

200500677A・B

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化
に関する研究（課題番号：H15-新興-1）

平成 17 年度総括・分担研究報告書

及び

平成 15～17 年度総括・総合研究報告書

（厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業）

主任研究者 寺嶋 淳

国立感染症研究所 細菌第一部

目次

1. 平成 17 年度総括研究報告書

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 1

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所

2. 平成 17 年度分担研究報告書

(I) 国立感染症研究所

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 13

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所

分担研究者 渡辺 治雄 ”

協力研究者 泉谷 秀昌 ”

伊豫田 淳 ”

三戸部治郎 ”

裴 迎新 ” (黒竜江省疾病
コントロールセンター)

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

a) 北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動法

(PFGE) を基礎とした施設間差について …………… 25

分担研究者 長野 秀樹 北海道立衛生研究所

協力研究者 広地 敬 札幌市衛生研究所

和栗 敦 青森県環境保健センター

八柳 潤 秋田県衛生科学研究所

齋藤志保子 ”

今野 貴之 ”

藤井伸一郎 ”

松館 宏樹 ”

佐藤 卓 岩手県環境保健研究センター

蛇口 哲夫 ”

谷津 壽郎 ”

田村 広子 ”

三品 道子 ”

菅原 直子 ”

佐藤 由美 ”

畠山 敬 宮城県保健環境センター

山口 友美 ”

沼田 昇 仙台市衛生研究所

村田 敏夫 ”

最上久美子	〃
大谷 勝実	山形県衛生研究所
水田 克己	〃
熊谷奈々子	〃
須釜久美子	〃
平澤 恭子	福島県衛生研究所
長沢 正秋	〃
渡部 啓司	〃
佐々木寿子	新潟県保健環境科学研究所
木村 浩一	北海道立衛生研究所
伊東 拓也	〃
合田 悟	〃

b) 秋田県で分離された志賀毒素産生性大腸菌 0121 の O1-122 保有状況、
薬剤感受性と分子疫学的性状 …………… 32

協力研究者	八柳 潤	秋田県衛生科学研究所
	齊藤志保子	〃
	今野 貴之	〃

c) 保育所において二つの異なる P F G E パターンが分離された腸管出血性大腸菌
O26:H11 による集団感染事例（岩手県） …………… 36

協力研究者	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	松舘 宏樹	〃
	佐藤 卓	〃
	蛇口 哲夫	〃

d) 宮城県下で発生した大腸菌感染事例
ーパルスフィールドゲル電気泳動法による解析とその概略ー …………… 38

協力研究者	谷津 壽郎	宮城県保健環境センター
	田村 広子	〃
	三品 道子	〃
	菅原 直子	〃
	佐藤 由美	〃
	畠山 敬	〃
	秋山 和夫	〃

e) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の院内感染が疑われた事例の
PFGE 解析 …………… 46

協力研究者	村田 敏夫	山形県衛生研究所
	最上久美子	〃
	大谷 勝実	〃
	水田 克己	〃

f) マンニト非分解性黄色ブドウ球菌による食中毒事例の

パルスフィールドゲル電気泳動法による解析 48

協力研究者	熊谷奈々子	福島県衛生研究所
	須釜久美子	〃
	平澤 恭子	〃
	長沢 正秋	〃
	渡部 啓司	〃

g) 北海道日高支庁で発生した集団 0157 症 50

協力研究者	木村 浩一	北海道立衛生研究所
	伊東 拓也	〃
	合田 悟	〃
分担研究者	長野 秀樹	〃

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

a) 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 52

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	矢萩かをる	茨城県衛生研究所
	長 則夫	栃木県保健環境センター
	黒澤 肇	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	依田 清江	千葉県衛生研究所
	鈴木理恵子	神奈川県衛生研究所
	武藤 哲典	横浜市衛生研究所
	野田 裕之	山梨県衛生公害研究所
	小山 敏枝	長野県衛生公害研究所
	川森 文彦	静岡県環境衛生科学研究所
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	尾畑 浩魅	〃

b) 腸管出血性大腸菌 0157 集団事例および散発事例への PFGE 解析の応用例 67

1. 栃木県で分離された 0157 散発事例由来株の PFGE パターン
栃木県保健環境センター
2. 群馬県で分離された 0157 散発事例由来株の PFGE パターン
群馬県衛生環境研究所
3. 埼玉県で分離された集団事例および散発事例由来 0157 株の PFGE パターン
埼玉県衛生研究所
4. 千葉県で分離された散発および集団事例由来 0157 株の PFGE パターン
千葉県衛生研究所
5. 神奈川県で分離された散発事例由来 EHEC 0157 株の PFGE パターン
神奈川県衛生研究所

