

2. PFGE 方法

PFGE 方法は、図 2 に示す方法で実施した。図 2 は感染症研究所から配布された方法を基に各手技について注意点を加え作成した。新法と旧法との相違点は、大きく次の 8 点であった。① λ-マーカから *S. Braenderup* H9812 株を用いた自作マーカを使用する(図 3)。② リゾチーム処理が無い。③ 各段階の処理時間が短縮されている。④ 菌体包埋用及び泳動用アガロース SeaKem Gold(販売元: TaKaRa, 製造元: Cambrex 社)を使用する。⑤ プラグ作製用 Sample Plug Caster, 0.7 mm (Bio-Rad, cat. GLX8910106)を使用する。⑥ プラグの装填方法がコーム貼り付け法となった。⑦ PFGE 泳動条件の変更, ⑧ 泳動時間が 20 時間となった。

新規 PFGE 法に対応するため、平成 15 年 11 月 6 日及び 7 日に研修会(図 1)を行なった。また、当日 *S. Braenderup* H9812 株(図 3)及び SeaKem Gold を各地研に配布した。Sample Plug Caster, 0.7 mm は平成 14 年度に取り組んでいたもので、準備済みであった。

3. PFGE 像の取込方法

エチジウムブロミドでの染色・脱色後の PFGE ゲルからの画像取込は、各機関によりそれぞれの方法で行った。ゲルから画像を CCD カメラで直接取り込む機関は、4 機関であった。またその他の 7 機関では、一旦ゲルを写真撮影した後、写真をスキャナー(6 機関)または CCD カメラ(1 機関)で画像に取り込んだ。

4. 画像解析法

各機関で得られた画像データは、ポラロイド写真及び TIFF 形式で保存した(CCD カメラ、画像解析装置、スキャナーで泳動した写真を取り込み)画像を福岡県保健環境研究所に電子メールで送信し、DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD, 日本語版)で解析した。

C. 研究結果

1) 画像保存について

各研究協力機関から福岡県保健環境研究所に電子メールで送信された画像を図 4 及び 5 に機関別に示した。平成 14 年度は画像のファイル形式については全く問題がなかったが、当年度は、メールの添付ファイルの画像がそのまま使用できたのは 4 地研のみであった。また添付画像を開くことが出来なかった地研は 2 件であった。添付画像がそのまま使用できない原因は、イメージモードがグレースケールではなく RGB あるいはインデックスカラーである場合とファイルが圧縮されている場合あるいはその両方による場合であった。画像のサイズについては特に指定していなかったため、地研により画像サイズが 0.3~1.2 MB とまちまちであった。画像サイズの大きい解像度の高い画像の方が良好な解析が得られるため、画像サイズについても指定が必要と考えられた。一方、ゲルを直接 CCD カメラで取り込んだ画像は、ゲルを写真撮影しスキャナー等で取り込んだ場合に比べ、安定した良好な画像が得られていた。写真をスキャナー等で取り込んだ場合、プラグ作成も泳動も問題がないのに良好な写真が得られていないために解析に悪影響を及ぼしているケースが見られた。

2) *S. Braenderup* H9812 株を用いた自作マーカ
感染症研究所から配布された *S. Braenderup* H9812 株の Gold standard を図 3 に示した。*S. Braenderup* H9812 株は本条件で泳動すると、19 本のバンドに分かれる。19 本目のバンドは CDC でサイズが提示されていないので、Gold standard から除いた。また、14 本目のバンドは自動バンド検索では識別できなかったため、Gold standard から除いた。最終的に Gold standard のバンド数は 16 本とした。一方で各地研から送信されてきた画像からマーカを自動バンドし、明らかなゲル中の汚れやノイズを削除した。各地研及び感染研のスタンダードを比較したところ、図 6 のデンドログラムとなった。スタンダードの類似性は全体で 67%、第 2 のクラスターで 86%であった。このような状況で O157

標準株を比較することができなかった。

D. 考察

平成12-14年度にパルスネット構築にむけた基礎的研究を実施した。その結果、①シングルピークで確認できるマーカーの安定供給、②PFGE 機器の管理と保守点検、③バッファ量と温度による移動度のチェック、④バンド認識の基準策定の4点が特に必要であることが分かった。平成15年度は市販されているマーカー(λ-ラダー)を用いず *S. Braenderup* H9812 株を用いマーカーを自作する新規 PFGE 法による精度管理を実施した。今回の精度管理ではマーカーとして使用する18本のピーク中2本は必ずしも認識できなかった。マーカーのピークを的確に認識すること自体が精度管理であり、今後は認識できなかった要因について解明し、相互画像の比較が可能な土壌を構築する必要がある。また、マーカーとして使用するバンド数は今後精査する必要がある。さらに解像度が低いとバンド認識に影響が見られるので、画像取込時の設定についても明確にすべきである。

前事業から今回の事業に移行した際、研究協力者が半数近く交代した。また、PFGE は熟練が必要な技術であり、如何に初心者でも安定した結果を得るかが重要な点であると考えられる。次年度は今回の結果を踏まえ、新規 PFGE マニュアルの見直しから始める予定である。一方、PFGE の方法や泳動条件が変わることに拠ることは、全体統一が直ちにとれないことを実感した。相互のデータを比較する基本となる検査法については特に検査法の全体統一が必要である。

E. 結論

1. 新規検査法の周知徹底の必要性

定期的精度管理を実施し、相互の評価を行なうことにより、検査精度の向上を図ることが可能となる。

2. 安定したマーカーの作成の必要性

自作のマーカーであるため、各自の努力により安定したマーカーを得ることが可能であり今後の検討が必要である。また、マーカーバンド数の策定も検討すべきである。

3. PFGE 機器チェックと基準作りの必要性

①PFGE 機器の管理と保守点検

②バッファ量と温度による移動度のチェック

③バンド認識の基準策定

④画像取込の改善

F. 研究発表

1. 論文発表

堀川和美, 村上光一, 長野英俊, 濱崎光宏, 石黒靖尚, 荒川英二, 渡邊治雄, 近藤正治, 森田 繁, 原 一美, 江崎泰之, *Vibrio cholerae* O8 感染事例-福岡県, 病原微生物検出情報, 2004, 1(287), 25.

堀川和美, 殺菌効力試験用検査材料として提出された消毒薬に混入していたセラチア菌, 2003, 日本防菌防黴学会誌, 31, 39-40.

2. 学会等発表

堀川和美, 村上光一, 長野英俊, 濱崎光宏, 高田 智, 2 検体の食品残品から O157 が分離された食中毒事例について, 第8回腸管出血性大腸菌シンポジウム, 東京都, 2004. 3. 5.

