

表1 北海道日高支庁で発生した集団 O157 症事件で便より検出された腸管出血性大腸菌 O157

性別	年齢	分類	症状	初発月日	VT 産生	PFGE	備考
女	93	入所者	+	6/21	1&2	Ia	
女	77	入所者	+	6/22	1&2	I	
女	86	入所者	+	6/22	1&2	I	死亡、発症後 5 日
女	94	入所者	+	6/22	1&2	I	死亡、発症後 4 日
女	81	入所者	+	6/22	1&2	I	
女	82	入所者	+	6/23	1&2	I	
女	86	入所者	+	6/23	1&2	I	死亡、発症後 9 日
女	91	入所者	+	6/23	1&2	I	死亡、発症後 3 日
男	78	入所者	+	6/23	1&2	I	
男	95	入所者	+	6/23	1&2	I	
女	85	入所者	+	6/23	1&2	I	
男	87	入所者	+	6/23	1&2	I	
男	79	入所者	+	6/23	1&2	I	
男	72	職員	+	6/23	1&2	I	
女	87	入所者	+	6/24	1&2	I	
女	97	入所者	+	6/24	1&2	I	
男	79	入所者	+	6/24	1&2	I	
女	93	入所者	+	6/24	1&2	I	
女	91	入所者	+	6/24	1&2	I	
女	85	入所者	+	6/24	1&2	I	
女	79	入所者	+	6/24	1&2	I	
女	85	入所者	+	6/25	1&2	I	
女	56	職員家族	+	6/25	1&2	I	夫婦
男	56	職員家族	-		1&2	I	
女	87	入所者	+	6/26	1&2	I	
女	84	入所者	+	6/27	1&2	I	
女	88	入所者	+	7/3	1&2	I	
男	94	入所者	-		1&2	I	
女	79	入所者	-		1&2	I	
女	93	入所者	-		1&2	I	
女	82	入所者	-		1&2	I	
女	79	入所者	-		1&2	I	
女	84	入所者	-		1&2	I	
女	78	入所者	-		1&2	I	
女	91	入所者	-		1&2	I	
女	83	入所者	-		1&2, 1	I, Ib	Ib は VT1 のみ産生
男	44	職員	-		1&2	I	
女	55	職員	-		1&2	I	
女	47	職員	-		1&2	I	
女	46	職員	-		1&2	I	
女	44	職員	-		1&2	I	
女	31	職員	-		1&2	Ia	

研究課題名「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」

分担研究報告書

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, 尾畑浩魅	東京都健康安全研究センター

研究要旨：関東甲信静に分散する11地方衛生研究所（地研）において、腸管出血性大腸菌O157を中心に細菌学的疫学指標としてのPFGE法による解析技術の向上、均一化、特に解析ソフトで解析できるPFGE解析結果を得るための検討を行った。すなわち，“New protocol”に従って薄型のDNAブロックを作製し、*S. Braenderup* を分子量マーカーとして、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行った結果、非常に鮮明なPFGE像が得られ、その後の解析ソフトを利用したデンドログラム作成に非常に有利であった。

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株5株を、11地研でほぼ同一の条件下でPFGE解析を行い、その成績を東京都健康安全研究センターに電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた結果、78.2kb以上のDNAバンドを対象にしてデンドログラムを作成した場合、どの施設でPFGEを行った場合も同一株は92%以上の類似性が得られた。

また、腸管出血性大腸菌およびサルモネラのPFGE解析成績を疫学調査に応用した結果、有効な情報が得られ、多数の事例で実際に行政に有効に活用された。

A. 研究目的

PFGE法を用いた病原菌の遺伝子解析情報を共有するためのネットワーク構築を目的として、これまで腸管出血性大腸菌

(EHEC)O157を中心にPFGE解析、およびその成績のデータベース化を試みている。その根幹の役割を担う各地方衛生研究所におけるPFGE解析技術は、導入当時

べ格段に上達したが、その画像を解析ソフトで処理するには、まだ問題点が残されている。例えば、各地研で行われる泳動像が常に鮮明ではないため、その後の解析を困難にしていることや、担当者の異動により、PFGE解析技術のレベルを常に一定に保つことが困難なことである。どの施設でも同じレベルのPFGE画像を得るためには、ある程度共通した方法で実施することが必要であることから、本研究班では、米国CDC法に準じたPFGE法として「感染研New protocol」を使うこととした。そこで、関東甲信静地域に分散する11地研において、New protocolによるPFGE解析を行い、画像を東京都健康安全センターに送付、解析ソフトを用いた解析を実施し、問題点を洗い出し検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

1) PFGE解析用共通菌株

各地研でPFGE解析をするための共通菌株として、腸管出血性大腸菌O157:H7 (VT1+VT2産生株：4株 および VT2産生株：1株) 5株を供試した。

2) 散発または集団下痢症事例由来株

EHEC 株：各地研毎に、平成17年度に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例で分離されたEHEC O157 またはO26 株を供試した。

Salmonella 株：各地研毎に、平成17年度に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例由来の*Salmonella* serovar Enteritidis(SE)株またはその他の血清型の分離株を供試した。

2. 感染研 New protocol によるPFGE解析

感染研 New protocol に準拠し、以下のとおり条件を統一して検討した。

1) アガロースブロックの作製

PFGE用DNAブロックの作製は、0.7mmプラグキャストを使用し、SeaKem Gold Agarose（最終濃度0.5%）で作製した。供試菌の調製および濃度は、各施設の方法で行った。

2) DNA抽出法

DNA抽出時にLysozyme処理は行わず、溶菌は、1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0)で、50℃, 18~20時間、行った。

3) PFGE法による解析

作製したDNAブロックは、EHECでは、制限酵素*Xba* Iで、サルモネラでは制限酵素*Xba* Iおよび*bln* Iで処理(37℃, 4時間)した後、PFGE解析を行った。電気泳動用 agaroseには、SeaKem Gold Agaroseを使用した。電気泳動は、EHECでは、6V/cm, 2.2~54.2sec, 20時間、サルモネラでは6V/cm, 2.2~63.8sec, 20時間で行った。泳動温度は12℃とした。但し、泳動時間は、泳動した時のDNAバンドの最先端がゲルの下から1cm ~ 1.5cmになるように各施設で調整することとした。

DNAサイズマーカーとしては、*Salmonella* Braenderup H9812 株を使用し、泳動するゲルの両端と中央のレーンに入れた。

3. PFGE解析成績の電送

各地研で解析したPFGE画像を、tif(または jpeg)ファイルとして、電子メールで送付した。

4. 画像解析

画像解析ソフトFingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いて解析を試みた。

5. 腸管出血性大腸菌食集団事例および散発事例へのPFGE解析の応用

各地研で経験した腸管出血性大腸菌食集団事例および散発事例から分離された菌株についてPFGE解析を行い有用性を検討した。

6. サルモネラ食中毒事例へのPFGE解析の応用

各地研で経験したサルモネラによる感染症および食中毒事例から分離された菌株についてPFGE解析を行い有用性を検討した。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた各施設におけるPFGE解析

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)で行ったPFGE像を写真1に示した。0.7mmキャスト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。

2. 共通菌株の各施設で行ったPFGE解析結果に基づくデンドログラム解析

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株5株を、11施設で行ったPFGE像(写真1)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成績を図1および図2に示した。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。このため、No.2の株が2つのクラスターに分かれる結果となった(図1)。

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(図2)。

3. PFGE像の写真の取り込み方法

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。

4. 腸管出血性大腸菌O157分離株のデンドログラム解析

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。

5. 腸管出血性大腸菌のPFGE解析の応用

10地研で経験した腸管出血性大腸菌による感染症および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の比較が可能となり、実際に行政対応に使われた例も多い。

6. 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 に比較すると、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。

D. 考察

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を各研究所でほぼ同一の条件下でPFGE解析を行い、その成績を東京都健康安全研究センターに電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた。本年度は、DNAブロックプラグ作製法の改良、分子量マーカーとして*S. Braenderup* を用い、マーカー

