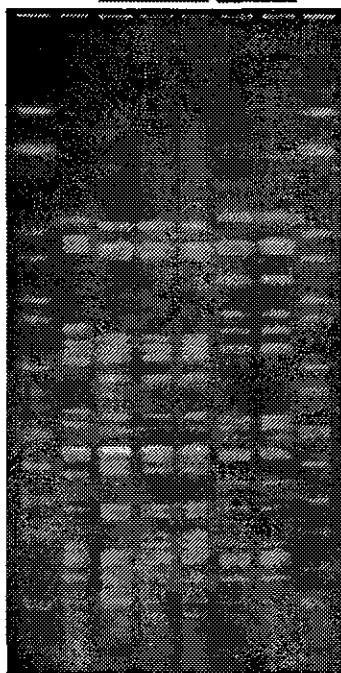


図 2 代表的なPTのPFGE泳動図

PT1 PT3



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 16 年度分担研究報告書

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

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所
	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

研究要旨

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) 0157: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。したがって、直接泳動像に影響のある泳動用アガロースを除き、泳動バッファーや試薬を統一する必要はないと考えられた。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。

## A. 研究目的

近畿支部の11衛生研究所において、パルスネット構築における施設間差を最小に抑えるため、方法の統一と各施設の技術向上を計ってきた。昨年度は、同一ロットの試薬を使い、アメリカ CDC の方法に準拠した「感染研新プロトコール」を試用したところ、従来法よりも簡便で、小さいサイズのバンドがクリアになり施設間変動をある程度解消できることがわかった。本年度は、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、施設間差および解析者による変動を検討した。また、異なるメーカーの TBE を使用し、電気泳動像への影響の有無を調べた。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 3 株 (No. 1-3) および *Shigella sonnei* 3 株 (No. 4-6) の計6株を用いた。

### 2. PFGE 法

感染研新プロトコールに準じ、Proteinase K 処理を 50°C 一夜、制限酵素 *Xba*I 処理を 37°C 2 時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba*I 切断を使用した。

前培養に用いる培地、制限酵素および反応バッファーは各施設で日常使用している

試薬を使用し、SeaKem Gold Agarose (タカラ)、Pefabloc SC (Roche) はロットを指定することなく、各施設で購入した製品を使用した。

電気泳動には、各施設で日常使用しているバッファーと統一バッファー (Invitrogen、同一ロットを配布) を使用し、同時に作製したゲルブロックで1回ずつ泳動した。

EHEC と *S. sonnei* は1枚のゲルで泳動し、泳動時間は19時間を目安として、各施設の泳動装置でゲル下端から1-1.5cm程度の泳動距離になるようにした。

### 3. PFGE 画像の解析

統一バッファー、各施設バッファーそれぞれの PFGE 画像を電子メールで施設 X に集約し、施設 X (A 解析者) および施設 Y (B 解析者) で FingerprintingII バージョン 3 (Bio-Rad) を用いて解析した。バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 5%、シヨルダー感度 0 で行い、目視で補正した後、20.5kb-1135kb 間のバンドについて類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トランス設定は最適化 0%、トランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

## C. 研究結果

### 1. 各施設における泳動条件

各施設の電気泳動用 TBE バッファーは、タカラあるいは Bio-Rad の製品が3施設ずつ、ニッポンジーン製品が2施設で使用されており、自家調整が3施設であった。泳動温度は11施設とも14°Cであったが、泳動

時間はバッファーに関係なく、18 時間が 3 施設、19 時間が 7 施設で、残りの 1 施設は 20 時間泳動していた。(表 1)

## 2. EHEC 0157 のデンドログラム

菌株 No. 1-3 について、統一バッファーおよび各施設バッファーに分けてデンドログラム (図 1、図 2) を作成したところ、解析者およびバッファーに関わらず、全株で菌株ごとに近似度 90%以上のクラスターを形成した。

A 解析者では、統一バッファーの菌株 No. 1 で 7 画像、菌株 No. 2 で 9 画像が 100%一致したが、菌株 No. 3 の 100%一致は 3 画像のみであった。各施設バッファーにおいても同様の傾向が見られ、菌株 No. 1 および菌株 No. 2 はそれぞれ 6 画像と 7 画像が 100%一致したが、菌株 No. 3 は 100%一致した 2-3 画像が異なるクラスターを作っていた。菌株ごとの近似度についても、統一バッファーと各施設バッファーで差はなく、菌株 No. 1 は 97%と 96%、菌株 No. 2 では 94%と 95%、菌株 No. 3 はどちらも 91%であった(表 2)。

一方 B 解析者では、全株で 7 画像以上が 100%一致しており、特に統一バッファーの菌株 No. 2 は 10 画像で 100%一致を示した。菌株ごとの近似度も、統一バッファーでは 96-97%と高く、各施設バッファーでは 92-93%と統一バッファーに比べやや低い結果であった(表 2)。

## 3. *S. sonnei* のデンドログラム

EHEC 0157 と同様に、菌株 No. 4-6 のデンドログラム (図 3、図 4) を作成したが、菌

株 No. 6 は、スメアな泳動像になった施設 No. 8 を除外し、10 施設の画像で解析した。菌株ごとに、近似度 85-91%のクラスターを形成したが、EHEC 0157 に比べばらつきのある結果であった。

A 解析者では、いずれのバッファーを用いた場合でも、100%一致は各菌株 2-4 画像であった。菌株ごとの近似度は、統一バッファーで 89-90%、各施設バッファーで 87-91%と差は見られなかった(表 2)。

また、B 解析者は菌株 No. 4 の統一バッファーで 7 画像、菌株 No. 6 の各施設バッファーで 5 画像が 100%一致を示したものの、他は 2-3 画像の 100%一致が異なるクラスターを形成するのみであった。菌株ごとの近似度は、統一バッファーで菌株 No. 4 が 87%、菌株 No. 5 が 85%、菌株 No. 6 が 90%であったが、各施設バッファーではどの株も 91%と、統一バッファーよりもやや高い傾向が見られた。

## D. 考察

食中毒あるいは感染症の発生に際して、原因菌の分離同定に加え、細菌学的疫学解析を求められることが日常的になってきている。その手法として、現在 PFGE 型別が広く用いられているが、その標準化、データベース化を目指して、統一法の普及と精度管理を実施してきた。

EHEC 0157 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（図 5）。

*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（図 6）。特に 76.8Kb（マーカーの 14 本目）以下のバンド認識において、EHEC 0157 のバンド数は 4-7 本で、同一条件の画像で最大 2 本差であったが、*S. sonnei* は、多いもので 10 本あり、同一条件で 2-5 本の違いが見られた。

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、解析者による補正を実施したが、施設 No. 8 の画像はコントラストが弱く、菌種や解析者に関わらず認識バンド数が少ない傾向があった。そのため、近似度の高い菌株でも、他の画像との隔たりが見られた。反対に施設 No. 3 はコントラストが強く、特に EHEC 0157 のサイズの大

きいバンド認識で本数やサイズの正確さに問題があった。バンド認識において解析者の主観を入れないためには、どの画像もデフォルト値で解析できることが望ましいが、目視補正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る。

