

今回の調査では、昨年度のPFGE像を使用し、バンドパターン読み取り方法の検討を行った。

## B. 方法

**菌株:** 北海道立衛生研究所に保存されている大腸菌0157:H7株から、PFGE上で比較的太いバンドが多く見られる7株を選定した。この中から6株を3株ずつ分けて、第1群および第2群試料とした。残り1株は、2つの群の双方に入れた。第1群は菌株No. 1~4、第2群は菌株No. 5~8と番号を付けた(表1)。それぞれの群を別々にPFGEし、PFGEパターンを写真撮影した(図1)。第1群のPFGE像は12月、第2群のPFGE像は1月に各地方衛生研究所(地研)に送付した。各地研には、昨年度のPFGE像であること、および今回の調査の目的を通知した。また、バンドパターンの読み取り方法は、特定の方法で行うよう要請した。

**PFGE解析:** バンドパターンの読み取りの際には、解析ソフトにある「自動バンド選択」を使用しないで行うこととし、バンドの位置および本数は、基本的に泳動像ではなく解析ソフト画面に表示されるデンストグラフの波形を基に判断するよう要請した。また、標準化の作業に必要なマーカーレーンのバンド位置設定には、「Tab」キーを使用して特に正確に行うよう要請した。解析ソフトを保有していない地研に対しては、各レーンの泳動像ごとに解析ソフトのデンストグラフ波形を印刷した資料(図2)を送付し、バンド位置を直接書き込んだ上で北海道立衛生研究所に返送するよう要請した。

2回に分けて送付した画像は、それぞれ各地研において到着後直ちにバンドパターンの入力を行った。入力したバンド位置は、以後訂正しないよう要請した。各地研で2群の画像データを同じデータベース上に登録した後、両方のデータをDice法およびPeason法で解析した。Peason法については、パラメータの設定値についての資料が無く、各地研でデフォルトのまま解析した。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。解析ソフト未保有地研については、返送された資料に記されたバンド位置を道立衛生研究所にて解析ソフトに入力し、解析を行った。

## C. 結果

解析結果を図3、4に示した。また、同一株であるNo. 2とNo. 7について各アルゴリズムで計算された類似度を表2に示した。なお、解析ソフト保有の関係から、地研F、G、Hの解析は同一施設で行った。

同一株であるNo. 2とNo. 7についての類似度が100%一致を示した地研は、昨年度わずか2施設であったが、本年度も3施設にとどまった(表2)。昨年度に100%一致の結果となった2施設は、本年度のバンド指定方法ではいずれも100%一致の結果を得られなかった。アルゴリズム別では、昨年度と同様、Dice法でのみ100%一致の結果が得られ、Peason法では100%一致の結果を得た施設はなかった。本年度100%一致の結果が得られた施設は、昨年度より1施設増えたが、その他の施設では、類似度の値がすべて減少していた。

## D. 考察

昨年度の調査の結果を踏まえ、本年度はバンドパターンの指定方法の改善を目指した検討を行った。道立衛生研究所において、いくつかのバンド読み取り方法を検討した結果、デンストグラフの波形のみを基準にしてバンド指定をした場合に、個人差がなく、かつ2群に含まれる同一菌株間で100%一致の結果を得ることが出来た。このため、本年度の精度管理では、各地研に昨年度と同じ菌株を用いたPFGE画像データを送付し、全施設同一の泳動像でのバンド読み取りを行い、かつバンド読み取り方法をデンストグラフの波形のみに基づいて行うよう指定した。

2群に含まれる同一菌株間の一致率が100%となった施設は、昨年度より1施設増えて3施設となったが、昨年度100%一致率の結果を出した2施設では、いずれも100%一致の結果が得られず、今回指定したバンド読み取り方法が、必ずしも適切でないことを示す結果となった。100%一致の結果が得られなかった施設の殆どでは、昨年度同様、2つの群に含まれる同一菌株の太いバンドを、片方の群で1本、もう一つの群で2本と判断していた。各地研でのPFGE担当者が昨年度と同じなのであれば、昨年度と本年度で100%一致の結果を出した施設が異なるということは、担当者によってバンド位置の最適な指定方法が異なっているということを示唆するものである。実際問題として、各地研の担当者ごとに最適なバンド指定方法をあらかじめ検討するという方法は、担当者の変更などを考えると精度管理上問題がある。したがって、今後、バンドの位置・数の判断方法に個人差が出ない明確な基準を設定するよう検討を続けていかねばならないであろう。

また、地研Iではバンド本数が一致していながら100%一致の結果が得られていなかった。同様の結果は、昨年度でも他の地研で得られており、バンドの本数以外にも正規化などソフト側

の何らかの要因が関与している可能性があり、今後の検討課題である。

#### E. 結論

昨年度と同じPFGE画像を用い、画像解析における施設間差を検討した。同じ菌株であるNo. 2とNo. 7における類似度が100%であった施設は昨年度は2施設、今年度は3施設であった。昨年度において100%の類似度を示した2施設は今年度は100%とはならなかった。従って、バンド指定では、担当者の個人差を吸収できるような明確な基準が必要であることが示された。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

