

図3 B解析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

□ は家族事例由来

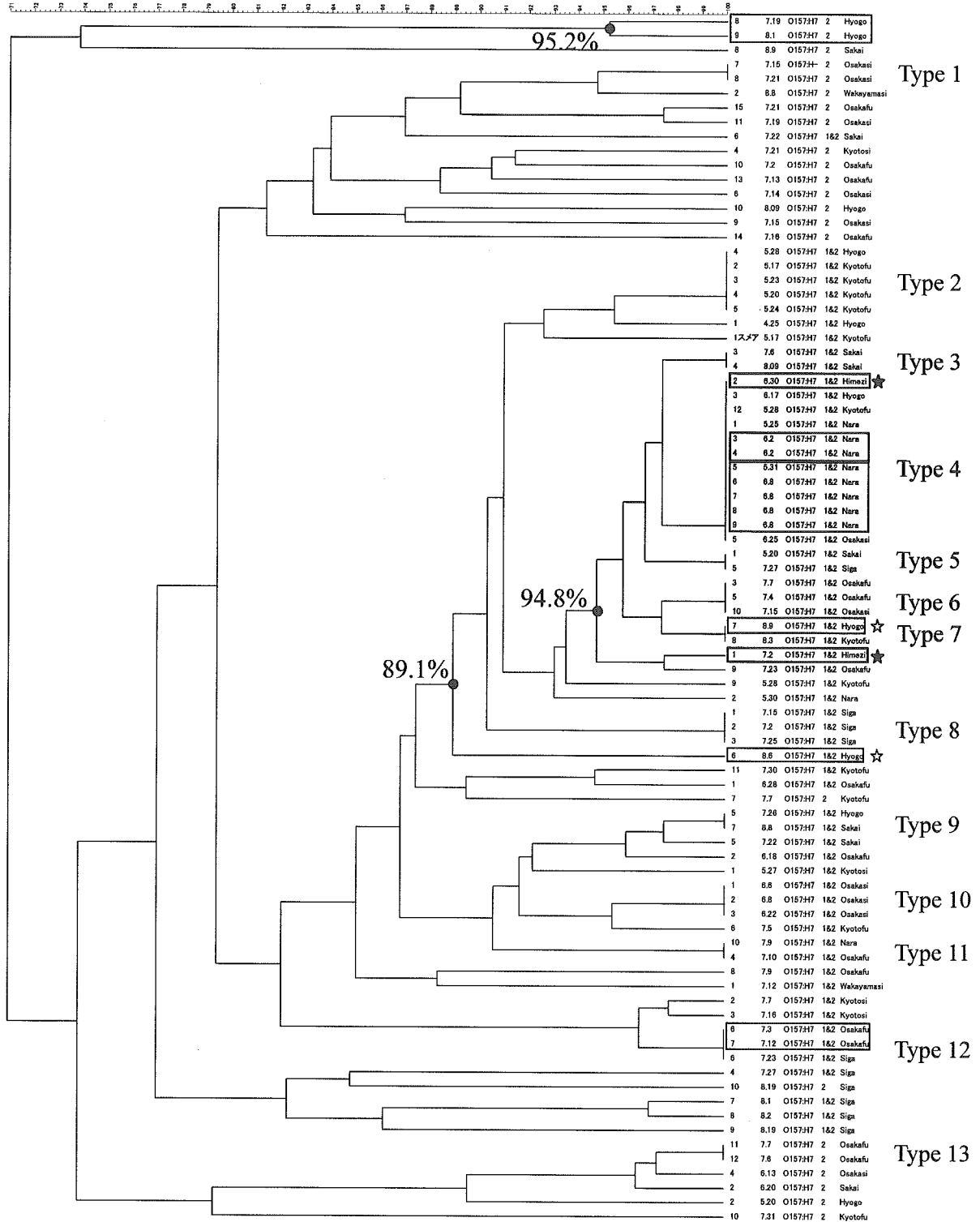


図4 2005年5月～8月に近畿ブロックで分離されたEHEC O157のデンドログラム

厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
平成 17 年度分担研究報告書

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

| | | | |
|-------|------|---------------|-------|
| 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

2005 年 10 月下旬、兵庫県下で腸炎ビブリオ O3:K6 による食中毒が発生した。これらの事例から分離された腸炎ビブリオ 6 株を用いて PFGE による菌型解析を行った。その結果、全ての株が同一のパターンを示した。

A. 研究目的

2005 年 10 月に兵庫県下で腸炎ビブリオによる集団食中毒が発生した。健康福祉事務所の喫食調査により、デパートの物産展の寿司が原因食品として疑われ、患者及び保存食のイカソーメンから腸炎ビブリオ O3:K6 が検出された。患者由来株および食品由来株の関連性を調べるためパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

1. 菌株

患者由来株 5 株、食品(イカソーメン)由来株 1 株の合計 6 株の腸炎ビブリオを試験に供した。

2. PCR

病原遺伝子である *tdh* および *trh* の検出には Tada ら¹⁾ のプライマーを、*toxR* の検出には Kim ら²⁾ のプライマーを使用した。また、GS-PCR を Matsumoto ら³⁾ のプライマーを使用して実施した。

3. PFGE

PFGE New Protocol-Kinki に従ってプラグを作成した。プラグは *AscI*、*NotI* 及び *SfiI* で切断後、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 4.0-8.0 秒、11 時間、8.0-50.0 秒、9 時間、総泳動時間 20 時間で行った。サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 株の *XbaI* 切断物を使用した。

C. 研究結果

1. PCR

PCR の結果は表 1 に示した通りである。すべての供試菌株は毒素遺伝子のうち *tdh* を保有していたが、*trh* は保有していなかった。また、全ての株が *toxR* 遺伝子を保有していた。GS-PCR の結果、全ての株が陽性を示した。

2. 分離菌株の PFGE

3 種類の制限酵素 *AscI*、*NotI* 及び *SfiI* での切断パターンを図 1 に示した。*AscI*

では 23 本、*NotI* では 18 本、*SfiI* では 14 本のバンドが検出された。患者由来株及び食品由来株の PFGE パターンは *AscI*、*NotI* 及び *SfiI* のどの制限酵素で切断しても切断パターンは一致した。

D. 考察

今回供試した菌株は全て *tdh* のみを保有しており、GS-PCR 陽性であったことから、世界的大流行を起こしている新型クローンであることが確認された。

また、PFGE 解析の結果、イカソーメン由来株は患者分離株と同一の PFGE パターンを示したことから、イカソーメンが原因食品であったことが確認された。

腸炎ビブリオは我が国における最も重要な食中毒起因菌の一つである。以前は O4:K8 が主流だったが、1996 年を境に O3:K6 が日本だけでなく東南アジアや米国などで急増し、世界的な規模での流行となっている。今回の結果から県内でも新型クローンが浸淫していることがわかった。今後、この血清型の動向を監視し続けてい

く必要がある。

E. 結論

食品及び患者由来株を用いて PFGE を実施した結果、同一の遺伝子型を示したことから、原因食品が確認された。今回供試した菌株は全て新型クローンであることが確認された。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Mol. Cell. Probes 6:477-487(1992).
- 2) J. Clin. Microbiol. 37:1173-1177(1999)
- 3) J. Clin. Microbiol. 38:578-585(2000)

