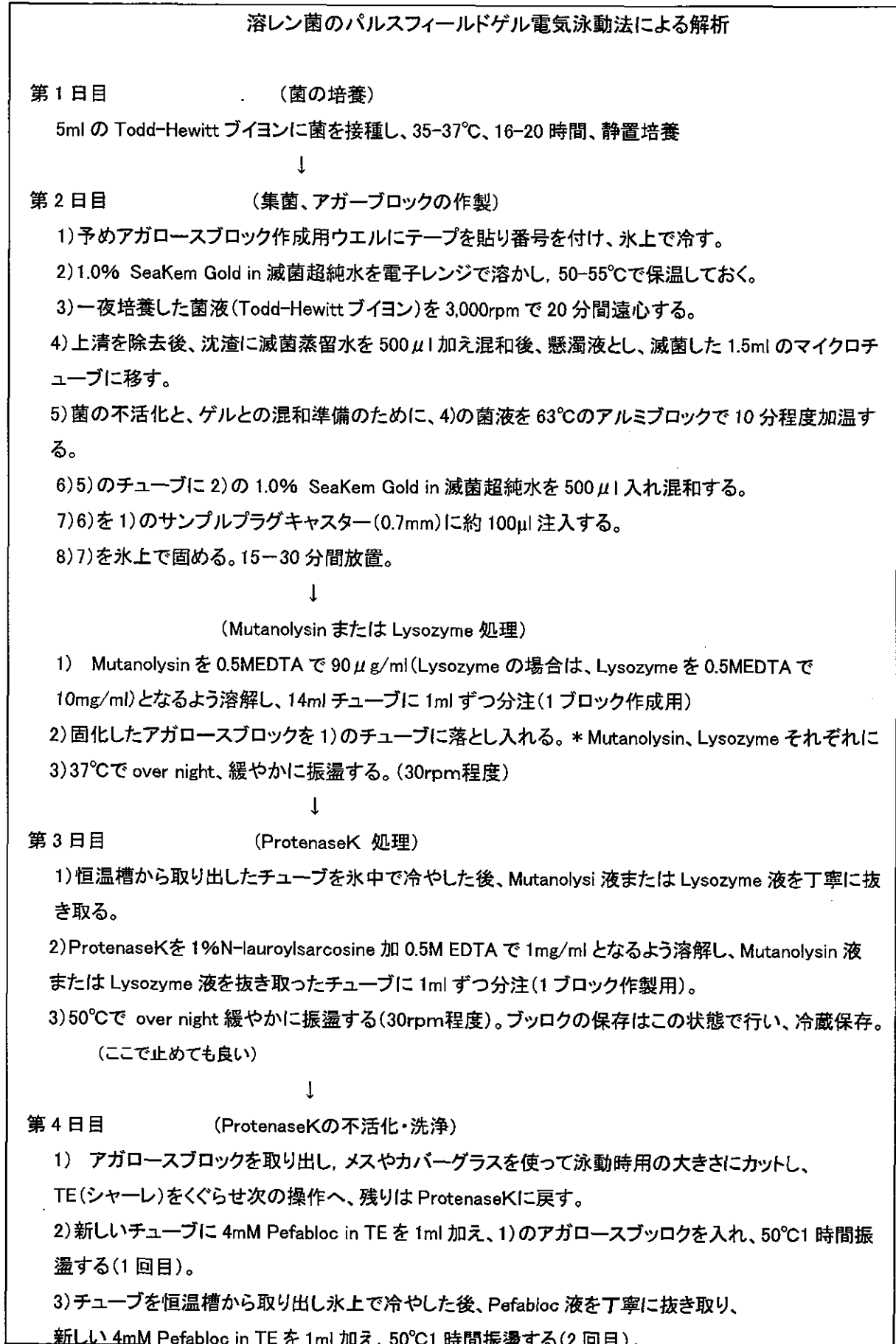


図 1. 溶レン菌のパルスフィールドゲル電気泳動法マニュアル



4) チューブを恒温槽から取り出し氷上で冷やした後、Pefabloc 液を丁寧に抜き取り、TE を 1ml 加え、氷上で 1 時間穏やかに振盪し、平衡化・洗浄を 2 回行う。

(ここで止めても良い)



(制限酵素による消化)

- 1) 制限酵素を含まない制限酵素用の buffer を 1.5ml チューブに 200  $\mu$ l 分注する。
- 2) アガロースブロックを 1) に移し、氷上で 1 時間振盪する。
- 3) buffer を丁寧に抜き取る。制限酵素の入った buffer (Sma I、30unit / sample plug または Sfi I 30unit / sample plug) を 200  $\mu$ l チューブに入れ、Sma I の場合は 30°C で、Sfi I の場合は 50°C で over night 振盪反応する。(ここで止めても良い)



第 5 日目 (アガロースプラグのコームへの貼り付け)

- 1) 黒いゲル・フレームを泳動槽に装着し、2L の 0.5  $\times$  TBE バッファーを泳動槽に注ぎ入れ、14°C に予冷する。
- 2) 0.5  $\times$  TBE バッファー 100ml に 1g の SKG アガロースを加え、電子レンジ等で溶解する。
- 3) 55–60°C の恒温水槽で溶解した 1% アガロースを保温する。
- 4) 恒温槽からチューブを取り出し、0.5  $\times$  TBE バッファー (TE でも可) を 400  $\mu$ l 加え、氷冷する。
- 5) ゲルの作成台において先端が gel platform の底に接着していることを確認する。
- 6) 泳動方向を向いているコームの面を上側にして置き、順にプラグを貼り付けていく。
- 7) マーカーは入ラダーを使用。入ラダーは、貼り付ける前に、泳動用の大きさに切り、TE で洗浄後、ブロックを TE 1ml 程度入れた 1.5ml のチューブに入れ、37°C で 5 分温後、急冷し、他のサンプルと同じ方法で、コームに貼り付ける。
- 8) コームにある余剰の液をキムワイパーで除き、5~10 分間程度乾燥させる。
- 9) コームの先端が platform に接着するようコームをゲル作製台にセットする。
- 10) 溶解・保温したアガロースをとコームの反対側からゲル作製台にゆっくり注ぎ込む。
- 11) 30~45 分間アガロースを固化させた後、コームをアガロースから抜く。



(泳動)

泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。

泳動条件は、Sma I の場合は 6.0V/cm, 5 to 15sec, 11 時間、15 to 45sec, 13.5 時間、14°C  
Sfi I の場合は 6.0V/cm, 15 to 80sec, 22 時間、14°C



第 6 日目 (染色・写真撮影)

- 1) 泳動が終わったら、電源を切り、ゲルを取り出す。泳動槽は 2 度蒸留水で洗浄する。
- 2) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3  $\mu$ g/ml のエチジウムブロミド 300ml (TBE) で 30 分、振盪・染色。
- 3) 脱色 : ゲルを蒸留水で振盪しながら 2 時間洗浄。こまめに DW を替える。
- 4) 写真撮影 : イルミネーターにサララップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真をとる。

