

図5 画像2におけるsimilarityの比較(%)

ポイント	施設				Av	SD	Range			
	A	B	C	J						
a	82	75	80	78.05	80.01	76.19	80.01	78.8	2.28	7

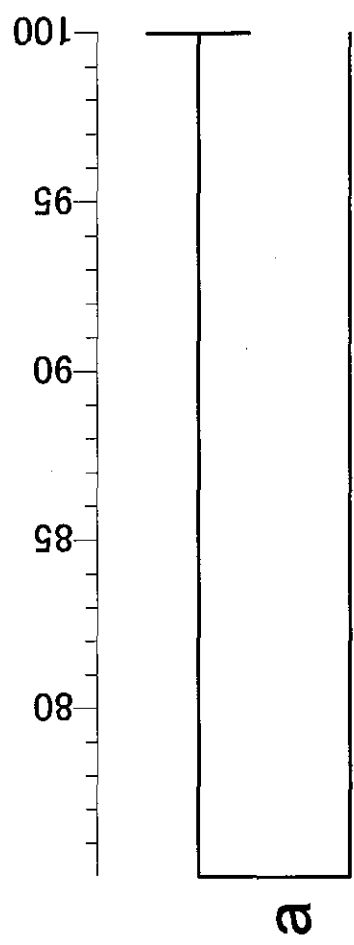
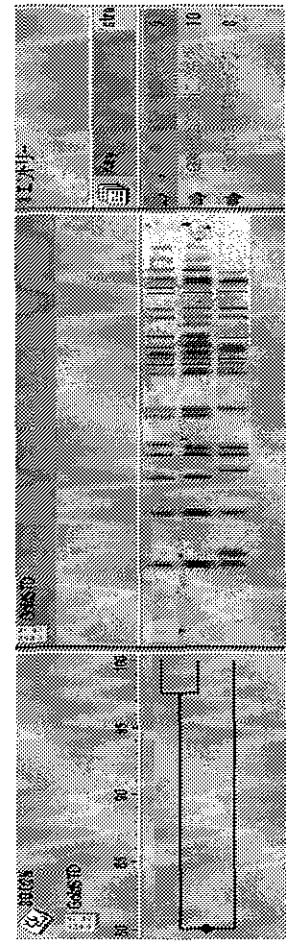
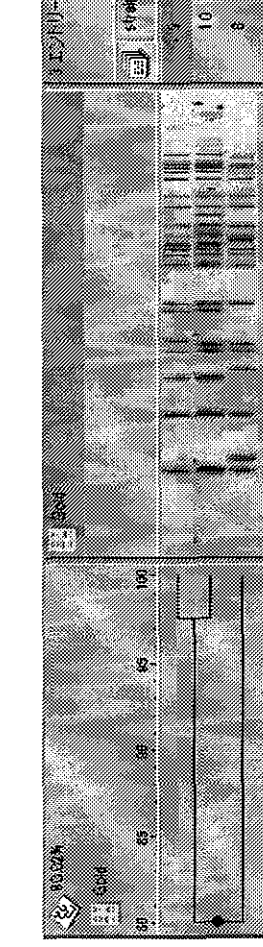
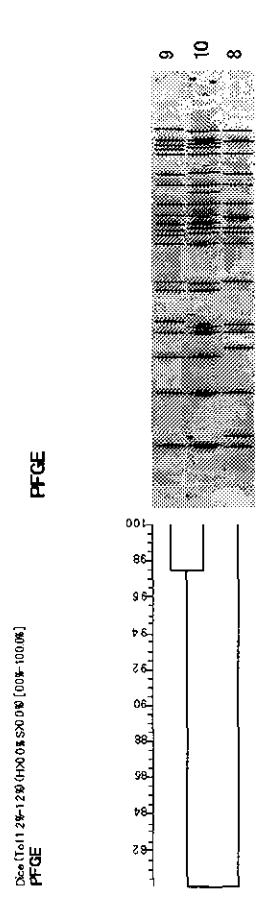
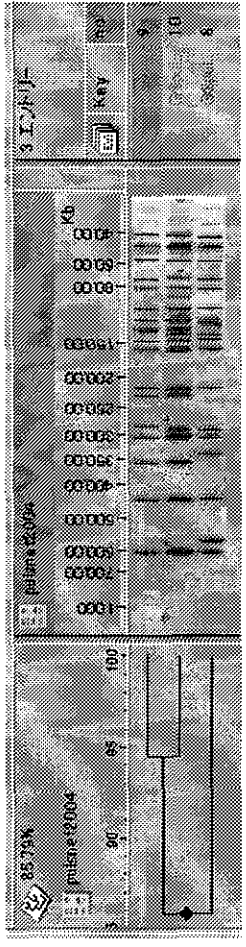
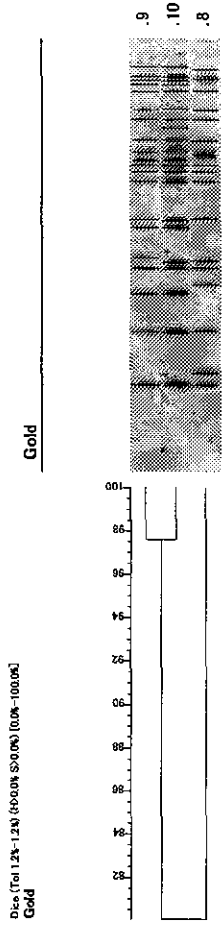
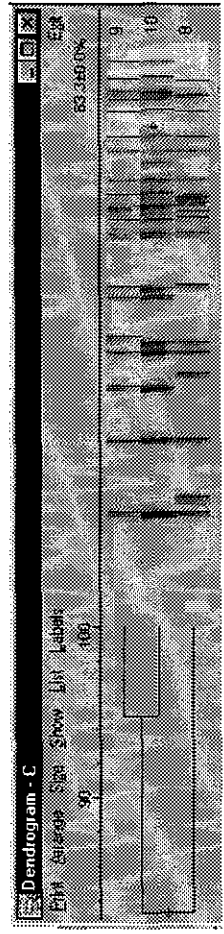


図6 画像3での比較



- 施設A 施設H
- 施設B 施設I
- 施設C 施設J
- 施設E

図7 画像3におけるsimilarityの比較(%)

ポイント	施設						Av	SD	Range	
	A	B	C	E	H	I				J
a	83.3	82.98	80.1	80.02	80.02	85.79	80.02	81.7	2.14	5.77
b	94.7	90.91	97.6	97.57	97.56	94.45	97.57	95.8	2.38	6.69