スメアな泳動像になった施設 No. 8 の菌株 No. 6 については、当該施設で I 相菌を再選択した後、複数株について実施したが同様の結果であった。また、泳動バッファーに 50  $\mu$ M チオ尿素を加える、市販キットを使用してプラグを作製するなど方法を変更して検討したが改善されず、原因は不明である。他の 10 施設では問題なかったが、菌株の輸送や保存方法にも配慮すべきであった。

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。

## E. 結論

PFGE の施設間変動を解消するためには、直接泳動像に影響のある泳動用アガロースを除き、泳動バッファーや試薬を特に指定する必要はないと考えられた。むしろ、安定して解像度の高い画像を得るため、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Taguchi, M., Seto, K., Kanki, M., Tsukamoto, T., Izumiya, H., and Watanabe, H.: Outbreak of food poisoning caused by lunch boxes prepared by company contaminated with multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58:55-56 (2005)

塚本定三, 田口真澄, 神吉政史, 川津健太郎, 河合高生, 依田知子, 久米田裕子, 浅尾 努,

濱野米一, 石橋正憲, 勢戸和子, 小林一寛: 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium による大規模食中毒, 病原微生物検出情報, 25:99-100 (2004)

2. 学会発表

田口真澄, 勢戸和子, 神吉政史, 塚本定三, 泉谷秀昌, 渡邊治雄: 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium definitive phage type 104 による大規模食中毒事例, 第44回感染性腸炎研究会 (2005年3月、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 各施設の電気泳動条件

施設No.	統一バッファー			各施設バッファー		
	メーカー	泳動時間 (hr)	温度 (°C)	メーカー	泳動時間 (hr)	温度 (°C)
1	インビトロジェン	18	14	タカラ	18	14
2	インビトロジェン	18	14	タカラ	18	14
3	インビトロジェン	20	14	Bio-Rad	20	14
4	インビトロジェン	19	14	自家調整	19	14
5	インビトロジェン	19	14	自家調整	19	14
6	インビトロジェン	19	14	Bio-Rad	19	14
7	インビトロジェン	19	14	ニッポンジーン	19	14
8	インビトロジェン	19	14	タカラ	19	14
9	インビトロジェン	19	14	自家調整	19	14
10	インビトロジェン	18	14	Bio-Rad	18	14
11	インビトロジェン	19	14	ニッポンジーン	19	14

表2 解析者および使用バッファーによる近似度の比較

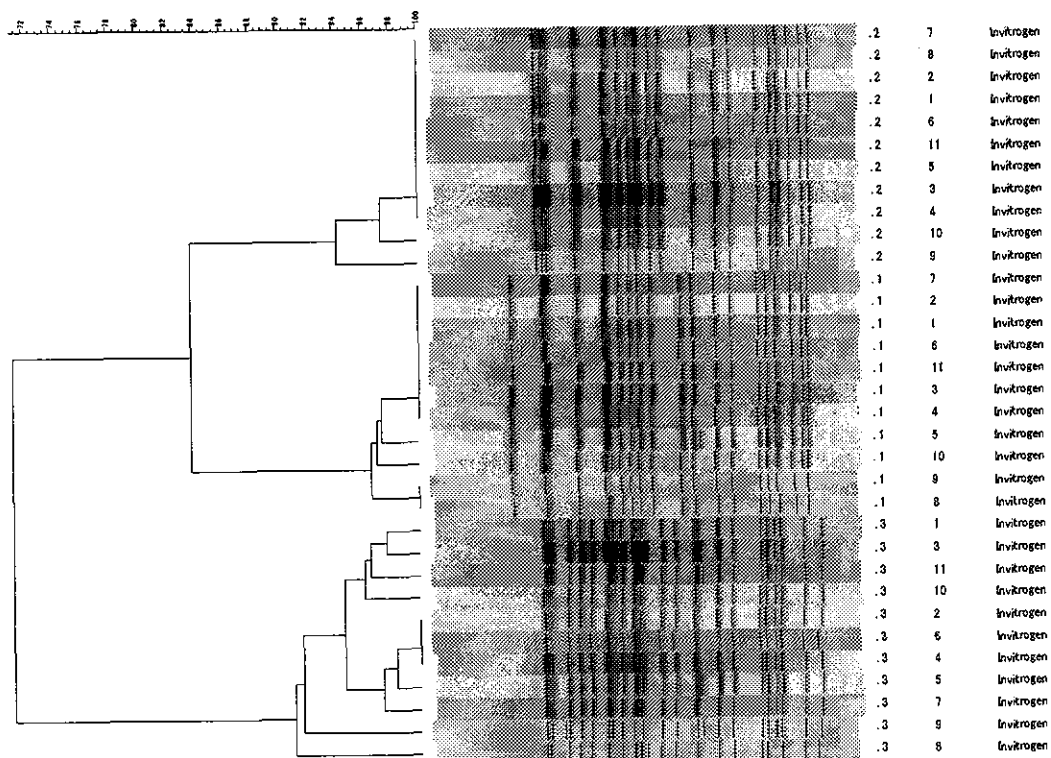
菌種	菌株No.	A解析者		B解析者	
		統一 バッファー	各施設 バッファー	統一 バッファー	各施設 バッファー
STEC O157	1	97 <sup>a</sup>	96	96	93
	2	94	95	97	93
	3	91	91	96	92
<i>S. sonnei</i>	4	90	87	87	91
	5	89	88	85	91
	6	89	91	90	91

a 近似度 (%)