図 1. 新パルスフィールドゲル電気泳動法に関する研修会計画

新パルスフィールドゲル電気泳動法に関する研修会計画

- 1 研修期間 平成 15 年 11 月 6 日(木)～11 月 7 日(金)
- 2 開催式 平成 15 年 11 月 6 日(木) 13:00 2F 講堂
- 3 研修場所 福岡県保健環境研究所 病理細菌課及び講堂
- 4 研修内容 新パルスフィールドゲル電気泳動法に関する研修
- 5 担当者 福岡県保健環境研究所

病理細菌課長 石黒 靖尚
 専門研究員 堀川 和美
 専門研究員 村上 光一
 主任技師 長野 英俊
 主任技師 濱崎 光宏

宮崎県衛生環境研究所

細菌課長 河野 喜美子

福岡市保健環境研究所

主任研究員 尾崎 延芳
 主任研究員 樋脇 弘

6 研修参加者

研修出席者名簿

出席者	所属	役職名
尾崎 延芳	福岡市保健環境研究所	主任研究員
樋脇 弘	〃	主任研究員
瓜生 佳世	〃	研究員
藤田 景清	北九州市環境科学研究所	技術吏員
隈元 星子	佐賀県衛生薬業センター	技術吏員
眞子 純孝	〃	技術吏員
山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所	研究員
東根 秀明	長崎市保健環境試験所	副主幹
緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター	主任研究員
荒平 雄二	熊本県保健環境科学研究所	研究参事
丸住 美都里	熊本市環境総合研究所	技師
河野 喜美子	宮崎県衛生環境研究所	細菌科長
中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター	主任研究員
久高 潤	沖縄県衛生環境研究所	研究員
石黒 靖尚	福岡県保健環境研究所	病理細菌課長
堀川 和美	〃	専門研究員
村上 光一	〃	専門研究員
長野 俊英	〃	主任技師
濱崎 光宏	〃	主任技師

図 2. 新規パルスフィールドゲル電気泳動法マニュアル

大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

九州ブロックマニュアル

第 1 日目 (菌の培養)

3ml の TSB に菌を接種し、35-37°C、16-18 時間、静置培養

↓

第 2 日目 (集菌)

- 1) 1.5ml のマイクロチューブに培養液を 500 μ l とり、12,000 rpm で 5 分間冷却遠心
- 2) 上清を除去後、滅菌生理食塩水または PBS1,000 μ l を加え混和後、12,000 rpm、5 分間冷却遠心
- 3) 2) の操作を繰り返す(2 回洗浄)。
- 4) 上清を除去後、滅菌超純水 500 μ l を加え、懸濁

↓

(アガロースブロックの作成)

- 1) アガロースブロック作成用ウエルにテープを貼り番号を付け、氷上で冷す。
- 2) 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水 を電子レンジで溶かし、50-55°C で保温する。
- 3) 菌の不活化と、ゲルとの混和準備のために菌液を 63°C のウォーターバスに 10 分程度 浮かす。
- 4) 2) のチューブに 3) の 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水 を 500 μ l 入れ混和する。
- 5) 4) を 1) の plug mold(サンプルプラグキャスター、0.7mm)に 100 μ l 注入する。
- 6) 5) を氷上で固める。15-30 分間放置。…写真 1, 2

↓

(ProtenaseK 処理)

- 1) ProtenaseK を 1 mg/ブロック 分秤量し、1%N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA で 1 mg/ml と
なるよう溶解し、チューブに 2ml ずつ分注(2 ブロック作製用)。
- 2) plug mold(サンプルプラグキャスター、0.7mm)の短い方を横にスライドして外し、固化した PFGE プラグを保温した溶菌
液入りチューブの中にチューブ管壁に付けないように注意しながら移す。…写真 3
- 3) モールドのテープを外し、両端のモールド、ミニスパーテルを洗浄前 15 分間 70% イソプロパノールに浸ける。ディスプレイ
を使用するときはオートクレーブして廃棄する。
- 4) 50°C で 2h - over night 緩やかに振盪反応。(72 時間まで可)。
(ここで止めても良い、ブロックの保存はこの状態で行い冷蔵保存。)
* 水槽の水位がチューブの中の溶液より上であることを確認する。

↓

(プロテナーゼKの不活化・洗浄)

- 1) アガロースブロックを取り出し、カバーガラスを使って泳動時用の大きさにカットする。…写真 4, 5, 6
残りは新しい ProtenaseK 液に戻す
- 2) 500 μ l の 4 mM Pefabloc SC(AEBSF) in TE に移し、50°C、20 分以上振盪反による洗浄を行う(1 回目)。
- 3) Pefabloc 液を丁寧に抜き取り、新しい 4mM Pefabloc in TE を 0.5ml 加え 50°C 20 分以上振盪反応による洗浄を行う(2
回目)

4) TE (1ml/sample)にバッファーを変えて、氷上 20 分以上により平衡化・洗浄を 2 回行う。

(ここで止めても良い)

↓

(緩衝液による平衡化及び制限酵素による消化)

- 1) ブロックを出し、新しいチューブに制限酵素を含まない buffer を 200 μ l 入れ、氷上で 20 分以上振盪する。
- 2) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (XbaI, 30unit / sample plug) をチューブに入れ、37°C, 2 時間—over night 振盪反応

↓

(アガロースプラグのコームへの貼り付け)

- 1) 0.5×TBE バッファー100ml に 1g の SKG アガロースを加え、溶解する。
- 2) 55–60°Cの恒温水槽で溶解した 1%アガロースを保温する。
*あまり熱いゲルを注ぎ込むとコームに貼り付けたプラグがずり落ちることがある。
- 3) 37°Cの恒温水槽からチューブを取り出し、0.5×TBE バッファーを 400 μ l 加え、氷冷する。
- 4) 黒いゲル・フレームを泳動槽に装着し、2L の 0.5×TBE バッファーを注ぎ入れ、14°Cに予冷する。
- 5) コームを装着し、予めゲルの作成台において先端が gel platform の底に接着していることを確認する。

…写真 7

- 6) 泳動方向を向いているコームの面を上側にして置き、順にプラグを貼り付けていく。
- 7) コームにある余剰の液を滅菌したキムワイパーで除く。5–10 分間乾燥させる。
*プラグと一緒に残っているバッファーが多いと乾くのに時間がかかる。
- 8) コームの先端がプラットフォームに接着するようコームをゲル作製台にセットする。
- 9) 溶解・保温したアガロースをとコームの反対側からゲル作製台にゆっくり注ぎ込む。…写真 8
- 10) 30–45 分間アガロースを固化させた後、アガロースからコームを抜く。

↓

(泳動)

泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。泳動の温度は 14°C。

泳動条件は、は 6.0V/cm, 2.2 to 54.2 sec, 21 時間

↓

第 3 日目

(染色・写真撮影)

- 1) 泳動が終わったら、電源を切り、ゲルを取り出す。泳動槽は 2 度蒸留水で洗浄。
- 2) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3 μ g/ml のエチジウムブロミド 300ml (TBE) で 30 分 (時間厳守) 振盪・染色。
アルミフویلなどで染色槽に蓋をする。
- 3) 脱色 : ゲルを蒸留水で振盪しながら 2 時間洗浄。こまめに DW を替える。特に最初が肝心。
アルミフویلなどで槽に蓋をする。
- 4) 写真撮影 : イルミネーターにサララップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真を撮る。
上はコームの真上、下は寒天の真下にとる。拡大されていた方が取り込みやすいため。
コームの跡が分かり、下の寒天の位置が分かるようにする。
- 5) 写真は最低限 2 枚撮影 (露出時間を長めにしてバンドが良く読める写真 1 枚、露出時間が普通の写真 1 枚)
- 6) コンピューター取り込み用は背景が暗めの方が良い。JPEG は画像が解析できないので、TIFF 形式で保存する。

マーカー株の電気泳動像 (new STECタイム)