图2 Mutanolysin 处理 : *Sma* I

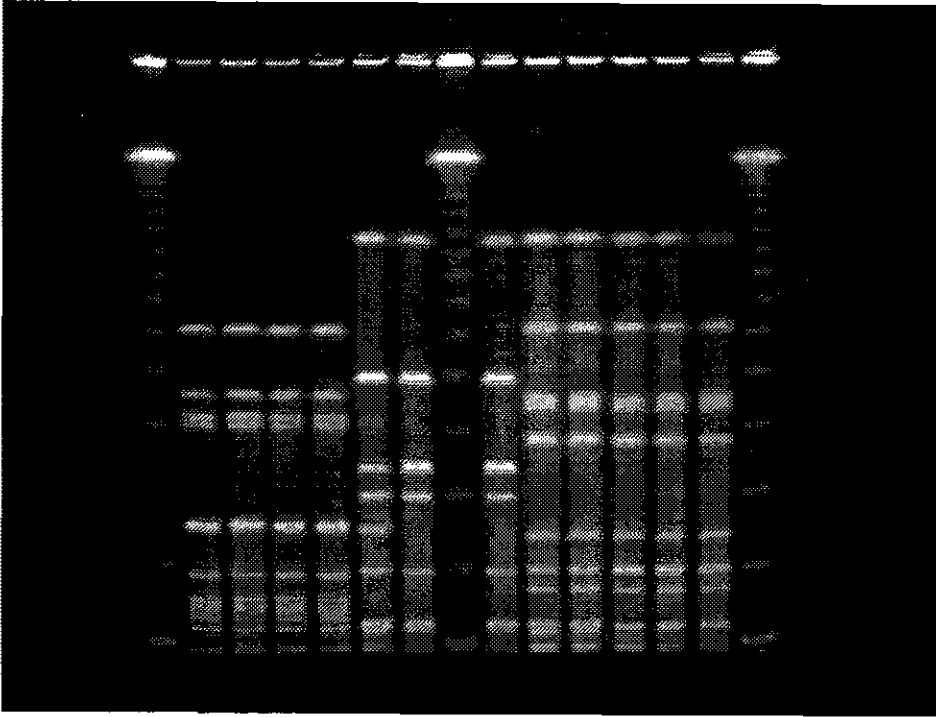


图3 Mutanolysin 处理 : *Sfi* I

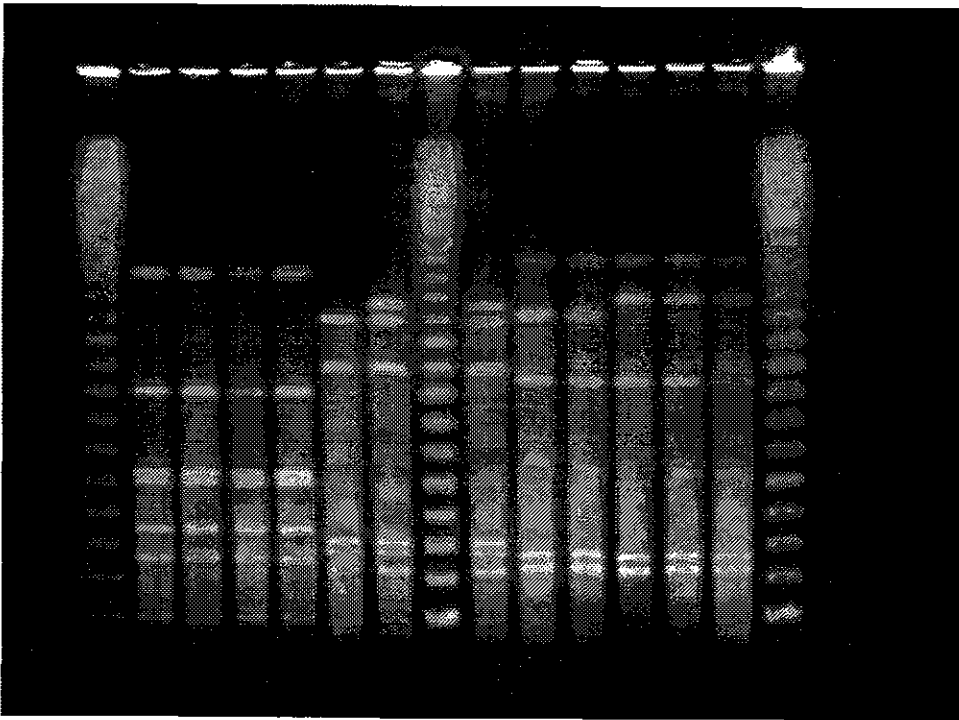


图4 Lysozyme 处理 : *Sma* I

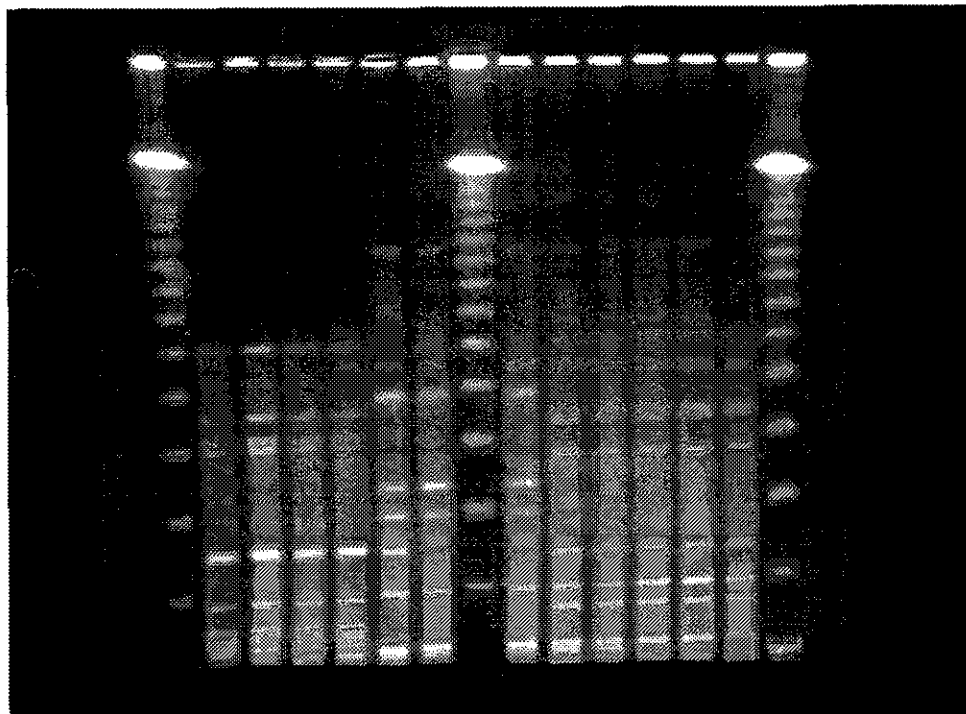
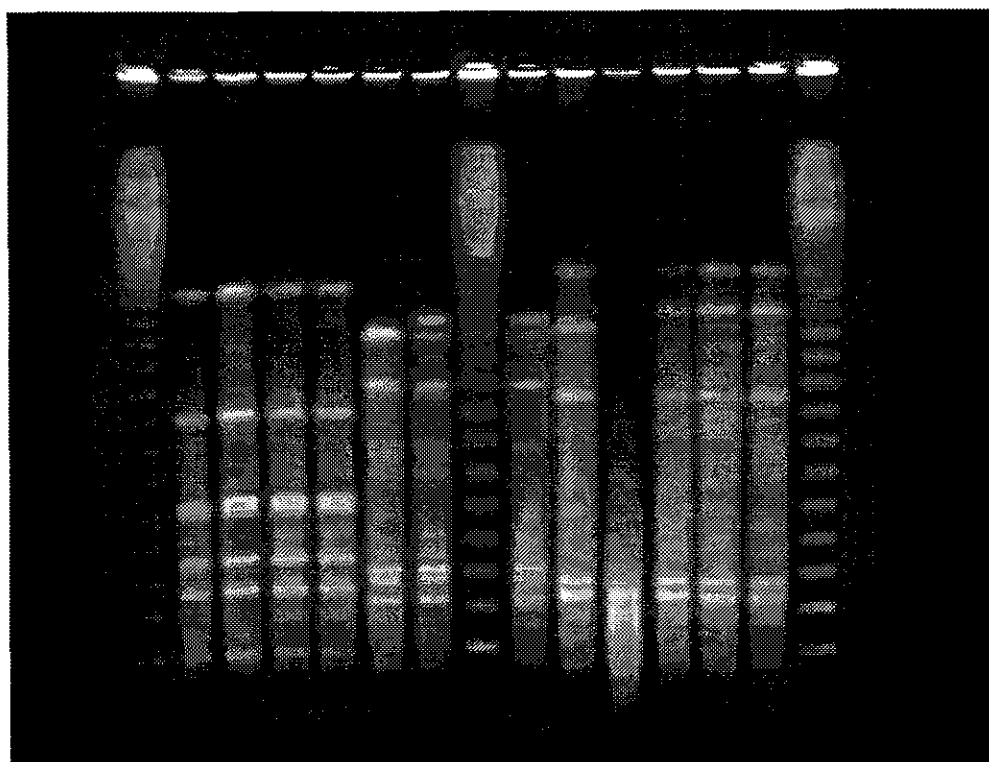


