

Fig.4 Patterns of PFGE by *Not* I in sea water and food poisoning isolates (O3:K6). (M: DNA size marker:Lambda ladder)

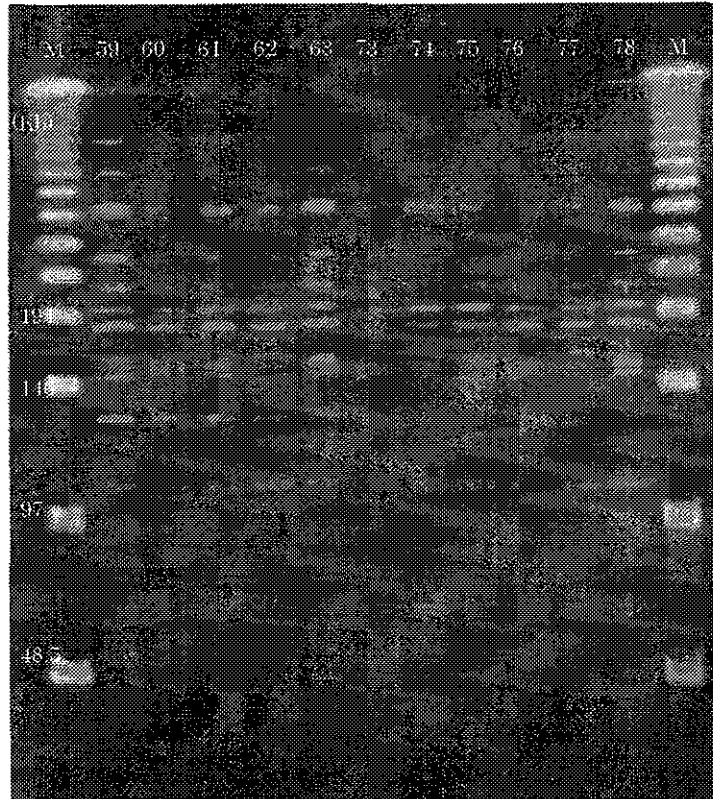


Fig. 5 Patterns of PFGE by *Not* I in isolates from patients (59-63, 73-78) in 2 outbreak cases. (M: DNA size marker; Lambda ladder)

下痢症患者由来 *Salmonella* Enteritidis の疫学的解析

山形県衛生研究所 池田辰也 最上久美子 大谷勝実 工藤勝博

【はじめに】

サルモネラによる食中毒、散発の下痢症は、山形県内でも毎年多数の発生がみられている。これらの血清型では、Enteritidis (以下 SE) が最も多く、例年半数以上を占める状況にある。今回、山形県内で分離された下痢症患者由来 SE の疫学的な解析を試みたので報告する。

【材料および方法】

平成 10 年から 15 年の 6 年間に山形県内の医療機関や保健所で分離され、当衛生研究所が菌株提供を受けた下痢症患者由来 SE について、パルスフィールドゲル電気泳動法 (以下 PFGE) による遺伝子解析、および薬剤感受性試験を実施した。

PFGE は 216 事例 (261 株) について、制限酵素 Bln I を用いて実施した。また、薬剤感受性試験は 165 事例 (190 株) について K-B 法により実施した。使用ディスクは、アンピシリン (ABPC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、セフトキシム (CTX)、シプロフロキサシン (CPFX)、ナジクズ酸 (NA)、フルロキサシン (NFLX)、ホスホマイシン (FOM)、ST 合剤 (ST) の 12 薬剤とした。

【結果】

① PFGE による遺伝子解析

216 事例の下痢症患者由来 SE は、PFGE パターンの類似性により A~P の 16 グループ (49 パターン) およびそれに属さない 38 パターンに分類された。最も多かった A1 パターンが 68 事例 (31.5%)、次いで A3 パターンが 59 事例 (27.3%) であり、全体の約 6 割をこの 2 パターンが占めていた。特に平成 15 年は、A1 が 33 事例、A3 が 24 事例と分離株の 87.7% を占めていた。

② 薬剤感受性試験結果

12 薬剤の感受性試験では、81 事例 (49.1%) で 1~3 剤の薬剤に対する耐性が認められた (1 剤耐性: 59 事例、2 剤耐性: 9 事例、3 剤耐性: 13 事例)。耐性が認められたのは TC (26.7%)、SM (25.5%)、NA (9.7%)、KM (7.9%)、ABPC (0.6%) の 5 剤であった。PFGE による遺伝子解析で A1 を示した事例では、45 事例 (67.2%) で 5 パターンの耐性が認められた (1 剤耐性: TC, NA, ABPC、2 剤耐性: TC+SM、3 剤耐性: TC+SM+NA)。一方、A3 では実施した 45 事例 49 株は全て 12 薬剤に感受性であった。

③ 山形県内の地域別分離状況 (平成 15 年)

平成 15 年分離株の遺伝子パターンを県内 4 つの地域別にみると、庄内、最上で A1、村山で A1 および A3、置賜では A3 が多数分離されている状況が認められた。また、これらの A1 パターン株の薬剤感受性では、庄内では 16 事例中 15 事例 (93.8%) が TC 耐性、最上では 5 事例全て SM、TC の 2 剤耐性、村山では 6 事例 (54.5%) が TC 耐性、4 事例 (36.4%) が NA 耐性であった。

【考察】

今回、下痢症患者由来 SE の疫学的解析を試みたが、PFGE による遺伝子解析に加え、薬剤感受性試験を併用することにより、より詳細な解析が可能であった。

PFGE による遺伝子解析では、県内患者由来株の過半数が A1、A3 の 2 パターンを示し、特に 15 年は 87.7% が A1、A3 のいずれかであった。この 2 パターンの検出では明らかな地域差が認められた。さらに、A1 パターンでは分離地域により薬剤感受性が異なる傾向が認められた。これらの要因として、地域的な感染源の存在や食材の流通が強く関与しているものと考えられることから、今後その解明に向け検討を続けていきたい。

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

福島県衛生研究所 微生物グループ
熊谷奈々子 須釜久美子 平澤恭子 長沢正秋 渡部啓司

はじめに

今年度県内で発生し、PFGE 法による解析によってその有用性が得られた 2 つの事例について報告する。

事例の概要

(事例 1) 幼稚園と小学校で発生した腸管出血性大腸菌 O111 による集団感染事例

2004 年 10 月 30 日、郡山市内の医療機関から VT1 および VT2 産生の腸管出血性大腸菌 O111 (EHEC O111) の患者発生届けがあった。患者は男児 (男児 A) で、その後男児 A の弟と、男児 A の通う T 幼稚園の別の男児 (男児 B) から EHEC O111 が検出された。さらに、T 小学校に通う 2 名 (男児 C, 男児 D) が発症し、11 月 10 日に EHEC O111 による患者発生届けがあった。また男児 C の弟が T 幼稚園に通園しており、発症はしていなかった。これらのことから、T 幼稚園と T 小学校での患者発生の関連性を調査する目的で、郡山市保健所から PFGE の依頼を受け実施した。

