

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（課題番号：H15-新興-1）

平成 16 年度総括・分担研究報告書

（厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業）

主任研究者 渡 辺 治 雄

国立感染症研究所 細菌第一部

目次

1. 平成 16 年度総括研究報告書

食品由来感染症の細菌疫学的指標のデータベースに関する研究・・・1

主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所

2. 平成 16 年度分担研究報告書

(I) 国立感染症研究所

食品由来感染症の細菌疫学的指標のデータベースに関する研究・・・ 10

分担研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所

協力研究者 泉谷 秀昌 //

伊豫田 淳 //

三戸部治郎 //

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

a) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)の画像解析における施設間差の検討・・・25

分担研究者 長野 秀樹 北海道立衛生研究所

協力研究者 木村 浩一 北海道立衛生研究所

若森 吉広 //

駒込 理佳 //

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 秋田県衛生科学研究所

齋藤志保子 //

藤井伸一郎 岩手県環境保健研究センター

畠山 敬 宮城県保健環境センター

牛水真紀子 仙台市衛生研究所

熊谷奈々子 福島県衛生研究所

須釜久美子 //

佐々木寿子 新潟県保健環境科学研究所

b) 北海道における *Salmonella* Enteritidis のパルスフィールドゲル電気泳動像を基礎としたデータベース構築の試み・・・ 42

協力研究者 木村 浩一 北海道立衛生研究所

若森 吉広 //

駒込 理佳 //

分担研究者 長野 秀樹 //

- c) 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌 0166:HUT が原因と考えられた食中毒事例 (岩手県) 45

協力研究者 藤井伸一郎 岩手県環境保健研究センター
佐藤 卓 //

- d) 食品及び環境等からの TDH、TRH 産生腸炎ビブリオ分離株のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析 47

協力研究者 佐々木寿子 新潟県保健環境科学研究所
加藤美和子 //
白幡 祐子 //
寺澤 宏司 //
不二崎順二 //

- e) 下痢症患者由来 *Salmonella* Enteritidis の疫学的解析 55

協力研究者 池田 辰也 山形県衛生研究所
最上久美子 //
大谷 勝実 //
工藤 勝博 //

- f) 腸管出血性大腸菌 O111 集団感染事例及び *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 56

協力研究者 熊谷奈々子 福島県衛生研究所
須釜久美子 //
平澤 恭子 //
長沢 正秋 //
渡部 啓司 //

(III) 関東・甲・信・静岡ブロック

- a) 食品由来感染症の細菌疫学的指標のデータベースに関する研究 59

分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター
研究協力者 高木 英 茨城県衛生研究所
長 則夫 栃木県保健環境センター
船渡川圭次 //
黒澤 肇 群馬県衛生環境研究所
倉園 貴至 埼玉県衛生研究所
依田 清江 千葉県衛生研究所
横山 英二 //
内村眞佐子 //
鈴木理恵子 神奈川県衛生研究所

武藤 哲典	横浜市衛生研究所
金子 通治	山梨県衛生公害研究所
笠原ひとみ	長野県衛生公害研究所
川森 文彦	静岡県環境衛生科学研究所
小西 典子	東京都健康安全研究センター
尾畑 浩魅	〃

- b) 腸管出血性大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動パターンを系統樹解析ソフトウェアで解析するための条件検討・・・・・・・・・・・・・・・・ 78

研究協力者	横山 栄二	千葉県衛生研究所
	内村眞佐子	〃

- c) *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例への PFGE 解析の応用・・・・・・・・ 84

1. *Salmonella* Enteritidis 集団食中毒事例 茨城県衛生研究所
2. SE を原因菌とする食中毒事例 群馬県衛生環境研究所
3. 2004 年 8 月分離 *S. Enteritidis* 散発事例の PFGE パターン
埼玉県衛生研究所
4. 仕出し弁当を原因とした *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例
長野県環境保全研究所
5. 飲食店を原因とした *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例
長野県環境保全研究所
6. *S. Enteritidis* 食中毒事例の概要および分離株の PFGE 画像 事例 1, 事例 2
静岡県環境衛生科学研究所

(IV) 東海・北陸ブロック

- a) 東海・北陸地方 8 地方衛生研究所と豊田市衛生検査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・・・・・・・・ 93

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	〃
	倉本 早苗	石川県保健環境センター
	安田 恵子	岐阜県保健環境研究所
	田中 保知	岐阜市衛生試験所
	田中 大祐	富山県衛生研究所
	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
	藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所
	多和田光紀	豊田市衛生試験所

- b) *Shigella sonnei* (ソンネ菌) 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・・・・・・・・・・ 104

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	〃

(V) 近畿ブロック

a) 近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 型別法の施設間変動について・・・・・・・・・・ 114

