

図2. 写真の取り込み方法による違い

K: Kodak Electrophoresis
Documentation system (デジカメ)

B: BIO-RAD Fluor-S Multilmager (白黒CCDカメラ)

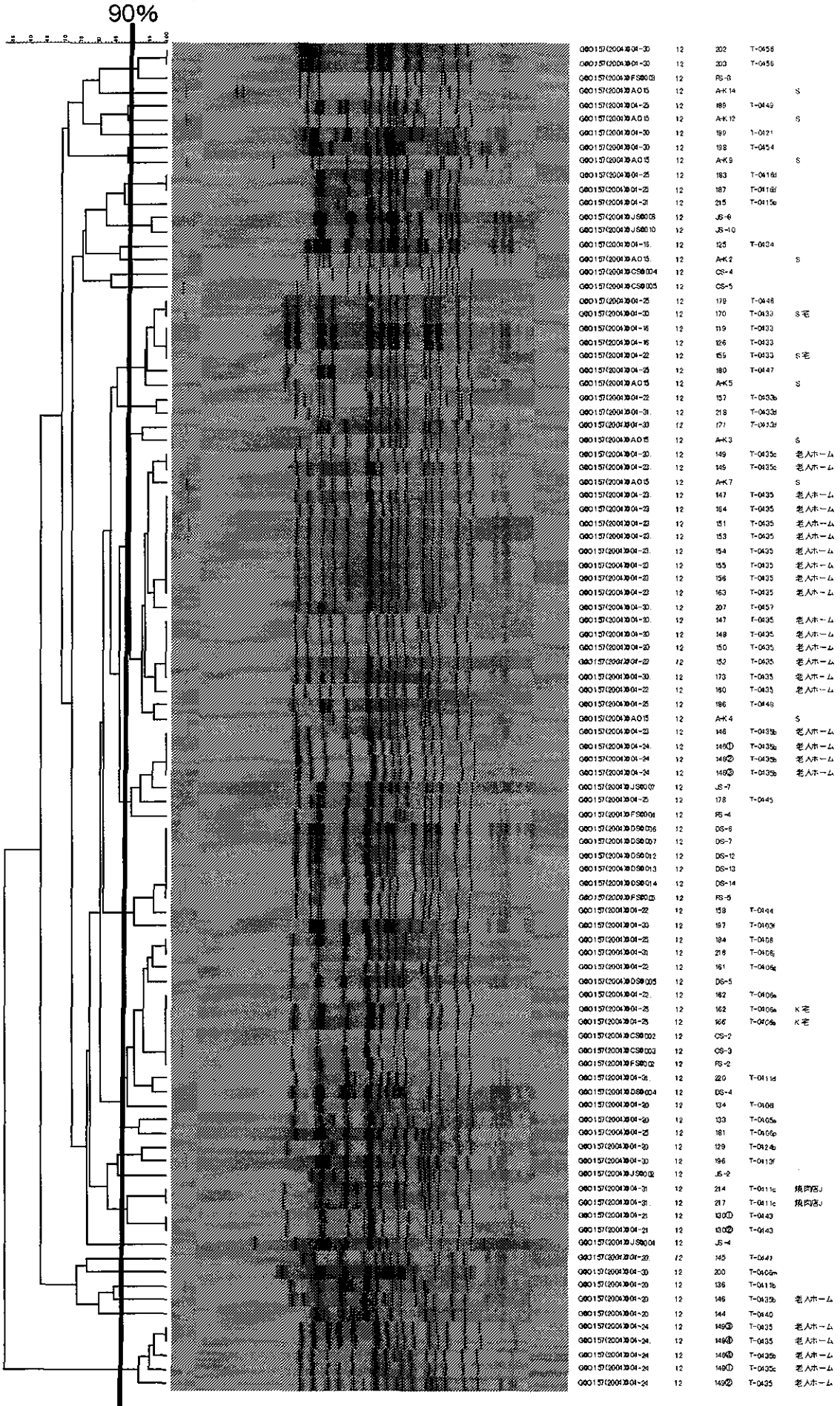


図3. 散発事例由来O157 (VT1+VT2)のデンドログラム