その後、本事例は EHEC O111 の病原体陽性者数が 26 名にのぼり、その内訳は男児 A・B を含む幼稚園児が 9 名 (患者 4 名, 保菌者 5 名) で、男児 C・D を含む小学生は 11 名 (患者 6 名, 保菌者 5 名) であり、それらの家族が 6 名 (患者 4 名, 保菌者 2 名) であった。また、感染者の年齢は 1 歳から 40 歳にわたり、感染経路は不明であった。

(事例 2) 卵を使った焼き物を原因とした *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) による食中毒事例

2004 年 12 月 11 日、県内の飲食店で会食した 22 人が、下痢や発熱などの食中毒様症状を呈している旨の通報が保健所にあり、直ちに調査が開始された。

調査対象者は 10 日から 13 日までに同店でほぼ同じ宴会料理を食べた 218 人にのぼり、そのうち 114 人が発症した。食品、ふきとり、従事者便、患者便の検査を実施した結果、食品 (焼き物原料)、従事者便、患者便から *S. Enteritidis* が検出された。患者はそれぞれ所属グループが異なっており、共通点が同店での飲食 (宴会料理) のみだったこと、また、そのメニューである卵を使った焼き物原料からも *S. Enteritidis* が検出されていることから、当該施設を原因とする *S. Enteritidis* による食中毒と断定された。

材料および方法

1. 材料 (使用菌株)

事例 1 については、幼稚園児 (男児 A・B) と男児 A の弟および小学生 (男児 C・D) からの患者便由来の計 5 株を使用した。

事例 2 については、患者便由来の 5 株と従事者便由来の 2 株、そして食品 (焼き物原料) から検出された 2 株の計 9 株を使用した。

2. 方法

事例 1 の EHEC O111 については制限酵素 *Xba*I を用い、泳動条件は電圧 6V/cm, パルスタイム 2.2~54.2 秒, 泳動時間 19 時間, バッファー温度は 14°C とした。

事例 2 の *S. Enteritidis* については制限酵素 *Bln*I を用い、泳動条件は電圧 6V/cm, パルスタイム 2.2~63.8 秒, 泳動時間 19 時間, バッファー温度は 14°C とした。

なお、DNA サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた。

結果

事例 1 の EHEC O111 の PFGE パターンを図 1 に、事例 2 の *S. Enteritidis* の PFGE パターンを図 2 に示した。

事例1については、幼稚園児とその家族、小学生から分離された株が同一パターンを示した。

事例2については、3グループの患者便5株と従事者便由来の2株、それに食品由来の2株が同一パターンを示した。

考 察

当県において、VT1のみ産生のEHEC O111による患者発生の報告はあるが、VT1およびVT2産生のEHEC O111による患者発生は、感染症法が施行されてから初めてである。全国的に見ても、VT1およびVT2産生のEHEC O111分離株の報告は、2002年には国立感染症研究所に送付された2,332株のうちの15株のみであり、2003年には1株も送付されていない。今回の26株は、国立感染症研究所からの報告によるとPFGEにおいてほぼ同一のパターンを示し、2005年1月現在、他の地域でのPFGEによる同一パターンは検出されていないとのことであった。2002年、2003年と保育所・幼稚園での集団発生が全国的に多くみられ、保育所・小学校等の集団発生では施設内感染に留まらず、家族への二次感染が報告される事例が多いのが特徴であるといわれている。今回の事例も同様の傾向を示す事例であった。

一方、*S. Enteritidis*による食中毒は過去5年間に10件(当県)起きており、平均患者数127.4人と大型化する傾向にある。その原因食品は、そのほとんどにおいて鶏卵が何らかの形で関与していると考えられている。事例2は上記を裏付ける事例となった。今回の原因食品である焼き物は、卵黄を含んだタレを食材に塗って焼いた物で、そのタレは継ぎ足して使用されていた。そのため、汚染された鶏卵由来の*S. Enteritidis*が継ぎ足し中に増殖し、さらに十分に加熱されなかったために起こったと推察される。

以上、2つの事例はPFGE法によってそれぞれ幼稚園と小学校、患者と食品とを関連づける事ができ、その有用性が示された。

まとめ

今回PFGE法を実施した事例1については、幼稚園児とその家族、小学生から分離された

株が同一パターンを示した。また、事例2についても、3グループの患者と調理従事者、そして食品から分離された株が同一パターンを示した。

食中毒の原因究明や感染拡大の防止には、多くの疫学情報を集めて総合的に判断することが重要である。また、その結果を地域に還元することで行政、現場、消費者等がそれぞれ対策を取り、今後起き得る感染症や食中毒を未然に防ぐということがなよりの目的である。その科学的な根拠として、今後PFGE法を活用する事例が増えると推測される。

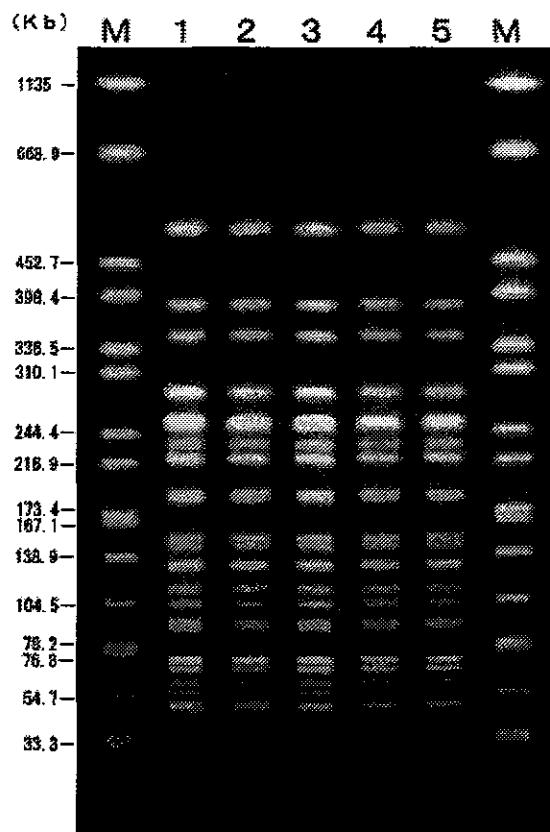


図1 事例1 : EHEC O111のXbaIによるPFGEパターン

- 1 : 8歳, 男児C, T小学校
- 2 : 8歳, 男児D, T小学校
- 3 : 5歳, 男児A, T幼稚園
- 4 : 1歳, 男児Aの弟
- 5 : 4歳, 男児B, T幼稚園

