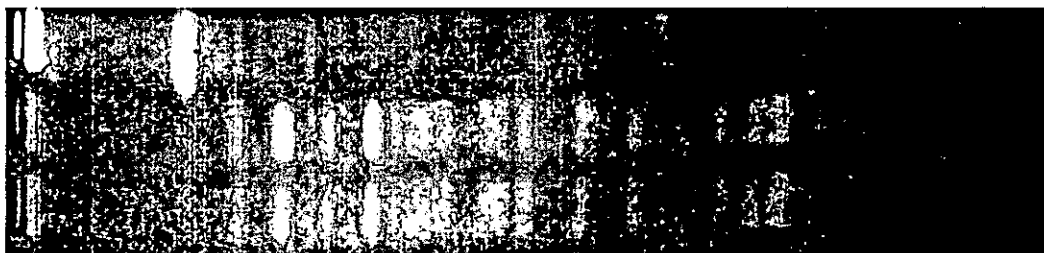
1. OM株(東京都)
2. YC株(埼玉県)

泳動条件
 4~8秒 9時間
 8~50秒 13時間

制限酵素 *Xba* I

写真7 東京都および埼玉県で検出されたEHEC O63 (VT2産生)株の PFGEパターン (2003年7月)

1 2 M



1. 患者A(都内K区)
2. 患者B(埼玉県)

(PFGE型:T-39)

患者A:7月5日 S区内の焼肉店aでユツケ・レバ刺しを喫食

患者B:7月5日 I内の焼肉店bでユツケ喫食

焼肉店aおよび焼肉店bは共に埼玉県の卸業者からユツケを仕入れていたことが判明

写真8 ユツケによるdiffuse outbreakが疑われた事例(2003年7月)

