

れたクラスターは3つ (C8, 11, 15) で、これらクラスターに含まれる菌株数は6であった。一方、後期 (90年代) のみに認められたクラスターは4つ (C5, 9, 12, 13) であった。これらクラスターに含まれる菌株数は11であった。2000年以降のみに検出されたクラスターは2つ (C16, 17) でこれらクラスターに含まれる菌株は4つであり、そのうち3つは岐阜県及び富山県で検出された。前期、後期及び2000年以降共に認められたクラスターは2つ (C1, C3) であった。これらクラスターに含まれる菌株数は56であった。前期及び後期のみに認められたクラスターは5つ (C2, 4, 7, 10, 14) であり、43株が含まれた。後期及び2000年以降のみに認められたクラスターは1つ (C6) のみで株数は4つであった。

## 2. 菌株1 PFGE型

前期、後期、2000年以降併せて31株が1菌株1 PFGE型に型別分類された (表6)。このうち前期は17株 (54.8%)、後期10株 (32.3%)、2000年以降4株 (12.9%) であった。

## 3. 2000年以降検出された *S. Typhimurium* (13株) のクラスター及び1菌株1 PFGE型

愛知県で検出された7株は6株が4つのクラスターに属していた。C3には3株が含まれ、C1、6、17にそれぞれ1株が含まれていた。残りの1株は1菌株1 PFGE型属していた。岐阜県で検出された2株は何れもC16に属していた。富山県で検出された2株はひとつがクラスター (C17)、もうひとつは1菌株1 PFGE型に属していた。石川県の2株は何れも1菌株1 PFGE型であった。

### *S. sonnei*

#### [I] PFGE解析とPT

139株は19のPTに型別され、106株 (全体の76.3%) が含まれた。図2には系統樹と型別分類されたPTを示した。19PTのうち、PT1が39株と最も多くの菌株が含まれ、以下PT2 (n=10)、PT3 (n=9)、PT4 (n=6)、PT5 (n=5)、PT6及びPT7 (n=4)、PT8からPT12 (n=3)、それに、PT13からPT19 (n=2) であった。また、PT2、3、4はそれぞれ同一集団事例株が2株含まれ、PT8、9ではそれぞれ3株中2株が同一集団事例株であった。また、PT5は5株全てが5つの異なる国内集団事例株であった。一方、残りの33株は85

%以上の相同性を示す菌株が他に認められず、PTには属さず単独で系統樹上に存在した。

#### [II] PTの年次推移 (表7)

ソンネ菌139株をその分離年によって前期 (1982年から91年まで) と後期 (1992年から2003年まで) に分け、検討を加えた。

前期には50株が含まれ、このうち26株 (52%) は11の異なるPTに属していた。一方、残りの24株 (48%) はPTには属していなかった。後期には89株が含まれ、80株 (90%) が15の異なるPTに属していた。一方、PTに属さないソンネ菌は前期とは異なって非常に少なく9株のみ (10%) であった。

19PTのうち4PTは前期のみに認められ、8PTが後期にのみ認められた。一方、7PTは前期、後期両方に認められた。そのうちPT1では属する39株のうち30株 (76.9%) が、PT2では10株のうち9株 (90%) が、PT3では9株のうち7株 (77.8%) が後期に認められた。

#### [III] PT株の由来

型別分類された19のPTについて、含まれる菌株の由来 (国内感染事例又は国外感染事例) を調べた。その結果、13PTではそれぞれ含まれる菌株の由来として、国内感染事例及び国外感染事例の両者が認められた (表8)。最も多くの菌株が含まれたPT1では、39株のうち国内事例が17株 (43.6%)、国外感染事例が22株 (56.4%) であった。国外感染事例における感染推定国はインドネシア (n=5)、インド (n=3)、中国 (n=3) 等であった。次いで多くの菌株が含まれていたPT2 (n=10) では国内事例と国外感染事例が同数の5株で、国外感染における主な渡航先はインド (n=3) であった。PT4では6株中、国内事例が4株、国外感染事例が2株であった。以下表2に示したようにPT6から19まで、それぞれ国内事例及び国外感染事例由来株が認められ、国外感染事例における主な渡航先はインドネシア (n=4)、フィリピン (n=3)、及びインド (n=2) 等であった。一方、PT5 (n=5) とPT17 (n=2) は国内事例株のみが含まれており、PT5の5株は5つの異なる集団事例株であった。また、残りの4PT (PT3 (n=9)、13、15、18 (各n=2)) は国外感染事例株のみが含まれ、特にPT3の9株は1991年から97年にかけて分離された9

件で、その全てがインドネシア渡航からの散発事例由来であった。

#### D. 考察

##### *S. Typhimurium* (前期及び後期検出株)

薬剤感受性試験の結果から、愛知県で後期に検出された *S. Typhimurium* は前期に比べその薬剤耐性菌の割合が有意に高かった (後期 52.3%、前期 75.6%)。また、これは4から6剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加が主な原因であることが推察された。これら多剤耐性菌の耐性パターンとしては、欧米で90年代に患者、食中毒事例から多数検出され大きな問題となった *S. Typhimurium* DT104 と同じ耐性パターンである ACSSuT、もしくはこれら5剤耐性パターンにPまたはNが加わった6剤耐性パターンが約半数を占めた (51.3%、20/39)。

前後期含めた28株のDT104と同じ耐性パターンの5剤及び6剤耐性菌についてファージ型別分類を行なった結果、1988年以降99年までの間に今回検出された143株のうち7株のDT104が検出され、愛知県においても80年代後半に既に *S. Typhimurium* DT104 が存在していたことが明らかとなった。松下らの研究では、我々と同時期に都内在住の下痢症患者から検出された耐性菌の44.9% (44/98) が *S. Typhimurium* DT104 とその検出率は高率であった。一方、我々の今回の結果からは耐性菌に占めるDT104の割合は7.4% (7/94) と非常に低かった。この原因として、松下らが検出した *S. Typhimurium* DT104 は全て患者由来であったが、我々が検査した菌株の6割が主に健康保菌者であった。事実、今回検出された *S. Typhimurium* DT104 の7株中6株は健康保菌者由来であった。欧米からの報告では *S. Typhimurium* DT104 は患者症状が他のサルモネラに比べ重症であり死者も認められるとのことであるから、本菌は患者からより高率に検出される菌型であるのかもしれない。