表 1. 腸炎ビブリオ O3 : K6 供試菌株の性状

| No. | 由来 | 血清型 | PCR | | | | PFGE pattern | | |
|-----|----------------|---------|------------|------------|-------------|--------|--------------|--------------|--------------|
| | | | <i>tdh</i> | <i>trh</i> | <i>toxR</i> | GS-PCR | <i>Asc</i> I | <i>Not</i> I | <i>Sfi</i> I |
| 1 | 食材 (イカソーメン) | O3 : K6 | + | - | + | + | A1 | N1 | S1 |
| 2 | 患者 | O3 : K6 | + | - | + | + | A1 | N1 | S1 |
| 3 | 患者 | O3 : K6 | + | - | + | + | A1 | N1 | S1 |
| 4 | 患者 | O3 : K6 | + | - | + | + | A1 | N1 | S1 |
| 5 | 患者 | O3 : K6 | + | - | + | + | A1 | N1 | S1 |
| 6 | 患者 | O3 : K6 | + | - | + | + | A1 | N1 | S1 |

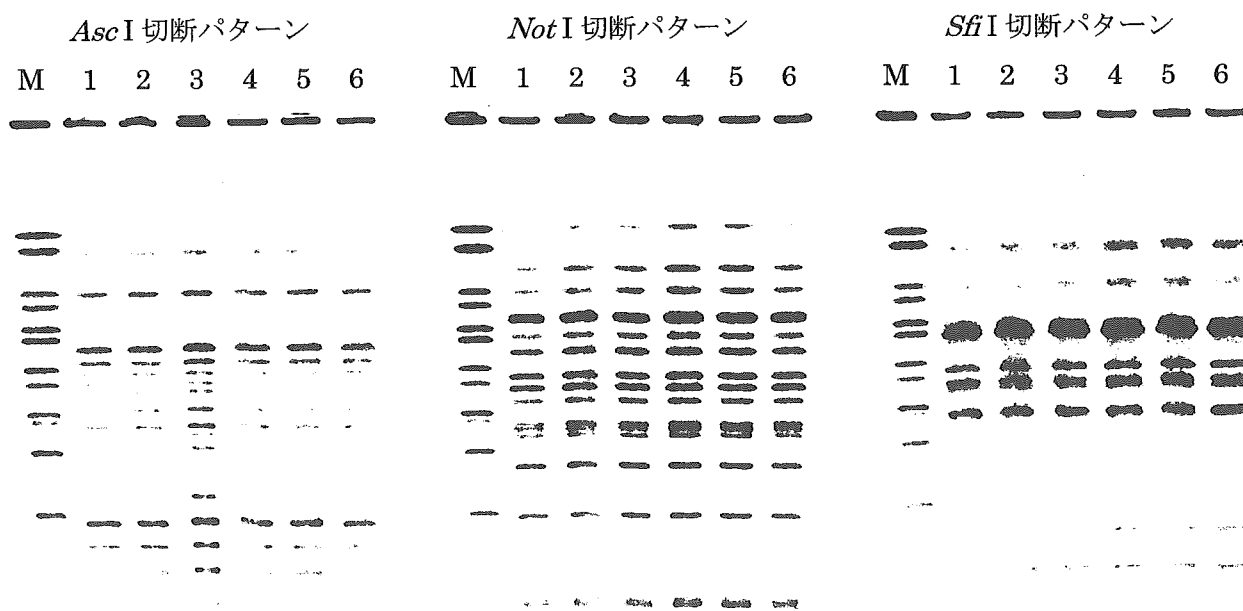


図 1. 腸炎ビブリオ O3 : K6 の PFGE パターン

M : マーカー, 1 : イカソーメン由来, 2~6 : 患者由来

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 17 年度分担研究報告書

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）

| | | |
|-------|--------|---------------|
| 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 | 奈良県保健環境研究センター |
| | 橋田 みさを | 奈良県保健環境研究センター |
| | 山本 安純 | 奈良県保健環境研究センター |

研究要旨

2004 年 8 月に奈良県内の保育園において集団食中毒が発生し、エルシニア・エンテロコリチカ感染が判明した。血清型 O8 の同菌による集団食中毒は、国内では例がないため、慎重に調査を行った結果、患者便 16 検体、検食 1 検体と食材を混合した 1 検体から同菌を分離した。血清型のほか生物型、PCR (*ail*、*virF*、*yst*)、PFGE により、集団食中毒の原因病原体はエルシニア・エンテロコリチカ血清型 O8 である可能性が非常に高いことが確認された。

A. 研究目的

2004 年 8 月に奈良県内の保育園において発生した食中毒は、エルシニア・エンテロコリチカ血清型 O8 感染であることが判明した。同菌血清型 O8 による集団感染は国内に例がなかったため、分離された菌株の病原遺伝子保有を確認するとともに、感染源を解明する目的で、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) 解析を行った。

食中毒事例の概要：2004 年 8 月 3 日、県内の医療機関から、5 名の保育園児が食中毒症状を呈している旨、管轄保健所に通報があった。保育園を調査した結果、園児 182 名中 42 名が食中毒症状を呈しており、そのうち 13 名の入院が確認された。患者に共通する症状は、39～

40°C の発熱、終末回腸付近を中心とした強い腹痛、CRP 高値であり、一方食中毒としては下痢を呈する患者が少なかった。以上の臨床症状から、担当医はエルシニアによる感染型食中毒である可能性を強く疑った。

B. 研究方法

1. 検体

検便 52 検体（患者 32 検体、保育従事者 17 検体、調理従事者 3 検体）、検食 19 検体、食材 20 検体（少量であったためメニューごとに混合して使用）、ふき取り 15 検体について検査を実施した。

2. 検査項目

(1) 分離培養

医療機関において、先にエルシニア・エンテロコリチカが分離されたため、早い時期から同菌を対象を絞って培養を行った。患者便を CIN 寒天培地に直接塗末培養 (28°C) するとともに、すべての検体を 10 倍量の 1/15M リン酸緩衝食塩液 (pH 7.6) により 5°C で最大 3 週間増菌培養を行った。増菌培養液は、直接 CIN 寒天培地に塗末培養するとともに、アルカリ処理法 (0.3ml の増菌培養液と、等量の 0.5% 食塩加 0.75% 水酸化カリウム液を 15 秒間混合し、1 白金耳を CIN 寒天培地に塗末) を併用した。

(2) 分離株の同定

CIN 寒天培地上の典型的なコロニーを釣菌して、TSI 及び LIM 培地 (28°C) で性状を確認し、群別用免疫血清による群別を行った。また、いくつかの菌株を簡易同定システム (バイテック) により同定するとともに、生物型の分類を行った。

(3) 分離株の遺伝子検査

ail、*virF*、*yst* (American strains、European strains) 遺伝子を標的とした PCR 及び PFGE による DNA 解析 (*Xba*I、*Not*I) を実施した。

(4) 分離株の薬剤感受性試験

センシディスクを用い、NCCLS に準拠した方法で 11 薬剤について感受性を調べた。

C. 研究結果

患者便 32 検体中、16 検体からエルシニア・エンテロコリチカが分離されたが、保育従事者便、調理従事者便から同菌は分離されなかった。検食、食材の培養では、リンゴサラダと、その食材 (リンゴ、キュウリ、ジャガイモ、ニンジン、ハム) を混合したものから同菌が分離