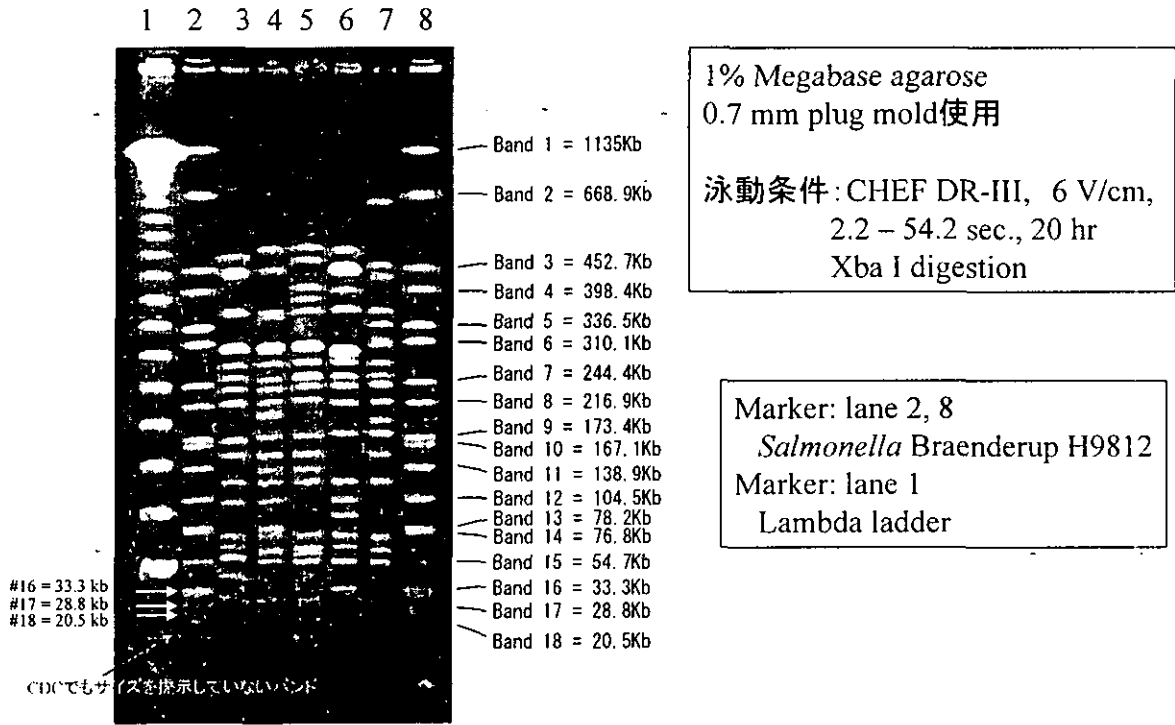
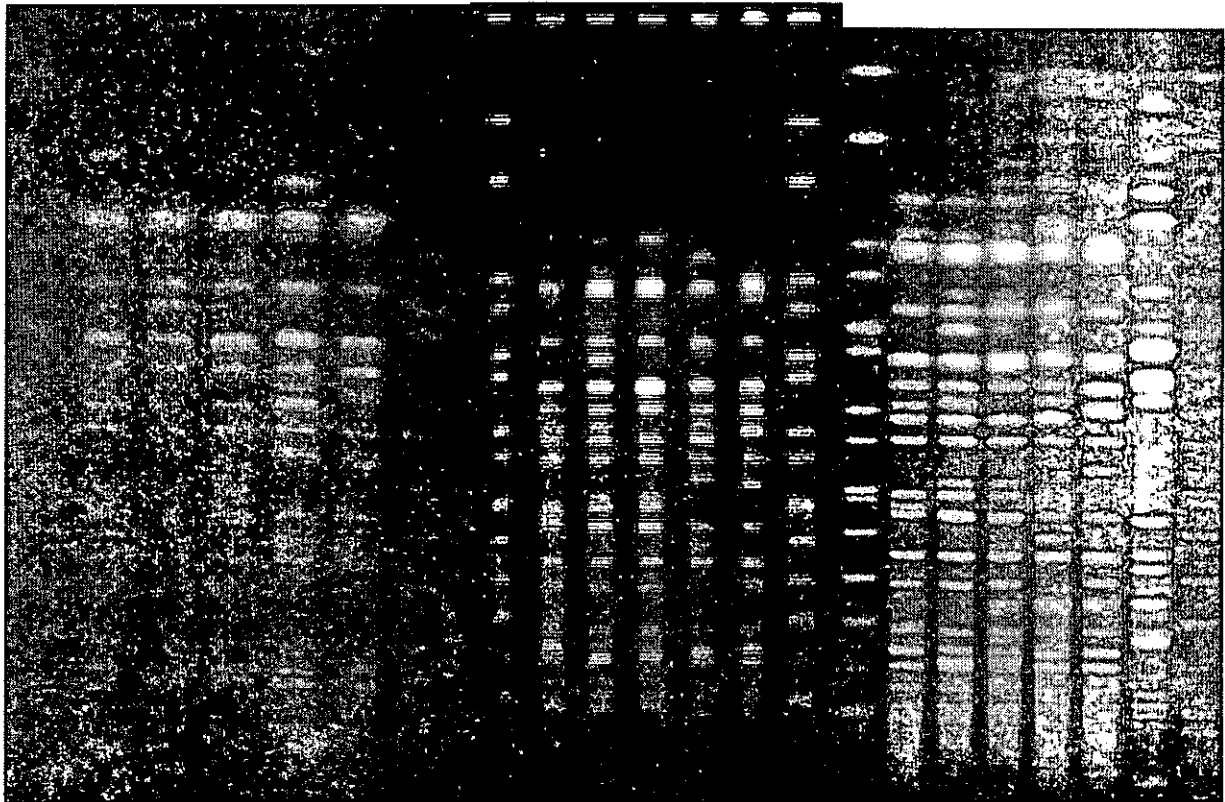