Dec 11 21:12:00 (00 00 00) (0.00-100.00)  
GSTD042704

GSTD042704

菌株 No. 施設 No. buffer



Dec 11 21:12:00 (00 00 00) (0.00-100.00)  
GSTD042704

GSTD042704

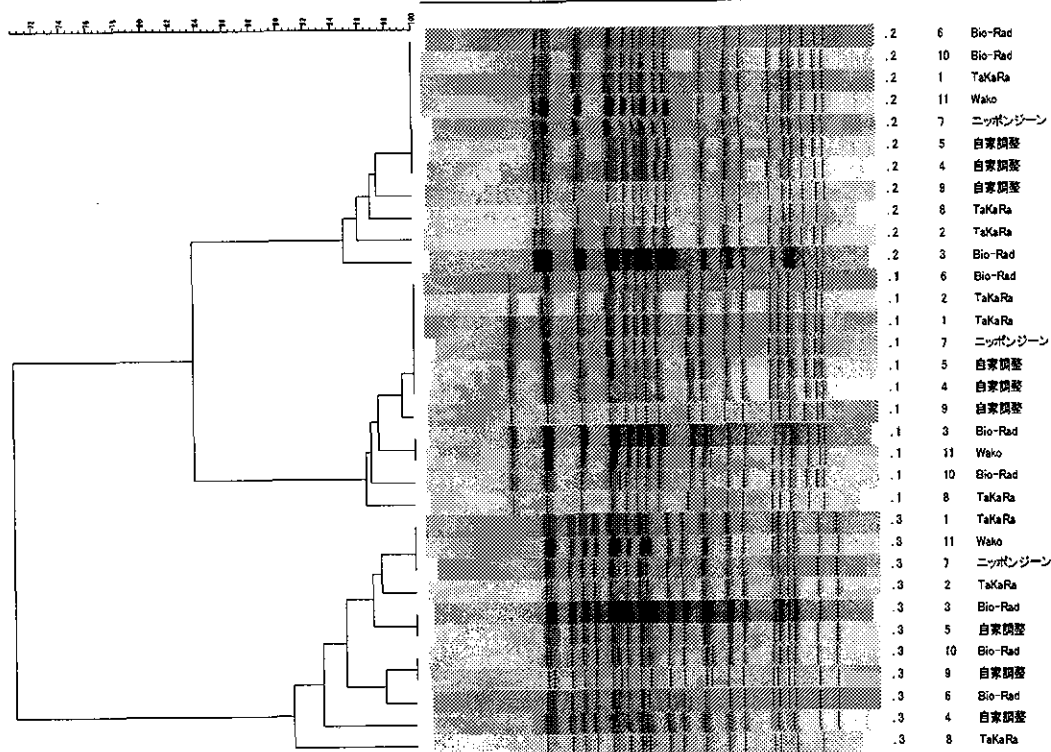
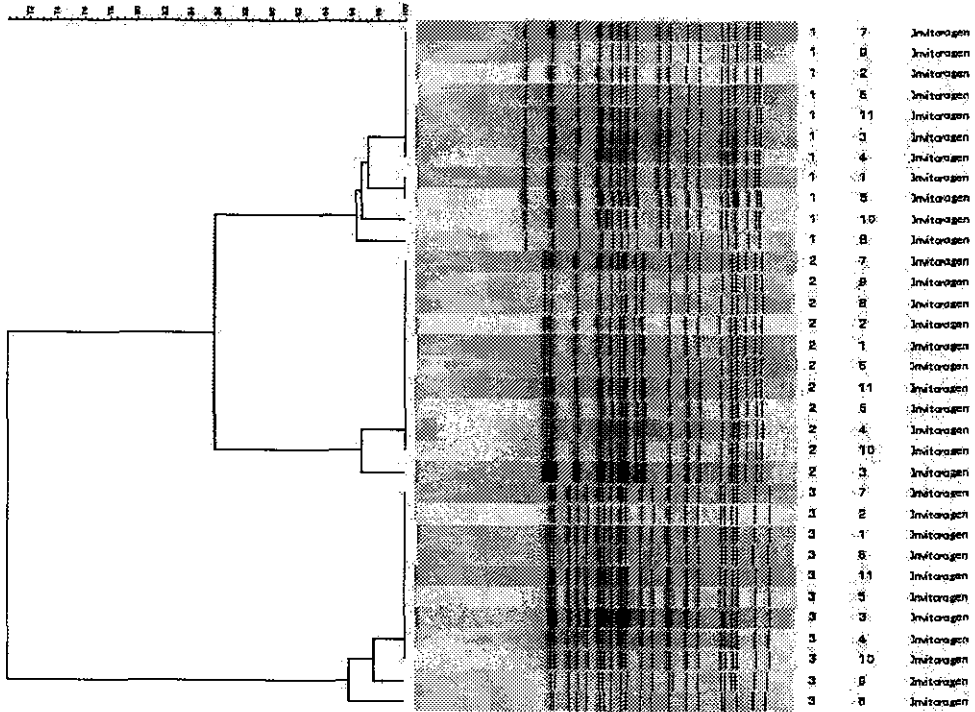