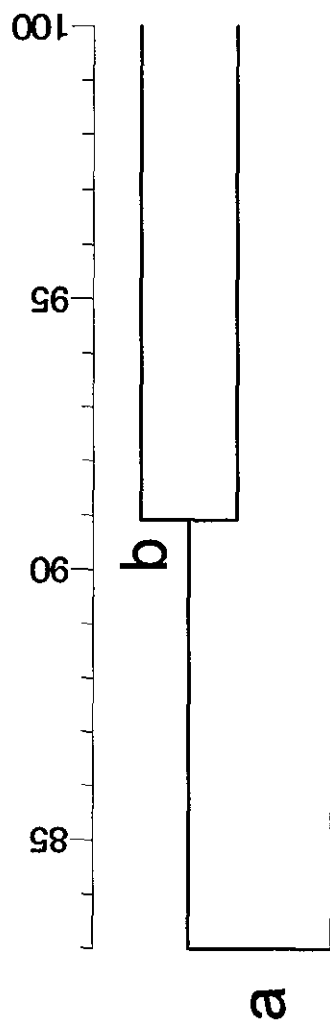
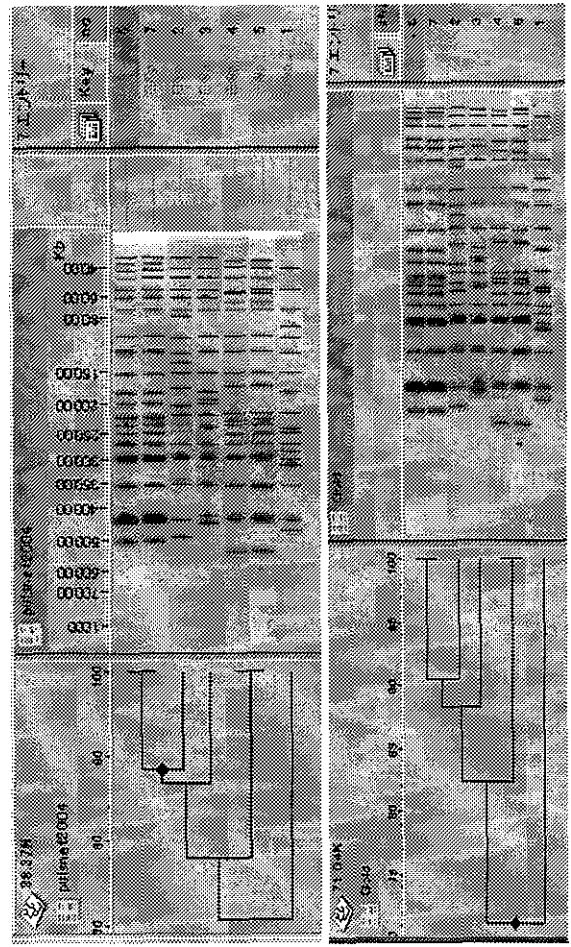
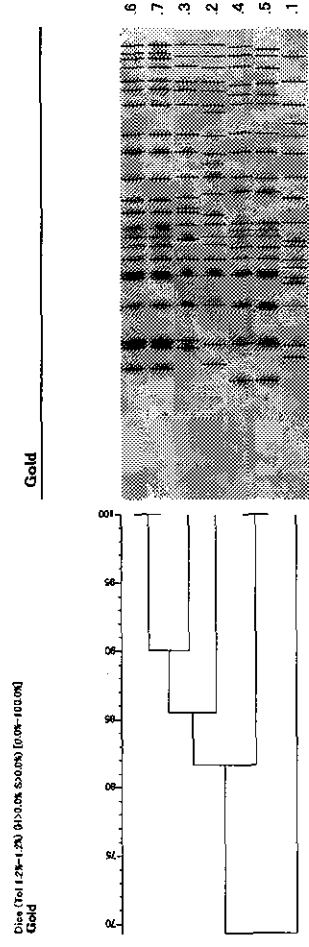
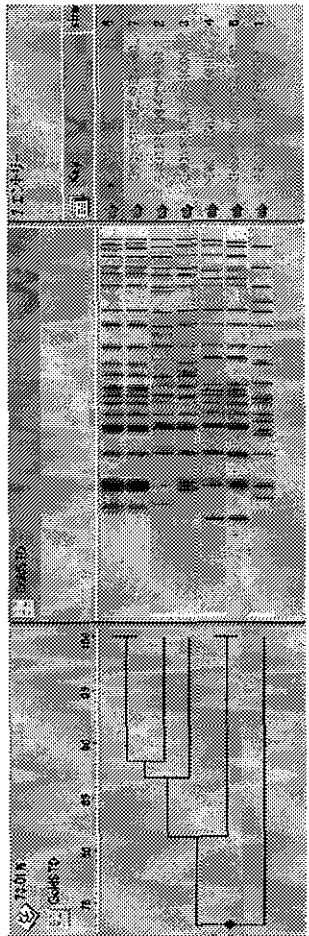
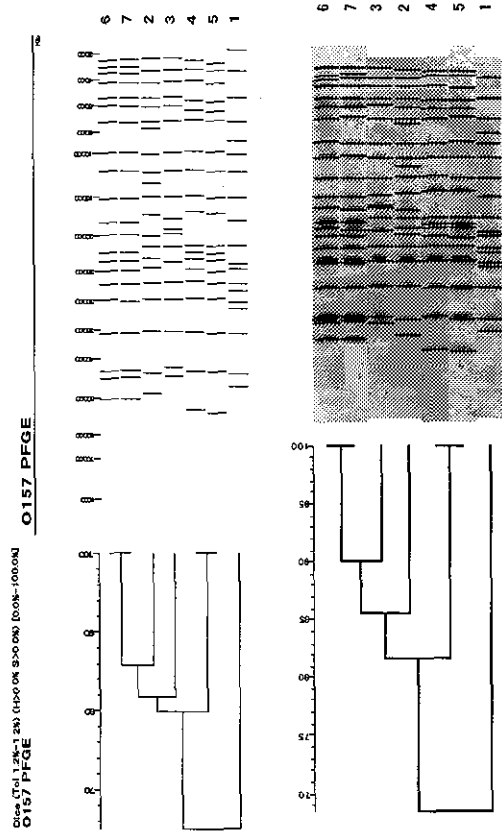
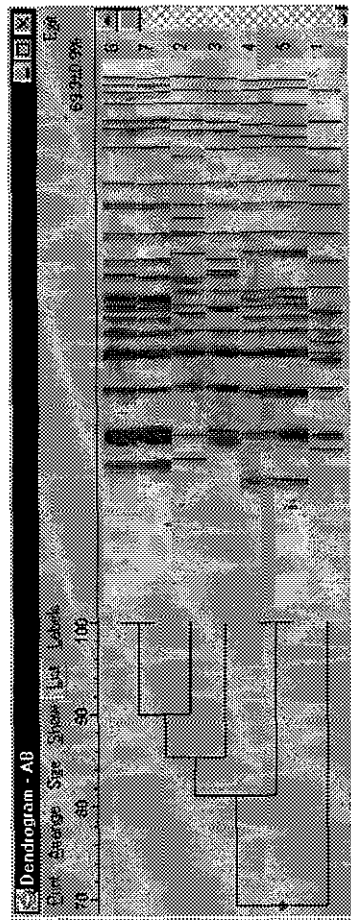