6. 腸管出血性大腸菌O26による感染症事例 2005年
神奈川県衛生研究所
7. 横浜市で分離されたEHEC 0157集団および散発事例由来株のPFGEパターン
横浜市衛生研究所
8. 山梨県で分離されたEHEC 0157:H7 (VT1+VT2)株のPFGEパターン
山梨県衛生公害研究所
9. 長野県で分離された散発事例および集団事例由来0157のPFGEパターン
長野県環境保全研究所
10. 静岡県分離株(0157:H7)のPFGE画像
静岡県環境衛生科学研究所
11. 東京都内および神奈川県内の系列店Bで発生したEHEC食中毒事例
東京都健康安全研究センター
12. 東京都内S苑で発生した腸管出血性大腸菌0157事例
東京都健康安全研究センター
- c) サルモネラ食中毒事例へのPFGE解析の応用例 83
1. *Salmonella* Montevideoによる集団食中毒
千葉県衛生研究所
2. 2005年7月に発生したサルモネラ血清型Enteritidis食中毒事例(1)
東京都健康安全研究センター
3. 2005年7月に発生したサルモネラ血清型Enteritidis食中毒事例(2)
東京都健康安全研究センター
- (IV) 東海・北陸ブロック
- a) 平成17年度東海・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 88
- | | | |
|-------|-------|---------------|
| 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 | " |
| | 倉本 早苗 | 石川県保健環境センター |
| | 白木 豊 | 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 |
| | 藪谷 充孝 | 名古屋市衛生研究所 |
| | 奥村貴代子 | 豊田市衛生試験所 |
- b) *Salmonella* Typhimuriumのパルスフィールドゲル電気泳動画像データベースへの2000年以降に検出された*S. Typhimurium*の追加 96

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	”
	白木 豊	岐阜県保健環境研究所
	倉本 早苗	石川県保健環境センター
	田中 大祐	富山県衛生研究所

(V)近畿ブロック

a) 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 102

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	滋賀県立衛生科学センター
	藤原 恵子	京都府保健環境研究所
	平野 隆	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センター
	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
	榮井 毅	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
	山崎 渉	”

b) 兵庫県で分離された食中毒由来腸炎ビブリオ O3:K6 の菌型解析 113

協力研究者	西海 弘城	兵庫県立健康環境科学研究センター
	辻 英高	”
	福永 真治	”

c) 保育園におけるエルシニア・エンテロコリチカ血清型 O8 による集団食中毒事例 (奈良県) 116

協力研究者	榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	中山 章文	”
	橋田みさを	”
	山本 安純	”

d) 2005 年に大阪府で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事件の PFGE 解析 120

協力研究者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	山崎 渉	”
	塚本 定三	”
分担研究者	勢戸 和子	”

(VI) 中国四国ブロック

- a) 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 125
- | | | |
|-------|-------|---------------|
| 分担研究者 | 田中 博 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| 研究協力者 | 榑 美代子 | 広島県保健環境センター |
| | 妹尾 正登 | ” |
| | 中嶋 洋 | 岡山県環境保健センター |
| | 最首 信和 | 鳥取県衛生環境研究所 |
| | 冨田 正章 | 山口県環境保健研究センター |
| | 吉田 紀美 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| | 砂原千寿子 | 香川県環境保健研究センター |
| | 絹田 美苗 | 高知県衛生研究所 |
| | 谷脇 妙 | ” |
| | 森 敏彦 | 徳島県保健環境センター |
| | 笹川知位子 | ” |
| | 古田 喜美 | 広島市衛生研究所 |
- b) *Legionella pneumophila* SG1 の遺伝子解析について …………… 141
- | | | |
|-------|-------|-------------|
| 研究協力者 | 榑 美代子 | 広島県保健環境センター |
| | 妹尾 正登 | ” |
- c) *Salmonella* Virchow のパルスフィールドゲル電気泳動法によるデータベース化の検討 …………… 145
- | | | |
|-------|-------|-------------|
| 研究協力者 | 吉田 紀美 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| | 田中 博 | ” |
- d) 腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討
—MLVA 法と PFGE 法の比較— …………… 148
- | | | |
|-------|-------|----------|
| 研究協力者 | 古田 喜美 | 広島市衛生研究所 |
| | 下村 佳 | ” |
| | 石村 勝之 | ” |
| | 笠間 良雄 | ” |
| | 松本 勝 | ” |
| | 荻野 武雄 | ” |

(VII) 九州ブロック

- a) 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Ⅲ
— 研修と精度管理 — …………… 168
- | | | |
|-------|-------|-------------|
| 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 |
| | 川内 良介 | 福岡市保健環境研究所 |
| | 徳崎 里美 | 北九州市環境科学研究所 |