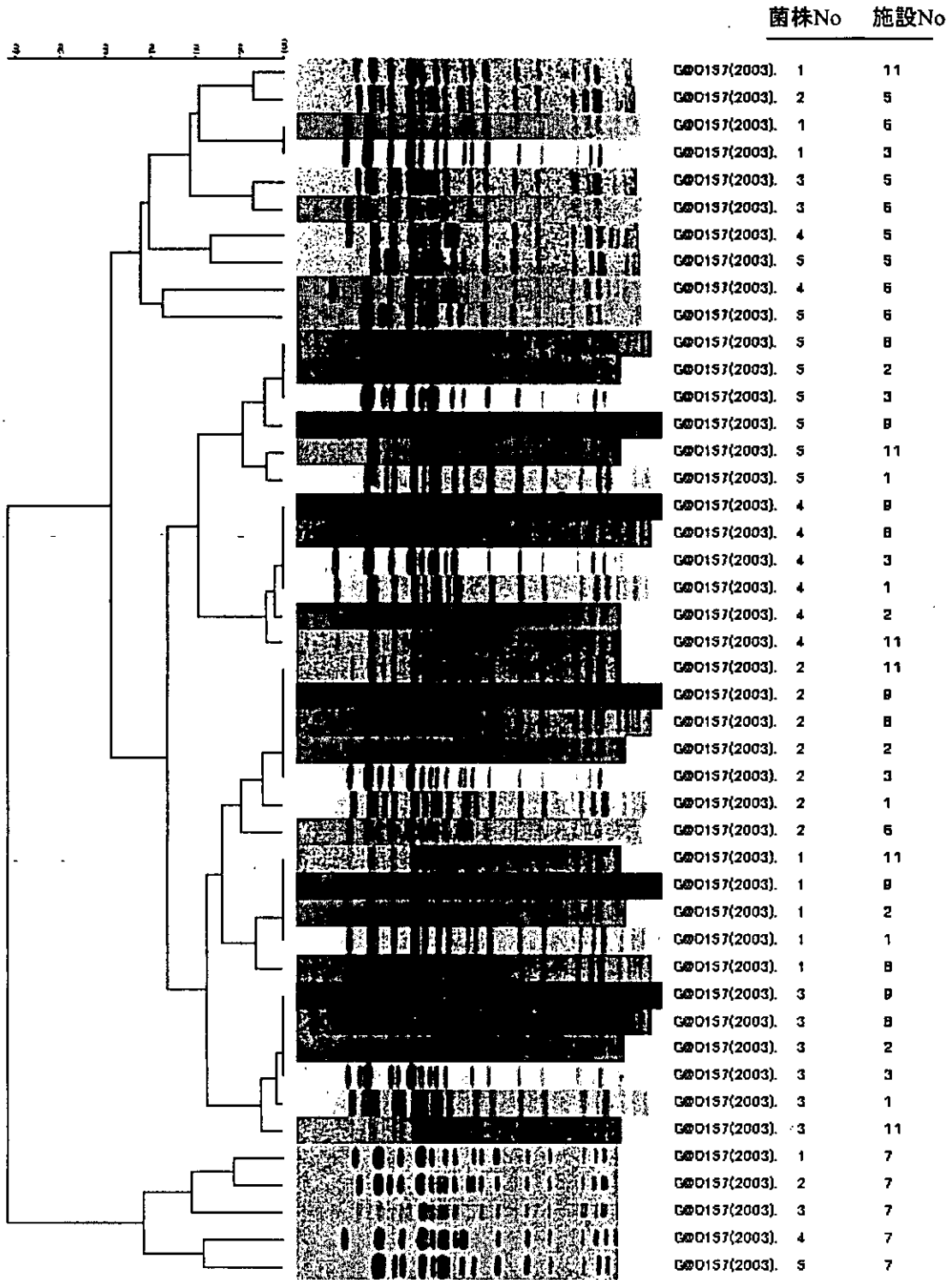


図1 共通菌株(O157)5株の各施設におけるPFGE解析像をもとにしたデンドログラム: λを基準にした解析

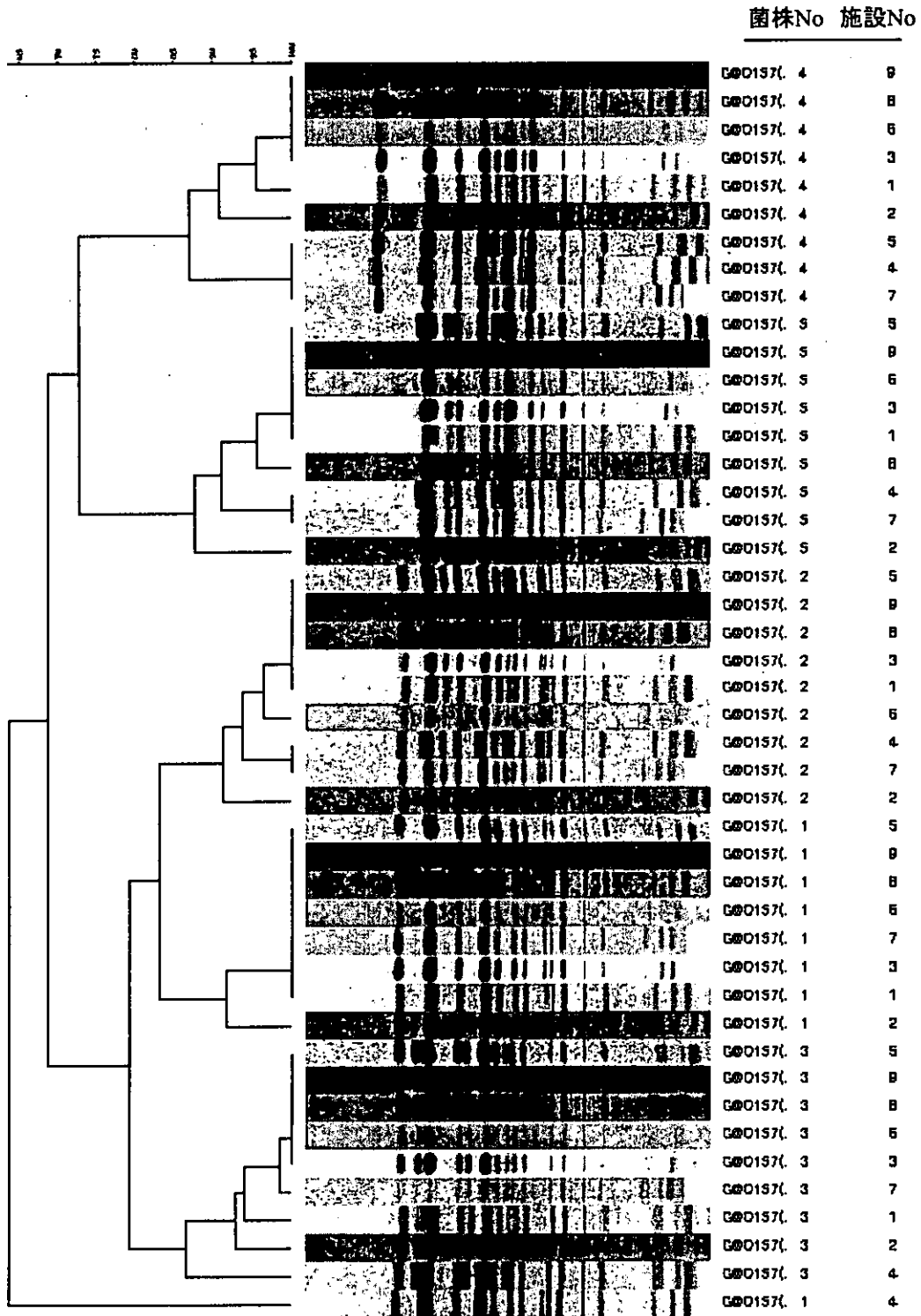
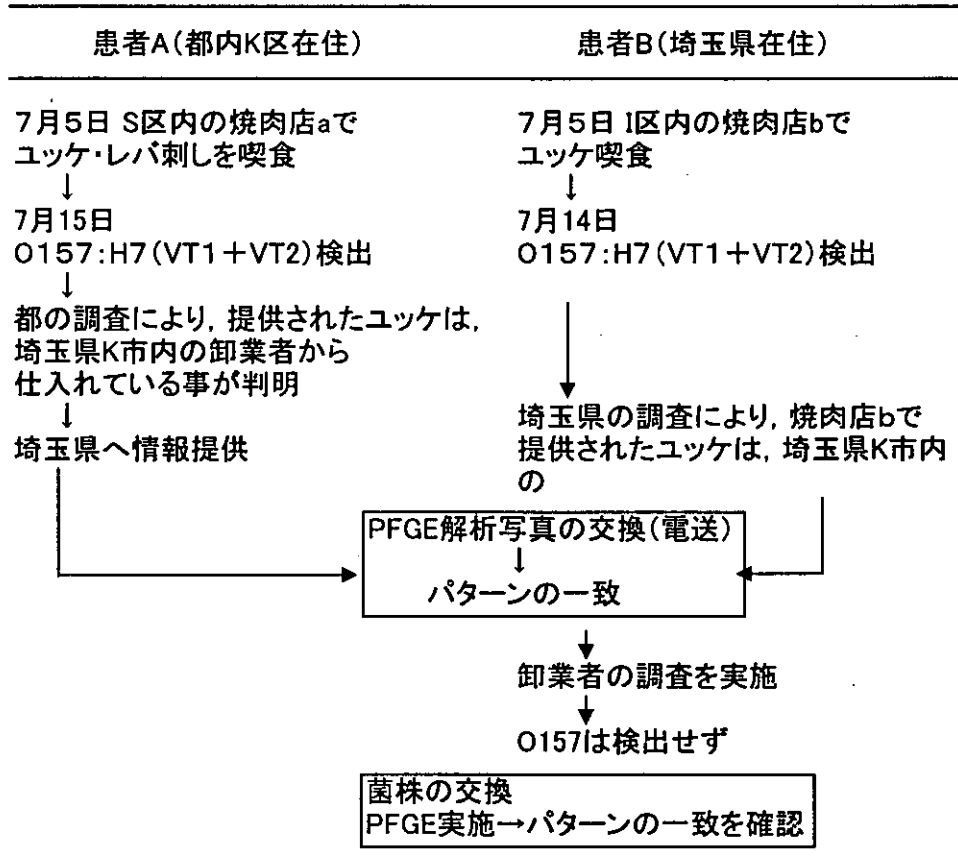


図2 共通菌株(O157)5株の各施設におけるPFGE解析像をもとにしたデンドログラム:S.Braenderup株を基準にした解析

表1 ユッケによるdiffuse outbreak(2003年7月)



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

分担研究・東海・北陸地方8地方衛生研究所による腸管出血性大腸菌 0157
を用いたパルスネット構築のための精度管理

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
分担研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 倉本早苗 石川県保健環境センター
板垣道代 岐阜県保健環境研究所
深尾敏夫 岐阜市衛生試験所
田中大祐 富山県衛生研究所
酒井高子 豊田市衛生試験所
石畝 史 福井県衛生研究所
岩出義人 三重県科学技術振興センター保健環境研究部

研究要旨

「パルスネットジャパン」構築のための準備活動として東海・北陸地方8地方衛生研究所（地研）による腸管出血性大腸菌 0157 を用いた精度管理を計2回実施した。

第1回精度管理では、PFGE 実施条件のうち PFGE 泳動条件、及び入マーカーの使用を統一したが、他の条件は全て各地研の方法で実施した。参加した8地研のうち、解析が可能であった6地研について、同一 PFGE 型の2検体について各地研内で相同性の比較を行なったところ、全ての地研においてその相同性は100%となった。しかし PFGE 型の異なる4検体について解析可能であった7地研について地研間の相同性の比較を行なったところ、4検体全てにおいて、同一 PFGE 型にもかかわらず全ての地研の泳動図が単一のクラスターに属することはなく、地研間の相同性も100（2地研間のみ）～40%と低かった。

第2回精度管理では、1）PFGE 泳動条件の統一。2）プラグ菌量の統一。3）薄いプラグを作成できるキットの使用。4）シャープなバンドが安定して得られるサルモネラを *Xba* I で処理したマーカーを使用した。その結果、8地研全ての泳動図を解析することが可能となり、しかも用いた3検体中2検体で8地研全ての泳動図が単一のクラスターを形成した。しかも各クラスターの相同性は87.7、89.2%と第1回に比べ非常に高かった。残りの1検体に関しては8地研のうち7地研の泳動図が同一クラスターを形成し、その相同性も88.4%と高かった。

