

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

分担研究・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 O157 を用いたパルスネット構築のための精度管理

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
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 愛知県衛生研究所
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保健環境研究部
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

研究要旨

「パルスネットジャパン」構築のための準備活動として東海・北陸地方 8 地方衛生研究所（地研）と豊田市衛生検査所（豊田市）による腸管出血性大腸菌 O157 を用いた精度管理を計 2 回実施した。

第 1 回精度管理では、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）型の異なる 4 検体について、これら 9 施設が感染研もしくはそれに類似した条件で PFGE を実施した。その結果、得られた 9 施設全ての泳動図は解析ソフトによる解析が可能な良好な画質であった。これら泳動図について施設間の相同性を検討した。4 検体全てで、同一検体が同一クラスターを形成した。なお、同一検体ごとに各施設間で得られた相同性は 60.1%から 82.4%であった。この結果は昨年度の第 1 回精度管理と比べ、単一クラスターの形成、及び施設間の相同性の向上（昨年度第 1 回は 38.5%～51.6%）の点でより優れていた。これは各施設が同一もしくは類似した実施条件で PFGE を実施したことによると考えられた。

第 2 回の精度管理では、研究協力者が愛知県衛生研究所（愛知衛研）に集まり同一検体（第 1 回精度管理で最も相同性の低かった検体 1 を用いた）を愛知衛研が作成した同一ゲルを用いて電気泳動を行なう実習を実施した。得られた泳動図の解

析を行なった結果、8地研（豊田市は不参加）全体の相同性は77.6%と各施設で行なった場合に比べ約18%高かった。この結果から、泳動図の相互比較のためには各施設で行なった場合の相同性をさらに高める必要があることが明らかとなった。また、感染研の実施条件には記載されていない PFGE 用ブロックの厚さ及び大きさが施設間で異なっていることも明らかとなった。従って、各施設間の相同性を今後さらに向上させるためには、PFGE 実施の手技ひとつひとつの細かいマニュアルの作成と各研究協力者が1カ所に集まってそのマニュアルに従った実習を行ない、手技の確認を行なうことが必要であると思われた。

A. 研究目的

我が国では、0157 による diffuse outbreak（散在的集団発生）を迅速に検出するためのシステムである「パルスネットジャパン」稼働のため、国立感染症研究所（感染研）と全国の各地域ブロック代表の5地方衛生研究所（地研）が協力して研究班活動を行なっている。本システムでは、各地研が都道府県内で検出された0157についてパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を行ない、その泳動図を感染研に電送し、感染研でこれら泳動図について解析ソフトを用いて比較を行なう。もし同一もしくは非常に類似した泳動図が複数の異なった都道府県から得られた場合には diffuse outbreak の発生が強く疑われ、迅速な diffuse outbreak の検出、及びその疫学情報の裏付けが可能となる。

本システムが円滑かつ信頼性を持って稼働するために最も重要な点は、「異なった地研で同一の PFGE 型の 0157 について PFGE を実施した場合、解析ソフトを用いてその泳動図を比較するとその相同性が 100%となる。」ことである。

昨年度東海・北陸ブロックでは、研究班活動の一環として7地研と豊田市衛生検査所が参加して0157を用いたPFGE精度管理を2回実施した。その結果、菌液濃度の統一、サルモネラマーカの使用、及び泳動条件の統一によって、各地研のPFGE画質の向上、及び同一検体を用いたPFGE解析にお

いて各施設間の相同性の向上が認められた。そこで、本年度もPFGE画質、及び各地研間の同一検体を用いたPFGE解析における相同性向上のため、2回の精度管理を実施した。具体的にはPFGE型の異なる4株の0157について各施設で感染研のPFGE実施条件でPFGEを行なうこと、及び、その泳動図を愛知県衛生研究所（愛知衛研）にメールで電送するよう要請した。愛知衛研では解析ソフトを用いてその泳動図の比較を行ない、その相同性について検討した。第2回精度管理では、第1回精度管理において各施設間で相同性が最も低かった1株の0157（検体1）を試料として用いた。各地研で独自に作成したPFGE用ブロックを各研究協力者が愛知衛研に持参し、愛知衛研が提供した同一ゲル上で電気泳動を行なった。得られた泳動図の相同性を各地研で個別に電気泳動を行なった場合と比較して、相同性にどの程度差があるかについて検討を加えた。また、泳動図に大きな影響を与えると考えられるPFGE用ブロックについて、その厚さ、大きさの地研毎の違いについて検討した。

B. 研究方法

菌株：散发事例4事例に由来する4株の腸管出血性大腸菌0157を用いた。これら菌株は、愛知県内で平成12年度（愛知衛研菌株番号：2000-48）、13年度（2001-77）、及び14年度（2002-58、2002-109）に検出さ

れたもので、その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて行なった。

第 1 回精度管理

[I] 送付菌株

4 検体の 0157 を精度管理に用いた。検体番号 1 から 4 はそれぞれ菌株番号 2001-77、2002-109、2000-48、及び 2002-58 である。これら検体は昨年度第 1 回精度管理で使用した菌株と同一である。

[II] 方法

愛知衛研よりそれぞれ 4 検体を 7 地研（石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県科学技術振興センター保健環境研究部、名古屋市衛生研究所）、それに豊田市衛生試験所（豊田市）に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設（仮に施設 A から I とした。）において、送付された 4 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、原則として感染研の方法（表 1）で実施することとした。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。また同時に PFGE 実施条件に関するアンケートも実施し、各施設の PFGE 実施条件の確認を行なった。

