

表3 EHEC O157 を用いた画像解析の結果

菌株No.	泳動Buffer	A解析者		B解析者	
		近似度 ^a	認識バンド数 ^b	近似度	認識バンド数
H15- 1		93	16, 17, 18, 19	95	18, 19
H15- 2		90	18, 19, 20, 21, 24	93	18, 20, 21
H15- 3	各施設	92	19, 20, 21, 22	97	20, 21, 22
H15- 4		93	17, 18, 19, 20	97	17, 18
H15- 5		90	17, 19, 20, 21, 22	97	20, 21
H16- 1	統一	97	17, 18, 19	96	17, 18, 19
	各施設	96	17, 18, 19	93	16, 18, 19
H16- 2	統一	94	18, 19	97	18
	各施設	95	17, 18, 19	93	18, 19, 20
H16- 3	統一	91	18, 19, 20, 21, 23	96	20, 21, 22
	各施設	91	17, 18, 19, 20, 21, 22	92	18, 21, 22
H17- 1		98	22, 23	97	22, 23
H17- 2		98	20, 21	96	18, 19, 20
H17- 3	各施設	95	19, 20, 21, 22	98	20, 21
H17- 4		94	19, 20, 21, 22	96	19, 20, 21
H17- 5		94	16, 17, 18, 19	96	16, 17, 18

a 近似度 (%)

b 認識バンド数 (本)

表4 *S. Enteritidis* を用いた画像解析の結果

菌株No.	A解析者		B解析者	
	近似度 ^a	認識バンド数 ^b	近似度	認識バンド数
H15- 6	93	11, 12, 13	94	11, 12
H15- 7	93	10, 11	100	10
H15- 8	93	10, 11, 12	93	10, 11, 12
H15- 9	84	13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21	85	13, 16, 17, 18, 19, 20
H15- 10	90	15, 16, 18, 19, 20	91	15, 16, 18, 19

a 近似度 (%)

b 認識バンド数 (本)

表5 *S. sonnei* を用いた画像解析の結果

菌株No.	泳動Buffer	A解析者		B解析者	
		近似度 ^a	認識バンド数 ^b	近似度	認識バンド数
H16- 4	統一	90	19, 20, 21, 23, 24	87	17, 20, 21, 23
	各施設	87	17, 19, 20, 21, 22, 23	91	18, 19, 20, 21, 22
H16- 5	統一	89	20, 21, 22	85	17, 19, 21, 22, 23
	各施設	88	19, 20, 21, 22, 24	91	18, 20, 21, 22, 23
H16- 6	統一	89	18, 19, 20, 22, 23	90	18, 19, 20, 21, 22, 23
	各施設	91	18, 19, 20, 21, 22	91	17, 18, 19, 21, 23

a 近似度 (%)

b 認識バンド数 (本)

表6 近畿ブロックにおける PFGE 解析事例

報告年度	No.	タイトル	報告機関	報告者名
15年度	1	卵サラダを原因とした <i>S. Enteritidis</i> による集団食中毒事例	兵庫県立健康環境科学研究センター	西海弘城、辻英高、押部智宏、池野まり子
	2	市販のスモークサーモンから分離された <i>Listeria monocytogenes</i> のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析	大阪市立環境科学研究所	中村寛海、小笠原準、長谷 篤
	3	2003年8月に大阪府で発生した腸管出血性大腸菌 O157 事例のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析	大阪府立公衆衛生研究所	田口真澄、小林一寛、勢戸和子
16年度	4	食中毒事件等由来の黄色ブドウ球菌におけるパルスフィールド電気泳動法を用いた解析	滋賀県立健康環境センター（現滋賀県衛生科学センター）	石川和彦、川端彰範、井上朋宏、林 賢一
	5	国内感染例から分離された赤痢菌 <i>Shigella sonnei</i> の菌型解析	兵庫県立健康環境科学研究センター	西海弘城、辻英高、福永真治
	6	腸管出血性大腸菌 O157 による家族内感染事例の PFGE 解析 —異なった PFGE 型が検出された 1 事例について—	大阪府立公衆衛生研究所	田口真澄、松根涉、塚本定三、勢戸和子
17年度	7	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	兵庫県立健康環境科学研究センター	西海弘城、辻英高、福永真治
	8	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）	奈良県保健環境研究センター	柴井 毅、中山章文、橋田みさを、山本安純
	9	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	大阪府立公衆衛生研究所	田口真澄、山崎涉、塚本定三、勢戸和子

厚生科学研究費補助金（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)

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	榎美代子 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
	角森よしえ	島根県保健環境科学研究所
	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
	谷好史 森敏彦 笹川知位子	徳島県保健環境センター
	河本秀一 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、3 年度に渡り、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)10 施設が参加し、PFGE タイプの異なるサルモネラと腸管出血性大腸菌 O157(O157)各 4 株を供試菌株として、新しいプロトコールによる PFGE を実施し、考察を加えた。

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。平成 15 年度からの精度管理では、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、サルモネラと

O157 を用いて PFGE 解析の制度管理を行い、技術的問題点等について指摘・改善していくことを目的とした。さらに、感染症の PFGE 解析に関連した基礎的研究も実施したので、その結果について報告する

B. 研究方法

1. PFGE 技術の精度管理

中四国ブロックの 10 施設が共通した菌株（*Salmonella* Enteritidis と腸管出血性大腸菌 O157:H7）を用いて精度管理を実施した。

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、島根県保健環境科学研究所、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広島市衛生研究所が胃腸炎患者から分離した *Salmonella* Enteritidis の 4 株と国立感染症研究所から分与を受けた腸管出血性大腸菌 O157:H7 の 4 株を使用した。

3) PFGE

方法は感染研ニュープロトコールに準拠した。詳細は平成 15、16、17 年度分担研究報告書に記述したとおりである。

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。

2. PFGE 解析に関連した基礎的研究

各地研が独自に PFGE 解析に関連した基礎的研究を行なった。研究課題は次のとおりであった。

1) *Salmonella* Enteritidis での制限酵素別 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 像の違いとファージタイプとの関連性について (平成 15 年度: 高知県衛生研究所)

2) 同一遺伝子型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来菌株の疫学マーカーによる相同性の検討 (平成 15 年度: 広島市衛生研究所、広島県保健環境センター)

3) ND, II a, ND 型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討 (平成 16 年度: 広島市衛生研究所)

4) 2004 年中・四国ブロックで分離された *Salmonella* Virchow のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 (平成 16 年度: 愛媛県立衛生環境研究所)

5) *Salmonella* Enteritidis におけるパルスフィールドゲル電気泳動像とファージタイプとの関連性について (平成 16 年度: 高知県衛生研究所)

6) 散発例由来 *S. Enteritidis* の遺伝子型の特徴 (平成 16 年度: 広島県保健環境センター)

7) *Salmonella* Virchow の PFGE データベース化の検討 (平成 17 年度: 愛媛県立衛生環境研究所)

8) *Legionella pneumophila* SG1 の遺伝子解析について (平成 17 年度: 広島県保健環境センター)

9) 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 (平成 17 年度: 広島市衛生研究所)