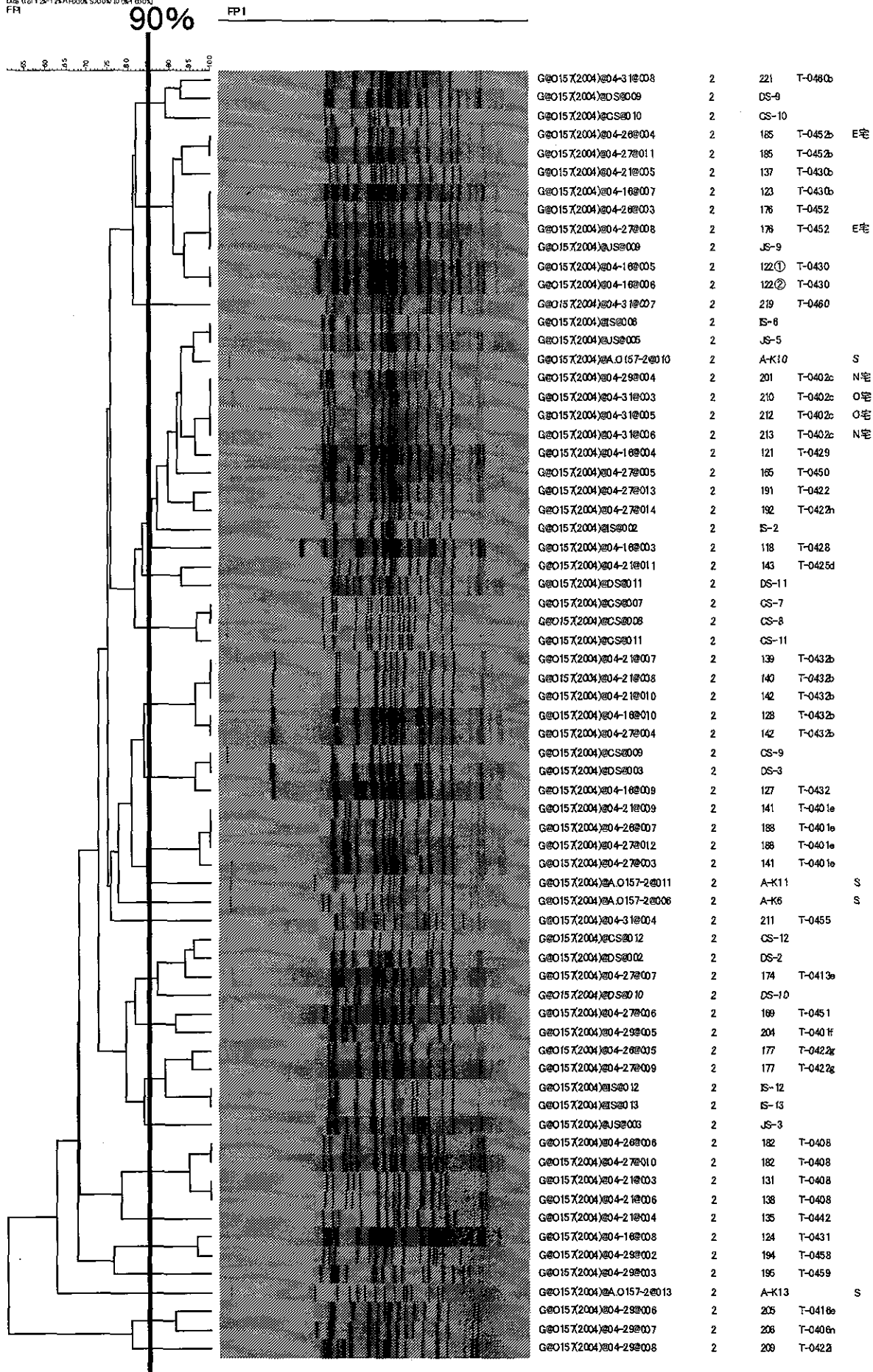
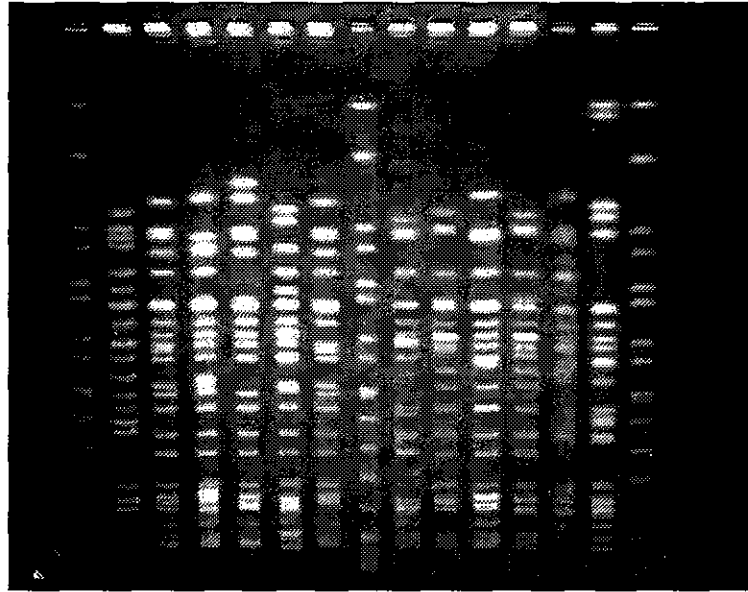


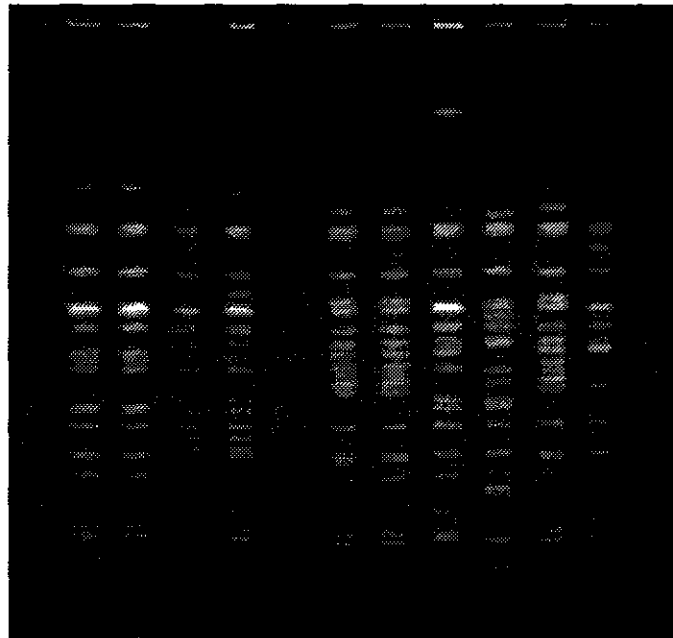
図4. 散発事例由来O157(VT2)のデンドログラム

写真3. 2004年8月～9月に分離されたO157のPFGE画像(一部)