第 2 回精度管理

「平成 16 年度地域保健総合推進事業 健康危機管理における地方衛生研究所の広域連携システム構築」の研修会（平成 17 年 1 月 20 日、21 日）の一環として実施した。

[I] 菌株

検体番号 1 の 0157 を精度管理に用いた。

[II] 方法

各施設に於いて第 1 回精度管理と同一の方法で DNA 調製、制限酵素処理を行なっ

て PFGE 用ブロックを作成した。そして制限酵素反応液を TE 溶液（Tri-HCl (pH 8.0), 0.5M EDTA）に置換し、過剰な制限酵素反応が進行しないようにした。その後、8 地研の研究協力者（豊田市は不参加）が愛知衛研に集まり、愛知衛研が作成した同一ゲル上に各施設が持参した PFGE 用ブロックを置いて電気泳動を実施した。得られた泳動図について「フィンガープリント II」を用いて解析を行なった。具体的には、得られた各施設間の相同性を第 1 回の精度管理で得られた検体 1 の相同性と比較し、同一ゲルで泳動した場合と各地研で個別に電気泳動を行なった場合とで各地研間の相同性にどの程度差があるかについて検討した。また、PFGE 用ブロックをゲル上に置く際、その厚さ、大きさの観察を行なった。

C. 研究結果

[I] 第 1 回精度管理

1. 東海・北陸地方 9 施設の PFGE 実施条件（表 2）

DNA 調製及び制限酵素処理（表 1 の感染研の PFGE 実施条件の Plug agarose から Restriction digestion に相当する）に関しては、9 施設のうち 6 施設が感染研と全く同一の方法で行なっていた。残りの 3 施設うち 2 施設ではバイオラド社のキットを用い、1 施設は施設独自の方法で行なっていた。泳動条件に関しては、7 施設が感染研の泳動条件を用いていた。残りの 2 施設のうち 1 施設は泳動時間のみ異なる条件、1 地研は泳動条件の入力ミスによって感染研の泳動条件で実施した後さらに 3 時間ほど異なった泳動条件が加えられていた。なお、菌懸濁液の調製、マーカー（感染研の PFGE 実施条件の Cell suspension buffer と Marker に相当する。）は全ての施設で感染研の実施条件に従っていた。

2. 異なった PFGE 型検体の各施設間での相同性の比較とその泳動図

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体 1 から 4 までの泳動図の解析を行ない系統樹を作成した。

検体 1 (図 1) に関しては 9 施設全体の相同性は 60.6%とやや低かった。これは 9 施設の泳動図が 2 つの大きなクラスターに分かれたためと考えられ、ひとつのクラスターには 7 施設が含まれ、もうひとつのクラスターには残りの 2 施設が含まれた。それぞれの 2 つのクラスター内の相同性は 66.7%、及び 75.1%であった。また全体の相同性が低かったことを反映してか 100%の相同性を示した施設間の泳動図は認められず、最も高い相同性を示したのは施設 B と I、及び D と H の 90.1%であった。泳動パターンを解析してみると、施設 E のように同一の泳動パターンとは明らかに異なる場合が認められた。

検体 2 (図 2) については 9 施設全体の相同性は 71.1%と検体 1 に比べて高かった。9 施設のうち 7 施設は 81.5%と高い相同性を示す同一のクラスターを形成していた。このクラスター内に含まれる 3 及び 2 施設間でそれぞれの相同性が 100%を示した。一方残りの 2 施設は前述のクラスター内と比較し約 72%と低い相同性を示していた。検体 2 でも検体 1 の場合と同様にクラスターに含まれなかった地研 E の泳動パターンは他の地研の泳動パターンとはやや異なっていた。

検体 3 (図 3) に関しては 9 施設全体の相同性は 76.4%と検体 1 及び 2 より高かった。9 施設のうち 7 施設は 85.4%と高い相同性を示す同一のクラスターを形成していた。特にこれら 7 施設のうち 2 施設ではその相同性が 100%を示していた。残りの 2 施設に関しては、2 施設が同一のクラスターを形成したが、クラスター内の相同性は前述のクラスターと比べ低く約 77%であった。

検体 4 (図 4) は全体の相同性は他の 3 検体に比べて最も高く 82.4%を示した。特に 6 施設の相同性は高く約 87%で同一のクラスターを形成した。しかし、相同性が 100%を示した泳動図は認められず、最も高い相同性は地研 I と F 及び地研 C と H で何れも 94.1%であった。一方、残りの 3 施設では 2 施設が同一クラスターを形成し、そのクラ

スター内の相同性は約 94%であった。1 施設は他の施設とクラスターを形成せず単独で存在した。

9 施設の検体 1 から 4 までの泳動図を図 5 に示した。泳動図からも分かるように、いずれの泳動図も解析ソフトを用いた解析に供するのに十分な画質であった。

[II] 第 2 回精度管理

8 地研 (豊田市は不参加) が参加して、同一ゲル上に各施設で独自に作成し持参した PFGE 用ブロック (第 1 回検体 1) を置き電気泳動を実施した。そして得られた泳動図の解析を行なった (図 6)。その結果、8 地研全体の相同性は 77.6%であり、第 1 回検体 1 の 60.1%に比べ相同性の向上を得ることができた。系統樹解析の結果、数の上では第 1 回精度管理 (図 1) の時と同様に、6 つの地研からなるクラスターと 2 つの地研からなるクラスターに分かれたが、それぞれのクラスターの相同性は 87.4%、89.5%と第 1 回 (66.7%と 75.1%) に比べ、何れも高率であった。さらに 6 地研が属するクラスターのうち 3 地研はその相同性が 100%となった。また、ゲルに置く PFGE 用ブロックの厚さ、及び大きさには地研間で大きな違いがあることが明らかとなった。