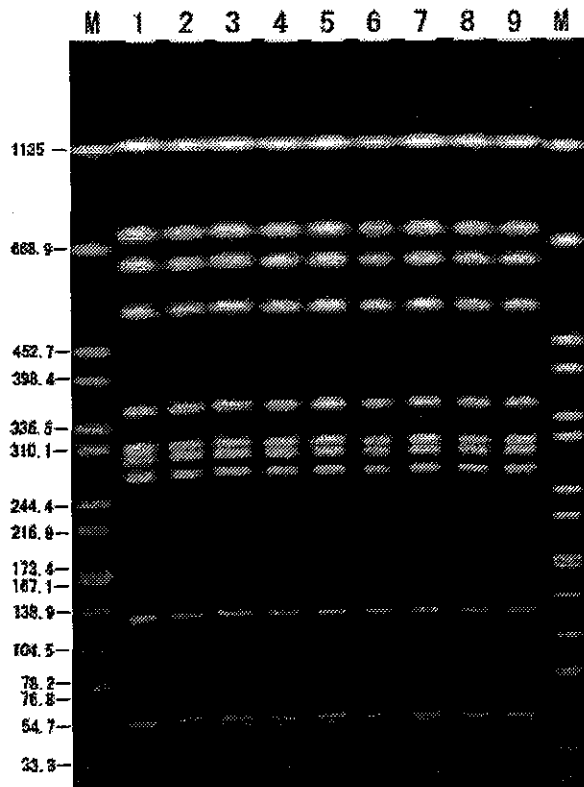


図2 事例2 : *S. Enteritidis* の *BlnI* による
PFGE パターン

- 1 : 42 歳, 男, 患者 (グループA)
- 2 : 56 歳, 男, 患者 (グループA)
- 3 : 70 歳, 男, 患者 (グループB)
- 4 : 23 歳, 男, 患者 (グループC)
- 5 : 82 歳, 男, 患者 (グループB)
- 6 : 43 歳, 女, 従業員
- 7 : 65 歳, 女, 従業員
- 8 : 食品由来株
- 9 : 食品由来株

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	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, 船渡川圭次	栃木県保健環境センター
	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, 横山英二, 内村眞佐子	千葉県衛生研究所
	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, 尾畑浩魅	東京都健康安全研究センター

研究要旨： 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O157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。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。

腸管出血性大腸菌O157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、ある程度は有効であるが、EHEC O157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。

A. 研究目的

PFGE法を用いた病原菌の遺伝子解析情報を共有するためのネットワーク構築を目的として、これまで腸管出血性大腸菌O157を中心にPFGE解析、およびその成績のデータベース化を試みている。その根幹の役割を担う各地方衛生研究所におけるPFGE解析技術は、導入当時と比べ格段に上達したが、その画像を解析ソフトで処理するには、まだ多くの問題点が残されている。最大の問題点は、各地研で行われる泳動像が常に鮮明ではないため、その後の解析を困難にしていることである。本研究班の渡辺治雄主任研究者（国立感染症研究所）は、米国CDC法に準じたPFGE法として「感染研New protocol」を提示した。そこで、関東甲信静地域に分散する11地研において、New protocolによるPFGE解析を行い、それを東京都健康安全センターで解析ソフトを用いて解析を試行し、問題点を洗い出し検討する。

また、解析ソフトの検討も試みる。さらに、PFGE法をサルモネラに応用することも検討する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

1) PFGE解析用共通菌株

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O157:H7 (VT1+VT2産生株：2株 および VT2産生株：4株) 6株を供試した。

2) 散発または集団下痢症事例由来株

EHEC O157 株：各地研で8月～9月に分離されたEHEC O157 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。

2. 感染研 New protocol によるPFGE解析

感染研 New protocol に準拠し、以下のとおり条件を統一して検討した。

1) アガロースブロックの作製

PFGE用DNAブロックの作製は、0.7mm プラグキャストを使用し、SeaKem Gold Agarose で作製した。供試菌の調製および濃度は、各施設の方法で行った。

2) DNA抽出法

DNA抽出時にLysozyme処理は行わず、溶菌は、1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0)で、50°C, 1晩(18～20時間)行なった。

3) PFGE法による解析

作製したDNAブロックは、EHECでは、制限酵素*Xba*Iで、サルモネラでは制限酵素*Xba*Iおよび*bln*Iで処理(37°C, 4時間)した後、PFGE解析を行った。電気泳動用agaroseには、SeaKem Gold Agaroseを使用した。電気泳動は、EHECでは、6V/cm, 2.2～54.2sec, 20時間、サルモネラでは6V/cm, 2.2～63.8sec, 20時間で行った。泳動温度は12°Cとした。但し、泳動時間は、泳動した時のDNAバンドの最先端がゲルの下から1cm～1.5cmになるように各施設で調整することとした。

DNAサイズマーカーとしては、

Salmonella Braenderup H9812 株を使用し、泳動するゲルの両端と中央のレーンに入れた。

3. PFGE解析成績の電送

各地研で解析したPFGE画像を、tif(または jpeg)ファイルとして、電子メールで送付した。

4. 画像解析

画像解析ソフトFingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いて解析を試みた。

5. PFGEパターン系統解析ソフトウェアの検討

別項にまとめて記載した。

6. サルモネラ血清型Enteritidis の疫学解析へのPFGE解析の応用

各地研で経験したサルモネラ血清型Enteritidisによる感染症および食中毒事例から分離された菌株についてPFGE解析を行い有用性を検討した。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた各施設におけるPFGE解析

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株6株を用いて、11施設(A~K)で行ったPFGE像を写真1に示した。0.7mmキャストを用いてブロックを作成することで、PFGE解析像は、各施設ともDNAバンドが非常にシャープになった。また、分離も良い結果であった。サイズマーカーとして使用した*S. Braenderup*は、DNAバンドがシャープで濃度も均一で安定してお