分担研究者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
協力研究者	石川 和彦	滋賀県立衛生環境センター
	藤原 恵子	京都府保健環境研究所
	竹上 修平	京都市衛生公害研究所
	小笠 原準	大阪市立環境科学研究所
	横田 正春	堺市衛生研究所
	西海 弘城	兵庫県立健康環境科学研究センター
	黒川 学	神戸市環境保健研究所
	川西 伸也	姫路市環境衛生研究所
	中山 章文	奈良県保健環境研究センター
	金澤 祐子	和歌山市衛生研究所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所

b) 食中毒事件等由来の黄色ブドウ球菌におけるパルスフィールド電気泳動法を用いた解析・・・・・・・・・・ 125

協力研究者	石川 和彦	滋賀県立衛生環境センター
	川端 彰範	〃
	井上 朋宏	〃
	林 賢一	〃

c) 国内感染例から分離された赤痢菌 *Shigella sonnei* の菌型解析・・・・・・・・ 130

協力研究者	西海 弘城	兵庫県立健康環境科学研究センター
	辻 英高	〃
	福永 真治	〃

d) 腸管出血性大腸菌 O157 による家族内感染事例の PFGE 解析—異なった PFGE 型が検出された 1 事例について・・・・・・・・ 133

協力研究者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	松根 渉	〃
	塚本 定三	〃
分担研究者	勢戸 和子	〃

(VI) 中国四国ブロック

a)	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	137
	分担研究者	田中 博 愛媛県立衛生環境研究所
	研究協力者	榊 美代子 広島県保健環境センター
		妹尾 正登 //
		中嶋 洋 岡山県環境保健センター
		角森よしえ 島根県保健環境科学研究所
		最首 信和 鳥取県衛生環境研究所
		吉田 紀美 愛媛県立衛生環境研究所
		砂原千寿子 香川県環境保健研究センター
		絹田 美苗 //
		谷脇 妙 //
		谷 好史 徳島県保健環境センター
		河本 秀一 広島市衛生研究所
		古田 喜美 //
b)	ND, II a, ND 型腸管出血性大腸菌 0157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討	149
	研究協力者	古田 喜美 広島市衛生研究所
		下村 佳 //
		河本 秀一 //
c)	2004年中国四国ブロックで分離された <i>Salmonella</i> Virchow のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析	163
	研究協力者	吉田 紀美 愛媛県立衛生環境研究所
		田中 博 //
		谷脇 妙 高知県衛生研究所
		河本 秀一 広島市衛生研究所
d)	<i>Salmonella</i> Enteritidis におけるパルスフィールドゲル電気泳動像とファージタイプとの関連性について	165
	研究協力者	谷脇 妙 高知県衛生研究所
		松本 紀子 //
		絹田 美苗 //
e)	散発例由来 <i>S.</i> Enteritidis の遺伝子型の特徴	169
	研究協力者	妹尾 正登 広島県保健環境センター
		榊 美代子 //

(VII)九州ブロック

a)	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Ⅱ	
	①研修と精度管理	172

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
	松雪 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
	八尋 俊輔	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
	野田多美枝	福岡県保健環境研究所
	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
	石黒 靖尚	福岡県保健環境研究所

b) 黄色ブドウ球菌の食中毒由来株と病院由来株の比較・・・・・・・・・・180

研究協力者	東根 秀明	長崎市保健環境試験所
	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
	瓜生 佳世	福岡市保健環境研究所
	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
	堀川 和美	福岡県保健環境研究所

c) A群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討・・・・・・・・・・191

研究協力者	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	岸川 恭子	佐賀県衛生薬業センター
	尾崎 延芳	福岡市保健環境研究所
	瓜生 佳世	〃
	丸住美都里	熊本市環境総合研究所
	松岡由美子	〃

d) *Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討・・・・・・・・・・197

研究協力者	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
	山崎 省吾	〃
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所

	松雪 星子	佐賀県衛生薬業センター
e)	食中毒及び感染性胃腸炎原因物質の臨床症状・・・・・・・・・・	210
	研究協力者	
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	堀川 和美	福岡県保健環境研究所
	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
	松雪 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
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
	山崎 省吾	〃
	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター
f)	レジオネラ属菌についての PFGE 画像の機関間差の検討及び九州地区で検出されたレジオネラ属菌のデータベース化についての基礎的研究・・・・・・・・・・	215
	研究協力者	
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	岡田 美香	〃
	田栗 利紹	長崎県衛生公害研究所
	丸住美都里	熊本市環境総合研究所
	緒方喜久代	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
	瓜生 佳世	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
	松雪 星子	佐賀県衛生薬業センター
	植木 信介	長崎市保健環境試験所

3.	研究成果の刊行・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	231
----	---------------------------------	-----

