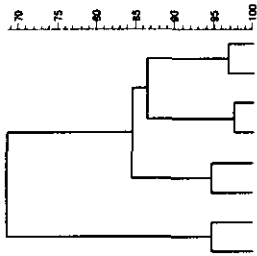
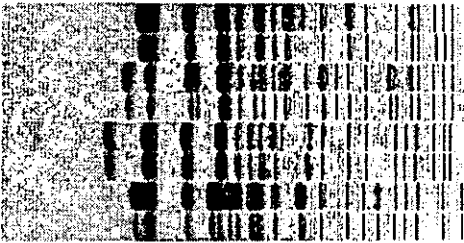


Dice (Tot 1.2%~1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%~100.0%]
FP1



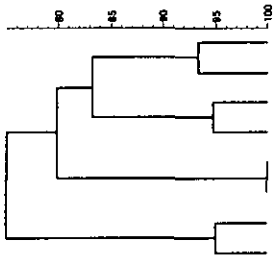
FP1



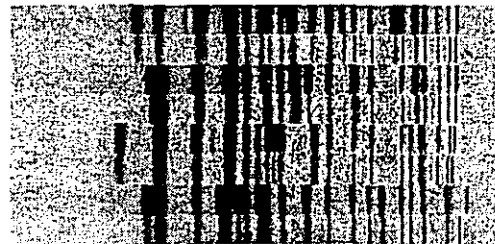
- .2 A プレート
- .2 A ブイオン
- .4 A プレート
- .4 A ブイオン
- .1 A プレート
- .1 A ブイオン
- .3 A プレート
- .3 A ブイオン

図 28 A 施設のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%~1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%~100.0%]
FP1



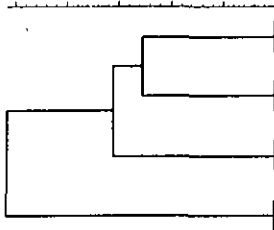
FP1



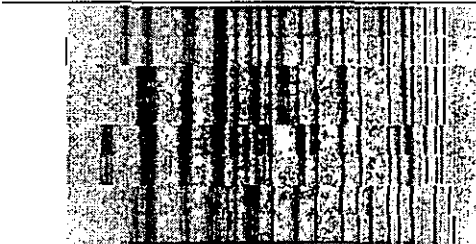
- .4 B プレート
- .4 B ブイオン
- .2 B プレート
- .2 B ブイオン
- .1 B プレート
- .1 B ブイオン
- .3 B プレート
- .3 B ブイオン

図 29 B 施設のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%~1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%~100.0%]
FP1



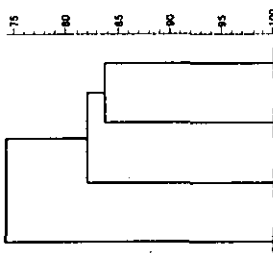
FP1



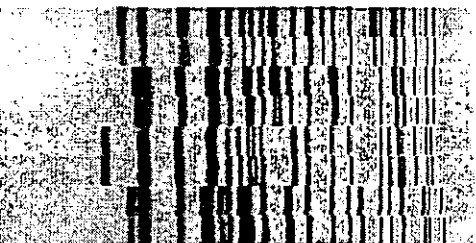
- .4 C プレート
- .4 C ブイオン
- .2 C プレート
- .2 C ブイオン
- .1 C プレート
- .1 C ブイオン
- .3 C プレート
- .3 C ブイオン

図 30 C 施設のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%~1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%~100.0%]
FP1



FP1



- 4 D プレート
- 4 D ブイオン
- 2 D プレート
- 2 D ブイオン
- 1 D プレート
- 1 D ブイオン
- 3 D プレート
- 3 D ブイオン

図 31 D 施設のデンドログラム

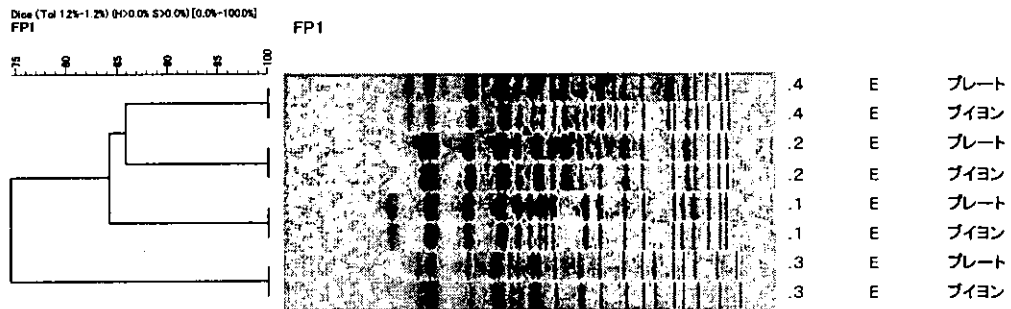


図 3 2 E 施設のデンドログラム



図 3 3 F 施設のデンドログラム

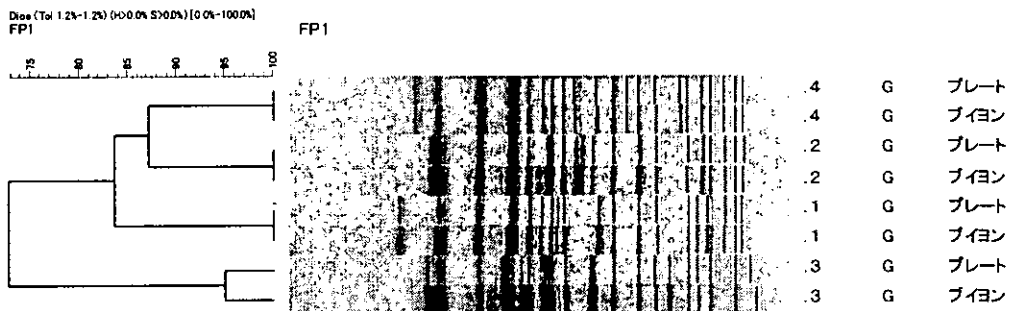


図 3 4 G 施設のデンドログラム

Salmonella Enteritidis での制限酵素別 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 像の違いと ファージタイプとの関連性について

研究協力者 高知県衛生研究所 谷脇妙 安岡富久

要旨

Salmonella Enteritidis (以下 SE とする) のパルスフィールドゲル電気泳動法 (以下 PFGE とする) での解析について、より良い結果を得るための制限酵素を検討した。また、同時にファージタイプ (以下 PT とする) との関連性も調べることにした。Bln I, Xba I, Sma I, Not I, Spe I, Sfi I の 6 種類を同じ条件で PFGE 解析を行った。Bln I, Xba I, Spe I は泳動像としては解析のできるよい結果が出たが、PT との関連性は Xba I では少し考えられたが、その他の酵素ではないように思われた。

目的

最近、当所での PFGE 法の解析結果から、SE 株のパターンに類似したものが多く見られ、また PT 別では異なるものでも PFGE のパターンが類似しているものが見られたため、より SE の解析に適した制限酵素を検討することにした。

現在、当所にある制限酵素 Bln I, Xba I, Sma I, Not I, Spe I, Sfi I (すべて Takara) の 6 種類で制限酵素処理を行い、解析を行った。

供試菌株

制限酵素 Bln I でのパターンが比較的似ていた 10 株 (平成 13 年の食中毒由来株 3 株、同年に分離された液卵及び卵由来株 4 株と散発下痢症患者由来株 3 株) を用いた (表 1)。

方法

PFGE 法は中四国パルスネットの平成 15 年度の方法に準じて行った。またマーカーは BIO-RAD の DNA Size Standard

Lambda ladder を用いた。すべてを同じ条件にするためにブロックを多めに作成し、同一ブロックを用いて制限酵素処理を行った。

PT は国立感染症研究所に依頼した。

研究結果

まず、SE について最近もっともよく用いられている制限酵素の 1 つである Bln I (図 1) ではレーン 6 の上から 2 番目と 3 番目のバンドが若干ずれて見え、レーン 2 の上から 10 番目と、レーン 5 と 6 の上から 5 番目に他では見られないバンドが見られた。デンドログラム (図 7) ではレーン 6 のみが他のレーンと大きく違っており、他は 95.6% で一致していた。Bln I のデンドログラムの結果からは PT の 14 b 型と 47 型の区別がつかなかった。

次に、Xba I (図 2) についてもレーン 6 は他のレーンとは異なっていた。デンドログラムではその他のレーンは大きく 2 つに別れた (図 8)。この 2 つは、片方のグループは PT が 47 型のみ、もう片方のグルー

ブはPT, 14b型とRDNC型が含まれていた。

Spe Iは(図3)バンドの数が23本と多かったが, 解析結果は99.9%の一致を示し, 解析が出来なかった(図9)。

Sma I(図4)では全体が48.5kb以下, Not I(図5)では242.5kb以下, Sfi I(図6)では291.0kb以下に流れ, 解析ソフトにはかけることができた(図10, 11, 12)が, バンドの間が狭く, 分かれ目が不鮮明な所があり, デンドログラムの作成でバンドの認識がしづらい箇所があった。

考察

Bln Iの結果からは, レーン6以外は95.6%の一致を示し, PFGEパターンからは同一グループであると考えられた。しかし, PTはその中に3つの型が含まれており, PFGEパターンと同じ結果にならないことが判明した。

