

E. 結論

パルスネットから複数の散発事例分離株が同一 PFGE パターンを示すとの情報を受け、関連した分離菌株について、複数の制限酵素を使用した PFGE 解析に加え、薬剤感受性試験、MLVA による解析を行った結果、各事例由来株間の相同性をより詳細に解析することができた。

近隣地研間での速やかな情報交換を行うとともに、発生状況に応じた追加試験等を実施することは、より精度の高い diffuse outbreak の探知と感染源追求に有効と考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Bjorn-Arne Lindstedt et al, DNA fingerprinting of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA), *Ann, Clin, Microb. Antimicrob.* 2,1-7, 2003

表1 2004年(平成16年)7月中旬から8月下旬に発生したND, II a,ND型、O157:H7(*stx1, stx2*)感染症

菌株 No		事例	発生場所	性別	年齢	発症年月日	パルスネット		
保存番号	感染研						遺伝型	コメント	
1	広島 04042	042341	事例1	広島市	M	10	8月2日	ND, II a,ND	
2	広島 04043	042342	事例1		F	41	8月3日	"	2341と同じ
3	広島 04044	042343	事例2		F	60	8月8日	"	"
4	広島 04051	042350	事例3		M	19	8月16日	"	"
5	広島 04054	042349	事例4		M	29	8月15日	"	"
6	広島 04055	042351	事例5		M	24	8月20日	"	"
7	広島 04056	042352	事例6		F	14	8月21日	"	"
8	広島 04059	042353	事例7		M	20	8月22日	"	"
9	岡山 880	041189	事例8	岡山県	M	8	7月27日	"	
10	岡山 881	041190	事例9		F	5	7月26日	"	1189と同じ
11	岡山 882	041191	事例10		M	12	7月29日	"	"
12	岡山 884	041193	事例11		F	27	7月22日	"	1189と1バンド異なる
13	岡山 888	041194	事例12		M	13	7月31日	"	1189と同じ
14	岡山 889	041195	事例13		M	70	8月1日	"	"
15	岡山 896	041854	事例14		F	74	7月30日	"	"
16	岡山 897	041855	事例15		F	23	7月29日	"	"
17	岡山 900	041858	事例16		F	9	8月3日	"	"
18	岡山 902	041860	事例17		F	63	8月3日	"	"
19	岡山 907	041865	事例18		F	21	8月11日	"	1189と3バンド異なる
20	岡山 908	041866	事例19		F	12	8月1日	"	1189と同じ
21	岡山 909	041867	事例20		M	58	8月1日	"	"
22	岡山 911	041868	事例21		F	50	8月9日	"	"
23	岡山 913	041870	事例22		M	22	8月9日	"	"
24	山口 04Y26	041954	事例23	山口県	M	36	8月13日	"	
25	徳島 1	041033	事例24	徳島県	F	18	7月19日	"	
26	徳島 2	041183	事例25	徳島県	F	17	7月27日	"	1033と同じ
27	徳島 3	011480	事例26	徳島県	F	33	8月14日	"	"

表 2 各プライマー

名称	配列	アニーリング温度	産物長(bp)
Vhec1-F	5'-fam-AGCCCGCAGTTGATACCTAGG-3'	50.9	513
Vhec1-R	5'-GATGCCGGATGAAAATGATAAGTT-3'		
Vhec2-F	5'-fam-AACCGTTATGAAAGAAAGTCCT-3'	49.8	452
Vhec2-R	5'-TCGCCAGTAAGTATGAAATC-3'		
Vhec3-F	5'-fam-GGCCGGATGGAAACTATGCTATT-3'	53.8	487
Vhec3-R	5'-GCCGCTATTTTTAACCACTGACTA-3'		
Vhec4-F	5'-fam-ATCGCCTTCTTCCTCCGTAATG-3'	55.3	530
Vhec4-R	5'-CTCCTCGCGCTCAGACAGTG-3'		
Vhec5-F	5'-fam-CTCAGGCGCGTTAAGGTGTAGC-3'	57.1	469
Vhec5-R	5'-TCCGCGGAGTGCAGAGAAAATAAA-3'		
Vhec6-F	5'-fam-ACGTAAACCCGGAATGGAAAATC-3'	50.3	304
Vhec6-R	5'-GAGCGAAAATGTCTATCTTGAGG-3'		
Vhec7-F	5'-fam-ATGCGCGGTTAGCTACACGACA-3'	56.8	288
Vhec7-R	5'-TGAAAGCCCACACCATGCGATAAT-3'		

表3 PCR 条件

反応	温度	時間	
初期変性	94°C	5分	
変性	94°C	30秒	} 30 cycle
アニーリング	*	60秒	
伸張	72°C	50秒	
伸張反応	72°C	10分	