図1 A 解析者作成 STEC 0157 のデンドログラム



File: C:\1154\12040001\0400\0025-00057  
0.STD

ESTD



File: C:\1154\12040001\0400\0025-00057  
0.STD

ESTD

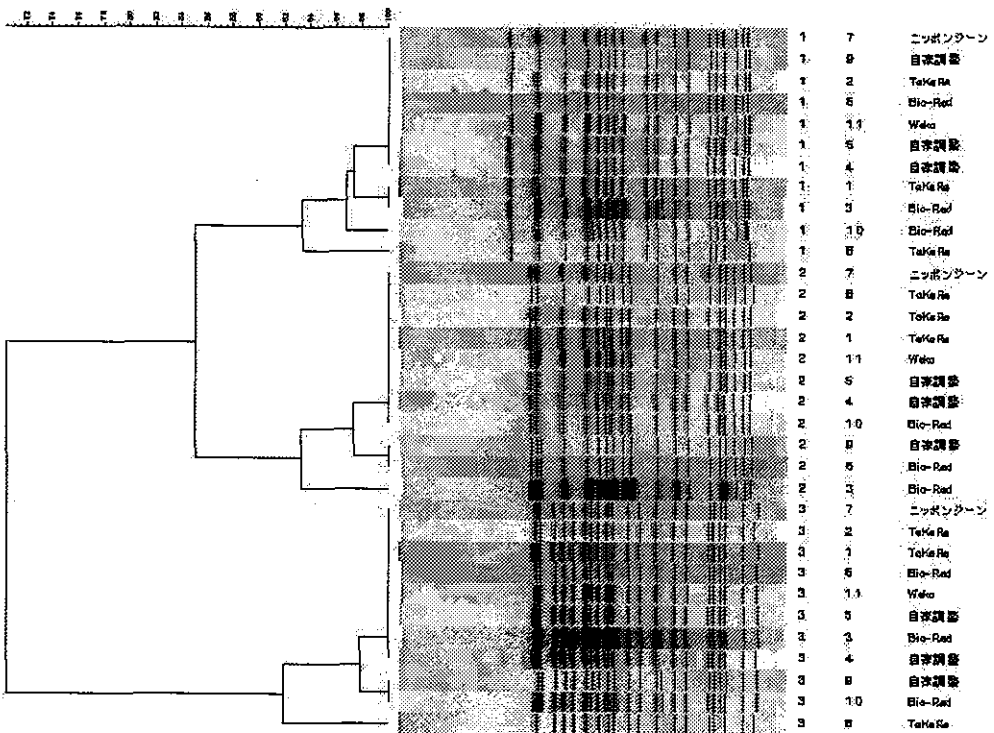


図2 B解析者作成 STEC 0157 のデンドログラム

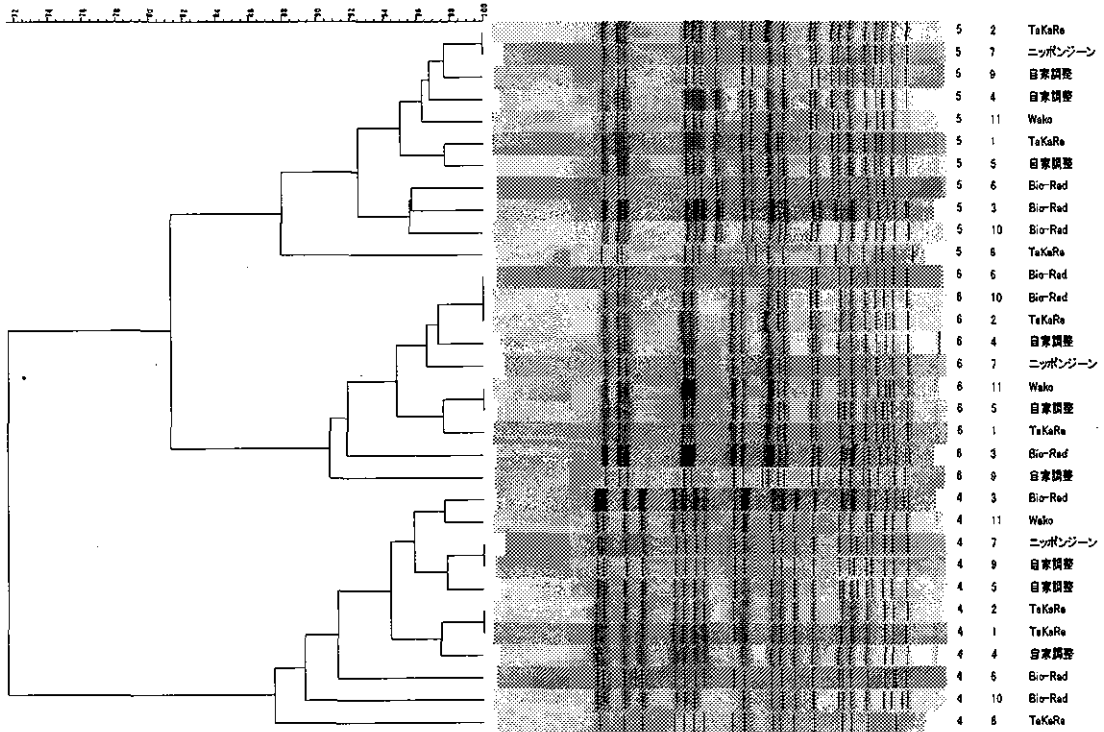
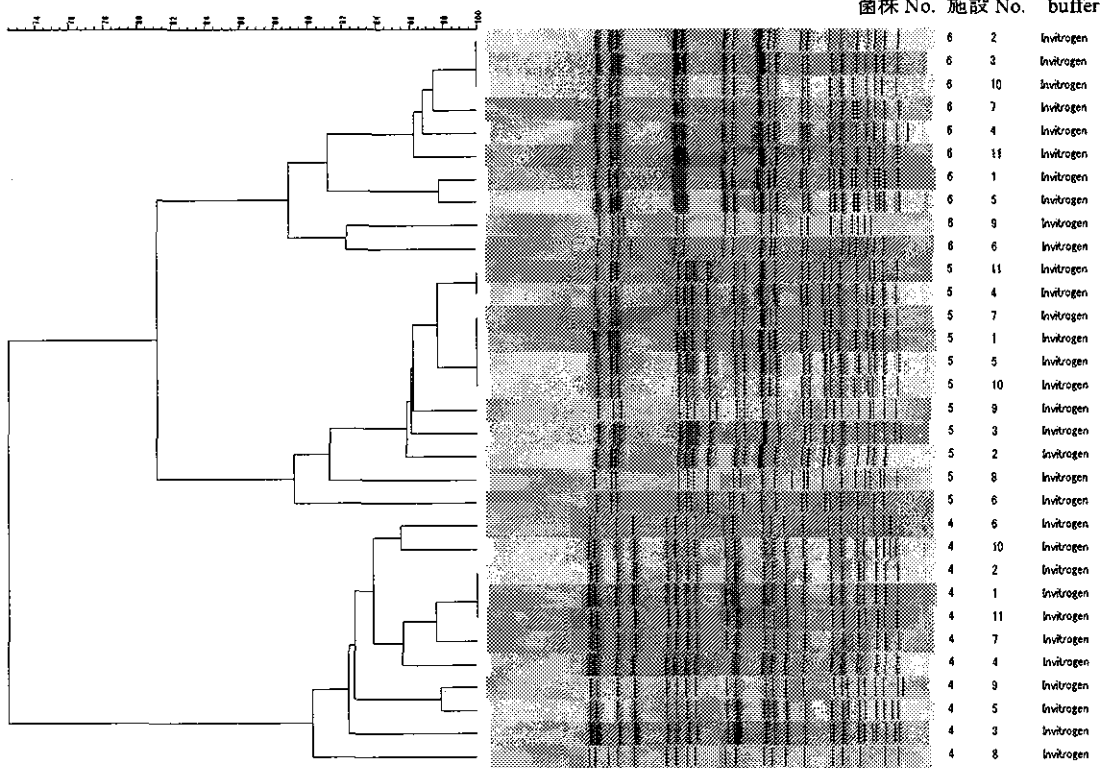
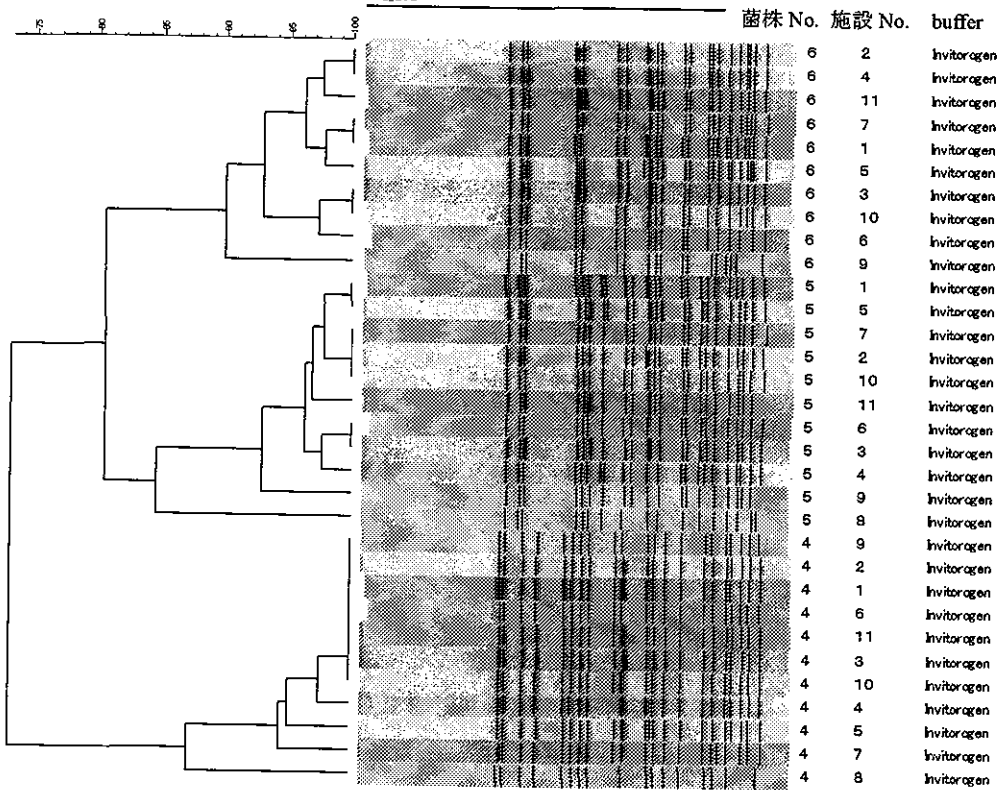