平成 16 年度総括研究報告書

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

主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所細菌第一部長

細菌学的疫学指標の一つとして PFGE による解析結果を用い、そのネットワーク化及びデータベース化を継続した。国際的なデータの互換性を確保するために必要である標準化プロトコールを使用し、全国を6つに分けたブロックごとに各種の菌について PFGE 解析を行い、その有効性の検討および精度の向上を図ること、さらに新しく作成したソフトにより処理された PFGE 画像を解析し系統樹解析を行うことに重点を置いて研究を行った。PFGE 解析技術を均一化し互換性のあるデータを得るためには、継続的な PFGE 解析の精度管理を行う必要がある。したがって、基準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株を使用し標準化プロトコールに基づいて各ブロックでの精度管理を継続した。また、アジア諸国を中心とした「細菌の DNA 解析ネットワーク（現在のところは、PFGE 解析をその対象にしている）」である PulseNet Asia Pacific の構築に向けて参加国で準備が進められている。我が国での解析結果がこれらの諸国でも互換性を持つことが、将来起こりうる国際的な広域感染症事例に対応する際には重要と考えられる。各ブロック内での精度管理の結果から、標準化プロトコールを使用することでより高精度の解析結果が得られデータの互換性が確保されつつあることが伺える。基準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株の使用が高解像度に貢献しており、信頼度の高いデータベース構築に直結している。新しい解析ソフトによる系統樹作成から分離株のサブタイピングを行い、広域共通パターンについては、従来が目視によるサブタイピングよりも高精度での検出が可能であり、頻度が低いパターンにおいても見逃すことなく検出できた。一方で、解析ソフトの解析条件等については標準化も不十分であり検討の余地があると言える。標準化プロトコールでのデータの互換性については、日米間での腸管出血性大腸菌 0157 と赤痢菌の2事例においてそれぞれの解析結果が両国で一致していることが確認されたことから、十分に信頼できる互換性が確保できていると考えられる。PFGE 解析能の限界を補完する可能性のある解析方法として、Multi Locus VNTR Assay (MLVA) が CDC においても評価されているところであるが、本研究班においても予備的な解析報告がなされ、今後の継続的な評価が必要だと考えられた。解析情報を共有化する一手段として感染研 HP の利用なども検討することが必要だと考えられた。

分担研究者：

長野秀樹（北海道立衛生研究所）

甲斐明美（東京都健康安全研究センター）

松本昌門（愛知県衛生研究所）

勢戸和子（大阪府公衆衛生研究所）

田中博（愛媛県立衛生研究所）

堀川和美（福岡県保健環境研究所）

寺嶋淳（国立感染症研究所）

協力研究者：泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部

治郎（感染研）、および各地方衛生研究所

関係者（各分担報告書を参照）

A. 研究目的

食品由来感染症においても、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、赤痢等を起因菌として大規模に発生する事例の報告が続いている。被害の拡大を未然に防ぐためには、探知される事例の疫学的解析と関連性が疑われる起因菌の菌学的解析という2面からの解析に基づいて、迅速かつ総合的判断を下すことが重要である。パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）は、菌の解析システムとして汎用され成果を挙げている。特に、食品由来感染症の対策においては、PulseNetと呼ばれるPFGE解析情報のネットワークが世界的な規模で標準化されつつある。わが国においても、国際的ネットワークでのデータの互換性を確保するために、標準プロトコルを採用して精度管理を行うとともに、データベースを構築して分離株の異同をDNAレベルで識別できるシステムを稼働させ、広域腸管感染症事例に対応することが重要である。本研究では、標準プロトコルでの精度管理を継続し、データベース構築に基づく迅速か

つ有益な情報共有システムを機能させることを目的とする。

B. 研究方法

1) 標準化プロトコルに基づいて我が国の解析技術の均一化、およびその精度管理を行う。そのために、全国に75ある地方衛生研究所（地研）を6ブロックにわけ、ブロックごとに各種の菌についてPFGE解析を行い、その有効性、および精度管理を行う。

2) 新しく作成した解析ソフト（Fingerprinting II）を使用してPFGE画像を処理することにより、お互いの菌の相同性を識別し、離れた場所あるいは離れた時間において分離された菌が同一汚染原因由来のものかどうかを判定する方法を開発する。2004年に引き続き2005年3月にも香港において、標準化プロトコルによる技術研修会が開催された。我が国のPFGE解析技術の検証を行うためにも、各国のデータとの比較を目的としてデータの提示を行う。

C. 研究結果と考察

1. 感染研における研究

腸管出血性大腸菌（EHEC）及び赤痢菌について、CDCから分与された標準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株を用いたデータベースの構築を行った。EHECについては、従来のサブタイプ名の他に解析ソフトによる系統樹作成に基づいて新タイプ名の付与を行った。EHEC 0157 では、2004年に分離された1987株に対して957種類のサブタイプがあり、026では507株に対して230種類のサブタイプに

分類された。新プロトコールによるデータの互換性を示す事例として、日米で発生した腸管出血性大腸菌 0157 及び *Shigella sonnei* による 2 事例において両国における PFGE 解析結果が一致し、原因究明、予防対策につながった。一方、わが国では、広域共通パターンを示す EHEC 株については、*Xba*I 消化でのパターンが同一と考えられる 0157 では、3 ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが 28 種類存在し、そのうち 6 箇所以上の都道府県で分離されたパターンは 3 種類存在していた。広域共通パターンについては、従来の目視によるサブタイピングよりも高精度での検出が可能であり、頻度が低いパターンにおいても見逃すことなく検出できた。しかしながら、解析ソフトでは同一パターンとなるにもかかわらず、目視ではパターンの相違を見つけられる場合もあり、パターンが一致するか否かについては最終的には目視による確認が必要と考えられた。

2004 年分離の EHEC 0157 では、沖縄県で患者及び原因食である冷凍ハンバーグから分離された 0157 の PFGE パターンについて、CDC に 0157 データベースでの照会を依頼した。感染研から送付した当該菌の PFGE パターンについては CDC のデータベースでの照合が可能であり、EXHX01.1509 のパターン名が付与された。2004 年 8 月には、ハワイから日本への帰国者において *S. sonnei* の集団発生事例があり、ハワイから米国本土への帰国者においても *S. sonnei* が分離されている状況について、PulseNet を通じて米国側から情報提供があった。日本国内 12 名の該当旅行者からの分離株と米国での分離株のパターンにつ