*アニーリング温度は Vhec1,2,3,6,7 は 50°C
Vhec4,5 は 53°C

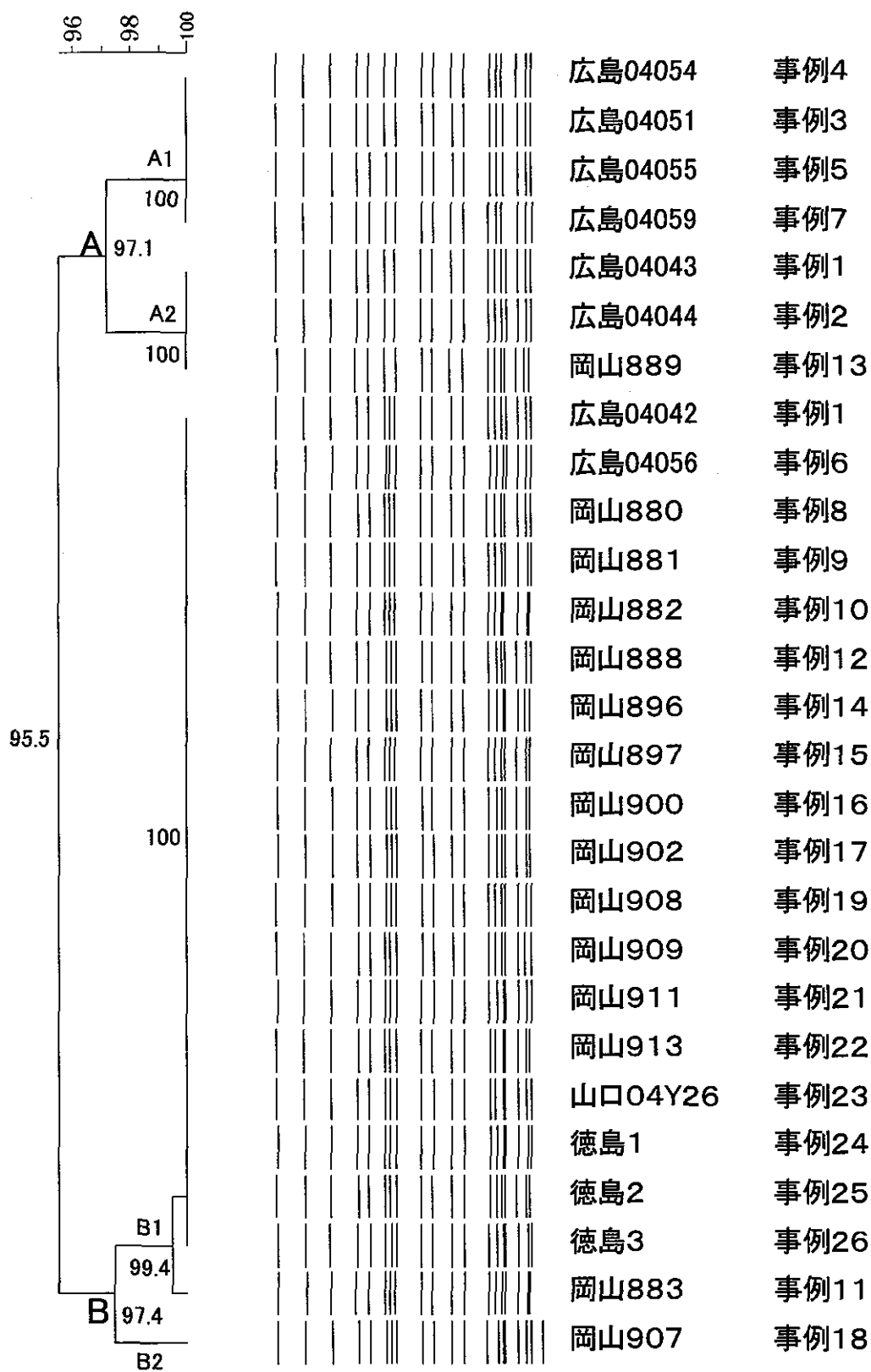


図1 *Xba* IによるPFGE デンドログラム

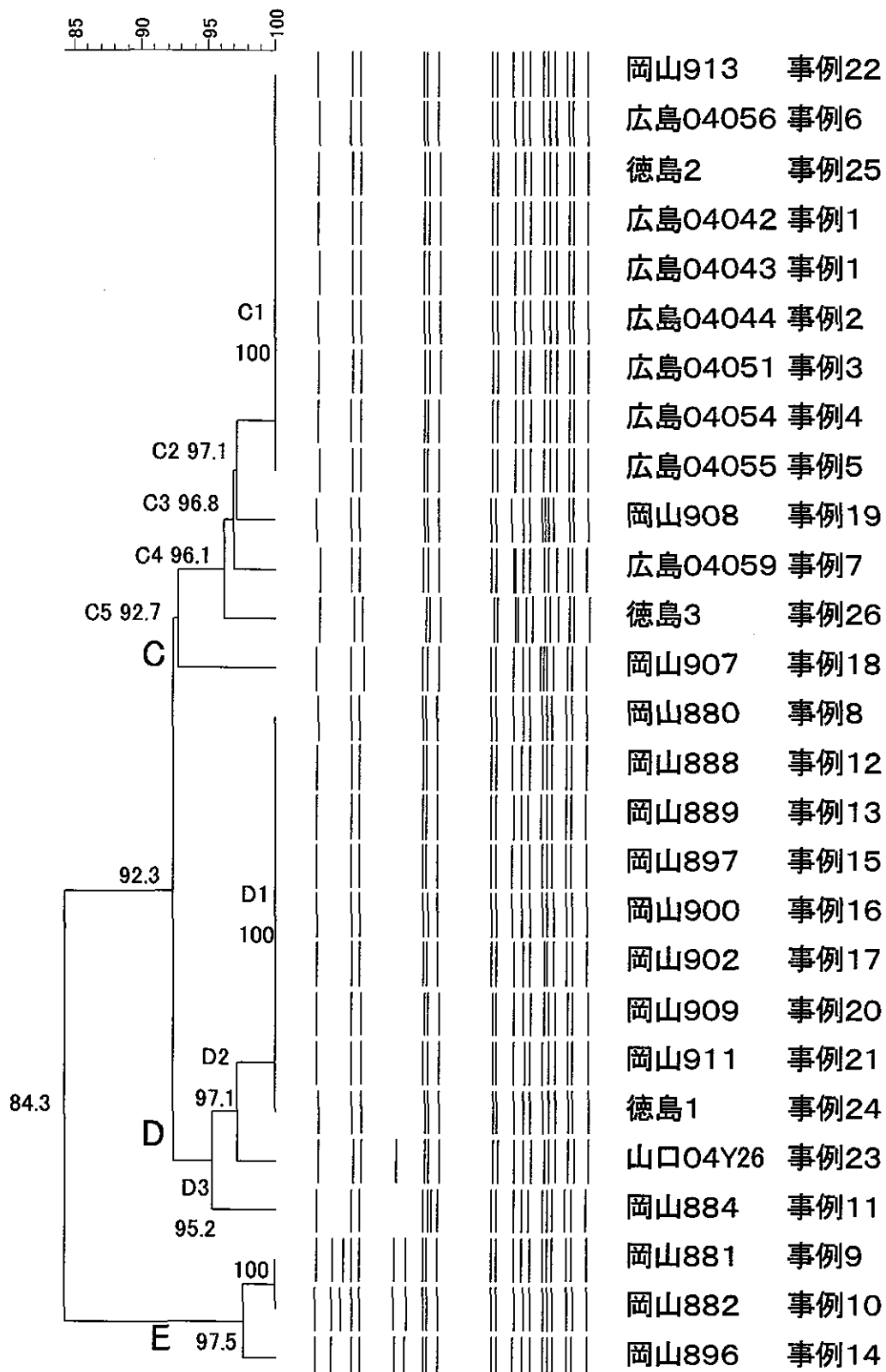


図2 Bln IによるPFGE デンドログラム

表4 各事例分離株の薬剤感受性試験

菌株 No	事例	発生場所	薬剤感受性												
			SM	KM	TC	AM	NA	CP	CIP	CTX	SXT	TMP	GM	FOM	
1	広島 04042	事例1 広島市	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
2	広島 04043	事例1 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
3	広島 04044	事例2 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
4	広島 04051	事例3 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
5	広島 04054	事例4 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
6	広島 04055	事例5 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
7	広島 04056	事例6 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
8	広島 04059	事例7 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
9	岡山 880	事例8 岡山県	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
10	岡山 881	事例9 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
11	岡山 882	事例10 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
12	岡山 884	事例11 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
13	岡山 888	事例12 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
14	岡山 889	事例13 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
15	岡山 896	事例14 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
16	岡山 897	事例15 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
17	岡山 900	事例16 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
18	岡山 902	事例17 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
19	岡山 907	事例18 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
20	岡山 908	事例19 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
21	岡山 909	事例20 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
22	岡山 911	事例21 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
23	岡山 913	事例22 //	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
24	山口 04Y26	事例23 山口県	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
25	徳島 1	事例24 徳島県	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
26	徳島 2	事例25 徳島県	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
27	徳島 3	事例26 徳島県	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