の入れ方（ゲルの両端と真中のウエルに入れる）の統一を図る等の標準化を進めたことにより、解析のためのデータの質が非常に向上した。その結果、PFGE画像上の78.2kb以上のDNAバンドを対象に作成したデンドログラムでは、どの施設でPFGEを行った場合も、92%以上の類似性が得られ、パルスネットを構築するための基盤ができた事が確認された。

また、各研究所は、いずれも実際に発生した集団および散発の感染症・食中毒事例について、独自にPFGE法による解析を実施し、非常に有効であった事例を多数経験し、行政に活用することが出来た。また、PFGE解析技術も進歩し、パルスネット構築のための環境整備が図られてきた。

サルモネラ血清型Enteritidis の解析にPFGE解析を応用することについては、さらに検討する必要性が示唆された。

E. 結論

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を各研究所でNew protocolに従い、ほぼ同一の条件下でPFGE解析を行い、その成績を東京都健康安全研究センターに電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた結果、同一菌株は、11施設どこでPFGE解析を行った場合でも92%の類似性が得られるに至った。

サルモネラの解析にPFGE解析を応用することを検討した結果、ある程度は有効であるが、EHEC 0157 に比較すると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。

F. 研究発表

門間千枝, 小西典子, 尾畑浩魅, 下島優香子, 柴田幹良, 藤川 浩, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖: 死亡例が確認された高齢者施設の腸管出血性大腸菌0157集団感染—東京, 病原微生物検出情報 (国立感染症研究所) 26(6), 144, 2005.

大塚佳代子, 倉園貴至, 柳川敬子, 工藤由起子, 高鳥浩介: 食品および人における *Salmonella* Senftenberg と Weltevreden の分布と細菌学的解析, 第26日本食品微生物学会総会 (2005, 11, 金沢) .

横山栄二, 内村眞佐子: Variable numbers of tandem repeat typing による腸管出血性大腸菌0157の型別, 第26日本食品微生物学会総会 (2005, 11, 金沢) .

依田清江, 横山栄二, 内村眞佐子: 制限酵素double-digestion法を用いたパルスフィールド電気泳動(PFGE)法による *Campylobacter jejuni* 集団食中毒の疫学的解析, 第79日本感染症学会総会 (2005, 3, 名古屋)

川森文彦, 原田哲也, 廣井みどり, 柏木美智子, 大畑克彦, 杉山寛治, 増田高志: Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別による腸管出血性大腸菌0157の分子疫学的解析, 地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会 第18日総会・研究会 (2006, 2, 長野) .

G. 知的所有権の取得状況

な し

写真1

共通菌株(O157)5株の各施設における PFGE画像

〈 供試菌株 〉

腸管出血性大腸菌O157

No.1 E05674 (VT1+VT2)

No.2 E05660 (VT1+VT2)

No.3 E05677 (VT1+VT2)

No.4 E05670 (VT1+VT2)

No.5 E05470 (VT2)