図8 画像1, 2での比較



施設A 施設H  
 施設B 施設I  
 施設C 施設J  
 施設E

図9 画像1, 2におけるsimilarityの比較(%)

ポイント	施設										Av	SD	Range
	A	B	C	E	H	I	J						
a	69.3	64.96	68.5	73.01	69.33	70.66	71.04	69.5	2.32	8.05			
b	81.3	79.95	81.6	81.33	81.65	78.07	82.31	80.9	1.33	4.24			
c	85.5	81.67	85.5	86.87	85.49	86.87	88.34	85.7	1.93	6.67			
d	90	85.72	90	88.37	90.01	88.37	90.48	89.0	1.55	4.76			

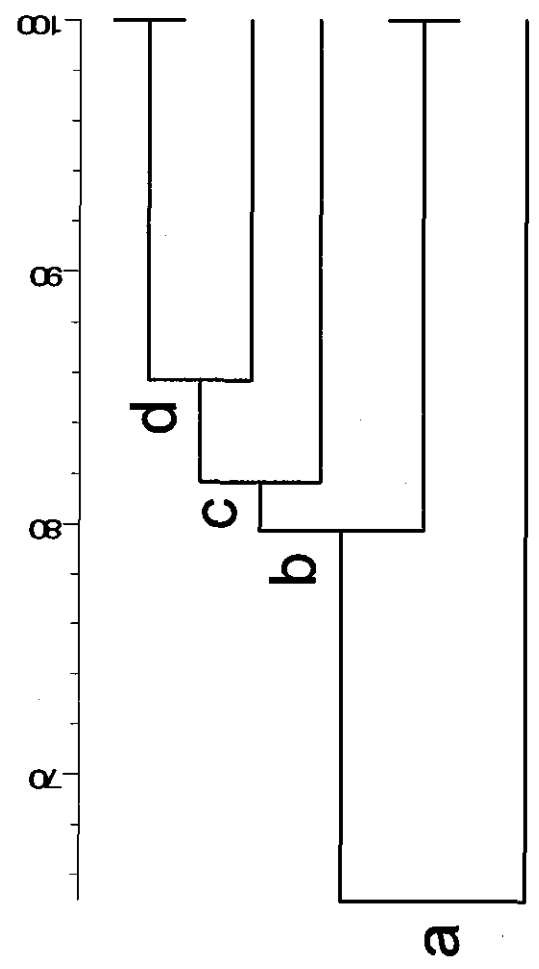
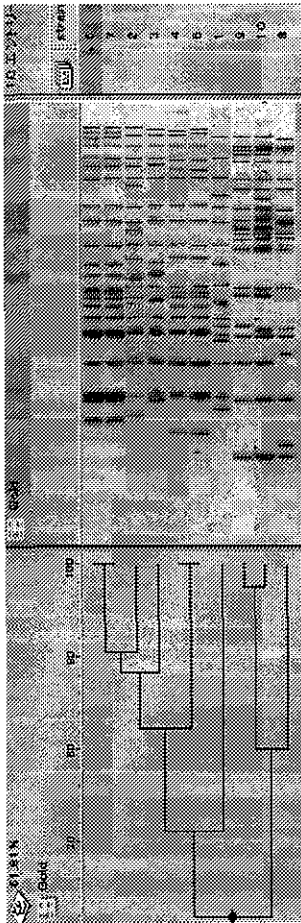
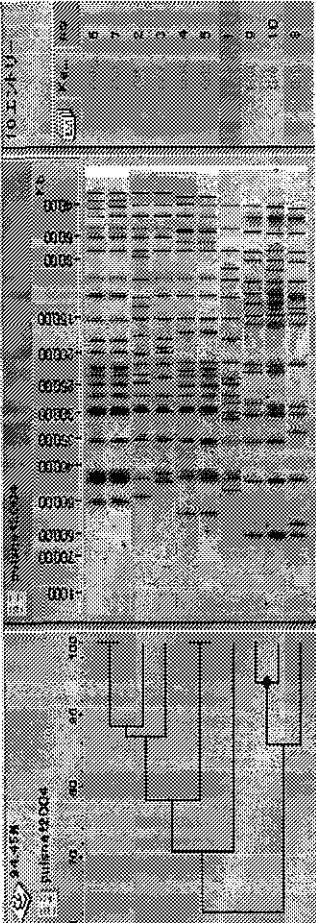
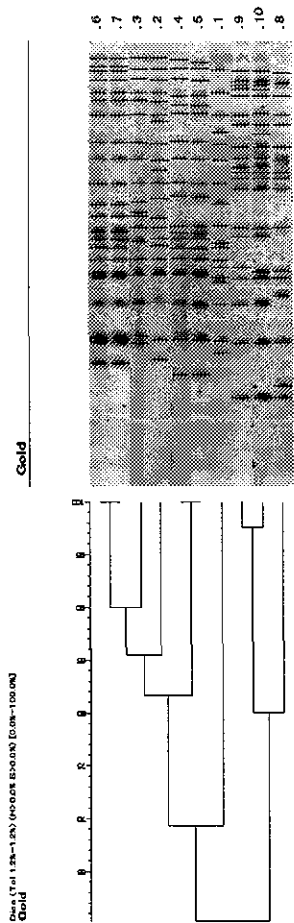
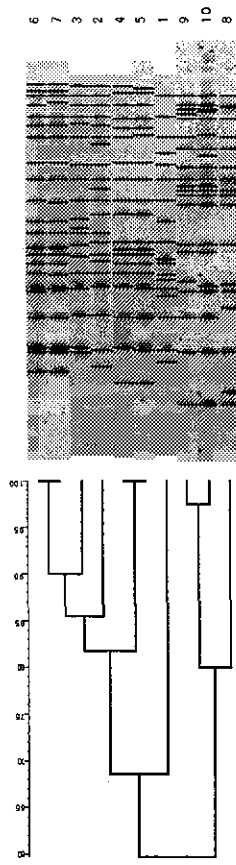
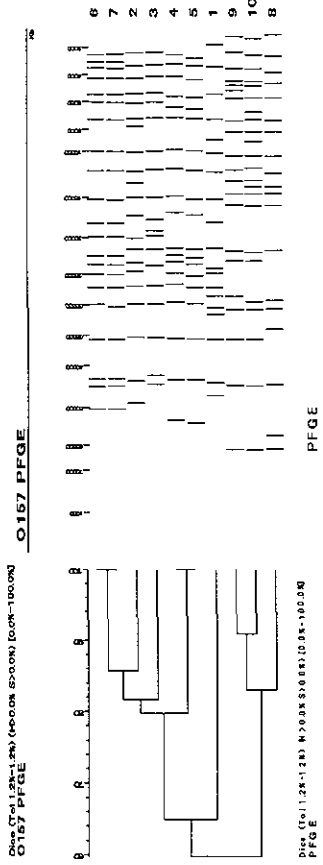
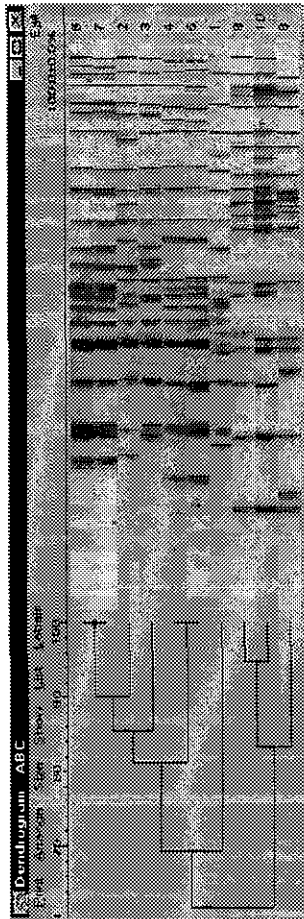