いて CDC と感染研において画像の交換を行い、PFGE パターンが一致していることが確認できた。

2004 年に分離された EHEC 0157 については、1987 株が 957 種類のサブタイプに分かれた。そのうち 28 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されている広域共通パターンであることが示唆された。このうち、No. 5, 52, 112, 191, 292, 465, 589 の 7 種類のパターンについては、5 箇所以上の異なる都道府県において分離されており、*Xba*I の結果だけではなく *Bln*I の結果においても同一パターンを示していることから極めて clonality の高い株であることが示唆された。

広域共通パターンを示す株が引き続いて分離されていることから、これらの株の解析については、PFGE 以外の分子生物学的方法である MLVA (Multi-Locus VNTR Analysis) 等についてもその実用性について検討する必要があると考えられた。

平成 16 年においても、複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果 (PFGE の画像) の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送あるいは PulseNet Japan の掲示板において公開し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。容易なアクセスで情報が入手できるように Internet 利用による情報の提供も検討中である。具体的には、感染研のホームページ上で地研等に対してユーザー名とパスワードによる管理を行って

の限定公開を想定している。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックの衛生研究所7施設においてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) の画像解析について施設間差を検討した。PFGE の手法については、昨年度、国立感染症研究所 (感染研) によって示された米国 CDC 法をベースとした方法に従って実施した。北海道立衛生研究所において個別に3枚の PFGE 画像を用意した。画像1, 2は出血性大腸菌 0157、画像3はサルモネラ菌血清型エンテリティディスを用いた。この PFGE 画像3枚を衛生研究所6施設に送付し、それぞれの施設において解析ソフトである Fingerprint II (バイオラッド社) を用いて解析を実施した。北海道立衛生研究所がそれらの解析結果を回収し、施設間差について比較検討を行った。それぞれの画像を個別に解析すると、得られたデンドログラムの分岐パターンはすべて一致した。また、複数の PFGE 画像を組み合わせて解析した場合においてもそのデンドログラムは各施設において同じ形状を示した。一方、分岐パターンに基づく株間の類似性 (%) を比較すると、分岐位置によって多少の違いが認められた。そこで、株ごとに解析に用いるバンドの数を比較したところ、そのレンジは0から4であり、PFGE パターンにより差が生じることが示された。このことから、解析に用いるバンドの数が類似性の違いに影響していることが推察される。統一マニュアルの採用など数回の精度管理を経て、手技的にはほとんどの施設が一定の技術レベルにあるように思われた。

そこで今回は、解析ソフトを用いた解析結果についてその施設間差を評価した。北海道・東北・新潟ブロックにおいて、定常的に解析ソフトを使用していたのは全部で7施設であった。

3種類の PFGE 画像を解析したときの施設間差について検討したところ、デンドログラムの形状、つまり菌株の分岐パターンは同じであり、これについては同じ情報を得ることができた。これによってスタンダードを用いたゲルの標準化が適切になされていることが示された。次に、各分岐点における similarity (%) を比較した結果、分岐点によっては施設間によって若干の違いが認められた。しかし、CDC から提供されたサルモネラ菌の制限酵素処理産物をスタンダードとして用いることにより、この問題は解消された。次に解析のためのバンドを認識させるが、このときにどのバンドを選択するかは解析結果に影響するものと考えられる。

その結果、菌株により、バンドの認識の違いが認められた。すなわち、菌株3では全施設が19本のバンドを選択したが、菌株9および10では施設によって4本の違いがみられた。認識したバンドの数と similarity の度合いとのあいだに何らかの関連性が認められた。このことは、1, 2本のバンドしか違わないような株を比較するときの影響が出るかもしれない、従って多数の株を解析する際には注意をする必要があることを意味する。解析に用いたバンドの数を比較した成績から、バンドを多く認識すると similarity が低くなる傾向がみられた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

関東甲信静に分散する 11 地方衛生研究所（地研）において、腸管出血性大腸菌 0157 を中心に細菌学的疫学指標としての PFGE 法による解析技術の向上、均一化、特に解析ソフトで解析できる PFGE 解析結果を得るための検討を行った。すなわち、“New protocol” に従って薄型の DNA ブロックを作製し、*S. Braenderup* を分子量マーカーとして、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行った結果、非常に鮮明な PFGE 像が得られ、その後の解析ソフトを利用したデンドログラム作成に非常に有利であった。各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として、腸管出血性大腸菌 0157:H7 (VT1+VT2 産生株: 2 株 および VT2 産生株: 4 株) 6 株を供試した。EHEC 0157 株: 各地研で 8 月～9 月に分離された EHEC 0157 株を各地研毎に最大 12 株を供試した。

Salmonella serovar Enteritidis (SE) 株: 各地研毎に、平成 16 年度に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例由来の SE 株を供試した。腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌株を 11 地研でほぼ同一の条件下で PFGE 解析を行い、その成績を東京都健康安全研究センターに電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた結果、78.2kb 以上の DNA バンドを対象にしてデンドログラムを作成した場合、同一株は、どの施設で PFGE を行った場合も 90% 以上の類似性がえられ、現実的に使える見通しがついてきた。