図3 A 解析者作成 *Shigella sonnei* のデンドログラム

Dea (Feb12 21:23) 9900152006 (006-10203)  
G.STD



Dea (Feb12 21:23) 9900152006 (006-10203)  
G.STD

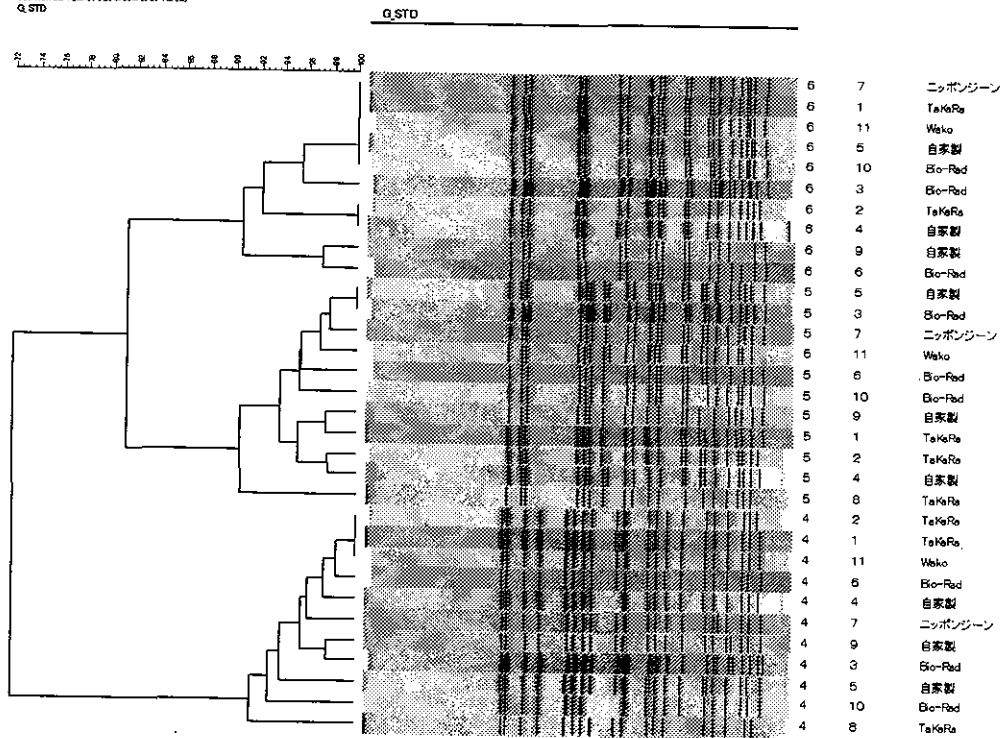


図4 B解析者作成 *Shigella sonnei* のデンドログラム

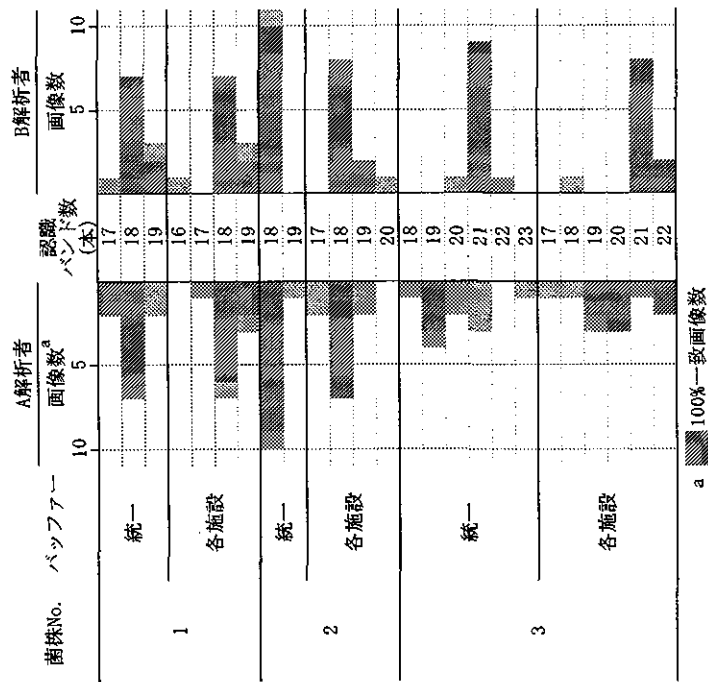


図5 STEC 0157 の画像解析における認識バンド数

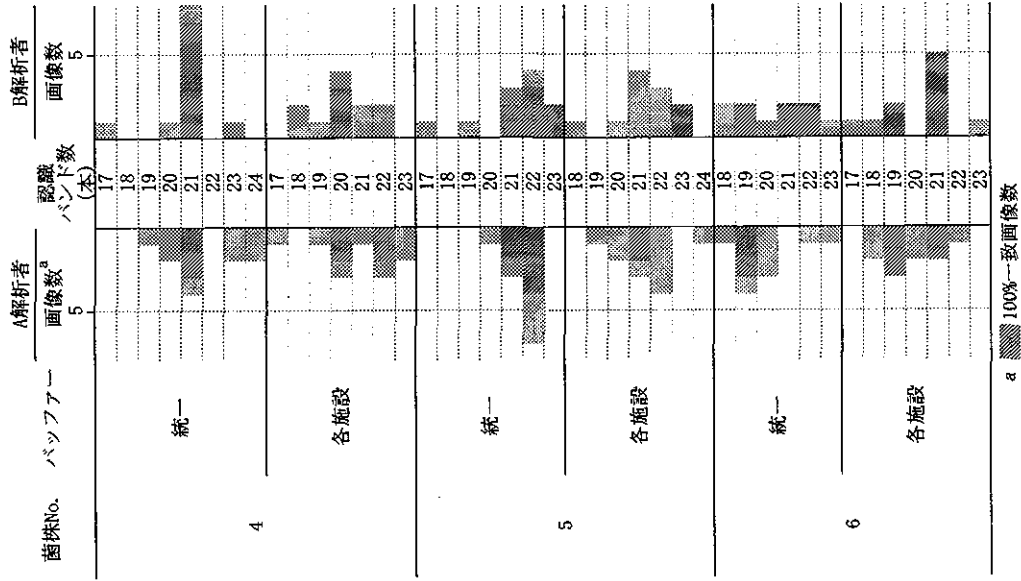


図6 S. sonnei の画像解析における認識バンド数

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）  
平成 16 年度分担研究報告書

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

協力研究者	石川和彦	滋賀県立衛生環境センター	主任主査
	川端彰範	滋賀県立衛生環境センター	主任技師
	井上朋宏	滋賀県立衛生環境センター	主任専門員
	林 賢一	滋賀県立衛生環境センター	次長

### 研究要旨

食中毒事例等において分離された黄色ブドウ球菌 39 株について、コアグラゼ（Coag）型、エンテロトキシン（Ent）産生型およびパルスフィールド電気泳動（PFGE）パターンによる遺伝子型による菌株間の関連性を調査した。

供試した 39 株は Coag 型および Ent 産生型の組み合わせで 5 種類のタイプに分類され、PFGE パターンで 8 種類のタイプに分類された。同一事例内の Coag 型および Ent 型が同じ菌株は同一の PFGE パターンを示したが、事例が異なると Coag 型および Ent 型が同じ菌株でも PFGE パターンが異なった。PFGE 法は Coag 型および Ent 型より詳細な情報が得られ菌の感染源および感染経路の解明に有効な方法と推考された。

### A. 研究目的

食中毒事件において、症状、潜伏時間、喫食調査など疫学調査情報のほか、細菌学的疫学解析が重要な情報として利用され、感染源、感染経路の究明がなされている。

黄色ブドウ球菌の場合、従来から細菌学的疫学解析としてコアグラゼ（以下、Coag）型、エンテロトキシン（以下、Ent）産生型などが利用され、菌の同一性が判定されている。