图5 Lysozyme 处理 : *Sfi* I



*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討

研究協力者	山口 仁孝	長崎県衛生公害研究所
	山崎 省吾	長崎県衛生公害研究所
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	松雪 星子	佐賀県衛生薬業センター

研究要旨 *Campylobacter jejuni* のパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) による解析画像を、異なる機関間で有効活用するために、同菌の PFGE マニュアルの作成、画像解析および有用性について九州地区 3 機関で基礎的な検討を行った。reference 株および各地研保有株を材料とし、マニュアルに従い各機関でそれぞれ PFGE を実施し、画像データを集めて解析し比較検討した。また、PFGE の有用性を検討するために、*Campylobacter jejuni flaA* 遺伝子の PCR-RFLP による解析との比較を行った。

#### A. 研究目的

近年、本邦においてはカンピロバクターによる食中毒事例の報告が増加し、サルモネラ、ビブリオ、黄色ブドウ球菌等とならび主要な食中毒起因菌の一つとなっている。また、カンピロバクターは神経麻痺などを主徴とするギランバレー症候群を誘起する微生物としても注目されている。

カンピロバクター属菌は、微好気性で空気中では死滅しやすい事や、genome が約 1.6Mb (大腸菌 genome の約 1/3 の長さ) と他の病原細菌に比べて短いという特徴があり、遺伝子解析を実施するにあたっては、特に培養から前処理 (遺伝子抽出) にかけて、注意が必要である。

今回我々は、カンピロバクターの PFGE 画像データベースの構築、およびそのデータベースを異なる機関間で有効活用することを最終目的として、PFGE プロトコルの作成を試みるとともに、PFGE の有用性について検討するため、PFGE 以外の分子疫学解析の手法として知られる、*flaA* PCR-RFLP との比較検討を実施した。

#### B. 研究方法

##### 1. 精度管理試験

供試菌株として、熊本県 (カンピロバクター九

州地区レファレンスセンター) が保有する、Penner および Lior 血清型が明らかな 5 株を使用した。また、各機関が保有する *Campylobacter* 株について、同様に PFGE を実施した (表 1)。

##### 2. 基礎解析

###### 1) 培養法の検討

PFGE の Plug に充填する菌量・発育状態が PFGE におよぼす影響を検討するため、同一株について、Brucella Broth (BBL)、Brain Heart Infusion (Difco)、Heart Infusion Broth (Difco)、Trypticase Soy Broth (BBL)、Neutrient Broth No.2 (Oxoid)、GN Broth (Difco) 以上 7 種類の培地を用いて、培養試験を実施し、各培地における一定時間培養後に PBS で洗浄して OD 値を計り、菌量を算定した。

また、菌濃度による泳動パターンへの影響について検討するため、Brucella Broth および Brain Heart Infusion で 42°C、24hrs 微好気培養し、一定の菌量に希釈した検体について PFGE を実施した。

###### 2) 制限酵素の検討

同一株を用いて PFGE を実施し、Sma I、Kpn I、BamH I、Sac II の各酵素による DNA 切断パターンの比較を行った。

###### 3. PFGE 法

基礎解析結果を踏まえ、感染研から示された腸

管出血性大腸菌のプロトコールを一部変更したマニュアルを作成し実施した(図1)。画像データは一旦ゲルを写真撮影した後、写真をスキャナーで取り込み、TIFF形式で保存した。

#### 4. *flaA* PCR-RFLP との比較解析

Nachamkin<sup>1)</sup>らの方法を参考に、今回新たにPrimerを設計し*flaA* PCR-RFLP(図2)を実施し、PFGEとの比較を行った。

#### 5. 画像解析法

各機関で得られた画像は長崎県衛生公害研究所に電子メールで送信し、解析ソフトDensitograph(ATTO)で解析した。

### C. 研究結果

#### 1. 精度管理結果

今回の精度管理株は、配布後継代培養を繰り返す中で、各機関が実験を開始する時点で、供試株自体が均一でなかった。また、PFGEのバンドのバックがスメアであったり、まったくバンドが確認できないものが多く、各機関間での比較を行う十分なデータは得られなかった。

唯一No.2については機関Nと機関KでPFGEのデータが得られたので参考に示す(図3)。

#### 2. 基礎解析結果

##### 1) 培養法の検討

表2に示すとおり、今回の実験ではカンピロバクターは、培養後菌濃度が腸内細菌ほど上がらなかった。また、培地によっては増殖のピークが早く、一定時間を過ぎると死滅傾向にあった。

比較的増菌効果が安定した、Brucella Broth(BBL)、Brain Heart Infusion(Difco)を用いて、菌濃度を調整しPFGEで確認した結果、 $1.0 \times 10^8$ 以上の菌量で明瞭にバンドが確認できた(図4)。

##### 2) 制限酵素の検討

Sma Iは、約380kb以下の比較的広い領域に10本程度バンドが分布し、解析が容易と思われたが、Kpn I、BamH Iは、約180kb以下に10数本の短いバンドが近接し、解析が困難と思われた。Sac IIについては、今回検討した株ではバンドが確認され

ず、解析ができなかった(図5)。

#### 3. PFGE 解析結果

今回の解析では、各機関でバンドのバックがスメアであったり、バンド自体が確認できない検体が多く認められた。

これらの対処法として、Plug作成時の温度を低くする事や、菌液調整時にホルマリン処理を行うことで、改善が見られた(図6、7)。

#### 4. *flaA* PCR-RFLP との比較解析結果

今回新たに*C. jejuni flaA* primerを設計したことにより、良好な増幅産物が得られ、安定した結果が得られるようになった(図8、9)。

### D. 考察

今回の検討で、カンピロバクターのPFGEを実施するにあたり、(増菌)培地としては、Brucella Broth(Agar)あるいはBrain Heart Infusion Broth(Agar)が適当であると思われた。

一方、PFGEにおいて、バンドのバックがスメアになりやすい事やまったくバンドを確認できないサンプルもあったことから、培養前後のカンピロバクターの発育状態、溶菌処理がPFGEに多大な影響を与えることが想像された。

いかにintactなDNAを得て、制限酵素を作用させるかを念頭において、培養後はDNase等の作用をできるだけ早くブロックする必要があると考えられた。

また、今回平行して行った*flaA* PCR-RFLPは、作業が簡便で1日で結果がわかり、特別な機材を必要としないことから、迅速な解析が必要な場合などは、非常に有用な方法であると思われた。ただし、PCR産物(1本のバンド増幅)の確認と制限酵素を少なくとも3種類以上は使用することが望ましいと考えられる。

### E. 結論

今回検討した結果より、カンピロバクターのPFGEを実施するにあたっては、菌の状態(培養法)、溶菌処理に十分注意する必要があると思われた。

今後は、培養法や溶菌処理の方法について、各地研協力のもと、より詳細に検討してカンピロバクターの PFGE マニュアルを作成したい。

#### 参考文献

1. Irving Nachamkin, K. B. and Charlotte M. Parron.  
Flagellin: Gene Typing of *Campylobacter jejuni*  
by Restriction Fragment Length Polymorphism  
Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*,  
1531-1536 (1993).