D. 考察

昨年度実施した本研究班の第 1 回精度管理では、1 施設において鮮明なバンドパターンが得られなかったため系統樹解析が不可能であった。また、4 検体何れの場合にも同一検体であるにもかかわらず相同性が低いために同一クラスターに属さない泳動図が 1 つ認められた。しかし、昨年度と同じ検体を用いて実施した本年度の第 1 回精度管理では、全ての泳動図が解析ソフトを用いた解析に供するのに十分な画質であった (図 6)。さらに同一検体は 4 検体何れに於いても同一のクラスターを形成していた。昨年度実施した第 1 回精度管理の結果から相互比較のために最も重要と考えられる条件として 1) ブロック内菌量の統一、

2) シャープなバンドが安定して得られるサルモネラを *Xba* I 処理したマーカーの使用、3) PFGE 泳動条件の統一、の3点が挙げられた。従って、本年度の第一回精度管理においてはこの点に留意し、参加した9施設全てで感染研法もしくはそれに準じた実施条件によってPFGEを行なったことが今回の好結果につながったと考えられる。特に、参加した9施設のうち2施設の研究協力者は本年度からのPFGE担当者であったにもかかわらず良好な結果が得られたことは、PFGEの実施条件を統一すれば実施者の経験に大きく作用されることなく良好な結果を得ることが可能なことを示すものと考えられた。なお、DNA調製、制限酵素処理の段階では9施設のうち3施設が感染研の方法とは異なる方法であったが、上述の1) ブロック内菌量の統一はなされていた。泳動条件に関しては、2施設では感染研類似の泳動条件で実施していたが、これらは感染研の泳動条件と比べ泳動時間が長い(3時間)もの、それにミスにより感染研の本来の泳動時間に加えて更に約3時間長い異なった泳動条件が追加されたのみであったことから、その影響はきわめて小さかったものと考えられた。

本年度の第2回精度管理では、第1回精度管理で最も相同性の低かった検体1に関して、各地研が愛知衛研に集まり持参したPFGE用ブロック(検体1)を同一ゲル上に置いてPFGEを行なった。その相同性を各施設で独自に行なった場合と比較すると同一ゲルで行なった場合の方が約18%高く(60.1%と77.6%)、各地研でPFGEを実施した場合の相同性をさらに高める必要があることが明らかとなった。また、泳動図に大きな影響を与えるPFGE用ブロックの厚さ、及び大きさの観察も併せて行なったところ、ブロックの厚さ、及び大きさが各研究協力者間で異なっていることが明らかとなった。このような細かい点に関しては感染研のPFGE実施条件には記載されていない。そこで、各施設で実施した同一検体のPFGEの相同性をさらに向上させるためには、

PFGEのひとつひとつの手順を細かく記載したマニュアルを作成し、ブロック内研究協力者を一カ所に集め、マニュアルに従った実習を行ないその手技を確認することが最も有効であると思われた。

また、相同性の低かった検体1と2では目視で確認しても各地研のバンドパターンに違いが認められた。具体的には高分子量領域のバンドが施設によって薄いバンドが認められたり、認められない場合があり、バンドが1から2本程度異なる場合があった。これらの原因として1) 制限酵素処理が不十分であった。2) 0157の*Xba* I認識部位に変異が起きた。等が考えられる。しかし1)に関しては他の検体ではこのような現象が認められていないことから可能性は低いと思われる。よって、2)、すなわち検体自身が不安定であることが考えられる。この点に関してさらに検討を行なう必要があるが、集団発生及びdiffuse outbreakからの検体のPFGEではこのような現象が発生する可能性があることも考慮する必要があるものと思われる。

E. 結論

パルスネットジャッパン構築のための準備活動として東海・北陸地方8地方衛生研究所(地研)と豊田市衛生検査所(豊田市)による腸管出血性大腸菌0157を用いた精度管理を計2回実施した。

第1回精度管理では、PFGE実施条件は感染研の実施条件を要請した。PFGE型の異なる4検体全てについて、9施設全ての泳動図は解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。施設間の相同性の比較を行なったところ、全ての検体で検体ごとに同一のクラスターを形成した。また、その相同性は60.1%から82.4%であった。これらの結果は昨年度の第1回精度管理の結果と比べ向上(昨年度第1回は38.5%から51.6%)が認められた。これは昨年度第1回精度管理とは異なり全9施設が感染研もしくはこれに類似した実施条件でPFGEを行なったことが大きく関与しているものと思われた。

第2回精度管理では8地研（豊田市は不参加）が愛知衛研に集まり、第1回で最も相同性の低かった検体1について各地研独自に作成し持参したPFGE用ブロックを同一ゲル上に置き電気泳動を行なう実習を実施した。8地研全体の相同性は77.6%と第1回の各施設で行なった場合に比べ約18%高かった。この結果から、泳動図の相互比較のためには各施設で行なった場合の相同性をさらに高める必要があることが明らかとなった。また、各地研のブロックの厚さ、及び大きさにも違いがあることが明らかとなった。従って、各施設間の相同性を今後さらに向上させるためには、PFGE実施の手技ひとつひとつの細かいマニュアルの作成と各研究協力者が1カ所に集まってそのマニュアルに従った実習を行ない、手技の確認を行なうことが必要であると思われた。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表
誌上発表

Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A *Streptococcus* isolates of T serotypes 4 and 11. Masakado Matsumoto, Kenji Sakae, Michio Ohta, Miyoko Endo, Rumi Okuno, Shoko Murayama, Kyoko Hirasawa, Rieko Suzuki, Junko Isobe, Daisuke Tanaka, Chihiro Katsukawa, Aki Tamaru, Masaaki Tomita, Kikuyo Ogata, Tomihisa Yasuoka, Tadayoshi Ikebe, Haruo Watanabe and The Working Group for Group A Streptococci in Japan. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 25:142-147, 2005.