Xba IではPTが47型だけのグループと14b型とRDNC型を含むグループの2つに別れ, 36型も異なるPFGEパターンに認識

しているため(図8), 確実ではないが少し関連性があるように思われる。

バンドの数ではSpe Iが23本と多く良かったが, 解析結果が99.9%の一致を示し分類がまったくできず(図9), 今回の結果からはSEについて適した制限酵素だとは言えなかった。

Sma I(図10), Not I(図11), Sfi I(図12)では解析ソフトにかけることはできたが, バンドが不鮮明で認識しづらい箇所があり, SEの解析には適当でないと思われる。

結論

PFGEでのSEの解析においてより良い制限酵素を見つけ, またPTとの関連性を見るために検討をしたが, どちらについても確実な結果が得られなかった。しかし, 10株と検体が少なく, また, 6種類の制限酵素しか試していないため, これから検体を増やし, 他の制限酵素についても検討していきたい。また, PTとの関連性については, 多くのデータを集め解析をしていく必要があると考えられる。

表1 供試菌株の由来とPT

レーン	由来株	PT
1	卵由来株	14b
2	液卵由来株	RDNC
3	卵由来株	47
4	卵由来株	47
5	食中毒由来株	47
6	食中毒由来株	36
7	食中毒由来株	47
8	散発下痢症由来株	47
9	散発下痢症由来株	14b
10	散発下痢症由来株	14b