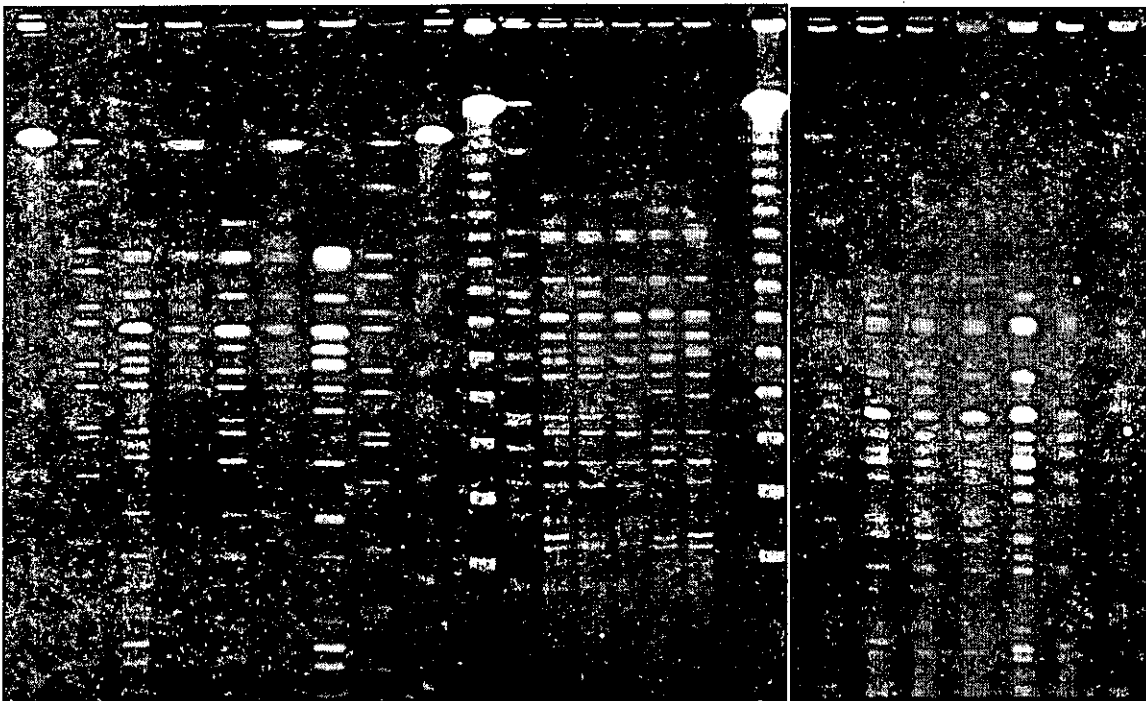
図 3. *S. Braenderup* H9812 株を用いた PFGE サイズマーカー