図10 画像1, 2, 3での比較



施設A 施設H  
 施設B 施設I  
 施設C 施設J  
 施設E 施設J

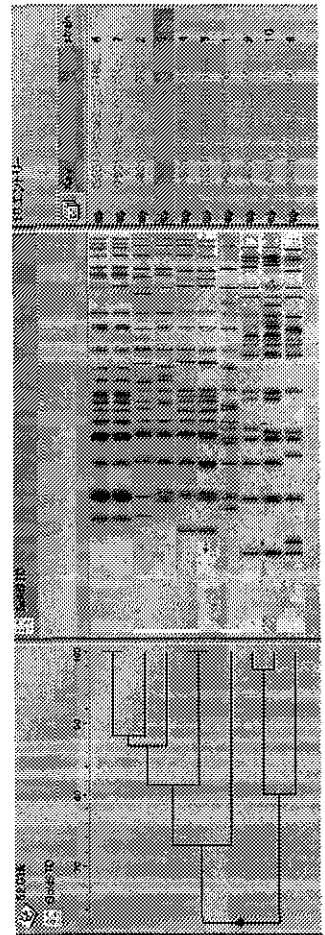
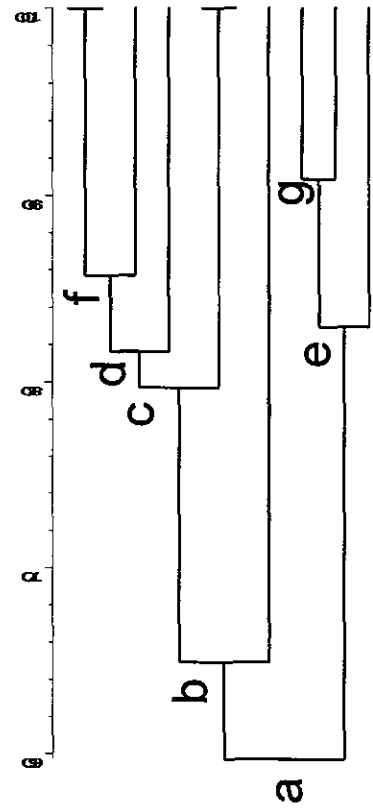


図11 画像1, 2, 3におけるsimilarityの比較(%)

ポイント	施設										Av	SD	Range
	A	B	C	E	H	I	J						
a	61.6	59.72	59.6	62.03	60.32	62.21	61.68	61.0	1.03	2.61			
b	69.3	64.96	68.5	73.01	69.33	70.66	71.04	69.5	2.32	8.05			
c	81.3	79.75	80.1	80.02	80.02	78.79	80.02	80.0	0.68	2.51			
d	83.3	81.67	81.6	81.33	81.65	85.79	82.31	82.5	1.47	4.46			
e	85.5	82.98	85.5	86.87	85.49	86.87	88.34	85.9	1.55	5.36			
f	90	85.72	90	88.37	90.01	88.37	90.48	89.0	1.55	4.76			
g	94.7	90.91	97.6	97.57	97.57	94.45	97.57	95.8	2.38	6.69			