C. 研究結果

1. PFGE 技術の精度管理

平成 15 年度は 8 施設が精度管理に参加し、*Salmonella* Enteritidis 4 株と腸管出血性大腸菌 O157 の 4 株を供試菌株として、統一したプロトコール (感染研ニュープロトコール) で PFGE を実施し、各施設間の PFGE 画像を比較した。さらに、異なった 2 つの集菌方法 (プイヨンからの集菌法とプレートからの集菌法) による PFGE 画像の影響についても比較・検討を加えた。精度管理の結果、1 施設の画像を除き、ほとんどの施設で概ね良好な画像が得られた。(1 施設の画像はサルモネラ、O157 とも不明瞭であったが、これは技術的な問題によるものではなく泳動装置の不良によるものであった。) さらに、画像をもとに画像解析ソフトで解析を行い施設間の差異を確認したところ、サルモネラおよび O157 ともタイプの異なる 4 株はそれぞれ異なるクラスターを形成 (類似値 90% 以上) したが、同一菌株の一部に集菌方法などの違いによる技術的問題または菌株の変異に起因すると推

察される差異が認められた。

平成 16 年度は 9 施設が参加し、腸管出血性大腸菌 O157 の 4 株を供試菌株として精度管理を実施した。その結果、概ね良好な画像が得られたが、3 施設の作成した画像の一部に不鮮明な個所が認められた。また、画像解析ソフトによるクラスター解析で施設間の差異を確認したところ、O157 の 4 株はそれぞれ異なるクラスターを形成（類以値 55～100%）したが、不鮮明な画像のクラスターは低い値（類以値 55%）であった。

平成 17 年度は 9 施設が参加した。供試菌株は前年度と同一の腸管出血性大腸菌 O157 の 4 株とし、8 施設の PFGE 画像について比較・検討を加えた（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）。その結果、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には不鮮明な部分が認められた。これらの画像を画像解析ソフトでクラスター解析し、各施設間の差異を確認したところ、比較的良好的な画像の得られた 7 施設では各株の類以性が高く、それぞれ異なるクラスターを形成（類以値 92～100%）したが、不鮮明な画像のクラスターは低い値（類以値 55%）であった。また、平成 17 年度と平成 16 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。

2. PFGE 解析に関連した基礎的研究

1) *Salmonella* Enteritidis での制限酵素別 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 像の違いとファージタイプとの関連性について

要約：*Salmonella* Enteritidis の PFGE 解析において、より良い制限酵素を見つけ、またファージタイプとの関連性について検討を加えたが、供試菌株が 10 株と少数であったため明確な結果を得ることができなかった。今後、菌株数を増やし検討することとした。

（詳細は平成 15 年度分担研究報告書に記載）
2) 同一遺伝子型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来菌株の疫学マーカーによる相同性の検討

要約：複数の制限酵素による PFGE 解析に加えて他の疫学マーカーを併用すれば、菌株間の類似性をより詳細に検討することができると考えた。そこで、2003 年 9 月下旬から 10 月上旬にかけて広島・山口県内各地で発生した同一遺伝子型(II a,ND, I)の腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染症 8 事例の菌株について、また、同時期に発生した遺伝子型の異なる事例由来株も加え、同一遺伝子型事例株の相同性を 2 種類の制限酵素による PFGE 解析と薬剤感受性等の疫学マーカーの併用により、その有用性を検討した。その結果、*Xba* I と *Bln* I の制限酵素の使用による解析は、II a,ND, I 型同一パターングループ事例株と他事例株との異同の判定を容易にした。また、薬剤感受性試験の追試により、PFGE 解析結果をより詳細に分類することが出来た。（詳細は平成 15 年度分担研究報告書に記載）

3) ND, II a,ND 型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討

要約：腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例のより精度の高い分子疫学的解析方法を確立するために、2004 年 7 月中旬から 8 月中旬にかけて、広島市(7 事例)、岡山県(15 事例)、山口県(1 事例)、および徳島県(3 事例)で発生した ND, II a,ND 型による STEC O157:H7 感染症、計 26 事例から分離した 27 株について *Xba* I によるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)に加え、*Bln* I による PFGE、薬剤感受性試験、Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) による解析を行った。*Xba* I による PFGE 解析では 2 種類のクラスターに分類されたが、すべての株の相似値は 95.5%と高い値を示し

た。*BlnI* では3種類のクラスターに分類され、岡山県の3株は他の株と比較し84.3%の低い相似値を示した。薬剤感受性試験では供試12薬剤に対しすべて感受性を示した。MLVAでは、解析可能な波形ピークを用いてFinger printing IIで系統樹解析を行った結果、6種類のクラスターに分類された。*XbaI* および*BlnI* によるPFGEとMLVAによる分類の結果、供試株は13種類に分類された。以上の結果から、*XbaI* によるPFGE解析で同じND, II a, ND型を示すSTECは、*BlnI* によるPFGEおよびMLVAを併用することで、より詳細に分類することが可能であることが示された。(詳細は平成16年度分担研究報告書に記載)

4) 2004年中・四国ブロックで分離された*Salmonella* Virchowの Pulsフィールドゲル電気泳動法による解析

要約: 2004年7月から8月にかけて愛媛県内の散発下痢症患者から*Salmonella* Virchow (*S. Virchow*) が相次いで分離された。これらの菌株と同時期に食中毒患者から分離された*S. Virchow* を Pulsフィールドゲル電気泳動法(PFGE)で遺伝子解析した結果、全て同一のPFGEパターンを示した。一方、同時期に高知県および広島市で分離された*S. Virchow* の菌株のPFGEを各々の研究所において実施し、遺伝子解析を行なった。その結果、高知県と愛媛県での分離株は同一クラスターに属していたことから、この遺伝子型の*S. Virchow* が侵淫し、食中毒および散発下痢症の原因となったことが示唆された。しかし、広島市の分離株は愛媛・高知の分離株とは異なるPFGE型であった。(詳細は平成16年度分担研究報告書に記載)

5) *Salmonella* Enteritidis における Pulsフィールドゲル電気泳動像とファージタイプとの関連性について

要約: *Salmonella* Enteritidis の PFGE 解析結果とファージタイプとの関連性を調査した。その結果、PFGE 泳動像のデンドログラムでは2つのグループに大別され、1つのグループはファージタイプ1のみであった。しかし、そのPFGEパターンは類似値が低く、明確な関連性が見られなかった。(詳細は平成16年度分担研究報告書に記載)

6) 散発例由来 *S. Enteritidis* の遺伝子型の特徴

要約: *S. Enteritidis* によるサルモネラ症散発例の遺伝子型による発生状況の特徴を明らかにするため、分離株106株を用いて Pulsフィールドゲル電気泳動法による遺伝子解析を実施した。Pulsフィールドゲル電気泳動法に使用する制限酵素の分離株間のDNA識別能力について比較し、さらにコンピューターによる画像解析の有用性について検討した。その結果、制限酵素*BlnI*が*XbaI*に比べ分離株間のDNA識別能力が優れていた。コンピューターによる画像解析は、肉眼によるそれとよく一致し有用であった。デンドログラムは類似値42%で大きく2つに分岐し、それぞれに優勢な遺伝子型が存在した。優勢な遺伝子型の1つは亜型を含め主に年の前半に、もう1つの亜型のない遺伝子型は主に年の後半に検出された。(詳細は平成16年度分担研究報告書に記載)