各研究所は、いずれも実際に発生した集団および散発の感染症・食中毒事例について、独自に PFGE 法による解析を実施し、非常に有

効であった事例を多数経験した。それに伴い PFGE 解析技術も進歩し、パルスネット構築のための環境整備が図られてきた。

腸管出血性大腸菌 0157 の PFGE パターン系統解析ソフトウェアとして、Fingerprinting II Ver. 3 (Bio Rad) を用いて、Dice 法で解析しているが、Peason 法の方が使い易いのではないかという結果が得られたが、さらに検討する必要がある。

また、サルモネラ血清型 Enteritidis の解析に PFGE 解析を応用することを検討した結果、それぞれ患者由来株や原因食品由来株と比較が出来、良好な成績が得られているが、EHEC 0157 に比較すると PFGE パターンの多様性が少なく、さらに検討する必要性が示唆された。

4. 東海・北陸ブロック

本研究では、1982 年から 2003 年の約 20 年間に愛知県内で検出された 139 株のソネネ菌についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施し、その画像をデータベースとして保存した。そして、そのデータベースを用いて解析を行ない、過去約 20 年間での PFGE 型の推移、国内感染事例株と国外感染事例株との PFGE 型の比較等の分子疫学的解析を実施した。

139 株は 19 の PT に型別され、106 株 (全体の 76.3%) が含まれた。

19PT のうち、PT1 が 39 株と最も多くの菌株が含まれ、以下 PT2 (n=10)、PT3 (n=9)、PT4 (n=6)、PT5 (n=5)、PT6 及び PT 7 (n=4)、PT8 から PT 12 (n=3)、それに、PT13 から PT 19 (n=2) であった。一方、残りの 33 株は 85% 以

上の相同性を示す菌株が他に認められず、PTには属さず単独で系統樹上に存在した。

ソンネ菌 139 株をその分離年によって前期（1982 年から 91 年まで）と後期（1992 年から 2003 年まで）に分け、検討を加えた。

前期には 50 株が含まれ、このうち 26 株（52%）は 11 の異なった PT に属していた。残りの 24 株（48%）は PT には属していなかった。後期には 89 株が含まれ、80 株（90%）が 15 の異なる PT に属していた。一方、PT に属さないソンネ菌は前期とは異なって非常に少なく 9 株のみ（10%）であった。

19PT のうち 4PT は前期のみに認められ、8 PT が後期にのみ認められた。一方、7PT は前期、後期両方に認められた。そのうち PT1 では属する 39 株のうち 30 株（76.9%）が、PT2 では 10 株のうち 9 株（90%）が、PT3 では 9 株のうち 7 株（77.8%）が後期に認められた。最も多くの菌株が含まれた PT1 では、39 株のうち国内事例が 17 株（43.6%）、国外感染事例が 22 株（56.4%）であった。国外感染事例における感染推定国はインドネシア（n=5）、インド（n=3）、中国（n=3）等であった。次いで多くの菌株が含まれていた PT2（n=10）では国内事例と国外感染事例が同数の 5 株で、国外感染における主な渡航先はインド（n=3）であった。PT4 では 6 株中、国内事例が 4 株、国外感染事例が 2 株であった。

これらの結果から、前期には比較的多数の異なった PFGE パターンのソンネ菌が存在していたが、後期には異なる PFGE のパターン数が少なく、比較的限られた PFGE パターンのソンネ菌のみが存在していたことが判明した。また、お互いに類似した泳動パターン

（PT）を持つものとして型別分類された 19 の PT のうち、13 の PT では国内感染事例と国外感染事例の両者が同一 PT に認められた。

このことから、感染源不明の国内事例の一部はヒト若しくは輸入食品を介して我が国に運び込まれ感染を起こした可能性があることが推察された。しかし、後期では国内事例及び国外感染事例を問わずソンネ菌の PFGE パターンが類似していたこと、赤痢菌が法律上は国内常在菌とされていることから、ソンネ菌の感染源究明に際しては、PFGE 結果の解釈を疫学情報等も充分加味し慎重に行なう必要があると考えられた。

5. 近畿ブロック

実際に広域流行が発生した場合に備え、各施設で日常使用している試薬を用いて PFGE を実施し、電送画像を 2ヶ所の施設で解析して、近畿支部 11 衛生研究所間の施設間差および解析者による変動を検討した。また、泳動バッファーである TBE について、異なるメーカーの製品を使用し、電気泳動像への影響の有無を調べた。

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157:H7 3 株および *Shigella sonnei* 3 株について PFGE 画像解析を行った結果、菌株ごとに EHEC は近似度 91～97%、*S. sonnei* は近似度 85～91% のクラスターを形成し、特に EHEC では 100% 一致する画像も多く、良好な結果が得られた。EHEC O157 は、各施設においても PFGE 実施の機会が多く、毎年精度管理を実施していることから、技術的な差は解消されつつあり、施設間変動は小さくなってきている。

菌株 No. 1、菌株 No. 2 では解析者、使用バッ

ファーに関わらず、93%以上の近似度を示し、半数以上（6～10 画像）で 100%一致するなど良好な結果であった。菌株 No. 3 は、B 解析者では他の菌株と同様の成績であったが、A 解析者では若干ばらつきが見られた。これは、B 解析者の判定した認識バンド数が統一バッファーで 20～22 本、各施設バッファーでは 18 本の 1 画像を除き 21～22 本であったのに対し、A 解析者の判定では、統一バッファーで 18～23 本、各施設バッファーで 17～22 本と最大 5 本異なっており、目視によるバンド認識補正において解析者による差が生じたと考えられる。