	眞子 純孝	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
	植木 信介	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
	上野 伸広	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
b)	<i>Campylobacter jejuni</i> 分子疫学解析の検討	186
	研究協力者	山口 仁孝 長崎県衛生公害研究所
		上野 伸広 鹿児島県環境保健センター
		八尋 俊輔 熊本県保健環境科学研究所
	分担研究者	堀川 和美 福岡県保健環境研究所
c)	レジオネラ属菌の PFGE の精度管理、及び九州各機関で 検出されたレジオネラ属菌の PFGE による比較解析	196
	研究協力者	河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所
		岡田 美香 "
		村上 光一 福岡県保健環境研究所
		野田多美枝 "
		徳崎 里美 北九州市環境科学研究所
		眞子 純孝 佐賀県衛生薬業センター
		植木 信介 長崎市保健環境試験所
		緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター
		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
		上野 伸広 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
d)	A 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	210
	研究協力者	緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター
		久高 潤 沖縄県衛生環境研究所
		岸川 恭子 佐賀県衛生薬業センター
		尾崎 延芳 福岡市保健環境研究所
		瓜生 佳世 "
		丸住美都里 熊本市環境総合研究所
		松岡由美子 "

目次

1. 平成 15～17 年度総合研究報告書

- 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 217
主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所

2. 平成 15～17 年度分担研究総合報告書

(I) 国立感染症研究所

- 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 226
主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所
分担研究者 渡辺 治雄 ”

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

- －北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスネット構築に向けた基盤研究－ …… 233
分担研究者 長野 秀樹 北海道立衛生研究所

(III) 関東・甲・信・静岡ブロック

- 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 240
分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

(IV) 東海・北陸ブロック

- a) 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 …………… 265
b) *Salmonella* Typhimurium と *Shigella sonnei* (ソルネ菌) 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 …………… 282
分担研究者 松本 昌門 愛知県衛生研究所

(V) 近畿ブロック

- 近畿ブロックにおける食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化
に関する研究 …………… 296
分担研究者 勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所

(VI) 中国四国ブロック

- 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究 …………… 310
分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所

(VII) 九州ブロック

- a) 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 …………… 316

b) 食中毒及び感染症胃腸炎の病原体と臨床症状	332
分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所	
3. 研究成果の刊行	339

平成 17 年度総括研究報告書

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所細菌第一部第一室長

食品由来感染症の原因菌に対して PFGE による解析を行い、得られた結果をデータベース化するとともに関係機関において共有して予防対策等に役立てるためのネットワーク構築を継続した。PFGE では標準化プロトコールを使用し、全国を6つに分けたブロックごとに各種の菌について解析を行い、その有効性の検討および精度の向上を図ること、さらに PFGE 画像解析により系統樹解析を行うことに重点を置いて研究を行った。各機関における互換性のあるデータを得るためには継続的な PFGE 解析の精度管理を行う必要があり、基準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株を使用し標準化プロトコールに基づいて各ブロックでの精度管理を継続した。今後予想される国際的な広域感染症事例に対応する際にも、まず国内でのデータの互換性が確保された上で海外の関係機関と連携することが重要だと考えられる。信頼度の高いデータベースを構築することが、事例発生時における関係機関へのより正確な情報提供に直結するであろう。したがって、国際的な標準化プロトコールを使用する精度管理システムは今後も継続して行うことが重要である。参加各機関において解析結果の互換性を確保するために行われている精度管理の結果から、各機関の PFGE 解析技術の向上が保持されていることが示されているものの、一部では解析技術の改善の必要が見いだされていることは、継続した精度管理が必要であることを強く示唆していると考えられる。Multi Locus VNTR Assay (MLVA) による解析結果から腸管出血性大腸菌 0157 では PFGE の解析結果を十分に補完しうる可能性が示唆され、今後も継続的な本法の検証が必要だと考えられた。感染研サーバーの利用による解析情報の共有化を行うために、地研を対象とした PFGE 解析結果等の限定公開を試行した。データベース化された情報を有効に利用するためにも、本システムをより充実させることが必要であると考えられる。

分担研究者：	堀川和美（福岡県保健環境研究所）
長野秀樹（北海道立衛生研究所）	渡辺治雄（国立感染症研究所）
甲斐明美（東京都健康安全研究センター）	協力研究者：泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部
松本昌門（愛知県衛生研究所）	治郎（感染研）、および各地方衛生研究所関
勢戸和子（大阪府公衆衛生研究所）	係者（各分担報告書を参照）
田中 博（愛媛県立衛生研究所）	

A. 研究目的

食品由来感染症においても、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、赤痢等を起因菌として大規模に発生する事例の報告が続いている。被害の拡大を未然に防ぐためには、探知される事例の疫学的解析と関連性が疑われる起因菌の菌学的解析という2面からの解析に基づいて、迅速かつ総合的判断を下すことが重要である。現在、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が、菌の解析システムとして汎用され成果を挙げている。特に、食品由来感染症の対策においては、PulseNet と呼ばれる PFGE 解析情報のネットワークが世界的な規模で標準化されつつある。わが国においても、国際的ネットワークでのデータの互換性を確保するために、標準化プロトコルを採用して精度管理を行うとともに、データベースを構築して分離株の異同を DNA レベルで識別できるシステムを稼働させ、広域腸管感染症事例に対応することが重要である。一方、PFGE 以外の技術に基づく解析方法も開発され、その評価が進みつつある。本研究では、標準化プロトコルでの精度管理を継続し、解析結果のデータベース構築に基づく迅速かつ有益な情報共有システムを機能させることを目的とする。