7) *Salmonella* Virchow の PFGE データベース化の検討

要約: *S. Virchow* は他のサルモネラと同様、散発下痢症及び食中毒事例から分離されているが、比較的分離頻度が低いことから分離株のPFGEパターンの多様性が明らかになっていない。今回、全国10県・市の協力を得て、全国各地で分離された86株を収集し、PFGE型別を実施することにより、データベース化を検討した。その結果、分離株は類似

値 48～100%で 50 パターン以上のタイプに分かれ、PFGE 解析は、*S.Virchow* の diffuse outbreak の感染源究明のための手段に応用できると推察した。(詳細は平成 17 年度分担研究報告書に記載)

8) *Legionella pneumophila* SG1 の遺伝子解析について

要約：レジオネラ菌の検出感度向上のため発案したアメーバを利用した増菌法により、これまで分離検出ができなかった微量の菌が、アメーバ内で検出可能な菌量まで増殖できるかどうか、さらに元の菌とアメーバ内で増殖した菌との遺伝子変化の有無をパルスフィールドゲル電気泳動法で検討した。その結果、接種した菌量が 1ml あたり、1 以上 100 未満では、24、48、72 時間後には、それぞれ約 10^3 、 10^5 、 10^7 CFU/ml に急激に増加し、24 時間後には検出可能な菌数になった。現行の検査法では検出できない 1ml あたり 1 未満の菌を接種した場合も 48 時間後の培養液で、5 株中 4 株は $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml に増殖し、72 時間後には、 $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml になり全株検出が可能となった。また、菌の遺伝子変化の有無については、目視および解析ソフトともパターンが一致し、画像からは遺伝子変化は認められなかった。アメーバ内での増殖を利用した方法は、微量の菌の分離を可能とし、レジオネラ菌の遺伝子解析に有用と考えられた。(詳細は平成 17 年度分担研究報告書に記載)

9) 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

要約：Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA) と呼ばれる O157:H7 の遺伝子疫学解析法は、1 日で判定できるため、PFGE を行う前あるいは並行的に実施すれば、スクリーニング的な遺伝子疫学検査が行えるのではないかと考えられた。

そこで、O157:H7 の 81 株を使用して、Bjorn らの 7 種類のプライマーに Keys らの 5 種類のプライマーを加えた合計 12 種類の縦列反復繰返し配列 (VNTRs) を利用した MLVA 解析を行い、PFGE と MLVA の併用による更なる検討を行った。その結果、PFGE では同一パターンでも、MLVA では、繰返し領域の有無やその回数の異なる株があった。また、MLVA は、PCR 増幅領域の数を増やしたことで、更に細かく分類できるパターンもあり、PFGE と MLVA の併用により、株間のより詳細な解析が行えるようになった。(詳細は平成 17 年度分担研究報告書に記載)

D. 考察

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が統一したプロトコルの導入と、そ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。中・四国地区の 10 地研では平成 15 年度から、米国 CDC のプロトコルをもとに感染研が新に作成した PFGE のプロトコル (感染研ニュープロトコル) に準拠して PFGE を実施している。従来、わが国では、平成 9 年 5 月に国立感染症研究所で行なわれた技術研修会で示された PFGE 方法 (腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会マニュアル) が用いられていたが、今回の精度管理では、感染研ニュープロトコルで行なった結果、従来の方法に較べ、① DNA ブロックプラグ作製に 0.7mm のプラグキャスターを使用することで、DNA バンドがシャープで鮮明になった。② DNA マーカーとして *S. Braenderup* を基準にすることにより各施設のマーカーが的確に認識できるようになった。③ 画像解析ソフトの導入によりクラスター解析ができ、客観的判定が可能となるなど幾つかの長所が認められた。しかし、現行の新し

いプロトコールでも菌量の違いによる画像に差異、写真撮影時のコントラストによる画像への影響などいくつかの技術的問題点も認められた。また、一定の PFGE 解析技術を取得し、維持するための組織的管理体制も必要であることが示唆された。

一方、精度管理以外に各地研では 9 課題の PFGE 解析に関連した基礎的研究が実施された。これらの研究結果から PFGE 解析は O157 感染症以外にも多くの細菌性感染症の疫学調査に不可欠な検査手法であることが再認識された。また、PFGE 解析を基本に他の疫学マーカーを用いた手法を併用することにより、さらに詳細な疫学調査が迅速に行なえるものと考えられた。

E. 結論

平成 15 年から 3 年間にわたり中・四国地区の 10 地研で、感染研ニュープロトコールによる PFGE を行い、PFGE 画像作製の精度管理を実施した。各施設の画像作製技術は年度ごとに改善され、概ね安定した PFGE 画像が作製されている。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

1. Seno M., Sakaki M., Ogawa H.
Genotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolates from sporadic patients in limited area during one year.

J. Infect. 49:291-296, 2004.

2. 吉田紀美ほか 2004 年愛媛県内で分離された *Salmonella* Virchow のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた疫学的解析, 愛媛衛研年報, 7, 1~4 (2004)

3. Seno M., Sakaki M., Ogawa H., Matsuda H., Takeda Y.

Effective proliferation of low level *Legionella pneumophila* serogroup 1 cells using coculture procedure with *Acanthamoeba castellanii*.

J. Microbiol. Methods (in press).

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)

分担研究報告書

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

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, 尾崎 延芳 (福岡市保健環境研究所)

徳崎 里美, 藤田 景清 (北九州市環境科学研究所)

松雪 星子, 眞子 純孝 (佐賀県衛生薬業センター)

山口 仁孝, 山崎 省吾 (長崎県衛生公害研究所)

植木 信介, 東根 秀明, 海部 春樹 (長崎市保健環境試験所)

八尋 俊輔, 荒平 雄二 (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 喜久代 (大分県衛生環境研究センター)

岡田 美香 (宮崎県衛生環境研究所)

上野 伸広, 中山 浩一郎 (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)

村上 光一, 野田多美枝, 濱崎光宏, 石黒靖尚 (福岡県保健環境研究所)

研究要旨 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に向けた基礎的研究について、九州地区 12 地方衛生研究所の参加により平成 15 年, 16 年, 17 年の 3 カ年間実施した。本研究は、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) の技術を一定水準で恒常的に維持するために PFGE 精度管理を行なうこと、PFGE が実施可能な状態にある菌種を増やすために方法論等について検討することおよび食中毒および感染性胃腸炎原因物質の臨床症状の特徴を把握することを目的とした。

3 年間を通じて実施した PFGE 精度管理では、新規 PFGE 法について研修を行ない、不都合な点については各施設の現状にあった方法により改善され、各機関相互に比較可能な PFGE 画像が得られるようになった。また、黄色ブドウ菌、カンピロバクター、A 群溶血レンサ球菌、レジオネラ属菌の 4 菌種についての PFGE 方法等について検討し、マニュアルを作成し緊急時に対応可能な状態にした。さらに、食中毒および感染性胃腸炎について原因物質 (細菌およびウイルス) 別に臨床症状の特徴を把握するため、各機関で原因物質が検出された有症者の症状について集計し、食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組みに関する情報を提供した。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段であり、平成 12-14 年度に地方衛生研究