(S:感受性)

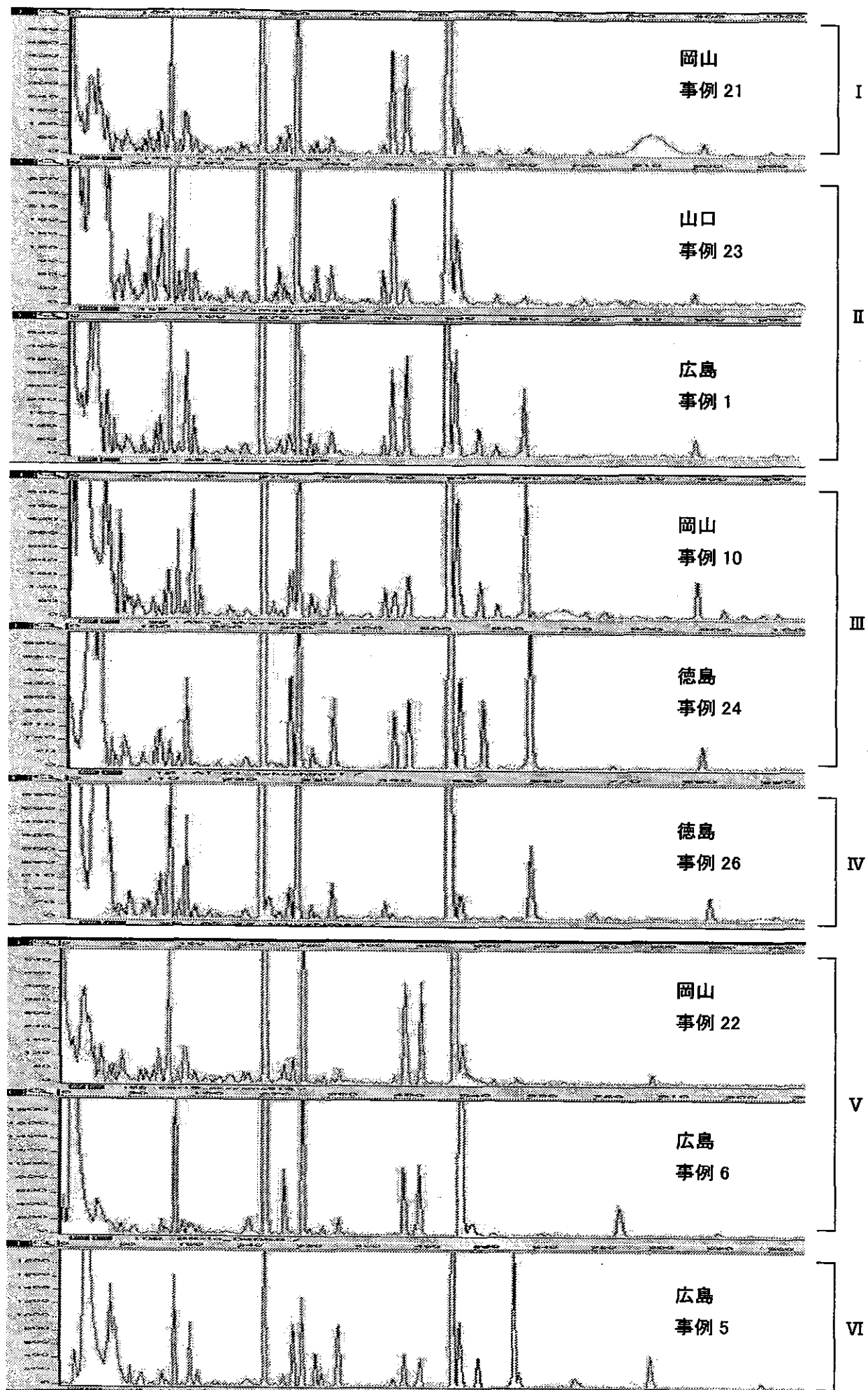


図 3 MLVA 波形パターン例

菌株No	事例No	主要ピークのDNAサイズ(bp)														
		170	275	300	315	325	345	375	450	460	485	530	545	590	615	650
広島04042	事例1															
広島04043	事例1															
広島04044	事例2															
広島04051	事例3															
広島04054	事例4															
広島04055	事例5															
広島04056	事例6															
広島04059	事例7															
岡山880	事例8															
岡山881	事例9															
岡山882	事例10															
岡山884	事例11															
岡山888	事例12															
岡山889	事例13															
岡山896	事例14															
岡山897	事例15															
岡山900	事例16															
岡山902	事例17															
岡山907	事例18															
岡山908	事例19															
岡山909	事例20															
岡山911	事例21															
岡山913	事例22															
山口04Y26	事例23															
徳島1	事例24															
徳島2	事例25															
徳島3	事例26															