以上の結果から、2回の精度管理を通して異なった地研で実施した同一 PFGE 型 0157 の地研間の相同性を著しく向上することが可能となった。これは、泳動条件の統一に加え、プラグ菌量の統一、薄いプラグを作成できるキットの使用、及びシャープなバンドが安定して得られるサルモネラを *Xba* I で処理したマーカーの使用によると思われた。

A. 研究目的

我が国で O157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働が平成 18 年度より予定されている。本システムの概要は、各地方衛生研究所 (地研) が都道府県内で検出された O157 についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行ない、その泳動図を国立感染症研究所 (感染研) に電送し、感染研でこれら泳動図について解析ソフトを用いて比較を行なう。もし同一もしくは非常に類似した泳動図が複数の異なった都道府県から得られた場合には diffuse outbreak の発生が強く疑われ、迅速な diffuse outbreak の検出、及びその疫学情報の裏付けが可能となる。本システムが円滑にかつ信頼性を持って稼働するために最も重要な点は、「異なった地研で同一の PFGE 型の O157 について PFGE を実施した場合、解析ソフトを用いてその泳動図を比較するとその相同性が 100% となる。」ことである。

本研究ではパルスネットジャパン稼働に向けた準備活動の一環として東海・北陸ブロック 8 地研が参加して PFGE 精度管理を計 2 回実施した。具体的には PFGE 型の同一もしくは異なる O157 について各機関で統一もしくは各地研独自の実施条件で PFGE を実施し、その泳動図を愛知県衛生研究所 (愛知衛研) に郵送した。愛知衛研では解析ソフトを用いてその泳動図の比較を行なった。そして、2 回の精度管理を通して同一 PFGE 型の O157 泳動図について地研間の相同性を 100% とするための問題点を明らかとし、その改善策について検討した。

B. 研究方法

菌株：散發事例 4 事例に由来する 4 株の EHEC O157 を用いた。これら菌株は、愛知県で平成 12 年度 (愛知衛研菌株番号：2000-48)、13 年度 (2001-77) 及び 14 年度 (2002-58、2002-109) に検出され、その PFGE 型は何れも異なっている (図 1)。なお OH 血清型別分類に関しては、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて行なった。

第 1 回精度管理

[I] 送付菌株

5 検体の O157 を精度管理に用いた。検体番号 1 から 5 はそれぞれ菌株番号 2001-77、2002-109、2000-48、2002-58 及び 2001-77 である。検体 1 と 5 は同一菌株である。

[II] 方法

愛知衛研より 5 検体を石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、豊田市衛生試験所、福井県衛生研究所、三重県科学技術振興センター保健環境研究部に送付した。そして、愛知衛研を含む 8 地研 (仮に地研 A から H とした。) において送付された 5 検体について PFGE を実施した。また、地研間の泳動図の比較を容易にするため、PFGE 実施条件のうち 2 つの条件を統一した。すなわち PFGE 泳動条件 (感染研旧条件：6 V/cm、パルスタイム 4 秒から 8 秒 9 時間、8 秒から 50 秒 13 時間) と λ マーカーの使用である。しかし、溶菌過程、制限酵素処理等その他の条件は、各地研の条件で実施した (表 1)。7 地研で PFGE 泳動図は郵送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一 PFGE 型の検体の場合には各地研内でパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。また異なる PFGE 型の検体の場合には各地研間で系統樹を作成した。また同時に PFGE 実施条件に関するアンケートも実施し各地研の PFGE 実施条件を把握した。

第 2 回精度管理

[I] 送付菌株

3 検体の O157 を精度管理に用いた。検体番号 1 から 3 は第 1 回と同一検体である。

[II] 方法

愛知衛研より 3 検体を第 1 回と同じ 7 地研に送付した。そして、愛知衛研を含む 8 地研において送付された 3 検体について PFGE を実施した。また、同一 PFGE 型検体の地研間の相同性を増すために PFGE 実施条件のうち 4 つの条件について統一、もしくは統一条件の変更を行なった。すなわち PFGE 泳動条件の統一 (感染研

新条件：6 V/cm、パルスタイム 2.2 秒から 54.2 秒 21 時間。なお、この変更は相同性の向上のために直接関係なく、平成 16 年 1 月より感染研の泳動条件が変更になるため)、プラグ菌液濃度の統一 (OD610=0.5-0.6)、プラグ作成キットの使用 (厚さ 0.7mm の薄いプラグを作成できる)、及びマーカーの変更 (*Xba* I 処理 *Salmonella* Braenderup H9812 DNA)、である。しかし、その他の条件は、各地研もしくは感染研の新プロトコールの条件で実施した。8 地研全てで PFGE が実施され、その PFGE 泳動図が愛知衛研に郵送され、同所で解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて解析を行なった。具体的には、異なった PFGE 型の検体について各地研間でパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

C. 研究結果

[I] 第 1 回精度管理

1. 東海・北陸地方 8 地研の PFGE 実施条件

(表 1)

PFGE 検体作成のうち、8 地研の間でプラグ菌液の濃度に差が認められた。すなわち、3 地研 (A, B, C) では比較的濃い菌液 (培養菌液の場合は、プラグ当たり一夜培養液 500 μ l、1000 μ l。又は平板の場合は Mac 4 の懸濁液 200 μ l) を作成していたが、残りの 5 地研では比較的薄い菌液 (それぞれ 50 μ l~200 μ l。又は Mac 2~3 の懸濁液の 1/10 量) を調製していた。溶菌、及び洗浄では、8 地研のうち半数の 4 地研が市販の溶菌のためのキットを使用していた。残りの地研では 2 地研 (C, E) が溶菌過程の Lysozyme 処理を行なっていなかった。また、1 地研 (H) では洗浄の項で Pefabloc を用いた場合の反応温度が 25°C と、他の 2 地研 (50°C) よりかなり低かった。しかし、その他の点では地研間で大きな差は認められなかった。制限酵素処理に関しては 8 地研中 5 地研でサンプル当たりの *Xba* I 量が 30U であり、残りの 2 地研は 50U を使用していた。PFGE 機器の項では機種の違いはあるものの、全ての地研でバイオラド社の機器を使用していた。マーカーに関しては、8 地研中 7 地研でバイオラド社の λ マーカーを使用していたが、

その前処理の条件は異なっていた。すなわち、45°C、7 分、又は 50°C、10 分がそれぞれ 2 地研認められたが、他の 3 地研では反応温度は何れも 50°C であったが、反応時間は 1.5、5、15 分と異なっていた。電気泳動に用いるプラグの厚さは薄めの 0.7mm を用いていた地研が 3、中程度の厚さの 1.4、1.5mm が 2、厚めの 2、3、7mm が 3 であり、地研によって差が認められた。