DNAサイズマーカー

S.braenderup H9812

〈 電気泳動条件 〉

6V/cm 2.2sec~54.2sec

20時間前後

Buffer温度 12°C

〈 PFGE画像 〉

(写真左端) レーン1 マーカー

2 菌株 No.1

3 菌株 No.2

4 菌株 No.3

5 菌株 No.4

6 菌株 No.5

7 マーカー

8 菌株 No.1

9 菌株 No.2

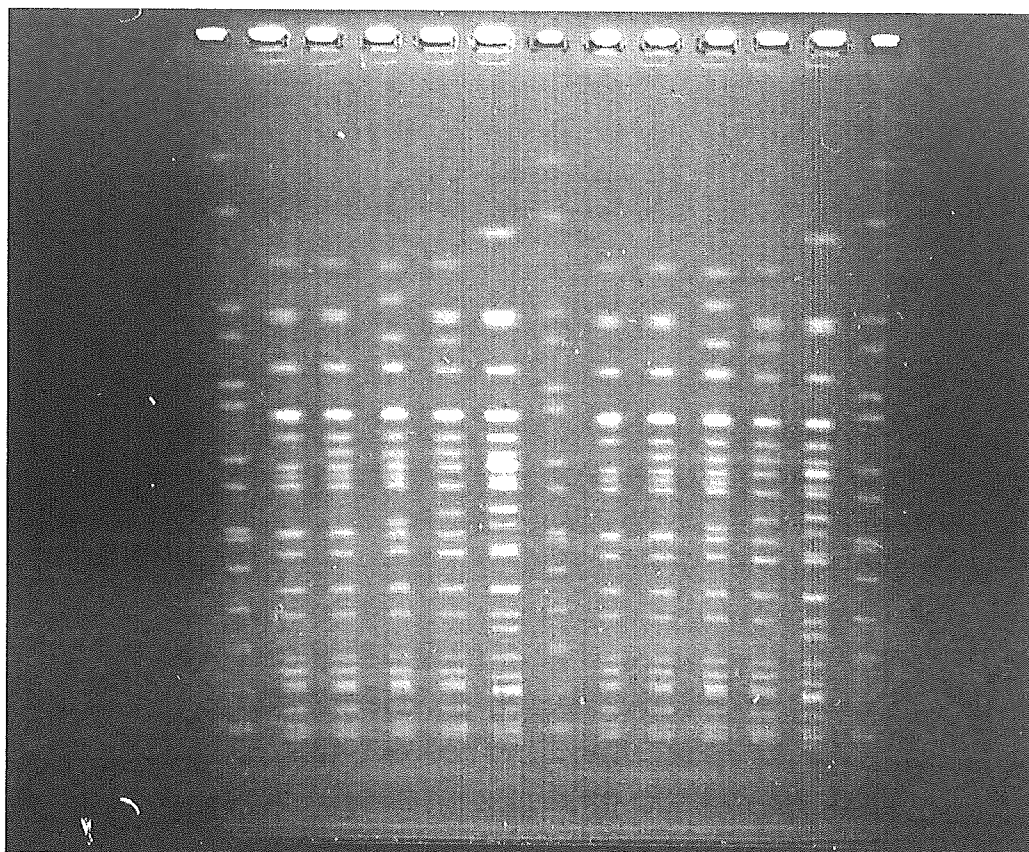
10 菌株 No.3

11 菌株 No.4

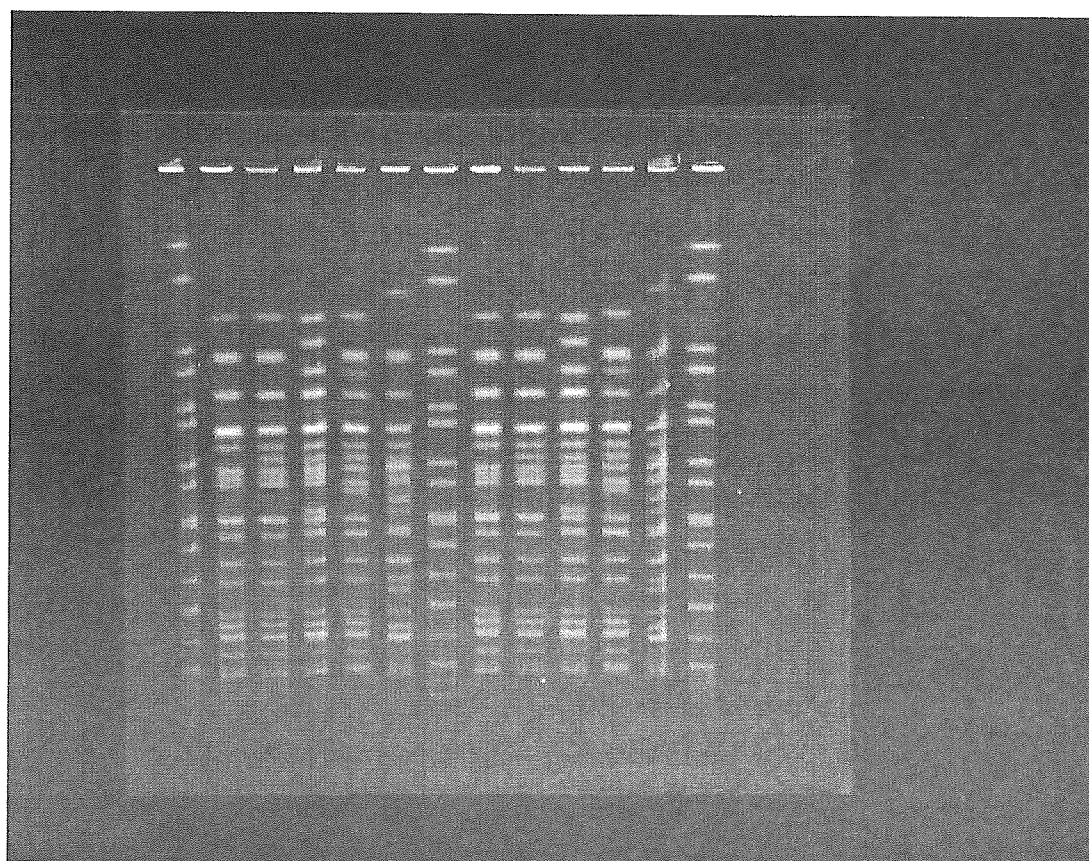
12 菌株 No.5

(写真右端) 13 マーカー

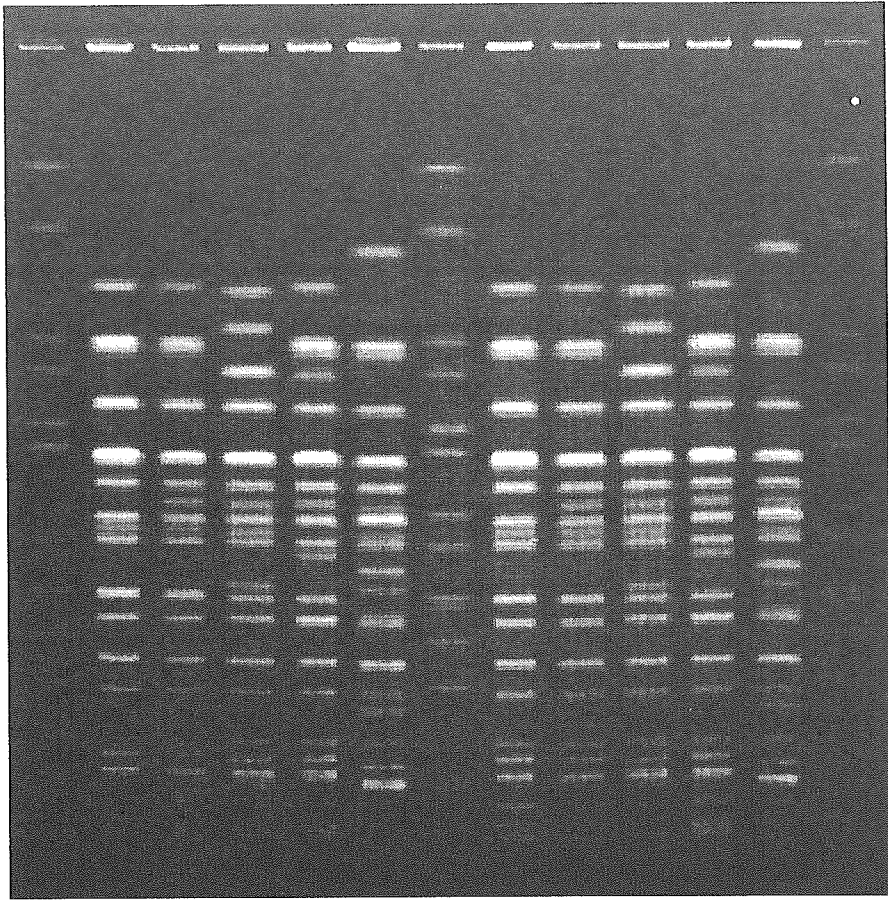
施設1



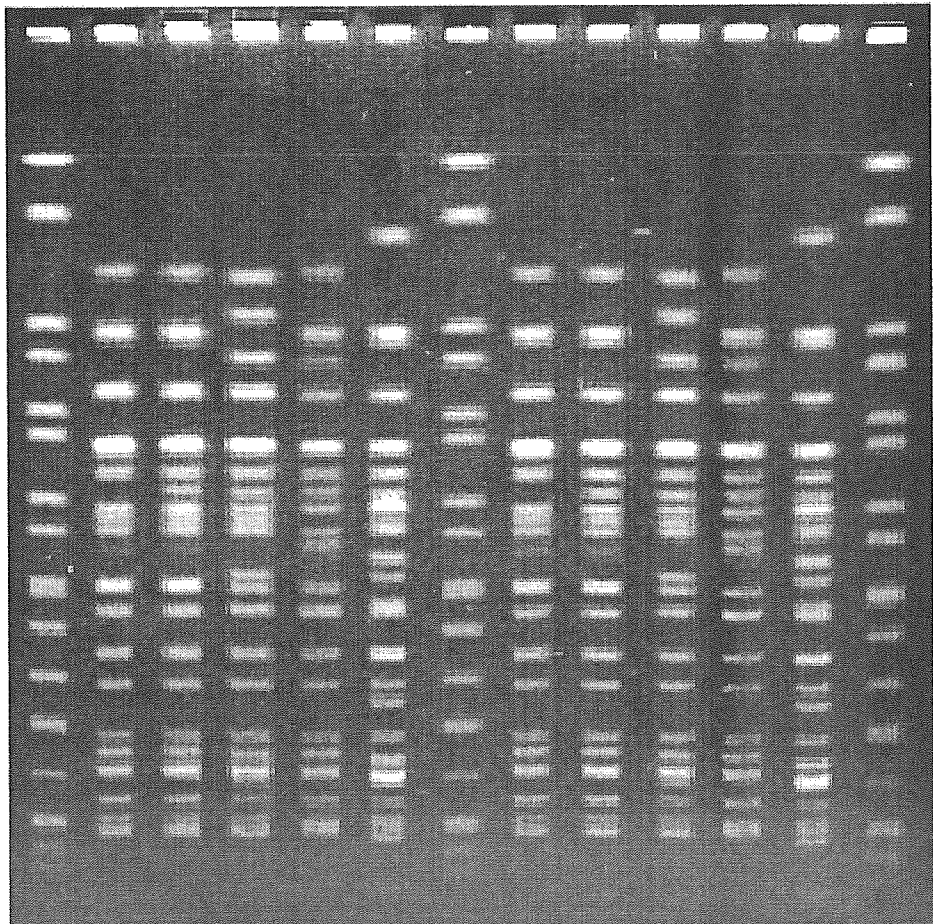
施設2