Analysis of a Novel Prophage-encoded Group A *Streptococcus* Extracellular Phospholipase A2. Nagiec MJ, Lei B, Parker SK, Vasil ML, Matsumoto M, Ireland RM, Beres SB, Hoe NP, Musser JM. *J. Biol. Chem.* 279:45909-18. 2004.

Development of a rapid PCR method using the insertion sequence IS1203 for genotyping shiga

toxin-producing *Escherichia coli* O157. Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Mami Hata, Masao Takahashi and Kenji Sakae. *J. Clin. Microbiol.* 42:5462-5466, 2004.

学会発表

松本昌門、鈴木匡弘、秦眞美、池辺忠義、渡辺治雄、鳥居啓三、長谷川忠男、太田美智男。A群レンサ球菌が産生するDNase Bの遺伝子解析とその発現に影響を及ぼす環境因子の検討。第41回細菌学会中部支部総会。岐阜市。2004.10.30, 31.

表1 感染研の PFGE 実施条件

感染研New Protocol in 2004 (STEC, <i>Shigella</i>)	
Cell suspension buffer	DW(精製水) OD610nm = 0.5 - 0.6
Plug agrose	Cell suspension buffer 200 μ l と1% SeaKem Gold Agarose in DW 200 μ lを混和。
Lysis buffer	1mg/ml Proteinase K, 1% N-Laurylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) (2h-overnight, 50°C)
Washes	4 mM Pefabloc SC in TE (20min, 50°C, 2回)→TEで洗浄 (20 min 1回, on ice) →Enzyme buffer (20min, on ice)
Restriction digestion	20-30U/sample (<i>Xba</i> I) at 37°C for 2h-overnight.
Electrophoresis condition	6V/cm, 2.2-54.2s, 19h, 12-15°C, 1% Seakem Gold Agarose 0.5 × TBE
Marker	<i>Salmonella</i> Braenderup H 9812 PulseNet Standard Strain (Digested by <i>Xba</i> I)

表2 東海・北陸9施設の PFGE 実施条件

	施設の数(n=9)
DNA調製、及び制限酵素処理	感染研:6 Kit:2 独自:1
泳動条件	感染研:7 感染研類似:2

図1 検体1の系統樹解析

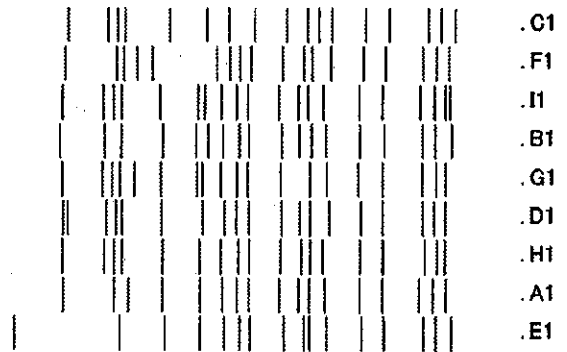
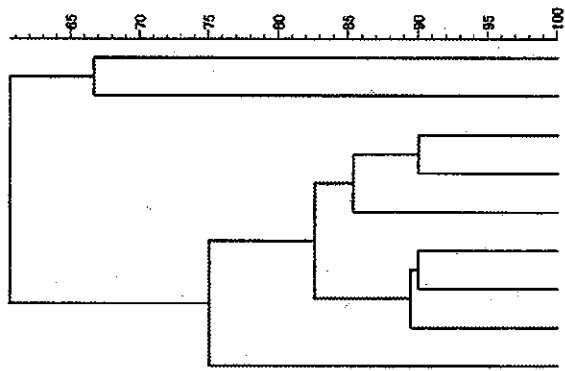


図2 検体2の系統樹解析

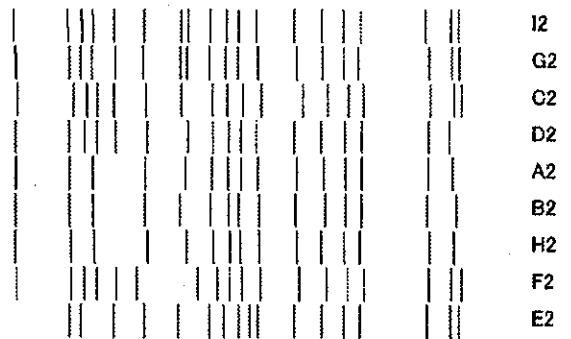
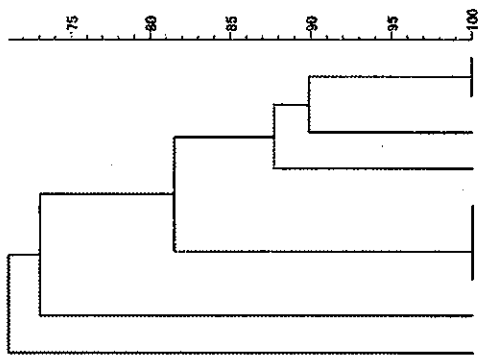