地研 A

地研 B

地研 C

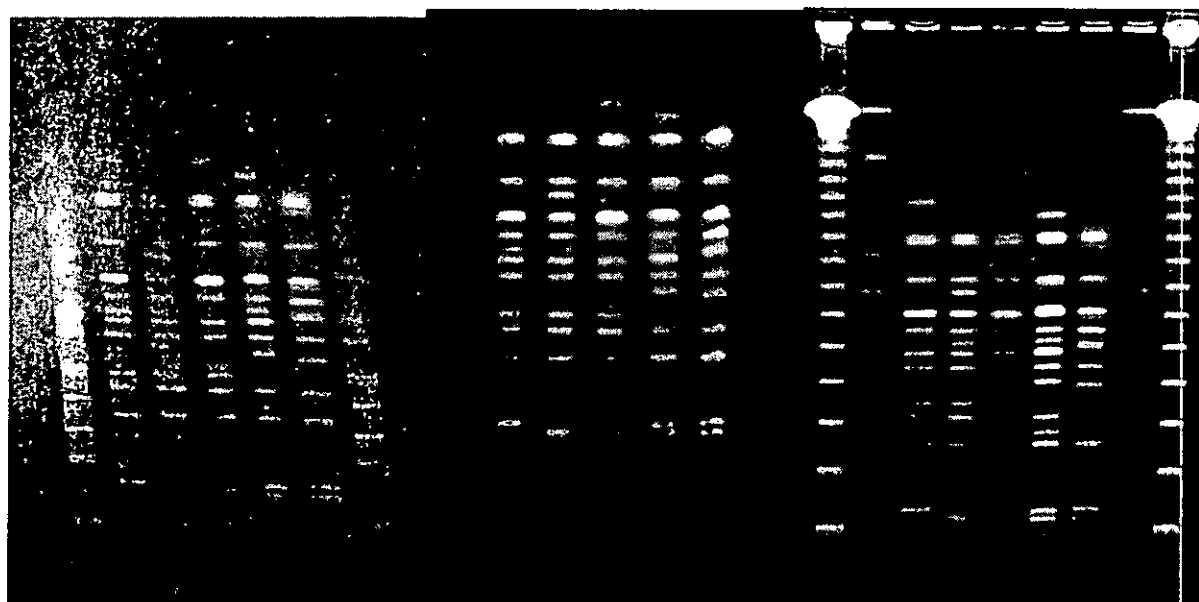


地研 D

地研 E

地研 F

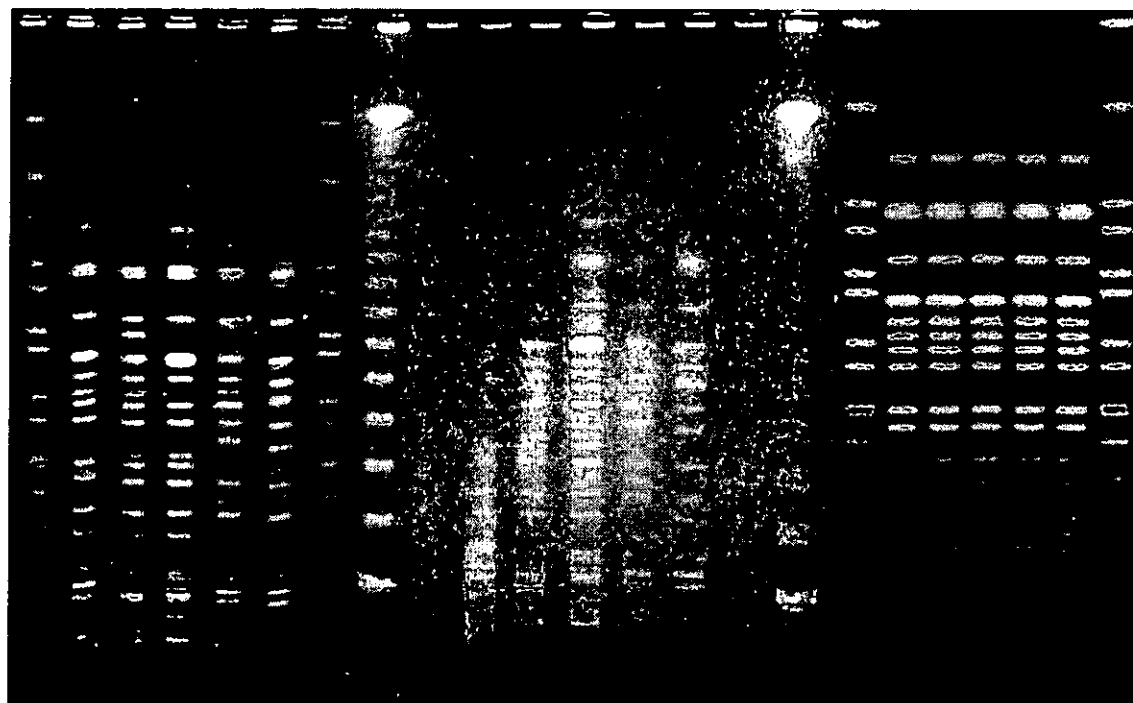
図 4. 地研 A-F の PFGE 泳動像



地研 G

地研 H

地研 I



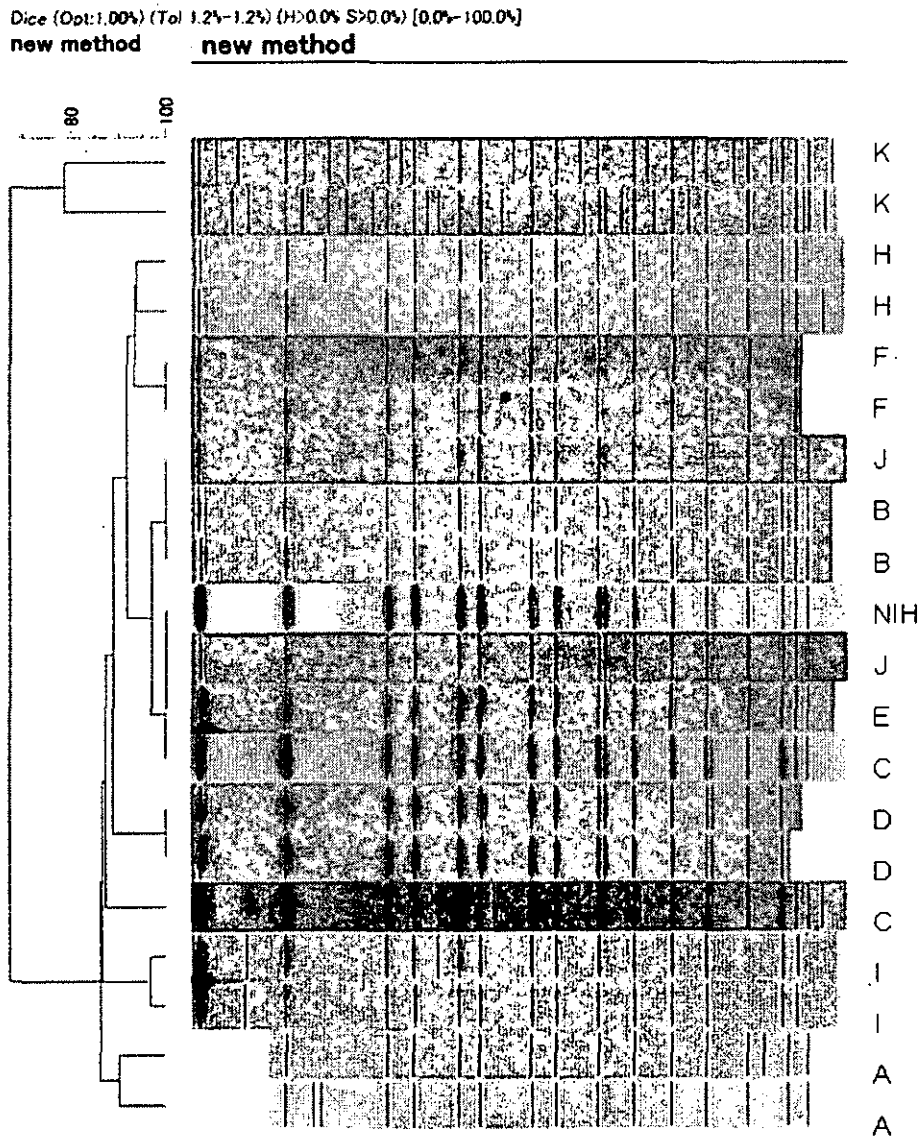
地研 J

地研 K

感染研

図 5. 地研 G-K および感染研の PFGE 泳動像

図 6. 各地研で泳動した *S. Braenderup* H9812 株の相互比較



平成 15 年度厚生労働省新興・再興感染症研究事業分担研究報告
分担報告書

症状からみた食中毒原因物質の特徴

研究協力者	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	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
	丸住美都里	熊本市環境総合研究所
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター

研究要旨

集団食中毒の発生初期段階に於いて、症状等の疫学的調査結果から得られた具体的数値より原因物質を推測し、検査方針を決定するのに必要な資料を得るため、過去 2 年間に九州地区で発生した食中毒のうち、特に頻度の高い 8 原因物質別の合計 219 症例について、原因物質が検出された患者の症状等を集計し、その特徴について解析を行った。

A. 研究目的

地方衛生研究所が集団食中毒及び感染症を探知した時点では、殆どの場合その原因物質等は不明であることが多く、患者・食品・環境等の多くの検体について、どの原因物質の検査に重点を置いて実施するかについての判断が必要である。

そこで今回は、症状を具体的な数値としてまとめ、集団食中毒の原因物質を推測するための資料を得ることを目的として、過去に発生した食中毒について、原因物質が特定された患者の症状等を集計し、その特徴について解析を行った。

B. 研究方法

過去 2 年間に於いて、北九州市、佐

賀県、熊本市、宮崎県、鹿児島県及び沖縄県の 6 県（市）で発生した食中毒のうち、原因物質として特に発生頻度の高いノロウイルス、サルモネラ、カンピロバクター、腸炎ビブリオ、毒素原性大腸菌、ウェルシュ菌、黄色ブドウ球菌及びセレウス菌（嘔吐型）の 8 物質の合計 219 の症例について、原因物質が検出された患者の症状等を集計し、その特徴について解析を行った。

C. 研究結果

1. 原因物質別食中毒の月別分布

図 1 に示すように、ノロウイルスは 11 月頃から発生し 12 月から 1 月にピークを迎え 3 月まで続き、また、細菌性食中毒は 3 月頃から発生し夏場にピークを迎え 11 月頃まで続く一般的な

傾向と一致した。

2. 原因物質別症状

表1に食中毒の原因物質別潜伏時間、症状についての一覧を示した。文献等で一般的にいわれている症状とほぼ近い結果であったが、今回は、具体的な数値として表すことができた。しかしながら、個別には、ノロウイルスの場合等、23%の患者に下痢が無く、嘔吐のみの症状を示す患者も8.3%で、ノロウイルスの一般的症状(吐気、嘔吐、下痢)に当てはまらない症例もあった。

3. 原因物質別症状のレーダー分布

図2及び図3に、今回の集計結果から、嘔吐の発症割合の高い原因物質と嘔吐の発症割合の低い原因物質の症状分布を示した。

嘔吐の発症頻度が比較的高い食中毒の原因物質は、黄色ブドウ球菌(94%)ノロウイルス(88%)、腸炎ビブリオ(50%)、ウェルシュ菌(31%)であり、これらの原因物質を症状より推定鑑別する際の特徴として、ノロウイルスは他の4者に比べ潜伏期間が比較的長く(平均41時間)また、頭痛の症状が出現する頻度が高い(39%)のが特徴であった。嘔吐の発症頻度が高いが、逆に潜伏時間が短く、かつ頭痛の出現頻度が低いウェルシュ菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、及びセレウス菌を鑑別するための特徴は次のとおりであった。ウェルシュ菌の場合は腹痛の発症頻度が低い(38%)。腸炎ビブリオは、腹痛の発症頻度が高く(81%)、若干の発熱がある(発熱有り42%:平均37.7℃)。黄色ブドウ球菌は

平均潜伏時間が短く(3時間)、嘔吐(94%)、下痢(100%)、腹痛(62%)が主症状で発熱、頭痛の発症は極めて低い。セレウス菌(嘔吐型)は黄色ブドウ球菌同様、潜伏期間が極めて短い(0.8時間)が、黄色ブドウ球菌と比較して下痢、腹痛の症状を示さないのが特徴であった。

嘔吐の発症頻度が比較的低い集団食中毒の原因物質は、サルモネラ(12%)、カンピロバクター(6%)、毒素原性大腸菌(0%)であり、これらの原因物質を症状で鑑別する際の特徴として、カンピロバクターは潜伏期間が長い(66時間)。サルモネラはカンピロバクターに比べ潜伏期間が短く(平均26時間)、毒素原性大腸菌に比べ発熱の平均温度が高い(38.1℃)。毒素原性大腸菌はカンピロバクターに比べ潜伏時間が短くカンピロバクター及びサルモネラと比較して発熱温度は低い(37.1℃)等が特徴であった。