所 (機関) と感染症研究所 (感染研) の間の全国的な PFGE ネットワーク (パルスネット) 構築の準備がなされた。さらに、食中毒のグローバル化により全世界的規模の PFGE ネットワークを作る必要があっ

たため、これまで本邦で実施していた方法から米国 CDC の方法に平成 15 年から変更することとなった。そこで、新規 PFGE 法を用いて相互性のある PFGE 画像を得るため従来使用していたマニュアルを改変し、新規 PFGE サイズマーカー *Salmonella* Braenderup H9812 株を用いて精度管理を行なった。O157 の PFGE 法を踏まえ、他菌種での PFGE の習得並びに画像の交換ができるよう検討を行なった。3 年間で実施した菌種は、黄色ブドウ菌、カンピロバクター、A 群溶血レンサ球菌、レジオネラ属菌の 4 菌種である。また、食中毒および感染性胃腸炎原因物質の臨床症状の特徴を把握するため、九州地区全 12 機関で蓄積されている病原体が検出された有症者の臨床症状について統計的集計を行なった。

B. 研究方法

1. PFGE 精度管理

各機関で使用されている PFGE 関連機器および統一条件と異なる点についてアンケート調査を行なった。精度管理は、各年次のように行なった。平成 15 年度は米国 CDC 法に変更になったので、サイズマーカー *S. Braenderup* H9812 株や 0.7 mm サンプルプラグキャスター、PFGE 用アガー「SeaKem Gold」の調達・配布を行ない、研修会を行なった。本邦で実施していた方法と CDC 法との相違点を表 1 に示した。また、平成 15 年および 16 年度は、O157 標準株を配布し、12 機関で比較を行ない近似度により判定を行なった。平成 17 年度は、サイズマーカー *S. Braenderup* H9812 株の保存性試験も兼ね *S. Braenderup* H9812 株の DNA パターンを解析した。併せて各機関で泳動された λ -ladder のパターン比較も行なった。

2. O157 以外の菌種についての PFGE

①黄色ブドウ球菌

平成 15 年度、7 機関の参加により実施した。各機関で保有している食中毒および病院由来の黄色

ブドウ球菌について、表現型別および遺伝子型別を行ない、比較解析した。特に PFGE 法については予め条件について検討した。

②カンピロバクター

低コストで効率の良い標準化を目標として、O157 等で広く使用されている試薬組成・マニュアルに近い形で培養・菌液処理を行い、かつ *Campylobacter jejuni* の DNA degradation を最小限にするために、標準株を材料とし、特に制限酵素処理以前の段階での処理方法について比較検討した。

③A 群溶血レンサ球菌

溶菌方法および制限酵素の検討を行ない、マニュアルの作成を行なった。さらに、食中毒由来 18 株と感染症由来 20 株の計 38 株について、血清型、病原因子型および遺伝子型別を行ないその有用性について検討した。

④レジオネラ属菌

プラグ作製に使用する菌量について各機関で検討し、マニュアルを作成した。精度管理は、標準菌株を用いて実施した。また、九州地区で分離された *Legionella pneumophila* 174 株について DNA 解析を行なった。

⑤食中毒および感染性胃腸炎の病原体と臨床症状

食中毒および感染性胃腸炎の潜伏時間と下痢、嘔吐、発熱、腹痛、頭痛等の臨床症状を集計し、検討した。特に発生頻度の高い 10 病原体（Norovirus、非チフス性 *Salmonella*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Campylobacter jejuni*、*Clostridium perfringens*、腸管出血性大腸菌 (STEC)、毒素原性大腸菌 (ETEC)、*Shigella sonnei/flexneri* (*Shigella*)、*Staphylococcus aureus*、嘔吐型 *Bacillus cereus*) について解析を行った。対象としたのは 2000 年 1 月から 2004 年 12 月までに九州 10 地区の衛生研究所管内で発生した 646 症例である。

C. 研究結果

1. PFGE 精度管理

平成 15 および 16 年度は、O157 標準菌株を用いて精度管理を実施した。17 年度は、サイズマーカー *S. Braenderup* と λ -ladder を用い、各機関の泳動像を比較した。図 1 に 3 年間、各機関で泳動したサイズマーカーを示した。

15 年度は、各機関から送信されてきた画像からサイズマーカー *S. Braenderup* を自動バンド検出し、明らかなゲル中の汚れやノイズによるバンドを削除した。これら各機関の DNA バンドを感染研のそれを Golden standard として比較した。解析は、類似性係数バンドタイプ Dice 法、デンドログラムタイプ UPGMA 法、最適化 1.0%、トレランス 1.2%で行なった。その結果、サイズマーカー *S. Braenderup* の類似性は、全体で 67%、第 2 のクラスターで 86%であった。このような状況で O157 標準株を比較することができなかった(図 2)。

16 年度は、同様に各機関から送信されてきた画像からサイズマーカー *S. Braenderup* H9812 株の DNA バンドを九州地区独自に Golden standard を作製し、比較した。解析は、類似性係数バンドタイプ Dice 法、デンドログラムタイプ UPGMA 法、最適化 1.0%、トレランス 1.2%で行なった。その結果、サイズマーカー *S. Braenderup* H9812 株の類似性は、全体で 95.12%、第 2 のクラスターで 97%であった(図 3)。5 株の精度管理株の一致率は、86–91%であった。

17 年度は、16 年同様に各機関から送信されてきた画像からサイズマーカー *S. Braenderup* H9812 株の DNA バンドを九州地区独自に Golden standard を作製し、比較した。解析は、類似性係数バンドタイプ Dice 法、デンドログラムタイプ UPGMA 法、最適化 0%、トレランス 1.0%で行なった。その結果、サイズマーカー *S. Braenderup* H9812 株の類似性は、全体で 93%以上であった(図 4)。

2. O157 以外の菌種についての PFGE

①黄色ブドウ球菌

食中毒由来と病院由来株の黄色ブドウ球菌では、毒素型とコアグララーゼ型の組み合わせによりそれぞれ特徴が観察された。食中毒由来株はエンテロトキシン A 型でコアグララーゼ IV および VII 型を示すものが半数以上を占め、病院由来株はメチリン耐性遺伝子保有株の 78%がエンテロトキシン C 型でコアグララーゼ II 型であった。これらは PFGE 解析でも異なるクラスターに分類された。しかし、コアグララーゼ III および IV 型を示すものについては、それぞれ食中毒由来株と病院由来株が近似度 90%以上の同一のクラスターに分類された。また、同じ病院由来菌株であっても医療従事者から注射液を介して感染した事例からの分離株は、コアグララーゼ I および V 型を示し、PFGE 解析においても食中毒由来菌株および他の病院由来菌株とは異なるクラスターに分類された。以上のことから食中毒関連調査や特異な病院内感染事例では、PFGE にさきがけて実施するコアグララーゼ型別およびエンテロトキシン型別試験が疫学的指標として有用と考えられた。しかし、コアグララーゼ II および III 型による病院内感染例では、PFGE による遺伝子解析が非常に有用であった。また、薬剤耐性パターンは、PFGE による遺伝子解析のように明快にクラスターに分けることはできないが、コアグララーゼおよび毒素型別とは違った角度からの菌株情報として有用であった。