#### F. 研究発表

なし。

#### G. 知的所有権の取得状況

なし。

表 1.精度管理株

No.	菌種	分離地	年度	血清型	
				LIOR	Penner
1	<i>Campylobacter jejuni</i>	佐賀県	12	7	O
2	〃	鹿児島市	14	TCK12	J
3	〃	鹿児島市	14	TCK13	K
4	〃	大分県	14	27	O
5	〃	熊本県	14	36	C
A	〃	ATCC29428			

表.2 増菌液の検討(42°C微好気培養後)

	24hrs	36hrs	72hrs
Brucella Broth	$3.4 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	$6.9 \times 10^7$
Brain Heart Infusion	$4.8 \times 10^7$	$5.9 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$
Trypticase Soy Broth	$2.3 \times 10^7$		$6.3 \times 10^7$
Heart infusion Broth			$7.2 \times 10^7$
Neutrient Broth	$1.7 \times 10^7$		
GN Broth	$4.8 \times 10^6$		

OD600: 1.00 =  $5 \times 10^8$  cell/ml



図 1. Campylobacter の PFGE プロトコール

- 第 1 日目 (菌の培養)
- 1) 3ml の Brucella Broth に菌を接種し、40-42°C、18-24 時間、微好気培養
- ↓
- 第 2 日目 (菌の培養)
- 2) Brucella Agar に 1) 菌液を濃厚に接種し、40-42°C、18-24 時間、微好気培養
- ↓
- 第 3 日目 (集菌、アガーブロックの作製)
- 3) 予めアガロスブロック作成用ウエルにテープを貼り番号を付け、氷上で冷す。
- 4) 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水 を電子レンジで溶かし、50-55°C で保温する。
- ↓
- (ホルマリン処理・洗浄)
- 5) 1.5ml のマイクロチューブに 5%ホルマリン PBS 液 を 1000  $\mu$ l 入れ、Agar の菌をマッチ棒の頭 1/3 程度掻き取り、Vortex を行った後、12,000 rpm で 2 分間冷却遠心する(1 回目)。
- 6) 上清を除去後、5%ホルマリン PBS 1,000  $\mu$ l を加え Vortex 後、12,000 rpm、2 分間冷却遠心し、室温で 30 分間放置する(2 回目)。
- 7) 12,000 rpm、2 分間冷却遠心して上清を除去後、PBS を 1000  $\mu$ l 加え Vortex 後、12,000 rpm、2 分間冷却遠心(1 回目)。
- 8) 上清を除去後、PBS を 1000  $\mu$ l 加え Vortex 後、12,000 rpm、2 分間冷却遠心(2 回洗浄)。
- 9) 上清を除去後、滅菌超純水 500  $\mu$ l を加え、懸濁する。
- S. Braenderup H9812 は滅菌超純水 250  $\mu$ l を加え、懸濁する。
- 10) ゲルとの混和準備のために菌液を 63°C のウオーターバスに 10 分程度浮かす。
- 11) 10) のチューブに 4) の 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水 を 500  $\mu$ l 入れ混和する。
- S. Braenderup H9812 は 1.0% SeaKem Gold in 滅菌超純水を 250  $\mu$ l を加え、懸濁する。
- 寒天が熱いのでチップが膨化し、2 度目以降は寒天量が多くなるのでチップは 1 回毎替える。
- 12) 11) を 3) のサンプルプラグキャスター(0.7mm)に 100  $\mu$ l 注入する。
- 13) 氷上で固める。15-30 分間放置。
- ↓
- (ProtenaseK 処理)
- 14) ProtenaseK を 1 mg/ブロック分秤量し、1%N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA で 1 mg/ml となるよう溶解し、チューブに 1ml ずつ分注(1ブロック作製用)。
- 1%N-lauroylsarcosine が溶けにくいので 50°C の恒温槽に入れておく。
- 15) 固化したアガーブロックを 50°C に保温した 1) の溶菌液入りチューブの中に落とし入れる。
- 使用したモールド及びミニスパーテルは消毒用エタノールで浸漬あるいはスプレーし消毒する。
- 16) 50°C で over night 緩やかに振盪する(30rpm程度)。(72 時間まで可)。
- \* 水槽の水位がチューブの中の溶液より上であることを確認する。
- (ここで止めても良い、ブロックの保存はこの状態で冷蔵保存する)
- 恒温槽から取り出したら氷上で一旦冷やした後、次の操作にはいと寒天が縮まり作業しやすい。
- ↓
- (プロテナーゼKの不活化・洗浄)

17) アガロースブロックを取り出し、メスやカバーガラスを使って泳動時用の大きさにカットする。

泳動時の大きさにすると取り扱いが大変なので取り敢えず半分にしても良い。

残りは新しい ProtenaseK 液 (0.5mg ProtenaseK in TE, 1% N-lauroylsarcosine は入れない) で保存する。

\* S. Braenderup H9812 マーカーはこの状態のものを作っておくと便利である。

18) 500 $\mu$ づつ分注した 1mg (4 mM) Pefabloc SC(AEBSF)/ml in TE にブロックを移し、50°C で 20 分以上振盪し ProtenaseK 液を不活化する (1 回目)。

19) チューブを恒温槽から取り出し氷上で冷やした後、Pefabloc 液を丁寧に抜き取り、新しい 4mM Pefabloc in TE を 0.5ml 加え 50°C 20 分間以上振盪する (2 回目)。

20) TE (1ml/sample) にバッファーを変えて、50°C で 20 分以上振盪し洗浄する。この操作を 2 回行う。

(ここで止めても、1 週間以内であれば冷蔵保存できる。日をおいて再開する場合は TE で洗浄する。この時 50°C の恒温水槽で 20 分間ゆっくり振盪する。この操作を 2 回繰り返す。)

↓

(緩衝液による平衡化及び制限酵素による消化)

21) アガーブロックを TE 液からパラフィルムなどの上に取り出し、コーム幅  $\times$  約 4-5mm に整形する。

22) 制限酵素を含まない制限酵素用の buffer を 1.5ml チューブに 200 $\mu$ l 分注しする。

23) スライスしたアガーブロックを 2) に入れ 37°C で 20 分以上振盪する。

24) チューブを恒温槽から取り出し氷上で冷やした後、buffer を丁寧に抜き取る。

25) 制限酵素の入った buffer (30unit / sample plug) を 100 $\mu$ l チューブに入れ、30°C (Sma I)、37°C (Xba I) で 2 時間—over night 振盪反応する。