2. 同一 PFGE 型 2 検体の各地研内での相同性の比較

8 地研のうち、1 地研は泳動図の質が劣っていたため解析ソフトを用いた解析が不可能であった。また他の 1 地研では同一菌株 (1 番と 5 番) のうちの 1 検体が泳動されていなかった。したがって、今回は 6 地研の泳動図についてのみ解析を行なった。図 2 には相同性を示す系統樹を示した。解析を行なった 6 地研全てで同一 PFGE 型検体 1 と 5 は地研内で 100% の相同性が得られた。

3. 異なった PFGE 型検体の各地研間での相同性の比較

1 地研は泳動図の質が劣っていたため解析ソフトを用いた解析が不可能であったので、解析が可能であった 7 地研それぞれの 4 検体の泳動図について解析を行なった。図 3 には検体 1 から 3 の系統樹を示した。検体 1 に関しては、2 地研 (C, D) の泳動図は 100% の相同性が得られた。また、これら 2 地研を含む 6 地研は相同性 63% で同一のクラスターに含まれた。しかし 1 地研 (E) の泳動図はこのクラスターには含まれず、クラスターとの相同性は低かった (40%)。検体 2 については、2 地研 (C, D) の泳動図は 100% の相同性が得られた。またこれら 2 地研を含む 4 地研は相同性 73% で同一のクラスターに含まれた。残り 3 地研のうち、2 地研 (E, F) の泳動図は相同性 72.3% で前述とは別のクラスターを形成した。また 1 地研 (G) はこれら 2 つのクラスターとは 47.2、及び 40% の低い相同性であった。検体 3 に関しては、相同性 100% が得られた泳動図はなかった。3 (C, D, H)、及び 2 地研 (E, F) の泳動図がそれぞれ相同性 71.9、68.4% で異なった 2 つのクラスターを形成した。

しかし残りの2地研(A、G)は何れのクラスターにも属さず前述の2つのクラスターとは何れも相同性は低かった。検体4については2地研(C、D)の泳動図は100%の相同性が得られた(系統樹は省略)。またこれら2地研を含む4地研は相同性71.4%で同一クラスターを形成した。他の2地研(E、F)は相同性86.7%で別のクラスターを形成した。1地研(G)の泳動図はこれら2つのクラスター何れとも相同性が低かった。

〔II〕第2回精度管理

1. 異なったPFGE型検体の各地研間での相同性の比較

第2回精度管理の検体1から3の系統樹を図4に示した。第2回は参加8地研全ての泳動図を解析することが可能であった。検体1に関しては、相同性100%の2地研を含む4地研(B、D、E、G)と相同性100%の3地研を含む4地研(A、C、F、H)の泳動図がそれぞれ相同性92.4、94.5%で2つの異なったクラスターを形成した。しかも両クラスターの相同性は87.7%と高かった。また高分子量領域のバンド(図4、検体1のバンド模式図の左から2本目と4本目のバンド)が地研によって比較的薄く認められる場合と全く認められない場合があった。検体2については、地研Bを除く7地研(3地研、及び2地研でそれぞれ相同性100%)の泳動図が相同性88.4%で同一クラスターを形成した。地研Bとこのクラスターとの相同性は72.7%と低かった。しかし、地研Bの泳動図では高分子量領域のバンド(図4、検体2、地研B(B2)のバンド模式図の左から1本目と2本目のバンド)が明らかに他の地研とは異なっていた。検体3は検体1、2の泳動図より地研間の相同性は高かった。すなわち8地研のうち、7地研が相同性100%であった。また残りの1地研(B)との相同性も89.2%と高かった。

D. 考察

第1回精度管理では、PFGE実施条件のうちPFGE泳動条件、及び λ マーカの使用は地研間で統一したが、その他の条件は全て各地研の方法で実施した。同一PFGE型の2検体について解析

が可能であった6地研について各地研内で相同性の比較を行なったところ、全ての地研においてその相同性は100%となった。よって、これら地研では、同一ゲルで0157のPFGEを実施した場合には、そのPFGE型の相違を正しく判定できるものと思われた。しかし、解析が不可能であった1地研(B)の泳動図では鮮明なバンドパターンが得られなかった。これはプラグ菌液の濃度が過剰で制限酵素による消化が不十分であると推察された。この推察は同時に行なったPFGE実施条件のアンケート結果からも裏付けられた(表1 地研B)。

異なったPFGE型4検体について7地研間での相同性を比較した場合には、4検体中3検体で相同性が100%となったのは特定の2機関のみであった。また、形成されるクラスターは1検体では1つであったが、残りの3検体では2つとなった。しかも、これらクラスターの相同性は検体4のクラスターで86.7%と高かったが、他のクラスターでは何れも63~73%と低かった。さらに、4検体何れの場合にもクラスターに属さない泳動図が1つ認められた。

これらの原因としては、1)異なった泳動図を比較する際の標準となる λ マーカースのバンドがシャープでない(図1のマーカの参照)。2)プラグ菌量が少なすぎる。3)プラグ菌量が多すぎる。4)電気泳動する際のプラグの厚さが厚すぎる。特に2)から4)はバンドが薄すぎたり、太すぎる原因となり解析ソフトが正しくバンドを認識できない大きな要因であることが推察された。

第2回では、第1回の精度管理の結果を踏まえてPFGE実施条件の統一、及び統一条件の変更を行ない、地研間の相同性の向上に努めた。具体的には、1)PFGE泳動条件の統一。2)プラグ菌量の統一。3)薄いプラグが作成できるキットの使用。4)シャープなバンドが安定して得られるサルモネラを*Xba*I処理したマーカへの変更である。その結果、図3と4を比較すれば明らかなように、同一PFGE型検体の地研間での相同性の向上に著しい成果が認められた。検体1と3では8地研全ての泳動図が1つのクラスターを形成した。しかもこれらクラスターの相同性は87.7、89.2%と第1回に比べかなり

高かった。検体2に関しては8地研のうち7地研の泳動図がクラスターを形成し、その相同性も88.4%と高かった。また第2回で明らかとなった問題点として、検体1と2では高分子量領域のバンドで地研によって薄いバンドが認められない場合があった。また検体2では1地研で高分子量領域で明らかに異なるバンドパターンが認められた。これらの原因として1) 制限酵素処理が不十分であった。2) 0157の *Xba* I 認識部位に変異が起きた。等が考えられる。今後、これらの点について改善策を講じることで異なった地研間で実施した同一 PFGE 型の検体の相同性を100%に近づけることが可能になると思われる。

E. 結論

パルスネットジャパン構築のための準備活動として東海・北陸地方8地研による腸管出血性大腸菌0157を用いた精度管理を計2回実施した。

第1回精度管理では、PFGE実施条件のうちPFGE泳動条件、及びλマーカの使用を統一したが、他の条件は全て各地研の方法で実施した。参加した8地研のうち、解析が可能であった6地研について、同一PFGE型の2検体について各地研内で相同性の比較を行なったところ、全ての地研においてその相同性は100%となった。PFGE型の異なる4検体について解析可能であった7地研について地研間の相同性の比較を行なったところ、全ての検体で同一のPFGE型にもかかわらず全ての地研の泳動図が単一のクラスターに属することはなく、地研間の相同性も100(2地研間のみ)~40%と低かった。