り、解析の基準として非常に適していることが確認された。

しかし、問題点として、

① ブロック作成時の菌量が多いため、PFGE像のDNAバンドが太く、分離の悪い例

② エチジウムブロマイド染色の不足や過剰染色、染色ムラ、脱色不足が認められた施設も一部認められた。。

2. 各施設で行ったPFGE解析結果を用いたデンドログラム解析

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株6株を、11施設で行ったPFGE像(写真1)を用いて、*S. Braenderup*を基準にしてデンドログラム解析を行った成績を図1に示した。各施設が6菌株をそれぞれ2レーンでPFGEを行なった。PFGEアガロースに出現した全DNAバンドを対象とした場合、小さいサイズのDNAバンドが不鮮明で読みとりにくい難点があったため、78.2kb以上のバンドを対象とした結果、6株とも95%以上の類似度が得られた。

3. PFGE像の写真の取り込み方法

PFGE像の写真の取り込みを、①デジタルカメラと、②白黒CCDカメラで行った場合を比較した。

同じゲルを撮影しても、使用するカメラの種類によって写真の印象が大きく異なる事が確認された(写真2)。図2は、2種類の 방법으로写した写真を元に作成したデンドログラムであるが、12菌株中7株は100%一致、4株は95%以上、1株は92%の一致であった。デンドログラムを作成する時に、輝度が強すぎた場合バン

どの位置を選択するのが困難であった。

4. 腸管出血性大腸菌O157分離株のデンドログラム解析

各施設で、散発または集団下痢症事例由来のEHEC O157株のPFGE解析を行い、その写真(写真3)を元に、デンドログラムを作成した。VT1+VT2産生株を図3に、VT2産生株を図4に示した。同一集団例由来株では、90%以上の類似度が得られているが、個々を解析するまでには至らなかった。

5. PFGEパターン系統解析ソフトウェアの検討

別項にまとめて記載した。

6. サルモネラ血清型Enteritidisの疫学解析へのPFGE解析の応用

6地研で経験したサルモネラ血清型Enteritidisによる感染症および食中毒事例から分離された菌株について検討した成績を別紙に示した。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 O157と比較すると、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。

D. 考察

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を各研究所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。本年度は、DNAブロックプラグ作製法の改良、分子量マーカーとして*S. Braenderup*を用い、マ

ーカーの入れ方(ゲルの両端と真中のウェルに入れる)の統一を図る等の標準化を進めたことにより、解析のためのデータの質が非常に向上した。その結果、PFGE画像上の78.2kb以上のDNAバンドを対象に作成したデンドログラムでは、どの施設でPFGEを行った場合も、90%以上の類似性が得られ、パルスネットを構築するための基盤ができた事が確認された。

また、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。

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という結果が得られたが、本法については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については、さらに検討する必要性が示唆された。

E. 結論

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を各研究所でNew protocolに従い、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、同一菌株は、11施設どこでもPFGE解析を行った場合でも90~95%の類似性が得られるに至った。

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。

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、ある程度は有効であるが、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。

F. 研究発表

1. 千葉県衛生研究所：3種類の腸管出血性大腸菌0157が検出された大学内集団感染事例—千葉県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）25(6)，144，2004.

2. 横浜市衛生研究所：横浜市内の幼稚園で発生した腸管出血性大腸菌026による集団食中毒事例，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）25(6)，149，2004.
3. 千葉県衛生研究所：保育園で発生した腸管出血性大腸菌0103:H2による集団感染事例—千葉県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）25(6)，150，2004.
4. 神奈川県衛生研究所：保育園で発生した腸管出血性大腸菌0157感染症の集団事例—神奈川県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）26(1)，18，2005.

G. 知的所有権の取得状況

なし

写真 1

共通菌株(O157)6株の各施設における PFGE画像

〈供試菌株〉

腸管出血性大腸菌O157
菌株No.1 E04607 (VT1+VT2)
No.2 E04523 (VT1+VT2)
No.4 E04617 (VT2)
No.5 E04537 (VT2)
No.6 E04556 (VT2)