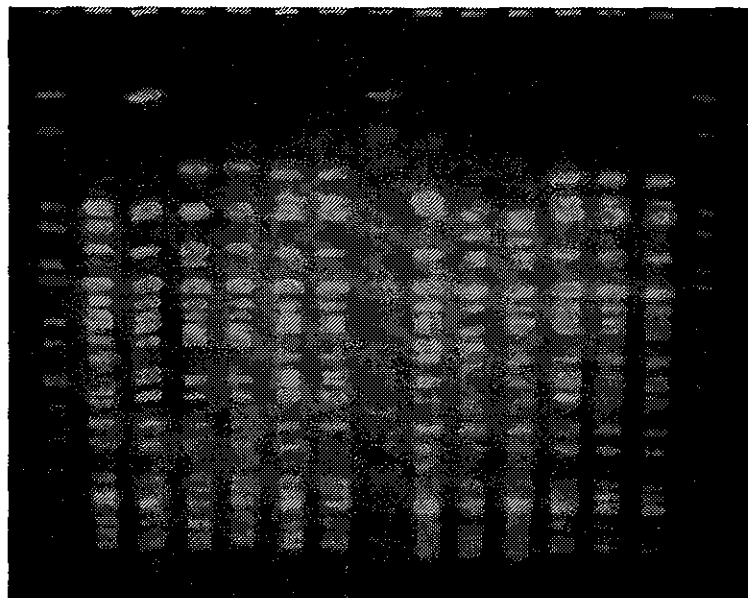
A



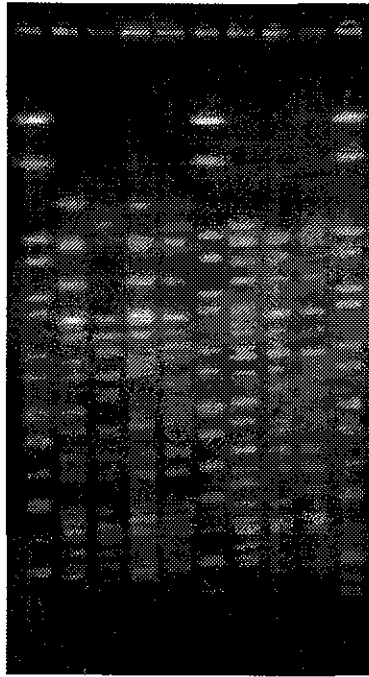
C



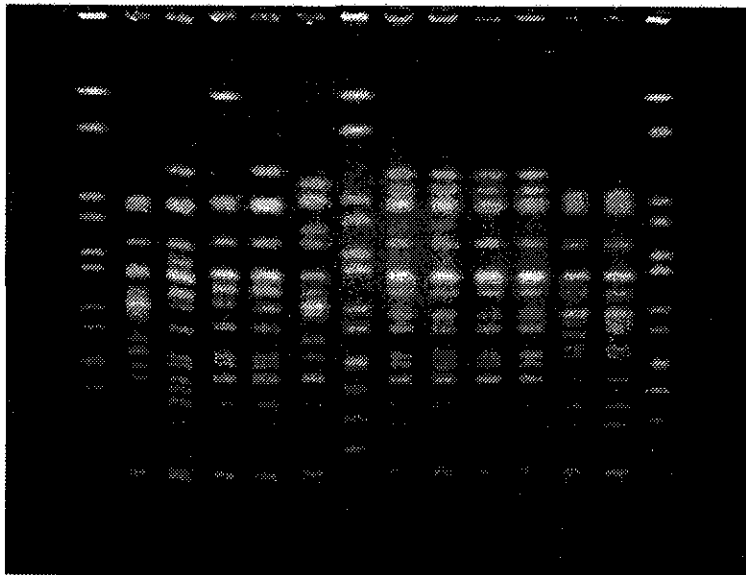
D



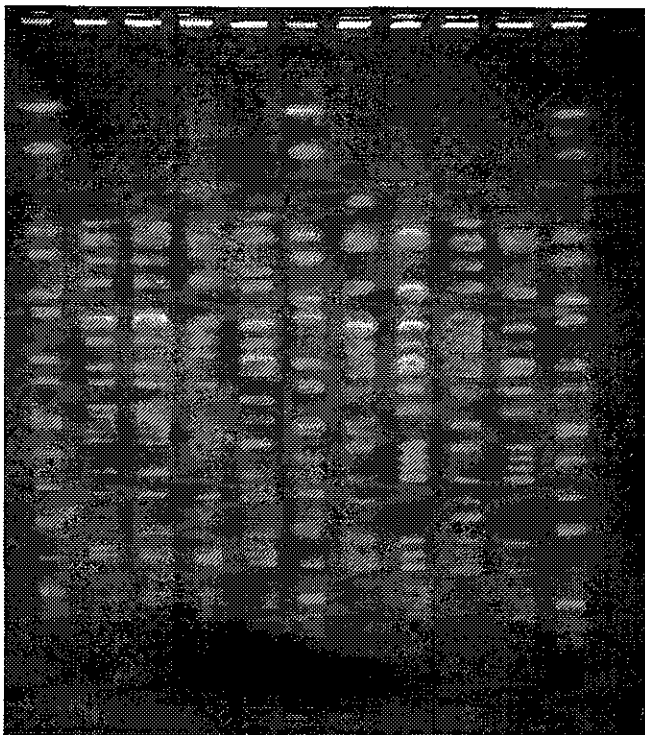
F



I



J



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

千葉県衛生研究所 横山栄二、内村眞佐子

1. 研究目的

パルスネット構築のために、腸管出血性大腸菌(以下、EHEC)のパルスフィールド・ゲル電気泳動(以下、PFGE)パターンを系統樹解析ソフトウェア(以下、解析ソフト)で解析するための条件検討を行った。

2. 研究方法

PFGE は、ディスプレイザブル・プラグ・モールドを使用する old protocol で実施した。解析ソフトとしては、Fingerprinting II Ver.3 (Bio Rad)を使用した。

初めに、PFGE の泳動時に生じる歪みの補正に使用するレファレンス・レーンの設置条件について λ DNA Ladder Marker (BMA)を用いて検討した。次に、得られたレファレンス・レーン設置条件を用いて、類似度算出法および類似度算出の際のパラメーター(トレランス値および最適化値)設定について検討した。最後に、検討したレファレンス・レーン設置条件および類似度算出法を用いて、千葉県内で2003年8~12月に分離された家族内発生4事例由来9株、集団発生1事例由来13株、散发発生由来17株の計40株のEHECのPFGEパターンを解析ソフトで解析し、クラスター分析の有効性を検討した。

3. 研究結果

1) レファレンス・レーンの設置条件

PFGE の泳動時に生じる歪みを補正するためには、歪み補正に使用するレファレンス・レーンをサンプル・レーン3本おきに設置する必要がある。さらにサンプル・レーンは、2本のレファレンス・レーンに挟み込まれる状態であるか、隣接している必要がある。

2) 類似度算出

Dice 法による類似度は、解析ソフトが算出するトレランス値(0.32%)と最適化値(0%)では同一菌株間であってもかなり低かった。トレランス値と最適化値を増加させると類似度は増加したが、全ての菌株を類似度90%以上にすることは出来なかった(表1)。またトレランス値と最適化値を増加させることで逆に類似度が低下する菌株があった(表2)。

一方、Pearson の積率相関係数(Pearson 法)による類似度は、解析ソフトが算出

する最適化値(0%)で同一菌株間で Dice 法より高く、最適化値 0.5%で全ての菌株が類似度 90%以上となった(表 1)。また最適化値を増加させても、類似度が低下することはなかった(表 2)。