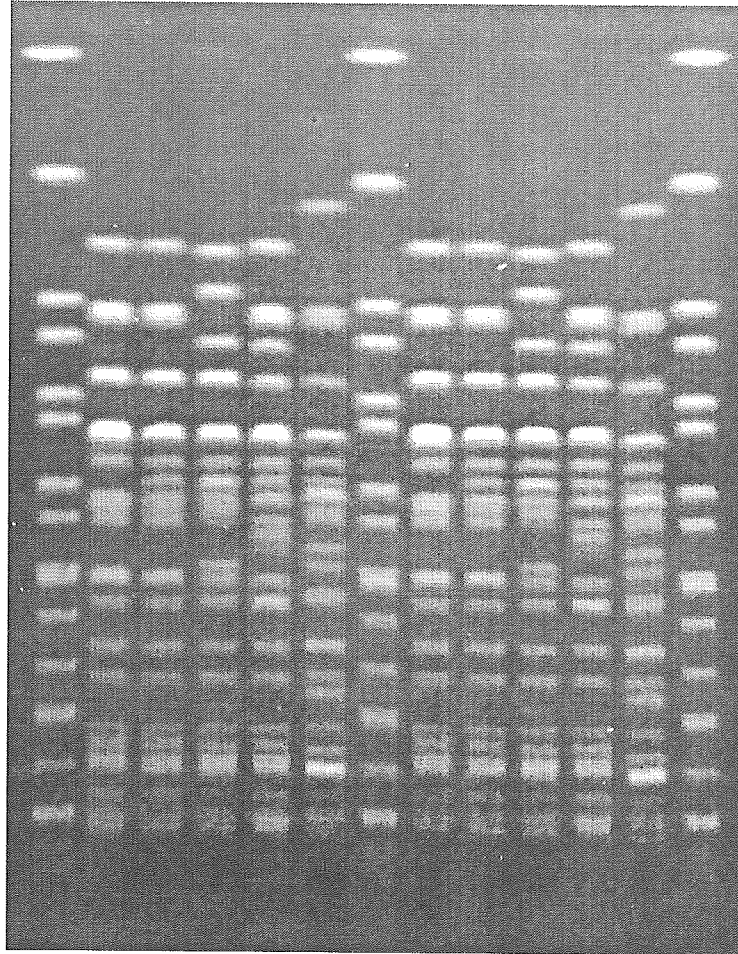
施設3



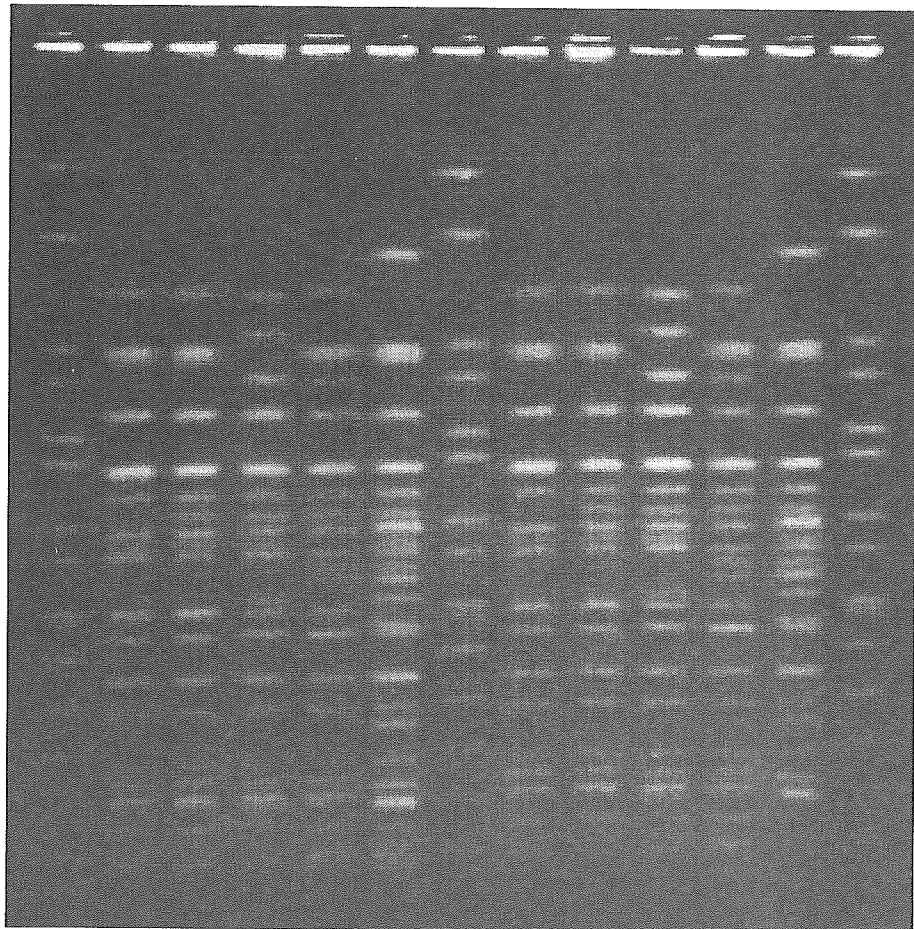
施設4



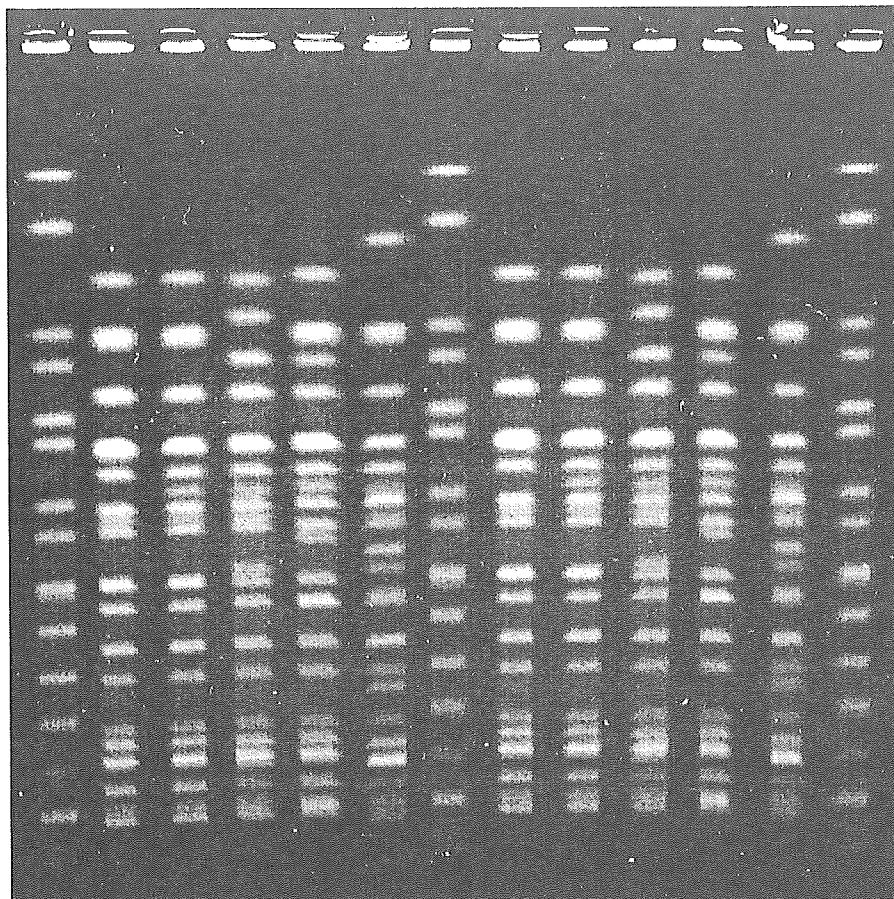
施設5



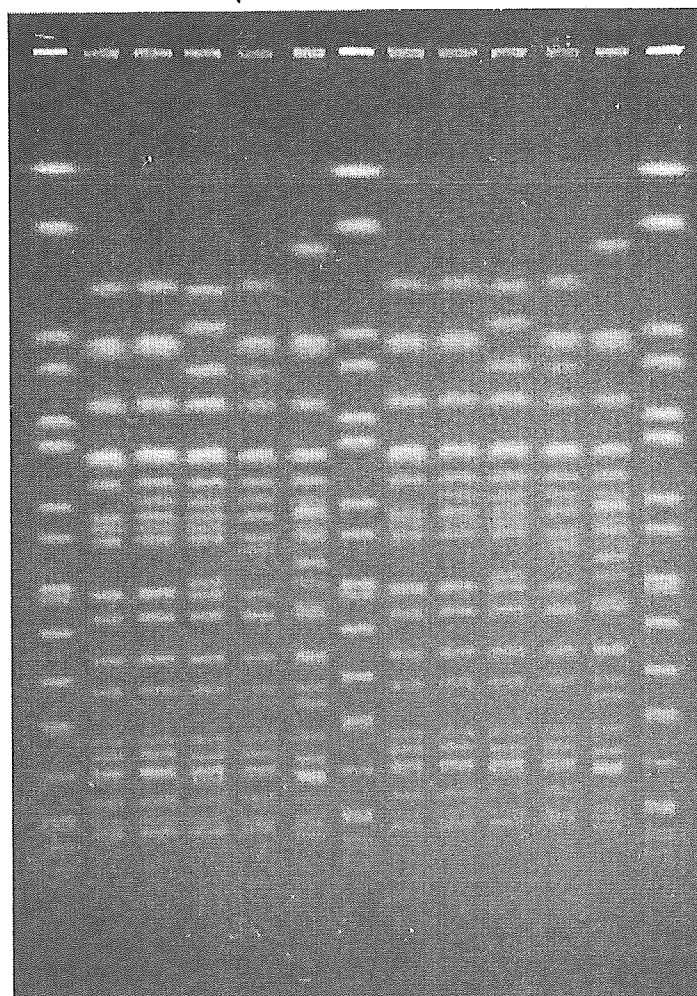
施設6



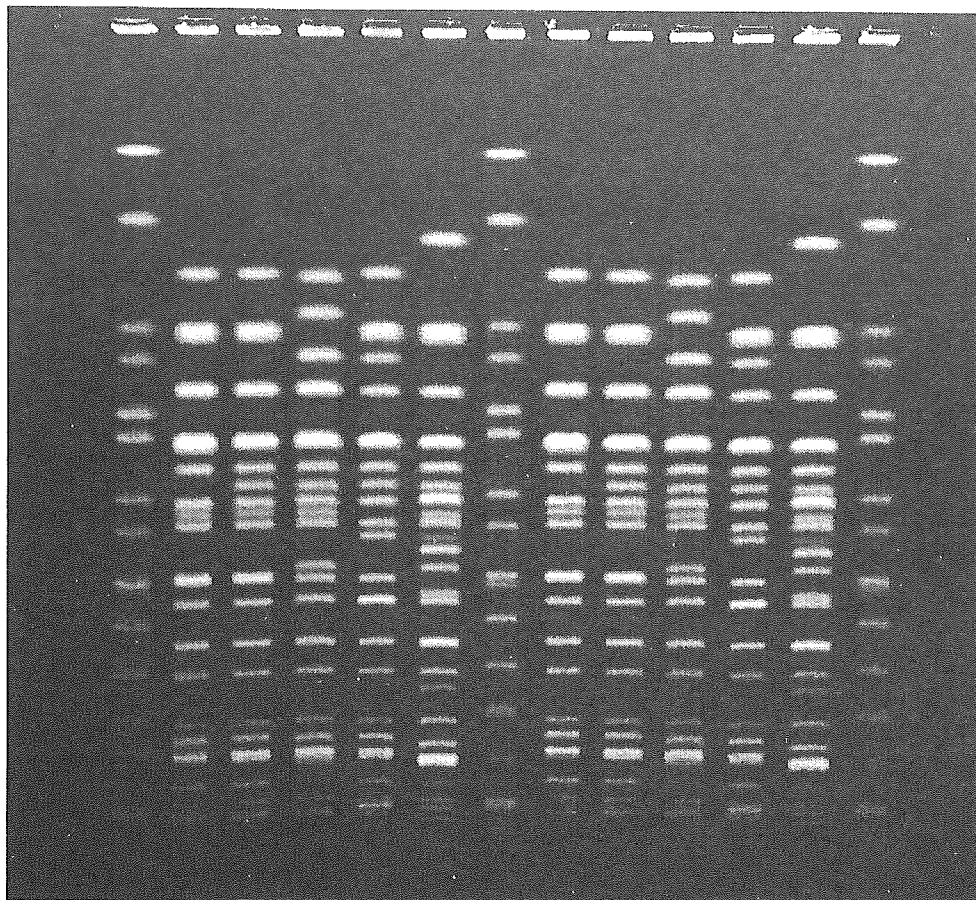