第2回精度管理では、PFGE泳動条件、及びプラグ菌量の統一、プラグ作成キットの使用、及びマーカの変更を行なった。その結果、8地研全ての泳動図が解析可能となった。用いた3検体中2検体で8地研全ての泳動図が1つのクラスターを形成した。しかもこれらクラスターの相同性は87.7、89.2%と第1回に比べかなり高かった。残りの1検体も8地研のうち7地研の泳動図がクラスターを形成し、その相同性も88.4%と高かった。

以上の結果から、2回の精度管理を通して異なった地研で実施した同一PFGE型0157の泳動

図の地研間の相同性を著しく向上することが可能となった。これは、PFGE泳動条件の統一をはじめ、プラグ菌量の統一、薄いプラグを作成できるキットの使用、及びシャープなバンドが得られるマーカの使用によるものと思われた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

Daisuke Tanaka, Junko Isobe, Shiho Hosorigi, Keiko Kimata, Miwako Shimizu, Koji Katori, Yotaku Gyobu, Yoshiyuki Nagai, Takayoshi Yamagishi, Tadahiro Karasawa and Shinichi Nakamura. An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid. Jpn. J. Infect. Dis. 56:137-139, 2003

学会発表

鈴木匡弘、秦 眞美、松本昌門、鈴木康元、志賀毒素産生大腸菌0157の *IS1203* によるPCR遺伝子型別分類法の開発、第40回日本細菌学会中部支部総会、新潟市、2003.10.13.

図1 精度管理に用いた 0157

M 1 2 3 4



M: λ マーカー、1 : 検体 1 (菌株番号 2001-77)、2 : 検体 2 (2002-109)、3 : 検体 3 (2000-48)、4 : 検体 4 (2002-58)

図2 同一 PFGE 型 2 検体の 6 地研内での相同性の比較

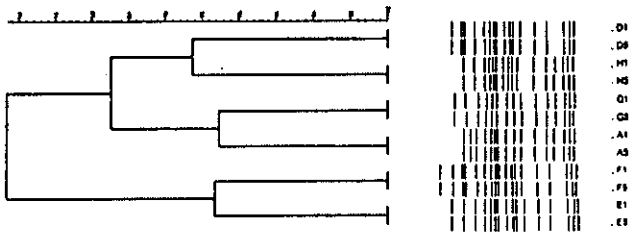


図3 異なった PFGE 型 3 検体の各地研間での相同性の比較 (第 1 回)

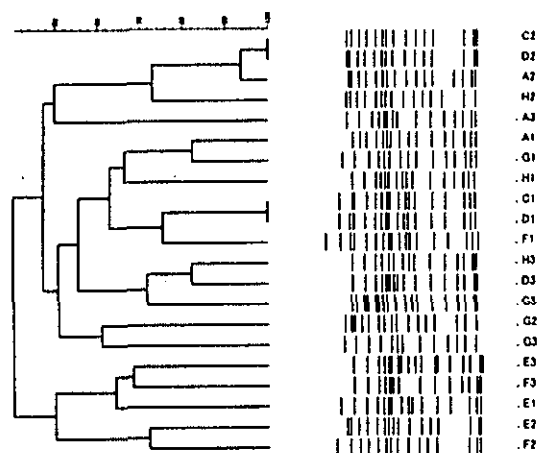


図4 異なった PFGE 型 3 検体の各地研間での相同性の比較 (第 2 回)

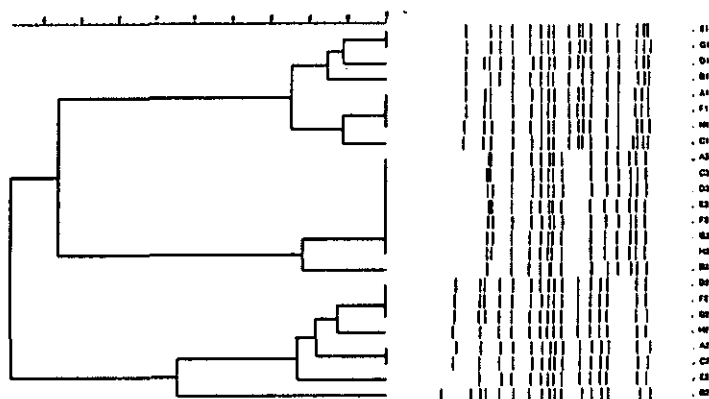


表1 東海・北陸地方8地研のPFGE実施条件

	A	B	C	D	E	F	G	H
プラグの作成								
場所	菌液	菌液	平板	菌液	菌液	菌液	菌液	平板
・サンプル当たりの菌液の濃度	一夜培養液500 μ l	一夜培養液1000 μ l	Mac 4の菌液200 μ l	一夜培養液100 μ l	一夜培養液200 μ l	一夜培養液50 μ l	一夜培養液200 μ l	Mac 2~3の1/10量
・サンプリングアロースの濃度 (%)	1.2	1.2	2	1.2	1.6	1	1.2	2
会社名	バイオラド	バイオラド	和光純薬	バイオラド	和光純薬	バイオラド	バイオラド	バイオラド
溶菌								
Lysozyme処理	キット	キット	処理なし	キット	処理なし	○	キット	○
バッファナー (0.5M EDTA (pH8.0))	キット	キット	処理なし	キット	○	○	キット	○
濃度 (lag/ml)						4.5	3	4
反応時間 (時間)						和光純薬		和光純薬
会社名								
Proteinase K 処理	キット	キット	0.5M EDTA (pH9.5)	キット	○	○	キット	○
バッファナー			0.5		○	○		○
(0.5M EDTA (pH8.0)+1% laurylsarcosine)			一夜		16	一夜		○
濃度 (lag/ml)			和光純薬		シグマ	和光純薬		16
反応時間 (時間)								和光純薬
会社名								
洗浄								
Pefablocの場合	キット	キット	キット	キット	4	4	キット	4
濃度 (mM)					0.5	0.5		1
反応時間 (時間)					50	50		25
温度 (°C)					2	2		2
処理回数					2	2		1
TE溶液での洗浄					4	0.5		2
反応時間 (時間)						1		1
処理回数						3		2
濃度 (mM)								
反応時間 (時間)								
温度 (°C)								
処理回数								
TE溶液での洗浄								
反応時間 (時間)								
処理回数								
制限酵素処理								
Iba I 量 (U)	30	50	30	50	30	30	50	30
反応時間 (時間)	18	20	一夜	一夜	一夜	一夜	18	18
会社名	ロジュー	バイオラド	ニッポンジーン	バイオラド	ロジュー	ロジュー	バイオラド	タカラ
DR III	DR III	GenePath	DR III	DR III	DR III	DR III	GenePath	DR III
PFGE機種								
メーカー	バイオラド	バイオラド	バイオラド	バイオラド	バイオラド	第一化学薬品	バイオラド	バイオラド
前処理の条件								
反応時間 (分)	1.5	10	7	5	7	10	10	15
温度 (度)	50	50	45	50	45	50	50	50
溶液	0.5 \times TBE	1 \times Wash Buffer	0.5 \times TBE	1 \times Wash Buffer	0.5 \times TBE	1 \times Wash Buffer	1 \times Wash Buffer	0.5 \times TBE
プラグの長さ (mm)	3	1.4	2	0.7	0.7	7	1.5	0.7
泳動バッファナー (0.5 \times TBE)	○	○	○	○	○	○	○	○
デオ尿素の添加の有無	×	○	△	×	○	○	×	×