図3 検体3の系統樹解析

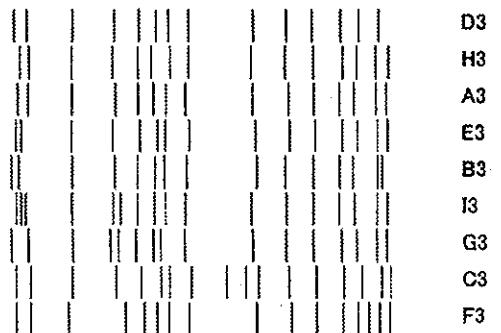
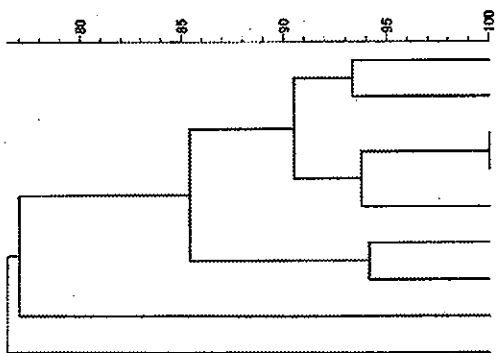


図4 検体4の系統樹解析

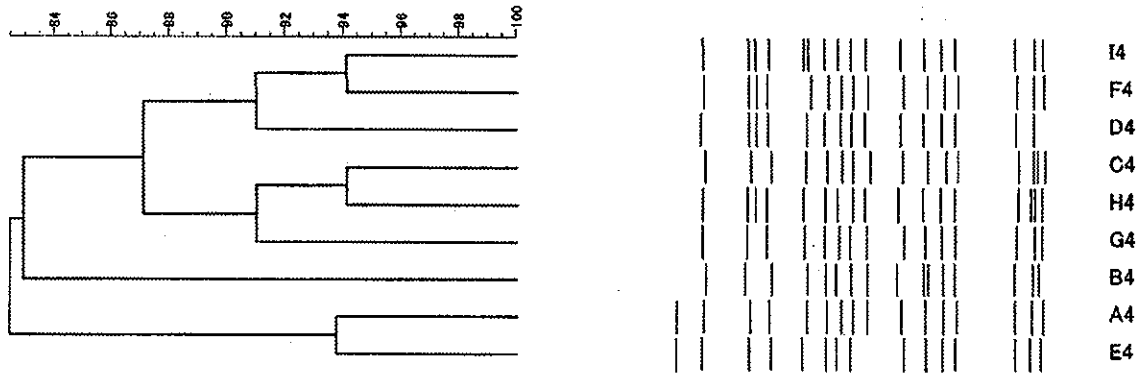


図6 同一ゲルで行なった検体1の系統樹解析

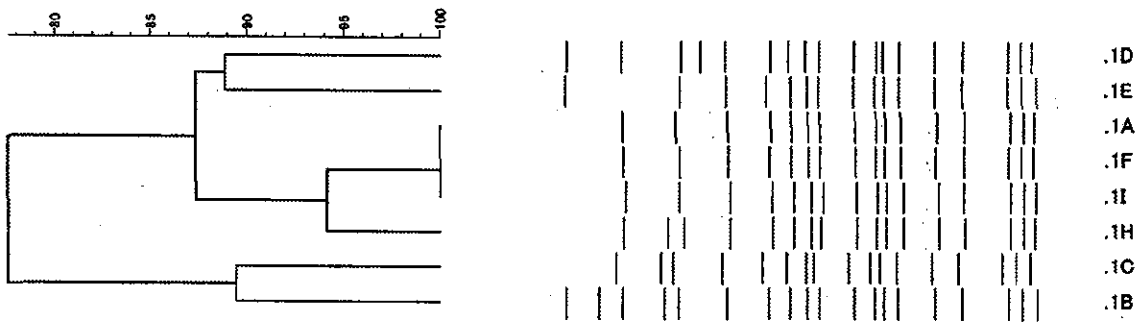


図5 9施設の泳動図 (A-D)