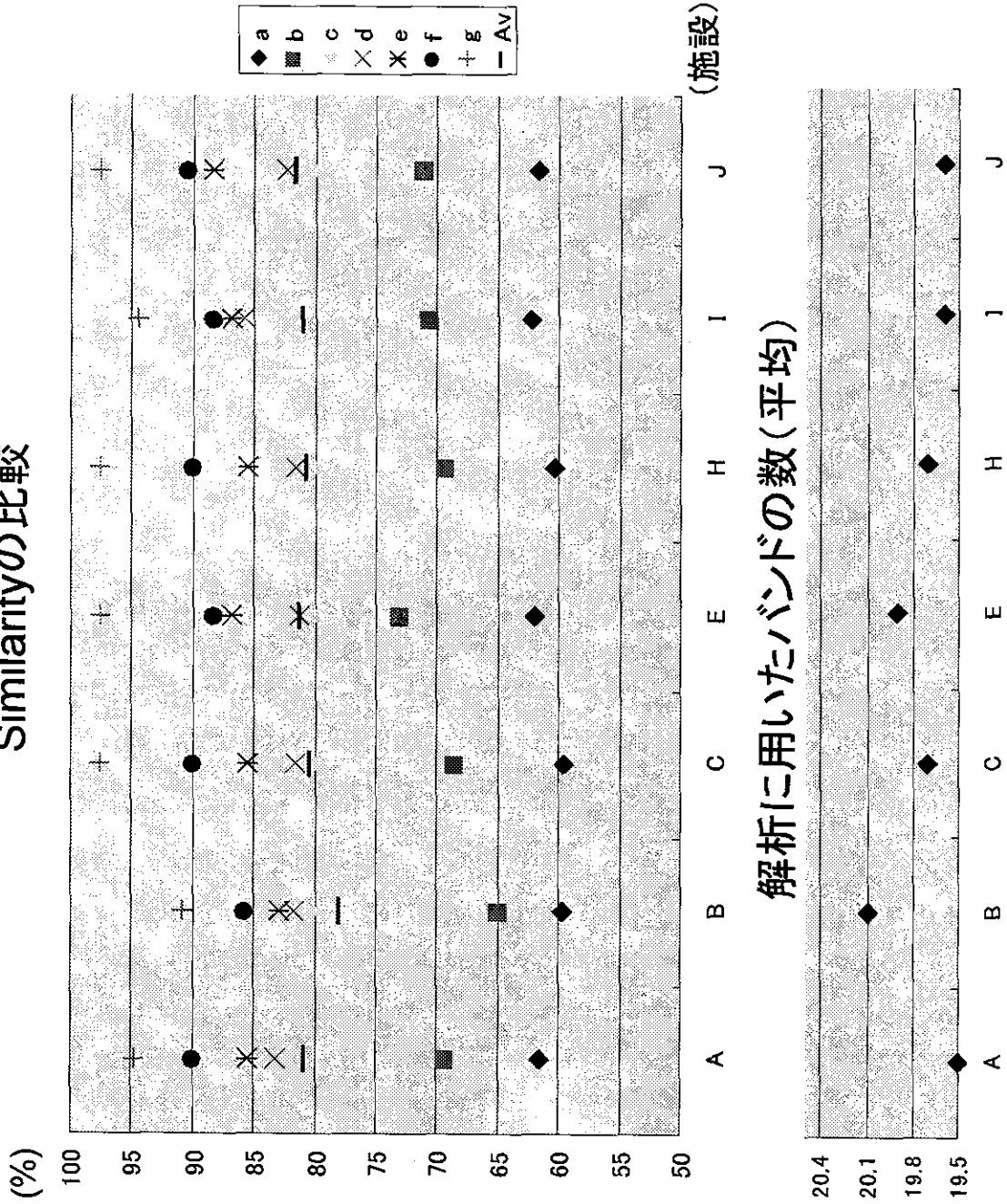
# 表1 解析に用いたバンドの数の比較

株	施設										Av	SD	Range (最大値-最小値)
	A	B	C	E	H	I	J						
1	20	18	18	19	18	18	18	18	18	18	18.4	0.73	2
2	20	21	21	21	21	21	21	21	21	21	20.9	0.35	1
3	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19.0	0.00	0
4	19	19	19	19	19	19	19	20	20	19	19.1	0.35	1
5	19	19	19	19	19	19	19	20	20	19	19.1	0.35	1
6	21	21	21	22	21	21	21	22	22	21	21.3	0.45	1
7	21	21	21	22	21	21	21	22	22	21	21.3	0.45	1
8	17	19	17	17	17	17	17	17	17	17	17.3	0.70	2
9	19	21	21	20	21	21	21	17	17	20	19.9	1.36	4
10	20	23	21	21	21	21	21	19	19	21	20.9	1.12	4



図12 Similarityと解析に用いたバンドの数

Similarityの比較



## 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

北海道立衛生研究所

木村浩一、若森吉広、駒込理佳、長野秀樹

### A. 目的

サルモネラ属菌は、食中毒などの胃腸炎起因菌として広く知られている。特に細菌性食中毒の原因物質として上位に位置している。さらに、本菌は食中毒だけではなく、チフス性疾患の原因菌として公衆衛生上重要な菌である。北海道においても例年、本菌による食中毒事例を経験しているが、集団感染事例の他に散発事例として本菌が多数分離されている。また、本菌には2,000以上の血清型が知られており、特定の血清型による流行パターンも知られている。近年、集団感染事例および散発事例において、血清型 Enteritidis が半数近くを占めており、流行の主流となっている<sup>1)</sup>。このような状況下において、本研究では *Salmonella* Enteritidis (SE) 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の構築を試みた。

### B. 材料及び方法

1996年から2003年までに当所細菌科に同定を依頼され、SEと同定された78菌株を用いた。血清型は市販の抗血清を用いて、O抗原およびH抗原を決定することにより同定された。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)は次に行った。プレート上のコロニーを掻き取り、200  $\mu$ lの滅菌蒸留水に懸濁した(OD<sub>610nm</sub>=0.5-0.6)。200  $\mu$ lの1% Seakem Gold agaroseと混合し、サンプルプラグキャストへ流し込み10-15分間、室温に放置した。固まったプラグを1mlのプロク溶液(1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine, 0.5M EDTA, pH 8.0)に入れ、50°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  $\mu$ lのTE bufferで調製した4mM Pefacloc SC (AEBSF)に移し、50°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  $\mu$ l/sample)氷上で20分以上平衡化した。酵素を含むbuffer 100  $\mu$ l (30units/sample)に変え、37°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液に交換した。泳動は0.5 x TBEで調製した1% Seakem Gold agaroseで行い、6.0V/cm、2.2-63.8 s (linear ramp)、19時間、14°Cの条件で実施した。泳動終了後、0.2-0.5  $\mu$ 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。バンドパターンの解析には、Fingerprinting II (バイオラッド社)を用いた。

### C. 結果及び考察

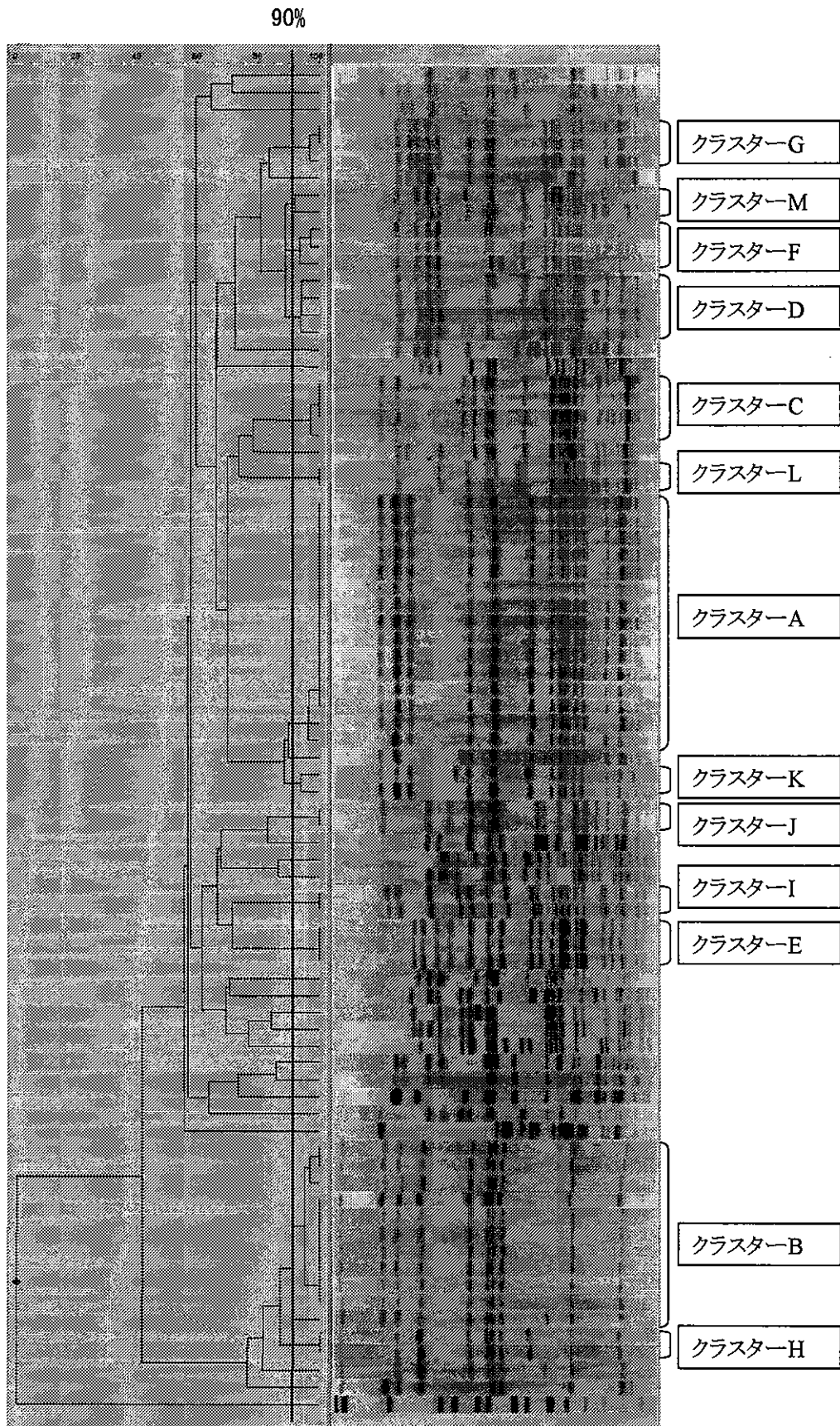
全78株を用いて解析したデンドログラムを図1に示した。90%以上のsimilarityを示す菌株をクラスターとすると、複数の菌株が属するAからHまでの13のクラスターに分けることができた。その中でもクラスターAでは16株(20.5%)、クラスターBには11株(14.1%)