なし。

表1 精度管理に使用した菌株

菌株No.	菌性状	菌株
第1群		
1	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	a
2	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	b*
3	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	c
4	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	d
第2群		
5	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	e
6	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	f
7	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	b*
8	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	g

\*, No.2とNo.7は同じ菌株

表2 同一菌株である No.2 と No.7 株の計算上の類似度 (%)

地研	2005 年度		2006 年度	
	Dice 法	Peason 法	Dice 法	Peason 法
A	100.0	94.5	95.0	94.2
B	97.2	94.7	100.0	93.1
C	100.0	-	97.4	94.6
D	-	-	92.0	-
E	97.6	96.2	100.0	94.6
F	97.3	93.9	97.5	20.1
G	94.7	95.1	100.0	93.7
H	94.7	95.2	78.1	81.9
I	94.7	95.2	94.7	92.2

施設 D は、2005 年度の解析アルゴリズムが不明なため数値を記載していない

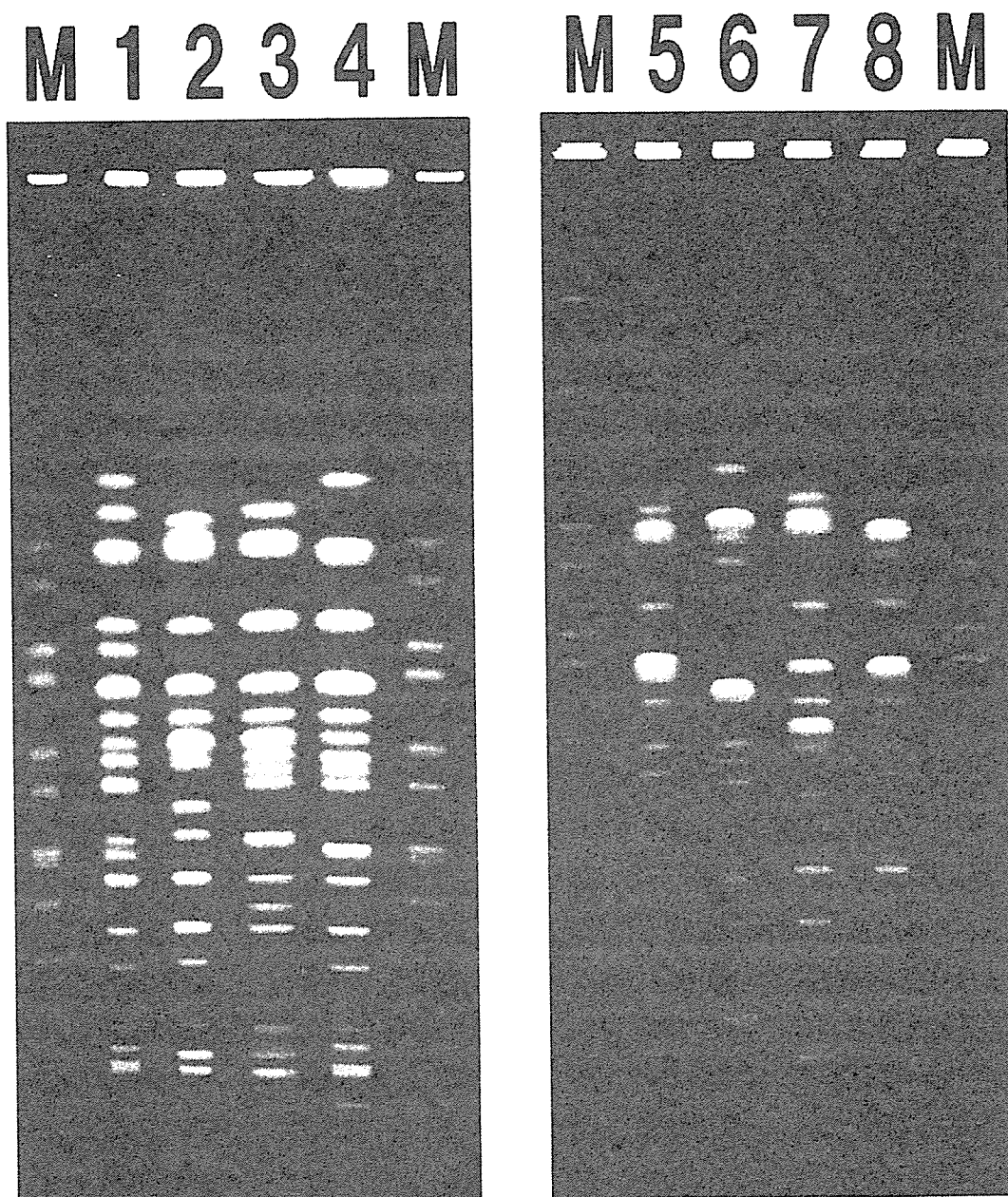


図1 精度管理に使用した PFGE 像

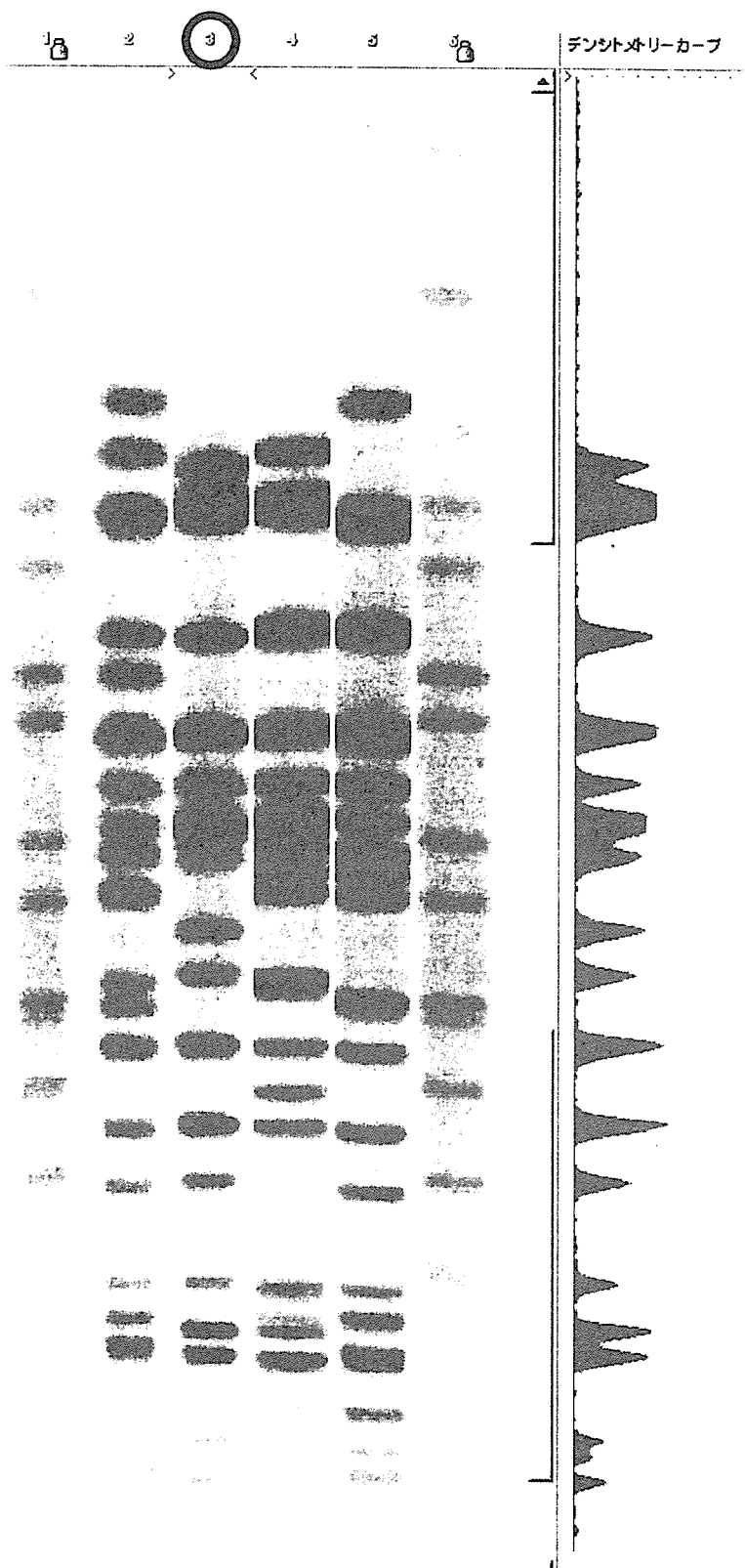


図2 解析ソフト未保有地研に送付した資料

右側に表示されているデンストグラフが、左から3番目のレーンのものであることを示す○印がレーン上部に表示されている。

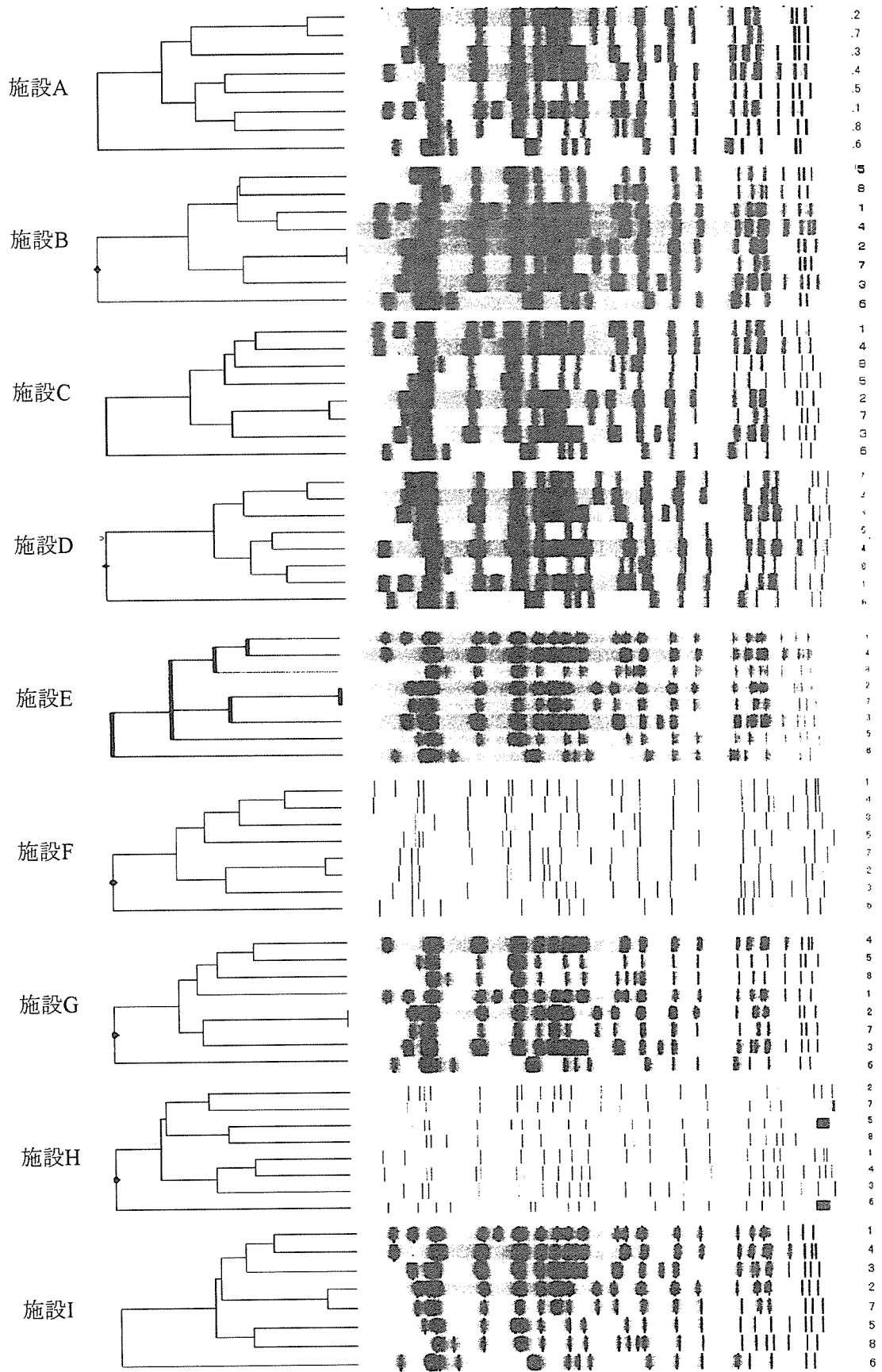


図3 Dice法による解析結果

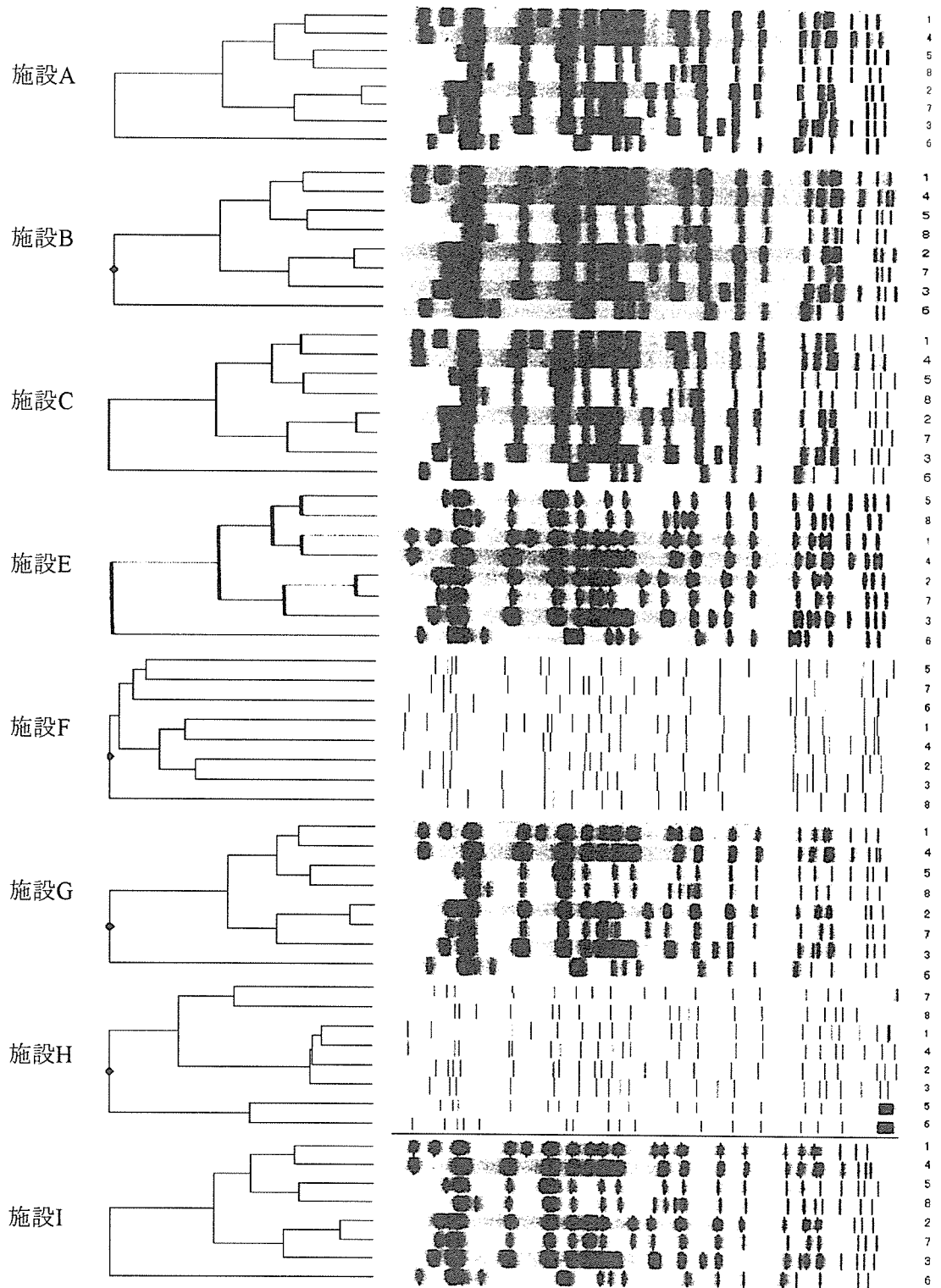


図4 Peason 法による解析結果