○は左端カラムと同じ、異なる場合は記載した。ただしデオ尿素添加の項では○は有、×は無、△は場合によって異なる。

キット: GenePathキットGroup6

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

分担研究・多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium のパルスフィールドゲル電気泳動画像データベース構築とそのデータベースを用いた分子疫学的解析

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
分担研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所

研究要旨

愛知県で1980年から1999年の間に検出された143株の *S. Typhimurium* について9種類の抗生剤に対する薬剤感受性試験を実施し、本県における多剤耐性菌の浸潤状況を調べた。その結果、薬剤耐性菌の割合は80-89年（前期）に検出された菌株では53%（32/61）であったのに対して90-99年（後期）では76%（62/82）と大きく増加し、また、前期には3剤までの薬剤に対する耐性菌の割合が耐性菌全体の69%（22/32）を占めていたのに対し、後期になるとその割合は37%（23/62）とほぼ半減した。これらの結果から、後期では前期に比べ耐性菌の割合が増加しており、4剤以上の薬剤へ耐性を示す多剤耐性菌の割合が増加した。また、ファージ型別分類の結果から、欧米で90年代に大きな問題となった *S. Typhimurium* ファージ型 DT104 が7株検出されたが、これらの菌株は全てが6剤耐性菌であり、その分離年は前期3株、後期4株であった。

薬剤耐性94株を含む143株の *S. Typhimurium* についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を実施し、その画像データベースの構築、及びそのデータベースを用いた解析を行ない、多剤耐性菌の分子疫学的解析を行なった。その結果、143株は20のクラスター（お互いの菌株の相同性が70%以上で2株以上が含まれるグループとした。）（n=98）と45の1菌株1 PFGE型（n=45）に分類された。クラスターに含まれる菌株数は10のクラスターが22から3株であったが、残りの10のクラスターは含まれる株数が2株のみであった。前期のみに検出されたクラスターは7つで含まれる菌株数は19であったが、これら過半数以上（13株、68.4%）が薬剤感受性株、また4剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌は全く認められなかった。後期のみに認められたクラスターは9つで、これらクラスターに含まれる菌株数は40であった。このうち25株（62.1%）が耐性を示し、このうち16株（64%）は4剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。残りの4クラスターは前期及び後期共に認められた。そして、これらクラスターに含まれる菌株は前期（16株中8株が耐性菌（50%））に比べ後期（23株中18株（78.3%））の方が耐性菌の割合が高かった。全体で7株検出された *S. Typhimurium* DT104 はクラスターには6株認められ、このうちの5株はクラスター3（C3）に属しており前期、後期共検出された。1菌株1 PFGE型に型別分類されたのは45株であった。前期26株中18（69.2%）株が耐性を示したが、このうちの12株（66.7%）は1-3剤耐性であった。一方、後期に検出された19株は全て耐性を示し、このうち11株（57.9%）は4剤以上の抗生剤に耐性を示した。また、*S. Typhimurium* DT104 が前期に1株認められた。

後期に多数検出された4、5、及び6剤耐性菌はそれぞれ全体の菌株数の1/2から1/3を占める1つのクラスターとその他のクラスター及び1菌株1 PFGE型菌から構成されていることが明らかとなった。例えば、後期の4剤耐性菌ではC5クラスターが3株で、他の3つのクラスターはそれぞれ1株、1菌株1 PFGE型が3株であった。また、後期に検出された9クラスターのうち、6つは後期のみから検出されていたが、残りの3つのクラスターは前期、後期何れからも検出された。これらの結果から、後期に多数出現した4剤-6剤耐性菌は、複数のクラスター及び1菌株1 PFGE型菌から構成されていることが明らかとなり、主に移動可能な耐性遺伝子群が複数の異なったクラスター、もしくは1菌株1 PFGE型菌に水平伝播した結果、新たに生じたこと可能性が推察された。

A. 研究目的

サルモネラは我が国で年間の食中毒発生病数及び患者数でも常に上位にランクされている代表的な食中毒菌のひとつである。その中でも *S. Typhimurium* は *S. Enteritidis* と共に患者及び保菌者から最も高率に検出される菌型のひとつである。

1990年代に英国及び米国より胃腸炎患者からアンピシリン(略号A)、クロラムフェニコール(C)、ストレプトマイシン(S)、スルファメトキサゾール(Su)、テトラサイクリン(T)の5剤の抗生剤に耐性を示し、しかもそのフェージ型がDT(definitive type)104である *S. Typhimurium* が高率に分離されるようになった。さらにDT104による食中毒事例も英国、オランダ、米国等の欧米諸国で相次いで報告されている。また上述の5剤(ACSSuT)耐性に加えてナリジクス酸、ピペラシリン、トリメトプリム等の抗生剤にも耐性を示す7剤及び8剤耐性の高度多剤耐性 *S. Typhimurium*DT104も検出されるようになった。

我が国では、現在のところ患者及び健康保菌者からの *S. Typhimurium* の検出の急増は報告されていない。しかし、松下らは東京都において1980年から98年に海外渡航者及び国内事例(発症前に海外渡航歴のない事例)の下痢症患者から分離された *S. Typhimurium* について薬剤感受性試験及びフェージ型別分類を行なった。その結果、多剤耐性株が98株(全検出株数647の15.1%)分離された。フェージ型DT104は、85年以前には全く分離されなかったが86年以降は年と共に次第に多く分離され、全体としては多剤耐性株の44.9%(44株)を占めていた。さらにその薬剤耐性パターンはACSSuT(43株)及びACSSuT+カナマイシン(K)(1株)であったと報告している。このことから我が国においても86年以降は、欧米で問題となっている多剤耐性 *S. Typhimurium*DT104が存在していたことが明らかとなった。

本研究では、愛知県で1980年から1999年の間に検出された143株の *S. Typhimurium* について薬剤感受性試験及びフェージ型別分類を実施し、*S. Typhimurium* DT104を含む多剤耐性菌の本県における浸潤状況を調べた。その結果、90年代に分離された *S. Typhimurium* の多剤耐性化

と *Typhimurium* DT104の存在が明らかとなった。そこで、薬剤耐性94株を含む143株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を実施し、その画像データベースの構築、及びそのデータベースを用いた解析を行ない、多剤耐性 *S. Typhimurium* の分子疫学的解析を行なった。

B. 研究方法

菌株：愛知県内で1980年から99年に分離された *S. Typhimurium* 143株に用いたこれら菌株は県内の保健所、当研究所、及び病院において分離され、86株は健康保菌者86名、35株が散发下痢症患者35名、それに22株が食中毒11事例(1事例当たり1~3株)に由来するものである。