B. 研究方法

1) 標準化プロトコルに基づいて我が国の解析技術の均一化、およびその精度管理を行う。そのために、全国に75ある地方衛生研究所(地研)を6ブロックにわけ、ブロックごとに各種の菌について PFGE 解析を行

い、その有効性、および精度管理を行う。

2) 画像解析ソフト(Fingerprinting II)を使用して PFGE 画像を処理することにより、各種の菌についてデータベースの構築を継続する。各地域の分離株がデータベース上で新規のものであるか否かを判定し、事例間の関連性の有無についての判断に役立つ情報提供が可能となるシステムの構築を行う。2005年に引き続き2006年3月にも香港において、標準化プロトコルによる技術研修会が開催された。我が国の PFGE 解析技術の検証を行うためにも、各国のデータとの比較を目的としてデータの提示を行う。

3) 腸管出血性大腸菌 0157 について、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析条件の検討を行う。

C. 研究結果と考察

1. 感染研における研究

平成16年度に設定した新プロトコルに基づいて国内で分離された EHEC について PFGE 解析を行った。EHEC 0157 については、2005年に分離・送付された1807株が、2005年に分離された新しいサブタイプとして780種類、2004年に分離されたことのあるサブタイプが72種類見いだされた。また、後述するように、散發事例由来株においても *XbaI* 消化による PFGE 解析結果では同一クラスターに属すると考えられる分離株も検出され、関連性を疑うような株の探知にも有用である可能性が示された。ただし、散發事例由来株については、PFGE パターンの一致のみから同一感染源であるとは断定するべきではな

く、MLVA の結果からもわかるように、より詳細な菌株の解析が必要であると考えられる。いずれの方法においても、分離株についての患者情報等の疫学情報と菌株の解析結果を十分に関連付けて調査を行うことが、信頼できる感染源の特定に結びつくものと考えられる。

2005 年に分離された 1807 株の EHEC O157 は、852 種類のサブタイプに分かれた。そのうち 34 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されている広域共通パターンであることが示唆された。このうち、2004 年に出ているパターンである、Type No. (TN) 52, 112, 413 の 3 種類のパターンについては、5 箇所以上の異なる都道府県において 2005 年に引き続いて分離されていた(図 3)。同様に、2005 年に初めて分離されたパターンである、TN a230, a264, a27, a491 のパターンを示す株においても 5 箇所以上の異なる都道府県において分離されていた(図 4)。これらの 7 種類のパターンを示す株は、*Xba*I の結果だけではなく *Bln*I または *Spe*I の結果においても同一パターンを示していることから、極めて clonality の高い株であることが示唆された。

MLVA による解析では、供試株として 2004 年の 5 月から 10 月に各地の散発事例に由来する 16 株の EHEC O157 を用いた。これらの保存株は *Xba*I 及び *Bln*I による PFGE 解析で 6 種類のサブタイプに分類されたが、MLVA により 14 種類のサブタイプに分けることができた。広域において共通の PFGE パターンを示す株においても、MLVA による解析で株間の相

違を識別できる可能性が示唆された。しかしながら、同一事例由来株においても相違が生じていることから、どの程度の変異までを関連性を有する株とするかという基準について詳細な検討が必要であると考えられた。PFGE においても観察される集団発生由来株内での variation の範囲を MLVA で確認してゆくことが必要だと考えられた。

2005 年分離株として感染研に送付されている EHEC 株は 2005 年 2 月現在 2389 株であり、O157 が 1807 株、O26 が 383 株、残りは他の血清型等であった。平成 17 年においても、複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送あるいは PulseNet Japan の掲示板において公開し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。感染研のサーバーを用いた、地研を対象とする限定公開では、全国 6 ブロックの地研の分担研究者を対象として ID とパスワードを配布し試験運用を行った。今後各地研等の担当者に対して ID とパスワードを配布し運用を開始する予定である。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックにおける PFGE 解析の施設間差について、2 群の試料について時間間隔をあけて別々に解析して得られた結果を比較した。11月に4株、12月に4株の大腸菌 O157:H7 を各地方衛生研究所に送付し、それぞれ送付後直ちに PFGE 解析を行った上、2回の解析結果を同一データベースに登録し