が属し、これらのクラスターが主流を占めているように思われた。その他にも、どのクラスターにも属さない22パターンがあり、全部で35のパターンに分けられた。若森ら<sup>1)</sup>はSEの北海道分離株では薬剤耐性が高頻度にとめられることを報告した。今後は、このような遺伝子型に加え、いくつかの表現型を加味することによってより詳細な解析が可能になると思われる。

#### 参考文献

- 1) 若森吉広、長野秀樹、森本洋、熊田洋行、玉手直人、内山康裕、藤原修、武士甲一、北海道で分離されたサルモネラ属菌の血清型と薬剤耐性、北海道立衛生研究所報53：84－86（2003）。

図1 *Salmonella* Enteritidis の PFGE をベースとしたデンドログラム



## 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)

岩手県環境保健研究センター保健科学部  
藤井伸一郎 佐藤卓

**要旨:** 岩手県内の某少年院において、*astA*遺伝子保有大腸菌0166:HUTが原因と考えられた集団食中毒が発生した。他の下痢起因細菌及びウイルスは分離されず、*astA*遺伝子保有大腸菌のみが分離され、分離株のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による解析でも同一パターンを示し、分子疫学的調査結果から原因菌であると推察された。分離株の薬剤感受性について調べたところ、テトラサイクリン (TC) に耐性を示したことから、TC加トリプトソイブrosを用い食品から菌の分離を試みた。しかし、培養液からPCRにより*astA*遺伝子は検出されたが菌は分離されなかった。今回、原因食品は特定されず感染源の究明には到らなかったが、*astA*遺伝子保有大腸菌のなかには、ヒトに下痢症状を惹起するものがある可能性が考えられ、今後、同様の事例が積み重ねられ、腸管凝集付着性大腸菌の詳細な病原性が解明されることが望まれる。

### I 発生状況

2004年9月2日、岩手県内の某少年院の医師から、院生数名が発熱、腹痛、下痢等の食中毒症状を呈している旨の通報が管轄保健所にあった。調査の結果、103名中31名が食中毒症状を呈しており、患者の発生は9月1日午後～2日午前に集中していた。患者の共通食は、院内で調理された食事に限られており、保存されていた検食及び患者便等について検査を実施した。

### II 検査内容

#### 1 検体

検便28検体 (患者便16検体、調理従事者12検体)、検食24検体、施設内拭き取り10検体について検査を実施した。

#### 2 検査項目

##### (1) 分離培養

病原大腸菌、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ、サルモネラ、セレウス、カンピロバクター、ウェルシュ、エルシ

ニア、赤痢菌およびウイルスについて実施した。

##### (2) 分離株の遺伝子検査等

*astA*、*aggR*、*eaeA*、LT、SH、SP、*invE*、*ipaH*遺伝子を標的としたPCR及びPFGEによるDNA解析を実施した。

##### (3) 分離株の薬剤感受性試験

センシディスクを用い、12薬剤 (ABPC, CTX, KM, GM, SM, TC, CP, CPFx, TMP, NA, FOM, ST) について感受性を調べた。

### III 検査結果

大腸菌以外は分離されず、大腸菌0166が患者便12検体から分離された。また、大腸菌028ac、大腸菌0159がそれぞれ1株ずつ分離された。

分離株すべてから*astA*遺伝子のみが検出され、大腸菌0166について、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) によるDNA解

析を行ったところ、すべて同一パターンを示した(図)。

また、大腸菌0166の薬剤感受性試験の結果、TCに耐性であったことから、TC加TSBを用い、食品から菌の分離を試みた。しかし、検食24検体中4検体(増菌培養液)からPCRにより*astA*遺伝子は検出されたが、分離培地(マッコンキー寒天培地)で菌は分離されなかった。

#### IV 考察

腸管凝集付着性大腸菌の耐熱性毒素(EAST-1)をコードする*astA*遺伝子の病原学的意義は今だ解明されていない。健常者から*astA*遺伝子保有大腸菌が高頻度に分離されることや、耐熱性毒素(EAST-1)のヒトに対する毒性が証明されていないことなどである。

しかし、国立感染症研究所感染症情報センターの病原微生物検出情報によれば、大阪市(1996年)及び福井県(1997年)において、*astA*遺伝子保有大腸菌0166:H15による集団食中毒事件が発生している。また、最近では、広島市(2002年)、大分県(2003年)、福井県(2004年)において*astA*遺伝子保有大腸菌による同様の事例が報告されている。これらの事例で共通していることは、他の下痢起因細菌及びウイルスは分離されず、*astA*遺伝子保有大腸菌のみが分離され、分離株のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析結果も同一パターンであることである。これらの事例のように、分子疫学的調査結果から、*astA*遺伝子保有大腸菌が原因であると推察される事例があり、今回、岩手県内で発生した事例も同様な事例である。

今回、*astA*遺伝子保有大腸菌0166が複数

の患者から分離されたが、原因菌として特定するには、さらに非発症者から分離されないことが重要であり、今後は非発症者の検便も検査に加える必要があると思われる。

また、*astA*遺伝子保有大腸菌028ac、0159が分離されたが、複数の患者から分離されていないことから、健常者も保菌しているといわれる常在菌であるかもしれない。もしくは、患者1名から大腸菌0166と028acの両方が分離されていることから、大腸菌0166から028acに*astA*遺伝子の形質伝達が行われたのかもしれない。

*astA*遺伝子保有大腸菌のなかには、ヒトに下痢症状を惹起するものがある可能性が考えられ、今後、同様の事例が積み重ねられ、腸管凝集付着性大腸菌の詳細な病原性が解明されることが望まれる。

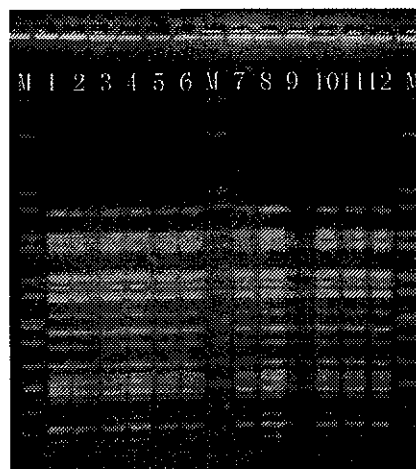


図 *astA*遺伝子保有大腸菌0166:HUTのPFGEパターン(*Xba*I処理)