(16 時間以上の反応は行なわない。またここで作業を止める場合は、TE で 2 回洗浄した後 TE で冷蔵保存する。保存したアガーブロックを泳動する場合は、泳動前に室温程度の温度の TE で 2 回洗浄する。)

↓

(アガロースプラグのコームへの貼り付け)

作業前に黒いゲル・フレームを泳動槽に装着し、2L の 0.5 $\times$  TBE バッファーを泳動槽に注ぎ入れ、14°C に予冷する。

26) 0.5 $\times$  TBE バッファー 100ml に 1g の SKG アガロースを加え、電子レンジ等で溶解する。

27) 55-60°C の恒温水槽で溶解した 1% アガロースを保温する。

\* 熱いゲルを注ぎ込むとコームに貼り付けたプラグがずり落ちることがある。

28) 37°C の恒温水槽からチューブを取り出し、0.5 $\times$  TBE バッファー (TE でも可) を 400 $\mu$ l 加え、氷冷する。

29) コームを装着し、予めゲルの作成台において先端が gel platform の底に接着していることを確認する。

30) 泳動方向を向いているコームの面を上側にして置き、順にプラグを貼り付けていく。

31) コームにある余剰の液をキムワイプで除き、10 分間程度乾燥させる。

\* プラグと一緒に残っているバッファーが多いと乾くのにかかる。

32) コームの先端がプラットフォームに接着するようコームをゲル作製台にセットする。

33) 溶解・保温したアガロースをとコームの反対側からゲル作製台にゆっくり注ぎ込む。

34) 30-45 分間アガロースを固化させた後、コームをアガロースから抜く。

↓

(泳動)

泳動槽にブロックを装填したゲルを装着し、泳動する。

泳動条件は、は 6.0V/cm, 6.8 to 38.4 sec, 19 時間、14°C

\* 泳動槽や温度、TBE のメーカーなどにより泳動距離が微妙に異なる。

S. Braenderup H9812 マーカーの最後のバンドが泳動用ゲルの端から 2-3cm のところにくるように時間を設定する。



第4日目以降

(染色・写真撮影)

- 35) 泳動が終わったら、電源を切り、ゲルを取り出す。泳動槽は2度蒸留水で洗浄する。
- 36) 染色 : ゲルは暗室で染色。0.3  $\mu$ g/ml のエチジウムブロミド(TBE)で30分(時間厳守)振盪・染色。  
アルミフオイルなどで染色槽に蓋をする。
- 37) 脱色 : ゲルを蒸留水で振盪しながら2時間洗浄。こまめにDWを替える。  
例) 10分、10分、20分、20分、20分、20分。特に最初が肝心。  
アルミフオイルなどで槽に蓋をする。
- 38) 写真撮影: イルミネーターにサランラップをひき、染色・脱色済みの寒天を載せ写真をとる。

パワーポイント参照

ゲルドックなどで取込を行なう場合

ゲル全体を撮影するし、8ビット・TIFF形式、圧縮無しで保存する。

ポラロイド写真

1枚目はゲルの下端と上端ぎりぎりにして全体写真に撮る。

2枚目はゲルの下端に固定して極限までアップでとる。

拡大されていた方が取り込みやすいため。コームの跡が分かり、下の寒天の位置が分かるようにする。

2枚目は写真は2枚撮影(露出時間を長めにしてバンドが良く読める写真1枚、露出時間が普通の写真1枚)

ゲルドックなどが無く画像をスキャナーで取り込む場合も保存形式は、TIFF形式、圧縮無しで保存する。

## 図 2.Campylobacter *flaA* PCR-RFLP プロトコール

### (被検菌の調整)

- 1)保存培地から白金線で(マッチ棒頭 1/2)掻き取り Brucella broth に接種し、42°C、18-24 時間微好気培養する。
- 2)Brucella Agar に 1)菌液を濃厚に接種し、40-42°C、18-24 時間、微好気培養
- 3)1.5ml のマイクロチューブに 5%ホルマリン PBS 液を 1000 μl 入れ、Agar の菌を マッチ棒の頭 1/3 程度 掻き取り、Vortex を行った後、12,000 rpm で 2 分間冷却遠心する(1 回目)。
- 4)上清を除去後、5%ホルマリン PBS1,000 μl を加え Vortex 後、12,000 rpm、2 分間冷却遠心し、室温で 30 分間 放置する(2 回目)。
- 5)12,000 rpm、2 分間冷却遠心して上清を除去後、PBS を 1000 μl 加え Vortex 後、12,000 rpm、2 分間冷却遠心(1 回目)。
- 6)上清を除去後、PBS を 1000 μl 加え Vortex 後、12,000 rpm、2 分間冷却遠心(2 回洗浄)。
- 7)上清を取り除き PBS 1ml を加え、vortex 後 12,000 rpm、2 分間、4°C で遠心する。
- 8)上清を取り除き 1000 μl の滅菌超純水 を加え Vortex する。

↓

### (DNA の抽出・PCR)

- 9) 約 95°C の沸騰水中に 15min 浮かべ、菌体を壊す。
- 10) 9)を 12,000 rpm、2 分間、4°C で遠心し、上清を Template とする。
- 11) PCR 混液<sup>①</sup>に 7)上清を 4.0 μl (25-50ng/50 μl reaction) 入れ、PCR<sup>②</sup>を実施する。

↓

### (増幅確認)

- 11) 0.8-1.0% Agarose gel に Amplicon を 5 μl 泳動・染色して、DNA 増幅を確認し DNA 量をそろえる<sup>③</sup>。

↓

### (制限酵素処理)

- 12) 11)の残りの Amplicon を用いて制限酵素処理を行う<sup>④</sup>。  
(酵素の至適温度で 2-4 時間ゆっくりと振盪する。Dde I : 37°C、Alu I : 37°C)

↓

### (ゲル作成)

- 11) 2.0% Nusieve GTG Agarose + 0.7% Agarose × 1TBE (or 2.5% Agarose × 1TBE)

↓

### (電気泳動)

- 12) Sample 7-15 μl および Marker 10 μl をそれぞれ Apply し泳動する<sup>⑤</sup>。  
泳動条件は、mini ゲルで 100V: 約 40min。

↓

### (染色・写真撮影・画像保存)

- 13)ゲルは暗室で染色。0.3 μg/ml のエチジウムブロミド (in TBE or DW) で 15 分 (時間厳守) 振盪・染色。  
\* アルミホイルなどで染色槽に蓋をする。
- 14)ゲルを蒸留水で振盪しながら 20 分洗浄。こまめに DW を替える (5、10、20min)。  
\* 特に最初が肝心。\* アルミホイルなどで槽に蓋をする。
- 15)写真撮影: 脱色済みの寒天を載せ写真をとる。  
\* 上はコームの真上、下は寒天の真下にとる。拡大されていた方が取り込みやすいため。

コームの跡が分かり、下の寒天の位置が分かるようにする。

16) 写真撮影は最低限2枚撮影

\* 露出時間を長めにしてバンドが良く読める写真1枚、露出時間が普通の写真1枚

17) コンピューター取り込み用は背景が暗めの方が良い。TIFF形式で画像を保存する。

① PCR Mixture

Primer 【mfla1】 5'-CTT TAA GCA GAC TTA GTT CAG GTC-3' :24MER

【mfla2】 5'-GCT TTA GAG TAG TTT GCA CTC TC-3' :23MER

Amplicon size: 約 1658bp

	EX Taq HS (Takara)
DW	38.0
× 10Buffer	5.0
dNTP Mixture	4.0
Polymerase	0.25 (2.5U)
Primer A1 (50 μM)	0.2
A2 (50 μM)	0.2
(Template	4.0 ) / Sample

② PCR Condition

PreDenature	94°C、7min.	} 35 cycle
Denature	94°C、30sec.	
Annealing	60-55°C、45sec. (0.5°C decrease by 1cycle for first 10cycle)	
Extension	72°C、100sec.	
ProExtension	72°C、10min.	