施設 D は、Dice 法のみで解析しているため、この図には記載されていない。

## 大腸菌 IS 配列による疫学調査の検討

北海道立衛生研究所

木村浩一、伊東拓也、合田悟、長野秀樹

本年度は、研究班に配布された大腸菌 IS 配列の PCR による分子疫学検査キット (IS-printing system) の評価を行った。PFGE 法で同一パターンを示した菌株が、本キットによる検査で異なる菌株と認識される例を見いだした。また、キットに使用する DNA 濃度が、結果に大きく影響することが明らかとなった。

### (1) DNA 濃度による結果への影響

DNA 濃度による影響を評価するため、キットの反応液に加える大腸菌 DNA 量を 4 ng、20 ng、100 ng とし、それぞれ PCR 反応後に得られる IS パターンを観察した (図 1)。

DNA 量が 100 ng では、スタンダードより高分子量の増幅バンドが観察された。また、DNA 量が 4 ng の場合には、DNA 量が 20 ng の場合に比べ、増幅されるバンド数が少なかった。DNA 量が 5 倍程度の差で IS パターンに大きな影響を与えることから、本キットに使用する DNA 試料は、ボーリング法の様な簡便法を用いるべきではないと考えられ、以降の実験では、本キットに使用する DNA 試料には、SepaGene で精製した後に計量し、その 20 ng を使用することとした。

### (2) 同一 PFGE パターン株の IS パターン

被験菌には、一昨年北海道日高支庁様似町で発生した集団 O157 症の患者由来株 1 株、PFGE パターンが集団 O157 症の患者由来株と同一の散発患者由来株 2 株、その他の患者由来株 2 株の計 5 株を使用した。いずれの菌株も 2005 年に採取された VT1 および VT2 産生大腸菌 O157:H7 である。

制限酵素 *Xba* I による PFGE パターンが同一の 3 株は、本キットで異なる IS パターンを示し、起源が異なることが示唆された (図 1、表 1)。また、他の 2 株についても、それぞれ異なる IS パターンを示した (図 1、表 1)。

今回の実験からは、本キットが PFGE 法より株の弁別能に優れていることが示された。また、本キットは PFGE 法に比べて操作が少なく、しかもより短時間で結果を得ることが出来、迅速な結果を求められる集団患者発生時の疫学調査において PFGE 法より有用な方法である可能性が示唆された。今後、本キットを用いて集団発生患者内での IS パターンを検討し、信頼性についての検討を行う予定である。