図4 MLVAの波形解析結果

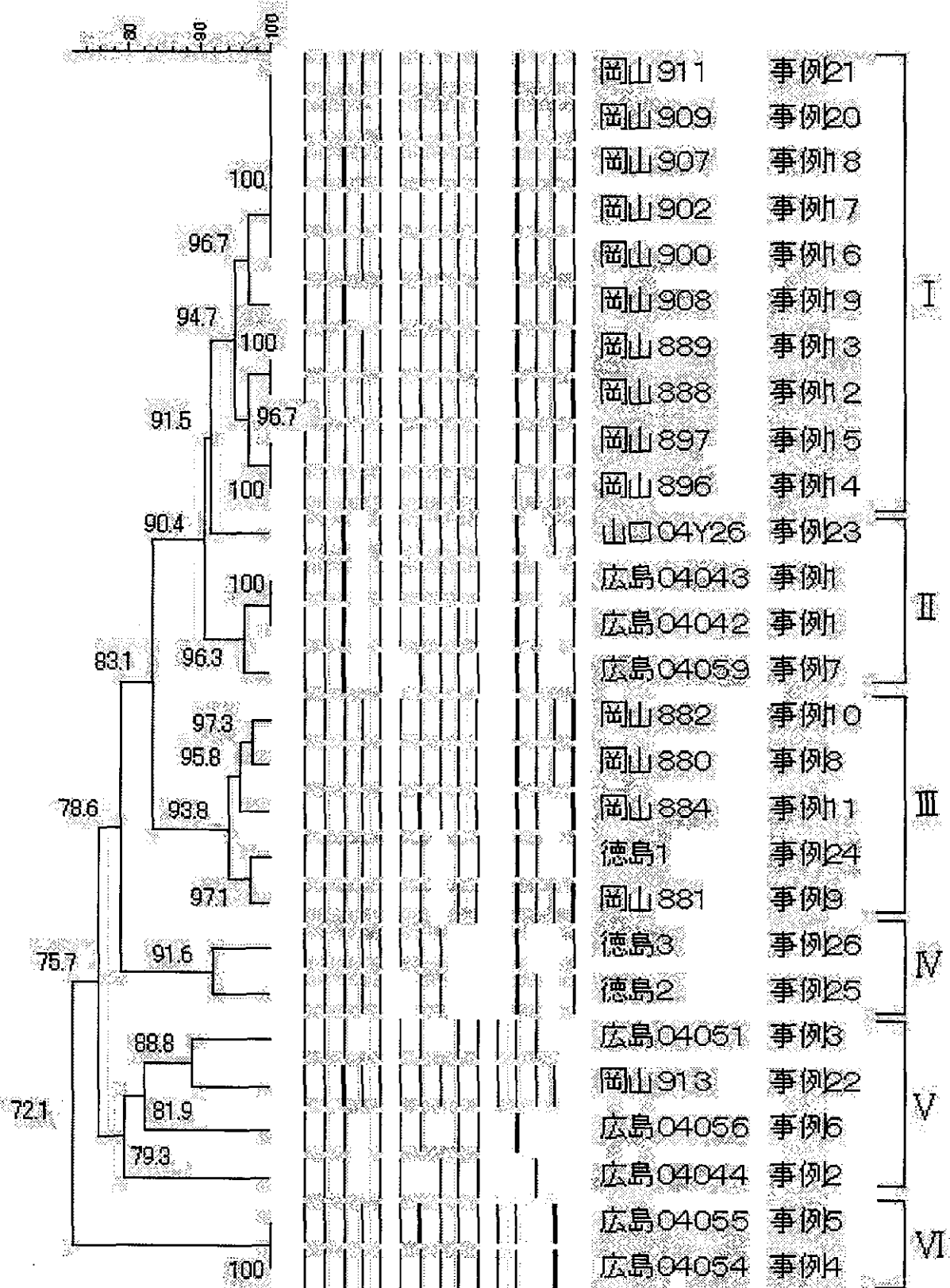


図5 MLVA dendrogram

表5 供試菌株のPFGEおよびMLVAデンドログラムにおけるクラスタ

菌株No	事例No	発生場所	クラスタ*		
			<i>Xba</i> I	<i>Bln</i> I	MLVA
広島04043	事例1	広島市	A	C	II
広島04059	事例7	広島市	A	C	II
広島04054	事例4	広島市	A	C	VI
広島04055	事例5	広島市	A	C	VI
広島04044	事例2	広島市	A	C	V
広島04051	事例3	広島市	A	C	V
岡山889	事例13	岡山県	A	D	I
岡山907	事例18	岡山県	B	C	I
岡山908	事例19	岡山県	B	C	I
広島04042	事例1	広島市	B	C	II
広島04056	事例6	広島市	B	C	V
岡山913	事例22	岡山県	B	C	V
徳島2	事例25	徳島県	B	C	IV
徳島3	事例26	徳島県	B	C	IV
岡山880	事例8	岡山県	B	D	III
岡山884	事例11	岡山県	B	D	III
徳島1	事例24	徳島県	B	D	III
岡山888	事例12	岡山県	B	D	I
岡山897	事例15	岡山県	B	D	I
岡山900	事例16	岡山県	B	D	I
岡山902	事例17	岡山県	B	D	I
岡山909	事例20	岡山県	B	D	I
岡山911	事例21	岡山県	B	D	I
山口04Y26	事例23	山口県	B	D	II
岡山881	事例9	岡山県	B	E	III
岡山882	事例10	岡山県	B	E	III
岡山896	事例14	岡山県	B	E	I

* *Xba* I, *Bln* IおよびMLVAの各デンドログラムのクラスタ記号を示す。

2004年中国四国ブロックで分離された *Salmonella* Virchow の
パルスフィールドゲル電気泳動法による解析

研究協力者 愛媛県立衛生環境研究所 吉田紀美 田中 博
高知県衛生研究所 谷脇 妙
広島市衛生研究所 河本秀一

研究要旨

2004年7月から8月にかけて愛媛県内の散発下痢症患者から *Salmonella* Virchow (*S.* Virchow) が相次いで分離された。これらの菌株と同時期に食中毒患者から分離された *S.* Virchow をパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) で遺伝子解析した結果、全て同一の PFGE パターンを示した。

一方、同時期に高知県および広島市で分離された *S.* Virchow の菌株の PFGE を各々の研究所において実施し、遺伝子解析を行なった。その結果、高知県と愛媛県での分離株は同一クラスターに属していたことから、この遺伝子型の *S.* Virchow が侵淫し、食中毒および散発下痢症の原因となったことが示唆された。一方、広島市の分離株は愛媛・高知の分離株とは異なる PFGE 型であった。

A. 研究目的

2004年に愛媛県内で分離された *S.* Virchow の食中毒由来株と散発下痢症患者由来株について PFGE を行い、由来を異にする菌株の関連性について検討し、愛媛県における *S.* Virchow が侵淫状況を推察することを目的とした。また、パルスネットを構築するため、高知県と広島市の分離株の PFGE データも解析に加え、考察した。

B. 研究方法

1 供試菌株

2004年7月から8月の期間、愛媛県感染症発生動向調査の病原体検査等において分離された散発下痢症患者由来株8株および同一食中毒の患者由来株2株、高知県で分離された散発下痢症患者由来株2株および食中毒患者由来株3株、広島市で分離された散発下痢症患者由来株1株を供試菌株とした。

2 方法

PFGE は平成 15 年から実施している感染研ニュープロトコールに基づいて実施した。制限

酵素は *Xba* I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2–63.8 秒、泳動時間 19 時間で行なった。高知県衛生研究所、広島市衛生研究所においても、同一条件で各々の分離株について PFGE を実施した。電気泳動像の TIFF ファイル、ポラロイド写真を愛媛県立衛生環境研究所へ送付し、DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD、日本語版) で解析した。

C. 研究結果と考察

愛媛県において *S.* Virchow は比較的稀な血清型であるうえ、分離時期が集中していたことから、PFGE による遺伝子解析を実施したところ、愛媛県の 10 株は全て同一の PFGE パターンを示した (図 1)。また、高知県および広島市においても同時期に *S.* Virchow が分離されたため、各々の研究所ではパルスネット構築を視野に入れ、同一条件により PFGE を行い、画像による遺伝子解析を愛媛県で実施した。Fingerprinting II を用いて全ての画像を解析した結果、愛媛県の 10 株は相同性 95% 以上で同一クラスターに属し、また高知の 5 株も愛媛の