DNAサイズマーカー
S.Braenderup H9812

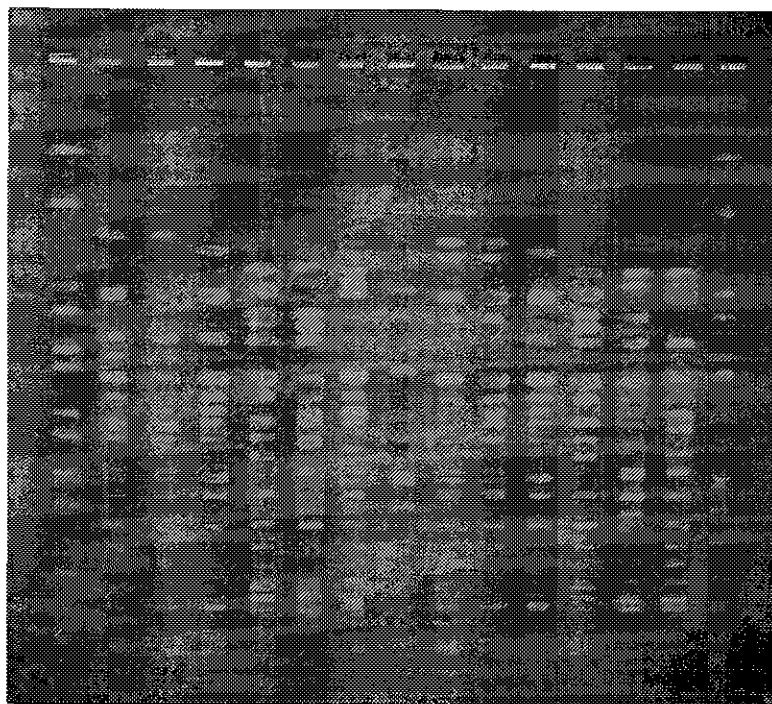
〈泳動条件〉

6V/cm 2.2 sec~54.2 sec
20時間
Buffer温度 12°C

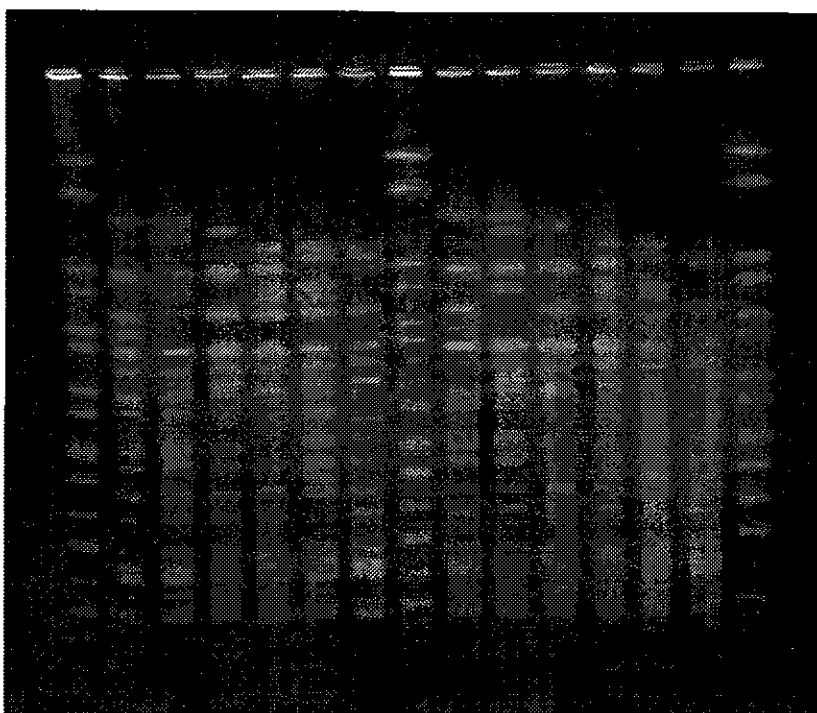
〈PFGE画像〉

(写真左端) レーン1. マーカー
2. 菌株 No.1
3. No.2
4. No.3
5. No.4
6. No.5
7. No.6
8. マーカー
9. 菌株 No.1
10. No.2
11. No.3
12. No.4
13. No.5
14. No.6
(写真右端) 15. マーカー