施設7



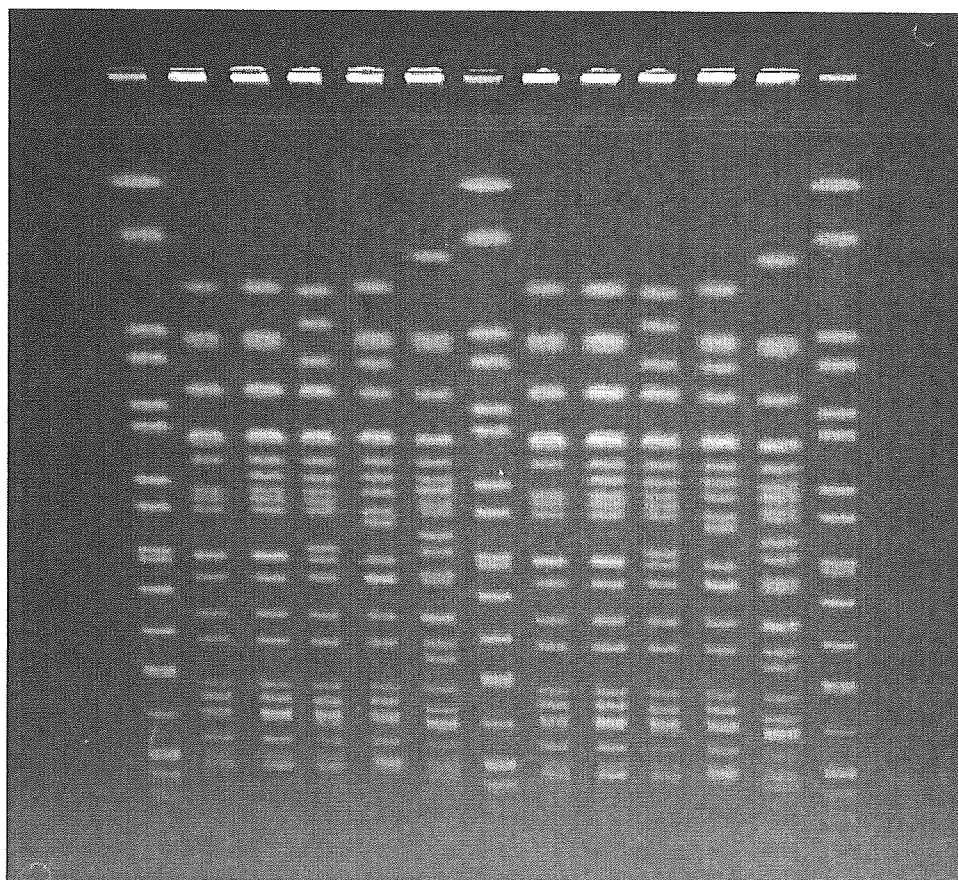
施設8



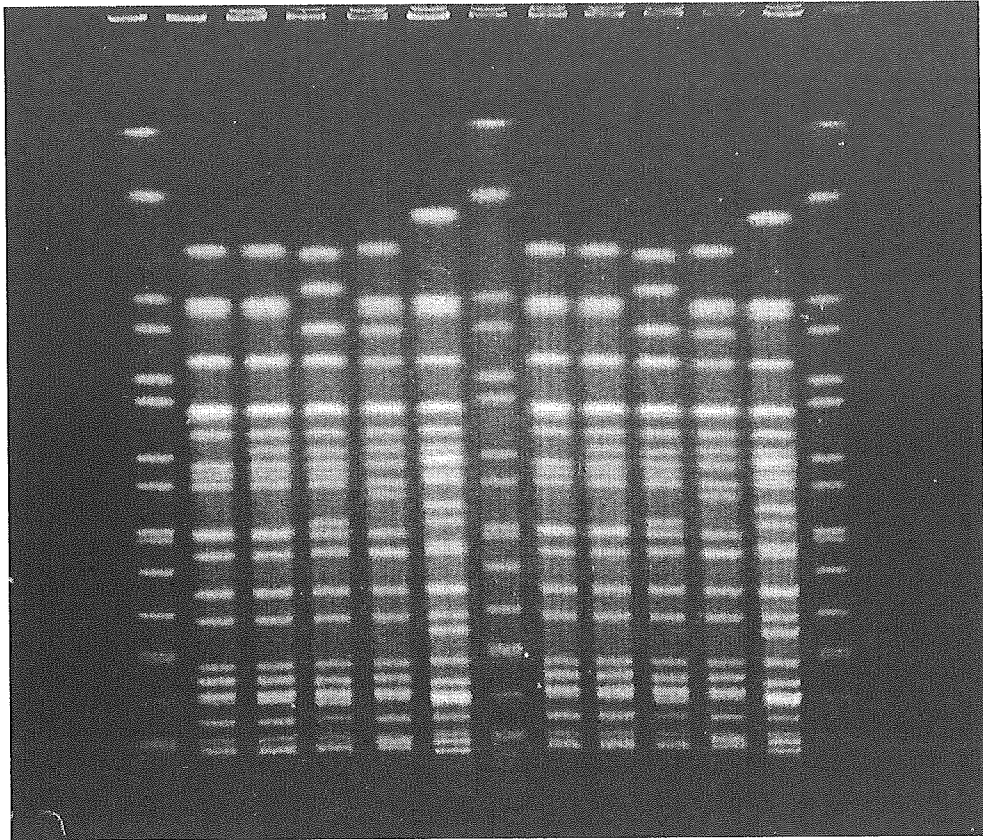
施設9



施設10



施設11



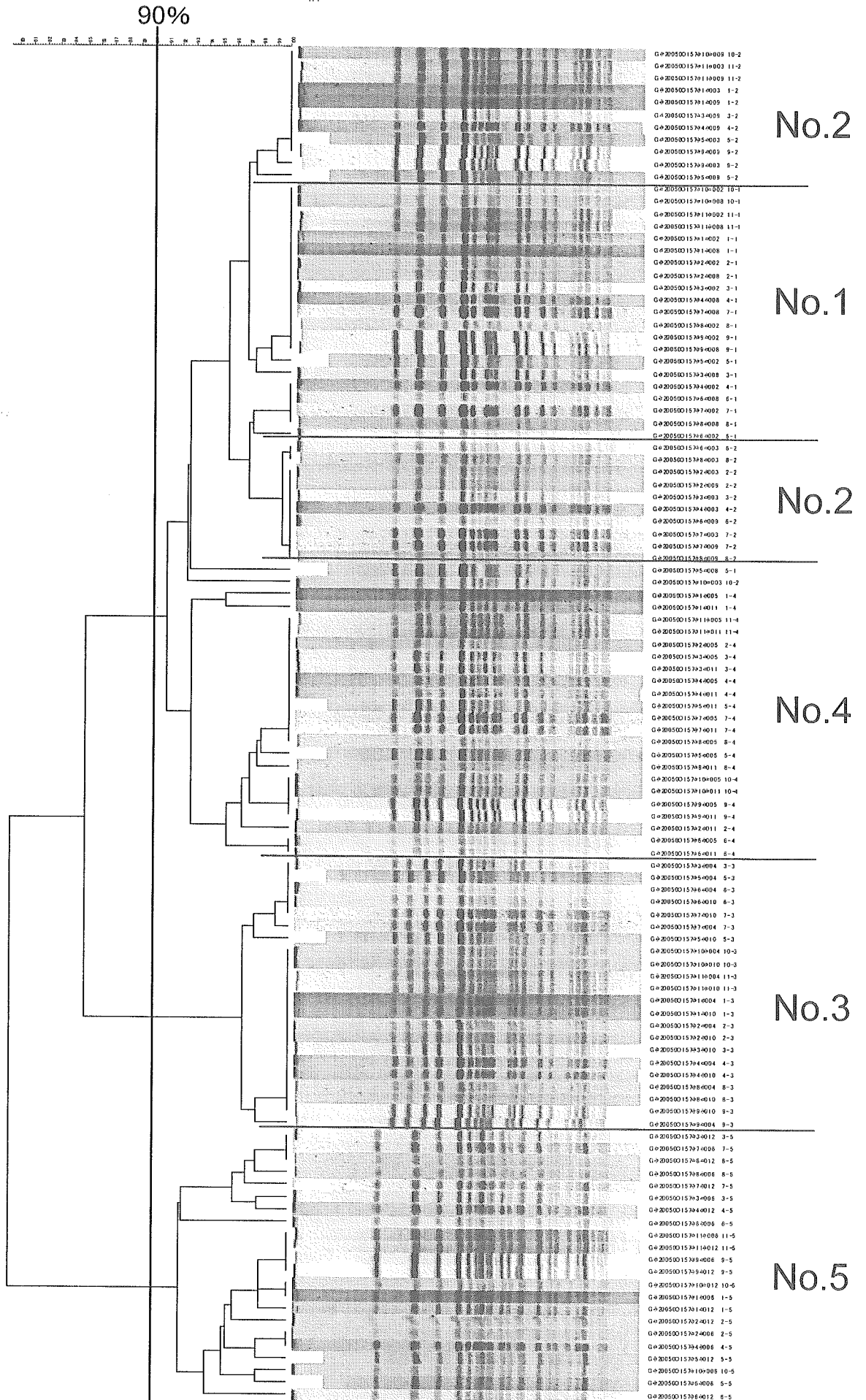


図1. 11施設で実施した共通菌株(5株)のデンドログラム
(全バンド対象)