今回、食中毒事例において分離された黄色ブドウ球菌を用いて、Coag 型および Ent 産生型のほかパルスフィールド

電気泳動（以下、PFGE）パターンによる遺伝子型を加え、菌株間の関連性を調査したので報告する。

### B. 研究方法

#### B. 1 使用菌株

2003 年から 2004 年までに県内で発生があった食中毒事件および苦情事例から分離された黄色ブドウ球菌 39 株を対象とした（表 1～4）。

#### B. 2 Coag 型別および Ent の検出

Coag 型別はブドウ球菌コアグラゼ型別用免疫血清（デンカ生研製）を使用し、Ent の検出はブドウ球菌エンテロトキシ

ン検出用キット(デンカ生研製)を用いた。

### B. 3 PFGE 法

PFGE 法は被検菌をトリプトソーヤブイオン培地で 18 時間培養後、200 $\mu$ l を 15,000rpm、3 分間遠心し、沈渣に 200 $\mu$ l の水に懸濁し、その後、等量の 1.0%SeaKem Gold agarose(TaKaRa 製)を混合しサンプルプラグキャスト 0.7mm に流し込み固めた。固まったゲルプラグを 5mg/ml リゾチーム・20 $\mu$ g/ml リゾスタフィン加 0.5M EDTA (pH8.0) で 37 $^{\circ}$ C 一晩振盪後、蛋白溶解液 1mg/ml プロテイナーゼ K、1% sarkosyl、0.5M EDTA (pH8.0) 1ml に交換し 50 $^{\circ}$ C で一晩振盪した。ゲルプラグを 1/4 にカットし、4mM Pefabloc SC・TE バッファー 1.0ml で 50 $^{\circ}$ C、30 分間振盪を 3 回行い、プロテイナーゼ K を不活性化した。TE バッファー(pH8.0)に交換し 4 $^{\circ}$ C、30 分間、さらに Enzyme バッファーに交換し、4 $^{\circ}$ C、30 分間平衡化を行った。制限酵素 *Sma* I (TaKaRa 製)を用いて 20U/サンプルで 37 $^{\circ}$ C、17 時間振盪した後、CHEF DR III (Bio Rad 製)を使用しバッファー温度 14 $^{\circ}$ C、電圧 6V/cm、パルスタイム 5.3~34.9 秒の条件で 18 時間、電気泳動を行った。解析には遺伝子解析ソフト *Fingerprinting II* (Bio Rad 製)を使用した。なお、系統樹の作成には相似度計数に *Dais* を用い、計算式に *Unweighted Pair-Group Method* を用いて解析した。

## C. 研究結果

### 事例 1

2003 年 5 月県内のホテルに宿泊していた修学旅行生 120 名および同行者 9

名の計 129 名のうち 15 名が食中毒様症状を訴えたため調査したところ、嘔吐 13 名(86.7%)、下痢 9 名(60.0%)、発熱 9 名(60.0%)、腹痛 8 名(53.3%)の有症者が確認された。患者便 7 検体、従事者便 5 検体、従事者手指ふき取り 2 検体、施設ふき取り 8 検体および食品 11 体の計 33 検体について食中毒菌を調査したところ、患者便 5 検体、従事者手指ふき取り 1 検体、および食品 6 検体の計 12 検体から黄色ブドウ球菌が分離された(表 1)。

分離された黄色ブドウ球菌は Coag 型および Ent 産生型から 2 タイプに分類され、CoagIV型、Ent A 型が 11 株、および CoagVII型、Ent B 型が 1 株であった。

PFGE パターンはレーン 1~12 で、レーン 5 はスメアー状になったが、他の 11 株のバンド本数は 15 本程度認められた。CoagIV型、Ent A 型の 11 株はレーン 1~8、10~12 で、スメアー状のレーン 5 を除く 10 株は同一の PFGE パターンを示した。CoagVII型、Ent B 型の 1 株はレーン 9 であり、CoagIV型、Ent A 型の 11 株の PFGE パターンとはバンド本数および出現パターンとも異なった(図)。

### 事例 2

2004 年 7 月に県内のホテルで合宿を行っていた 1,494 名のうち 163 名食中毒様症状を訴えたため調査したところ、嘔気 155 名(95.1%)、腹痛 121 名(74.2%)、発熱 104 名(63.8%)、嘔吐 100 名(61.3%)の有症者が確認された。患者吐物 10 検

体、患者便 10 検体、従事者便 29 検体、従事者手指ふき取り 30 検体、施設ふき取り 33 検体および食品 9 検体の計 124 検体について食中毒菌の調査したところ、患者吐物 2 検体、患者便 6 検体、従事者便 3 検体、従事者手指ふき取り 1 検体、施設ふき取り 1 検体および食品 5 検体の計 18 検体から 19 菌株の黄色ブドウ球菌が分離された。(表 2)

患者吐物からは CoagVII型、Ent A+B 型および CoagIV型、Ent A 型の 2 タイプの黄色ブドウ球菌が分離された。

分離された黄色ブドウ球菌は Coag 型および Ent 産生型から 3 タイプに分類され、CoagIV型、Ent A 型が 1 株、CoagVII型、Ent A+B 型が 16 株、および CoagVII型、Ent B 型が 2 株であった。

PFGE パターンはレーン 13~31 で、バンド本数は 15 本程度認められた。Coag 型および Ent 産生型が異なると PFGE パターンも異なった。CoagVII型、Ent A+B 型の 16 株はレーン 13、14、17~22、24~31 で、全て同一のパターンを示した。CoagVII型、Ent B 型の 2 株はレーン 16、23 で同一の PFGE パターンであり、CoagVII型、Ent A+B 型の 16 株とは 370Kbp 付近のバンドの位置が異なり、170Kbp 付近がバンド 1 本少なく、130Kbp 付近にバンド 1 本多かった。CoagIV型、Ent A 型の 1 株はレーン 15 で、CoagVII型、Ent A+B 型の 16 株とは 370Kbp 付近の 2 バンドの位置が異なった (図)。

#### 事例 3

2003 年 8 月に 3 名が嘔吐および下痢

症状を主症状とする患者が発生した。患者 3 名の共通食品であったおはぎ 3 個が調査され、3 個からそれぞれ黄色ブドウ球菌 4 株が分離された。

分離された黄色ブドウ球菌は Coag グラーゼ型および Ent 産生型から 2 タイプに分類され、CoagIV型、Ent A 型が 3 株、および CoagII型、Ent C 型が 1 株であった。(表 3)

PFGE パターンはレーン 32~35 で、バンド本数は約 15 本認められた。CoagIV型、Ent A 型の 3 株はレーン 33~35 で、同じ PFGE パターンを示したが、CoagII型、Ent C 型の 1 株はレーン 32 でバンド本数および出現パターンとも異なった (図)。

#### 事例 4

2003 年 10 月に鳥料理店を利用した 2 名が下痢、腹痛、発熱の症状を示し、保健所に連絡があった。保健所が調査をしたところ、発症者 1 名からカンピロバクターが分離された他、施設ふき取り検査 3 検体および従事者手指ふき取り 1 検体から黄色ブドウ球菌 4 株が分離された (表 4)。分離された黄色ブドウ球菌 4 株は全て CoagV型、Ent 非産生株であった。PFGE パターンはレーン 36~39 に示すとおり、バンド本数は約 10 本認められ、4 株全て同一の PFGE パターンを示した (図)。