て解析することとした。解析にあたっては、アルゴリズムによる差を見るため、通常行われているDice法以外に、Peason法による解析も併用した。使用している解析ソフトがDice法あるいはPeason法をサポートしていない場合には、サポートしている方法でのみの解析を行った。解析ソフトを保有していない施設については、PFGEの泳動像写真を北海道立衛生研究所にて解析した。送付した菌株のうち、No. 3は、2種類のPFGEパターンが出現したため、解析結果から除外した。同一株であるNo. 2とNo. 7についての類似度であるが、本来であれば100%と計算される筈である。しかし、当所を含む8地研では、いずれのアルゴリズムでもNo. 2とNo. 7を同じPFGEパターンとは認識出来なかった。残り2施設 (AおよびC) では、Dice法で類似度100%と計算された。このうち1施設 (C) では、Peason法による解析がされていないのでアルゴリズム間での比較は出来なかったが、残り1施設 (A) では、Dice法でのみ100%と計算され、Peason法では94.5%の類似度であった。Dice法およびPeason法の両方の類似度が計算されている8施設間で、両アルゴリズム間の差を検定したが、比率検定、順位検定のいずれでも有意差は認められなかった。

Dice法、Peason法それぞれのアルゴリズムによる解析には、当初予想していた有意差を認めることは出来なかったが、同じ菌株を正確に認識出来たのはDice法のみであった。施設Aの結果に示された通り、同じバンドデータを用いているにもかかわらず、Peason法では、同じ菌株を識別することが出来なかった。逆に、各菌株間の関係を示す系統樹では、

Peason法で全施設が同じパターンを示し、Dice法では異なるパターンとなる例が認められた。

通常使用しているアルゴリズムである Dice法と Peason法との比較では、同じ菌株を用いた検討において 100%の類似度を示したのは Dice法のみであった。この類似度については両者間で統計学的優位さは認められなかった。菌株のグルーピングについては、Peason法では全施設が同じパターンを示したが、Dice法では異なるパターンを示した例が認められた。これは用いているパラメーターの統一性の問題かもしれない。また、PFGE解析の結果に影響する因子としてバンド認識に対する判断基準の相違が考えられることから、何らかの統一的判断基準を設定する必要がある。ソフト上の問題として、PFGE画像では同じパターンを示しているように見える菌株を正規化することにより逆に異なるパターンとして認識される例があった。この問題については、今後も検討を要する。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株5株を用いて、11施設 (施設1~11) でPFGEを行った。0.7mmキャスターを用いてブロックを作成することで、PFGE解析像は、各施設ともDNAバンドが非常にシャープになった。また、分離も良い結果であった。サイズマーカーとして使用した *S. Braenderup* は、DNAバンドがシャープで濃度も均一で安定しており、解析の基準として非常に適していることが確認された。しかし、PFGE像のバンドが太く、分離の悪い例が認められた施設も一部に認

められた。これらを改善するためには、ブロックを作製する際のDNA量の検討が必要である。

この結果を用いて、*S. Braenderup* を基準にしてデンドログラム解析を行った。各施設が5菌株をそれぞれ2レーンでPFGEを行なった。PFGEアガロースに出現した全DNAバンドを対象として解析した場合、小さいサイズのDNAバンドの分離、染色が不鮮明であったため、バンドを選択することが非常に困難であった施設もあった。しかし、78.2kb以上のバンドを対象とした結果、5株とも、11施設間で92%以上の類似度が得られた。

PFGEパターン系統解析ソフトウェアで解析する際に読み込ませる写真は、画像の大きさや解像度をある程度統一した方が、その後の解析がし易く、均一な結果が得られることが確認された。例えば、小さく撮った写真であれば標準化の時の歪みが大きくなる。また、解像度が低い写真では、バンドを選ぶ際、選ぶバンドの判定が難しくなるため、誤差が大きくなることが確認された。

東京都内で2005年8月～9月に分離された散発または集団下痢症事例由来のEHEC 0157の141株についてPFGE解析を行い、その写真を基に、デンドログラムを作成した。同一集団例由来株では、100%の類似度が得られた。しかし、異なる時期に解析した散発事例由来株では、写真を目視で判断した場合は一致と判定できても、デンドログラム解析では100%一致とならない菌株もあった。

サルモネラのPFGE解析の応用；

2地研でそれぞれ経験したサルモネラ血清型MontevideoおよびEnteritidisによる

食中毒事例から分離された菌株について検討した成績を別紙に示した。それぞれ患者由来株や原因食品由来株と比較が出来、良好な成績が得られているが、EHEC 0157と比較すると、PFGEパターンの多様性が少なく、さらに検討する必要性が示唆された。