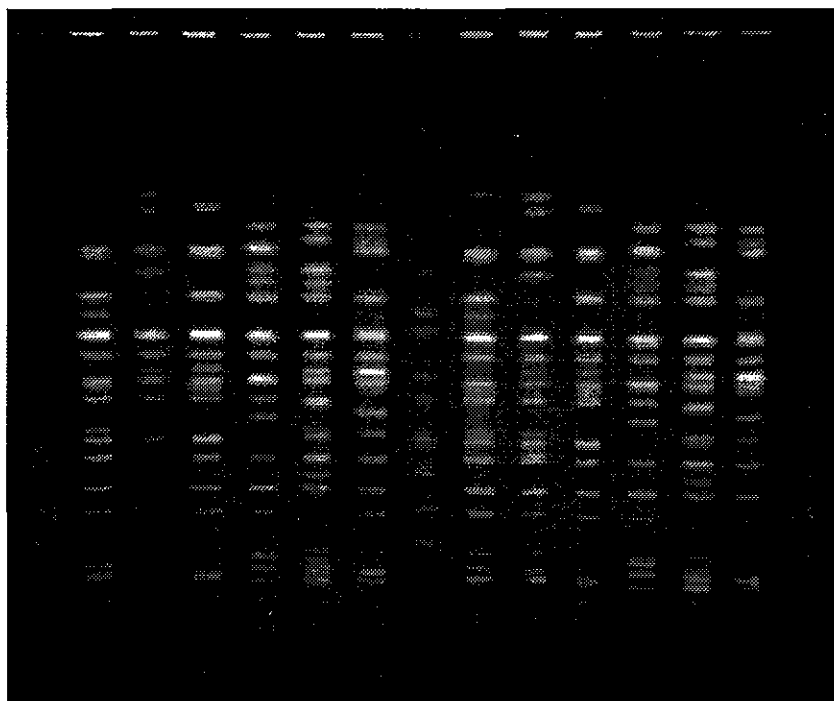
施設A



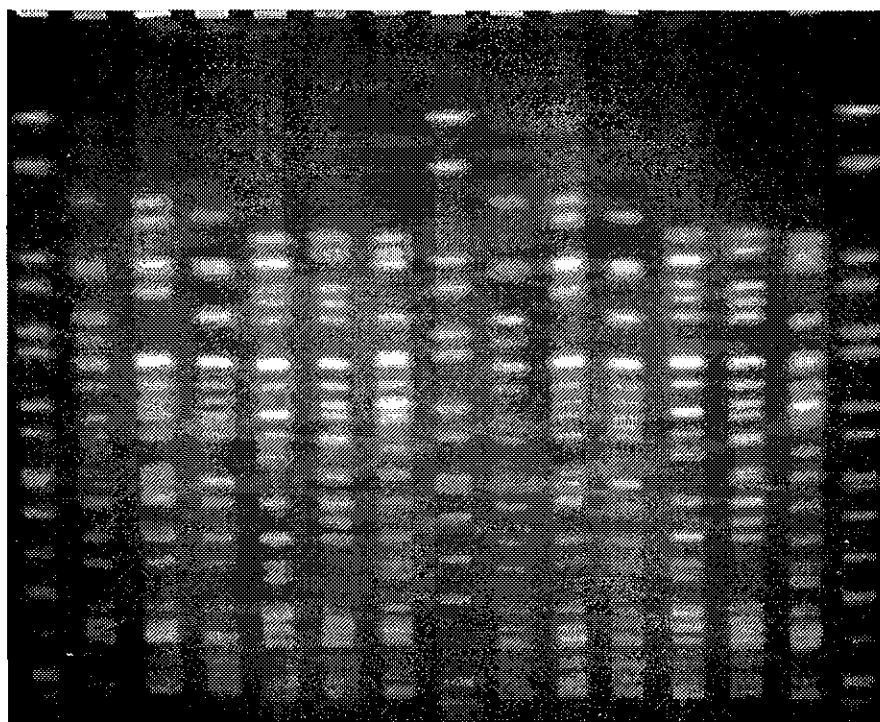
施設B



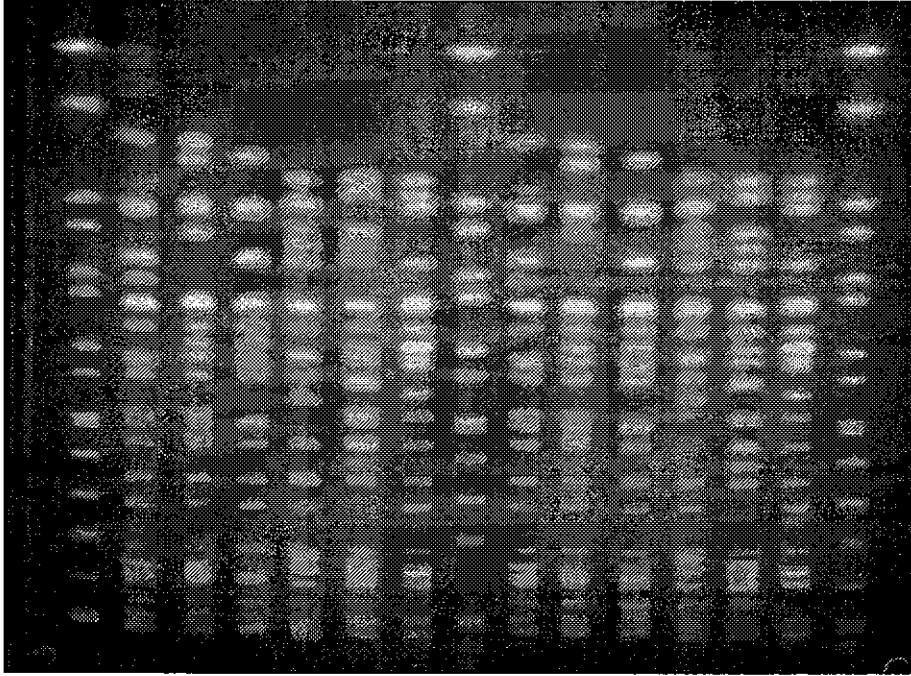
施設C



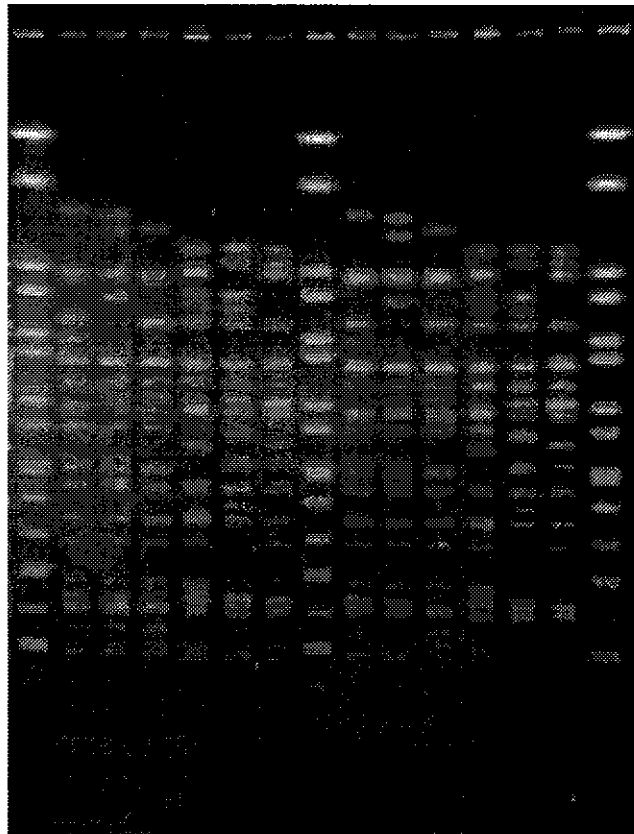
施設D



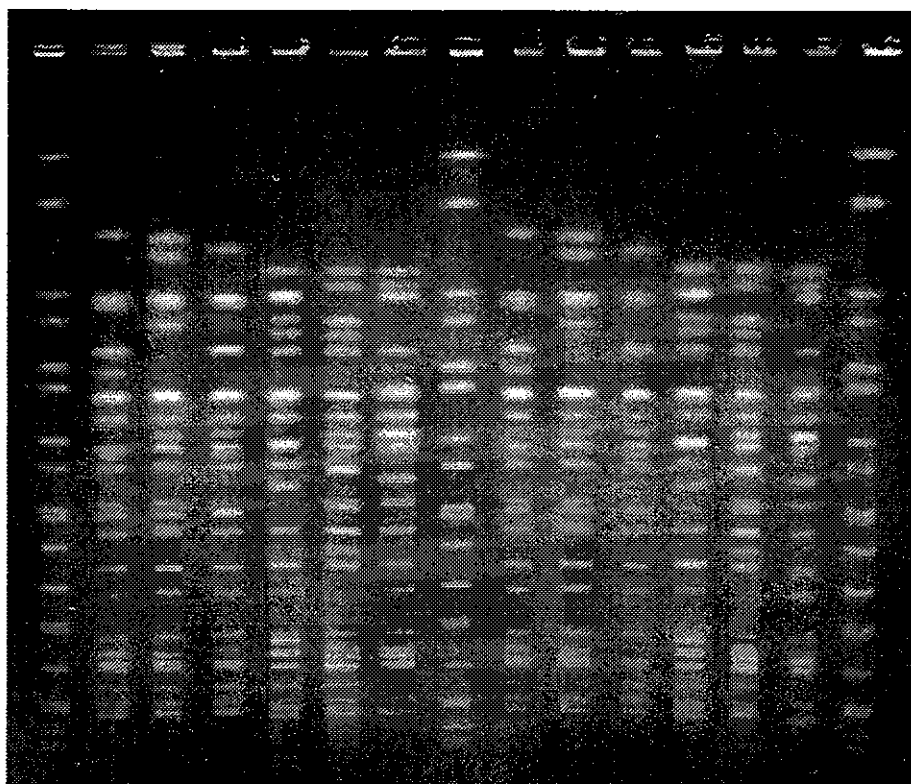