後期の4剤-6剤耐性菌は9クラスターと1菌株1 PFGE型菌から構成されていた。これら9クラスターのうち6つは後期のみから検出された。ACSSuT耐性を担っている遺伝子はひとつの遺伝子群を形成し他の菌への移動が可能な単位として存在していることはすでに知られてい

ることから、これら6クラスター及び1菌株1 PFGE型に属する *S. Typhimurium* は、耐性遺伝子群が複数の異なったクラスター、及びPFGE型菌に水平伝播した結果、新たに生じた可能性が示唆された。

その他のDT104を含むC3、及びC1クラスターは前後期何れからも検出されており、前期もしくはそれ以前に耐性遺伝子群を獲得し以降安定に存在していたものと推察される。また、C5クラスターは両期間から検出されているが、前期の1株は感受性株であることからこの感受性株が耐性遺伝子群を獲得し、後期に多剤耐性化したことが推察される。これらことから後期に多数検出された4剤-6剤耐性菌は、例えばDT104が属するC3クラスターのような特定のクラスター菌が多数を占めるのではなく、複数のクラスター及び1菌株1 PFGE型菌から構成されていることが明らかとなり、その構成は遺伝学的に複雑であることが推察された。

##### *S. Typhimurium* (2000年以降検出株)

2000年以降検出された13株の *S. Typhimurium* について平成15年度に作成した愛知県で80年代から90年代に検出された *S. Typhimurium* のPFGEデータへの追加を行なった。その結果、9株は何れかのクラスターに属した。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。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1PFGE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。

#### *S. sonnei*

過去20年間に愛知県内で検出された139株のソンネ菌についてPFGEとそのパターンの解析から、検出時期（前期：1982～91年、後期：1993年～2003年）によりPFGEパターンに変化があることが明らかとなった。すなわち、前期には検出株数（50株）は少ないものの比較的多数の異なったPFGEパターン（11のPT+24の1PFGE株=35）のソンネ菌が存在していたが、後期には前期の約1.8倍の株（89株）の約90%が前期とほぼ同数の15のPTに型別分類され、その結果として異なるPFGEパターン数（15のPT+9の1PFGE株=24）が少なく、後期では比較的限られたPFGEパターンのソンネ菌のみが存在していたことが判明した。さらに、この限られたPFGEパターンはお互いに系統樹上で隣接するPT1、2、5、6が主体であり、これら4つのPTで後期分離株の53.9%（48/89）を占めていた。また、これら4PTのうちPT5、6は後期のみ認められ、PT1では属する39株のうち30株（76.9%）が、PT2では10株のうち9株（90%）が後期に認められた。これら結果から、後期で過半数を占めた4PTは前期（特に後半の87年）以降に出現し、後期で検出されるソンネ菌の主流になったと思われる。

これまで愛知県で発生したソンネ菌による散发、及び集団事例に関して、その殆どが感染源不明であった。今回解析を実施した139株のうち106株が19のPTとして型別分類されたが、このうち13のPTでは、国内事例由来株と国外感染事例由来株が同一のPT内に存在していた。

（表2）。このことから、感染源不明の国内事例の一部はヒト若しくは輸入食品を介してアジア地域等から我が国に運び込まれ、国内で感染を起こした可能性も十分考えられるものと推察された。

しかし、前述のように後期では国内事例、国

外事例を問わずソンネ菌のPFGEパターンが類似していたこと、赤痢菌が法律上は国内常在菌とされている等をも考慮し、ソンネ菌の感染源究明に際しては、PFGE結果の解釈を疫学情報等も充分加味し慎重に行なう必要があるものと考えられる。

#### E. 結論

##### *S. Typhimurium*

1980年から99年まで愛知県で検出された143株の *S. Typhimurium* は、後期に検出された *S. Typhimurium* では前期に比べその薬剤耐性菌の割合が高かった（後期52.3%、前期75.6%）。これは4から6剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加が主な原因であると推察された。また、*S. Typhimurium* DT104が愛知県でも88年以降7株検出された。薬剤耐性菌を含む143株についてPFGEを実施し、その画像データをデータベース化し、解析を行なったところ、後期に増加した4-6剤耐性菌は複数のクラスター、及び1菌株1PFGE型菌から構成されていることが明らかとなった。この結果は、後期の多剤耐性 *S. Typhimurium* の増加が複数のクラスター、及び1菌株1PFGE型菌への耐性遺伝子群の水平伝播がひとつの原因となった可能性を示唆している。

愛知県、岐阜県、石川県、及び富山県で2000年以降検出された13株の *S. Typhimurium* について80年代から90年代に検出された *S. Typhimurium* 143株のPFGEデータへの追加を行なった。その結果、愛知県で2000年以降検出された *S. Typhimurium* 7株中5株が主要な3つの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。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1PFGE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。

#### *S. sonnei*

過去約20年間に愛知県内で検出されたソンネ菌

139 株について PFGE 解析を行なった。その結果、前期（82 年から 91 年まで年）に検出された 50 株のソネ菌は 26 株（52%）が 11 の PT に型別され、残りの 24 株（48%）は PT には属していなかった。一方、後期（1992 年から 2003 年まで）に検出された 89 株は 80 株（90%）が 15 の PT に型別され、PT に属さない株は 9 株のみ（10%）であった。これらの結果から、前期には比較的多数の異なる PFGE パターンのソネ菌が存在していたが、後期には異なる PFGE のパターン数が少なく、比較的限られた PFGE パターンのソネ菌のみが存在していたことが判明した。また、お互いに類似した泳動パターン（PT）を持つものとして型別分類された 19 の PT のうち、13 の PT では国内感染事例と国外感染事例の両者が同一 PT に認められた。このことから、感染源不明の国内事例の一部はヒト若しくは輸入食品を介して我が国に運び込まれ感染を起こした可能性があることが推察された。しかし、後期では国内事例及び国外感染事例を問わずソネ菌の PFGE パターンが類似していたこと、赤痢菌が法律上は国内常在菌とされていることから、ソネ菌の感染源究明に際しては、PFGE 結果の解釈を疫学情報等も充分加味し慎重に行なう必要がある

と考えられた。

#### 文献

1) 細菌性赤痢 2001～2002、病原微生物検出情報、24:1-8、2003

#### 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

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし

表1 *S. Typhimurium* の薬剤耐性パターン

分離年	供試株数	耐性株数	耐性パターン					
			1剤-3剤	4剤	5剤		6剤	
					ACSSuT	その他	ACSSuT+P	ACSSuT+N
1980-1989	61	32 (52.5%)	22 (68.8%)	1	4	1	4	0
1990-1999	82	62 (75.6%)	23 (37.1%)	9	8	10	7	5
	143	94	45	10	12	11	11	5