4. 東海・北陸ブロック

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0157を用いたパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)精度管理を実施した。平成15年度及び16年度の何れかまたは両年に使用した2検体について、これら9施設がサルモネラマーカの使用と泳動条件は統一して、その他のPFGE実施条件は各施設によって感染もしくはそれに類似した条件で実施した。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解析ソフトを用いて検討したところ、2検体とも同一検体が同一クラスターを形成した。検体3の施設間の相同性は、平成17年度は78.6%であり、平成15年度の89.2%よりは低かったものの平成16年度の76.4%よりは高い値となった。検体4に関しては、平成17年度は87.8%と非常に高率で、平成16年度の82.4%より高い値となった。

以上の結果からPFGE実施条件のうちDNA調製等の相違はPFGE泳動図の相同性の向上に大きな影響を及ぼさず、平成15、16年度と同様にマーカと泳動条件の統一が東海・北陸地方各施設が実施したPFGE泳動図の相同性を76%以上の高率に保つことに重要であると思われた。

平成15年度に作成した80年代から90年代に愛知県で検出された*S. Typhimurium* 143

株のPFGEデータベースへの追加として、2000年以降、愛知県（7株）、岐阜県、石川県、及び富山県（それぞれ2株）で検出された、計13株の *S. Typhimurium* のPFGE解析を行った。合計156株の *S. Typhimurium* のPFGE画像を解析ソフト「フィンガープリントII」により解析し型別分類を行なった結果、156株は17のクラスター（n=125）と31の1菌株1 PFGE型（n=31）に分類された。

2000年以降検出された13株のうち9株は何れかのクラスターに属した。その9株のうち愛知県で検出された5株は2株以上の菌株が含まれる主要なクラスター（C1, C3, C6）に属していた。一方、岐阜県で検出された2株に関してはこれら2つで独立したひとつのクラスター（C16）を構成していた。富山県で検出された1株は2000年以降に愛知県で検出された1株と共にひとつのクラスター（C17）を構成していた。一方、石川県で検出された2株は何れも1菌株1 PFGE型であった。さらに愛知県及び富山県でそれぞれ検出された1株も1菌株1 PFGE型に属していた。

以上の結果から、愛知県で2000年以降検出された *S. Typhimurium* 7株中5株が80年代から90年代に検出された *S. Typhimurium* が含まれるクラスターに属したことから、愛知県においては80年代以降比較的長期間に渡って類似したPFGE型の *S. Typhimurium* がヒトから検出されていることが推察された。一方、岐阜県、石川県、富山県で検出された *S. Typhimurium* に関しては、富山県で検出された1株が愛知県で検出された菌株と同じクラスターに属したが、残りの5株は愛知県

とは異なるクラスターもしくは1菌株1 PFGE型であった。このことは限られた数ではあるが、他県で検出された *S. Typhimurium* はPFGE型が愛知県とは異なっている可能性が示唆された。

5. 近畿ブロック

食品由来感染症が近畿ブロック内で広域に発生した場合に、PFGE型別法を共通の疫学指標として使用するため、11衛生研究所の施設間差および2名の解析者による変動を検討した。施設間変動の検討には、2005年に大阪府で分離された EHEC O157:H7 5株を用い、*Xba*I 切断されることを確認の上、11施設に配布した。また、2005年夏季に分離された EHEC O157 について、各施設で実施したPFGE画像を集めて解析し、流行菌型のさかのぼり調査を行った。各施設の電気泳動条件をみると、泳動温度は全施設で14℃であったが、泳動時間は17～20時間と3時間の開きがあり、19時間が最も多く6施設であった。バッファメーカーによる違いは認められなかった。電送されたPFGE画像は、いずれの施設も目視でサイズマーカーの band 9、band 10、band 16 が認識できたが、画像全体が白っぽくコントラストの弱い画像も見られた。また、サイズの小さいバンドは明瞭に分離されているものの、大きいバンドが太すぎる画像も見られた。したがって、自動バンド認識後に目視補正が必要であったが、画像解析から得られた dendrogram は、解析者にかかわらず菌株ごとに高い近似度でクラスターを形成し、良好な結果を示した。流行菌型のさかのぼり調査は、分離された EHEC O157 の全株について

て検討したわけではないが、100%一致した13組の画像のうち、7組は異なる自治体の分離株であり、近畿ブロックには潜在的に広域発生事例のあることを伺わせる結果であった。特に、Type 4は5月-6月に5つの自治体で発生した7事例由来12株でパターンが一致しており、同一感染源である可能性が高いと考えられた。また、Type 3からType 7を含む近似度94.8%のクラスターには、Type 4と1-2本異なる株が加わるが、大阪府で2005年に発生したEHEC 0157の家族事例27事例中10事例で1-3本異なる株が分離されており、精度管理株で得られた最低の近似度が94.1%であったことを考え合わせると、関連性を疑わせる結果であった。この菌型は、さかのぼり調査に参加した10施設中7施設の管轄区域で、5月下旬から8月上旬にかけて検出されており、広域で長期間にわたる「流行菌型」であったと推察された。