3) 解析ソフトによるクラスター分析の有効性

千葉県内で 2003 年に分離された 40 株の EHEC は、家族内感染および集団発生由来株はそれぞれ類似度 90%以上のクラスターを形成した(図 1)。

4. 考察

今回我々は、解析ソフトによる解析で同一菌株を同一と認識可能なレファレンス・レーンの設置条件を検討したところ、一般的に使用されることが多い両端の 2 レーンおよび中央付近の 1 レーンの計 3 レーンだけの配置では十分な補正が行えないことが明らかとなった。近年、 λ DNA Ladder Marker の代わりに *Salmonella* Braenderup H9812 株を用いて PFGE の再現性を高めることが検討されているが、その場合のレファレンス・レーン設定条件は本研究で良好であった条件よりは緩和されると思われるが、条件を緩和するためは再度設定条件を検討することが必用と思われる。

次に、類似度算出法および類似度算出の際のパラメーター設定について検討したところ、PFGE の類似度算出に用いられることの多い Dice 法はパラメーター値を増加させても同一菌株間の類似度が 90%以上とならず、パラメーター値を増加すると類似度が逆に低下するトレランス・パラドックスとでも言うべき現象が発生した。また Dice 法は、共通バンドの有無に基づき類似度が算出されたため、解析ソフトによるバンド認識によって類似度が影響を受ける恐れがある。一般にバンド認識は、解析ソフトによる自動バンド認識だけではピーク・ショルダーやバンド濃度の差により正確に認識されず、解析者が手動操作で修正する必用があるため、同一菌株の PFGE パターンであっても解析者の主観に基づく手動修正が影響してバンド認識が異なる危険性がある。さらに、複数のバンドが重複したバンドを 1 本のバンドとして認識させると異なる菌株を同一と誤認識する恐れがあるが、解析ソフトでは複数のバンドが重複したバンドに、同一位置の複数バンドとして認識することが出来きない。そこで我々は、デンストメリック・カーブに基づき算出される Pearson 法を用いて類似度を算出することを試みた。Pearson 法ではパラメーター値を増加させてもトレランス・パラドックスは生じなかった。また Dice 法で問題となるバンド認識の必用がないことから、手動修正による解析者の主観の影響や複数バンドが重複したバンドの影響を考える必用がなく、PFGE パターンのクラスター分析に有効であると思われた。

そこで千葉県内で実際に家族内発生および集団発生から分離された菌株を含む菌株を、レファレンス・レーンを3本おきに配置してPFGEを行い、得られたPEFGパターンをPearson法で類似度算出してクラスター分析したところ、家族内感染および集団発生由来株はそれぞれ類似度90%以上のクラスターを形成した。さらに菌株を追加し、最終的にEHEC203株のクラスター分析を行い、良好な結果を得た。

以上の検討結果を用いることで、分離されたEHECを逐次クラスター分析し、類似度90%以上となるクラスターが発生した場合にはdiffuse outbreakを疑って対処するシステムの構築が可能であることが示唆される。クラスター分析の対象としては、パルスネット構築の目的がdiffuse outbreakの早期把握であることから、Tenoverらが目視でのPFGEパターンの同一性の判断基準として提唱している3ヶ月以内の分離菌株を対象とすることが望ましいと思われる。

表1 2枚のゲルで泳動した同一菌株間の類似度

類似度算出法	トレランス	パラメーター設定				
		0	0.25	0.5	最適化	
Dice法	0.32	23.37~100	36.66~100	58.17~100	50.89~100	51.15~100
	0.5	36.69~100	54.41~100	63.33~100	73.15~100	72.67~100
	0.75	58.37~100	74.71~100	79.53~100	87.48~100	87.48~100
	1.0	69.54~100	80.23~100	83.61~100	82.23~100	82.23~100
Pearson法	—	61.99~97.81	89.39~97.81	91.09~97.81	91.09~97.81	91.09~97.81

表2 トレランス・パラドックスが生じた菌株の類似度

菌株	類似度算出法	トレランス	パラメーター設定最適化			
			0	0.25	0.5	1.0
CEC01273	Dice法	0.32	23.37	36.66	73.33	73.33
		0.5	36.69	80.01	86.67	93.33
		0.75	58.37	74.71	100	100
CEC03017	Dice法	1.0	74.30	100	100	100
		0.32	83.65	93.85	97.15	97.15
		0.5	63.49	87.29	87.29	87.29
CEC03018	Dice法	0.75	74.51	100	100	100
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03019	Dice法	0.5	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03020	Dice法	0.75	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03023	Dice法	0.5	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03024	Dice法	0.75	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03026	Dice法	0.5	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03027	Dice法	0.75	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03053	Dice法	0.5	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09
CEC03064	Dice法	0.75	74.51	94.12	94.12	94.12
		1.0	100	100	100	100
		0.32	63.49	63.87	71.86	63.09