された。後で食材を個別に培養したが、同菌は分離されなかった。ふき取りから同菌は分離されなかった。

分離株は、群別用免疫血清によりすべて 08 群に群別され、バイテックによる簡易同定試験でもエルシニア・エンテロコリチカと同定された。また、生物型はすべて 1B 型であった。

PCR の結果、すべての分離株から *ail*、*virF*、*yst* (American strains) 遺伝子が検出され、PFGE において同一パターンを示した (Fig. 1)。

薬剤感受性は、全ての分離株がアンピシリンのみに耐性を示した。

D. 考察

エルシニア・エンテロコリチカによる集団食中毒は、1972 年に散発下痢症患者から初めて菌が分離されてから現在までに 14 例の発生が確認されている。しかし、病原性が強いといわれる血清型 08 群、生物型 1B の菌株については、東北地方を中心として散発事例が報告されるのみであった。この血清型 08 群、生物型 1B のエルシニア・エンテロコリチカは、かつては北アメリカ大陸だけで分離されていたため、American strains と呼ばれており、血清型 03、05、27、09 などのヨーロッパ型とは、耐熱性エンテロトキシン遺伝子の塩基配列も異なっている。

今回、奈良県においてエルシニア・エンテロコリチカ血清型 08 による集団食中毒が起きたことから、病原性の強いタイプであることもふまえ、エルシニア汚染に対する注意・警戒をさらに強める必要があると考えられる。

E. 結論

以上の研究結果から、今回の食中毒事例の原因は、エルシニア・エンテロコリチカ血清型

08 である可能性が非常に高いと結論づけられた。その際、PFGE パターンの比較は感染源の特定に有用であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakai, T., Nakayama, A., Hashida, M., Yamamoto, Y., Takebe, H. and Imai, S.:

Outbreak of Food Poisoning by *Yersinia enterocolitica* Serotype 08 in Nara Prefecture: the First Case Report in Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 58:257-258 (2005)

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

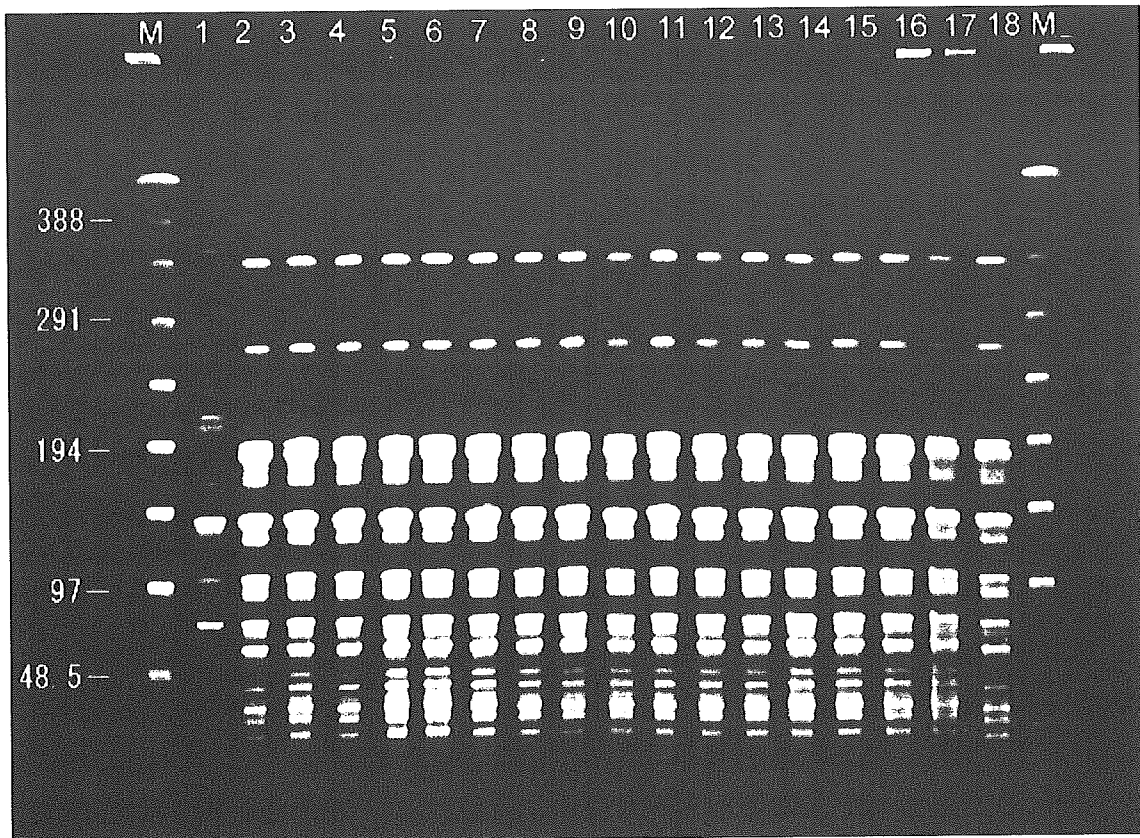


Fig. 1. PFGE patterns of *Not* I-digested genomic DNA of *Y. enterocolitica* serotype O8 strain and isolates. Lane 1, strain ATCC 9610; Lane 2, isolate from the salad; Lane 3, an isolate from raw materials of the salad; Lanes 4–18, isolates from patients; Lane M, DNA ladder.

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 17 年度分担研究報告書

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

| | | | |
|-------|------|-------------|-----|
| 協力研究者 | 田口真澄 | 大阪府立公衆衛生研究所 | 細菌課 |
| | 山崎 渉 | 大阪府立公衆衛生研究所 | 細菌課 |
| | 塚本定三 | 大阪府立公衆衛生研究所 | 細菌課 |
| 分担研究者 | 勢戸和子 | 大阪府立公衆衛生研究所 | 細菌課 |

研究要旨

2005 年に大阪府で発生した 6 件の腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 による食中毒事件について PFGE 解析を実施して感染源を推察した。5 事例では事例内で型が一致し喫食調査を裏付ける成績が得られた。事例内で型が異なった 1 事例では、同一人から複数の型を検出できたことから検査菌株数を増やし、喫食調査との整合性が得られる結果となった。患者から分離される菌型は、食品中での分布を反映して様々な型になると予想されることから、複数株を分離して解析することが、原因究明に役立つと考えられる。

A. 研究目的

2005 年に大阪府では 6 件の EHEC O157 による食中毒事件が発生した。各事例の感染源を解明する目的で、分離された菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）解析を行った。6 件の概要は以下のとおりである。

事例 1： 6 月 9 日に 34 歳の男性患者から EHEC O157 を検出したと保健所に届出があり、喫食調査から 6 月 2 日に A 焼肉店でユッケ等を喫食していたことが判明した。その後発生届けのあった 2 グループの EHEC O157 患者 3 名も 6 月 3 日に A 焼肉店でユッケ料理等を喫食していた。この 3 グループ（4 名）に提供されたユッケは、いずれも A 焼肉店が 6 月 1 日に仕入れたモモ肉で加工されたものであった。また調査の段階で、同じ業者が同一個体の牛のモモ肉を事例 2 の B 焼肉店