S. sonnei については、EHEC 0157 に比べ近似度は低く、100%一致画像も少ない結果であったが、これは、*S. sonnei* のバンド数が EHEC 0157 よりも多く、両解析者ともに認識バンド数のばらつきが大きくなったことが影響したと考えられる。

昨年度までは、同一ロットの試薬を使用して PFGE の施設間変動について検討してきたが、今回の成績から、試薬や泳動バッファーの統一は必要ないと考えられる。今後各施設で均質な画像を得るため、技術の向上はもちろんのこと、トランスイルミネーターの紫外線波長や強度の統一、写真撮影あるいは画像取り込み条件の改善を計る必要がある。

画像解析ソフトの自動バンド認識が目視と異なった場合には、解析者が補正を行ったが、菌株によっては認識バンド数にばらつきがあり、これは画像のコントラストに施設間差があるためと考えられた。解析者の主観を最小限にとどめるためにも、画像のコントラストを均質にする必要があり、電気泳動装置お

よび画像取り込み装置の保守点検や技術の維持が課題である。

6. 中国四国ブロック

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の一環として、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) の標準化と PFGE により解析された画像を基盤とした分散型情報システム (パスネット) 構築のため、昨年度に引続き、検査施設間における PFGE 技術の精度管理を行った。

また、PFGE 以外の新しい分子疫学的方法として、Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) による解析を行い実用性について検討した (詳細は該当頁参照)。

精度管理には中・四国地区の地方衛生研究所 (地研) 9 施設が参加し、PFGE タイプの異なる腸管出血性大腸菌 0157 (O157) 4 株を供試菌株として、新しいプロトコールによる PFGE を実施した。さらに、異なった 2 つの集菌方法による PFGE 画像の影響についても比較・検討を加えた。

精度管理の結果、概ね良好な画像が得られたが、3 施設の作成した画像の一部に不鮮明な個所が認められた。また、画像解析ソフトによるクラスター解析で施設間の差異を確認したところ、0157 の 4 株はそれぞれ異なるクラスターを形成 (近以性 55～100%) したが、不鮮明な画像のクラスターは低い値 (近以性 55%) であった。

2 種類の集菌方法で行った PFGE の画像を比較したところ、各施設とも比較的高い類似度 (95～100%) で、同様なクラスターを示し、

集菌方法の違いによる画像の差異が見られなかった。しかし、A、F施設の一部の菌株では85%、90%と解析結果に差異が生じる傾向を示した。

現在、中・四国地区の10地研では感染研ニュープロトコールに準拠してPFGEを実施しているが、パルスネットを構築し、diffuse outbreakの早期発見に成果を上げるには各施設の検査技術の維持が必要であり、精度管理は不可欠である。今年度は昨年度不参加の2施設(D施設、F施設)も精度管理に加わった。精度管理の結果、各施設間で比較する画像が得られたため、中・四国地区の地研では新しいプロトコールよるPFGE技術が概ね取得されたと考えられる。しかし、3施設の作成した画像の一部に不鮮明な個所が認められ、クラスター解析で施設間の差異を生ずる原因となった。A施設ではその画像から試料の作製課程の再確認と泳動条件の改善等が必要と思われた。また、D施設、F施設の画像はコントラストが低く、分子量の小さなバンドが認識されない傾向が見られた。これは写真撮影時の技術的な問題によるものと思われたが、今回の精度管理では写真撮影時の統一した条件を示していない。写真撮影時にはコントラストの高い鮮明な画像が得られるように撮影技術の標準化が必要と考える。

今後、これらの問題点の改善と更なるPFGE解析手法の標準化を推進し、各施設のPFGE技術を向上することが必要と思われた。

7. 九州ブロック

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・防止に組むため、平成16年度は①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、②黄色ブドウ球菌の食中毒由来株と病院由来株の比較、③A群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討、④Campylobacter jejuni分子疫学解析の検討、⑤食中毒及び感染性胃腸炎原因物質の臨床症状、⑥レジオネラ属菌についてのPFGE画像の機関間差の検討及び九州地区で検出されたレジオネラ属菌のデータベース化についての基礎的研究の6課題について実施した。

①研修と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の分離度は良好であった。しかし、泳動距離が施設間によって異なり、泳動結果に影響が見られた。菌株の精度管理の結果は、DNAの未消化の断片の影響と考えられるバンドによりバンド数が異なる結果となった。DNAの未消化の問題は、DNA量や消化反応時間等の検討が必要である。

②黄色ブドウ球菌の細菌学的疫学指標は、表現型と遺伝子型に大別される。表現型指標としてコアグララーゼ型別及びエンテロトキシン型別が、遺伝子型指標としてパルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別法の疫学的指標としての有用性について検討を行なった。その結果、コアグララーゼ型別とエンテロトキシン型別の組み合わせでは疫学的指標としては不十分な場合が多く、パルスフィールドゲル電気泳動による遺伝子型別が不可欠であることが分かった。