D. 考察

保健所や地方衛生研究所が集団食中毒の疑い事例を探知した時点で、殆どの場合その原因物質等は不明であることが多く、患者・食品・環境の検体について、どの原因物質の検査に重点を置いて実施するかについての判断が必要である。検体の数が少なく1検体あたりの量も多ければ、より多くの原因物質の検索が可能であるが、集団食中毒の場合、膨大な数の検体と少量の食品検体で検査を実施しなければ

ばならない場合が殆どであることから、迅速かつ正確な検査のためには、患者の症状、潜伏時間、喫食状況などから原因物質を推理し、検査の方針を決定する必要がある。

集計されたデータを解析した結果は、一般的文献等でいわれている症状とほぼ同様であったが、本調査により具体的な数値にて症状の発症頻度が示すことができた。

今回、嘔吐の発症率に着目し、原因物質を大別した症状のレーダー分布で解析した結果、比較的容易に原因物質が推定することができた。これは、集団食中毒の際に、たとえ、食中毒の調査経験、知識が少ない人であっても、調査から得られた臨床症状等の結果と、今回得られた集計結果を照合することにより具体的に原因物質を絞り込むことができ、また、推定された原因物質の潜伏時間からさらに原因食品及び原因施設の推定がスムーズに行うことができる。このような事から、集団食中毒発生の際、保健所の初期調査で患者集団の症状をまとめること

は、原因究明のため重要な要素である。

今回の調査ではデータ数が少なく、症状で不明な点も多かったため、より精度の高い具体的な数値で症状を解析するためには、継続したデータの集積が必要である。また、調査に加えなかったコレラ、赤痢等の他の細菌や、クリプトスポリジウム等の原虫、ロタウイルスなどのウイルスも含めた原因物質についても調査が必要である。

また、より精度の高い資料を得るためにはパルスネット、フードネットあるいは病原微生物検出情報の様なオンライン上にデータを蓄積し、解析したデータを利用できるシステムが望まれる。さらに、有意差検定解析などを含めた疫学的解析ソフトを同時に組み込むことにより、迅速でより正確な食中毒調査が可能となり、原因究明のための調査に役立てることが期待できる。

E. 研究発表

なし

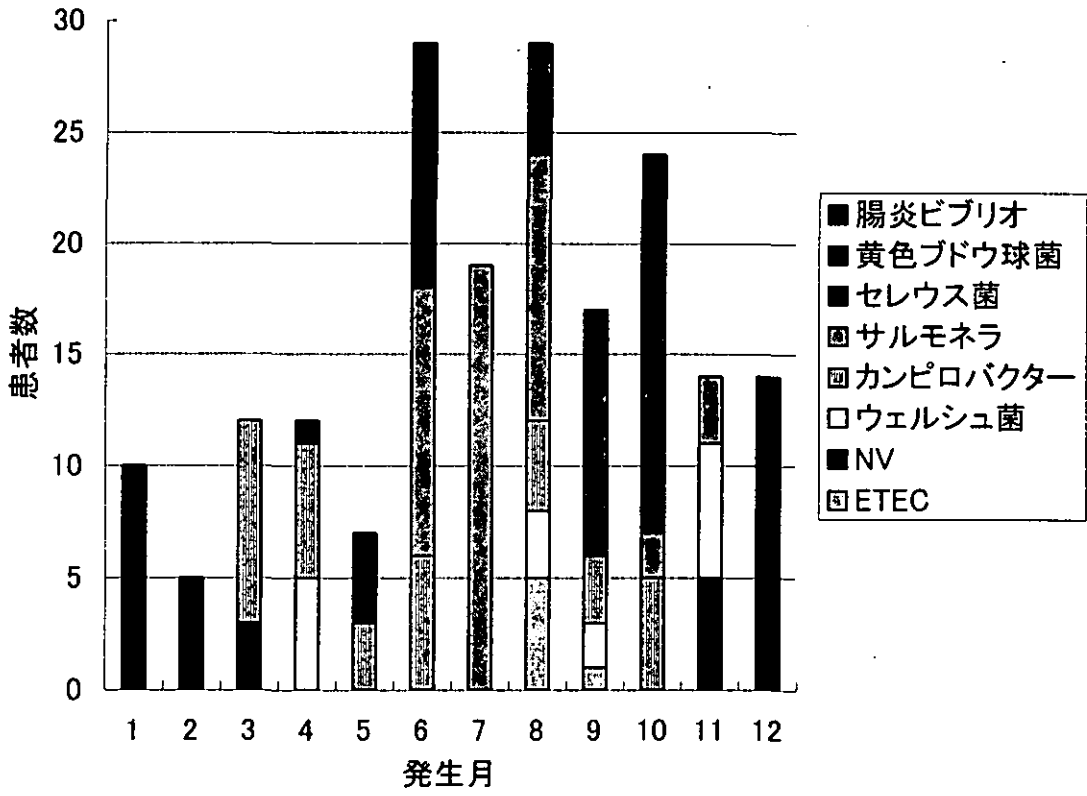


図1 原因物質別食中毒の月別分布 (N=219)

表 1 原因物質別症状の発症頻度 (N=219)

症状	ノロウイルス	サルモネラ	毒素原性大腸菌	腸炎ビブリオ	カンピロバクター	ウェルシュ菌	黄色ブドウ球菌	セレウス菌(嘔吐型)	
データ数	36	50	6	26	56	16	24	5	
潜伏時間	平均潜伏時間H	40	26	17	8	66	11	3	0.8
	潜伏時間の幅	11-72	6-49	13-31	4-28	28-90	2-19	1-10	0.5-2
下痢	下痢有症率%	77	92	100	96	94	88	100	0
	平均下痢回数	5	7	8	9	9	5	7	0
発熱	発熱有症率%	56	74	50	42	64	31	0	0
	発熱平均温度°C	38.1	38.1	37.1	37.7	38.5	37.2	0	0
	発熱温度の幅°C	平熱-39.0	平熱-39.0	平熱-37.2	平熱-38.0	平熱-40.0	平熱-37.5	平熱	平熱
嘔吐	嘔吐有症率%	88	12	0	50	6	38	99	100
	平均嘔吐回数	2.2	0.8	0	6.6	0.2	1.3	12.3	3.8
	嘔吐回数の幅	0->10	0-6	0	0-10	0-1	0-2	1-60	1-5
頭痛	頭痛有症率%	39	45	33	8	44	6	0	0
腹痛	腹痛有症率%	79	78	83	81	89	38	62	0