にも納入していたことが判明した。

事例 2： 6 月 9 日に大阪府に発生届けのあった EHEC O157 患者が 6 月 2 日に大阪府内の B 焼肉店でユッケ等を喫食していたことが判明した。その後発生届けのあった 2 名の EHEC O157 患者も B 焼肉店で 1 名は 6 月 3 日、別の 1 名は 6 月 4 日にユッケ等を喫食していた。患者に提供されたユッケはいずれも B 焼肉店が 6 月 1 日に事例 1 の A 焼肉店と同じ業者から仕入れたモモ肉で加工されたものであった。

事例 3： 7 月 23 日に医療機関から 2 歳の女児から EHEC O157 を検出したと保健所に届出があった。患者の喫食状況を調査したなかで外食歴として、7 月 16 日及び 7 月 18 日に A 焼肉店で家族とともに喫食している事が判明した。

そして7月27日に上記と別の医療機関から27歳の女性患者からEHEC O157を検出したと保健所に届出があり、上記患者と同じA焼肉店を家族で7月16日に利用している事が判明した。そして無症状の家族2名からもEHEC O157が検出された。なお、このA焼肉店は事例1と同一の店舗であるが、肉の納入業者は6月と異なっていた。

事例4： 8月15日に10歳の男性患者からEHEC O157を検出したとの届出が保健所にあり、喫食状況調査の結果、外食歴として8月7日のC焼肉店での食事があり、患者はユッケを喫食している事が判明した。一緒に焼肉店で喫食した家族3人は生レバー等を喫食しており、糞便検査で母親(36歳)と妹(7歳)からEHEC O157が検出された。

8月17日になり、上記とは別の医療機関より7歳の女性患者からEHEC O157を検出したとの届出が保健所にあり、喫食状況調査の結果、8月6日にC焼肉店で食事をし、患者は生レバーを喫食している事が判明した。一緒に焼肉店で喫食した家族と知人3人の糞便検査では、ユッケを喫食したが無症状であった兄(7歳男児)からEHEC O157が検出された。両家族の喫食した肉は同一のものであった。

事例5： 10月19日に医療機関より12歳の男性患者からEHEC O157とカンピロバクターを検出したとの届出があった。調査をすると、10月10日に45名でD焼肉店を利用し、他にも有症者が3人いること等が判明した。接触者検便で無症状の2名からEHEC O157が検出されたが、カンピロバクターは他の者からは検出されなかった。

事例6： 10月23日に医療機関より18歳の

女性患者からEHEC O157を検出したとの届出があった。調査したところ、10月16日にE焼肉店で喫食していることが判明した。

その後、10月27日に上記とは別の医療機関より2歳の女児からEHEC O157を検出したとの届出があった。調査してみると、上記の患者と同一の10月16日に家族でE焼肉店を利用していることが判明し、家族からもEHEC O157が検出された。

B.研究方法

供試菌株として事例1、2、3、5、6は感染者1名につき1株の合計19株を用いた。事例4のグループiでは初発患者(感染者No.12)由来1株、妹(感染者No.13)由来5株、母(感染者No.14)由来5株、グループjでは初発患者(感染者No.15)由来7株、兄(感染者No.16)由来5株の合計23を用いた。

血清型別と生化学的性状の確認は常法にしたがって行い、毒素(Stx)型別はPCR法とVTEC-RPLAキット(デンカ生研)で実施した。薬剤感受性試験はABPC、SM、TC、KM、CP、ST、GM、NA、FOM、CTX、CPFX、OFLXの12薬剤についてセンシディスク(BBL)を用いてKB法で行った。

PFGE法は供試菌株DNAを制限酵素XbaIで37°C2時間消化後、CHEF DRIII(Bio-Rad)を使用し、1%アガロースで電圧6V/cm、スイッチタイム22.2-54.2秒で19時間電気泳動を行った。

C.研究結果と考察

6事例由来株の解析成績を表1に、各事例の代表株のPFGEパターンを図1に示した。

事例1、2： 6グループの7名から検出され

た菌株はすべて血清型 O157:H7、Stx 型は 1&2 型、薬剤感受性試験は SM 耐性であり、PFGE 型も同一であった。患者の共通食は 6 月 1 日に仕入れられたモモ肉であったが、調査時点では残品はなく原因食品の特定には至らなかった。

事例 3： 2 グループの 4 名から検出された菌株はすべて血清型 O157:H7、Stx 型は 2 型、薬剤感受性試験は SM・TC 耐性であり、PFGE 型も同一であった。事例 1 と同じ店舗での発生であったが分離株の型は異なっていた。

事例 4： 2 グループの 5 名から検出された菌株はすべて血清型 O157:H7、薬剤感受性試験は感受性であった。感染者 No.12 と 16 はユッケ、No.14 と 15 は生レバー、No.13 は両方を喫食していた。

生レバーのみを喫食していた No.14 は Stx2・PFGE-B 型であり、No.15 は No.14 と同じ型以外に、Stx1&2・PFGE-C 型を検出した。またユッケのみ喫食した No.12 と 16 は Stx2・PFGE-A 型を検出しており、No.14、15 と異なっていた。そして両方を喫食した No.13 からは、ユッケ喫食の No.12 の型と生レバー喫食の No.14 の型を検出した。

本事例は初発患者の型と家族から検出された型が異なり、同一事例内で複数の感染源の存在が考えられたため、より詳細に解析を行う目的で、複数株分離できた検体については 5 株以上を解析に用いた。その結果と喫食調査の結果から、生レバータイプとユッケタイプが明らかとなった。患者から分離される菌型は、食品中での分布を反映して様々な型になると予想されることから、複数株を分離して解析することが、原因究明に役立つと考えられる。

事例 5： 3 名から検出された菌株はすべて血清型 O157:H7、Stx 型は 1&2 型、薬剤感受性試験は感受性であり、PFGE 型も同一であった。

事例 6： 2 グループの 5 名から検出された菌株はすべて血清型 O157:H7、Stx 型は 1&2 型、薬剤感受性試験は感受性であり、PFGE 型も同一であった。

D. 結論

PFGE 型別を行って 6 つの食中毒事件の感染源を推察した。5 事例では事例内で型が一致し喫食調査を裏付ける成績が得られた。事例内で型が異なった 1 事例では、同一人から複数の型を検出できたことから検査菌株数を増やし、喫食調査との整合性が得られる結果となった。患者から分離される菌型は、食品中での分布を反映して様々な型になると予想されることから、複数株を分離して解析することが、原因究明に役立つと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