②カンピロバクター

1) 増菌培地

菌液調整用の増菌培地 *Brucella* Broth, Bolton および Preston 培地について検討した。分離培地 (*Brucella* あるいは CCDA)で培養後、PFGE に用いた場合、増菌培地の影響は無かった。

2) 菌液のホルマリン処理法

無処理あるいはホルマリン PBS 処理時間 15 分、または 30 分で明瞭なバンドを確認し、ホルマリン処

理を加えなくても明瞭なバンドが得られることが分かった。

3) プラグ充填時の菌液温度および時間

菌液の加温温度による PFGE 結果への影響は、40℃・10 分＝無処理＞50℃＞63℃の順に良好な PFGE 結果が得られた。

4) プラグ菌量

ゲル混和時菌液濃度 OD₆₁₀=1.013, 1.825 (McFarland 2-4, 5×10⁸-1×10⁹ CFU/ml 程度) で良好な結果が得られた。

これらの結果を踏まえて新たにマニュアルを作成し、標準株を用い精度管理試験を実施し、比較解析した。その結果、おおむね90%以上の相同性を示し、良好な結果であった。しかしながら、大腸菌等に比較してバンド数が少ないため、*Campylobacter* においては *Sma* I 以外の *Kpn* I などの制限酵素についても検討する必要がある。

③A 群溶血レンサ球菌

1) 溶菌酵素の検討

溶菌酵素 Mutanolysin および Lysozyme について比較検討した。その結果、Lysozyme 処理に比べ Mutanolysin で処理をした方が明瞭なバンドを得ることができた。

2) 各事例由来株の比較

福岡市事例由来 14 株中代表 4 株と T 型別が同一の咽頭ぬぐい液由来株 3 株、熊本市事例由来株 4 株中代表 2 株と T 型別が同一の咽頭ぬぐい液由来株 3 株を *Sma* I および *Sfi* I で消化した DNA について比較した。*Sma* I および *Sfi* I ともに福岡市事例由来 4 株はいずれも同一パターンを示し、同じ T-B3264 でも咽頭ぬぐい液由来の 3 株とは異なるパターンを示した。一方、熊本市事例由来 2 株と T 型別が T-28 と同一の咽頭ぬぐい液由来の 3 株は、*Sma* I では同一パターンを示したが、*Sfi* I では集団事例由来株と咽頭ぬぐい液由来株との間で異なるパターンを示した。

3) PCR 法による *spe* 遺伝子保有状況

T-B3264 の福岡市事例由来 4 株と咽頭ぬぐい液

由来の 3 株は *speB* 遺伝子を保有し、T-28 の熊本市事例由来 2 株と咽頭ぬぐい液由来の 3 株は *speB*, *C* 遺伝子を保有しており、由来による差は認められなかった。

④レジオネラ属菌

平成 15 - 17 年度の 3 年間、標準菌株についての PFGE の精度管理およ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、17 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。

標準菌株 3 株の PFGE パターンについて、それぞれの菌株で 80%以上の類似性が見られたが、この結果は満足できるものではなかった。類似性が低くなった原因は、サイズマーカーとして使用した λ -ladder の画像の不具合が多かったことによるものであると推察された。異なる機関間の画像を解析するためには、サイズマーカーは、比較の基礎となるものであることから検討を要する。

今後、各機関で常に安定した PFGE 画像を得るために、この問題も含め、方法の検討とともに、さらなる技術的訓練が必要と考える。

また、各機関が PFGE を実施した分離株の総数は 174 株で、そのうち解析を実施した *Legionella pneumophila* serogroup (SG) 1 43 株, SG3 10 株, SG4 6 株, SG5 10 株, および SG6 20 株の PFGE パターンの類似性については、一部に 90%程度の高い類似性を示す株があったものの、概ね、85%以下であった。すなわち、制限酵素 *Sfi* I を使用した PFGE パターンは、多型を示し、疫学指標としての有用性が示された。

さらに、レジオネラ属菌の検出状況調査の結果、九州全体で 5 菌種(その他に菌種不明有り)が検出され、そのうち *L. pneumophila* については 11 血清型(その他に血清群不明有り)が確認された。

⑤食中毒および感染性胃腸炎の病原体と臨床症状

・・・別途報告

調査の結果、平均潜伏時間が最も短かったのは *B. cereus* (0.8h)、次いで *S. aureus* (3.3h)、*C.*

perfringens (10.7h), *V. parahaemolyticus* (16.4h)であった。なかでも *S. aureus* および *B. cereus* は6時間以内に *V. parahaemolyticus*, *C. perfringens* は24時間以内に、ほぼ全例が発症していた。血便を示す例は STEC と *Shigella* 以外では殆ど見られなかった。嘔吐の発現は高頻度群と低頻度群にはっきりと区別され、高頻度群としては *S. aureus* と *B. cereus* では、ほぼ全症例に見られ、Norovirus の71.5%, *V. parahaemolyticus* の56.1%が続いた。低頻度群では最高でも *C. perfringens* の22.0%であり ETEC, STEC は5%前後であった。O157 と O157 以外の STEC 株を比較すると血便・腹痛・嘔吐では O157 で有意差が見られた (P 値 0.01 以下)。

今回の調査で各病原体による臨床症状の発現頻度を具体的な数値として示すことができたほか、潜伏時間、血便、嘔吐、発熱の4項目では病原体別に特徴的な発現頻度を有する事が判明した。今回の結果は医療機関を受診するまでもない軽症者から入院を要した重傷者、また幅広い年代が含まれることから、保健所や衛生研究所が集団食中毒等の原因調査を行う際の有用な資料になると思われる。

D. 考察

「PFGE の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究」(H12 - H14)において、

H12 - H14 の結論

1. PFGE 用プラグ作成について

統一マニュアルに従ってプラグ作成を行うことにより、良好なプラグが作成可能である。

2. 泳動

- ① シングルピークで確認できるマーカーの安定供給
- ② PFGE 機器の管理と保守点検
- ③ バッファー量と温度による移動度のチェック

④ バンド認識の基準策定

⑤ 画像取込の改善

3. 迅速法によるプラグ作製法はルーチンワークに使用可能である。

九州ブロックでは上記に示す結論を得た。そこで、「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」(H15 - H17)では、H12 - H14 の結論を踏まえた精度管理の継続と新たな取り組みを加えて研究の推進を行なった。