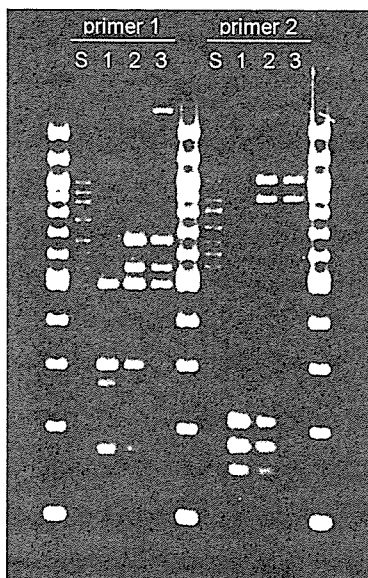


図1 DNA量が本キットのISパターンに与える影響

lane S: standard  
 lane 1: 100 ng DNA  
 lane 2: 20 ng DNA  
 lane 3: 4 ng DNA

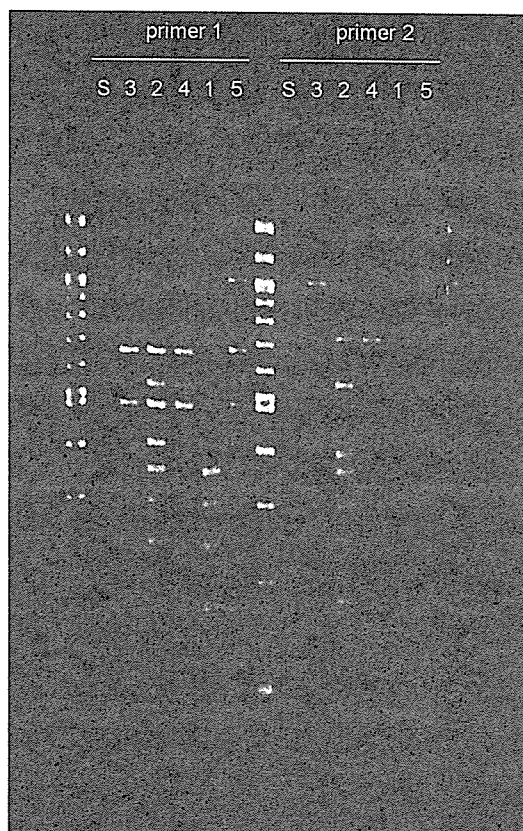
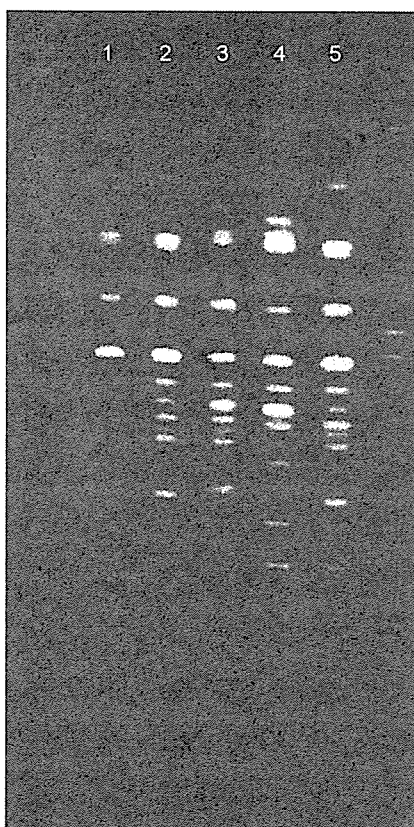


図2 PFGEパターン（左）と本キットによるISパターン（右）

レーン 1: 49-47-1 S K町

レーン 4: 2005-44 I 保健所

レーン 2: 49-47-2 S M町

レーン 5: 2005-59 様似集団 O157 症

レーン 3: 2005-43 I 保健所

レーン 1、2、および 5 は PFGE パターンが一致するが、IS パターンは全て異なっていた。

表 1 IS パターン

lane	Primers																
	1-1	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	eae	1-7	1-8	1-9	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	1-16
3	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
4	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1
5	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1

lane	Primers																	
	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11	1-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
4	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1

各レーンの番号は、図 2 のレーン番号に対応する。

# 臨床検査機関から分離された散発事例におけるサルモネラ属菌および *Campylobacter coli* のPFGE解析（岩手県）

岩手県環境保健研究センター 藤井伸一郎 太田美香子 後藤 徹

## 1 はじめに

平成15年に実施した臨床検査機関の聞き取り調査において、散発事例の胃腸炎患者からサルモネラやカンピロバクターが相当数分離されていることがわかった。そこで、散発事例の健康被害の実態を把握する目的で、平成17年10月から、臨床検査機関と連携を図り、当該分離菌の調査を始めたので、その概要（主にPFGE解析）について報告する。

## 2 調査方法

### (1) 分離状況

民間臨床検査機関の数ヶ所から、毎月、サルモネラ属菌と馬尿酸分解陰性のカンピロバクターの菌株を分与してもらい、分離状況を調べた。

分離状況の調査項目は、性別、年齢、地域、分離月日の4項目とした。

なお、馬尿酸分解陰性のカンピロバクターは、PCR法で *Campylobacter coli*（以下C. coli）の特異遺伝子が確認された株をC. coliとした。