施設E



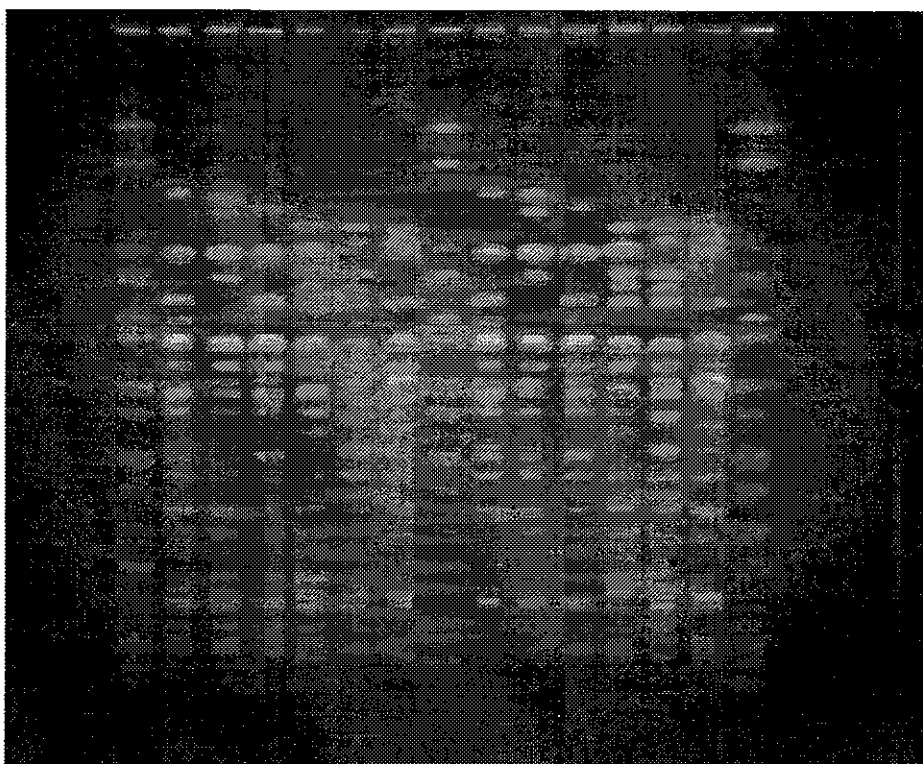
施設F



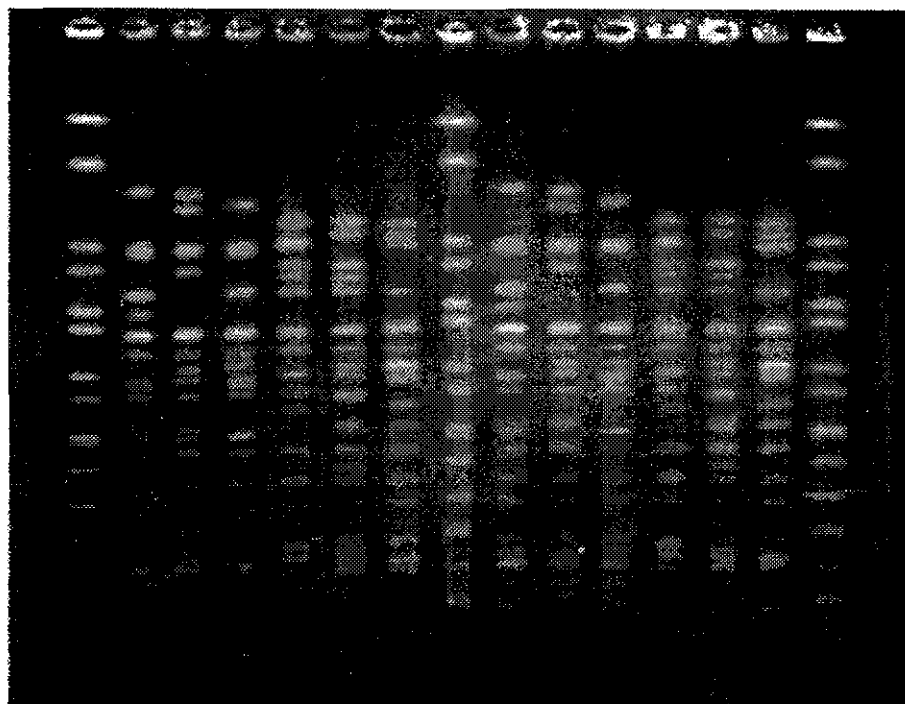
施設G



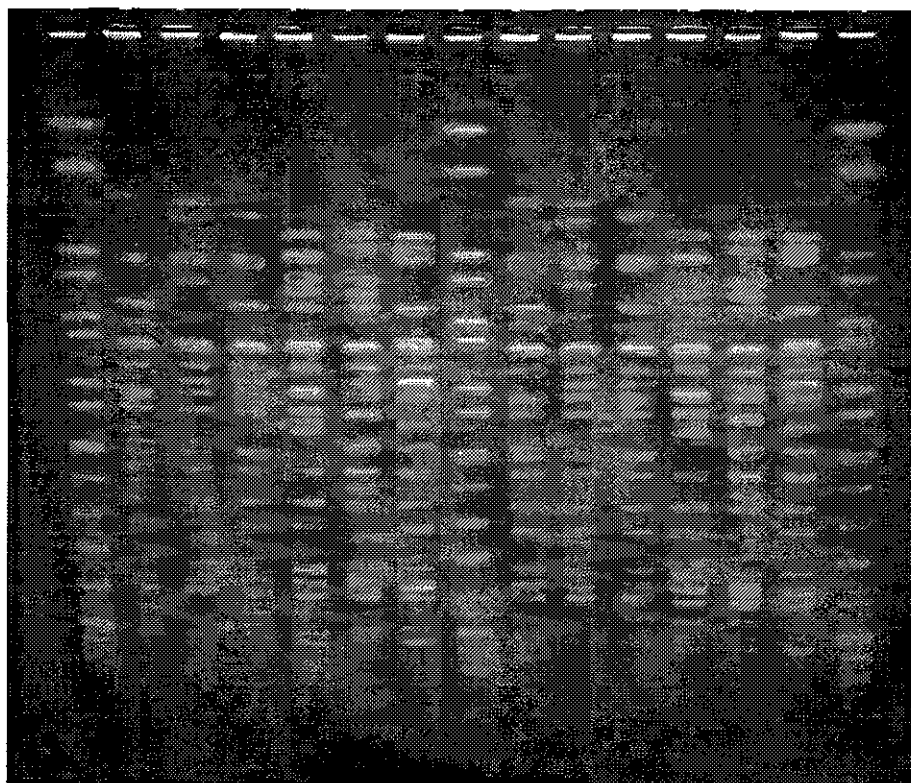
施設H



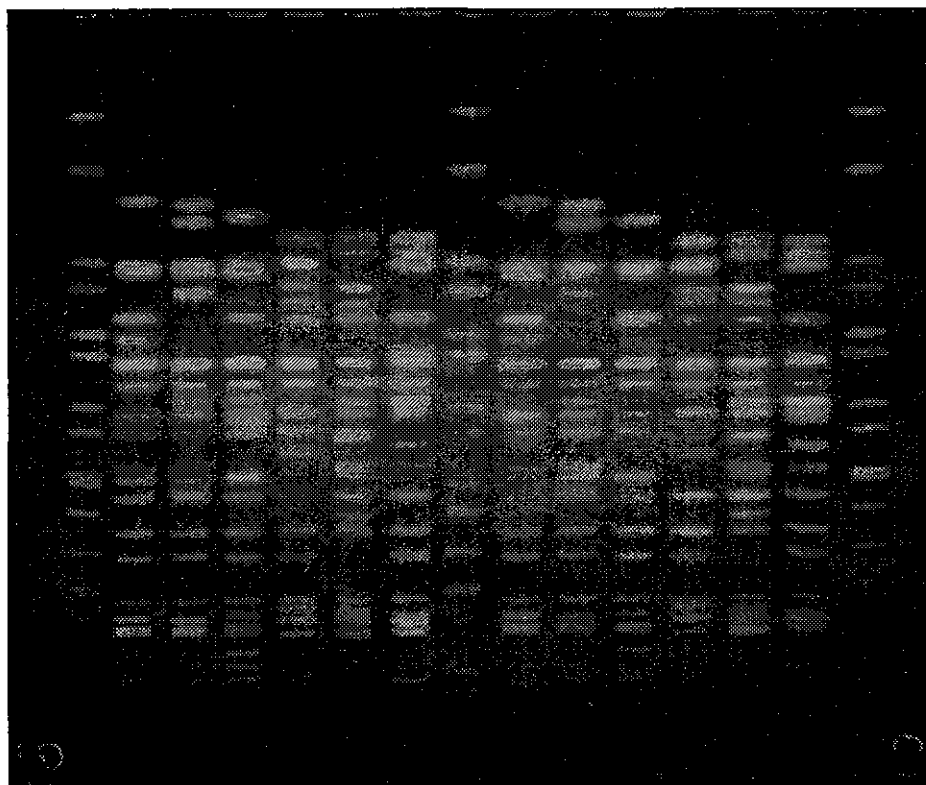
施設 I



施設 J



施設K