H12 - H14 での問題点については次のように解決できた。まず、1と3については、PFGEの方法が、従来の方法を米国 CDC 法に変更されたことにより、安定的な PFGE 操作ができるようになった。即ち、プラグおよび泳動用アガロースゲルに SeaKem Gold を用いることによって、操作性およびバンドの明瞭化に大きく貢献した。これに加え、プラグ作製の0.7 mm サンプルプラグキャスターを用いることにより、PFGE 中の酵素処理や洗浄効果が高まるとともにシャープなバンドが得られるようになった。また、プラグのゲル装填法からコーム貼り付け法に変更になったことにより、操作が簡便になるとともにバンドがシャープになった。しかし、 λ -ladder を用いた場合、PFGE 泳動用寒天を流し込んだ際に λ -ladder に熱が加わり、バンドに影響を及ぼす場合が多い。このことから *S. Braenderup* H9812 株をサイズマーカーとして使用する方が、画像比較において有利であると考えられる。本研究でレジオネラの精度管理において λ -ladder をサイズマーカーとして使用したが、やはり適切なバンドが得られにくい結果となった。自作のマーカーの場合、マーカーと制限酵素が異なる場合に多少の不便があるが、予め作製しておくなどの対応方法があると考えられる。この場合、保存性の確認も今後必要である。

2の①については、 λ -ladder が相互に画像を交換するサイズマーカーとしては不向きであることを提言してきた。平成 15 年からサイズマーカーを λ -ladder から *S. Braenderup* H9812 株に変更するこ

とによって、安定的なサイズマーカーが得られるとともに、画像の比較が容易になった。2 の②および③は、平成 17 年度の研究において、各機関が随時調整することによって改善された。さらに 2 の④については、表 2 に示すように PFGE 画像取込に関する機器がかなり整備されてきており、相互画像の交換に良好な結果を与えている。

九州ブロックでは、O157 以外の菌種についての PFGE の検討並びにそのマニュアル化を試みた。研究をとおして多くの菌種についてカバーし、広域連携を深めることができた。

一方、表 3 に本研究の研究協力者を示した。毎年かなりの移動や配置換えがあることが分かる。年によっては担当者が半数以上入れ替わることもある。このような状況に対応するためには、恒常的な精度管理が不可欠であると言える。しかも、精度管理を行なうことにより、他機関の状況も把握でき、互いに技術並びに情報交換が可能となる。

E. 結論

「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化」を行なうためには、各機関が相互に比較できるデータを担保しなければならない。多くの機関で実施可能な食品由来感染症の細菌学的疫学指標は、現時点では PFGE によって実施されている。今後 PFGE が他の方法に置き換わるにせよ、ブロックごとの恒常的な精度管理の実施が、必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

財津裕一、堀川和美、野田多美枝、田代律子、関

節腔内注射による黄色ブドウ球菌集団感染事例, *Modern Physician*, 2006, 26(3), 441-445.

久高潤, 堀川和美, 瓜生佳世, 松雪星子, 緒方喜久代, 河野喜美子, 山口仁孝, 山崎省吾, 渡辺治雄, 岩永正明, 食中毒および感染性胃腸炎の病原体と臨床症状, *感染症学雑誌*, 2005, 79(11), 864-870.

Masakado Matsumoto, Yasumoto Suzuki, Hideki Nagano, Jun Yaysuyanagi, Hajime Kurosaka, Koji Yamaoka, Kazumi Horikawa, Jun Kudaka, Jun Terajima, Haruo Watanabe and Yutaka Miyazaki, Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis Performed at Selected Prefectural Institutes of Public Health for Use in PulseNet Japan, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2005, 58(3), 180-183.

財津裕一, 堀川和美, 野田多美枝, 田代律子, 関節腔内注射による黄色ブドウ球菌集団感染事例, *病原微生物検出情報*, 2004, 25(10), 259-261.

2. 学会発表

堀川和美, 村上光一, 長野英俊, 濱崎光宏, 石黒靖尚, 荒川英二, 渡邊治雄, 2検体の食品残品からO157が分離された食中毒事例について, 第8回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 東京都, 2004. 3.5.

表1. PFGEの従来法と変更後の方法の比較

変更点	従来法	変更後
アガロース	プラグ作成用 Low melt agarose 泳動用 PFC agarose	SeaKem Gold agarose
プラグ作製方法	デイスポーザブルプラグモールド	サンプルプラグキャスター 0.7mm
溶菌緩衝液	1. 1mg/ml, リゾチーム in 0.5M EDTA 2. 1mg/ml, プロテネースK in 1% N-lauroylsarcosine 0.5M EDTA	1mg/ml, プロテネースK in 1% N-lauroylsarcosine 0.5M EDTA
プラグの装填	泳動用アガロースに後で埋め込み	コーム貼り付け法
泳動条件	4 - 8 秒 9時間, 8 - 50 秒 13時間	2.2 - 54.2 秒, 19時間
マーカー	λ-ladder	Salmonella Braenderup H9812 制限酵素Xba I 消化DNA

表2. 平成14年度および17年度時の各地研におけるPFGE周辺機器

地研	平成14年度調査				平成17年度調査			
	ゲル	写真	画像取込装置	画像取込ソフト名	ゲル	写真	画像取込装置	解析ソフト名
1		○	FOTODYNE model 60-2100	NIH Image 1.59	○		Kodak EDAS 290, 1D3.5.3	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
2	○		BIORAD Gel Doc1000	Molecular analyst Software	○		Bio-Rad GelDoc EQ	Finger Printing II
3	○		BIORAD GelDoc 2000	Multi Analyst ver.1.1 BIORAD	○		Bio-Rad GEL DOC2000にデジカメ	Molecular analyst fingerprinting ver.1.12
4		○	EPSON GT8700			○	EPSON GT8700	なし
5		○	EPSON GT8700			○	EPSON-GT9300UF	Bionumerics
6					○		FUJIFILM DF-20M	なし
7		○	UMAX Power Look2	MagicScan32 V3.12	○		Bio image Gel Print 201i/VGA	なし
8		○	EPSON CC700		○		Bio-Rad GelDoc 1000	MOLECULAR ANALYS T/MACINTOSH FINGERPRINTING
9		○	CanoScan 5000F		○		Insta Doc II BIO-RAD	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
10	○		ジェミック ソリューションズ Gelprint 2000i		○		ジェミック ソリューションズ Gelprint 2000i	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
11		○	EPSON スキャナー		○		Gel Doc 2000 BIO RAD	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD
12		○	EPSON GT-7600S			○	EPSON GT-7600S	Finger Printing II Japanese Edition BIO RAD

表3. 各機関のパルスネット担当者

地研	H12年度	H13年度	H14年度	H15年度	H16年度	H17年度
1	A	A	A	A	A	A
2	B1	B1	B2	B2	B2	B3
3	C1	C2	C3	C2	C2	C4
4	D1	D1	D1	D2	D2	D3
5	E1	E1	E2	E2	E2	E2
6	F1	F1	F1	F2	F2	F3
7	G1	G2	G2	G3	G4	G4
8	H1	H2	H2	H3	H3	H3
9	I1	I2	I3	I4	I4	I4
10	J	J	J	J	J	J
11	K1	K1	K2	K3	K3	K1
12	L	L	L	L	L	L