### (2) 検査項目

検査は、血清型別検査（サルモネラ属菌）、薬剤感受性試験およびPFGE解析（系統樹解析）を行った。

#### ア サルモネラ属菌のPFGE解析

制限酵素 *Bln* I、泳動条件 2.2 ～ 63.8sec、19hrである。

#### イ C. coliのPFGE解析

制限酵素 *Sma* I、泳動条件 6.8 ～ 35.4sec、19hrである。

## 3 調査結果

### (1) 分離状況

#### ア サルモネラ属菌

平成18年1月から11月までに、3ヶ所の臨床検査機関から54株が分離された。

#### イ C. coli

平成17年10月から平成18年11月までに、1ヶ所の臨床検査機関から、カンピロバクターが718株分離され、そのうちC. coliは77株（11%）であった。

### (2) 血清型別（表）

サルモネラ属菌54株は、22の血清型（計50株）、型別不能（計4株）に分類された。

### (3) 系統樹解析

#### ア サルモネラ属菌（図1）

PFGEパターンが一致した株を同一クラスターとした場合、6つの同一クラスター（計16株）があり、最大のクラスターは *S. Typhimurium* の6株であった。

#### イ C. coli（図2）

4つの同一クラスター（計10株）があり、最大のクラスターは4株であった。

## 4 まとめ

平成15年の調査で、1ヶ所の臨床検査機関において、10ヶ月の期間に、サルモネラ属菌が約50株、カンピロバクターが約550株分離されていた。集団発生の場合、患者数等の実態は食中毒統計等で把握されているが、散発事例の場合、潜在的に相当数発生しているにもかかわらず把握されていない。今回、臨床検査機関と連携を図ることで、散発事例の実態の一部を把握することができた。

今回の調査の結果、散発事例から分離されるサルモネラ属菌の血清型は非常に多様であり、一部の血清型（*S. Enteritidis* 等）で占められる集団食中毒事例とは明らかに様相が異なっていた。

また、系統樹解析の結果、同一クラスターで最も株数が多かった *S. Typhimurium* の6株は、発生時期も近く、薬剤感受性も同一であったことから、同一クローン由来株であると推定された。

カンピロバクターによる集団発生では、*C. jejuni* が主に分離されるが、散发事例では少なからず *C. coli* も分離されていること、*C. coli*によるヒトの健康被害の文献等が少ないことから、*C. coli*を調査することとした。今回の調査では、散发事例で分離されるカンピロバクターのうち約1割が *C. coli*であった。系統樹解析の結果、同一クラスターが4つあり、最大クラスターは4株であった。制限酵素 *Sma* I によるPFGE解析では、比較的バンド数が少なく、パターンが一致しても、薬剤感受性が異なる株もあることから、同一クローン由来株か否かは、他の制限酵素によるPFGE解析や他の遺伝子解析（鞭毛遺伝子型別）等を併用する必要があると思われる。

表 血清型別内訳

No	血清型	分離株数	%
1	<i>S. Typhimurium</i>	13	24%
2	<i>S. Enteritidis</i>	7	13%
3	<i>S. Agona</i>	4	7%
4	<i>S. Infantis</i>	2	4%
5	<i>S. Litchfield</i>	2	4%
6	<i>S. Stanley</i>	2	4%
7	<i>S. Virchow</i>	2	4%
8	<i>S. Hadar</i>	2	4%
9	<i>S. Thompson</i>	2	4%
10	<i>S. Derby</i>	2	4%
11	<i>S. Bovismorbificans</i>	1	2%
12	<i>S. Braenderup</i>	1	2%
13	<i>S. Anatum</i>	1	2%
14	<i>S. Brandenburg</i>	1	2%
15	<i>S. Othmarschen</i>	1	2%
16	<i>S. Bardo</i>	1	2%
17	<i>S. Newport</i>	1	2%
18	<i>S. Nagoya</i>	1	2%
19	<i>S. Saintpaul</i>	1	2%
20	<i>S. Javiana</i>	1	2%
21	<i>S. Bareilly</i>	1	2%
22	<i>S. Istanbul</i>	1	2%
23	型別不能	4	7%
計		54	100%