表2 各クラスターに含まれる菌株数、その菌株の分離年、耐性数

名前	数	クラスター	分離年		耐性数						
			1980-89	1990-99	1980-89			1990-99			
					感受性	1-3剤	4-6剤	感受性	1-3剤	4-6剤	
C4	7		7		3	4	0				
C12	2		2		2	0	0				
C13	2		2		1	1	0				
C15	2		2		1	1	0				
C17	2		2		2	0	0				
C19	2		2		2	0	0				
C20	2		2		2	0	0				
C2	15			15					3	5	7
C6	4			4					4	0	0
C7	4			4					3	0	1
C8	4			4					1	0	3
C9	4			4					2	0	2(1)
C10	3			3					1	0	2
C11	2			2					0	2	0
C14	2			2					1	1	0
C18	2			2					0	1	1
C1	22		11	11	7	3	1	4	2		5
C3	8		3	5	0	0	3(2)	1	0		4(3)
C5	7		1	6	1	0	0	0	3		3
C16	2		1	1	0	1	0	0	1		0
	98		35	63	21	10	4(2)	20	15		28(4)

( ) : DT104の菌株数再掲

表3 1菌株1 PFGE型に含まれる菌株の分離年、耐性数

分離年		耐性数					
1980-89	1990-99	1980-89			1990-99		
		感受性	1-3剤	4-6剤	感受性	1-3剤	4-6剤
26	19	8	12	6(1)	0	8	11

( ) : DT104の菌株数再掲

表4 4剤-6剤耐性S. Typhimuriumのクラスター及び1菌株1 PFGE型

	4剤	5剤		6剤	
		ACSSUT	その他	ACSSUT+P	ACSSUT+N
1980-89	I (1)	C1 (1) I (3)	I (1)	C3 (3) * <sup>(2)</sup> I (1)	0
1990-99	C5 (3) C7 (1) C10 (1) C18 (1) I (3)	C1 (3) C10 (1) I (4)	C2 (7) C9 (1) I (2)	C3 (4) * <sup>(3)</sup> C1 (2) C9 (1) * <sup>(1)</sup>	C8 (3) I (2)

I: 1菌株1 PFGE型 () : 菌株数 \*(): DT104菌株数再掲

表5 各クラスターに含まれる菌株数とその菌株の分離年

クラスター	前期 (80年代)	後期 (90年代)	2000年以降	合計
C1	20	25	1	46
C2	8	19	0	27
C3	2	5	3	10
C4	3	5	0	8
C5	0	5	0	5
C6	0	4	1	5
C7	1	3	0	4
C8	2	0	0	2
C9	0	2	0	2
C10	1	1	0	2
C11	2	0	0	2
C12	0	2	0	2
C13	0	2	0	2
C14	1	1	0	2
C15	2	0	0	2
C16	0	0	2	2
C17	0	0	2	2

表6 1菌株1 PFGE型に含まれる菌株数とその菌株の分離年

	前期 (80年代)	後期 (90年代)	2000年以降	合計
	17	10	4	31

表7 PTの年次推移

		前期 (n=50)	後期 (n=89)
PT (n=106)	PT1 (9)		PT1 (30), PT2 (9), PT3 (7)
	PT12 (3)		PT4 (6), PT5 (5), PT6 (4)
	PT3, 10, 17, 18, 19 (2)		PT7, 8, 9, 11 (3)
	PT2, 7, 14, 16 (1)		PT13, 15 (2), PT10, 14, 16 (1)
	(n=26)		(n=80)
その他 (n=33)	(n=24)	(n=9)	

表8 国内事例及び海外事例何れもが同時に検出されたPT

PT(株数)	国内事例株数	海外事例渡航先 (株数)
PT1 (39)	17	INA (5), IND (3), CHI (3), TAH (1), Others (10)
PT2 (10)	5	IND (3), TAH (1), NEP (1)
PT4 (6)	4	Others (2)
PT6 (4)	3	IND (1)
PT7 (4)	1	PHI (3)
PT8 (3)	1	Others (2)
PT9 (3)	1	INA (2)*
PT10 (3)	2	INA (1)
PT11 (3)	2	Others (1)
PT12 (3)	1	TAH (1), Others (1)
PT14 (2)	1	INA (1)
PT16 (2)	1	IND (1)
PT19 (2)	1	Others (1)
(84)	40	(44)

INA:インドネシア、IND:インド、CHI:中国、TAH:タイ、NEP:ネパール  
Others:その他の国 \* : 集団事例株

図1 愛知県で80年代から90年代に検出された *S. Typhimurium* の PFGE 系統樹及びバンド模式図 C:クラスター (菌株数)