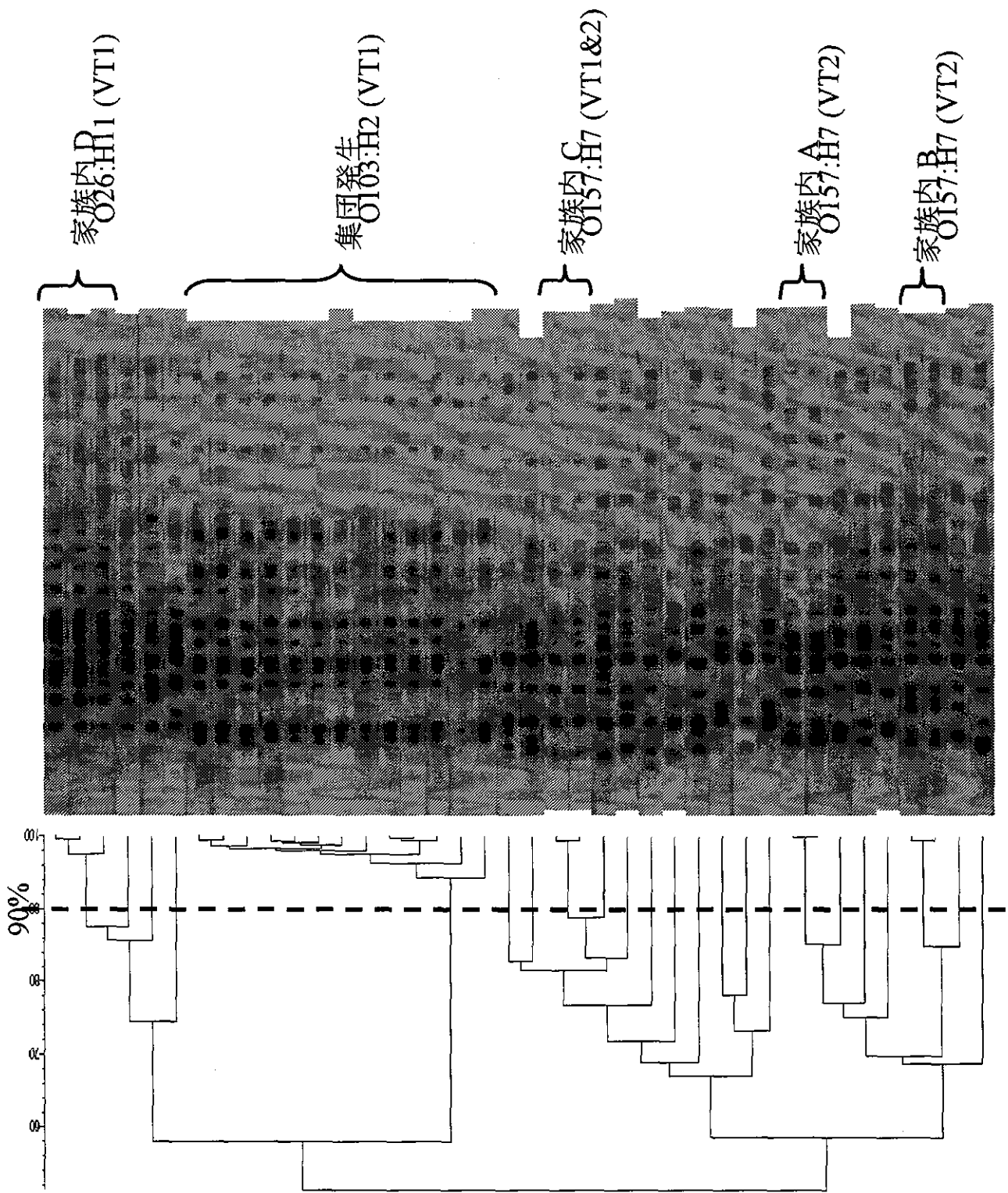


図1 Pearson法で類似度算出したクラスタ分析

Salmonella Enteritidis 食中毒事例へのPFGE解析の応用例

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)

Salmonella Enteritidis 集団食中毒事例(茨城県衛生研究所)

PFGE: Ibaraki SE(Xba1)及びIbaraki SE(Bln1)共通

「事例1」

茨城県日立市の菓子店で購入した柏餅を喫食した10名中9名が食中毒症状を呈した
患者は平成16年6月5-7日に喫食、6月6-8日にかけて発症
原因食は菓子店で製造販売された柏餅(6月5日購入)

Lane 1 柏餅残品分離株

Lane 2-6 患者便由来株

分離株のファージ型はすべて4

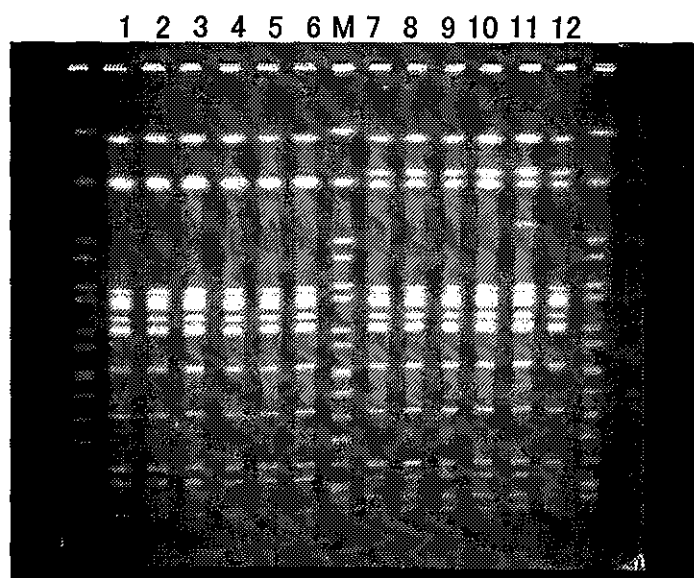
「事例2」

茨城県里美村の地区敬老会で配布されたロールケーキを喫食した209名中53名が食中毒症状を呈した
患者は平成16年9月20-23日に喫食、9月20-25日にかけて発症
原因食は福島県で9月19日に製造されたロールケーキ

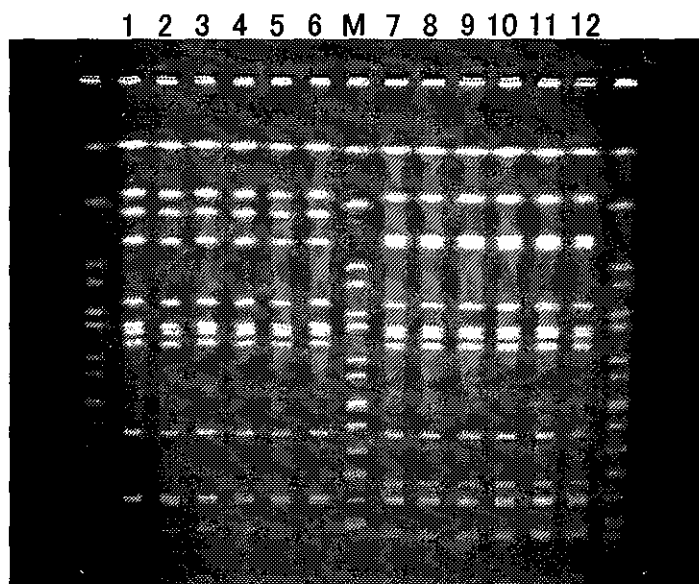
Lane 7 柏餅残品分離株

Lane 8-12 患者便由来株

分離株のファージ型はすべてRDNC



Xba I



Bln I

SEを原因菌とする食中毒事例（群馬）

〔概要〕2004年7月26日、県内の医療機関から「某保育園で下痢、発熱、嘔吐などの症状を訴える園児が増えている」、また、別の医療機関からも同様な状況である旨の連絡が当轄の保健福祉事務所にあった。同事務所は保育園とそこに通園する園児・児童の保護者との同意を得て疫学調査を実施した。