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M

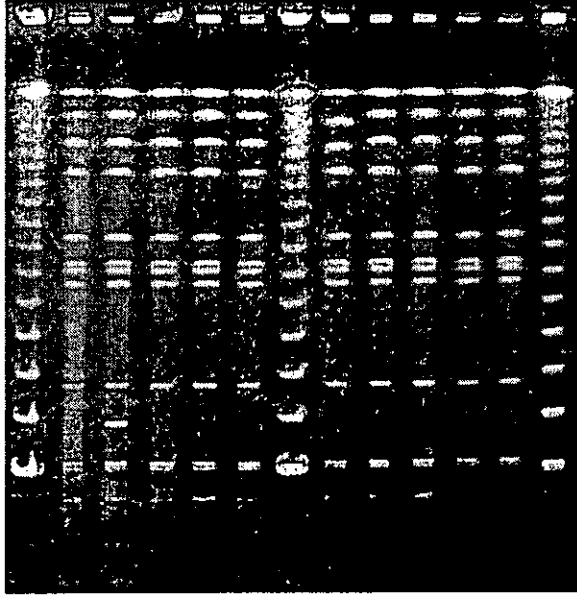


图 1 Bln I

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M

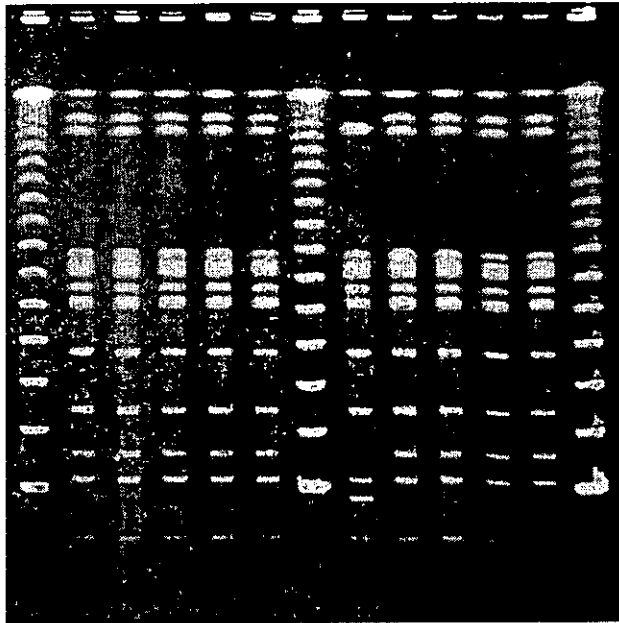


图 2 Xba I

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M

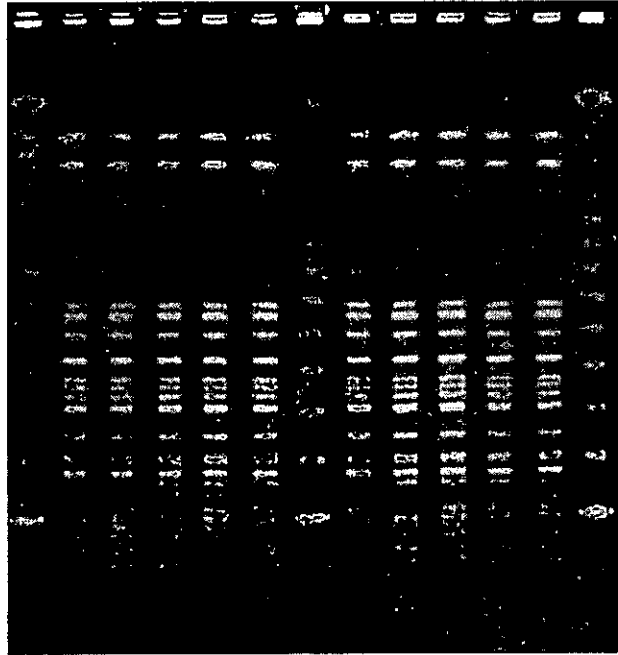


图3 Spe I

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M

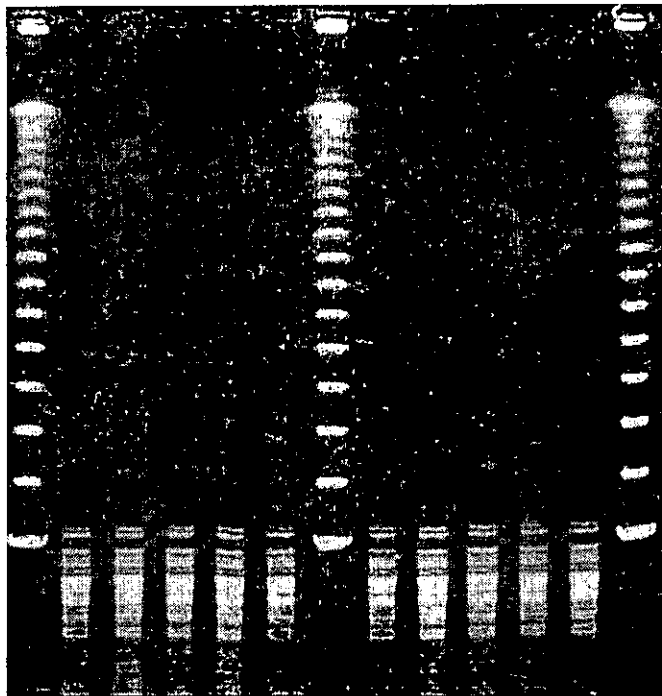


图4 Sma I

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M

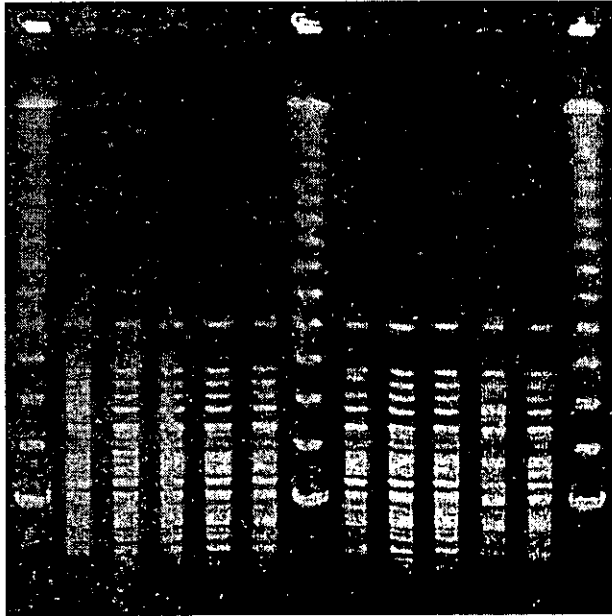


图5 Not I

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M

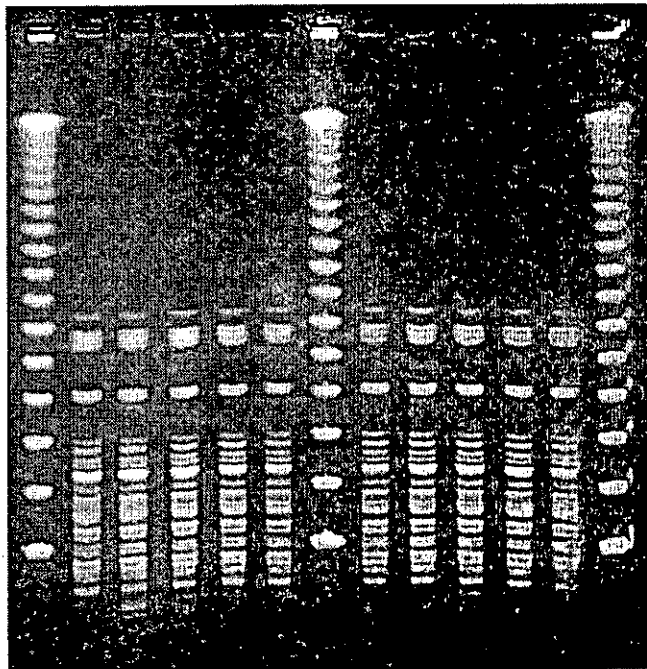


图6 Sfi I

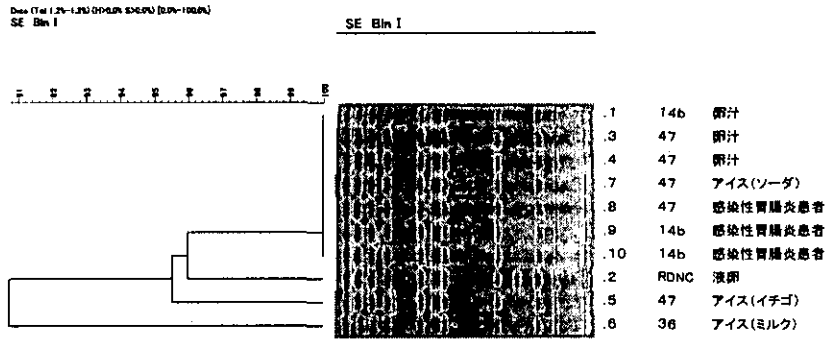


図7 Bln I のデンドログラム

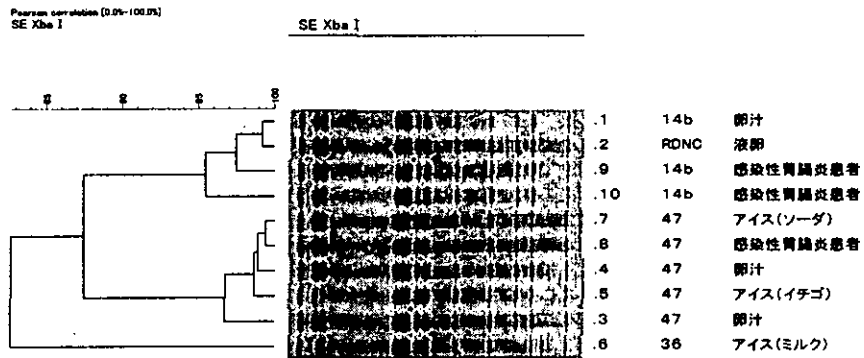


図8 Xba I のデンドログラム

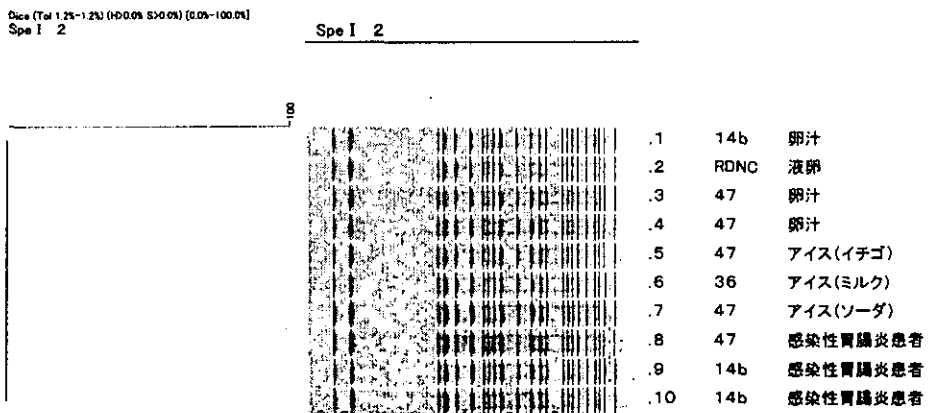


図9 Spe I のデンドログラム

Dise (Tot: 1.2%~1.2%) (0.000%~0.000%) (0.0%~100.0%)
SE Sma I

SE Sma I

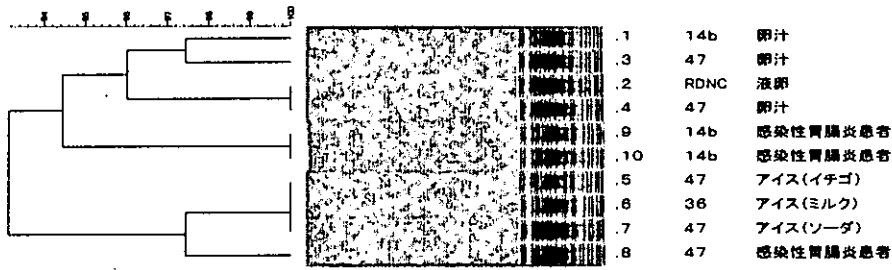


図 10 Sma I のデンドログラム

Dise (Tot: 1.2%~1.2%) (0.000%~0.000%) (0.0%~100.0%)
SE Not I

SE Not I

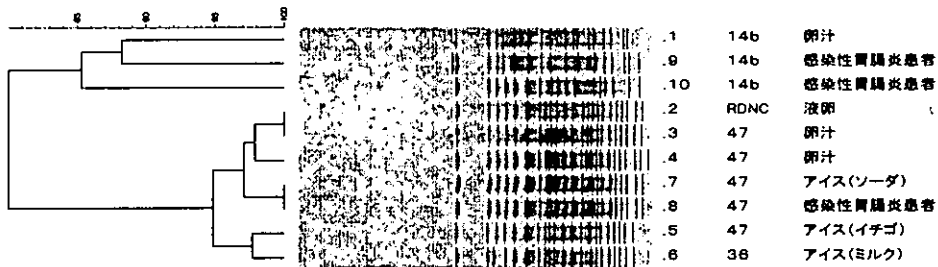


図 11 Not I のデンドログラム

Dise (Tot: 1.2%~1.2%) (0.000%~0.000%) (0.0%~100.0%)
Sfi I

Sfi I

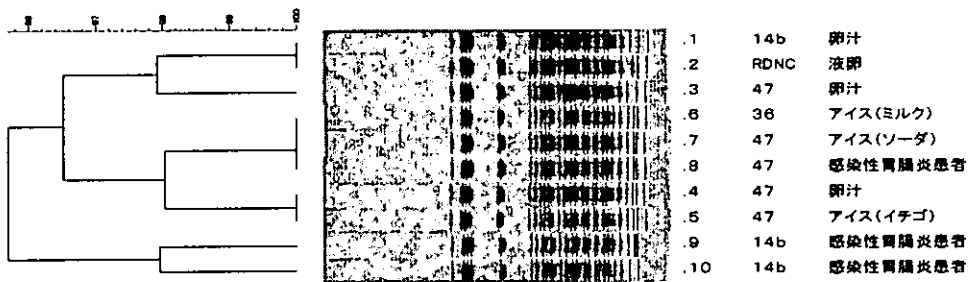


図 12 Sfi I のデンドログラム

同一遺伝子型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来菌株の疫学 マーカーによる相同性の検討

共同研究者 河本秀一, 橋渡佳子
共同研究者 榊美代子, 妹尾正登

広島市衛生研究所
広島県保健環境センター

研究要旨

2003年9月下旬から10月上旬にかけて、同一遺伝子型(IIa,ND,I)の腸管出血性大腸菌(STEC)O157:H7感染症8事例が広島・山口県内各地で発生した。同時期に発生した異なる遺伝子型事例由来株も加え、同一遺伝子型事例株の相同性を薬剤感受性試験、プラスミド解析等により検討した。

広島県内2市1町の散発3事例(家族内事例を含む)6株および山口県内3市での散発4事例4株の*Xba*I, *Bln*IによるPFGEパターンは一致した。この同一パターングループ事例株と同じ遺伝子型である広島市集団事例株とのデンドログラムの解析による相似度は*Xba*Iで約93%, *Bln*Iで約88%と相同性は低く、系統の異なる株と考えられた。同一パターングループ事例10株の12薬剤に対する感受性試験では、東広島市の家庭内事例4株中1株および光市の散発事例1株はTC,AM,STX,TMP耐性を示し、巨大プラスミドを付加していた。耐性菌が地域的に離れた患者から分離されたことから、同一パターングループ事例の患者はプラスミド付加株または非付加株により感染したものと推測された。付加されたプラスミドにより、DNA濃度の高いプラグを用いる従来法では明らかなバンドの変化を認めたが、今回提案されたPFGE New Protocolによる0.7mm厚プラグでのPFGEでは、デンドログラム解析に影響しなかった。

パルスネット等により同一遺伝子型の菌株情報を得た場合、単独地方衛生研究所のみでなく関連する地方衛生研究所間で分離菌株の疫学マーカー試験等を加えることで、より精度の高い疫学調査が可能となると考えられた。

A. 研究目的

広域食中毒事例等の迅速対応を目的とし、各地方衛生研究所(地研)の分離菌を国立感染症研究所(感染研)に収集してPFGE解析するシステム(パルスネット)の構築が進み、自治体をまたぐ分散型集団事例(diffuse outbreak)の把握に効果をあげている。

PFGE解析に加えて他の疫学マーカーを併用すれば、菌株間の類似性をより詳細に検討することができる。

2003年9月下旬から10月上旬かけて広島県および山口県で発生したSTEC O157:H7感染事例において広島県内3事例6株と山口県内4事例4株が同一遺伝子型を示した。同時期に広島市内でも予備校寮で集団事例が発生したが、各事例間の関連性は不明であった。

これらの事例からの分離株の相同性を検証することを目的に、同時期に発生した他の遺伝子型事例を含め、関連の地研から分離株を収集して、PFGE解析に加えて薬剤感受性等の疫学マーカー

の追加試験を行い、その有用性を検討した。

B. 研究方法

供試菌株は、2003年9月下旬から11月中旬に発生した広島市内1集団事例10株、広島県内1家族内事例4株、広島県内2散発事例2株、山口県内6散発事例6株、島根県内1散発事例1株の計11事例23株のO157:H7(*stx1, stx2*)を用いた。