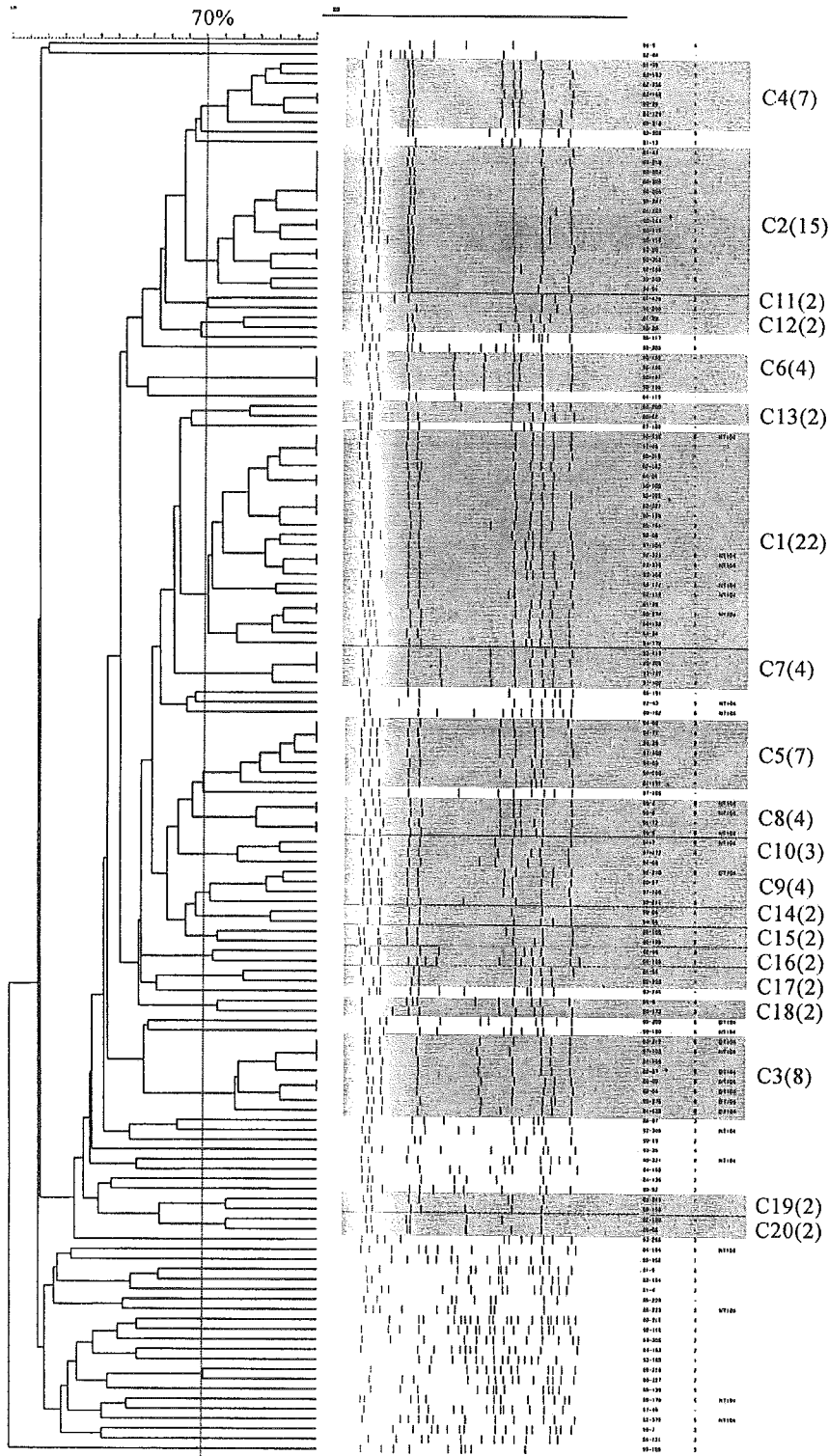
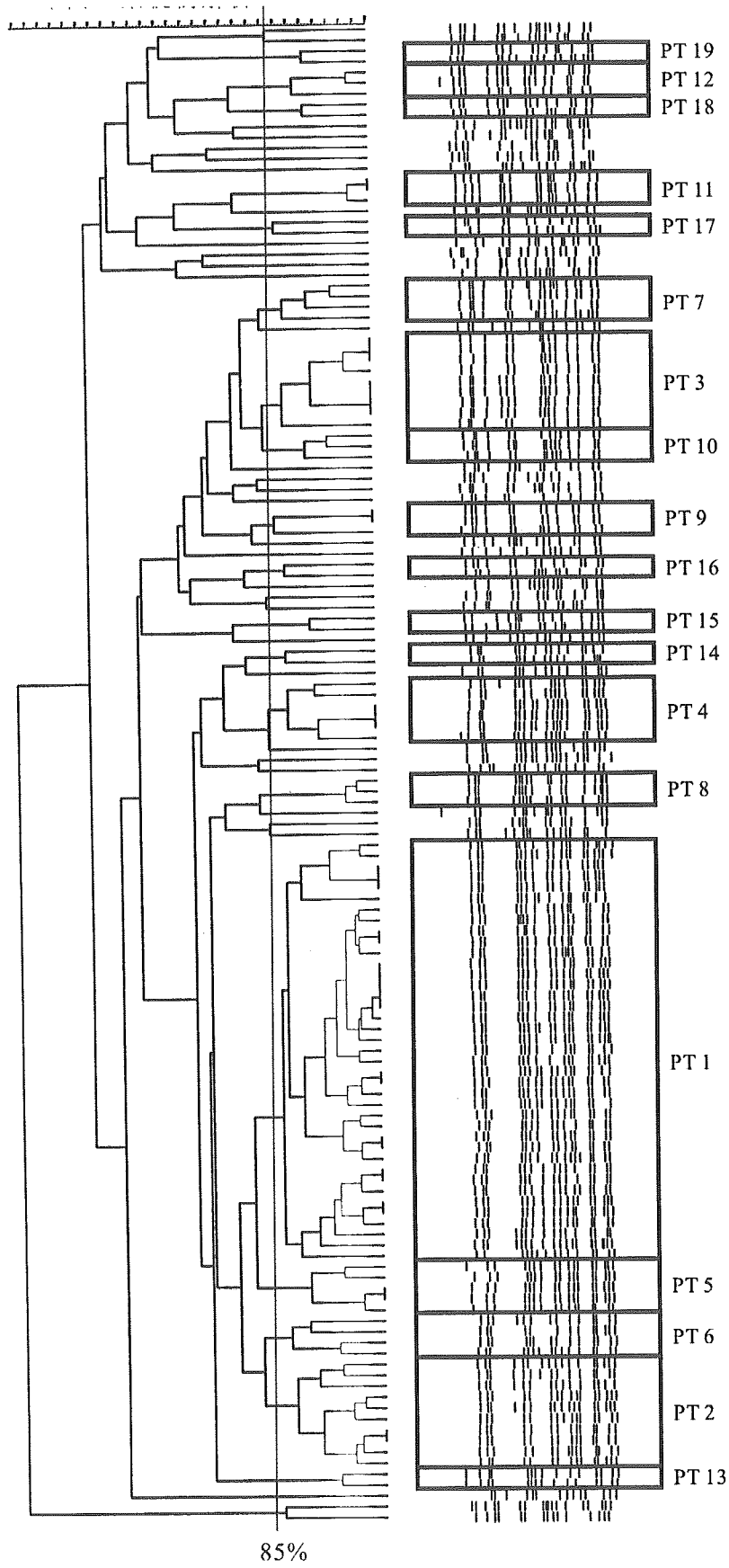




図2 愛知県で検出された *S. sonnei* の PFGE 系統樹及びバンド模式図 C: クラスター



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 15 年度～平成 17 年度総合研究報告書（分担報告）