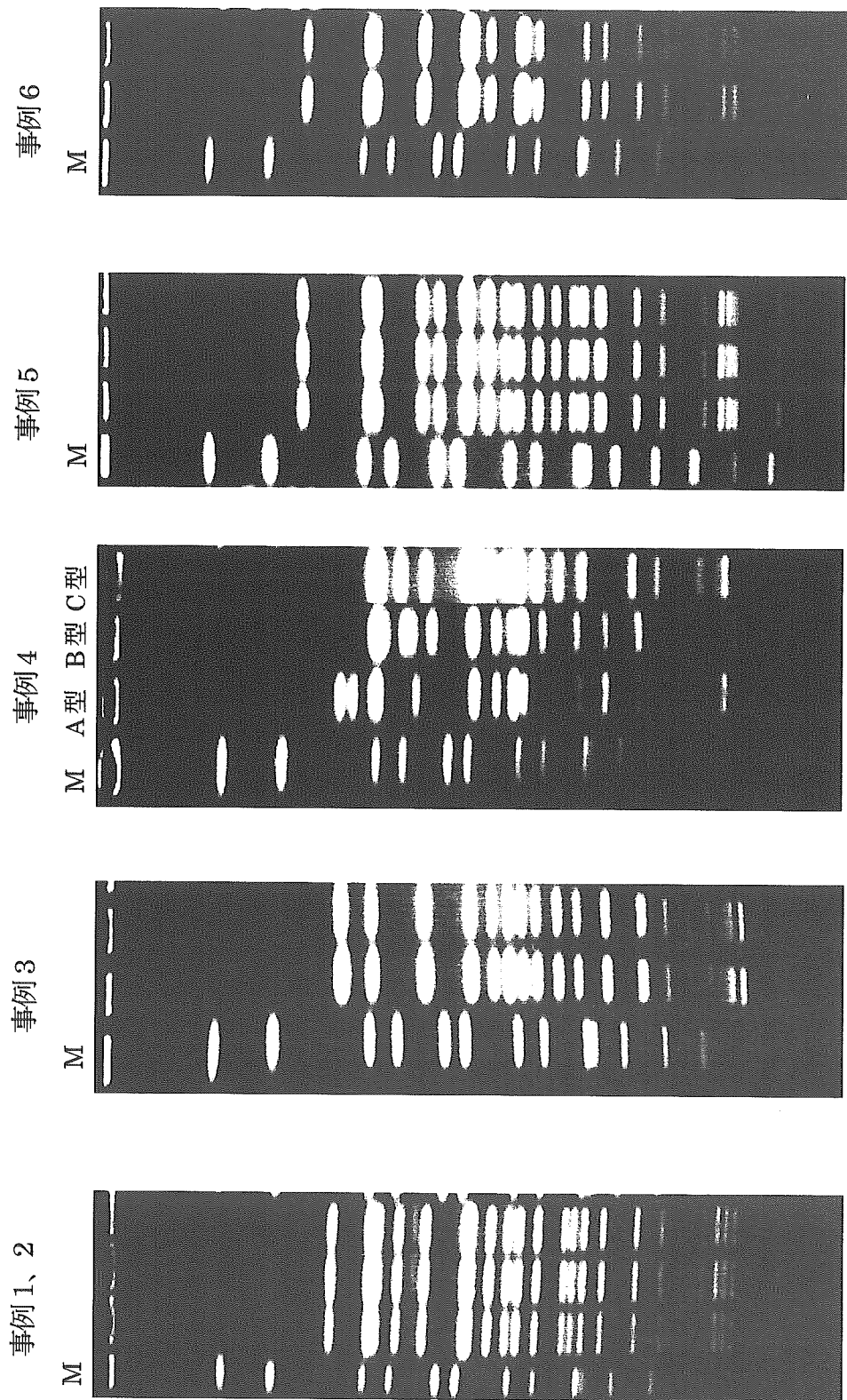
田口真澄、勢戸和子、山崎 渉、塚本定三：複数の遺伝子型の腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例、第 45 回感染性腸炎研究会（2006 年 3 月、東京）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 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

| 事例 | 施設 | 患者数 | グループ | 喫食日 | 感染者No. | 性別 | 年齢 | 発症日 | 血清型 | 薬剤感受性 | Stx型 | PFGE型 |
|----|----|-----|------|--------|--------|----|----|--------|---------|-------|--------|----------|
| 1 | A店 | 4 | a | 6月2日 | 1 | M | 34 | 6月5日 | O157:H7 | SM | 1&2 | 事例1と2は同一 |
| | | | | 6月3日 | 2 | M | 23 | 6月7日 | | | | |
| | | | | 6月3日 | 3 | F | 24 | 6月5日 | | | | |
| | | | | | 4 | F | 27 | 6月9日 | | | | |
| 2 | B店 | 3 | d | 6月2日 | 5 | M | 8 | 6月5日 | O157:H7 | SM | 1&2 | |
| | | | | 6月4日 | 6 | F | 24 | 6月6日 | | | | |
| | | | | 6月3日 | 7 | M | 9 | 6月7日 | | | | |
| | | | | | 8 | F | 2 | 7月21日 | | | | |
| 3 | A店 | 2 | h | 7月16日 | 9 | M | 27 | 7月18日 | O157:H7 | SM,TC | 2 | 事例内で同一 |
| | | | | 8月7日 | 10 | F | 26 | 無症状 | | | | |
| | | | | | 11 | M | 53 | 無症状 | | | | |
| | | | | | 12 | M | 10 | 8月12日 | | | | |
| 4 | C店 | 4 | i | 8月7日 | 13 | F | 7 | 8月13日 | O157:H7 | 感受性 | 2, 1&2 | A, B |
| | | | | | 14 | F | 36 | 8月10日 | | | | |
| | | | | 8月6日 | 15 | F | 7 | 8月10日 | | | | |
| | | | | | 16 | M | 7 | 無症状 | | | | |
| 5 | D店 | 4 | k | 10月10日 | 17 | M | 12 | 10月13日 | O157:H7 | 感受性 | 1&2 | 事例内で同一 |
| | | | | 10月16日 | 18 | M | 45 | 無症状 | | | | |
| | | | | | 19 | M | 38 | 無症状 | | | | |
| | | | | | 20 | F | 18 | 10月20日 | | | | |
| 6 | E店 | 2 | m | 10月16日 | 21 | F | 2 | 10月19日 | O157:H7 | 感受性 | 1&2 | 事例内で同一 |
| | | | | | 22 | M | 42 | 無症状 | | | | |
| | | | | 10月16日 | 23 | F | 34 | 無症状 | | | | |
| | | | | | 24 | F | 29 | 無症状 | | | | |



M : *Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain

図 1 2005 年に大阪府で発生した食中毒事件の PFGE パターン (制限酵素 *Xba*I)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 17 年度分担研究報告書

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

| | | |
|-------|------------|---------------|
| 分担研究者 | 田中 博 | 愛媛県立衛生環境研究所 |
| 研究協力者 | 榊美代子 妹尾正登 | 広島県保健環境センター |
| | 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 |
| | 富田正章 | 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 谷脇 妙 | 高知県衛生研究所 |
| | 森 敏彦 笹川知位子 | 徳島県保健環境センター |
| | 古田喜美 | 広島市衛生研究所 |

研究要旨

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、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）の標準化と PFGE により解析された画像を基盤とした分散型情報システム（パルスネット）構築のため、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 O157:H7 (O157) 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。

精度管理の結果、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不鮮明であった。また、1 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。各施設間の差異を画像解析ソフトによるクラスター解析で確認したところ、比較的良好的な画像の得られた 7 施設の O157 の 4 株は類似性が高く、それぞれ異なるクラスターを形成（類似値 92～100%）したが、不鮮明な画像のクラスターは低い値（類似値 55%）であった。今後、良好な画像を得るため、PFGE の技術的問題点の改善が必要と思われた。

A. 研究目的

平成 12 年度から中・四国地区の各地研がパルスネット構築の基礎的資料を得るため、PFGE 解析の有効性と技術的問題点について共同研究を行ってきた。その結果、PFGE 解析は細菌性食中毒や感染症の疫学調査に有効な手段となることが明らかとなった反面、パ