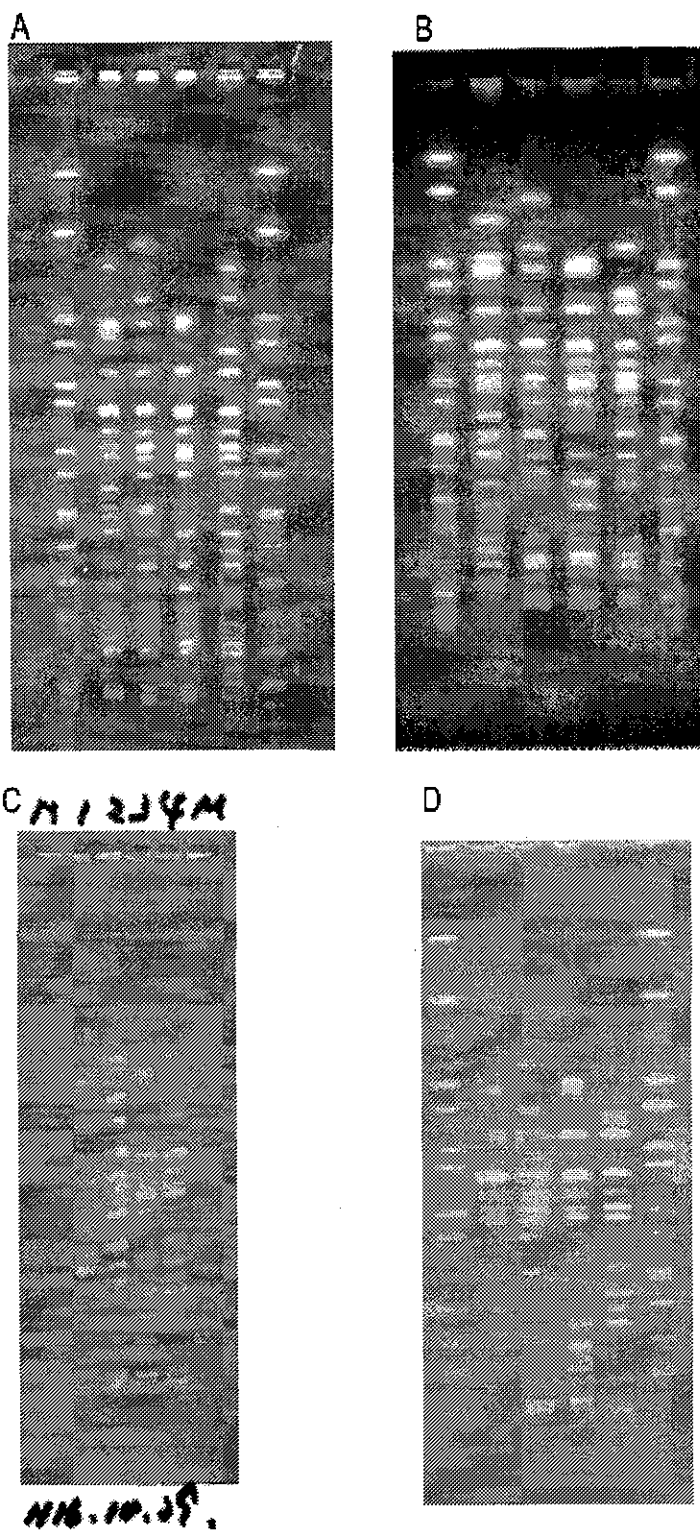
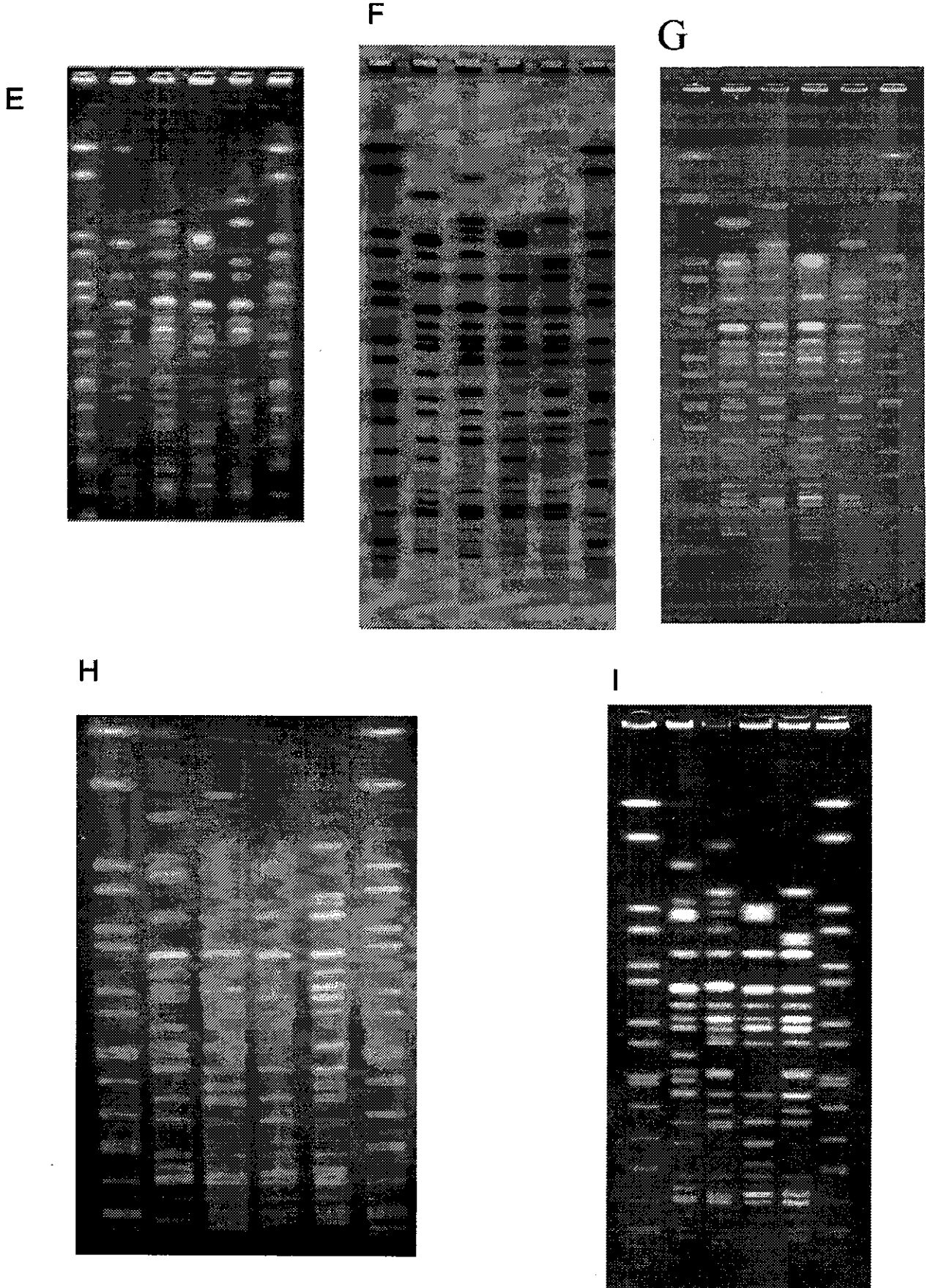