発生状況調査から、発症者は保育園内の者に限られ、共通食は保育園の給食（昼食）であることが分かった。摂食者は270人（園児223、学童保育児21、職員23、調理従事者3）、発症者は0歳～8歳の園児・児童の計154人（男子75人、女子79人）であった。いずれも発症は20日～27日の間に起こり、発病率（患者数/推定原因食品喫食者数×100）は57%と推定された。また、発症者の主症状は下痢（100%）、発熱（87.7%）、吐気（30.5%）、嘔吐（22.1%）、頭痛（26.0%）であった。

原因食品および汚染経路を特定するため、20日～23日までの食品27検体（検食17、食材10）、ふき取り10検体、園児・児童の便計13検体、調理場排水1検体、井戸水1検体の合計52検体が当研究所に搬入された。原因菌検索の結果、患者便12検体から *Salmonella* Enteritidis (SE) が検出された。しかし、他の検体からSEは検出されなかった。検出されたSEは、全ての株で生化学的性状ならびに薬剤感受性試験結果が一致した。また、同事務所から他の検査機関に依頼した職員および調理従事者便のうち9検体（職員6、調理従事者3）からも *Salmonella* 09群 (SE) が検出された。

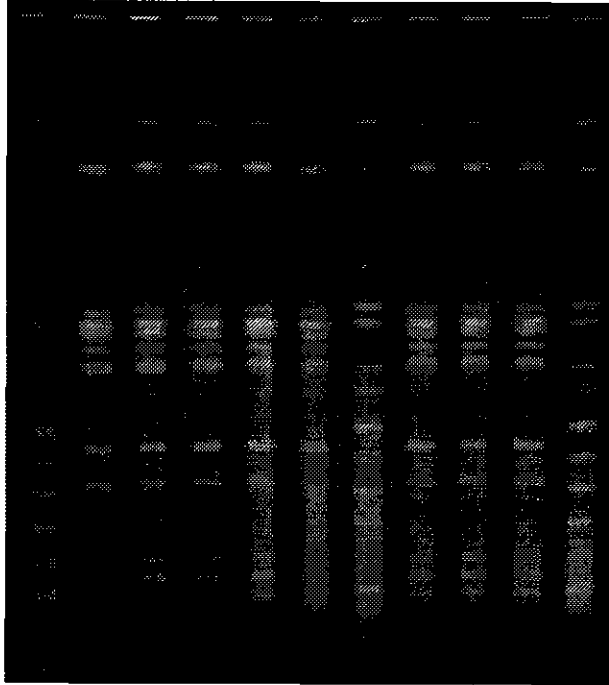
上記の調査結果から、SEは検食、食材、ふき取り等の検体から検出されず汚染経路は不明であったが、共通食が給食のみであること、複数の園児・児童、職員、調理従事者からSEが検出されたこと、発症者の症状が同菌による主要な症状を呈していることなどから、原因物質をSEと特定し食中毒と断定した。本事例では保育園の給食に卵や肉類がほぼ毎日使用され、喫食状況や発症時期に差のないことから、SEが同じ時期になんらかの原因で食品に混入したものと推定される。今回の事例はSEが検出された者のうち症状を呈したのは園児・児童に限られ、しかも摂食した園児・児童の約69（154/223）%に発症がみられた。以上のことから、特に低年齢層におけるサルモネラ汚染対策には、今後も十分な警戒が必要であると考えられた。

〔PFGEの結果〕

検出されたSEの21株のうち、任意に選んだ8株（園児・児童5株、職員1株、調理従事者2株）についてPEGEを実施した。制限酵素は *Xba*I と *Bln*I の2種を使用した。泳動条件は電圧6.0V/cm、パルスタイムおよび泳動時間は2.2sec.～63.8sec. 20時間、循環Bufferの温度は12℃とした。*Xba*I 処理では、SE8株は同一のDNA切断パターンが認められた。一方、*Bln*I 処理では園児・児童の1株でバンドが1本異なっていた。これらの結果から、同じ起源のSEによる食中毒であったことが推定される。

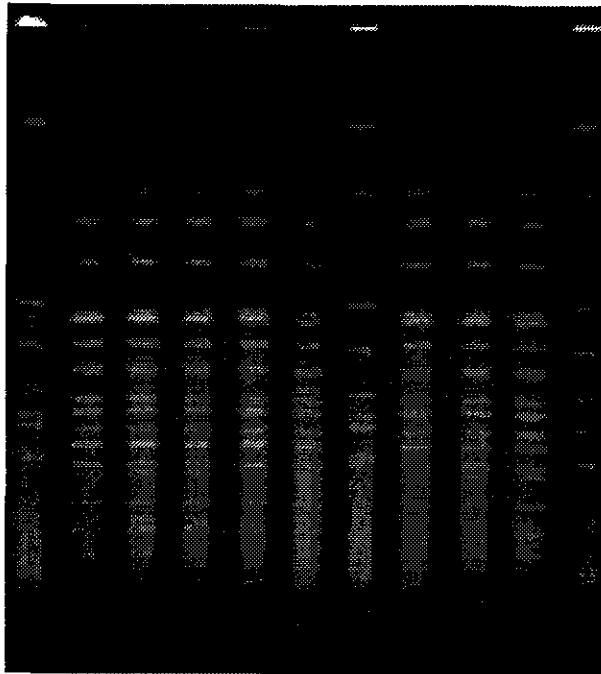
食中毒由来 S E の PFGE 泳動像

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 M



(制限酵素 *Xba* I)

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 M



(制限酵素 *Bln* I)

M: Marker (*S. Braenderup* H 9812)