③ 1本の Amplicon(約 1658bp)が増幅されていない場合は、Annealing 温度の変更等をして再度 PCR を実施する。  
バンドの厚さの目視から、大まかな DNA 量をそろえて制限酵素処理を実施する。

④ Restriction Enzyme Digestion

PCR Amplicon	12.5 μl	
Enzyme		
(Dde I、Alu I、Hinf I)	3U	
× 10 buffer	2.5 μl	
10mM DTT	2.5 μl	
DW	up to 25 μl	/ Sample

37°C(Alu I、Dde I、Hinf I)、2-3hrs

⑤ DNA Size Marker

Ex: Hi-Lo DNA Marker: アベテックなど 100bp-数 1000bp が認識できるもの。

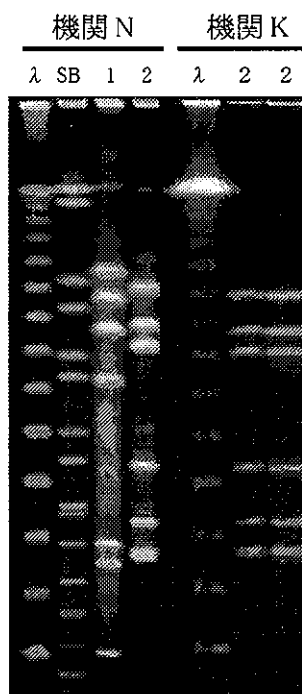
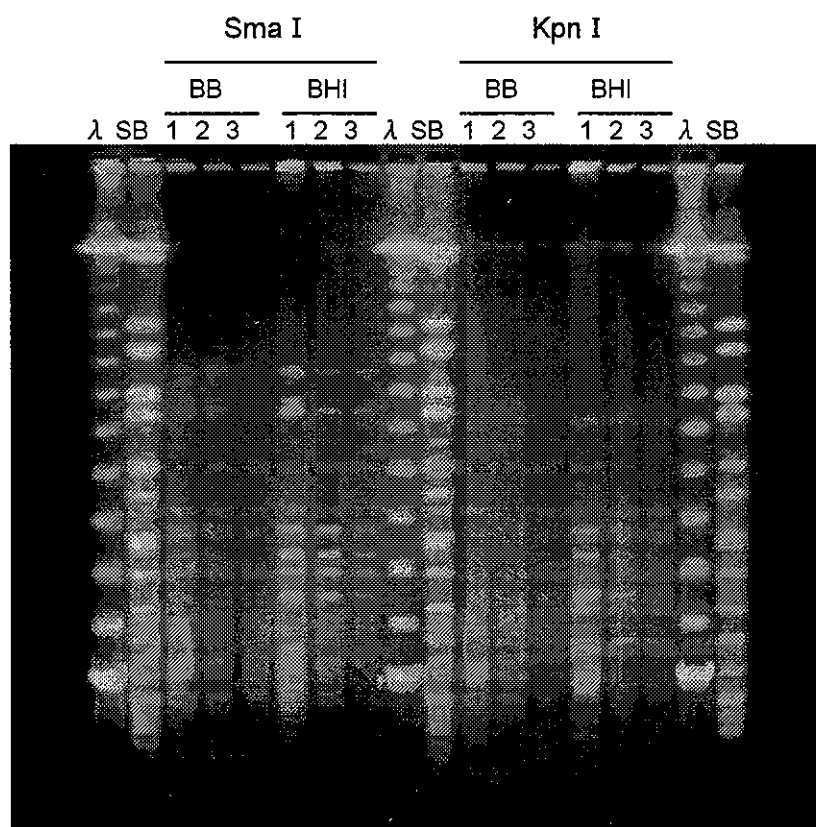


図 3.精度管理株の比較

図4.菌量の検討(同一菌)、制限酵素の検討



1	2	3
$2.3 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$5.7 \times 10^7$

cell/ml

図 5.制限酵素の検討

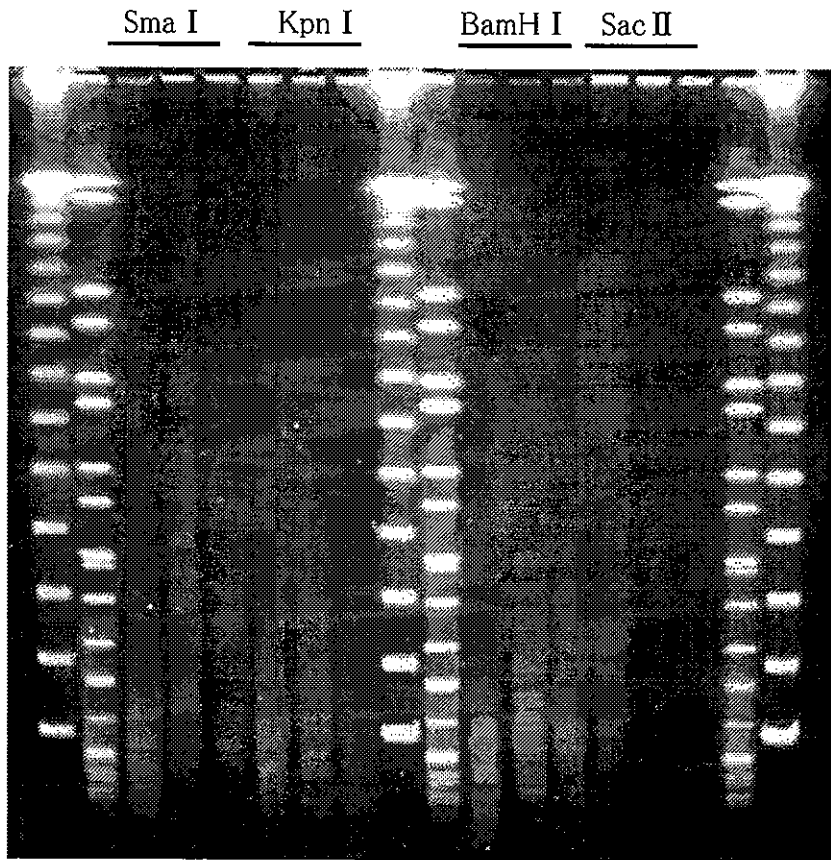
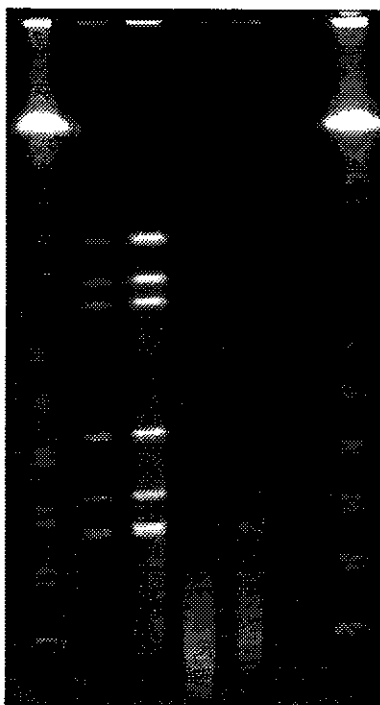