図5 9施設の泳動図 (E-I)



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

分担研究・*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

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
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 愛知県衛生研究所

研究要旨

1982年から2003年にかけて愛知県内で検出された139株のソンネ菌を対象に、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を実施し、そのバンドパターンの解析を解析ソフト「フィンガープリントII」を用いて行なった。その結果、139株のうち106株(76.3%)は19のパルス型(バンドパターンの相同性が85%以上を示すものを同一のパルス型と見なした。以下PTと略す。)に型別分類され、残りの33株(23.7%)は85%以上の相同性を示す菌株が他になく、単独で存在していた。これらの結果と菌株の分離年(分離年1982年～91年を前期、1992年～2003年を後期とした。)、及び由来(国内事例株か国外感染事例株)との関係について考察を加えた。

1. 前期に分離された50株は26株(52%)が11のPTに型別され、残りの24株(48%)はPTに型別されなかった。これに対し、後期に分離された89株は80株(90%)が15のPTに型別され、残りの9株(10%)はPTに型別されなかった。すなわち、前期は50株のソンネ菌に35の異なったPFGEパターン(11PTと24の1PFGEパターン株の和)が存在し、後期には89株に24の異なったPFGEパターン(15PT+9)が存在した。従って、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、後期では比較的限られたPFGEパターンのソンネ菌のみが存在していたと考

えられた。

2. 139株のうち106株が19のPTに型別分類されたが、このうち13PTには国内事例及び国外感染事例の両事例由来株が含まれていた。また、国外感染事例由来株の主な患者渡航先はインドネシア、インド、フィリピン、タイ、ネパール、及び中国であった。一方、残り6PTのうち4PTは国外感染事例のみ、2PTは国内事例のみに由来する株が含まれていた。以上の結果から、特に、後期では国内事例及びアジア地域を中心とする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ることが明らかとなった。したがって、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ことが強く示唆された。

A. 研究目的

我が国では、ここ10年来年間約700～1000名前後の細菌性赤痢患者の発生が報告されている。その推定感染地に関しては国外感染事例が57%、国内感染事例が約37%、不明が約6%となっており、国外感染事例が過半数を占めている(1)。国外感染事例における渡航先はアジア地域が最も多く認められ、国外感染事例の約86.4%がアジア渡航者である。アジア地域の中でもインド、インドネシア、中国、タイ、及びベトナムが上位を占め、これら5カ国でアジア地域での感染事例の約70%を占めている。

我が国で検出される赤痢菌の血清型に関しては、ソンネ菌が最も多く検出され約76%を占め、次いでフレキシネル菌が約21%で、両者で全体の約97%を占めている(1)。志賀菌、ボイド菌の検出は我が国では希で主に国外感染事例から検出されるのみである。

ソンネ菌については、国内における集団発生事例も散見される。1992年から1993年にかけて、愛知県ではソンネ菌による8件の集団感染事例が幼稚園、小学校等で発生した。また2001年から2002年にかけて、佐賀県でもソンネ菌による3件の集団感染事例が保育園等で発生している。これら小学校、保育園で発生した集団事例の感染源は何れも不明であった。また、2001年から2002年には韓国産輸入カキが原因と推定されるソンネ菌による食中毒事例が発生し、30都府県で84名の患者が発生している。

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株のソン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。

B. 研究方法

菌株: 愛知県内で 1982 年から 2003 年に分離された *Shigella sonnei* 139 株を用いた。これら菌株は県内の保健所、当研究所、及び病院において分離されたもので、129 株が下痢症患者 129 名、10 株は健康保菌者 10 名に由来するものである。また、これら 139 株のうち 113 株は散発事例 113 事例由来、26 株は集団事例 18 事例由来 (1 事例当たり 1 から 2 株) である。感染地域として国内が推定された国内事例株は 67 株 (散発事例 53 事例 53 株、集団事例 11 事例 14 株)、海外が推定された国外感染事例株は 72 株 (散発事例 60 事例 60 株、集団事例 7 事例 12 株) である。海外での感染が推定された事例における渡航先としてはインドネシア (n=20)、インド (n=10)、フィリピン (n=6)、タイ、及びネパール (n=5)、中国 (n=4) で、愛知県内で検出された国外感染事例の場合にはこれら上位 6 カ国で海外事例株の 69.4% (50/72) を占めていた。

PFGE: *Shigella sonnei* の一夜培養液 100 μ l を遠心後、滅菌蒸留水にて洗浄し、菌液を等量の 1.6% 軟寒天と混和した。その 100 μ l をインサートプラグ内に注入し、氷中で 30 分放置した。固化したゲルをプロテナーゼ K で処理した後、制限酵素 *Xba*I で処理を行ない、CHEF DR III (バイオラド社) を用いて

電気泳動を行なった。泳動条件は、電圧 6V / cm、泳動時間 21 時間、パルスタイム 2.2 秒から 54.2 秒である。マーカーは *Salmonella* Braenderup H9812 の制限酵素 *Xba*I 消化 DNA を用いた。型別分類は、解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて、PFGE パターンの相違に基づく相同性 (%) から系統樹を作成した。そして、お互いの菌株間の相同性が 85% 以上を示し、かつ 2 株以上の菌株が含まれるものをパルス型 (PT) とし、含まれる菌株数が多いものから順に PT の後に 1 から順に算用数字を付けた (例えば PT1, PT2)。