#### D. 考察およびまとめ

黄色ブドウ球菌はヒトの糞便、鼻前庭、頭髮、手指などから高率に分離され、化膿性疾患の代表的な病原菌として知ら

れており、食中毒原因菌の他、院内感染の原因菌としてメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）が知られている。

MRSA を原因とした院内感染の場合、感染源および感染経路の解明に PFGE 法等による分子生物疫学的手法が多く利用されているが、黄色ブドウ球菌を原因物質とする食中毒事件の場合、患者吐物や食品の残品からの直接 Ent を検出することが最も重要な結果として取り扱われ、感染源および感染経路の解明には検出された黄色ブドウ球菌の Coag 型および Ent 産生型によりタイプ分類が主に利用されている。

現在、市販の試薬で調査できる Coag 型は I から VIII 型までの 8 種類で、Ent 産生型は A から D 型までの 4 種類である。原因菌を追求する上では菌のタイプ分類数が少なく、PFGE 法で得られる遺伝子型を加えることにより、詳細な情報が得られ、菌株の同一性がより一層確定できると推考された。

今回、供試した 39 株は Coag 型および Ent 産生型の組み合わせで 5 種類のタイプに分類され、PFGE パターンで 8 種類のタイプに分類された。Coag 型および Ent 産生型の 5 種類のうち Coag IV 型、Ent A 型の菌株は事例 1 の 11 株、事例 2 の 1 株および事例 3 の 3 株で計 15 株であったが、PFGE パターンはスメアー状の 1 株を除いて、3 種類のパターンが

確認された。また、Coag VII 型、Ent B 型の菌株は事例 1 の 1 株および事例 2 の 2 株で計 3 株であったが、PFGE パターンは 2 種類のパターンが確認された。

同一事例内であれば Coag 型および Ent 型が同じ菌株は同一の PFGE パターンを示したが、事例が異なると Coag 型および Ent 型が同じ菌株でも PFGE パターンが異なった。これは、より詳細な情報が PFGE パターンから得られたことであり、菌の感染源および感染経路の解明に PFGE 法は有効な方法であると推考された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 岡田敦史、石川和彦、林 賢一、横山哲也、東浦光紀、井堀政芳：  
コアグラゼ IV 型黄色ブドウ球菌による食中毒事例、第 33 回滋賀県公衆衛生学会（2004 年 2 月、大津市）
- 2) 川端彰範、石川和彦、吉田とも江、古田世子、井上朋宏：黄色ブドウ球菌による食中毒事例について、第 31 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会（2004 年 11 月、神戸市）



表1 事例1の分離株状況

No	検体名	検査数	検出数(黄色ブドウ球菌)	コアグララーゼ型	エンテロトキシン型
1	患者便	7	4	IV	A
			1	VII	B
2	従事者便	5	0		
3	施設ふき取り	8	0		
4	従事者手指ふき取り	2	1	IV	A
5	食品	11	6	IV	A
計		26	12		

表2 事例2の分離株状況

No	検体名	検査数	検出数(黄色ブドウ球菌)	コアグララーゼ型	エンテロトキシン型
1	患者吐物	10	2	VII	A+B
			1	IV	A
2	患者便	13	6	VII	A+B
3	従事者便	29	2	VII	A+B
			1	VII	B
4	施設ふき取り	33	1	VII	A+B
5	従事者手指ふき取り	30	1	VII	B
6	食品	9	5	VII	A+B
計		72	19		

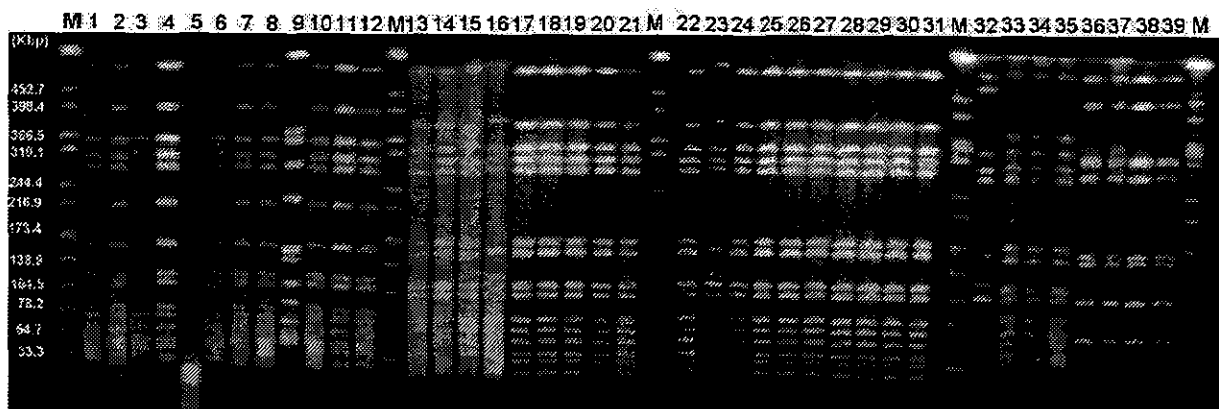
表3 事例3の分離株状況

No	検体名	検査数	検出数(黄色ブドウ球菌)	コアグララーゼ型	エンテロトキシン型
1	食品	3	3	IV	A
			1	II	C
計		3	4		

表4 事例4の分離株状況

No	検体名	検査数	検出数(黄色ブドウ球菌)	コアグララーゼ型	エンテロトキシン型
1	施設ふき取り	3	3	V	—
2	従事者手指ふき取り	1	1	V	—
計		4	4		

図 黄色ブドウ球菌の PFGE パターン



厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 16 年度分担研究報告書

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

協力研究者	西海弘城	兵庫県立健康環境科学研究所	主任研究員
	辻 英高	兵庫県立健康環境科学研究所	主任研究員
	福永真治	兵庫県立健康環境科学研究所	主任研究員

研究要旨

2004 年 6 月下旬、兵庫県下の隣接地域で *S. sonnei* による赤痢が 2 例発生した。これらの患者は海外渡航歴がないことから、国内感染と考えられた。両者の因果関係を明らかにするために、薬剤感受性試験及び *Xba*I 及び *Bln*I の 2 種類の制限酵素によるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)で解析を行った。その結果、同一の薬剤耐性パターンを示し、PFGE パターンも全て一致した。以上の結果から、同一起源の菌株による感染が疑われた。

A. 研究目的

2004 年 6 月下旬の同時期に兵庫県龍野健康福祉事務所管内及び姫路市管内で *S. sonnei* による赤痢が発生した。これらの患者は海外渡航歴がなく、国内感染と考えられた。両者の因果関係を明らかにするため、分離された *S. sonnei* の薬剤感受性試験及び PFGE による菌型解析を行った。

B. 研究方法

1. 事例概要

事例 1. 患者は揖保川町の 80 代男性で、6 月 22 日より高熱をだし、翌 23 日より意識障害をきたし、医療機関を受診し、同日入院後、27 日に細菌性赤痢であると診断された。接触者検便の結果、家族から赤痢菌は分離されなかった(図 1)。