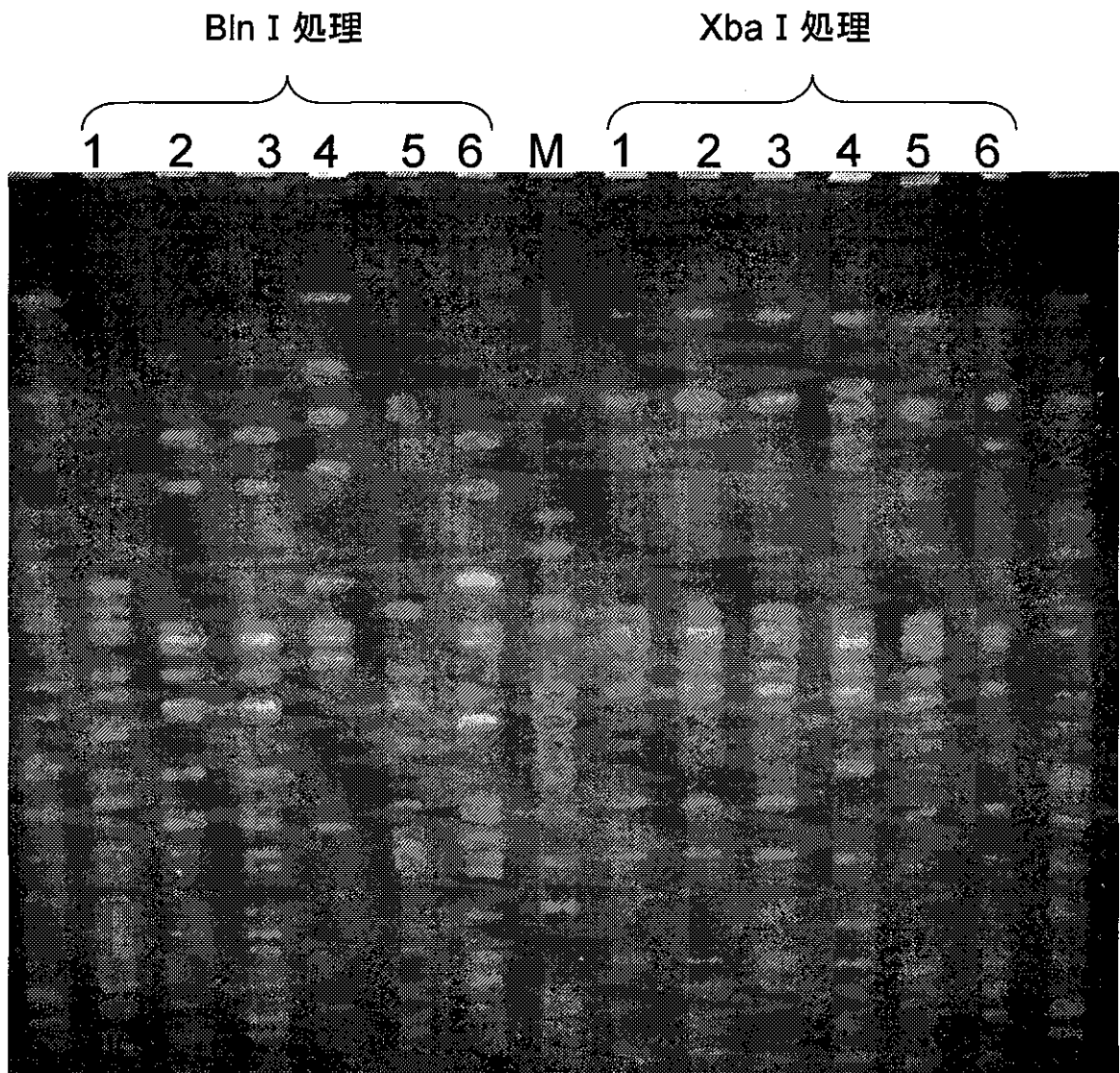
1~5: 園児・児童由来株

6~8: 職員・調理従事者由来株

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)

菌株No.	性	年齢	血清型名	区分	薬剤耐性	備考
Sa04098	男	?	Enteritidis	患者	SM	
Sa04102	男	?	Enteritidis	患者	SM	
Sa04103	男	?	Enteritidis	患者	SM	
Sa04139	男	35	Enteritidis	患者	—	
Sa04148	女	?	Enteritidis	患者	SM	
Sa04186	男	14	Enteritidis	患者	SM	

M:Salmonella Braenderup H9812 Standard/*Xba* I 処理



事例1 仕出し弁当を原因とした *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例

2004年8月6日、A市内の医療機関から保健所へ、「食中毒用症状を呈する患者を診察し、このうち複数の患者便からサルモネラ属菌を検出した」旨の連絡が入った。

保健所による調査の結果、患者らは8月2日から3日にかけてA市内で開催されたスポーツイベントに参加し、仕出し弁当屋が提供した弁当を喫食していることが分かった。その後、当該弁当を喫食した者は約2,000名にのぼることが分かり、調査で確認できた281名中72名が、下痢・腹痛・発熱など同様の症状を呈していた。保健所及び医療機関が行った検査の結果、合計8名の患者便から *Salmonella* Enteritidis が検出された。

患者72名の共通食はこの施設で製造した弁当のみだったため、保健所はこの仕出し弁当屋を原因とする食中毒と断定した。

分離された8菌株について、当所においてPFGEを実施したところ、3パターンに分類された。

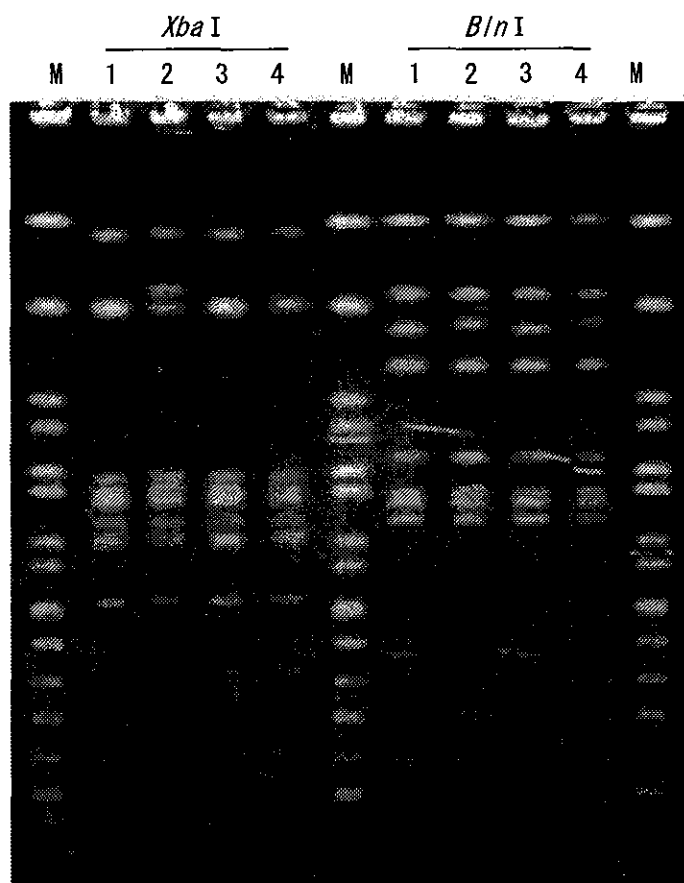
事例2 飲食店を原因とした *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例