PFGE 型別法の実施に際して、近畿ブロック11衛生研究所では技術的な施設間差はなく、共通の疫学指標として有用である。食品由来感染症の広域流行に備え、安定して解像度の高いPFGE画像を得られるように、各施設で技術の維持を図るとともに機器類の保守管理も重要である。

6. 中国四国ブロック

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究の一環として、昨年度に引続き、検査施設間におけるPFGE技術の精度管理を行った。精度管理には中・四国地区の地方衛生研究所(地研)9施設が参加し、PFGEタイプの異なる腸管出血性大腸菌

0157:H7(0157)4株を供試菌株として、新しいのプロトコールによるPFGEを実施した。さらに、同一施設における前年度のPFGE画像と比較し、前年度との差異について検討を加えた。また、PFGE以外の新しい分子疫学的方法として、腸管出血性大腸菌0157について、Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)による解析を行いその実用性についての検討を継続した(詳細は該当頁参照)。今回、9施設(A~I施設)において統一方法で作製した0157のPFGE画像の作製を試みた結果、7施設では概ね良好な画像が得られたが、1施設の作成した画像は画像全体が黒くなり、不鮮明であった。これは写真撮影時の技術的な問題によるものと思われる。また、1施設(C施設)では泳動装置が不良であったため画像を得ることができなかった。その他、概ね良好な画像でも分子量の大きい部分と小さい部分にバンドが認識し難い個所が見られた。画像をもとに画像解析ソフトで dendrogram を作成し、各施設間の差異を確認した結果、概ね良好な画像が得られた7施設では、同一菌株は同じクラスターを形成し、その類似度は概ね92~100%であった。集菌方法を異にした場合でも同様な傾向を示し、鮮明な画像が作成できた施設間での差異は小さい値であった。

前年度得られた画像と今年度の画像の比較では、D施設を除く各施設では一部の施設の画像に技術的原因と考えられる若干の差異(A施設の菌株2では差異が82%、F施設の菌株4では差異が87%、H施設の菌株2では差異が89%)が認められたが、概ね類似し

ていた。一方、年度別の画像比較で、供試菌株 3 と供試菌株 4 では菌株の変異（供試菌株 3 ではバンドの欠損、供試菌株 4 ではバンドの追加）と思われる差異が各施設の画像で認められた。

今年度を含め 3 年間の精度管理の結果、各施設間で比較しうる画像が得られ、クラスター解析でも高い類似度が得られているため、中・四国地区の地研では新しいプロトコルによる PFGE 技術が概ね取得されたと考えられる。しかし、各施設の画像の一部に不鮮明な箇所が認められ、クラスター解析で施設間の差異を生ずる原因となった。これは添加菌量の違いによるものと考えられ、適正な菌量に調整することで改善されると思われた。また、写真撮影時の技術的な問題点も見られたため、今後、これらの問題点の改善と更なる PFGE 解析手法の標準化を推進し、各施設の PFGE 技術を向上することが必要と思われた。

7. 九州ブロック

九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、平成 17 年度は ①パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法の研修と精度管理、② *Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討、③レジオネラ属菌の PFGE の精度管理および九州各機関で検出されたレジオネラ属菌の PFGE による比較解析、④A 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の 4 課題について実施した。

①精度管理として安定した PFGE マーカーの泳動を目標とし、2 ステップで行った。その結果から Step 1 で泳動距離など適切な泳動条件の検討を行なうことにより、Step 2 では

良好なゲルイメージを得ることができた。しかし、Step 1 では良好な結果が得られていたが、Step 2 で試薬が変わることによるトラブルが発生した。このようなことはいつでもどこでも発生する要因であり、今後 GLP で実施されているような試薬の保管・管理、機器の点検などについても検討する必要があると考えられた。

② *Campylobacter* の PFGE においては、ホルマリン処理は DNA 変性防止に有効な方法であることが示されたが、一部未処理群 (PBS 処理：なるべく低温で取り扱う) においても良好な結果を得た。また、アルコール処理群においても DNA 変性防止に有効なことが認められたことから、今後もより詳細に菌液処理過程を検討する必要があるものと思われる。

また、今回 plug 充填時の菌液温度による DNA への影響が大きいことから、ゲルとの混和時には菌液温度を 40℃以下に保つことが *Campylobacter* の PFGE においては、Key point と考えられた。

③レジオネラ属菌について標準菌株による PFGE の精度管理、及び各機関分離株についての PFGE 画像相同性比較を実施した。さらに、2005 年のレジオネラ属菌由来別検出状況を参加 10 機関から収集した。PFGE 画像解析においては、3 菌株とも 80%以上の類似性が見られたが、100%一致したのは一部のみであり、その原因の一つとしてラムダラダーをマーカーとして使用していることが考えられたことから、今後ラムダラダーの使用を検討する必要があると考えられた。各機関からの 2005 年レジオネラ属菌検出状況調査表の集計結果から、九州全体で 5 菌種、そのうち