③由来が異なるA群溶レン菌株について、

PFGE の方法、その有用性について検討するとともに、発赤毒遺伝子型（以下、*spe* 型）についても併せて検討した。

その結果、制限酵素 *Sma* I および *Sfi* I とともに Mutanolysin 処理した方が明瞭なバンドが得られた。制限酵素により泳動パターンに違いが認められたことより、*Sma* I および *Sfi* I の 2 種類の制限酵素を組み合わせる解析することが望ましいものと考えられた。また、T-B3264 は *speB* 遺伝子を保有し、T-28 は *speB*, *C* 遺伝子を保有しており、由来による差は認められなかった。

④ *Campylobacter jejuni* のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による解析画像を、異なる機関間で有効活用するために、同菌の PFGE マニュアルの作成、画像解析およ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。

⑤ 集団食中毒の発生初期段階において、症状等の疫学的調査結果から得られた具体的な数値から原因物質を推測し、検査方針を決定するのに必要な資料を得ることを目的に、過去 5 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 10 原因物質について、原因物質が検出された患者 646 症例の臨床症状等を集計し、その特徴について解析を行った。

⑥ レジオネラ属菌の細菌学的疫学指標データを有効活用するため、平成 15 年度に引き続き、標準菌株についてパルスフィールド電気泳動法 (PFGE) 画像の精度管理を 5 機関で、各機関分離株について PFGE 画像の同一性比較を 6 機関で実施した。

その結果、標準菌株 5 株の PFGE パターンは、それぞれの菌株で 80% 以上の類似性が見られ

たが、異なる機関間の画像を解析するためには、より高い類似性を持つ安定したデータが必要と思われた。

D. 結論

腸管出血性大腸菌のみならず、サルモネラ、赤痢菌においても多国間に及ぶ広域流行が発生しており、我が国においても世界的に共通のプロトコールに基づく PFGE 解析を一層普及させ、データの相互比較を可能にさせる必要がある。多国間に及ぶ広域流行解析には不可欠である。国内のシステムを充実させるための一手段として解析方法の技術的な精度管理が重要であるとともに、情報共有のための手段として Internet 利用の情報還元システムも推進すべきと考えられた。PFGE 解析のネットワークの中核となる全国の地研が解析技術を維持し改良できるような組織的支援システムが求められている。

E. 特許等

特になし。

F. 健康危害情報

依然として腸管出血性大腸菌感染症は重要な問題であり、広域散発事例 (diffuse outbreak) がかなり見られる。その発生を迅速に検知し、被害の拡大を未然に防ぐ努力が求められている。また、食品を介する感染症は国を超えて伝播するので、その監視および対策において国際的なネットワークの構築を進める必要がある。

研究課題名:「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」

分担研究報告書

分担研究者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者	泉谷秀昌	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
協力研究者	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び赤痢菌について、CDC から分与された標準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株を用いたデータベースの構築を行った。EHEC については、従来のサブタイプ名の他に解析ソフトによる系統樹作成に基づいて新タイプ名の付与を行った。EHEC O157 では、2004 年に分離された 1987 株に対して 957 種類のサブタイプがあり、O26 では 507 株に対して 230 種類のサブタイプに分類された。新プロトコールによるデータの互換性を示す事例として、日米で発生した腸管出血性大腸菌 O157 及び *Shigella sonnei* による 2 事例において両国における PFGE 解析結果が一致し、原因究明、予防対策につながった。一方、わが国では、広域共通パターンを示す EHEC 株については、*Xba*I 消化でのパターンが同一と考えられる O157 では、3 ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが 28 種類存在し、そのうち 6 箇所以上の都道府県で分離されたパターンは 3 種類存在していた。広域共通パターンについては、従来の目視によるサブタイピングよりも高精度での検出が可能であり、頻度が低いパターンにおいても見逃すことなく検出できた。しかしながら、解析ソフトでは同一パターンとなるにもかかわらず、目視ではパターンの相違を見つけられる場合もあり、パターンが一致するか否かについては最終的には目視による確認が必要と考えられた。

A. 研究目的

標準となる CDC プロトコールとの互換性を確保した新プロトコールを採用しデータベースを構築することにより、広域発生事例の原因菌を早期に特定し対策に反映することを目的とした。また、構築したデータベースに基づいて行うサブタイピングにより、EHEC O157 及び O26 に対しては新サブタイプ名での識別能について検討した。

B. 研究方法

平成 16 年度に感染研に送付された株に対して、平成 15 年度に設定した新プロトコールによる PFGE 解析を行った。Fingerprinting II (BIO-RAD 社)による画像解析は、新しい標準マーカーである *S. Braenderup* H9812 株のパターンを用いて行い、データベースを構築した。新サブタイピングでは、新規に解析した分離株のパターンを含んだデンドログラムを作成し、新しいパターンに対しては、順

じ新番号を付与することで新パターン名を付けた。バンドパターンに一本でも差が観察されれば異なる番号を付与した。デンドログラムの作成では、クラスター解析を行う方法として UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages)法を用い、近似度の計算には Dice 係数を使用した。PFGE 解析結果、デンドログラム及び新サブタイプ名については、従来と同様ほぼ1ヵ月おきに WISH 上の個別システム「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。広域食中毒事例などへの迅速な対応が必要であると考えられる場合には、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の PFGE 画像配信を行った。また、米国等、海外由来株が原因と考えられる場合には CDC のデータベースへの照会を行った。