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

分担研究者 勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

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、分離菌株の比較解析に用いる共通の疫学指標として、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を実施するための問題点と解決法について共同研究を実施した。また、集団発生や散发事例の疫学解析に PFGE 法を応用し、事例間の関連性や感染源を調査した。国立感染症研究所が提案した CDC PulseNet と比較可能な「新プロトコール」を用いることにより、サイズの小さいバンドが明瞭になり、技術的な施設間差はある程度解消された。また、従来法に比べて簡便で所要時間が短いことから、より迅速な行政対応が可能になると考えられた。画像解析ソフトの自動バンド認識が目視と異なった場合には、解析者が目視補正を行ったが、解析者によって認識バンド数に差の出る菌株が見られ、これは画像のコントラストに施設間差があるためと考えられた。各施設の事例報告で、細菌学的疫学解析における PFGE 法の有用性が確かめられたが、施設間で PFGE 画像を比較する際には、解析者の主観を最小限にとどめるためにも、画像のコントラストを均質にする必要があり、高い解像度の画像を安定して得られるように、電気泳動装置および画像取り込み装置の保守点検や技術の維持が課題である。

A. 研究目的

細菌性感染症の疫学調査において、分離菌株の遺伝子解析の手段として、パルスフィールド電気泳動（PFGE）法の有用性は確立されている。食品由来感染症の広域多発発生を迅速に探知するため、国立感染症研究所（NIID）を中心に、パルスネットジャパンを構築しているが、それぞれの地方衛生研究所（地研）で共通の疫学指標として PFGE 法を実施するには、方法の標準化を図

り施設間差を解消する必要があった。平成 15 年に、NIID より CDC PulseNet と比較可能で、より鮮明な PFGE 画像が得られる新しいプロトコールの提案があったことから、近畿ブロック内の 11 箇所の地研で新プロトコールを実施し、標準化への有用性および問題点について検討した。また、実際の事例について PFGE 法を始めとする細菌学的疫学解析を行い、その結果を行政へ還元することを目指した。

## B. 研究方法

### B-1. 新プロトコールによる施設間変動の検討

#### 1. 供試菌株

PFGE 法の施設間差と解析者による変動を調べるため、最近 diffuse outbreak の発生が見られた腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 および *Shigella sonnei* と食中毒発生の多い *Salmonella Enteritidis* について、大阪府立公衆衛生研究所保存株を精度管理株として各施設に配布した (表 1)。

#### 2. PFGE 法

平成 15 年度に NIID より示された新プロトコールに準じ、Proteinase K 処理を 50°C 一夜、制限酵素処理を 37°C 2 時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した (表 2)。制限酵素は、EHEC O157 および *S. sonnei* には *XbaI* を、*S. Enteritidis* には *BlnI* を用いた。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *XbaI* 切断を使用し、平成 15 年度は比較のためラムダラダーも使用した。

平成 15 年度は、同一ロットのトリプテケースソイブロス (BBL)、SeaKem Gold Agarose (タカラ)、Pefabloc SC、制限酵素、制限酵素インキュベーションバッファー H (以上 Roche) を一括購入し各施設に配布した。平成 16 年度は、プラグ作成および電気泳動には SeaKem Gold Agarose の使用を指定したが、ロットは統一せず、他の試薬は各施設で日常使用している製品を用いた。また、電気泳動には、各施設で日常使用して

いるバッファーと統一バッファー (Invitrogen、同一ロットを配布) を使用し、同時に作製したゲルブロックで 1 回ずつ泳動した。平成 17 年度は、SeaKem Gold Agarose を指定した以外は、各施設で日常使用している製品を用いた。

電気泳動条件は、平成 15 年度は 14°C で 19 時間と指定したが、平成 16 年度以降は、14°C で各施設の泳動装置でゲル下端から 1 ~ 1.5cm 程度の泳動距離になるまで泳動した。

#### 3. PFGE 画像の解析

PFGE 画像を電子メールで施設 X に集約し、施設 X (A 解析者) および施設 Y (B 解析者) の 2 箇所、FingerprintingII バージョン 3 (Bio-Rad) を用いて解析した。

平成 15 年度は、バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 3~20%、ショルダー感度 0 で行い、20.5kb~1135kb 間のバンドについて類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0.14%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。平成 16 年度および 17 年度は、最小ピーク高さ 5%、ショルダー感度 0 でバンド検索を実施し、目視で補正した後、20.5kb~1135kb 間のバンドについて類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

### B-2. PFGE 法を用いた事例解析

各施設で発生した集団事例および散发事例について、患者および食品から分離され

た菌株を使用した。PFGE 法は、菌種によって PFGE New Protocol-Kinki あるいは各施設の方法を使用した。

### B-3. 2005 年夏季流行菌型のさかのぼり調査

各施設で 2005 年 5～8 月に分離あるいは収集された EHEC O157 を任意に選んで供試した。PFGE 法は PFGE New Protocol-Kinki に従い、試薬は各施設で日常使用している製品を使用した。

PFGE 画像は、電子メールで施設 X に集約し、B-1 の平成 17 年度と同じ条件で A 解析者がデンドログラムを作成した。

## C. 研究結果と考察

### C-1. 新プロトコールによる施設間変動の検討

#### 1. 新プロトコールの有用性

新プロトコールの大きな特徴は、サイズマーカーに CDC PulseNet の標準株である *S. Braenderup* の *XbaI* 切断を用いる点である。平成 15 年度は、従来法との比較のためラムダラダーと標準株を同時に使用したが、ラムダラダーは施設によって非常に薄い、あるいは見えないバンドがある一方、バンドが太くピーク認識が困難な画像が見られた。標準株は被検株と使用菌液濃度が同じで、ラムダラダーに比べて輝度の均一な画像を得ることができ、1135kb から 20.5kb の範囲に分散してバンドが見られることから、サイズマーカーとして適切であると考えられた。また、平成 16 年度以降は、泳動像のコントラストを「マーカーの band 9 と band

10 が明瞭に 2 本に分かれ、band 16 が認識できること」と具体的に指示できるようになった。

さらに、電気泳動用アガロースとパルスタイムの変更により、従来法よりもサイズの小さいバンドが明瞭に区別できるようになった。リゾチーム処理が省略され、所要時間が短くなったことも利点である。しかし、ディスプレイプラグモールドに替えて使用するサンプルプラグキャストは、高価で多検体処理に難点があり、消毒洗浄を繰り返すことにより電気泳動像に悪影響が出る可能性について考慮しなければならない。