C. 研究成果

[I] PFGE 解析と PT

139 株は 19 の PT に型別され、106 株 (全体の 76.3%) が含まれた。図 1 には系統樹と型別分類された PT を、図 2 には代表的な PT の PFGE 泳動図を示した。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。また、PT2、3、4 はそれぞれ同一集団事例株が 2 株含まれ、PT8、9 ではそれぞれ 3 株中 2 株が同一集団事例株であった。また、PT5 は 5 株全てが 5 つの異なった国内集団事例株であった。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。

[II] PT の年次推移 (表 1)

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。一方、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。

[III] PT 株の由来

型別分類された 19 の PT について、含まれる菌株の由来 (国内感染事例又は国外感染事例) を調べた。その結果、13PT ではそれぞれ含まれる菌株の由来として、国内感染事例及び国外感染事例の両者が認められた (表 2)。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。以下表 2 に示したように PT6 から 19 まで、それぞれ国内事例及び国外感染事例由来株が認められ、国外感染事例における主な渡航先はインドネシア (n=4)、フィリピン (n=3)、及びインド (n=2) 等であった。一方、PT5 (n=5) と PT 17 (n=2) は国内事例株のみが含まれており、PT5 の 5 株は 5 つの異なった集団事例株であった。また、残りの 4PT (PT3 (n=9)、13、15、18 (各 n=2)) は国外感染事例株のみが含まれ、特に PT3 の 9 株は 1991 年から 97 年にかけて分離された 9 件で、その全てがインドネシア渡航からの散発事例由来であった。

D. 考察

過去 20 年間に愛知県内で検出された 139 株のソンネ菌について PFGE とそのパターンの解析から、検出時期 (前期: 1982 ~ 91 年、後期: 1993 年 ~ 2003 年) により PFGE パターンに変化があることが明らかとなった。すなわち、前期には検出株数 (50 株) は少ないものの比較的多数の異なった PFGE パターン (11 の PT + 24 の 1PFGE 株

＝35)のソネ菌が存在していたが、後期には前期の約1.8倍の株(89株)の約90%が前期とほぼ同数の15のPTに型別分類され、その結果として異なるPFGEパターン数(15のPT+9の1PFGE株＝24)が少なく、後期では比較的限られたPFGEパターンのソネ菌のみが存在していたことが判明した。さらに、この限られたPFGEパターンはお互いに系統樹上で隣接するPT1、2、5、6が主体であり、これら4つのPTで後期分離株の53.9%(48/89)を占めていた。また、これら4PTのうちPT5、6は後期のみ認められ、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%)が後期に認められた。これら結果から、後期で過半数を占めた4PTは前期(特に後半の87年)以降に出現し、後期で検出されるソネ菌の主流になったと思われる。

これまで愛知県で発生したソネ菌による散発、及び集団事例に関して、その殆どが感染源不明であった。今回解析を実施した139株のうち106株が19のPTとして型別分類されたが、このうち13のPTでは、国内事例由来株と国外感染事例由来株が同一のPT内に存在していた。(表2)。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アジア地域等から我が国に運び込まれ、国内で感染を起こした可能性も十分考えられるものと推察された。

しかし、前述のように後期では国内事例、国外事例を問わずソネ菌の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等をも考慮し、ソ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ものと考えられる。

E. 結論

過去約20年間に愛知県内で検出されたソネ菌139株についてPFGE解析を行なった。その結果、前期(82年から91年まで)に検出された50株のソネ菌は26株(52%)が11のPTに型別され、残りの24株(48%)はPTには属していなかった。一方、後期(1992年から2003年まで)に検出された89株は80株(90%)が15のPTに型別され、PTに属さない株は9株のみ(10%)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。

文献

1) 細菌性赤痢 2001～2002、病原微生物検出情報、24:1-8、2003

F.健康危機情報

G.研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし

表1 PTの年次推移

	前期(n=50)	後期(n=89)
	PT1 (9)	PT1 (30), PT2 (9), PT3 (7)
	PT12 (3)	PT4 (6), PT5 (5), PT6 (4)
PT	PT3, 10, 17, 18, 19 (2)	PT7, 8, 9, 11 (3)
(n=106)	PT2, 7, 14, 16 (1)	PT13, 15 (2), PT10, 14, 16 (1)
	(n=26)	(n=80)
その他		
(n=33)	(n=24)	(n=9)

表2 国内事例及び海外事例何れもが同時に検出された PT

PT(株数)	国内事例株数	海外事例渡航先(株数)
PT1 (39)	17	INA(5), IND(3), CHI(3), TAH(1), Others(10)
PT2 (10)	5	IND(3), TAH(1), NEP(1)
PT4 (6)	4	Others(2)
PT6 (4)	3	IND(1)
PT7 (4)	1	PHI(3)
PT8 (3)	1	Others(2)
PT9 (3)	1	INA(2)*
PT10 (3)	2	INA(1)
PT11 (3)	2	Others(1)
PT12 (3)	1	TAH(1), Others(1)
PT14 (2)	1	INA(1)
PT16 (2)	1	IND(1)
PT19 (2)	1	Others(1)
(84)	40	(44)

INA:インドネシア、IND:インド、CHI:中国、TAH:タイ、NEP:ネパール

Others:その他の国 * : 集団事例株

図1 ソンネ菌の系統樹解析