2004年8月17日、利用客から当該飲食店へ「8月14日の夜、家族3家族10名で食事をした。店を利用した翌日に熱が出て、うち1名は入院している。」との連絡が入った。翌々日の19日、当該飲食店は保健所へ連絡をした。20日になり、利用客から保健所へ同様の届出があった。

保健所による調査の結果、8月14日から17日の間に当該施設を利用した約900名のうち予約状況から確認できた23グループ162名中、13グループ42名に下痢、腹痛、発熱、嘔吐等の症状が認められた。また、保健所並びに医療機関で行った細菌検査の結果、有症者15名および従事者5名からSEが分離された。

有症者らにほかに共通する行動等はないことなどから、保健所は当該飲食店を原因とするSE食中毒と断定した。

分離された計20菌株について、当所においてPFGEを実施したところ、すべて同一パターンであった。



1 : 事例 1 パターン 1
 2 : 事例 1 パターン 2
 3 : 事例 1 パターン 3
 4 : 事例 2
 M : マーカー *Salmonella* Braenderup H9812

泳動条件 : 6V/cm 2.2sec~63.8sec 20 時間
 buffer 温度 12°C

S. Enteritidis 食中毒事例の概要および分離株の PFGE 画像

(静岡県環境衛生科学研究所)

事例 1

概要：6月30日に静岡県西部の飲食店で会食料理を喫食した3グループ12人中10人（うち入院2名）が、翌日午後から下痢、腹痛、発熱等の症状を呈し医師に受診したところ、食中毒と診断された。確定患者数36人。

1,8,15 レーン：DNA サイズマーカー (*S. Braenderup* H9812)

2,9 レーン：S04089 (食品 (茶碗蒸地) 由来株)

3,10 レーン：S04092 (調理従事者便由来株)

4,11 レーン：S04093 (患者便由来株)

5,12 レーン：S04094 (患者便由来株)

6,13 レーン：S04095 (患者便由来株)

7,14 レーン：S04096 (患者便由来株)

2~7 レーンは *Bln* I, 9~14 レーンは *Xba* I で処理

--91--

事例 2

概要：8月26日に静岡県東部の病院内の調理室で調理された夕食を喫食した84人（入院患者および従業員）中26人が27日の午前10時ごろから発熱、嘔吐、下痢等の症状を呈し、医師により食中毒と診断された。確定患者数33人。

1,8,15 レーン：DNA サイズマーカー (*S. Braenderup* H9812)

2,9 レーン：S04163 (患者便由来株)

3,10 レーン：S04165 (患者便由来株)

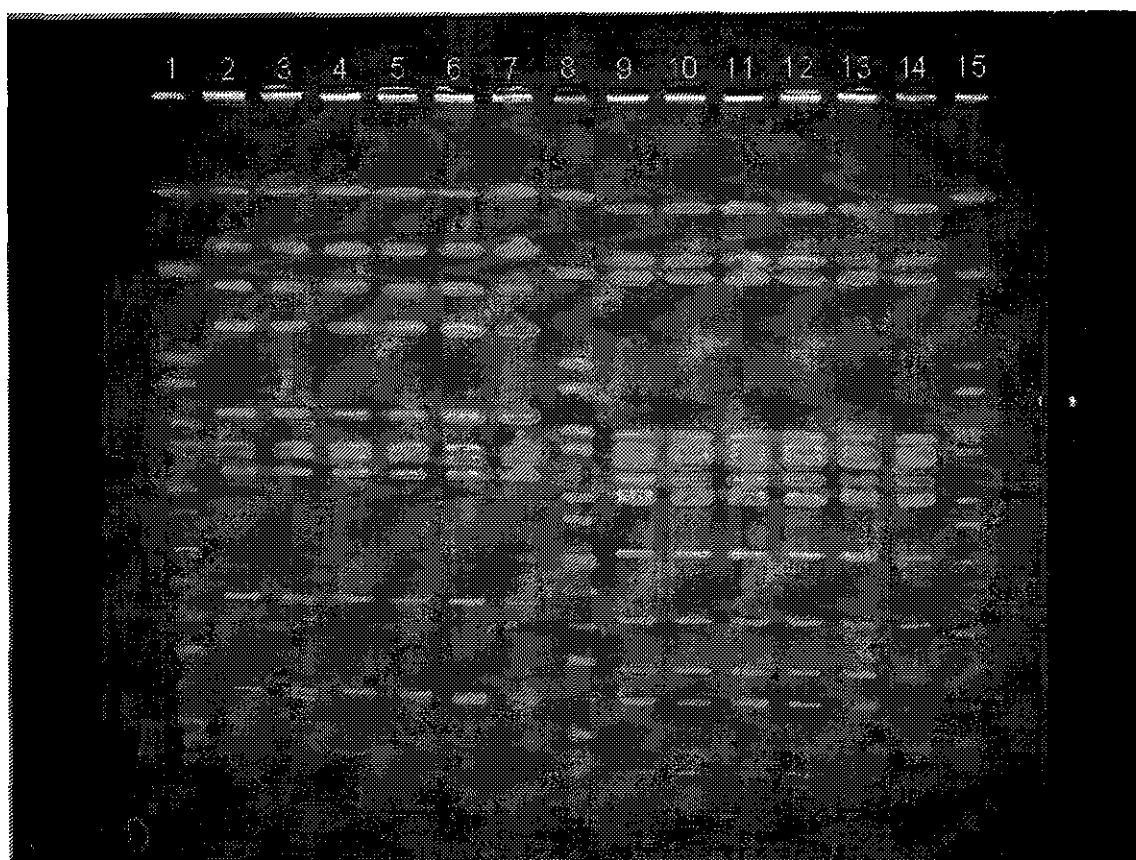
4,11 レーン：S04169 (患者便由来株)

5,12 レーン：S04173 (患者便由来株)

6,13 レーン：S04176 (患者便由来株)

7,14 レーン：S04171 (食品 (卵そばろ) 由来株)

2~7 レーンは *Bln*I, 9~14 レーンは *Xba*I で処理



静岡県環境衛生科学研究所