#### 2. 各施設における泳動条件

泳動温度の設定は 11 地研とも 14℃であったが、平成 15 年度は泳動時間を 19 時間に指定したところ、施設によって泳動距離が異なった。平成 16 年度以降は、ゲル下端から 1～1.5cm 程度の泳動距離になるまで泳動したが、平成 16 年度は 18 時間～20 時間、平成 17 年度は 17～20 時間の開きがあった。これは、泳動バッファの組成や電気泳動槽の冷却能力によるものと考えられた。

#### 3. 施設間変動について

EHEC O157 は、3 年間で 13 株について検討したが、いずれも菌株ごとに近似度 90% 以上のクラスターになった (表 3)。菌株によってバンド数やパターンが異なるため単純に比較はできないが、年々認識バンド数のばらつきは小さくなり、100%一致する画像も増加していた。平成 15 年度には試薬を、平成 16 年度には泳動バッファを統一した

が、各施設の試薬を用いた平成17年度の近似度が最も高く、施設間差解消には試薬の統一は関係なく、技術の向上が大切であると考えられた。解析者間および施設間で認識バンド数が異なった画像は、太いバンドが1本あるいは2本と判定される、または小さいサイズに多数のバンドが見られるパターンであった。

平成15年度は、*S. Enteritidis* 5株についても検討したところ、167.1kb（マーカー band 10）以下にバンドの多い2株は認識バンド数のばらつきも大きく、近似度も低い結果になった（表4）。特にH15-9は両解析者とも認識バンド数に7-8本の違いがあり、近似度は84-85%であった。画像解析に際して、デフォルト値である最小ピーク高さ5%でバンド検索したところ、目視判定と大きく異なったため、画像ごとに目視と一致する最小ピーク高さを設定したが、コントラストの弱い画像では認識バンド数が少ない傾向が見られた。H15-6-8は近似度93%-100%のクラスターになったが、認識バンド数が10-13本と少なく、疫学指標として使用するには別の制限酵素を用いたPFGE型別やフェージ型別との併用が望ましいと考えられた。

自治体によっては細菌性赤痢の発生がなく、赤痢菌の遺伝子解析の経験がない施設もあるため、平成16年度は*S. sonnei*についても検討した。H16-6は1施設でスメアな泳動像になったため、10施設の画像で解析した。同時に実施したEHEC O157（H16-1-3）に比べて近似度が低く、100%一致画像も少

ない結果であったが、これは、*S. sonnei*のバンド数がEHEC O157よりも多く、両解析者ともに認識バンド数のばらつきが大きくなったことが影響したと考えられる（表5）。特に76.8kb（マーカー band 14）以下のバンド認識において、*S. sonnei*は多いもので10本あり、同一株の画像でも2-5本の違いが見られた。また、H16-5は相転換によりPFGEパターンが2本異なることが確認された。H16-6がスメアになった施設では、I相菌を再選択する、泳動バッファーに50μMチオ尿素を加えるなどの検討を行ったが改善されず、原因は不明であった。実際の*S. sonnei*事例発生に際しては、II相菌を供試しないよう菌株の輸送や保存にも配慮する必要がある。

## C-2. PFGE法を用いた事例解析

各施設で発生した集団食中毒や散発事例由来株について細菌学的疫学解析を実施し、事例間の関連性や原因食品を明らかにして、行政へ還元することができた（表6）。

### 1. *Salmonella Enteritidis*

2003年に兵庫県で発生した事例では、保育園児4名と給食の卵サラダから分離された*S. Enteritidis* 18株について、*BlnI*および*XbaI*のPFGE型が完全に一致し、保育園を原因施設とした食中毒であることが科学的に裏付けられた。

### 2. *Listeria monocytogenes*

大阪市内で市販されているスモークサーモン等のready-to-eat水産加工品95検体から分離された*L. monocytogenes* 13株について、

PCR 法による病原遺伝子の検出と PFGE 型別を実施した。その結果、全株が対象とした 5 つの病原遺伝子を保有しており、ヒトへの感染源となる可能性が示された。また、PFGE 型は 5 つに分かれたが、同一の製造元からは血清型および PFGE 型の同じ菌株が分離される傾向が認められた。特に製品の汚染率が高かったある製造元では、調査実施時期が異なる製品から PFGE 型の一致する株が分離されており、さらに 1 検体からは血清型および PFGE 型の異なる 2 株が分離された。PFGE 法は同一血清型の株をさらに分類することが可能であった。

### 3. EHEC O157

2003 年に大阪府で発生した EHEC O157 感染者は 76 名であったが、このうち約 33% にあたる 25 名が 8 月に発生していたことから、因果関係の解明と感染拡大防止を目的に分離菌株の疫学解析を行った。25 名の内訳は家族内発生 5 事例 12 名、散发発生 13 事例で、PFGE 型は 9 タイプに分かれたが、このうち 8 事例由来 10 株は血清型 O157:HNM、毒素型 Stx 2 で PFGE 型が一致していた。この菌型は大阪府南部の隣接した地域で 2-10 才の小児に発生しており、共通の疫学事象を再調査したが、感染源につながる情報は得られなかった。しかしながら、4 名は HUS を併発しており、病原性の面からも、本菌型の今後の動向が注目された。これ以外にも異なる事例間で PFGE 型の一致が見られたが、いずれも感染源の解明には至らなかった。

また、2004 年 8 月には大阪府内の親類関

係の 3 家族 11 名が会食し、その後小児 4 名と祖父の EHEC O157 感染が明らかになった。5 名から分離された 24 株について、薬剤感受性試験、*XbaI* および *BlnI* を用いた PFGE 型別を実施したところ、4 種類の菌型に分類され、初発患者の兄と祖父からは複数の菌型が検出された。祖父は、初発患者の兄弟である無症状感染者 2 名を自宅に預かり世話をしていたことから、二次感染が疑われたが、他の 4 名とは異なる型が分離されていたことから、複数の菌型の EHEC O157 に汚染された食事が感染源であると推察された。このように、複数の菌型で汚染された食品を原因とする場合は、患者から分離される菌型が一致しないことがあり、1 名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。

同様の事例は 2005 年にも発生した。大阪府で発生した 6 件の EHEC O157 食中毒事例について *XbaI* および *BlnI* を用いた PFGE 解析を実施したところ、5 事例由来の 19 株では事例内で菌型が一致し、喫食調査を裏付ける成績が得られた。しかし、1 事例では事例内で菌型が異なったため、5 名から分離された 10 株について検討したところ、3 種類の菌型に分かれ、生レバーあるいはユッケの喫食と整合性が得られる結果となった。