図 6.Plug 作成時の菌液温度の影響

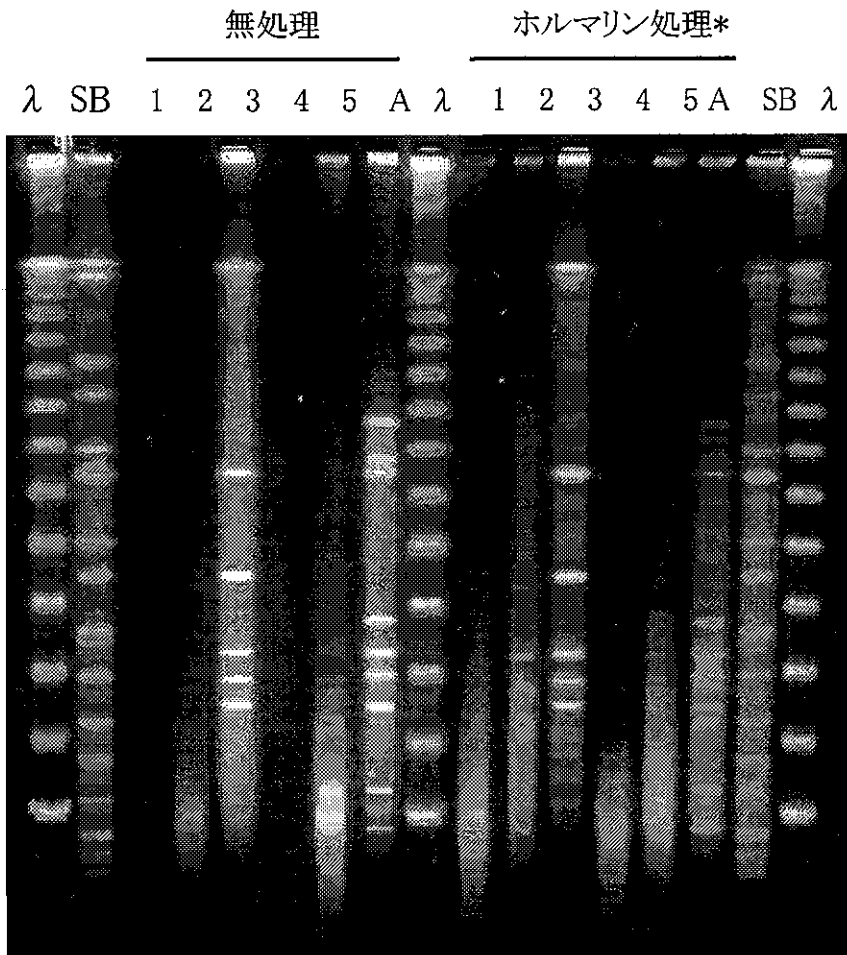
1 2 3 4



	1	2	3	4
加熱*	×	×	○	○
希釈	1/2	1	1/2	1

\* Plug 作成時、ゲルとの混和前に菌液を 63°C に加熱

図 7.ホルマリン処理効果

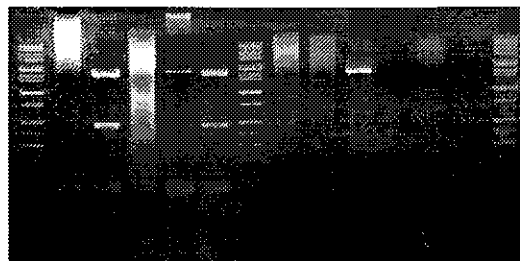


\*5%ホルマリン PBS 1hr

図 8. *flaA* PCR-RFLP I

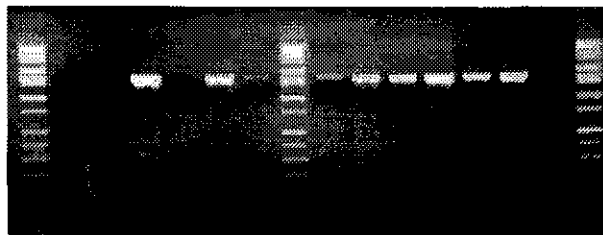
【Primer: Nachamkin】

2 3 4 5 A ① ② ③ ④ ⑤ ⑥\*



【New Primer】

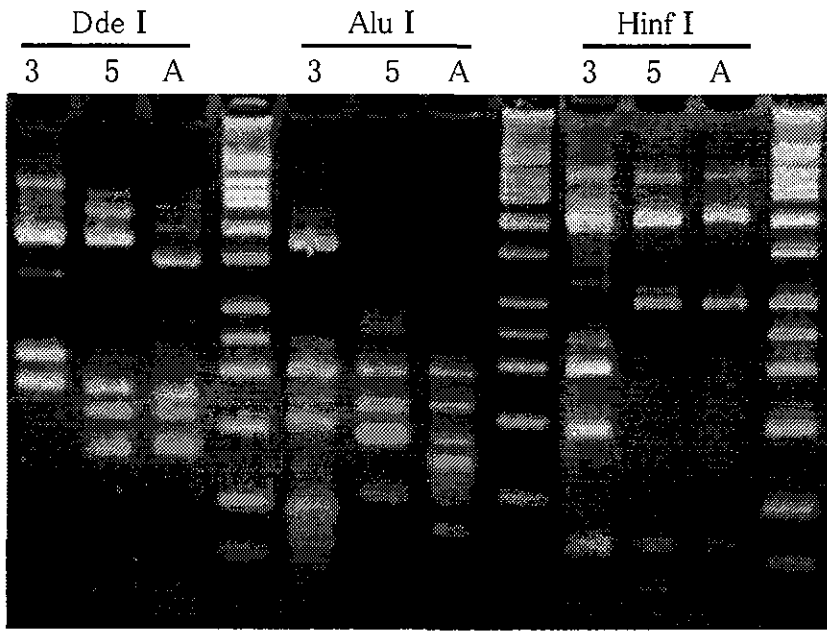
1 2 3 4 5 A ① ② ③ ④ ⑤ ⑥\*N



\* ①~⑥食中毒由来株



☒ 9. *flaA* PCR-RFLP II



平成 16 年度厚生労働省新興・再興研究事業分担研究報告  
食中毒及び感染性胃腸炎原因物質の臨床症状

久高 潤	沖縄県衛生環境研究所	堀川和美	福岡県保健環境研究所
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	丸住美都里	熊本市環境総合研究所
緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
山口仁孝, 山崎省吾	長崎県衛生公害研究所	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター

### 研究要旨

集団食中毒の発生初期段階において、症状等の疫学的調査結果から得られた具体的数値から原因物質を推測し、検査方針を決定するのに必要な資料を得ることを目的に、過去 5 年間に九州地区で発生した食中毒のうち特に頻度の高い 10 原因物質について、原因物質が検出された患者 646 症例の臨床症状等を集計し、その特徴について解析を行った。

#### A. 研究目的

保健所や地方衛生研究所が集団食中毒及び感染症を探知した時点において、殆どの場合その原因物質等は不明であり、その際、患者・食品・環境等の多くの検体について、どの原因物質に重点を置いて検査を実施するか判断が必要である。その判断材料として最も重要な情報は、保健所の初動調査として行われる患者個人調査票から得られた臨床症状の集計結果であり、これらの情報から、優先的に行われる検査項目が決定される。文献等に記載されている症状は、下痢、発熱、腹痛、嘔吐等の主症状の記載にとどまり、症状の発現頻度についての具体的記載は少ない。また、これまでになされた研究報告では、比較的症状が重いことが予想される医療機関受診者や、成人のボランティアに病原体を投与して得られた研究報告が主である。しかしながら、実際の食中毒事例では、医療機関を受診しない軽