薬剤感受性試験：薬剤感受性試験は9種類の抗生剤について寒天平板希釈法にて行なった。試験に用いた抗生剤は、アンピシリン(A)、クロラムフェニコール(C)、ゲンタマイシン(G)、ナリジクス酸(N)、ピペラシリン(P)、ストレプトマイシン(S)、スルファメトキサゾール(Su)、テトラサイクリン(T)、トリメトプリム(Tp)である。それぞれの薬剤の耐性と見なす濃度はA:16 µg/ml、C:8 µg/ml、S:16 µg/ml、Su:256 µg/ml、T:8 µg/ml、G:4 µg/ml、N:16 µg/ml、P:64 µg/ml、Tp:8 µg/mlである。

フェージ型別分類：*S. Typhimurium*DT104と同じ耐性パターン(ACSSuT)を持つ5剤、もしくはこれら5剤にNまたはP耐性を有する6剤耐性株計28株について国立感染症研究所(感染研)にてPublic Health Laboratory Services(PHLS), London, United Kingdomの方法に従って行なった。

PFGE：*S. Typhimurium*の一夜培養液100 µlを遠心後、滅菌蒸留水にて洗浄し、菌液を等量の1.6%軟寒天と混和した。その100 µLをインサートプラグ内に注入し、氷中で30分放置した。固化したゲルをプロテナーゼKで処理した後、制限酵素 *Bln* Iで処理を行ない、CHEF DR III(バイオラド社)によって電気泳動を行なった。泳動条件は、電圧6 V/cm、泳動時間21時間、パルスタイム2.2秒から63.8秒である。マーカーは *Salmonella* Braenderup H9812の制限酵素 *Xba* I消化DNAを用いた。型別分類は、解析ソフト「フィンガープリントII」を用いて、お互いの

バンドの相違に基づく相同性 (%) から系統樹を作成した。そして、お互いの菌株間の相同性が70%以上を示し、かつ2株以上の菌株が含まれるものを同一クラスターし、含まれる菌株数が多いものから順にCの後に1から算用数字を付けた(例えばC1, C2, C3----)。

C. 研究成果

[I] 薬剤感受性試験

表1にその結果を示した。分離年によって1980年から89年までを前期、1990年から99年までを後期とした。薬剤耐性菌の割合は前期が53%であったのに対して後期は76%と大きく増加し、90年代には80年代と比べ耐性菌が増加していることが明らかとなった。また、前期には3剤までの薬剤に対する耐性菌の割合が耐性菌全体の69%を占めていたのに対し、後期になるとその割合は37%とほぼ半減し、4剤以上の薬剤に対する耐性菌の割合が63%を占めていた。これらの結果から、90年代における耐性菌の増加の原因は主として*S. Typhimurium*の4剤以上の抗生剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加によるものと考えられた。

愛知県内における分離株からも、諸外国から報告されている5剤耐性*S. Typhimurium* フェージ型DT104と同じ耐性パターンを示すACSSuT耐性株が、前期には4株(1984,85,89年)、後期には8株(90,99年)検出された。また、前期には、この5剤耐性にピペラシリ(P)耐性が加わった6剤耐性株が4株(88,89年)認められたのに対し、後期になると同様の6剤耐性菌7株(91~93年、96,97,99年)に加え、ACSuT耐性にナリジクス酸(N)耐性が加わった6剤耐性菌が5株(90,99年)認められた。なお、これらACSSuT+N耐性5株の内訳は、2株が健康保菌者に、3株は99年に発生した食中毒1事例に由来するものであった。

[II] フェージ型別分類

欧米で検出された*S. Typhimurium* DT104と同じ耐性パターン(ACSSuT)を示す12株、及びこれら5剤にPまたはN耐性が加わったACSuT+P耐性11株、及びACSSuT+N耐性5株、計28株についてフェージ型別分類を行なった。

その結果、フェージ型DT104は7株検出された。これら菌株の耐性パターンは全てACSSuT+Pの6剤耐性菌であり、その分離年は前期3株(88年2株、89年1株)、後期4株(91,93,96,99年それぞれ1株ずつ)であった。また、その他21株は全てがフェージ型NT104に分類された。

[III] PFGE 解析

143株の*S. Typhimurium*のPFGE画像を解析ソフト「フィンガープリントII」を用いて解析を行ない型別分類を行なった結果、143株は20のクラスター(n=98)と45の1菌株1PFGE型(n=45)に分類された(図1)。

1. クラスター

表2には検出されたクラスターに含まれる菌株数、その菌株の分離年、耐性数を示した。クラスターに含まれる菌株数が最も多かったのはC1で22株、次いでC2で15株、以下C3(8株)、C4, C5(7株)、C6, C7, C8, C9(4株)、C10(3株)、残りの10クラスターは含まれる株数が2株のみであった。前期のみに検出されたクラスターは7つ(C4, 12, 13, 15, 17, 19, 20)で、これらクラスターに含まれる菌株数は19であったが、このうち13(68.4%)が薬剤感受性株であった。また、4剤以上の抗生剤に耐性を示す多剤耐性菌は認められなかった。一方、後期のみ認められたクラスターは9つ(C2, 6-11, 14, 18)であった。これらクラスターに含まれる菌株数は40であった。前期に比べ特徴的なのは、これら40株のうち、25株(62.1%)が耐性を示し、うち16株は前期には全く存在しなかった4剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。残りの4クラスターは前期及び後期共に認められた。そのうちC5は7株中6株が後期にのみ認められた。さらにこれら4クラスターの菌株は後期、及び後期にのみ認められたクラスターの場合と同様に、前期(16株中8株が耐性菌(50%))に比べ後期(23株中18株(78.3%))の方が耐性菌の割合が高かった。

また全体で7株検出された*S. Typhimurium* DT104は1株を除き6株が何れかのクラスターに分類されたが、このうちの5株はC3に属してお

り前期、後期共検出された。

2. 1菌株1 PFGE 型

前期、後期併せて45株が1菌株1 PFGE 型に型別分類された(表3)。このうち前期は26株(57.8%)、後期19株(42.2%)であった。前期26株中18(69.2%)株が耐性を示したが、このうちの12株は1-3剤耐性であった。一方、後期に検出された菌株19株は全て耐性を示し、このうち11株(57.9%)は4剤以上の抗生剤に耐性を示した。また、このグループに前期に分離された1株の*S. Typhimurium* DT104が認められた。

3. 4-6剤耐性*S. Typhimurium* のクラスター及び1菌株1 PFGE 型

4-6剤耐性*S. Typhimurium* のクラスター及び1菌株1 PFGE 型を表4に示した。前期では4剤以上に耐性を示す菌株数が限られているため顕著ではないが、後期では4, 5, 及び6剤耐性を示す多剤耐性菌はそれぞれ全体の菌株数の1/2から1/3を占める1つのクラスターとその他のクラスター及び1菌株1 PFGE 型菌から構成されていることが明らかとなった。即ち、後期の4剤耐性菌ではC5が3株で、他の3つのクラスターはそれぞれ1株、1菌株1 PFGE 型が3株であった。「5剤耐性、ACSSuTパターン」菌ではC1が3株、C10が1株、1菌株1 PFGE 型が4株であった。「5剤耐性、その他パターン」ではC2が7株と多数を占め、C9が1株、1菌株1 PFGE 型が2株であった。「6剤耐性、ACSSuT+Pパターン」ではC3が4株、C1、C9がそれぞれ2, 1株であった。「6剤耐性、ACSSuT+Nパターン」ではC8が3株、1菌株1 PFGE 型が2株であった。また、後期に検出された9クラスターのうち、6つは後期のみから検出されていたが、4剤のC5クラスター(前期は感受性株1株のみ)、5剤ACSSuTのC1、及び6剤ACSSuT+PのC3は前期、後期何れからも検出された。