### 4. 黄色ブドウ球菌

2003 年-2004 年に滋賀県で食中毒事例などから分離された黄色ブドウ球菌 39 株について、コアグララーゼ (Coag) 型、エンテロトキシン (Ent) 型、PFGE 型による菌株間の関連性を調査した。39 株は Coag 型および

Ent型の組合せで5種類のタイプに分かれたが、PFGE型では8種類に分類された。同一事例内ではCoag型、Ent型、PFGE型は一致したが、事例が異なるとCoag型およびEnt型が同じでもPFGE型は異なった。PFGE型は他の2つに比べより詳細な情報が得られ、常在菌でもある黄色ブドウ球菌においては、感染源や感染経路の解明に有用性が高いと考えられた。

#### 5. *Shigella sonnei*

2004年6月に兵庫県下の隣接地域で*S. sonnei*による赤痢患者が2名発生したが、いずれも海外渡航歴がなく、発症日が同じであった。分離菌株の薬剤感受性試験、PFGE型別を実施したところ、2株ともテトラサイクリン、ストレプトマイシン、ST合剤の3剤耐性で、*Xba*Iおよび*Bln*Iを用いたPFGE型は一致していた。以上の結果より、共通の感染源として食品が疑われたが、喫食状況が明確でなく、感染源の特定には至らなかった。

#### 6. *Yersinia enterocolitica*

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、*Y. enterocolitica* O8感染であることが判明した。患者便16検体、リンゴサラダ、サラダの食材（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分離された菌株について、PCRによる病原遺伝子検査および生物型、PFGE型、薬剤感受性試験を実施したところ、全株で*ail*、*virF*、*yst* (American strains) が検出され、生物型、*Xba*I、*Not*IによるPFGE型別も一致した。また、全株アンピシリン

耐性であった。本事例は、園児182名中42名が発症し、そのうち13名が入院した。患者に共通する症状は、39～40℃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、下痢を呈する患者は少なかった。臨床症状から、担当医がエルニシア感染を疑い原因解明の一助となったが、分離株の精査により食中毒であることが裏付けられた。

#### 7. 腸炎ビブリオ

2005年10月に兵庫県下で腸炎ビブリオ集団食中毒が発生し、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5株、食品由来株1株についてPCRによる病原遺伝子検出とPFGE型別を行った結果、6株とも*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、*Asc*I、*Not* I及び*Sfi* Iで切断したPFGEパターンは全株で一致していた。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が、今回の食中毒は新型クローンに汚染されたイカソーメンが原因食品であったことが確認された。

#### C-3. 2005年夏季流行菌型のさかのぼり調査

各自治体で分離されたEHEC O157について、10施設から2～15株のPFGE画像が電送され、合計84株(Stx1 Stx2産生株61株、Stx2産生株23株)について、デンドログラ

ムを作成した。

100%一致した画像は13組43株あり、このうち7組は異なる自治体の分離株であったことから、近畿ブロックには潜在的に広域発生事例のあることが推察された。特に100%一致した12株とこれと1〜2本異なる11株の計23株は、近似度94.8%のクラスターになり、関連性が示唆された。

#### D. 結論

別々の施設で実施した PFGE 画像を比較して、菌株の異同を判断するためには、方法の統一と標準化が必要である。平成15年度にNIIDより「新プロトコール」が提案され、マーカーの画像が鮮明になり、被検菌株はサイズの小さいバンドが明瞭に分離されるようになったことから、近畿ブロック11地研の技術的な施設間差は解消された。今後は電送画像による菌株の比較解析が可能であり、PFGE法の所要時間が短縮されたことから、行政的貢献が期待される。

しかしながら、菌株によってはバンドが隣接するパターンを示すことがあり、正確なバンド認識には解像度の高い画像が必要である。画像のコントラストやバンドの明瞭さに見られる施設間差の解消には、電気泳動装置の冷却能力やトランスイルミネーターの紫外線強度、写真撮影条件に関する改善が課題である。また、新プロトコールではプラグの取り扱いが容易になったとはいえ、PFGEの実施にはある程度の熟練が必要であり、各施設で技術が継承されるように努めるべきである。

食品流通や外食産業の現状から、食品由来感染症は広域で発生するリスクが高い。特に近畿ブロックは、住民が通勤通学などの生活圏を共有しており、各自治体では散发事例でも、感染源が共通するケースが多いと考えられる。このような事例を迅速に探知し、感染拡大を防止するためには、発生动向調査を通じた連携とともに、分離菌の精査と比較に基づいた科学的な裏付けが必要であり、共通の疫学指標としてPFGE型別法は有用性が高い。引き続き、各施設で良好なPFGE画像が得られるよう、ソフト面とハード面の維持管理が重要である。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

- (1)丸岡捷治, 山野親逸, 原田 保, 伊藤千恵, 小石智和, 竹上修平: *Salmonella* Enteritidis 集団食中毒事例—京都市, 病原微生物検出情報, 24:214-215 (2003)
- (2)辻 英高, 池野まり子, 押部智宏, 西海弘城, 大嶋香保理, 山本昭夫, 山岡政興, 濱田大輔, 東 美鈴, 馬淵 理, 大町隆生, 馬場博章, 藤本享男: 腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例—兵庫県, 病原微生物検出情報, 24:326 (2003)
- (3)塚本定三, 田口真澄, 神吉政史, 川津健太郎, 河合高生, 依田知子, 久米田裕子, 浅尾 努, 濱野米一, 石橋正憲, 勢戸和子, 小林一寛: 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium による大規模食中毒, 病原