PFGEの一部は、プラグ調製にディスポーザブルプラグモードを用いた従来法で実施したが、デンドログラム解析でのPFGEには感染研の示したPFGE New Protocol(以下、新PFGE法)に準じて実施した。即ち、TSBで37°C、1夜静置培養した菌液200μlを12000rpm、5分間遠沈後、沈渣を滅菌蒸留水200μlに懸濁して等量の1%Seakem® Gold agaroseを加え、サンプルプラグキャストを用いて厚み0.7mmのプラグを調製した。1%N-lauryoylsarcosine加1mg/ml proteinase K処理は50°Cで4~6時間、4mM Pefablok SC加TEでの洗浄は50°Cで30分間2回、TE洗浄は氷上で30

分間 1 回とした。制限酵素処理は *Xba* I で 30unit/sample, *Bln* I で 50unit/sample とし, 37°C, 18~20 時間処理した。泳動装置は GenePath system を使用し, ゲルには 1%Seakem®Gold agarose, 泳動バッファーは 0.5×TBE を用いた。電圧 6.0V/cm, パルスタイム 2.2-54.2s (linear ramp), 水温 12°C の条件で 19 時間泳動後, 0.5 μg/ml ethidium bromide で染色して写真撮影した。PFGE 画像は画像解析ソフト (Fingerprinting II) を用いて解析した。

薬剤感受性試験は SM, KM, TC, ABPC, NA, CP, CIP, CTX, SXT, TMP, GM, FOM の 12 薬剤についてセンシテスク (BBL) を用いて National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 法に準拠し, 1 濃度ディスク法で行った。

Plasmid 抽出は, Kado らの方法に準じて行った。即ち, L broth で 37°C, 1 夜振盪培養の菌液 1.5ml を 12000rpm, 5 分間遠沈後, 沈渣を TE 100 μl に懸濁し, 200 μl のアルカリ SDS 液を加えて 55°C, 10 分間加温して溶菌させた。300 μl のフェノール・クロロホルム (1:1) を加え, チューブを上下に 50 回程度激しく振盪させた後, 14000rpm, 20 分間遠心して plasmid 抽出上清を採取した。抽出上清 25 μl を 0.7%Seakem®Gold agarose で定電流 50mA, 3 時間泳動後, 0.5 μg/ml ethidium bromide で染色して写真撮影した。

C. 研究結果

1 EHEC O157:H7 (*stx1, stx2*) 感染事例 (表 1)

(1) 広島市内集団感染事例 (事例 1)

広島市東区の予備校寮 (寮生 206 名) で寮生 8 名が 2003 年 10 月 4 日から 14 日にかけて食中毒様症状を呈した。寮生 10 名 (患者 8 名, 無症者 2 名) から O157:H7 を分離したが, 検食, 給食従事者, 寮母等からは分離しなかった。

患者間の交流はなく, 共通食も見つからず感染原因は不明であった。分離株 10 株の感染研による遺伝子型は II a, ND, I であった。

(2) 広島県内および山口県内感染事例

(事例 2~10)

東広島市で 2003 年 10 月 1 日に 1 歳の女兒が O157:H7 により発症した。続いて 10 月 6 日, 13 日に家族 2 名が発症した。これらの患者および無症状の家族 1 名から同菌を分離した。家族の感染は女兒からの 2 次感染によると考えられた (事例 2)。10 月 5 日に福山市で 1 名 (事例 3), 10 月 6 日

に大和町で 1 名 (事例 4) が O157:H7 により発症した。これら 3 事例 6 株の感染研遺伝子型は II a, ND, I で, かつ同一泳動パターンであった。山口県内では, 9 月 30 日に光市で 1 名 (事例 5), 10 月 8 日に周南市と下松市で各 1 名 (事例 6, 8), 10 月 9 日に下松市で 1 名 (事例 7) が O157:H7 により発症した。これらの 4 事例 4 株の感染研遺伝子型も II a, ND, I で, 同一泳動パターンであった。そのパターンは予備校寮事例株と異なったが, 広島県内の 3 事例 (事例 2, 3, 4) 株と一致した。

いずれの事例も原因食品は不明であり, 患者間の接触機会もなく感染源を追求できなかった。

10 月 15 日, 28 日に山口市, 徳地町で各 1 名 (事例 9, 10) が O157:H7 により発症した。分離菌株の感染研遺伝子型は II a, II c, I で 10 月上旬の事例株遺伝子型と異なっていた。

(3) 島根県内感染事例 (事例 11)

11 月 14 日に広島市から島根県に帰省した 1 名が, 帰省当日に O157:H7 により発症した。感染研遺伝子型は ND, ND, ND であった。患者は 3 日前に広島市内で牛のレバ刺しを喫食していたが, 他に患者の発生はなく, 因果関係は不明であった。

2 PFGE 解析 (図 1, 図 2)

図 1 に *Xba* I による PFGE デンドログラムを示した。事例 1 の II a, ND, I 型広島市内集団事例の 10 株は相似度約 98% の 1 株を除き, 同じパターンであった。

事例 2 から事例 8 の II a, ND, I 型同一パターン事例株は, 広島市内集団事例株との相似度約 93% であり, 100~200Kb 部位におけるバンド泳動像が異なっていた。山口県内発生の II a, II c, I 型事例の事例 9 由来株とは相似度約 93%, 事例 10 由来株とは相似度約 95% であった。

11 月中旬に発生した事例 11 の島根県内 ND, ND, N 型事例株は, II a, ND, I 型事例株および II a, II c, I 型事例株と約 84% の低い相似度であった。

図 2 に *Bln* I による PFGE デンドログラムを示した。広島市内集団事例株は, 3 株が相似度約 97% で, 他の 7 株が同じパターンであった。

II a, ND, I 型同一パターン株は, 広島市内集団発生事例株との相似度が約 88% で *Xba* I の相似度より低く, 泳動像の違いも明らかであった。II a, II c, I 型の事例 9 由来株とは相似度約 94%, 事例 10 由来株とは相似度約 90% であった。

事例 11 の島根県内事例は、II a,ND, I 型同一パターン事例株との相似度約 96%, 広島市集団事例株との相似度約 88% であり, II a, II c, I 型の山口県内事例の事例 9 由来株と相似度約 97%, 事例 10 由来株と相似度約 90% であった。

II a,ND, I 型同一パターン事例株と他の事例株との相似度は使用する制限酵素で異なり, 特に広島市内集団事例株が *Bln* I で, ND, ND,ND 型事例 11 由来株が *Xba* I で 90% を下回る低い相似度を示した。

3 薬剤感受性試験(表 2)

表 2 に 12 薬剤の感受性試験結果を示した。事例 1 の II a,ND, I 型広島市集団事例 10 株は 12 薬剤感受性であった。

II a,ND, I 型同一パターングループ事例では, 事例 2 の東広島市家族内事例での 10 月 1 日に発症した 1 歳の女兒からの分離株および事例 5 の 9 月 30 日発症の光市内散発事例の 2 株のみが TC,AM,SXT,TMP の 4 剤耐性であり, それ以降に分離した 6 事例 8 株は 12 薬剤感受性であった。

同じ II a, II c, I 型の山口県 2 事例 2 株は, 事例 9 由来株が 12 薬剤感受性, 事例 10 由来株が AM 耐性で異なる薬剤耐性を示した。事例 11 の ND,ND,ND 型島根県内事例 1 株は SM,TC,CP の 3 剤耐性で, 他のいずれの事例分離株とも異なっていた。

4 プラスミド解析(図 3, 4)

図 3 に II a,ND, I 型同一パターングループ事例の東広島市家族内事例(事例 2)4 株と山口県内 4 事例(事例 5,6,7,8)4 株のプラスミド泳動パターンを示した。8 株は共通の 1 本の巨大プラスミドを保有していた。TC,AM,SXT,TMP 耐性の東広島市家族内事例株(事例 2, レーン 11)と光市内事例株(事例 5, レーン 17)の 2 株は共通プラスミドに加えて, より分子量の大きな巨大プラスミドを 1 本保有していた。

図 4 に上記 8 株のプラスミド抽出上清を制限酵素未処理で泳動した PFGE パターンを示した。共通プラスミドのバンドは 452.7Kbp 付近に位置し, TC,AM,SXT,TMP 耐性 2 株の付加されたプラスミドバンドは少し高分子量側に位置していた。

5 プラスミドの PFGE パターンへの影響

(1) 従来法での影響(図 5, 図 6)

ディスパーザブルプラグモードを用いた従来法での東広島市家族内事例 4 株とそのプラスミド抽出上清の PFGE パターンを図 5, 図 6 に示した。*Xba* I 処理では, プラスミド抽出上清は 97.0Kb 以下に 2 本の共通バンドがみられた。4 剤耐性株(レーン 11)は 97.0Kb の上に 1 本加わり 3 本のバンドを有し, 菌株での PFGE パターンにもほぼ同じ位置にバンドが出現した。*Bln* I 処理では, 97.0Kb のやや高分子量位置に 1 本の共通バンドがみられた。4 剤耐性株(レーン 11)は 48.5Kb 以下に 2 本加わり 3 本のバンドを有し, 菌株での PFGE パターンにも 48.5Kb 以下に 2 本のバンドが出現した。

(2) 新 PFGE 法での影響(図 7, 図 8)