ルスネットを構築し円滑に運用するには、PFGE の標準化と精度管理の必要性が示唆された。今回の精度管理では、昨年度に引続き、中・四国地区の各地研が米国 CDC のプロトコールをもとに感染研が新たに作成した PFGE のプロトコール(感染研ニュープロトコール)により、O157 について PFGE を行い、

技術的問題点を指摘・改善していくことを目的とした。

B. 研究方法

1. 参加施設

広島県保健環境センター、岡山県環境保健センター、鳥取県衛生環境研究所、山口県環境保健研究センター、愛媛県立衛生環境研究所、香川県環境保健研究センター、高知県衛生研究所、徳島県保健環境センター、広島市衛生研究所

2. 供試菌株

精度管理用菌株として国立感染症研究所から分与を受けた前年度と同一の腸管出血性大腸菌 O157:H7 の 4 株を使用した。

腸管出血性大腸菌 O157:H7 の菌株番号と PFGE 型 (感染研型別)

- ・ 菌株番号 1 (感染研番号 021533 II a II a I)
- ・ 菌株番号 2 (感染研番号 020095 III a ND III)
- ・ 菌株番号 3 (感染研番号 020021 VII ND III)
- ・ 菌株番号 4 (感染研番号 020049 V a ND ND)

3. PFGE

方法は感染研ニュープロトコールに準拠した。詳細は次のとおりである。

1) 菌量の調整とアガロースブロック包埋

菌株は 2 通りの集菌方法を試み、比較した。ブイヨンからの集菌方法としてトリプトソイブイヨン 3ml に 35~37°C、16~18 時間静置培養した菌液 200 μ l を 1.5ml のマイクロチューブに移し、12,000rpm で 2 分間遠心した。遠心後、上清を除去、沈渣に滅菌蒸留水 200 μ l を加え、懸濁した。この懸濁液にプレート法と同様、200 μ l の 1% Seakem Gold Agarose を加え、その混合液を plug mold で固化させた (ブイヨン法)。一方、プレートからの集菌方法として、35~37°C で 16~18 時間培養したトリプトソイ寒天平板上の菌苔をプラスチックエーゼでかき取り、滅菌蒸留水に懸濁後 OD を 0.5 (610nm) に調整した。

分光光度計が使用できない施設はマッファーランドの濁度計を目安に調整した。(OD0.5 はマッファーランド 5 に相当することを予め確認した。) この懸濁液 200 μ l に等量の 1% Seakem Gold Agarose を加えて混ぜ、その混合液を Sample Plug Caster 0.7mm (Bio-Rad) へ流し込み、室温で 10~15 分間 (4°C で 5 分間) 固化させた (プレート法)。

2) 菌体処理 (Proteinase K)

固まったプラグを 1 mg/ml Proteinase K (Roche)、1% N-Lauroylsarcosine (Sigma) in 0.5M EDTA, pH8.0 溶液 1 ml の入ったチューブに移し、50°C で 2 時間、振盪培養した。

3) 制限酵素処理 (前処理)

アガロースブロックを取り出し、泳動時用の大きさ (4 mm \times 4 mm) にカットした。この断片を 4 mM Pefabloc SC (AEBSF) (Roche) in TE 1 ml の入ったマイクロチューブに移し、50°C で 20 分間の洗浄を 2 回行った。さらに、バッファーを TE (1 ml/sample) に替え、氷上で 20 分以上平衡化した。

4) 制限酵素処理 (バッファーによる平衡化)

TE buffer を抜き取り、酵素処理のための H buffer (200 μ l/sample) を加え、氷上で 20 分間処理した。

5) 制限酵素処理 (消化反応)

100 μ l の制限酵素 *Xba* I (Roche) を含むバッファー (30 units/sample) に置き換え、37°C で一昼夜、振盪培養を行った。酵素処理の終わったサンプルには、0.5 倍の TBE buffer を 400 μ l 加え反応を停止した。

6) コムへの貼り付け

プラグをコムの泳動方向面に静置、5~10 分間乾燥させた後、ゲル作製台にセットし、55~60°C に保温した 1% SeaKem Gold Agarose (0.5 倍の TBE buffer で溶解) 100ml を流し込み、泳動用アガロースゲルを作製した。

7) 泳動槽の設定・泳動条件

予め 4℃に保存しておいた 0.5 倍の TBE buffer 2 リットルを水平に設定した泳動槽に加えた後、泳動用ゲルを泳動槽に配置した。泳動条件は、6.0V/cm、2.2-54.2 s、19 時間、バッファー温度は 14℃に設定した。

8) ゲルの染色・写真撮影

泳動後のゲルを 0.2 μg/ml Ethidium bromide 水溶液で 30 分間染色、染色後、蒸留水で 30 分間脱色し、Transilluminator 上でポラロイドカメラにて撮影した（1 施設は CCD カメラで撮影）。

4. 画像解析

各施設で写真撮影された画像を電子メールまたは郵送で愛媛県立衛生環境研究所に集め画像解析ソフト（Fingerprinting II、Bio-Rad）を用いてクラスター解析を行った。

C. 研究結果

1. 各施設の PFGE 画像の比較

今回、9 施設（A～I 施設）が統一方法で作製した O157 の PFGE 画像の作製を試みた。その結果、7 施設では概ね良好な画像が得られたが（図 1、図 2、図 4～8）、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（図 3）。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。この原因については不明であるが機器のハード面及びソフト面から原因を調査している。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箇所が見られた。

2. 各施設間の画像解析

画像をもとに画像解析ソフトでデンドログラム（図 9、図 10）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、その類似値は概ね 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。しかし、前述した D 施設の画像では類似値が 55%、60%、67% 80%と同一のクラスターからの差異が見られた。

3. 集菌方法の違いによる画像の比較

2 種類の集菌方法で行った PFGE の画像を比較したところ、D 施設を除く各施設では比較的高い類似値（95～100%）で、同様なクラスターを示し、集菌方法の違いによる画像の差異は見られなかった。（図 11～18）

4. 平成 16 年度の画像との比較

8 施設については前年度（平成 16 年度）の画像と今年度の画像とを比較することができた（図 19～26）。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。

D. 考察

現在、中・四国地区の 10 地研では感染研ニュープロトコールに準拠して PFGE を実施しているが、パルスネットを構築し、diffuse outbreak の早期発見に成果を上げるには各施設の検査技術の維持が必要であり、精度管理は不可欠である。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ールによる 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個所（分子量の大きいバンドでは濃度が濃くなりバンド数を区別できなくなる傾向が見られ、分子量の小さいバンドではバンドが薄くなり、認識できない個所等）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、D 施設の画像はコントラストが低く、分子量の小さなバンドが認識されない傾向が見られた。これは写真撮影時の技術的な問題によるものと思われ、今後、写真撮影技術の改善が必要と考えられた。一方、集菌方法の違いによる画像の比較では、前年度と同様、菌量を客観的な方法で測定・添加したため、画像に大きな差異は見られなかった。さらに、今年度と前年度の画像とを比較した結果、菌

株の変異と思われる差異が各施設の画像で認められた。このことから精度管理に供試する菌株の選定や取扱にも配慮が必要と考えられた。

E. 結論

中・四国地区の9地研で、感染研ニュープロトコールによる PFGE を行い、精度管理を実施したところ、概ね良好な PFGE 画像を得ることができた。しかし、パルスネットを構築するためには、いくつかの技術的問題点も認められた。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。