分離株と同一クラスターに属していた。しかし、広島市の分離株は相同性が84%と低く、愛媛・高知の分離株とは異なる PFGE 型であった (図2)。このことから、2004年7月から8月にかけて愛媛、高知両県において、同一遺伝子型の *S.Virchow* が侵淫し、食中毒および散発下痢症の原因となったことが示唆された。

S.Virchow に関しては比較的分離数が少なく、全国的な侵淫状況が明らかではない。今回、同一遺伝子型と見られる株が広域的に散発したことから、今後は全国的な *S.Virchow* の分離状況についても調査を進めるとともに、菌株を収集し、PFGE 型のデータベース化を図りたいと考えている。

No.	菌株番号	分離月日	年齢	性別	由来	地域	患者情報等
1	SV202	7月20日	10	男	散発	中予	T病院
2	SV209	7月20日	14	男	食中毒	中予	県外患者
3	SV210	7月20日	20代	女	食中毒	中予	原因施設従業員
4	SV211	7月20日	12	男	散発	中予	E臨床検査所
5	SV212	7月30日	10	女	散発	中予	小児科定点 (I医院)
6	SV213	8月4日	92	女	散発	中予	T病院
7	SV214	8月19日	75	男	散発	南予	U病院
8	SV215	8月19日	1	女	散発	南予	小児科定点 (U病院)
9	SV216	8月19日	1	男	散発	南予	小児科定点 (U病院)
10	SV217	8月29日	6	男	散発	南予	小児科定点 (U病院)

図1 2004年愛媛県で分離された *S.Virchow* と PFGE パターン

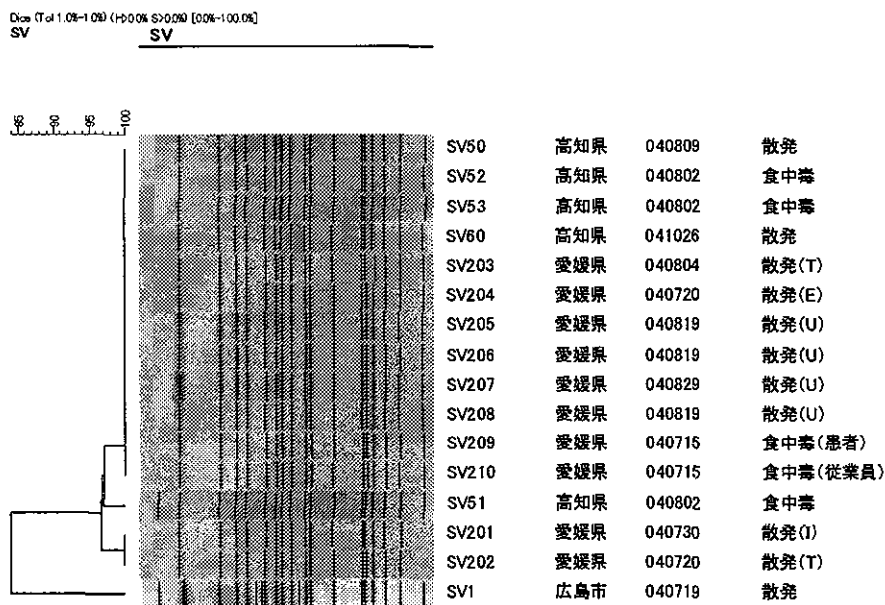


図2 2004年愛媛県・高知県・広島市で分離された *S.Virchow* のデンドログラム

Salmonella Enteritidis におけるパルスフィールドゲル電気泳動像 とファージタイプとの関連性について

研究協力者 高知県衛生研究所 谷脇妙 松本紀子 絹田美苗

研究要旨: *Salmonella* Enteritidis(以下、SE)のパルスフィールドゲル電気泳動(以下、PFGE)を疫学調査などで行っているが、その中で類似した泳動像の多いことに気づいた。そこで、ファージ型別(以下、PT)と関連づけてみることで細分化できないか調査をした。泳動像は全体の60%が類似度86.5%となり、SEの感染症では類似している株が長期にわたり流行していることが考えられた。泳動像とPTの関連性については、デンドログラムの結果で2つに大別されたグループの内、1つがPT1のみであったが、そのPFGEパターンの類似度が低く、明確な関連性が見られなかった。

I 目的

厚生労働省食中毒統計によると、近年細菌性食中毒の原因物質別患者数では、2000年に黄色ぶどう球菌が1位となったのを除き、サルモネラが1位となっている。そのサルモネラの血清型においては1989年以降SEが1位の状態が続いていると報告されている。高知県でもSEを原因物質とする食中毒事件が平成13、14、15年度にそれぞれ2件ずつ発生している。また、感染症病原体動向調査検査定点から提出された小児散発下痢症患者からは平成13年度は379件中46件(12.1%)、平成14年度は194件中17件(8.8%)、平成15年度は234件中41件(17.5%)、SEが検出されている。これらサルモネラ症の疫学調査ではPFGE法やファージ型別などが行われている。

平成13年度に起きたSEを原因物質とする食中毒事件の疫学解析でPFGE像は類似しているが、PTの型が異なる事件があった。また、その類似している泳動像のパターン

が他の事例からも多く見られた。そこで、PFGEの解析結果とPTとの関連性を調査することにした。

II 方法

PTは国立感染症研究所(以下、感染研)に依頼した。

PFGEは平成15年に作成された感染研New Protocolにしたがって行った。供試菌株は平成13年度から平成16年度に検出されたSE株の中で、感染研にPTを依頼していた48株(平成13年度10株、平成14年度3株、平成15年度28株、平成16年度7株)で、制限酵素はBln I (Roche)を使用した。48株の由来は卵由来株が6株、食中毒関連株13株、散発下痢症患者由来株29株であった。1回の泳動につき10株前後の株を泳動し、その画像をFingerprinting II (Bio-Rad)で解析を行った。

III 結果

PTの結果は表1に示した。

表1 PTの結果

PT	検体数	%
1	19	40
14b	16	33
36	1	2
47	11	23
RDNC	1	2
	48	100

デンドログラムの結果(図1)は、2つに大別された。1つは類似度86.9%のグループA(図2、全体の60%、29検体)で、もう1つはその他のパターンの集合であるグループB(図3、全体の40%、19検体)とした。

グループAはPT14b、36、47、RDNCと4種類のPTが含まれていたが、グループBはPT1のみであった。

また、4件の食中毒及び有症事例(表2)の内、3件(事例1~3)がグループAに含まれた。

卵由来株はすべてグループAに含まれた。

表2 食中毒及び有症事例株

事例	検出日	原因食品	菌株数
1	H13.10	アイスクリン	3
2	H15.9.4	卵 or イカ料理	2
3	H15.10.22	皿鉢料理	5
4	H16.2.24	卵?	3

IV 考察

グループAはPFGE泳動パターンが類似しており、その中には平成13年から平成

15年までの株が含まれているため、流行株があまり変異をせずに流行し続けていることが伺われる。しかし、PTは14bと36、47、RDNCであったため、グループAの中ではPFGEの結果とPTの関係が見られなかった。