同一薬剤耐性の東広島市家族内事例(菌株 11)と光市内事例株(菌株 17)の 2 株について, 0.7mm プラグを用いた新 PFGE 法により菌濃度を通常の 0.5 倍から 3 倍とし, 制限酵素無処理で泳動した PFGE パターンを図 7 に示した。いずれの濃度でも巨大プラスミドの位置する 452.7Kb 付近にバンドは出現しなかった。

図 8 に東広島市家族内事例(事例 2)4 株と山口県内 4 事例(事例 5,6,7,8)4 株の通常菌濃度プラグでの *Xba* I, *Bln* I の PFGE パターンを示した。レーン 11 と 17 の 4 剤耐性 2 株のパターンは, *Xba* I では感受性株と同一のパターンを示した。*Bln* I では, 54.7Kbp と 33.3Kbp 間に発色度の強いバンドが出現した。

D. 考察

国内各地で発生した STEC 感染症の分離菌株を感染研に収集し PFGE 解析するシステム「パルスネット」が diffuse outbreak の把握に効果をあげている。広島・山口県で, 2003 年 9 月下旬から 10 月上旬に発生した STEC O157:H7(*stx1, stx2*)感染症 6 事例(家族内 1 事例を含む)10 株が同一 PFGE パターンを示したとの情報を得た。同時期に広島市内でも同じ遺伝子型 II a,ND, I 型の集団感染症が発生した。患者発生地は山陽自動車道沿いにあり, 物流時間では極めて近隣の地区であることから, 共通した暴露原因があったものと思われたが, 各事例間の関連性は不明であった。

より詳細な情報を得るため, この期間に関連の地研で分離した O157:H7(*stx1, stx2*)11 事例 23 株について, PFGE 解析とともに薬剤感受性試験, プラスミド解析を加えた疫学的解析を行った。

Xba I, *Bln* I でのデンドログラムによる PFGE 解

析では、II a, ND, I 型広島市内集団事例 10 株中 2 株が相似度約 98%と約 97%で異なったパターンを示したが、目視により部分消化と考えられたので同一由来菌による事例と判定した。広島市内集団事例株と II a, ND, I 型同一パターングループ事例株との相似度は *Bln* I で約 88%と低く、由来の異なる菌株による事例であると考えられた。

II a, II c, I 型山口県内事例 2 株および ND, ND, ND 型の島根県内事例 1 株も同様に相似度、目視によるバンド差数からそれぞれ個別の由来の菌株による事例であると判断できた。

Xba I と *Bln* I での 2 種類の制限酵素の使用による解析は、II a, ND, I 型同一パターングループ事例株と他事例株との異同の判定を容易にした。

薬剤感受性試験は、PFGE 解析結果をより詳細に分類することが出来た。II a, ND, I 型同一パターングループの東広島市家族内事例 03064 株と光市散発事例 03074 株の 2 株は TC, AM, STX, TMP の 4 剤耐性であり、感受性菌と異なり STEC O157H7 に共通と思われる巨大プラスミド、2Kb プラスミドのほかに、もう 1 本の巨大プラスミドを保有していた。同じ感受性を示す耐性菌が地域的に離れた患者から分離されていることから、感染源としては同一系統から派生した薬剤耐性菌と感受性菌の 2 種類が存在し、散発事例ではどちらかの菌に感染したものと考えられた。家族内事例では、初発患者が耐性菌に感染した後、二次感染の過程で耐性因子が脱落した結果、家族から感受性菌を分離したものと考えられた。今回は、患者あたり 1 株のみの試験であるが、複数株の試験をすることで、

より詳細な情報が得られるものと思われた。

プラスミドの PFGE パターンへの影響は、ディスプレイブルプラグモードを用いた従来法によるパターンで、*Xba* I, *Bln* I とともにプラスミド DNA 断片と思われるバンドが出現した。一方、0.7mm プラグを用いた新 PFGE 法では、*Xba* I で耐性菌と感受性菌の PFGE パターンは変わらずプラスミドの影響は無かった。*Bln* I では、発色の強いバンドが 54.7Kb 以下の位置に出現しており、プラスミド DNA 断片のバンドが重なったものと考えられた。今回の解析ではプラスミドの泳動像がデンドログラムの相似度に影響を与えるものではなかったが、プラグの菌濃度により PFGE パターンに影響を与える場合があり、デンドログラム解析に加えて薬剤感受性試験等を参考した目視による解析が必要と考えられた。

E. 結論

パルスネットから複数の散発事例分離株が同一 PFGE パターンを示すとの情報を受け、関連した分離菌株について、薬剤感受性試験、プラスミド解析等の疫学マーカーによる試験を行った結果、各事例由来株をより詳細に解析することができた。

近隣地研間での速やかな情報交換を行うとともに、発生状況に応じた追加試験等を実施することが、diffuse outbreak の探知と感染源追求に必要である。

F. 研究発表

なし

表1 2003年(平成15年)9月下旬から11月中旬に発生したO157:H7(stx1, stx2)感染症

菌株No	事例	発生場所	性別	年齢	発症年月日	パルスネット	
						遺伝子型	コメント
1 03054	31596 事例1	広島市	M	19	無症者	II a, ND, I	
2 03055	31597		M	19	031007	II a, ND, I	
3 03056	31598		M	20	031009	II a, ND, I	
4 03057	31599		M	18	031006	II a, ND, I	
5 03058	31600		M	19	031006	II a, ND, I	
6 03059	31601		M	19	無症者	II a, ND, I	
7 03060	31602		M	18	031007	II a, ND, I	
8 03061	31603		F	18	031004	II a, ND, I	
9 03062	31604		M	21	031009	II a, ND, I	
10 03063	31605		M	19	031014	II a, ND, I	
11 03064	31495 事例2	東広島市	F	1	031001	II a, ND, I	
12 03065	31496		M	24	031013	II a, ND, I	same as 1495
13 03066	31497		F	23	無症者	II a, ND, I	"
14 03067	31498		F	3	031006	II a, ND, I	"
15 03069	31499 事例3	福山市	M	39	031005	II a, ND, I	"
16 03070	31500 事例4	大和町	M	13	031006	II a, ND, I	"
17 03074	31459 事例5	光市	M	9	030930	II a, ND, I	
18 03076	31461 事例6	周南市	M	11	031008	II a, ND, I	same as 1459
19 03077	31462 事例7	下松市	F	17	031009	II a, ND, I	"
20 03078	31463 事例8	下松市	F	18	031008	II a, ND, I	"
21 03079	31745 事例9	山口市	F	7	031015	II a, II c, I	
22 03081	31747 事例10	徳地町	F	2	031028	II a, ND, I	
23 03073	40158 事例11	島根(広島市)	M	30	031114	ND, ND, ND	

表2 各事例分離株の薬剤感受性試験

菌株No	事例	発生場所	薬剤感受性											
			SM	KM	TC	AM	NA	CP	CIP	CTX	SXT	TMP	GM	FOM
1 03054	事例1	広島市	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
2 03055			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
3 03056			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
4 03057			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
5 03058			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
6 03059			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
7 03060			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
8 03061			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
9 03062			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
10 03063			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
11 03064	事例2	東広島市	s	s	R	R	s	s	s	s	R	R	s	s
12 03065			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
13 03066			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
14 03067			s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
15 03069	事例3	福山市	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
16 03070	事例4	大和町	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
17 03074	事例5	光市	s	s	R	R	s	s	s	s	R	R	s	s
18 03076	事例6	周南市	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
19 03077	事例7	下松市	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
20 03078	事例8	下松市	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
21 03079	事例9	山口市	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
22 03081	事例10	徳地町	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s
23 03073	事例11	島根(広島市)	R	s	R	s	s	R	s	s	s	s	s	s