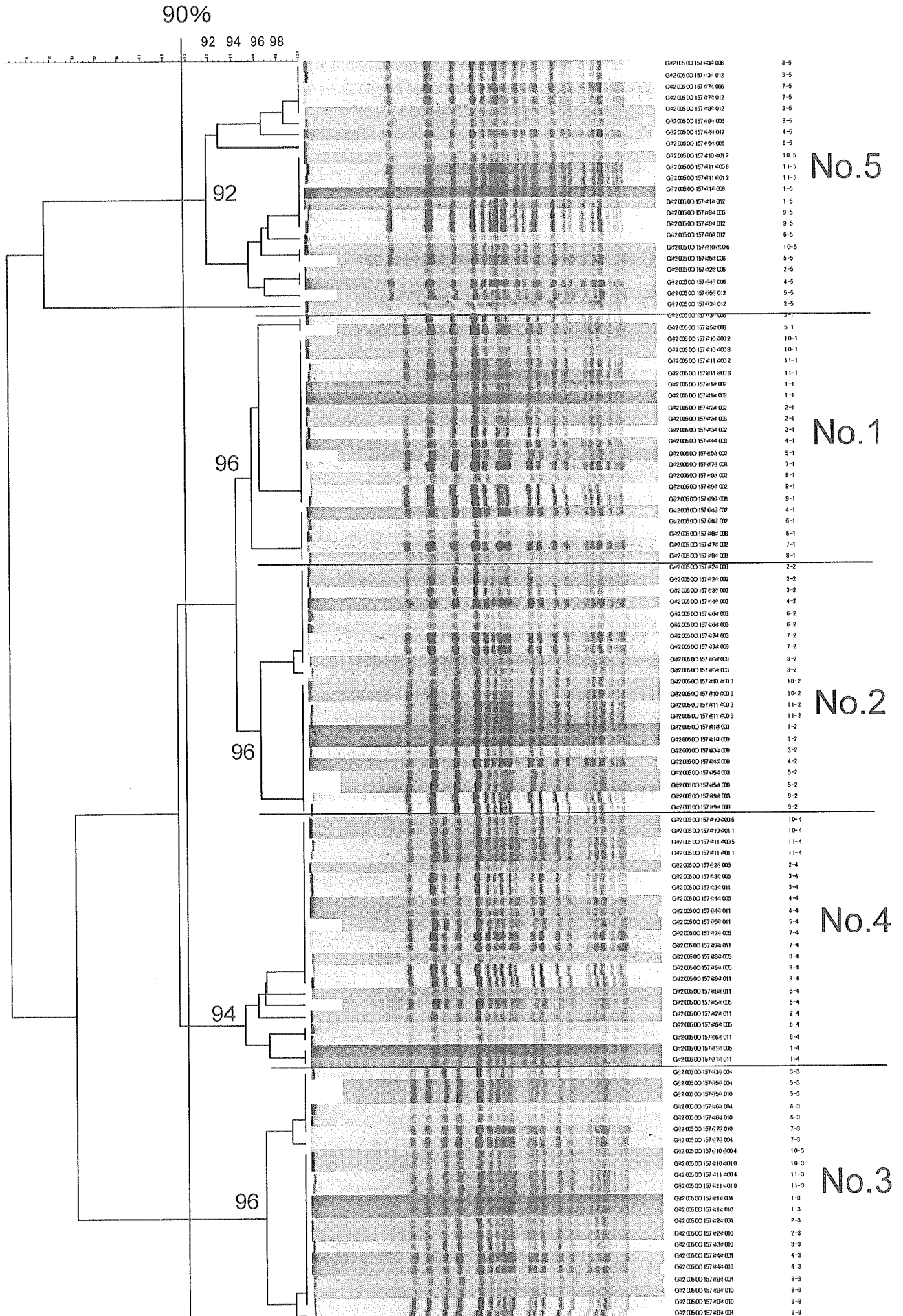


図2. 11施設で実施した共通菌株(5株)のデンドログラム (78.2Kb以上対象)

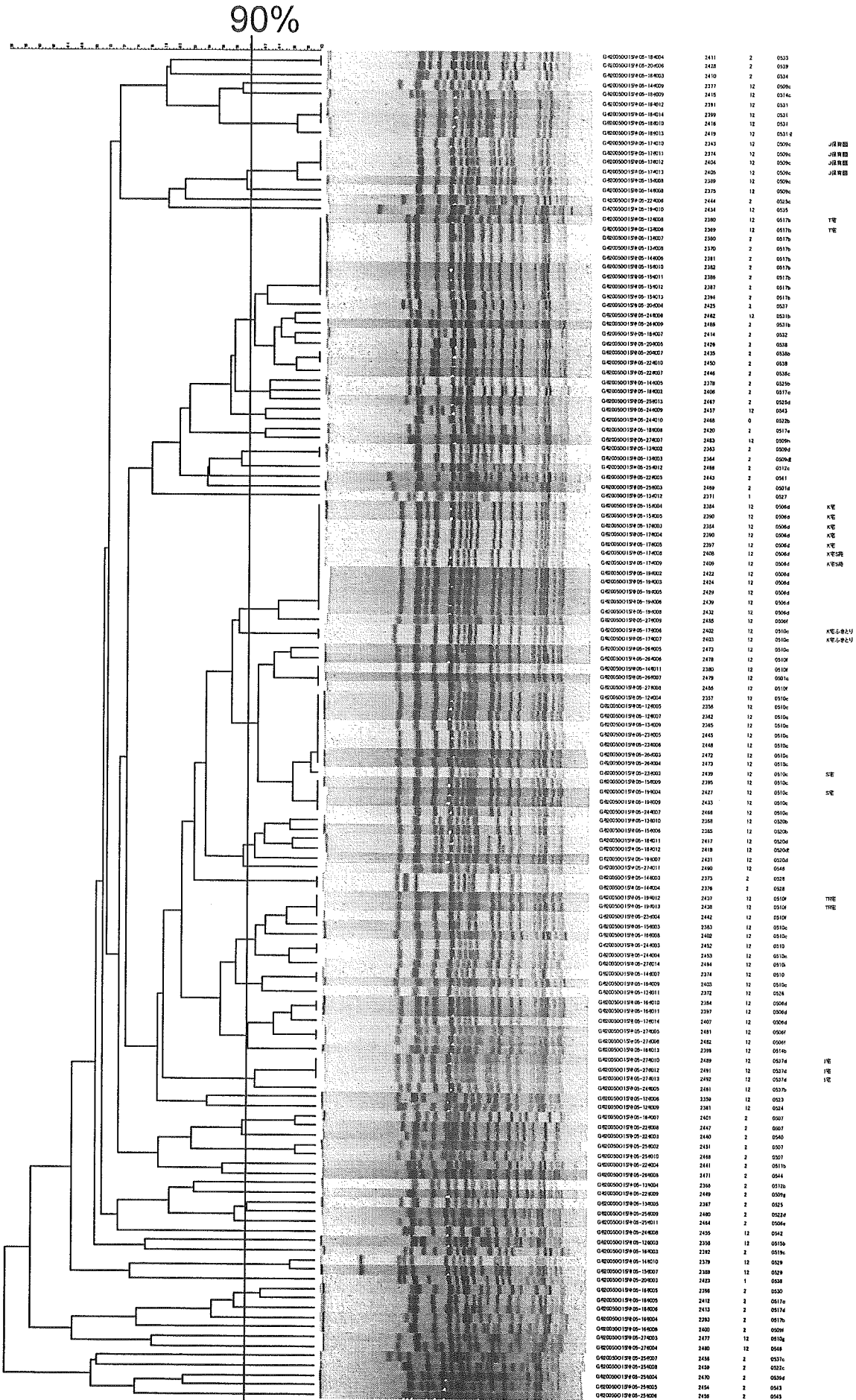
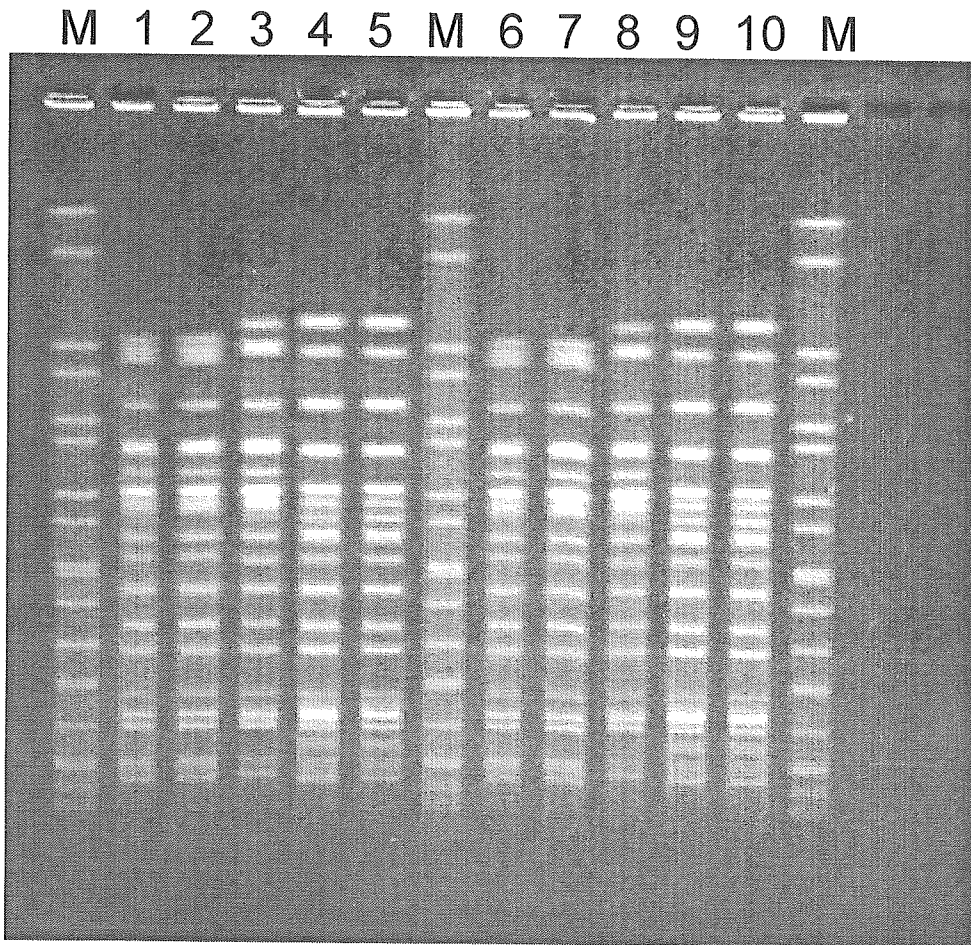