C. 研究結果と考察

1. 新プロトコールによる PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイピング

平成 15 年度に検討した新プロトコールに基づいて国内で分離された EHEC 及び赤痢菌について PFGE 解析を行った。EHEC O157 については、2004 年に分離・送付された 1987 株が 957 種類のサブタイプに分かれ、集団発生由来株等がクラスターを形成した(図 1)。また、後述するように、散发事例由来株においても *Xba*I 消化による PFGE 解析結果では同一クラスターに属すると考えられる分離株も検出され、関連性を疑うような株の探知にも有用である可能性が示された。EHEC のその他の血清型である O26, O111 についても同じような傾向が見られたが、O157 株で観察された程度の頻度では、同一クラスター内に存在する散发事

例由来株が見つからなかった。したがって、クラスターを形成する株は集団発生由来株であり、ほとんどの株は異なるサブタイプであることが示唆された(図 2,3)。なお、Fingerprinting II によるデンドログラム作成では、CDC が推奨しているトレランス値 1.2%を使用した⁶⁾が、*Xba*I-100%マッチであるパターンにおいても目視では相違が見出される場合があり、同一クラスター内でもサブタイプ名の異なるパターンが検出された(図 4, 5)。実際、同じ菌株を *Bln*I 消化での PFGE 解析を行うと、異なるバンドが検出できるので、*Xba*I 消化での PFGE 解析結果で観察された微妙な違いが菌株の clonality によるものであることが確認できた(図 4, 5)。したがって、デンドログラムに基づいたサブタイピングにおいても、目視による確認を行いながらサブタイプ名を確定する必要が示唆された。

2. データの互換性について

2004 年分離の EHEC O157 では、沖縄県で患者及び原因食である冷凍ハンバーグから分離された O157 の PFGE パターンについて、CDC に O157 データベースでの照会を依頼した。その直後の報告ではわが国同様、CDC においても該当するパターンが見られなかったが、PulseNet USA の WebBoard 上にこのパターンが掲載されると、日本での分離の約半年ほど前にカリフォルニア州において同一パターンを示す O157 が分離されていることが明らかになった。感染研から送付した当該菌の PFGE パターンについては CDC のデータベースでの照合が可能であり、EXHX01.1509 のパターン名が付与された。なお、沖縄での原因菌分離後、わずか 2 週間で米国の製造会社によるリコールが行われた影響もあり、新規の患者発生は見られなかった。2004 年 8 月には、ハワイから日本への帰国者において *S. sonnei* の集団発生事例

があり、ハワイから米国本土への帰国者においても *S. sonnei* が分離されている状況について、PulseNet を通じて米国側から情報提供があった。日本国内 12 名の該当旅行者からの分離株と米国での分離株のパターンについて CDC と感染研において画像の交換を行い、PFGE パターンが一致していることが確認できた。なお、実際に菌株を交換してそれぞれに PFGE を行った結果も一致していることから、赤痢菌の PFGE 標準プロトコールにおいても互換性が確立していることが確認できた。この事例においては、2 種類のパターンが見られたが、日米ともにこれらのパターンが一致した(図 6)。

3. EHEC における広域共通パターンについて

2004 年に分離された EHEC O157 については、1987 株が 957 種類のサブタイプに分かれた。そのうち 28 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されている広域共通パターンであることが示唆された。このうち、No. 5, 52, 112, 191, 292, 465, 589 の 7 種類のパターンについては、5 箇所以上の異なる都道府県において分離されており、*Xba*I の結果だけではなく *Bln*I の結果においても同一パターンを示していることから極めて clonality の高い株であることが示唆された。多種類のパターンを示す O157 が年間を通じて分離されている一方で、これらの広域分離株については比較的短期間に分離された集中型 (No. 5, 292 など) と、ほぼ年間を通じて分離される散在型 (No. 52, 112 など) がある傾向が見られた(図 7)。また、これらの株の分離地については、集中型のパターンにおいても広域にわたって分離されている株 (No. 292) と比較的限局された地域で分離されている株 (No. 5) が見られた(図 8)。No. 112 につい

ては、2001 年以來の広域流行株が示すパターンであり、2004 年分離株中では約 2% の頻度で検出され、その分離地も広域であった(図 9)。2001 年には約 20% の頻度で日本各地から分離されていたことに比べると、その頻度は減少したとはいえ、まだ広域から分離されており、蔓延している可能性を含めてその動向に注意すべきパターンであると言える。その他にも分離期間はさまざまであるが、広域から分離されているパターンである株が数種類検出された(図 10)。一方、EHEC O26 については、*Xba*I の結果から同一と考えられるパターンで異なる 2 県から分離されているパターンが 3 種類あり (No. 12, 28, 62)、異なる 9 県から分離されている広域共通パターンが 1 種類 (No. 26) 検出された(図 11)。その他の血清型では送付菌株数も少ないが、広域から検出される共通パターンは見られなかった。

広域共通パターンを示す株が引き続いて分離されていることから、これらの株の解析については、PFGE 以外の分子生物学的方法である MLVA (Multi-Locus VNTR Analysis) 等についてもその実用性について検討する必要があると考えられた。

4. 「PulseNet Japan」上での公開

2004 年分離株として感染研に送付されている EHEC 株は 2005 年 2 月現在 2690 株であり、O157 が 1987 株、O26 が 507 株、残りは他の血清型等であった。平成 16 年においても、複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果 (PFGE の画像) の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送あるいは PulseNet Japan の掲示板において公開し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料