s:感受性 R:耐性

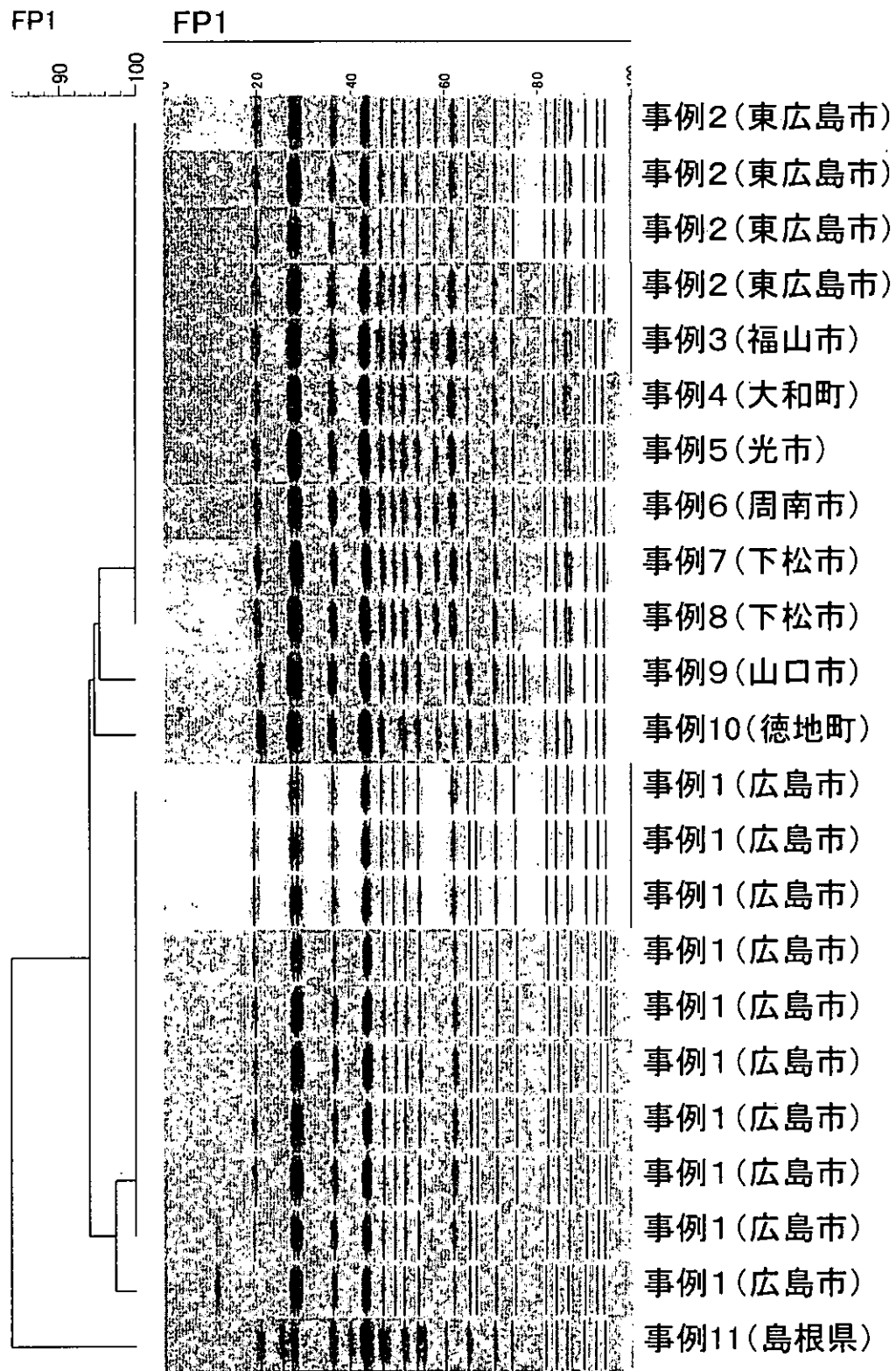


図1 *Xba* I によるPFGEデンドログラム

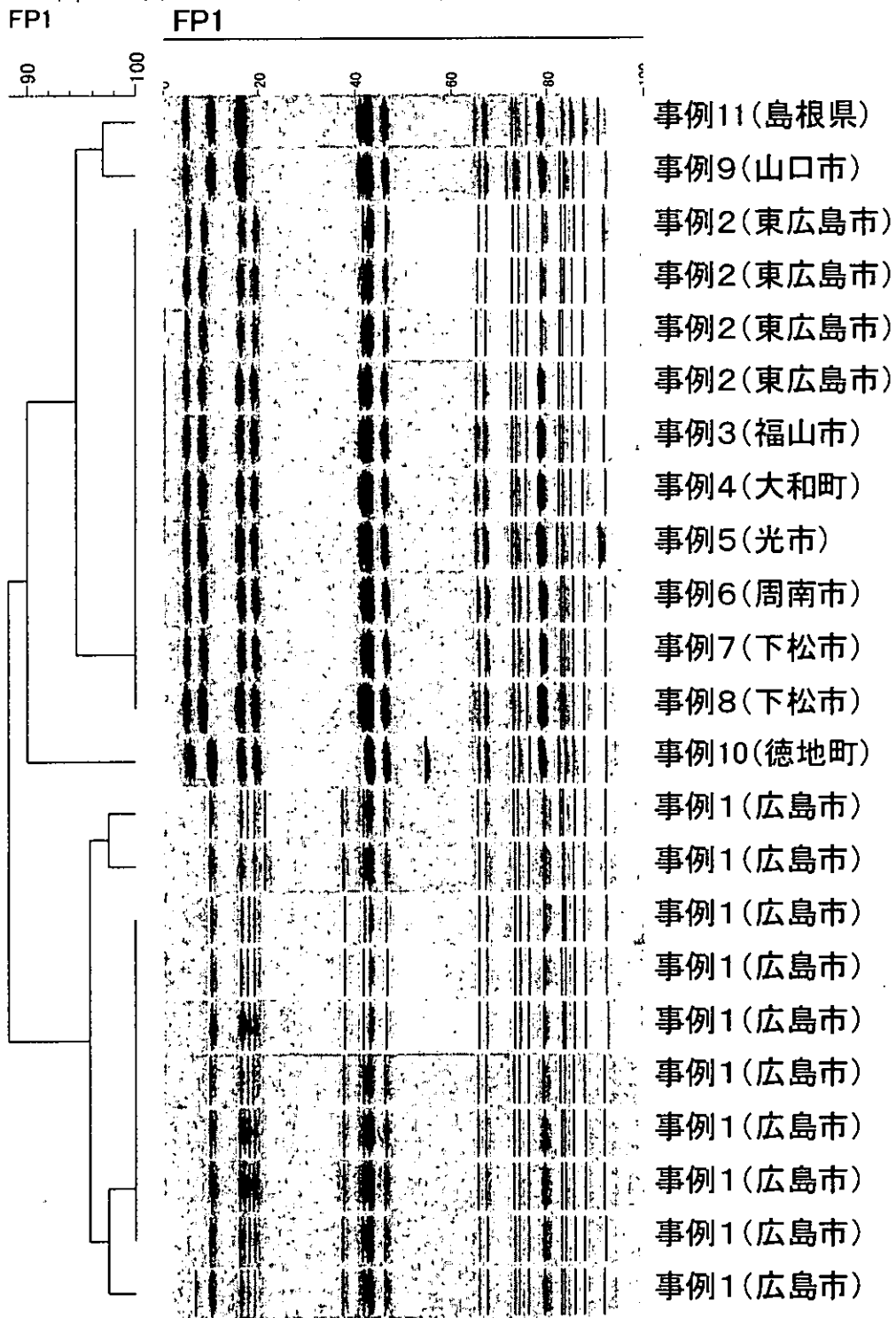


図2 *Bln I* によるPFGEデンドログラム

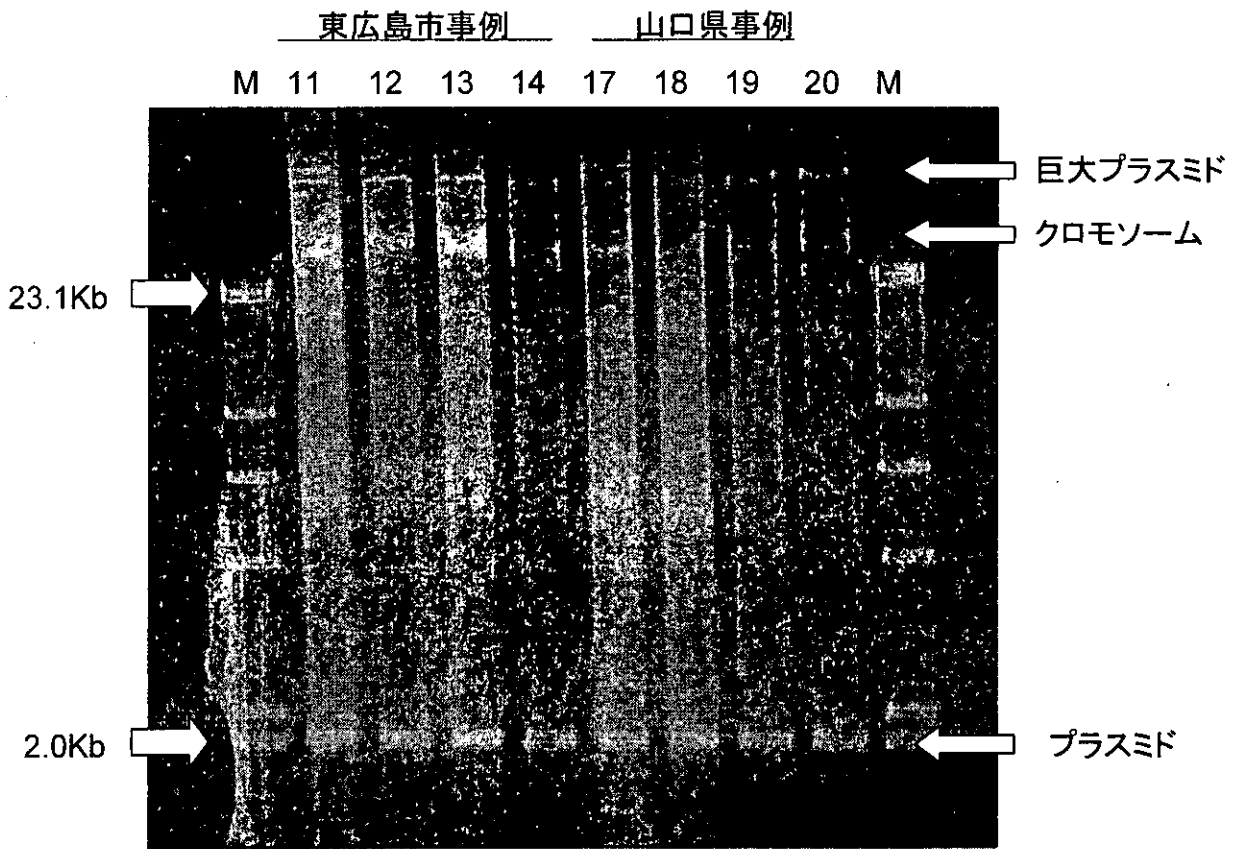