現在SEによる感染症については、原因食品として卵が最も疑われている。その卵由来株がすべてグループAに含まれているので、長期に渡り流行し続けている株について卵が関与しているのではないかと考えた。しかし、6株という少ない株の結果であるので、ひき続き卵の調査を行い、データを集めていく予定である。

グループBはPFGE泳動パターンの類似度が低いグループであるが、すべてPT1であったことが興味深い。しかし、このグループからもPFGEの結果とPTの関連性が見られなかった。

V 結論

SEの疫学調査で行われているPFGE法とPTの関連性について調査を行ったが、今回は2つの結果を結びつけることが出来なかった。しかし、両方法とも疫学調査でよく行われている検査であることから、より多くの情報を集め、今以上に疫学調査に活用できるものにしていきたい。

また、広域に流通している食品が食中毒の原因となることも考えられるため、他県との連携をより強くし、情報の交換と共有をしていきたい。

VI 研究発表

なし

SE PTとの関係

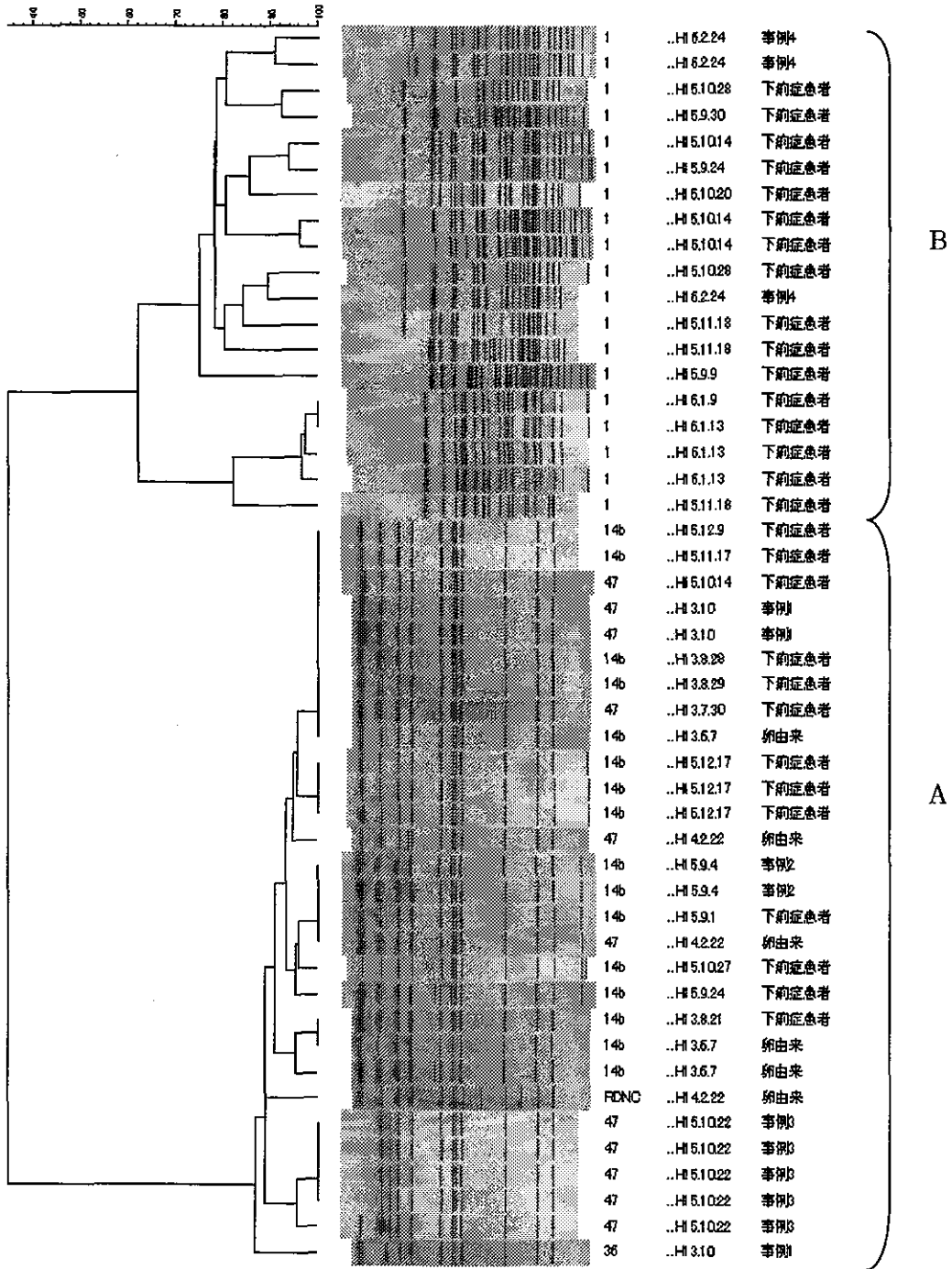
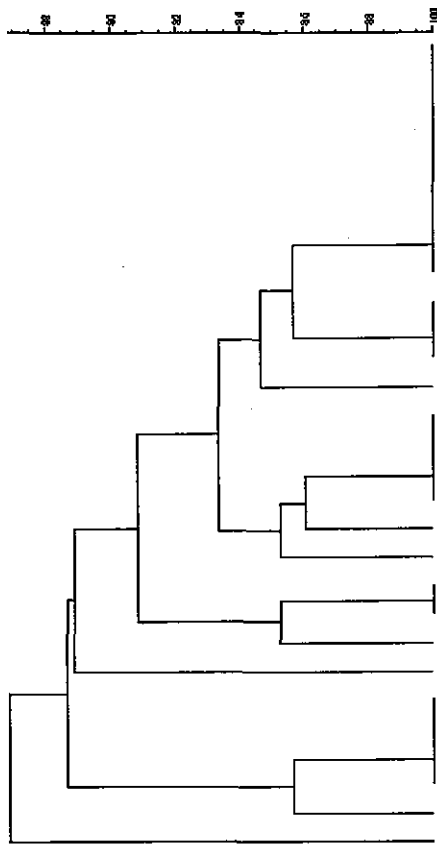