F. 研究発表

なし

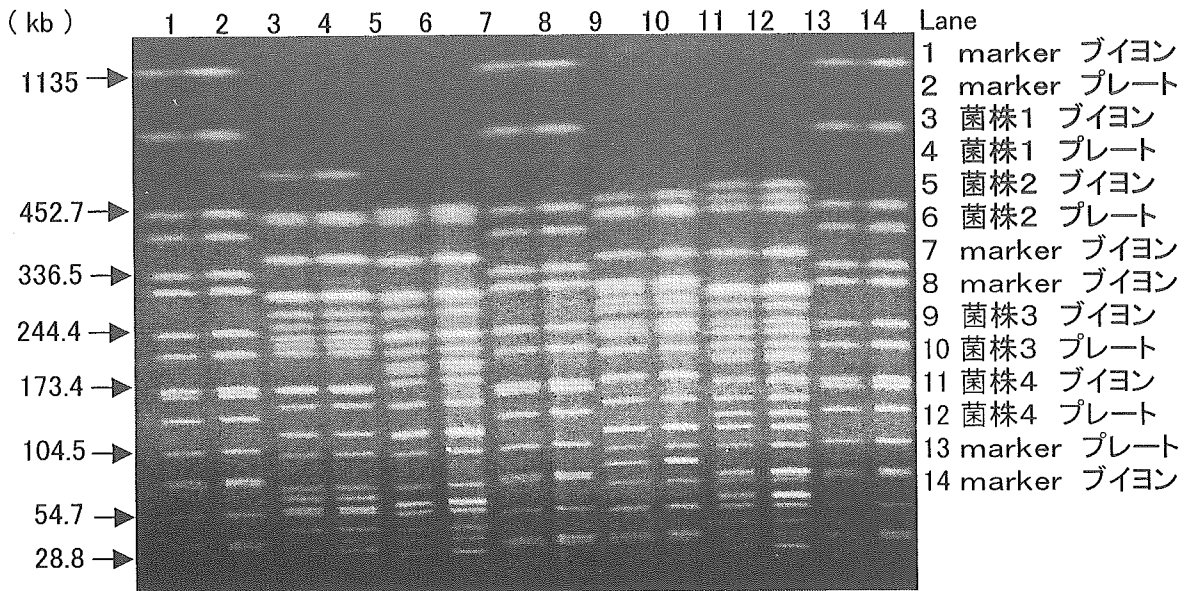


図 1 A施設のPFGE画像(H17)

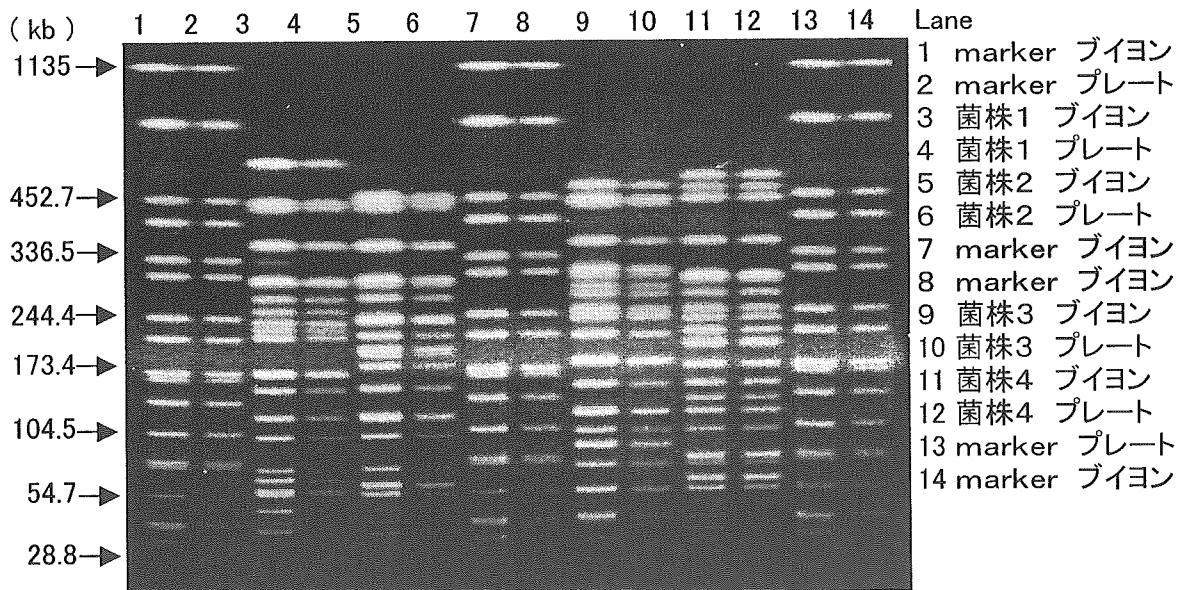


図 2 B施設のPFGE画像(H17)

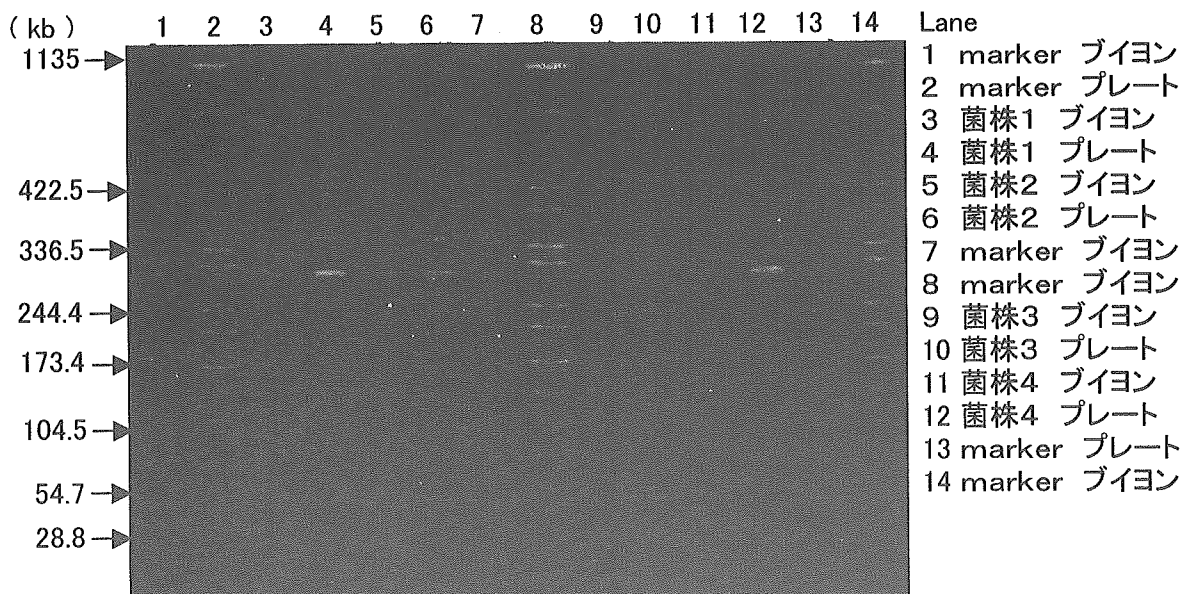


図 3 D施設のPFGE画像(H17)