図3. 東広島市事例と山口県事例のプラスミドパターン

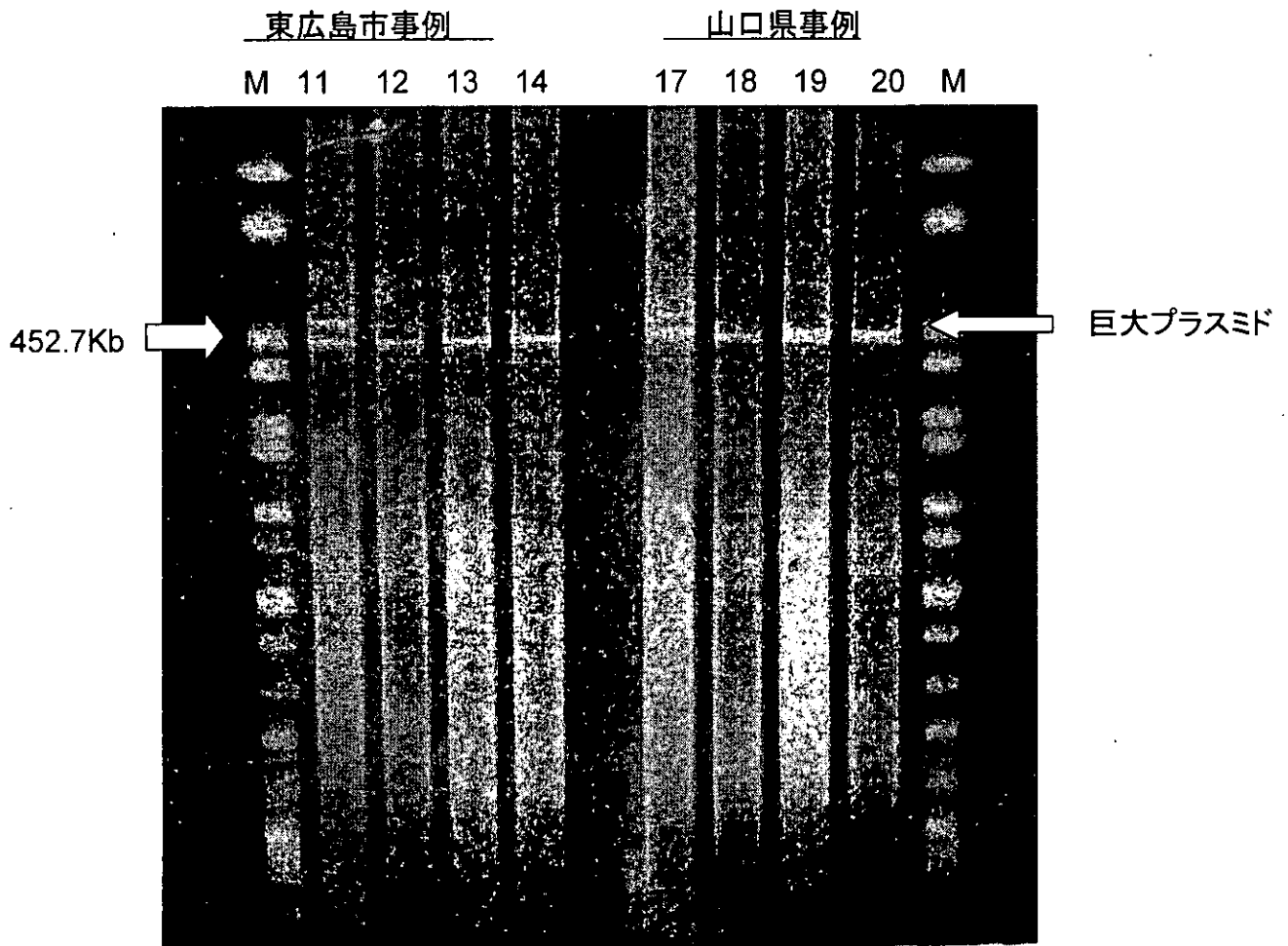


図4 東広島市事例と山口県事例のプラスミド抽出上清
制限酵素無処理PFGEパターン

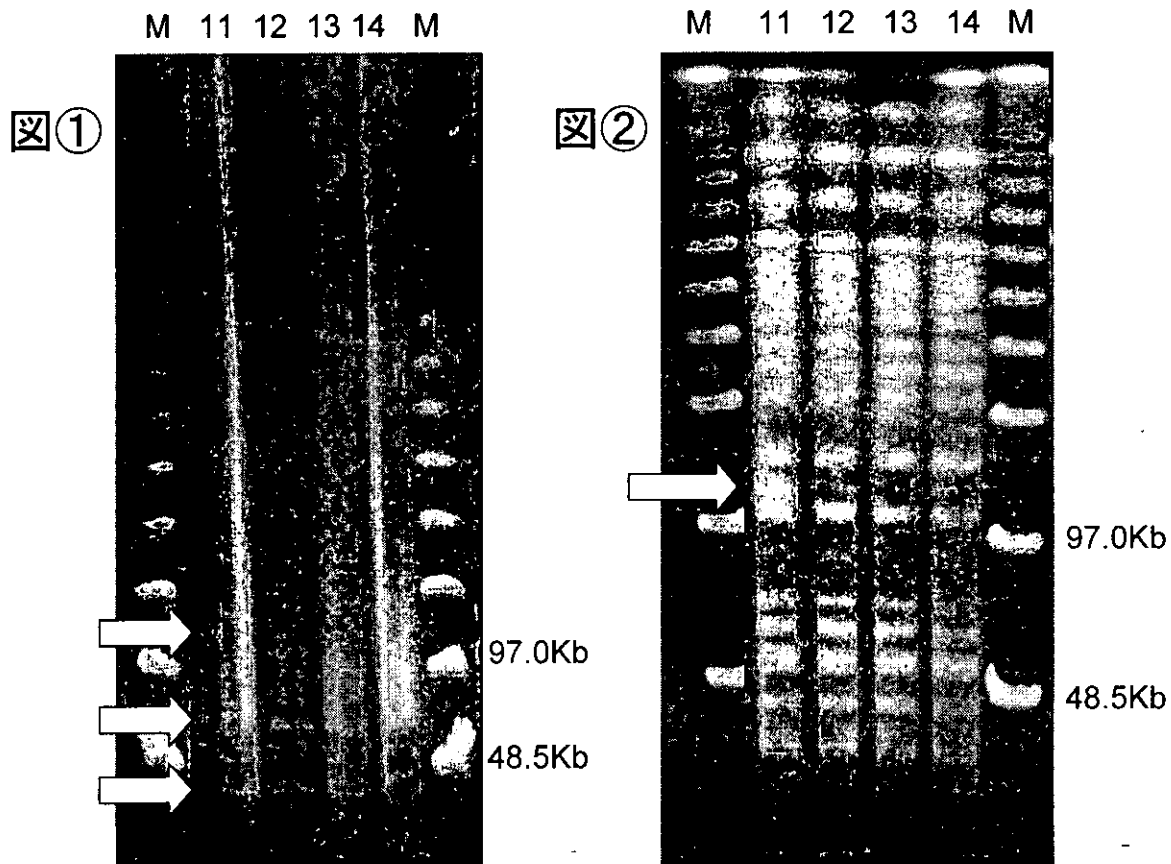


図5 東広島市事例のXba I によるPFGEパターン(従来法)
 (図①: プラスミド抽出上清 図②: 分離菌DNA)