図 1

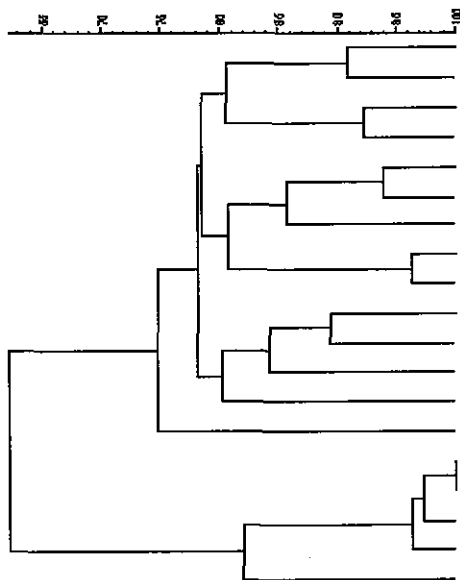
PT 検出日 由来



.14b	..H15.12.9	下痢症患者
.14b	..H15.11.17	下痢症患者
.47	..H15.10.14	下痢症患者
.47	..H13.1.0	事例1
.47	..H13.1.0	事例1
.14b	..H13.8.28	下痢症患者
.14b	..H13.8.29	下痢症患者
.47	..H13.7.30	下痢症患者
.14b	..H13.6.7	卵由来
.14b	..H15.12.17	下痢症患者
.14b	..H15.12.17	下痢症患者
.14b	..H15.12.17	下痢症患者
.47	..H14.2.22	卵由来
.14b	..H15.9.4	事例2
.14b	..H15.9.4	事例2
.14b	..H15.9.1	下痢症患者
.47	..H14.2.22	卵由来
.14b	..H15.10.27	下痢症患者
.14b	..H15.9.24	下痢症患者
.14b	..H13.8.21	下痢症患者
.14b	..H13.6.7	卵由来
.14b	..H13.6.7	卵由来
.RDND	..H14.2.22	卵由来
.47	..H15.10.22	事例3
.47	..H15.10.22	事例3
.47	..H15.10.22	事例3
.47	..H15.10.22	事例3
.47	..H15.10.22	事例3
.36	..H13.1.0	事例1

図2 グループA

PT 検出日 由来



.1	..H16.2.24	事例4
.1	..H16.2.24	事例4
.1	..H15.10.28	下痢症患者
.1	..H15.9.30	下痢症患者
.1	..H15.10.14	下痢症患者
.1	..H15.9.24	下痢症患者
.1	..H15.10.20	下痢症患者
.1	..H15.10.14	下痢症患者
.1	..H15.10.14	下痢症患者
.1	..H15.10.28	下痢症患者
.1	..H16.2.24	事例4
.1	..H15.11.18	下痢症患者
.1	..H15.11.18	下痢症患者
.1	..H15.9.9	下痢症患者
.1	..H16.1.9	下痢症患者
.1	..H16.1.13	下痢症患者
.1	..H16.1.13	下痢症患者
.1	..H16.1.13	下痢症患者
.1	..H15.11.18	下痢症患者

図3 グループB

PT 検出日 由来

散発例由来 *S. Enteritidis* の遺伝子型の特徴

協力研究者 妹尾正登, 榊美代子 広島県保健環境センター

研究要旨

S. Enteritidis によるサルモネラ症散発例の遺伝子型による発生状況の特徴を明らかにするため、分離株 106 株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子解析を実施した。パルスフィールドゲル電気泳動法に使用する制限酵素の分離株間の DNA 識別能力について比較し、さらにコンピューターによる画像解析の有用性について検討した。その結果、制限酵素 *Bln I* が *Xba I* に比べ分離株間の DNA 識別能力が優れていた。コンピューターによる画像解析は、肉眼によるそれとよく一致し有用であった。デンドログラムは類似値 42% で大きく 2 つに分岐し、それぞれに優勢な遺伝子型が存在した。優勢な遺伝子型の 1 つは亜型を含め主に年の前半に、もう 1 つの亜型のない遺伝子型は主に年の後半に検出された。

A. 研究目的

広島県内の *S. Enteritidis* によるサルモネラ症散発例の遺伝子型による発生状況の特徴を明らかにする。パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子解析に使用する制限酵素の分離株間の DNA 識別能力を比較する。コンピューターによる画像解析の有用性について検討する。

B. 研究方法

広島県内医療機関の協力によりモニタリング調査で得られた *S. Enteritidis* 散発例の分離株 106 株を用いた。PFGE は制限酵素 *Bln I* と *Xba I* を用いて実施した。コンピューターによる画像解析はバイオ・ラッド社の Fingerprinting II を使用した。

C. 研究結果と考察

1 制限酵素による DNA 識別能

S. Enteritidis 106 株の制限酵素 *Bln I*

による PFGE では、遺伝子型が 29 タイプに型別された(図 1)。コンピューターによる類似値 90%での遺伝子型は、15 タイプであった。これに対し制限酵素 *Xba I* による PFGE では、類似値 90%での遺伝子型は 4 タイプだけであり、明らかに *Bln I* が *Xba I* に比較して DNA 識別能力に優れていた。

2 コンピューター画像解析の有用性

コンピューターによる PFGE のバンド認識は、肉眼によるそれとよく一致していた。類似性を考慮したコンピューターによる遺伝子型の分類は、肉眼による分類とよく一致しており、PFGE の高い再現性を併せ考えると、疫学調査で多数の検体を処理する上でのコンピューターによる解析の有用性が確認された。しかし、コンピューター処理する場合には、泳動された DNA 断片を全て検出しているか、さらに人工産物を検出していないかを肉眼で確認することが重要である。

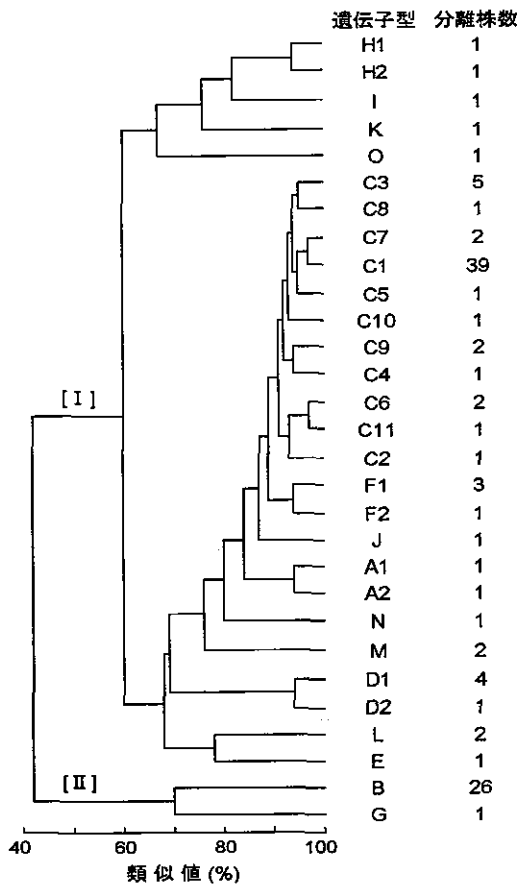


図1 制限酵素*Bln*IによるPFGE遺伝子型の類似性

3 PFGEによる遺伝子型

*Bln*IによるPFGEの結果、県内では類似値42%で大きく2つに分岐した系統(I、II)の*S. Enteritidis*が存在したことが明らかになった(図1)。この2つの系統にはそれぞれに優勢な遺伝子型B(26株)とC1(39株)が存在していた。図2にそれぞれのPFGEパターンを示した。一般に制限酵素の種類を増やすと、同一PFGEパターンの分離株群がさらに細区分される可能性が高い。しかし、今回使用した*Xba*Iでは*Bln*I以上の細区分はされなかった。