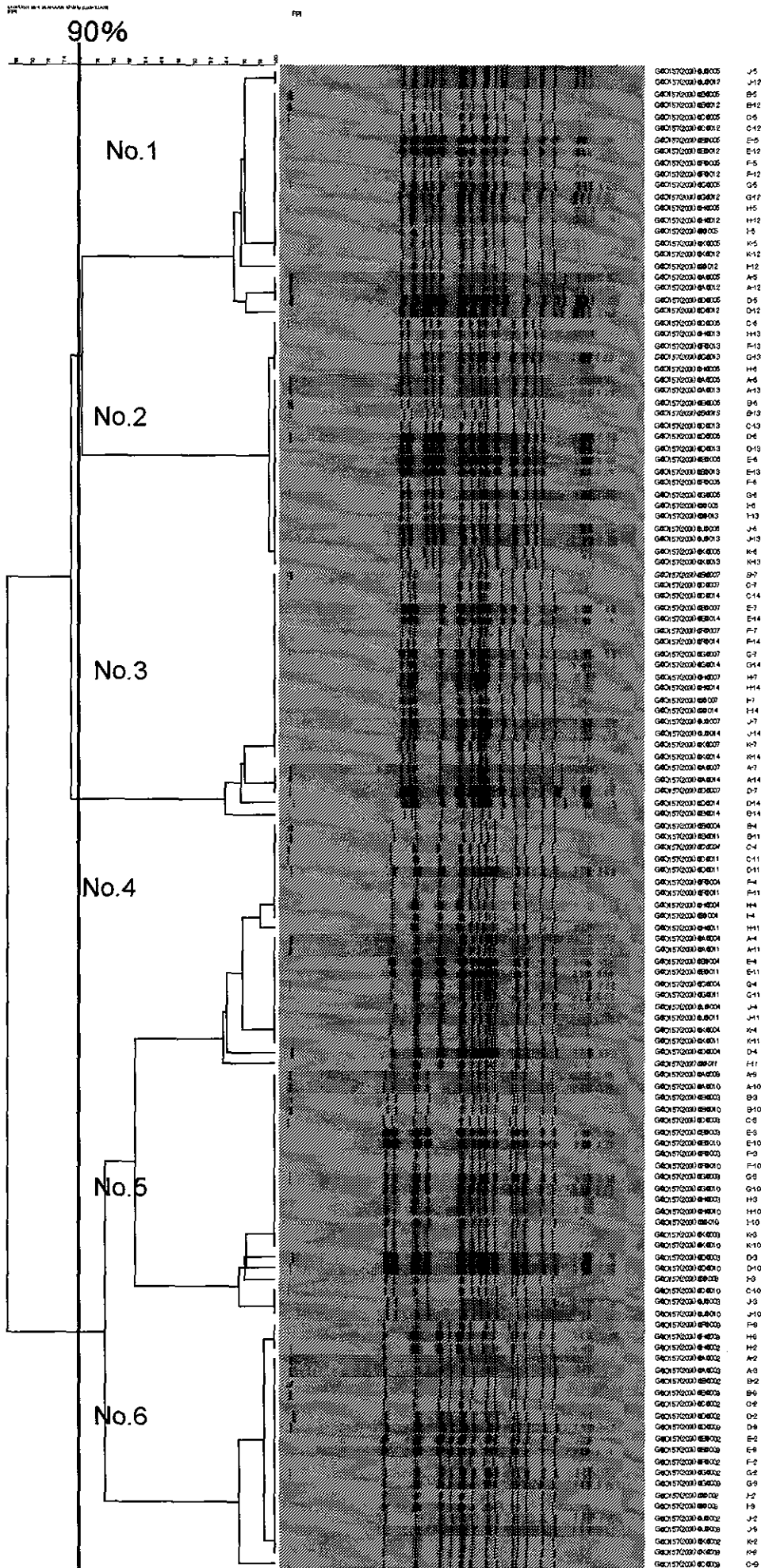
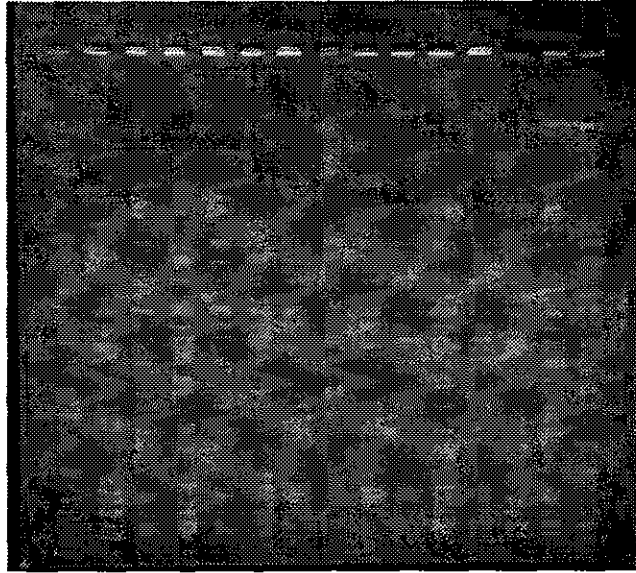


図1. 11施設で実施した共通株6株のデンドログラム

写真2. 写真の取り込み方法による違い

1. Kodak Electrophoresis Documentation system (デジカメ)



2. BIO-RAD Fluor-S Multimager (白黒CCDカメラ)