- 微生物検出情報, 25:99-100 (2004)
- (4) 福味節子, 平野 隆, 渡辺正義, 三上信彦: 施設で集団発生した腸管出血性大腸菌感染症一京都市, 病原微生物検出情報, 25:147 (2004)
- (5) 山野親逸, 辻 尚信, 竹上修平, 原田 保, 伊藤千恵, 小石智和, 丸岡捷治: リジン脱炭酸試験陰性の *Salmonella* Enteritidis による集団食中毒事例一京都市, 病原微生物検出情報, 25:154-155 (2004)
- (6) 大中隆史, 横田正春, 山内昌弘, 中村 武, 内野清子, 田中智之, 中口博行, 浦崎健次: *Salmonella* Infantis による食中毒事例一堺市, 病原微生物検出情報, 25:303-304 (2004)
- (7) 福永真治, 辻 英高, 西海弘城, 山本昭夫, 大島香保理, 山岡政興, 盆子原宗司, 関めぐみ, 小林ゆかり, 大槻美幸, 前田新造, 平田きよえ: 保育所における腸管出血性大腸菌O26 集団感染事例一兵庫県, 病原微生物検出情報, 26:73-74 (2004)
- (8) Nakamura, H., Hatanaka, M., Ochi, K., Nagao, M., Ogasawara, J., Hase, A., Kitase, T., Haruki, K., Nishikawa, Y.: *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan, Int. J. Food Microbiol. 94:323-328 (2004)
- (9) 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)
- (10) Sakai, T., Nakayama, A., Hashida, M., Yamamoto, Y., Takebe, H. and Imai, S.: Outbreak of Food Poisoning by *Yersinia enterocolitica* Serotype O8 in Nara Prefecture: the First Case Report in Japan, Jpn. J. Infect. Dis., 58:257-258 (2005)
- (11) Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Yagita, K., Endo, T., Ikeno, M., Tsuji, H., Taguchi, M., Kobayashi, K., Ishii, E., Watanabe, H.: Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with *Legionella pneumophila* serogroup 5, Epidemiol. Infect., 134:385-91(2006)
- G.知的財産権の出願・登録状況  
なし
- H.研究協力機関および協力研究者  
滋賀県立衛生科学センター  
石川和彦、川端彰範、井上朋宏、林 賢一  
京都府保健環境研究所  
藤原恵子  
京都市衛生公害研究所  
平野 隆、竹上修平、福味節子  
大阪市立環境科学研究所  
小笠原準、中村寛海、長谷 篤  
堺市衛生研究所  
横田正春  
兵庫県立健康環境科学研究所  
西海弘城、福永真治、辻 英高、押部智宏、池野まり子

神戸市環境保健研究所

黒川 学

姫路市環境衛生研究所

川西伸也

奈良県保健環境研究センター

榮井 毅、中山章文、橋田みさを、

山本安純

和歌山市衛生研究所

金澤祐子

大阪府立公衆衛生研究所

田口真澄、山崎 渉、塚本定三、

小林一寛

表1 施設間変動の検討に用いた菌株

実施年度	菌株No.	菌種	分離年	備考
平成15年度	H15- 1	EHEC O157:H7	2002	IIa IIa I
	H15- 2	EHEC O157:H7	2001	Va ND ND
	H15- 3	EHEC O157:H7	2002	III f V IV
	H15- 4	EHEC O157:H7	2002	ND ND I
	H15- 5	EHEC O157:H7	2002	IIa ND ND
	H15- 6	<i>Salmonella</i> Enteritidis	2003	
	H15- 7	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1994	フェージ型12
	H15- 8	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1996	
	H15- 9	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1994	フェージ型22
	H15- 10	<i>Salmonella</i> Enteritidis	1994	フェージ型34
平成16年度	H16- 1	EHEC O157:H7	2004	IIa IIa I
	H16- 2	EHEC O157:H7	2004	IIIa ND ND
	H16- 3	EHEC O157:H7	2004	ND ND III
	H16- 4	<i>Shigella sonnei</i>	1998	
	H16- 5	<i>Shigella sonnei</i>	2001	
	H16- 6	<i>Shigella sonnei</i>	2004	
平成17年度	H17- 1	EHEC O157:H7	2005	a88
	H17- 2	EHEC O157:H7	2005	a140
	H17- 3	EHEC O157:H7	2005	a222
	H17- 4	EHEC O157:H7	2005	a248
	H17- 5	EHEC O157:H7	2005	a254

表2 プロトコールの比較

	PFGE New Protocol - Kinki	感染研 New Protocol	CDC Protocol
Cell suspension buffer	DW TSB 一夜培養液	DW OD610nm=0.5-0.6	100mM Tris:100mM EDTA, pH8.0 OD610nm=1.3 - 1.4
Plug agarose	1% SeaKem Gold agarose  in DW Cell suspension 200 $\mu$ l +1% agarose 200 $\mu$ l	1% SeaKem Gold agarose  in DW Cell suspension 200 $\mu$ l +1% agarose 200 $\mu$ l	1% SeaKem Gold:1%SDS agarose in TE buffer Cell suspension 400 $\mu$ l + Proteinase K(20mg/ml) 20 $\mu$ l +1% agarose 400 $\mu$ l
Lysis buffer	1mg/ml Proteinase K, 1% N-laurylsarcosine in 0.5M EDTA 1ml  50°C, over night	1mg/ml Proteinase K, 1% N-laurylsarcosine in 0.5M EDTA 1ml  50°C, 2h - over night	Cell Lysis Buffer (50mM Tris:50mM EDTA,pH8.0 +1%Sarcosyl) 5ml + Proteinase K(20mg/ml) 25 $\mu$ l 54°C, 1.5 - 2h with vigorous agitation
Washes	4mM Pafabloc SC in TE 500 $\mu$ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min Enzyme buffer 200 $\mu$ l on ice, 20min	4mM Pafabloc SC in TE 500 $\mu$ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min Enzyme buffer 200 $\mu$ l on ice, 20min	Sterile water 10 - 15ml 50°C, 10 - 15min, twice TE 10 - 15ml 50°C, 10 - 15min, 4 times 1xH buffer 200 $\mu$ l 37°C, 5 - 10min/ RT, 10 - 15min
Restriction digestion	30unit/sample enzyme buffer 100 $\mu$ l 37°C, 2h	20~30unit/sample enzyme buffer 100 $\mu$ l 37°C, 2h - over night	Restriction enzyme mixture 200 $\mu$ l(50U/sample) 37°C, 1.5 - 2h
Electrophoresis conditions	EHEC, <i>Shigella</i> 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 19h 14°C, 0.5xTBE non-typhoidal <i>Salmonella</i> 6V/cm, 2.2 - 63.8s, 21h 14°C, 0.5xTBE	EHEC, <i>Shigella</i> 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 19h 14°C, 0.5xTBE non-typhoidal <i>Salmonella</i> 6V/cm, 2.2 - 63.8s, 21h 14°C, 0.5xTBE	EHEC, <i>Shigella</i> 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 21h 14°C, 0.5xTBE non-typhoidal <i>Salmonella</i> 6V/cm, 2.2 - 63.8s, 21h 14°C, 0.5xTBE
Marker	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I)	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I)	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I)