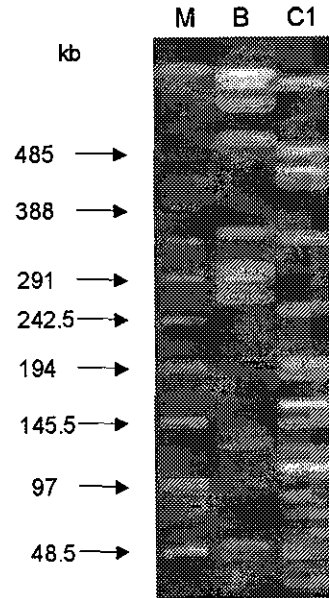


図2 *Bln*Iによる主要遺伝子型のPFGEパターン

(M: マーカー)

4 遺伝子型の月別検出状況

遺伝子型BとC1は、共に最初は2月に検出され、その後12月まで検出が続いた(図3)。その内1つの遺伝子型C1は5月に急激に増加し、亜型(類似値90%以上)の遺伝子型C2-11を伴い、この亜型を含めた遺伝子型の全分離株の79%が7月までに検出された(図3)。これに反して、もう1つの遺伝子型Bは、亜型(類似値90%以上)が存在せず、この遺伝子型の77%が8月以降に検出された(図3)。この遺伝子型による検出時期の特徴は、亜型の存在の有無などから*S. Enteritidis*の遺伝子的変異性と関連があると考えられ、今後の研究を推し進める上で、十分に留意しておく必要がある。

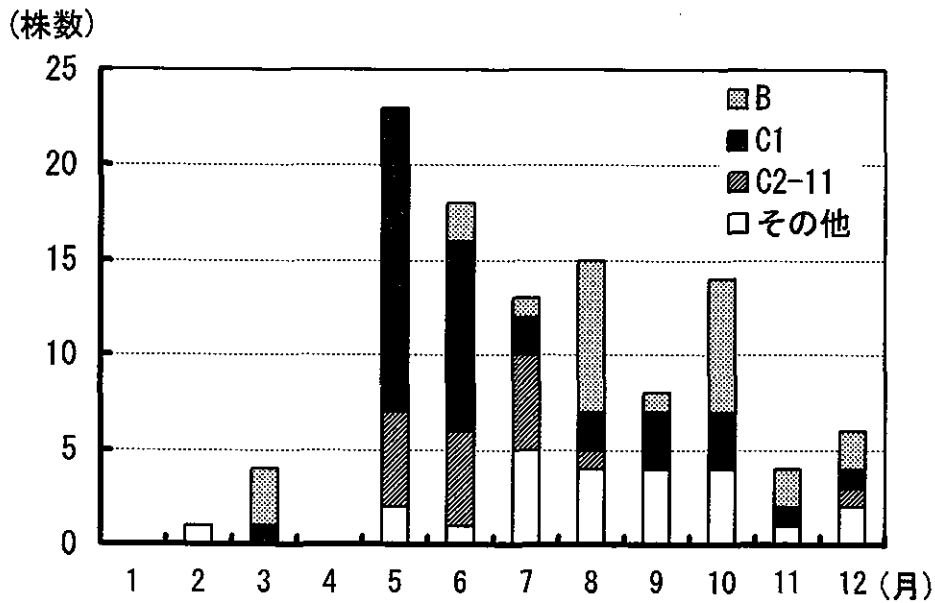


図3 *Bln I*による遺伝子型の月別検出状況

D. 結論

- 1 制限酵素 *Bln I* は, *Xba I* に比べ分離株間の DNA 識別能が優れていた。
- 2 コンピューターによる画像解析は, 多数の検体を扱う疫学調査に有用であった。
- 3 分離株の遺伝子型は類似値 42%で2つに分岐し, それぞれに優勢な遺伝子型が存在した。
- 4 優勢な遺伝子型の1つは亜型を含め主

に年の前半に, もう1つの亜型のない遺伝子型は主に後半に検出された。

E. 研究発表

Seno M, Sakaki M, Ogawa H. Genotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolates from sporadic patients in limited area during one year. *J. Infect.* 49:291-296, 2004.

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み II

— ①研修と精度管理 —

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所

尾崎 延芳	福岡市保健環境研究所	藤田 景清	北九州市環境科学研究所
松雪 星子	佐賀県衛生薬業センター	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
海部 春樹	長崎市保健環境試験所	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
丸住 美都里	熊本市環境総合研究所	緒方 喜代子	大分県衛生環境研究センター
中山 浩一郎	鹿児島県環境保健センター	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
村上 光一	福岡県保健環境研究所	野田多美枝	福岡県保健環境研究所
濱崎光宏	福岡県保健環境研究所	石黒靖尚	福岡県保健環境研究所

研究要旨 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により九州地区における食品由来感染症の拡大防止・防止に組むため、平成 16 年度は①パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)の習得並びに精度管理、②黄色ブドウ球菌の食中毒由来株と病院由来株の比較、③A 群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討、④*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討、⑤食中毒及び感染性胃腸炎原因物質の臨床症状、⑥レジオネラ属菌についての PFGE 画像の機関間差の検討及び九州地区で検出されたレジオネラ属菌のデータベース化についての基礎的研究の 6 課題について実施した。本稿では①について報告する。

①研修と精度管理を行なった結果、*S. Braenderup* H9812 株のアガロースで包埋した DNA の分離度は良好であった。しかし、泳動距離が施設間によって異なり、泳動結果に影響が見られた。菌株の精度管理の結果は、DNA の未消化の断片の影響と考えられるバンドによりバンド数が異なる結果となった。DNA の未消化の問題は、DNA 量や消化反応時間等の検討が必要である。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に最も有用な手段であり、平成 12-14 年度に地方衛生研究所(地研)と感染症研究所(感染研)の間の全国的な PFGE ネットワーク(パルスネット)構築の準備がなされた。さらに、食中毒のグローバル化により全世界的規模な PFGE ネットワーク作りのため、これまで本邦で実施していた方法から米国 CDC の方法に平成 16 年から変更することとなった。そこで、

九州地区では、平成 15 年 11 月に新規 PFGE 法の研修会(図 1)を実施すると共に平成 12 年から使用している O157 標準株 5 株を用いて精度管理を行ない、新 PFGE 法でのパルスネット構築について検討した。しかし、15 年度の精度管理では PFGE サイズマーカーの泳動状況が悪かった。当年度は精度管理前に各地研ともに泳動像の確認を行ない画像共有に耐えうる泳動像を確保するよう努めた。

B. 研究方法