症者も多く、年齢層も幅広いため、典型的な症状を示さない場合も多い。

今回の調査では、集団食中毒発生時の初期段階において原因物質を推測するための資料を得ることを目的として、過去の食中毒・感染症事例のうち、原因物質が検出された患者の臨床症状を調査し、その発現頻度を具体的な数値としてまとめ、その特徴について解析を行った。

#### B. 研究方法

調査期間は 1999 から 2004 年の過去 5 年間に九州地区 10 カ所の県・市衛生研究所管轄区で発生した食中毒及び感染症事例のうち、原因物質が検出された患者（接触者検便等にて検出された健康保菌者を除く）を対象とした。原因物質は、食中毒の発生頻度の高い 10 病原体（ノロウイルス、サルモネラ、カンピロバクター、腸炎ビブリオ、毒素原性大腸菌、腸管出血性大腸菌、ウェ

ルシユ菌，赤痢菌，黄色ブドウ球菌及び嘔吐型セレウス菌）の646症例を集計した。

調査は事例発生時に各保健所から提出された食中毒の個人調査票及び感染症調査に用いられる感染症法関連別記様式2の記載より，発生年月，性別，年齢，潜伏時間，下痢の有無と1日の下痢回数及び便の性状，最高発熱温度，嘔吐の有無と回数，腹痛，頭痛の有無，検出された病原体の血清型及び病原因子等について調査した。尚，各症状の記載で「不明」あるいは未記入のものは集計の母集団から除外した。下痢の種類については「下痢」と「血便」に分類し，水様性下痢及び粘液性下痢を「下痢」，軟便は下痢無しに含めた。発熱について，最高体温の記入欄に「熱無し」とのみ記載されたものは便宜上日本人の腋下体温の平均値36.89℃とした。発熱の有症率の集計では37.0℃以上を発熱とした。

### C. 研究結果

#### 1. 嘔吐の発症頻度が高い原因物質。

図1に嘔吐の発症率が高い（50%以上）の原因物質の症状のレーダー分布を示した。また，表1に原因物質別臨床症状の発症頻度一覧を数値で示した。ノロウイルスは，平均潜伏時間が36.1時間，（幅11-72時間），下痢有症率が86.1%，平均下痢回数4.7回で血便はみられなかった。発熱有症率71.5%，発熱の平均値は37.7℃と微熱程度であったが，最高発熱は40.3℃であった。嘔吐の発症率は毒素型食中毒の黄色ブドウ球菌やセレウス菌を除く感染型食中毒の原因物質としては最も高く，平均嘔吐回数は3.1回，最高嘔吐回数は15回であった。

腸炎ビブリオは，Novと比較すると平均

潜伏時間が16.4時間と短く，91.6%が24時間以内に発病し（Table 2），頭痛の発症率も1.2%と低かった。

黄色ブドウ球菌は，ノロウイルス及び腸炎ビブリオと比較して発熱有症率が12%と低く，平均潜伏時間も3.3時間と短かった。

#### 2. 嘔吐の発症頻度が低い原因物質

図2に嘔吐の発症頻度が低い（50%以下）原因物質の症状のレーダー分布を示した。

サルモネラは，潜伏時間の平均値が30.2時間（幅6.5-72時間），下痢の有症率94.7%とノロウイルスに類似していたが，嘔吐有症率は14.6%と低く，また発熱の有症率及び最高発熱の平均値は，それぞれ87.8%，38.5℃とやや高い値を示した。

カンピロバクターについては，下痢98.3%，腹痛89.5%，発熱78.7%頭痛47.2%と臨床症状がサルモネラに類似していたが，平均潜伏時間が65.3時間（幅24~115時間）とサルモネラと比較して長い。また，平均下痢回数が11.7回と最も多かった。今回集計した57症例では血便の症状を示したものがなく，これまでの症例報告と異なっていた。

赤痢菌については，下痢が90.5%にみられたが，血便の有症率は9.1%とSTECと比較して低率で，発熱（52.9%）及び頭痛有症率（29.4%）は高率であった。

ウェルシユ菌による腸炎は，潜伏期間10.7（幅2~19）時間，下痢93.3%、腹痛68.9%。文献的に発熱や嘔吐は稀であるとのされているが，最高発熱の平均値は37.0℃と微熱程度であったものの，37.2%に37℃以上の発熱，22%に嘔吐みられた。

腸管出血性大腸菌感染者（STEC）の臨床症状とベロ毒素型を表2に示した。STEC

の臨床症状は血清型により異なり、0157 とその他の STEC を比較した場合その他の STEC の症状は比較的軽く、血便、腹痛、嘔吐が有意に低かった ( $P < 0.01$ )。

その他の原因物質についても文献等で一般的にいわれている症状とほぼ近い結果であったが、今回は、具体的数値として表すことができた。

#### D. 考察

食中毒及び感染性胃腸炎の事例発生時には、主に臨床症状や喫食状況から、経験的判断や主症状の文献記載により、原因物質を推測し調査項目を決定しているケースが多い。このうち、症状は、最も有用な情報であるが、実際には、下痢、発熱、腹痛、嘔吐などの少数のほぼ共通した症状が主体であるため、これだけでは、判断材料として不十分場合も少なくない。さらに、食中毒事例の場合、幅広い年齢層や、病院へ受診あるいは入院する程でもない軽症者も多く、必ずしも感染した原因物質に特徴的な症状を示さないケースもある。今回の調査ではこのような軽症者を含め食中毒・感染症患者の臨床症状発症頻度を具体的な数値として表すことにより、臨床症状の情報をより詳細なものとすることができた。

集計されたデータを解析した結果は、一般的に文献等といわれている症状とほぼ同様であったが、今回症状の発症頻度がこのような具体的な数値で示されたことから、集団食中毒の際に、たとえ、食中毒の調査経験が少ない人であっても、調査から得られた臨床症状等の集計結果と今回得られた

結果を照合することにより、予想される原因物質を絞り込むことができ、また、推定された原因物質の潜伏時間と喫食状況調査結果から原因施設の推定がスムーズに行うことができる。しかし、そのためには、保健所の初動調査時に、喫食状況のみならず患者個人の症状についても詳しく調査し、検体確保とともに検査機関に情報提供することが求められる。

今回の調査ではデータ数が少なく、症状で不明な点も多かったが、より精度の高い具体的な数値で症状を解析するためには、継続したデータの集積が必要である。また、今回発生頻度が少ないため調査に加えなかったコレラ、エルシニア、リステリア等の細菌や、クリプトスポリジウム等の原虫類、ノロウイルス以外の胃腸炎ウイルス、及び自然毒や化学物質も含めた食中毒の原因物質についても調査が必要と思われる。

更に、病原微生物検出情報や WISH net の様なオンライン上にデータを蓄積（例えば患者個人症状や集団発生の際の有症率を入力）することにより、統計学的に予想される原因物質の一覧が確率とともに検索できるシステムを構築できれば、医療機関をはじめ保健所や地方衛生研究所では、迅速でより正確な食中毒調査が可能となり、原因究明のための調査に役立てることが期待できる。

---

#### F. 健康危機情報：

無し

#### G. 研究発表：

無し