L. pneumophila については11血清型が検出された。循環式浴場から最も多くレジオネラ属菌が検出され、菌種は、*L. pneumophila* SG1~6、8~10、15、*L. dumoffii*であった。また、菌種については、掛け流し式浴場も同様の傾向であったが、冷却塔水では浴槽水で検出されていない *L. pneumophila* SG7、*L. anisa*、*L. spiritensis*が検出され、菌相の違いが示唆された。

④A群溶血レンサ球菌におけるPFGE法の検討と、発赤毒遺伝子型（以下、*spe*型）についても併せて実施した。*Sma* IによるPFGEでは明瞭なバンドが得られたが、熊本市事例由来のT-28型については、*Sfi* Iを併用し比較することにより、より正確な解析が可能となった。T-1型においても*Sfi* Iでよく似たパターンを示したが、*Sma* Iでは異なるパターンを示したことから、A群溶血レンサ球菌のPFGE法には少なくとも2種類の制限酵素を用いて比較することが有用であると考えられた。

また、*speB* 遺伝子のみを保有していたT-1型と *speA, B* 遺伝子を保有していたT-1型のPFGE法における泳動パターンにおいて、*Sfi* Iではよく似たパターンを示し区別できなかったが、*Sma* Iでは異なるパターンとなり、その有用性が示された。

D. 結論

食品由来感染症においても多国間に及ぶ広域流行が発生しており、我が国においても世界的に共通のプロトコールに基づくPFGE解析を一層普及させ、データの相互比較を可能にさせる必要がある。国内のシステムを充実させるための一手段として解析方法の技

術的な精度管理が重要であるとともに、情報共有のための手段としてInternet利用の情報還元システムも推進すべきと考えられた。PFGE解析のネットワークの中核となる全国の地研が解析技術を維持し改良できるような組織的支援システムが求められている。

E. 発表業績

1. 誌上発表

1) 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. Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A Streptococcus isolates of T serotypes 4 and 11. Int. J. Antimicrob. Ag. 25:142-147, 2005.

2) 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

3) Hirose, K., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., Arakawa, E., Takai, N., and Watanabe, H. Antimicrobial susceptibility of *Shigella sonnei* isolates in Japan and molecular analysis of *S. sonnei* isolates

- with reduced susceptibility to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 1203-1205, 2005
- 4) Matsumoto M, Suzuki Y, Nagano H, Yatsuyanagi J, Kurosawa H, Kobayashi K, Yamaoka K, Horikawa K, Kudaka J, Terajima J, Watanabe H, Miyazaki Y. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis analysis performed at selected prefectural institutes of public health for use in PulseNet Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2005 Jun;58(3):180-3.
- 5) Matsumoto M, Sakae K, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Endo M, Okuno R, Murayama S, Hirasawa K, Suzuki R, Isobe J, Tanaka D, Katsukawa C, Tamaru A, Tomita M, Ogata K, Yasuoka T, Ikebe T, Watanabe H and The Working Group for Group A Streptococci in Japan and Ohta M. Close correlation of Streptococcal DNase B (*sdaB*) alleles with *emm* genotypes in *Streptococcus pyogenes*. *Microbiol Immunol.* 2005; 49, 925-929.
- 6) Iyoda S, and Watanabe H. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 187(12): 4086-4094, 2005.
- 7) Toma C, Higa N, Iyoda S, Rivas M, and Iwanaga M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Res. Microbiol.* in press, 2006.
- 8) Izumiya H, Mori K, Higashide M, Tamura K, Takai N, Hirose K, Terajima J, Watanabe H. Identification of CTX-M-14 {beta}-lactamase in a *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolate from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jun;49(6):2568-70.
- 9) Hiramatsu R, Matsumoto M, Sakae K, Miyazaki Y. Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. To Survive in a Desiccation Model System and in Dry Foods. *Appl Environ Microbiol.* 2005 71:6657-63.
- 10) Okura M, Osawa R, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3533-6.
- 11) 高原賢守、伊豫田淳、浅田順子、水本洋、上松あゆ美、羽田敦子、渡辺治雄、田村和満、秦大資。「腸管出血性大腸菌 O177:HNM による溶血性尿毒症症候群の 1 例」日本小児科学雑誌 109(1): 54-57, 2005.
- 12) 甲斐明美、横山敬子、高橋正樹：食を介する感染症、カンピロバクター 化学療法の領域 21、529-536 2005
- 13) 広瀬健二、寺嶋 淳、渡辺治雄：食を介する感染症、食を介する赤痢・腸チフス、化学療法の領域 21、523-528, 2005
- 14) 泉谷秀昌、田村和満、渡辺治雄：食を介する感染症、サルモネラ、化学療法の領域 21、509-515, 2005
- 15) 寺嶋 淳 泉谷秀昌 伊豫田 淳 三戸