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

佐々木寿子、加藤美和子、白幡祐子、寺澤宏司、不二崎順二  
(新潟県保健環境科学研究所)

はじめに

新潟県では、1996年に患者数が700人を超える腸炎ビブリオ(V.p)による食中毒が発生し、地形的に長い海岸線を有し海産物の利用度も高いため、V.p 予防対策に重点を置いている。その一環として、食品及び環境等からの TDH、TRH 産生 V.p の実態を調査し、分離株について解析した結果、食中毒と環境との因果関係について若干の知見を得た。

A. 調査方法

1. 検体

2002 及び 2003 年の 6～10 月の間、毎週約 10 匹計 255 匹の近海産アジ、T 及び M 漁港近海の沿岸海水(T、M 海水)計 75(2003 年は 6～11 月) 及び 2003 年 10～11 月に採取した同地点の海泥(T、M 海泥)計 8、2002 及び 2003 年に当所に搬入された 4 事例の食中毒関連食品を検体とした。

2. 試料の調製

アジは 1 匹全量を細切し、等量の 3% NaCl 加リン酸緩衝液(以下 PBS)で 1 分間ストマッキングしたものを試料原液とした。海水は 10L を孔径 0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターで濾過(濃縮)し、PBS 10ml 中で同様に処理し、海泥は均一に混ぜ試料とした。食中毒関連食品は細切し、等量の生理食塩水を加え同様に処理した。

3. 分離試験

2 で調製した試料原液 10ml(海水は 9ml、海泥は 10g)を 2%NaCl 加 TSB(以下 TSB) 90ml で増菌後、SPB10ml で 2、3 次増菌し、各増菌液は PCR 法で TDH、TRH 産生菌を検索すると共に、クロモアガービブリ

オ平板(CAV)に塗抹した。また、食中毒関連食品は試料原液 1ml を TSB10ml に接種し同様に操作した。

3.1 PCR 法による TDH、TRH 産生菌の検索

各増菌液 1ml を洗浄後、滅菌水を加え加熱した上清をテンプレート DNA とした。プライマーは、TDH 遺伝子検出用は当所で設計 1) したものを、TRH 遺伝子検出用は西沢ら 2) が報告したものをを用いた。増幅条件は熱変性 94°C 1 分間、アニーリング 55°C 1 分間、伸長 72°C 1 分間を 35 サイクルで行った。

3.2 TDH、TRH 産生菌の分離

3.1 で遺伝子が陽性の増菌液を塗抹した CAV の V.p 様コロニーを TDH 産生 V.p は PCR 法で、TRH 産生 V.p はクリステンゼンの尿素培地で検索した。

4. 分離株の解析

2001 年(当所の保存株)、2002 及び 2003 年に当所で分離した TDH、TRH 産生株及び県内各保健所が分離した V.p 患者株について PFGE、GS-PCR、PCR、RPLA 等の各方法を実施した。

#### 4.1 PFGE 法

1%NaCl 加 TSB で一晩培養した増菌液 200 $\mu$  l を使用し、CDC の方法に準拠した感染研が提案した方法で実施した 3)。1% Seakem Gold agarose でプラグを作製し、プロテナーゼ K 溶液で処理後泳動用にカットし、4 mM Pefabloc SC 溶液で 2 回洗浄後 TE で平衡化した。酵素バッファーで平衡化し、Not I (30U) で 37°C 3 時間酵素処理を行った。50 $\mu$  M チオ尿素加 0.5 $\times$  TBE 4) で調製した 1% Seakem Gold agarose を使用し、CHEF DR II で泳動した。泳動条件は 6.0V/cm、14°C、4-8 秒 12 時間、8-50 秒 10 時間 5) とした。

#### 4.2 GS-PCR 法

分離株を TSB で増菌し、その 1ml を用いた。プライマー及び増幅条件等は松本ら 6) が報告した方法に準じた。

### B 結果及び考察

#### 1. 環境等からの TDH、TRH 産生 V.p の分離状況

Table 1 に示したが、2002 年は TDH 産生株が海水から 3 株、TRH 産生株が海水から 5 株、アジから 4 株分離された。2003 年は TDH 産生株が海水から 3 株、海泥から 4 株、TRH 産生株が海水から 1 株、海泥から 1 株、アジから 6 株分離された。また、TDH・TRH 産生株が海水から 2 株分離された。

#### 2. 分離株の解析結果

Table 2 に 2001~2003 年の食中毒及び環境等からの分離株の解析結果を示した。2001 及び 2002 年に T 海水 (No.1、2)、2003 年に T 海水 (No.4) 及び T 海泥 (No.3、5、6、7) から分離された TDH 産生 V.p (O4:K37)

は Fig.1 の結果から全て同一の遺伝子型を示した。同じ遺伝子型の TDH 産生 V.p (O4:K37) が同一地点の海水から 3 年間に渡って分離され、更に海泥からも複数回分離されたことは、T 漁港近海の沿岸海域に同一クローンが生息している可能性が示唆された。また、2002 年にアジ (No.9) と M 海水 (No.10~13) から分離された TRH 産生 V.p (O10:KUT) は Fig.2 の結果から遺伝子型に高い類似性が見られた。一方、2003 年に M 海泥 (No.23) から分離された TRH 産生 V.p (O10:K52) は Fig.3 の結果からアジ (No.14~19) 分離株 (O10:KUT) と遺伝子型が同一だったが、M 海水 (No.20~22) 分離株 (O10:KUT, O10:K52) とは異なった遺伝子型であった。Fig.2 及び Fig.3 の結果から、M 海水から 2002 及び 2003 年に連続して分離された TRH 産生 V.p (O10:KUT) は年別に遺伝子型が異なり、同じ血清型でも複数のクローンが存在していることがわかった。また、2001~2003 年に分離された TDH 産生 V.p (O3:K6) は全て新クローンで、2003 年に海水 (No.46) から分離された株は Fig.4 の結果から 2002 年の食中毒患者株 (No.45) と遺伝子型が同一で、他の食中毒患者株とも類似した遺伝子型を示した。また、2001 年と 2003 年に分離された食中毒患者株の O4:K68 も新クローンで Fig.5 の結果から O3:K6 株と遺伝子型が類似していた。

#### 3. まとめ

環境から病原因子産生菌が反復して検出されたり、同じ遺伝子型の菌が海産魚類及び食中毒患者から検出されたことは、環境の汚染と人への感染が密接に関与し、環境汚染が人への感染源になる可能性を示唆す