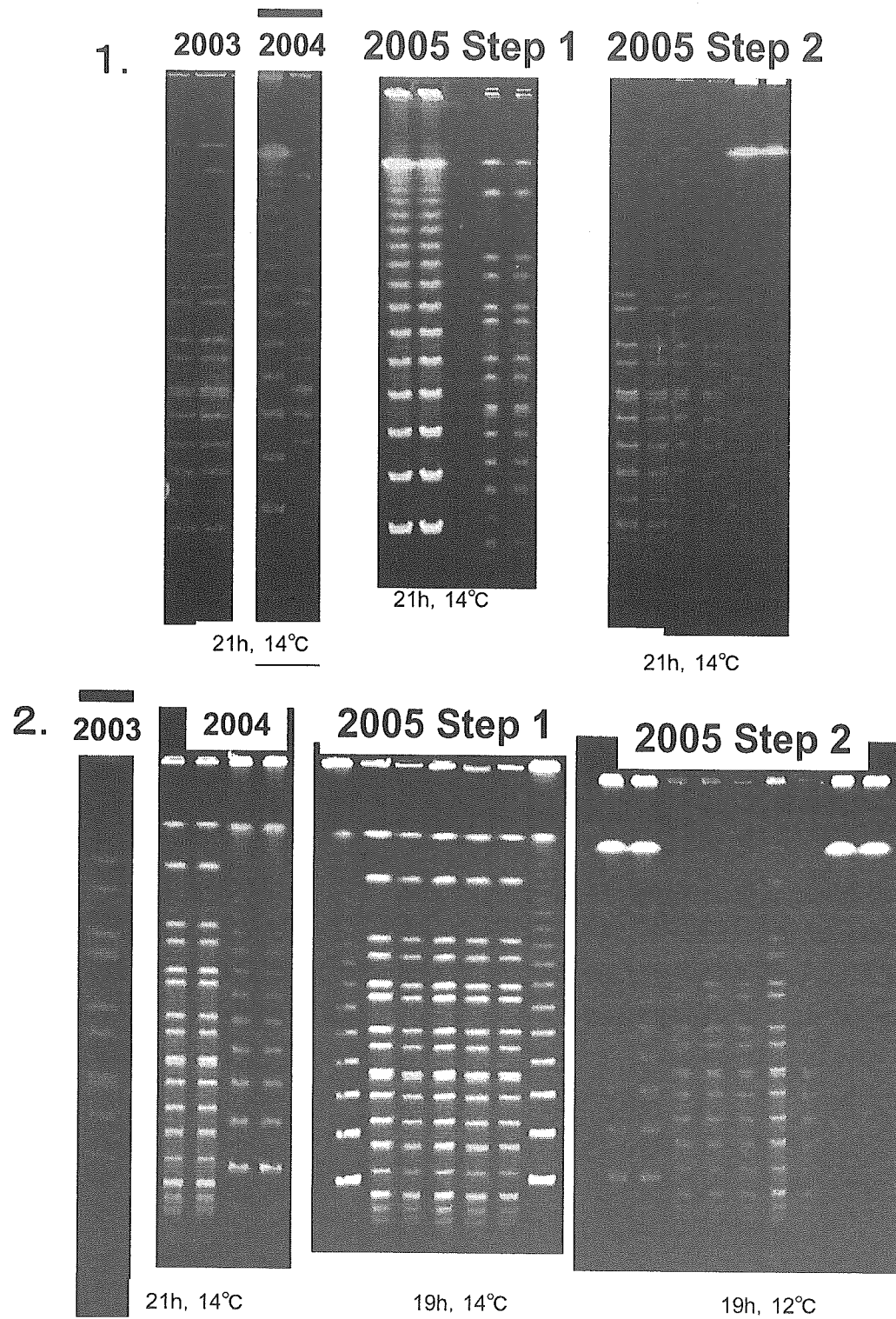


図1-1 3年間のサイズマーカーの泳動像

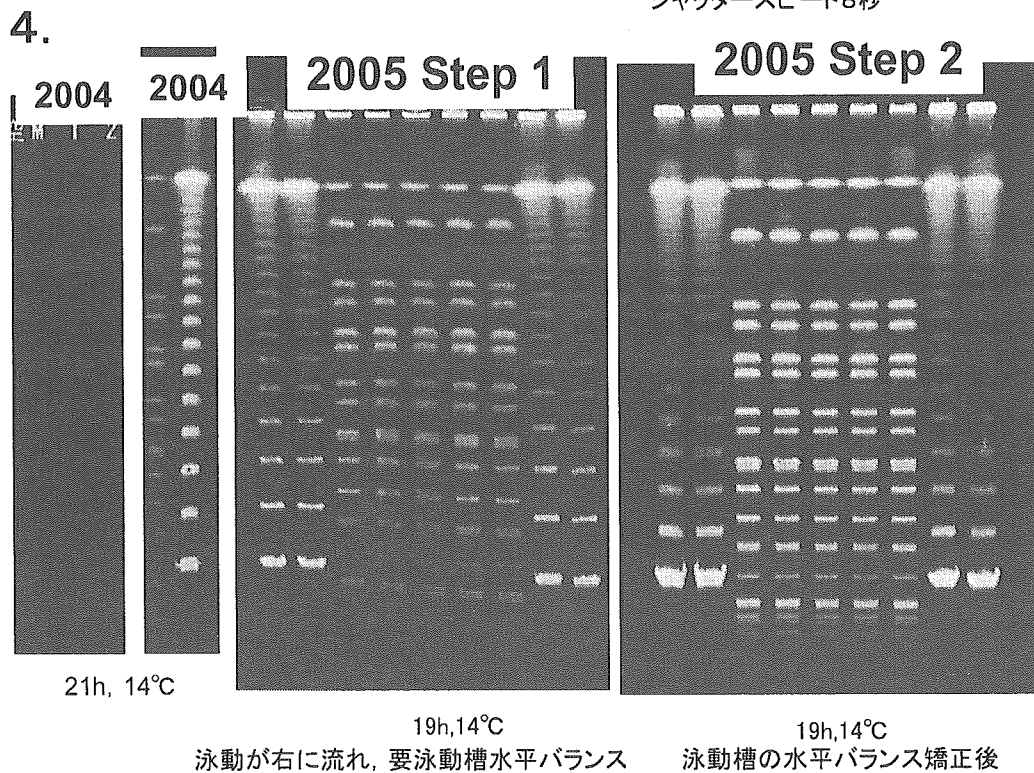
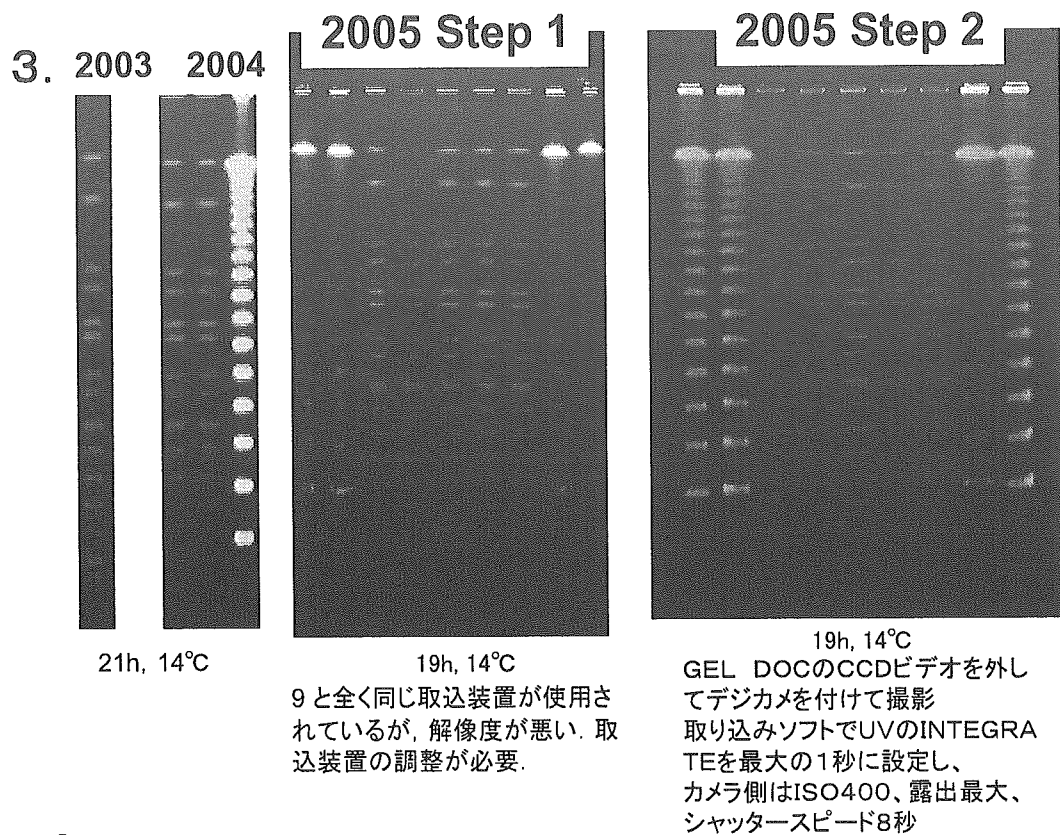