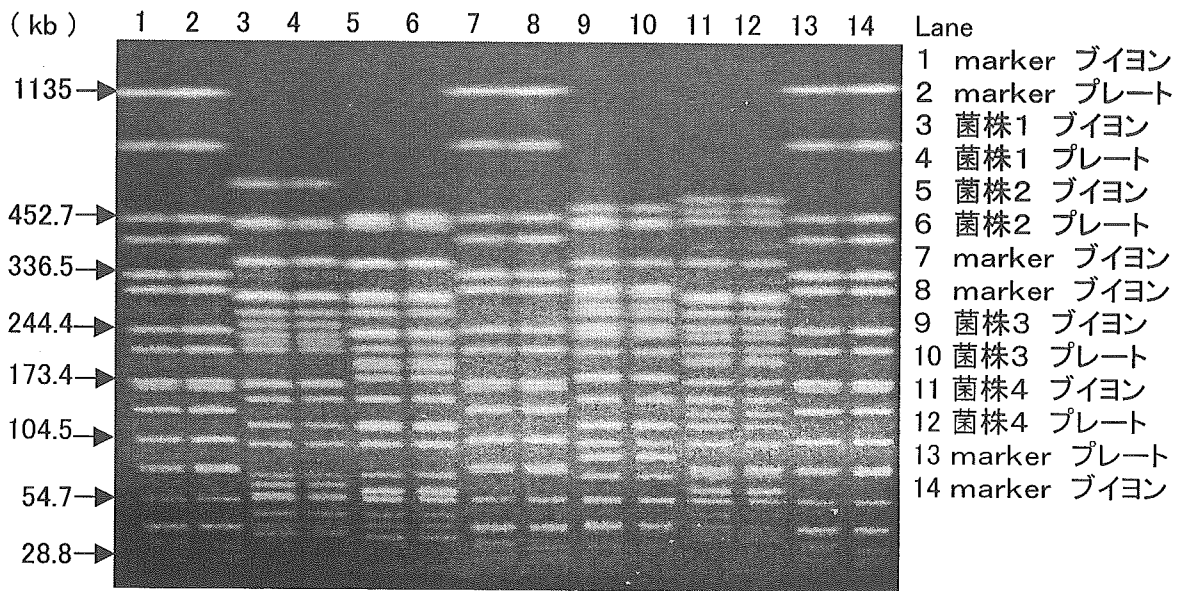


図 4 E施設のPFGE画像(H17)

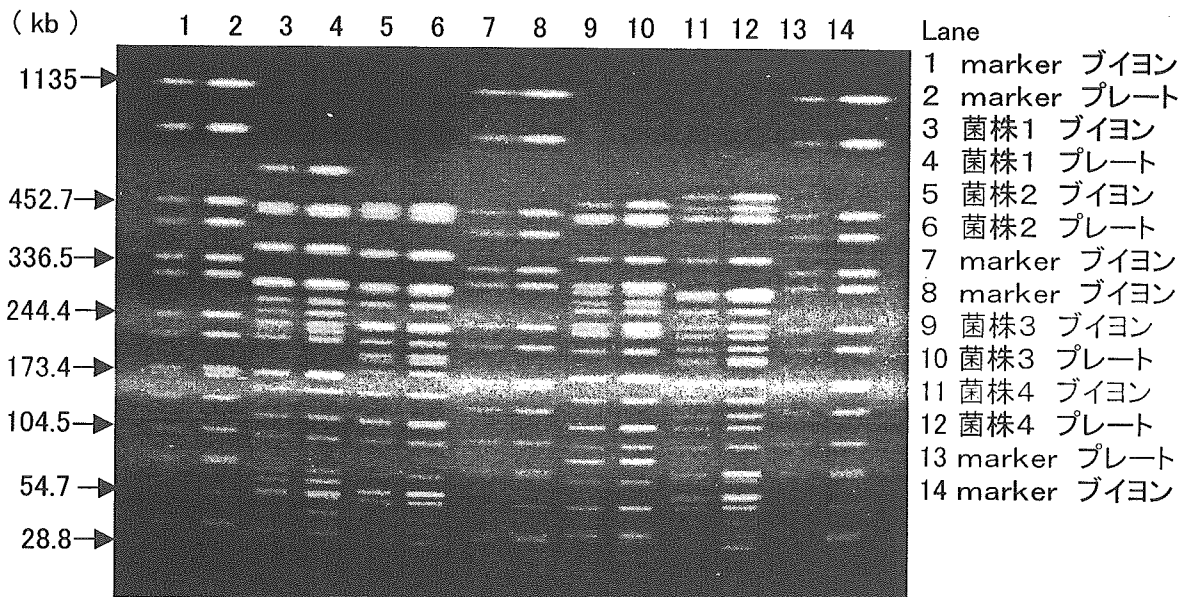


図 5 F施設のPFGE画像(H17)

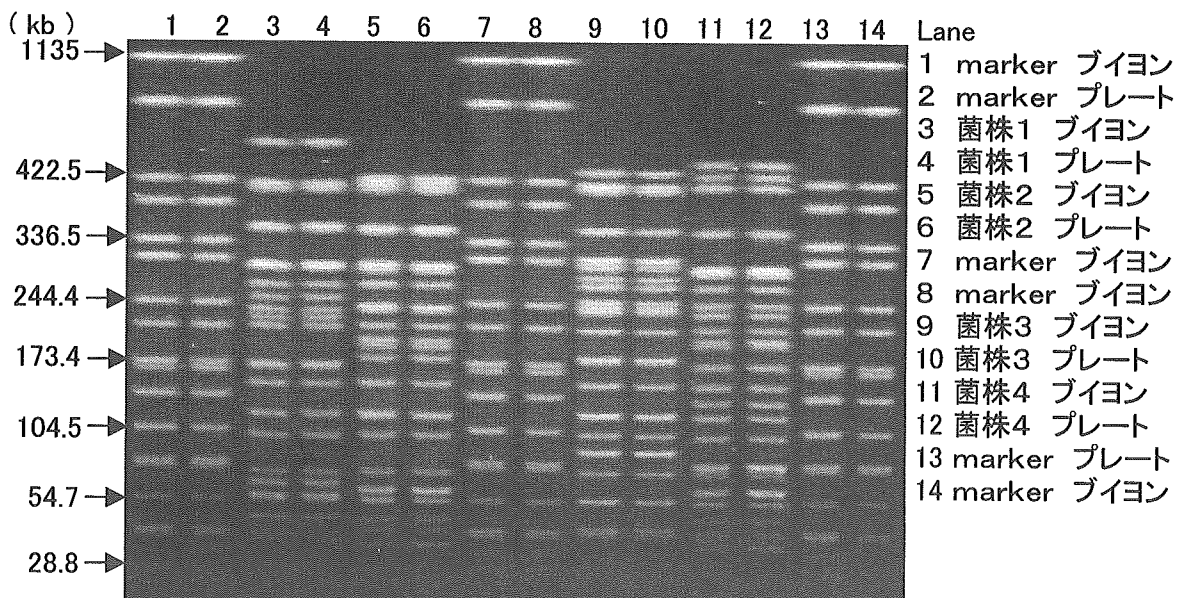


図 6 G施設のPFGE画像(H17)