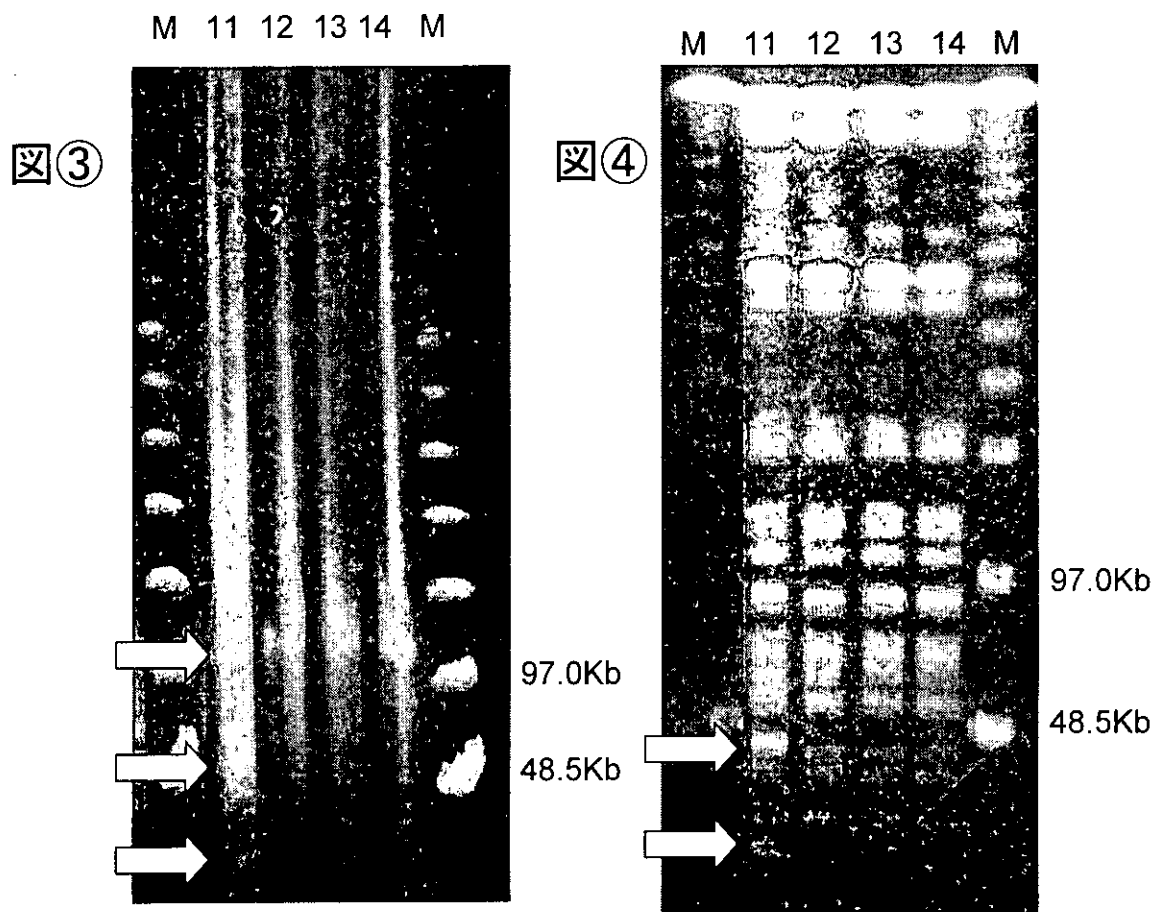


図6 東広島事例のBln I によるPFGEパターン(従来法)
 (図③: プラスミド抽出上清 図④: 分離菌DNA)

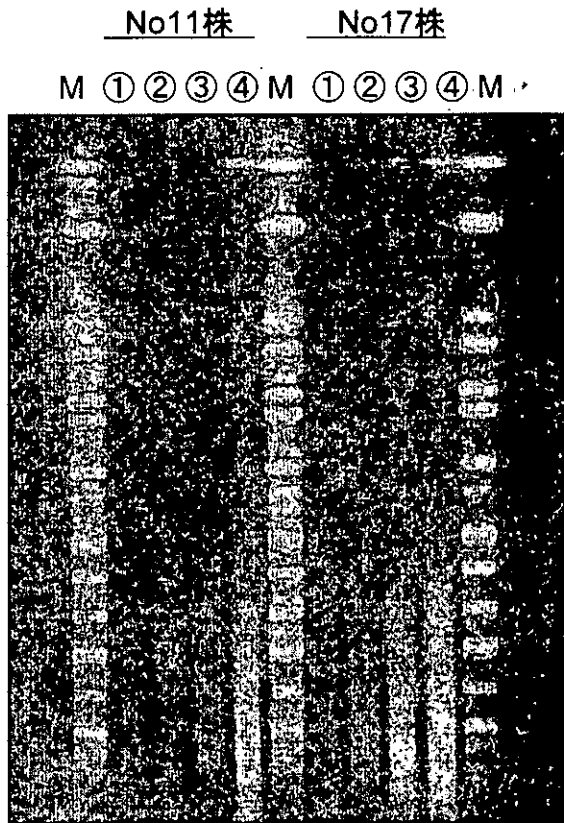
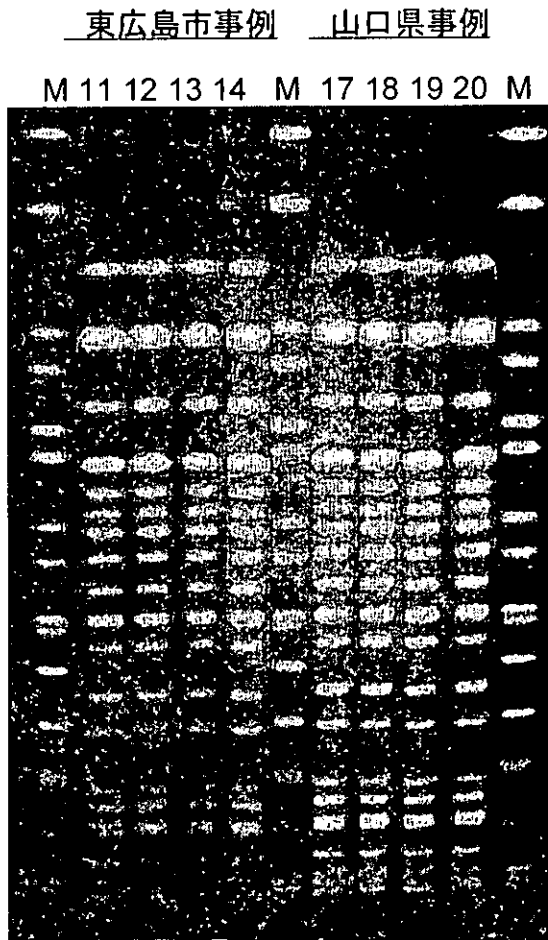
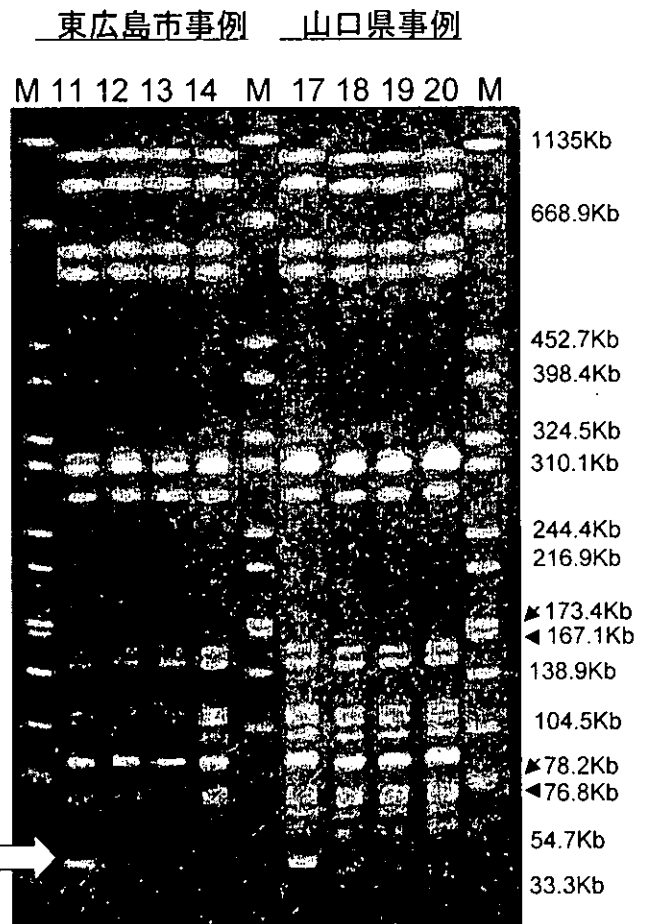


図7 薬剤耐性株の制限酵素未処理 PFGEパターン

- ① 100 μ l菌液プラグ
- ② 200 μ l菌液プラグ(標準)
- ③ 400 μ l菌液プラグ
- ④ 600 μ l菌液プラグ



図①



図②

図8 東広島市事例と山口県事例の新PFGE法によるパターン

(図①: *Xba* I 処理 図②: *Bln* I 処理)

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

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み

— 研修と精度管理 —

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	福岡市保健環境研究所	藤田 景清	北九州市環境科学研究所
隈元 星子	佐賀県衛生薬業センター	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
海部 春樹	長崎市保健環境試験所	荒平 雄二	熊本県保健環境科学研究所
丸住 美都里	熊本市環境総合研究所	緒方 喜代子	大分県衛生環境研究センター
中山 浩一郎	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 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により九州地区における食品由来感染症の拡大防止・防止にむかため、平成 15 年度は新規パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)の習得並びに精度管理を行なった。新規 PFGE 法と従来法との違いは大きく、①結果が最大 2 日早く得られる迅速法である事及び②画像の比較に使用するマーカーを *Salmonella* Braenderup H9812 株を用い自作する点、③菌体包埋用アガロース及び泳動用アガロースの変更、④泳動条件の変更の 4 点である。新規 PFGE 法を用いた精度管理を行なった結果、*S. Braenderup* H9812 株のアガロースで包埋した DNA の分離度が施設により異なり PFGE 画像の相互比較が困難であった。今後分離度の違いに及ぼす問題点を明確化し、改善する予定である。また、PFGE 泳動像の写真撮影方法やデジタル画像の保存方法等についてもマニュアル化が必要であると考えられた。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動法(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、平成 12-14 年度に地方衛生研究所(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)構築の準備がなされた。さらに、食中毒のグローバル化により全世界的規模な PFGE ネットワーク作りのため、これまで本邦で実施していた方法から米国 CDC の方法に平成 16 年から変更することとなった。そこで、九州地区では、平成 15 年 11 月に新規 PFGE 法の研修会(図 1)を実施すると共に平成 12 年から使用している O157 標準株 5 株を用いて精度管理を行

ない、新 PFGE 法でのパルスネット構築について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

PFGE の標準菌株として、感染研から分与された腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 5 株(表 1)を使用した。

表 1. 精度管理に使用した標準菌株

番号	分離年	分離府県	市・町	VT型	<100kb	100-350kb	>350kb
1	1996	広島県	東城町	1+2	I a	I	I
2	1996	大阪府	堺市	1+2	II a	II b	I
3	1998	宮崎県	宮崎市	1+2	II b	II b	I
4	1997	埼玉県	上尾市	2	III a	ND	ND
5	1994	神奈川県	記載なし	2	III b	ND	III