D. 考察

薬剤感受性試験の結果から、愛知県で後期に検出された*S. Typhimurium* は前期に比べその薬

剤耐性菌の割合が有意に高かった(後期52.3%、前期75.6%)。また、これは4から6剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加が主な原因であることが推察された。これら多剤耐性菌の耐性パターンとしては、欧米で90年代に患者、食中毒事例から多数検出され大きな問題となった*S. Typhimurium* DT104と同じ耐性パターンであるACSSuT、もしくはこれら5剤耐性パターンにPまたはNが加わった6剤耐性パターンが約半数を占めた(51.3%、20/39)。

前後期含めた28株のDT104と同じ耐性パターンの5剤及び6剤耐性菌についてファージ型別分類を行なった結果、1988年以降99年までの間に今回検出された143株のうち7株のDT104が検出され、愛知県においても80年代後半に既に*S. Typhimurium* DT104が存在していたことが明らかとなった。松下らの研究では、我々と同時期に都内在住の下痢症患者から検出された耐性菌の44.9%(44/98)が*S. Typhimurium* DT104とその検出率は高率であった。一方、我々の今回の結果からは耐性菌に占めるDT104の割合は7.4%(7/94)と非常に低かった。この原因として、松下らが検出した*S. Typhimurium* DT104は全て患者由来であったが、我々が検査した菌株の6割が主に健康保菌者であった。事実、今回検出された*S. Typhimurium* DT104の7株中6株は健康保菌者由来であった。欧米からの報告では*S. Typhimurium* DT104は患者症状が他のサルモネラに比べ重症であり死者も認められるとのことであるから、本菌は患者からより高率に検出される菌型であるのかもしれない。

後期の4剤-6剤耐性菌は9クラスターと1菌株1 PFGE 型菌から構成されていた。これら9クラスターのうち6つは後期のみから検出された。ACSSuT耐性を担っている遺伝子はひとつの遺伝子群を形成し他の菌への移動が可能な単位として存在していることはすでに知られていることから、これら6クラスター及び1菌株1 PFGE 型に属する*S. Typhimurium* は、耐性遺伝子群が複数の異なったクラスター、及びPFGE 型菌に水平伝播した結果、新たに生じた可能性が示唆された。

その他のDT104を含むC3、及びC1クラスターは前後期何れからも検出されており、前期も

しくはそれ以前に耐性遺伝子群を獲得し以降安定に存在していたものと推察される。また、C5 クラスタは両期間から検出されているが、前期の1株は感受性株であることからこの感受性株が耐性遺伝子群を獲得し、後期に多剤耐性化したことが推察される。これらのことから後期に多数検出された4剤-6剤耐性菌は、例えばDT104が属するC3クラスタのような特定のクラスタ菌が多数を占めるのではなく、複数のクラスタ及び1菌株1 PFGE型菌から構成されていることが明らかとなり、その構成は遺伝学的に複雑であることが推察された。

E. 結論

1980年から99年まで愛知県で検出された143株の*S. Typhimurium*は、後期に検出された*S. Typhimurium*では前期に比べその薬剤耐性菌の割合が高かった(後期52.3%、前期75.6%)。これは4から6剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加が主な原因であると推察された。また、*S. Typhimurium* DT104が愛知県でも88年以降7株検出された。薬剤耐性菌を含む143株についてPFGEを実施し、その画像データをデータベース化し、解析を行なったところ、後期に増加した

4-6剤耐性菌は複数のクラスタ、及び1菌株1 PFGE型菌から構成されていることが明らかとなった。この結果は、後期の多剤耐性*S. Typhimurium*の増加が複数のクラスタ、及び1菌株1 PFGE型菌への耐性遺伝子群の水平伝播がひとつの原因となった可能性を示唆している。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし

表1 S. Typhimurium の薬剤耐性パターン

分離年	供試株数	耐性株数	耐性パターン						
			1剤-3剤		4剤	5剤		6剤	
						ACSSuT	その他	ACSSuT+P	ACSSuT+N
1980-1989	61	32 (52.5%)	22 (68.8%)	1	4	1	4	0	
1990-1999	82	62 (75.6%)	23 (37.1%)	9	8	10	7	5	
	143	94	45	10	12	11	11	5	

表2 各クラスターに含まれる菌株数、その菌株の分離年、耐性数

名前	数	分離年		耐性数					
		分離年		1980-89			1990-99		
		1980-89	1990-99	感受性	1-3剤	4-6剤	感受性	1-3剤	4-6剤
C4	7	7		3	4	0			
C12	2	2		2	0	0			
C13	2	2		1	1	0			
C15	2	2		1	1	0			
C17	2	2		2	0	0			
C19	2	2		2	0	0			
C20	2	2		2	0	0			
C2	15		15				3	5	7
C6	4		4				4	0	0
C7	4		4				3	0	1
C8	4		4				1	0	3
C9	4		4				2	0	2(1)
C10	3		3				1	0	2
C11	2		2				0	2	0
C14	2		2				1	1	0
C18	2		2				0	1	1
C1	22	11	11	7	3	1	4	2	5
C3	8	3	5	0	0	3(2)	1	0	4(3)
C5	7	1	6	1	0	0	0	3	3
C16	2	1	1	0	1	0	0	1	0
	98	35	63	21	10	4(2)	20	15	28(4)

() : DT104の菌株数再掲

表3 1菌株1 PFGE型に含まれる菌株の分離年、耐性数

分離年		耐性数					
		1980-89			1990-99		
1980-89	1990-99	感受性	1-3剤	4-6剤	感受性	1-3剤	4-6剤
26	19	8	12	6(1)	0	8	11

() : DT104の菌株数再掲

表4 4剤-6剤耐性S. Typhimuriumのクラスター及び1菌株1 PFGE型

	4剤	5剤		6剤	
		ACSSUT	その他	ACSSUT+P	ACSSUT+N
1980-89	I (1)	C1 (1) I (3)	I (1)	C3 (3) ^{*(2)} I (1)	0
1990-99	C5 (3) C7 (1) C10 (1) C18 (1) I (3)	C1 (3) C10 (1) I (4)	C2 (7) C9 (1) I (2)	C3 (4) ^{*(3)} C1 (2) C9 (1) ^{*(1)}	C8 (3) I (2)

I: 1菌株1 PFGE型 () : 菌株数 *() : DT104菌株数再掲

図の説明文

図1 愛知県で検出された S. Typhimurium の PFGE 系統樹及びバンド模式図
C: クラスター