図3. 2005年8~9月に東京都内で分離されたO157株のデンドログラム

腸管出血性大腸菌O157集団事例および散発事例へのPFGE解析の応用例

1. 栃木県で分離されたO157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O157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O157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O157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 O157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 O157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 O157: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O157のPFGEパターン(長野県環境保全研究所)
10. 静岡県分離株(O157: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O157事例(東京都健康安全研究センター)

栃木県保健環境センター

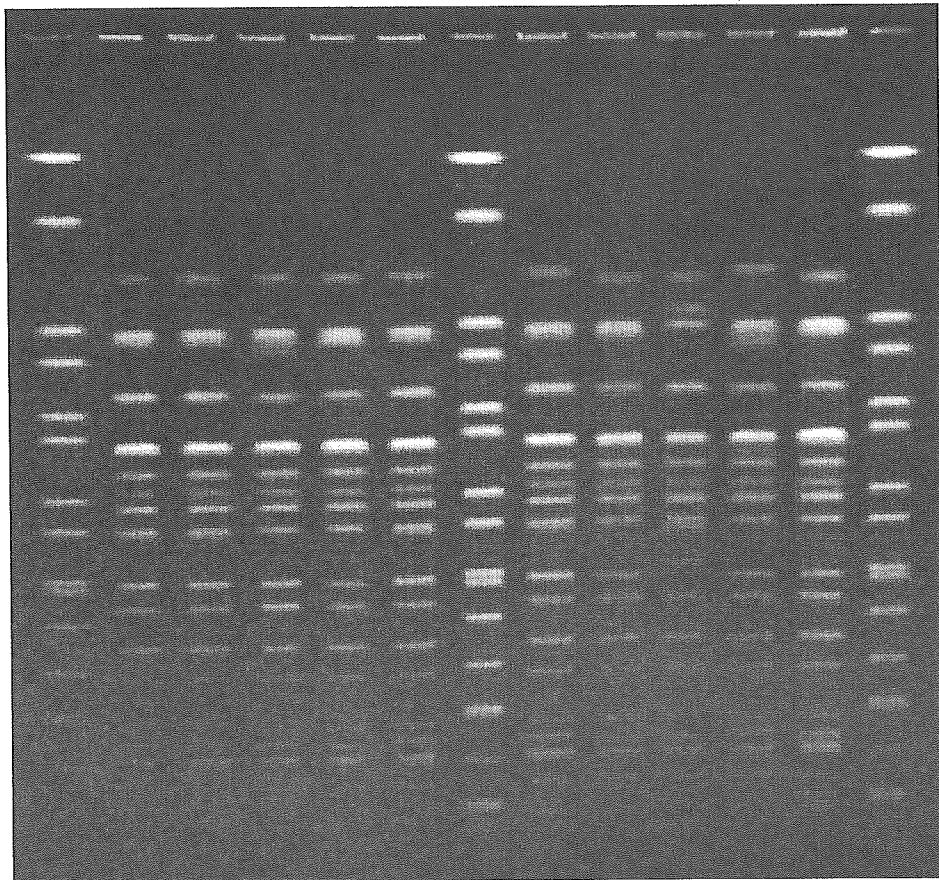


レーン1: マーカー
2 }
3 } O157(VT2)
4 }
5 }
6 }
7: マーカー
8 }
9 } O157(VT2)
10 }
11 }
12 }
13: マーカー

栃木県で分離されたO157散発事例由来株のPFGEパターン

群馬県衛生環境研究所

M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M



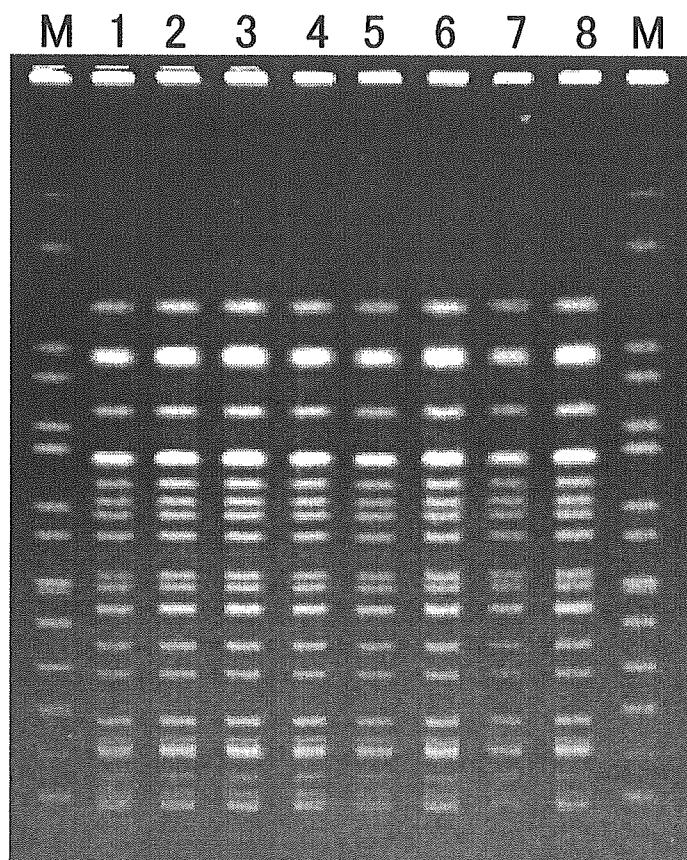
(制限酵素 *Xba* I)

M: Marker (S. Braenderup H 9812株)

- 1: 散発例由来株 (VT1 & VT2) 2: 散発例由来株 (VT1 & VT2)
3: 散発例由来株 (VT1 & VT2) 4: 散発例由来株 (VT1 & VT2)
5: 散発例由来株 (VT1 & VT2) 6: 散発例由来株 (VT1 & VT2)
7: 散発例由来株 (VT1 & VT2) 8: 散発例由来株 (VT1 & VT2)
9: 散発例由来株 (VT1 & VT2) 10: 散発例由来株 (VT1 & VT2)
(5及び6は同一事例; 家族内)

2005年6月から8月にかけて群馬県内の散発例から分離されたO157株のPFGE画像を示した。同一のパターンを示す株も存在し、かなり近縁な株による広域的な汚染のあったことが推定される。

埼玉県衛生研究所（集団事例）



レーンNo.	菌株No.	性	年齢	発症日
1	EC05017	男	6	5月26日
2	EC05021	男	5	5月24日
3	EC05022	女	30	なし(患者母親)
4	EC05016	女	6	5月24日
5	EC05020	女	14	5月28日
6	EC05018	男	34	5月26日
7	EC05019	女	4	5月28日
8	EC05028	女	36	なし(患者母親)

埼玉県内において、STEC O157:H7(VT1&2)分離患者が5月下旬から6月下旬にかけて急増し、東京都や神奈川県でも同型菌による発生が見られた。分離株のPFGEパターンを比較したところ、全て一致していたため、さらなる疫学調査を実施した。その結果患者の多くがレバ刺しを喫食し、その流通元がS市内にある内臓卸であること、加熱用として卸されていたレバーが販売店で生食用として販売されていたこと等が判明した。そこで内臓卸および関連施設の清浄化を進めるとともに、県内食肉販売店等に一斉立ち入り調査を実施し、適正な販売がなされるよう指導した。