図1-2 3年間のサイズマーカーの泳動像

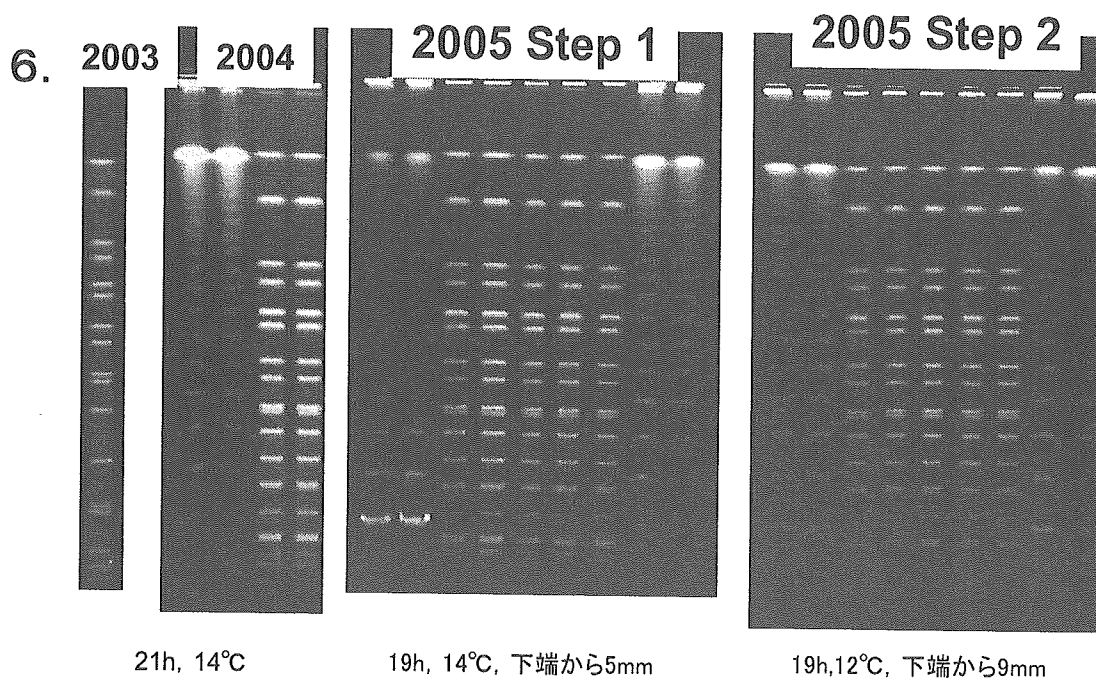
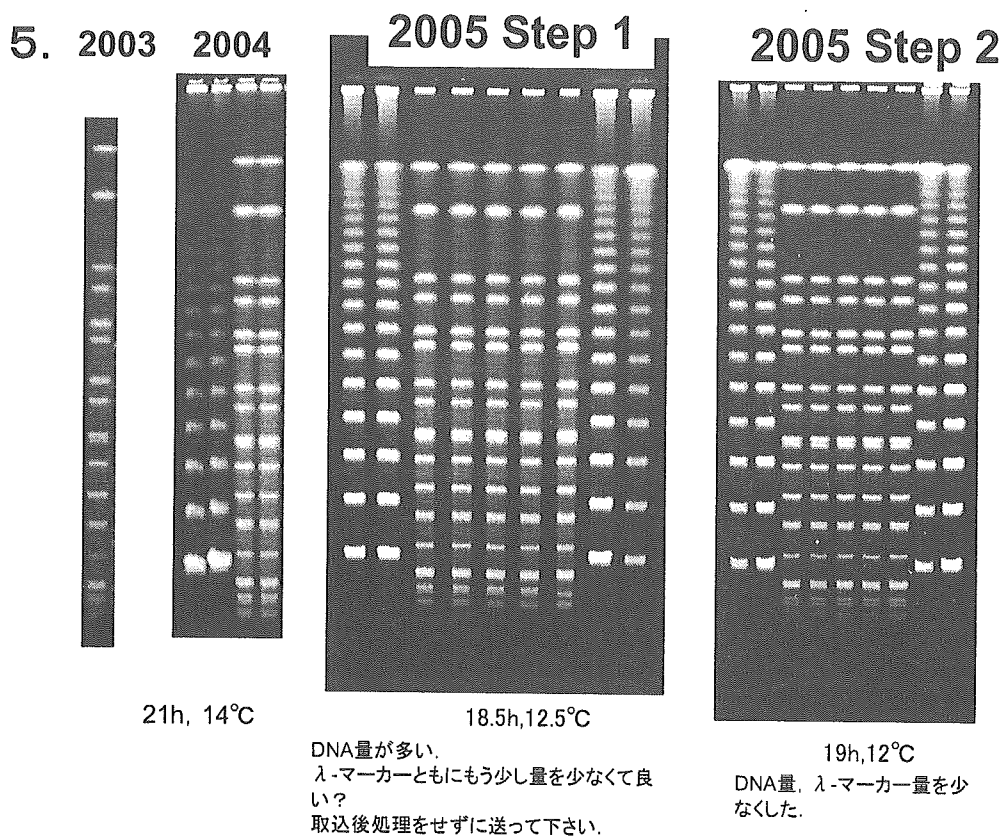


図1-3 3年間のサイズマーカーの泳動像