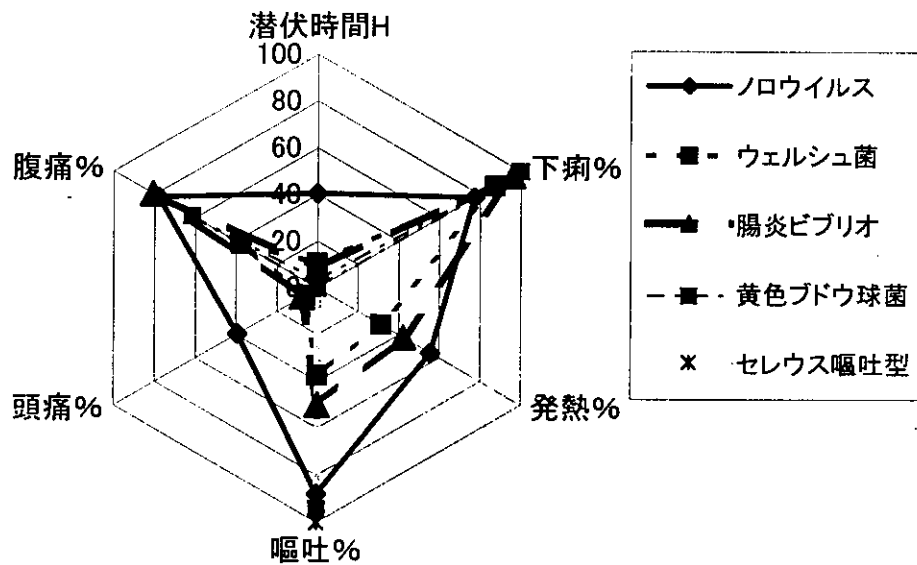


図1 嘔吐の症状を示す割合が比較的高い食中毒原因物質別症状レーダー分布 (N=107)

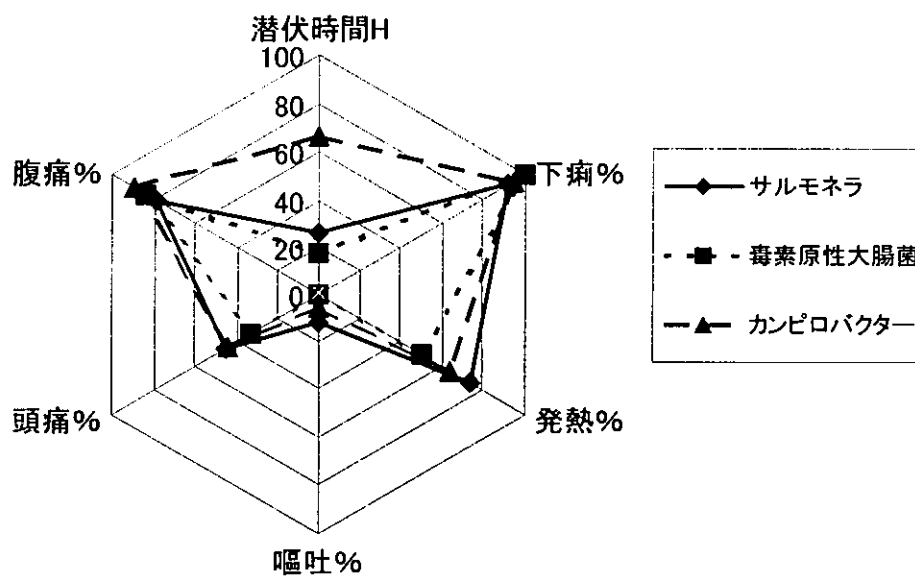


図2 嘔吐の症状を示す割合が比較的低い食中毒原因物質別症状レーダー分布 (N=102)

九州地区で報告された劇症型溶血レンサ球菌感染症からの
分離菌株の細菌学的特徴

緒方喜久代, 内山静夫 (大分県衛生環境研究センター)
池辺忠義, 渡辺治雄 (感染症研究所)

研究要旨

1992 年から現在までの九州地区における劇症型溶血レンサ球菌感染症年次別発生状況を調査した。報告された 30 例の劇症型溶血レンサ球菌感染症に由来する 30 株について、T 型別、M 型別、M 蛋白遺伝子(*emm*)シーケンスによる *emm* 型別、*spe* 型を実施した。

A. 研究目的

A 群溶血レンサ球菌は小児の咽頭炎や扁桃炎の原因菌として、B 群溶血レンサ球菌は新生児の髄膜炎や敗血症の原因菌として知られているとともに、多臓器不全や軟部組織の壊死等を起こし急激な病態を惹起する劇症型感染症起因菌としても知られている。

全国的には 1992 年から現在までに、疑い例を含め 252 例が報告されており、患部より分離された菌の主な血清型は、A 群 T1、T3、T12、T28、T22 型、G 群であった。九州地区の分離菌の傾向を見てみると、A 群 T1 型が主要血清型であることは一致しているが、A 群 T22 型のように地域性が見られるものもある。

今回は、九州地区における劇症型溶血レンサ球菌感染症発生状況について調査を行うとともに、分離菌に関する情報をまとめた。

B. 研究方法

菌株：1992 年から現在まで、九州地区においては報告された 30 例の劇症型溶血レンサ球菌感染症に由来する 30 株について検討した。

方法：馬血液寒天培地上で明らかな β 溶血を示し、カタラーゼ陰性、グラム陽性球菌であることを確認後、血清群別キットを用いて群別を行った。T 蛋白による型別は市販の T 型別用免疫血清(デンカ生研)を用いてスライド凝集反応法で実施した。抗原はデンカ生研の操作法に従いブタ豚エキス(デンカ生研)処理により作製した。

M 型別、M 蛋白遺伝子(*emm*)シーケンスによる *emm* 型別、*spe* 型は感染症研究所で実施した。

C. 結果

表 1 に九州地区における劇症型溶血レンサ球菌感染症年次別発生状況

を示した。1992年から現在までに、30例の劇症型溶血レンサ球菌感染症が報告されており、2001年から2003年にかけて、わずかながらではあるが増加傾向にあった。鹿児島県以外の7県に劇症型溶血レンサ球菌感染症の発生が見られた。T1型はどの県からも分離されたが、T22型は沖縄県のみで多く分離された。

表2に分離菌株の型別成績を示した。T型別の内訳は、T1型が15例(50%)、T22型が4例(13.3%)、T28型が2例(6.7%)、T3型、T6型、T11型、T12型が各1例(3.3%)であった。A群以外では、G群が3例(10%)、B群が2例(6.7%)であった。*emm*型別はT型別と同じ分布を示したが、M型別ではM22やM28に見られるように、MUTとなる不一致の株が2株あった。また、*spe*型別では、T28型で保有が異なる株があった。

D. 考察

全国的には1992年から現在までに、疑い例を含め252例が報告されており、患部より分離された菌の主な血清型は、A群T1(37.3%)、T3(11.5%)、T12(5.2%)、T28(5.2%)、T22型(4.4%)、G群(7.9%)であった。九州地区の分離菌の傾向を見てみると、A群T1型が15例(50%)で、主要血清型であることは一致しているが、A群T22型のように地域特異性が見られるものもある。

一方、九州地区において溶レン菌感染症を疑う小児の咽頭ぬぐい液から

分離される菌の主な血清型は、T12型次いでT4型、T1型の順であった。沖縄県においては、A群T22型は小児の咽頭ぬぐい液からも多く分離される傾向にある。

九州地区においては劇症型溶血レンサ球菌感染症の報告は、5~6例と少ないことに加えて、近年は菌株の確保が困難な状況もある。今後は、積極的に菌株の確保を図るとともに、分離菌の分子疫学的解析を行うことにより、九州地区の浸淫状況を明らかにしたい。また、小児の咽頭ぬぐい液由来の菌と劇症型溶血レンサ球菌感染症由来の菌との比較を行うことにより、菌の特性を明らかにしたい。