る。今回検出された生息していると思われるTDH産生V<sub>p</sub>の病原性の強弱についてはこれからの課題であるが、県内においても新クローンが高度に侵淫しており、今後新たなクローンの流行も考えられ、これらの消長に注目し、継続して監視していく必要があると思われる。

## 5 参考文献

- 1) 丸山智子他：新潟県保健環境科学研究所年報, 15, 79 (2000)
- 2) 西瀨光昭他：日本臨床微生物学雑誌特別号, 50, 350 (1992)
- 3) 厚生科学研究パルスネット精度管理資料 (2003)
- 4) 国立感染症研究所：病原微生物検出情報, 23, 68 (2002)
- 5) 刑部陽宅他：日本食品微生物学雑誌, 17, 6 (2000)
- 6) C. Matsumoto et al.: J. Clin. Microbiol, 38, 578 (2000)

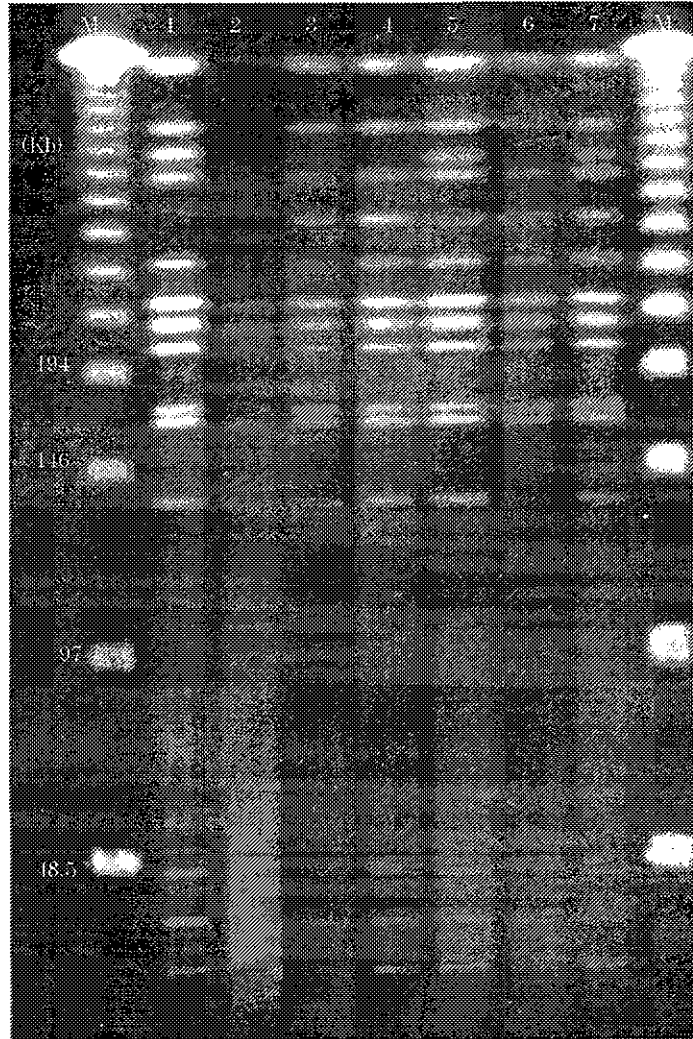


Fig. 1 Patterns of PFGE by *Not* I in sea water and mud isolates (O4:K37, TDH+) from T area. (M: DNA size marker: Lambda ladder)

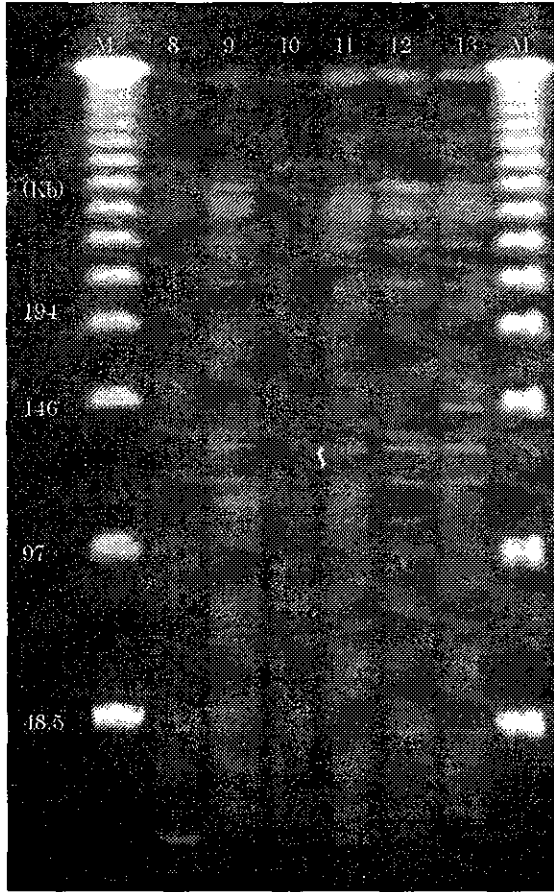


Fig. 2 Patterns of PFGE by *Not* I in sea water and saurel isolates (O10:KUT, TRH+). (M: DNA size marker; Lambda ladder)

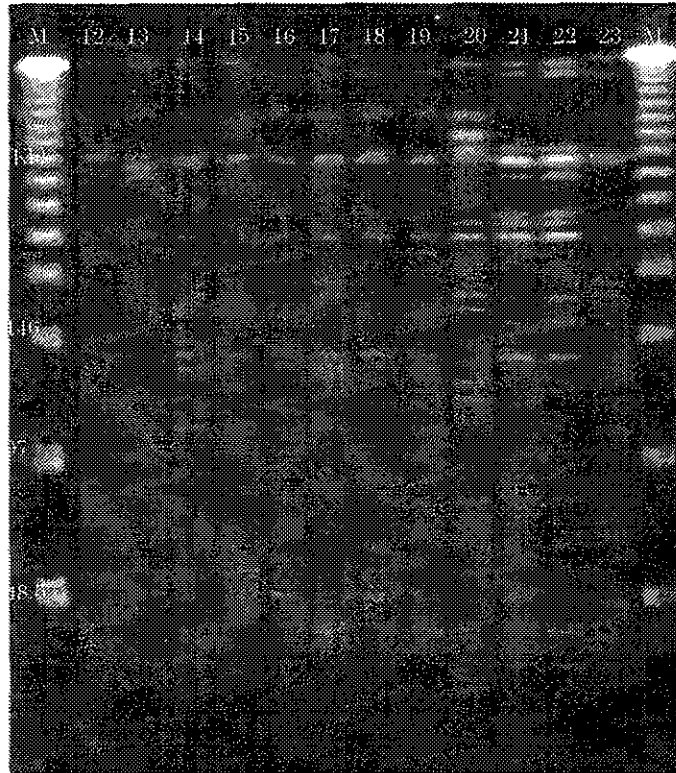


Fig.3 Patterns of PFGE by *Not* I in sea water, mud and saurel isolates (O10:KUT , O10:K52, TRH+) (M: DNA size marker;Lambda ladder)