事例 2. 患者は姫路市の 20 代女性で、6 月 22 日より高熱をだし、23 日朝から腹痛、水様性の激しい下痢をきたし、医療機関を

受診し、26 日に細菌性赤痢であると診断された。接触者検便の結果、家族から赤痢菌は分離されなかった(図 1)。

両事例の患者はいずれも海外渡航歴はなかった。

2. 菌株

上記の 2 事例からそれぞれ分離された *S. sonnei* 2 株を用いた。

3. 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準委員会の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき、市販の感受性試験用ディスクを用いて行った。使用薬剤はクロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、アンピシリン、スルファメトキサゾール/トリメトプリム合剤、ナリジクス酸、ホスホマイシン、ノルフロキサシンの 9 剤を用いた。

4. PFGE

PFGE New Protocol-Kinki に従ってプ

ラグを作成した。プラグは30Uの *Xba* I 及び *Bln* I で 37°C、2 時間反応後、電気泳動に供した。泳動条件は 0.5×TBE buffer、1%アガロースゲル、電圧 6V/cm、パルスタイム 2.2-54.2 秒、泳動時間 19 時間で行った。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株の *Xba* I 切断を使用した。

### C. 研究結果

#### 1. 分離菌株の薬剤感受性試験

薬剤感受性試験の結果、2 株は共にテトラサイクリン、ストレプトマイシン及びスルファメトキサゾール/トリメトプリム合剤の 3 剤に対して耐性であった。

#### 2. 分離菌株の PFGE

2 種類の制限酵素 *Xba* I 及び *Bln* I での切断パターンはそれぞれ図 2 及び 3 に示した通りである。*Xba* I では<30kb~600kb の間に 22 本、*Bln* I では<30kb~600kb の間に 20 本のバンドに切断された。2 株の PFGE パターンはいずれも一致した。

### D. 考察

事例 1、2 の患者はどちらも海外渡航歴はなく国内で感染したものと考えられた。どちらの患者も 6 月 22 日より高熱をだしていることから、感染時期が同時期であったことが推定された。また、薬剤感受性試験及び 2 種類の制限酵素切断による PFGE パターンがすべて一致したことから、2 株は同一の起源であると考えられた。今回の 2 事例の共通の感染源として食品が疑われたが、喫食状況が明確でなかったため、十分な疫学解析が実施できず、感染源及び感染経路の特定には至らなかった。

今回の 2 例を含め、国内感染事例での感染源や感染経路が明らかにされた例は非常に少なく、ほとんどが原因不明である。喫食調査など疫学調査をより積極的に行い、感染源や感染経路を特定することにより感染拡大防止を図らなければならない。

### E. 結論

2004 年 6 月下旬、兵庫県下の隣接地域で発生した赤痢患者から分離された株を用いて、菌型解析を実施した。その結果、2 株は共にテトラサイクリン、ストレプトマイシン及びスルファメトキサゾール/トリメトプリム合剤の 3 剤に対して耐性を示した。また、2 種類の制限酵素 *Xba* I 及び *Bln* I での PFGE パターンも全て一致した。以上のことから、同一起源の菌株による感染が疑われた。共通の感染源として食品が疑われたが、喫食状況が明確でなかったため、十分な疫学解析が実施できず、感染源及び感染経路の特定には至らなかった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

西海弘城、辻英高、福永真治、山岡政興：同時期に発生した国内感染例から分離された赤痢菌 *Shigella sonnei* の菌型解析、兵庫県立健康環境科学研究所紀要(in press)、(2005 年)

#### 2. 学会発表

西海弘城、辻英高、福永真治、山岡政興：国内感染例から分離された赤痢菌 *Shigella sonnei* の菌型解析、第 31 回地方衛生研究所全国協議会近畿支部細菌部会研究会(2004 年 11 月、神戸)

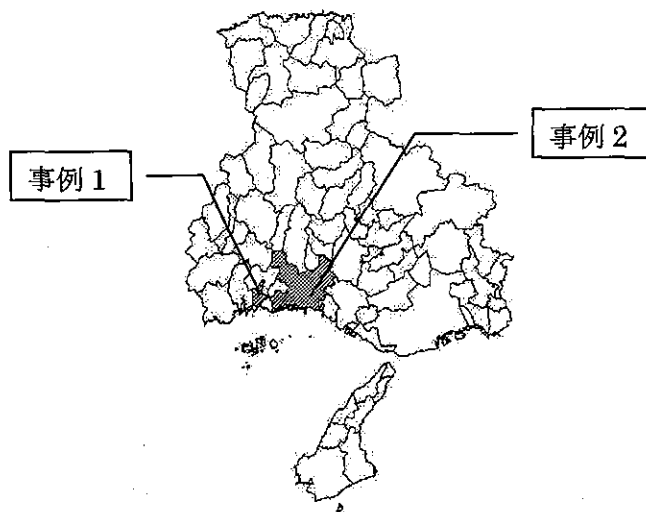


図 1. 事例発生場所

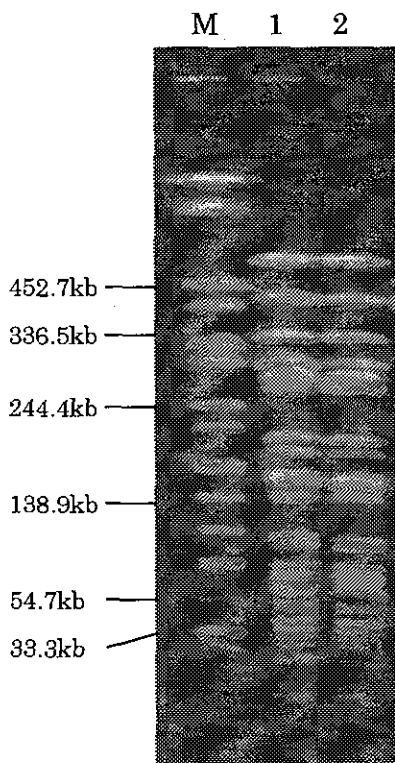


図 2. *S. sonnei* 分離株の PFGE パターン  
(*Xba* I)

M : マーカー

1 : 事例 1 患者由来株

2 : 事例 2 患者由来株

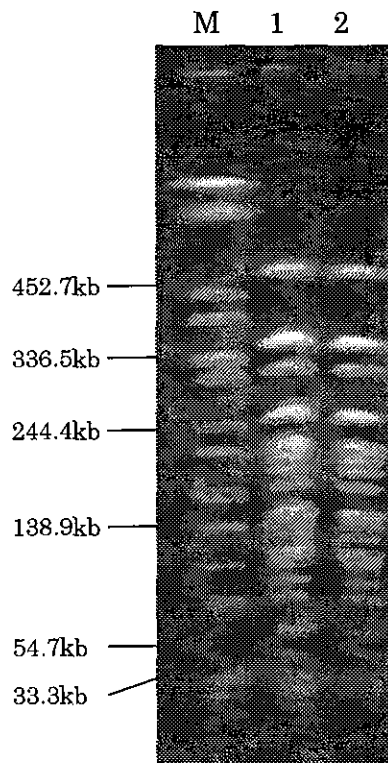


図 3. *S. sonnei* 分離株の PFGE パターン  
(*Bln* I)

M : マーカー

1 : 事例 1 患者由来株

2 : 事例 2 患者由来株