表1 九州地区における劇症型溶血レンサ球菌感染症年次別発生状況

年	福岡県	佐賀県	長崎県	熊本県	宮崎県	大分県	沖縄県
1994	T3						
1995		T1			T28		
1996		T28					
1997						G	
1998						T1(2)	T12,T1
1999					T1	T1,T6	
2001	T1	B,G			T1		T22(2),G
2002	T1	T11	T1	T1			T22
2003	T1		T1(2)	T1,B			T22

表2 分離菌株の型別成績

群別	T型別	M型別	<i>emm</i> 型別	<i>spe</i> 型別	例数
A	T1	M1	<i>emm1</i>	A、B	15
A	T22	M22	<i>emm22.2</i>	B、C	3
A	T22	MUT	<i>emm22.2</i>	B、C	1
A	T3	M3	<i>emm3.1</i>	A、B	1
A	T6	M6	<i>emm6.8</i>	B、C	1
A	T11	MUT	<i>emm89</i>	B、C	1
A	T12	M12	<i>emm12</i>	B、C	1
A	T28	M28	<i>emm28</i>	B、C	1
A	T28	MUT	<i>emm28</i>	B	1
G					3
B					2
合計					30

レジオネラ属菌における遺伝子解析の検討

研究協力者	河野喜美子	東 美香	宮崎県衛生環境研究所
	中山浩一郎		鹿児島県環境保健センター
	丸住美都理		熊本市環境総合研究所

研究要旨 レジオネラ属菌のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子画像を、異なる機関間で交換し有効活用するために、同菌の PFGE の方法、画像解析及び有用性について九州地区 3 機関で基礎的な検討を行った。すなわちレジオネラ属菌の標準株 3 株及び各地研の *Legionella pneumophila* SG1~6 の分離株 30 株を材料として、参加機関それぞれで PFGE を実施し、画像データを 1 機関に集めて解析し PFGE の方法及び解析結果等を比較検討した。その結果、きれいな PFGE 画像を安定して得るためには方法の再検討が必要であることが示唆された。また、送付された画像の比較解析の結果、標準菌株を用いた精度管理試験で、概ね良好な結果が得られた。さらに各機関分離菌の解析では、由来の異なる株間の遺伝子パターンの類似度はすべて 60%未満であり、それぞれの株で相当に異なったパターンを示していたことから、本 PFGE 法は同菌での感染源決定に有用であると考えられた。

A. 研究目的

レジオネラ属菌は、循環式浴槽、冷却塔水、給湯水等の人工環境水を感染源として、大規模な集団感染を起こすことがある。また、最近の旅行ブーム等で、人の頻繁な移動により患者発生も一地方に限定されず、広域に渡ることも多く、そのため、様々な感染源および広い地域を想定した調査や対策が必要となる。パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) は、このような場合の原因究明に欠かせない手法であるが、感染の早期発見のためにはさらに、他関係地域への情報の伝達、解析結果の比較や交換が可能なシステムが必要となる。そこで本研究では、異なる機関間の連携システムづくりを目的とし、レジオネラ属菌の PFGE に関する検査法の検討、他機関とのデータの交換及び他機関の画像データの解析法等について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

PFGE の標準菌株として、感染研から分与されたレジオネラ属菌 3 株 (表 1) を使用した。また、3 機関 (A-C) で分離・選定された *Legionella (L.) pneumophila* SG1~6 について PFGE を実施した。分離菌の総菌株数は 30 株で、その血清型、由来等を表 2 に示した。

2. PFGE の方法

PFGE の方法は原則として感染研のプロトコールに準じて行ったが、一部、変更して実施した (図 1)。画像データは、画像解析装置で取り込んだ画像 (TIFF 形式、グレースケール、8 ビット) を、宮崎県衛生環境研究所へ送付し、解析用とした。

3. 画像解析法

各機関から送付された画像は、Fingerprinting™ II ソフトウェア (BIO-RAD) を用いて解析した。解析条件は、

Dice、Band-Tolerance 値は 1.0%、最適化値 1.0%とした。

C. 研究結果

1. 精度管理結果

標準菌株 3 種について、3 機関で PFGE を実施した画像を比較解析した (図 2)。NIIB0233(SG4)、NIIB0138(SG3)の 2 菌株については、各機関間で 100%の一致率が得られ、良好な成績であった。他の 1 株 (NIIB0058, SG1) については、1 機関はバンドの染まりが薄すぎて解析不能、他の 2 機関間は 70%程度の類似度であった。

2. 分離株の PFGE パターン比較解析結果

L. pneumophilla SG1~6 の分離株について実施した得られた PFGE 画像を比較解析した結果を図 3~6 に示した。SG1 では、由来が同じである菌については、100%の類似度を示したが、由来が異なる菌株間では 50%以下の類似度しかなく菌株により異なった PFGE パターンを示した。SG3 では、B 機関と C 機関の株間、C 機関の分離日が異なる株間で、90%以上の類似度を示す菌株が見られたが、株の由来についての検討はしていない。SG5 および SG6 については、すべての株間で、60%以下の類似度しか示さず、それぞれの菌株で異なった PFGE パターンを示した。

3. PFGE 方法について各参加機関から提出された問題点

PFGE の方法は、図 1 の方法で実施したが、参加機関で PFGE 実施時に出てきた問題点を以下に示す。

(1) 菌液の調整

アガロースブロック作成時の菌液の濃度はマックファーランド 3 程度、0.7mm の厚さのゲルを使用し、泳動時のブロックの大きさは、EHEC0157 迅速法と同様の

4×2mm としたが、結果的には、バンドの染色は薄めであり、菌液の濃度、または泳動時のブロックの大きさに検討が必要と思われた。

(2) サイズマーカー

ラムダラダーは 37°C5 分保温したものをを用い、ほぼ良好な成績が得られたが、ロット差があるためか、処理時間 5 分でもバンドが太くなった機関もあった。

(3) PFGE 画像

解析ソフトでの取り込みは TIFF 形式であるが、この形式のデータでも圧縮等の操作を加えてあるものについては解析ができなくなるため、メールでの交換に支障を来した。メールで交換でき、かつ解析に耐える画像が得られるような、画像取り込み条件を検討する必要がある。

D. 考察

今回初めて、検査機関間での、レジオネラ属菌の PFGE 画像交換と比較解析を実施した。PFGE の方法として今回のマニュアルでは、アガロースブロックを厚さ 0.7mm と薄く作成したため、菌量の不足からか、全体的にバンドの染まりが悪く、中には解析不能のものもあった。菌液の濃度等、マニュアルを検討する必要がある。各機関間での精度管理のために使用した標準株 3 株中 2 株において全機関で 100%の一致が見られたことから、バンドの検出については、各機関とも、概ね良好な結果であったと考えられた。また分離株 SG1~6 の菌株の PFGE パターンは、由来の異なる株間で比較すると、類似度がすべて 60%未満であり、それぞれの株で相当に異なったパターンを示していたことから、本方法でのレジオネラ属菌の解析結果は遺伝子的に多型を示すことが推測され、本方法が同菌での感染源決定に十分に有用であると考えられた。

今回は 3 機関でスクリーニング的に PFGE 画像の比較解析を行ったが、レジオネラ属菌の