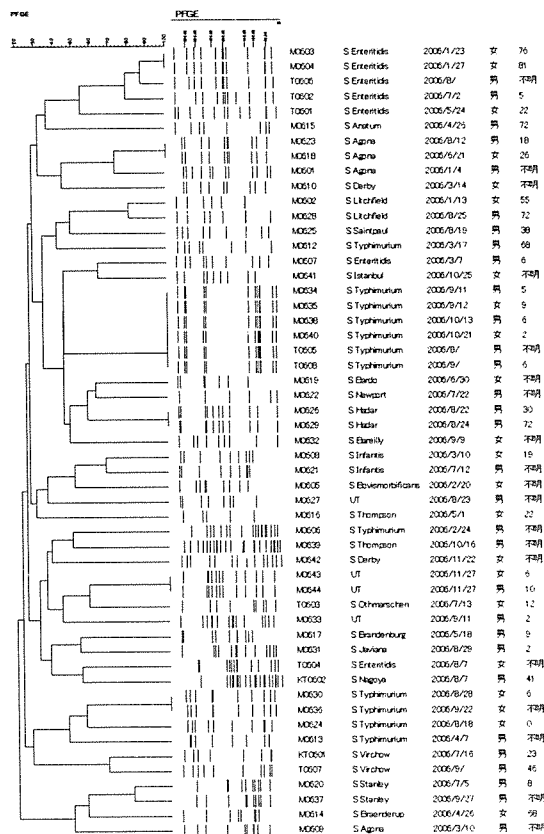


図1 サルモネラ属菌の系統樹解析

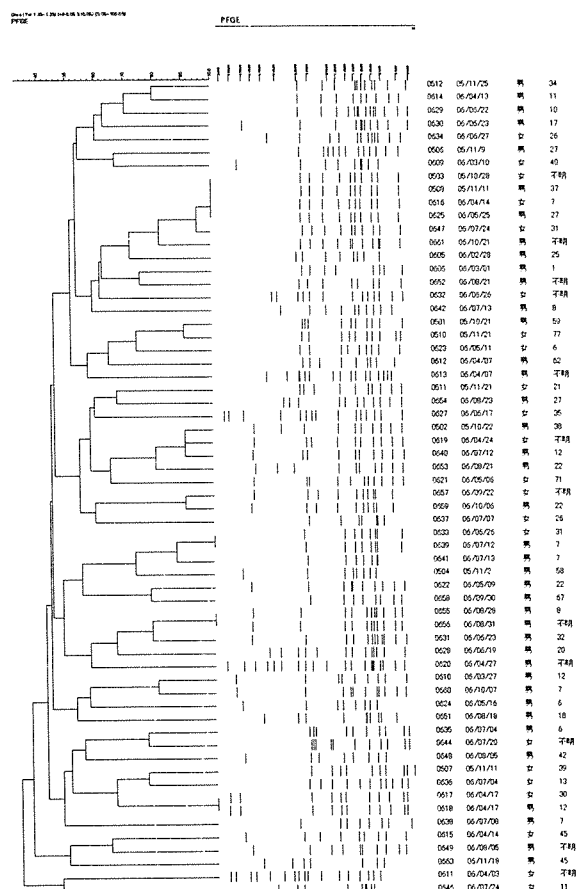


図2 *C. coli*の系統樹解析

# Campylobacter jejuni subsp.jejuni による水系食中毒事例の PFGE 法による解析 及び

## IS-printing System による O157 の解析結果報告

福島県衛生研究所 微生物グループ

渡邊奈々子 小澤奈美 平澤恭子 須釜久美子 大竹俊秀

### はじめに

今年度県内で発生し、PFGE 法を行った食中毒事例の概要と IS-printing System による O157 の解析結果について報告する。

### ① *Campylobacter jejuni* subsp.*jejuni* による水系食中毒事例の PFGE 法による解析

2006 年 8 月、県内の A 保健所管内で食中毒疑い事例が発生し、発症者の共通食がその地区の水道水以外になかった。また、検査により発症者便 13 件中 11 件と原水から *C. jejuni* を検出したことから、水道水が原因の食中毒と断定した。水源が何らかの原因で汚染され、さらに水道施設の管理不備が重なったことにより発生したと考えられた。

#### 材料および方法

##### 1. 材料 (使用菌株)

今回の事例については、原水由来 1 株、発症者便由来 11 株の計 12 株を使用した。

また、比較のために、別の食中毒事例 3 株 (食品由来 2 株、便由来 1 株)、サーベイ由来 2 株の計 5 株も使用した。

##### 2. 方法

血液寒天培地で微好気培養した菌を使用し、プラグとした。制限酵素は *Sma*I (30units) と *Kpn*I (40units) を用いた。泳動条件は、*Sma*I が電圧 6V/cm、パルスタイム 0.5~25.0 秒、泳動時間 20 時間、バッファー温度 14℃で、*Kpn*I は電圧 6V/cm、パルスタイム 4.0~20.0 秒、泳動時間 22 時間、バッファー温度 14℃で実施した。

なお、DNA サイズマーカーとして *Salmonella* Braenderup H9812 を用いた。

### 結果

PFGE パターンを図 1 に示す。今回の事例関連株である原水由来 1 株、発症者

便由来 11 株の計 12 株は、制限酵素 *Sma*I, *Kpn*I を用いた場合のそれぞれにおいて同一パターンを示した。*Kpn*I によるレーン No.11 は泳動バンドを示さなかった。また、*Kpn*I による PFGE は *Sma*I よりバンドが不鮮明であった。比較のための 5 株はすべて異なるパターンを示した。

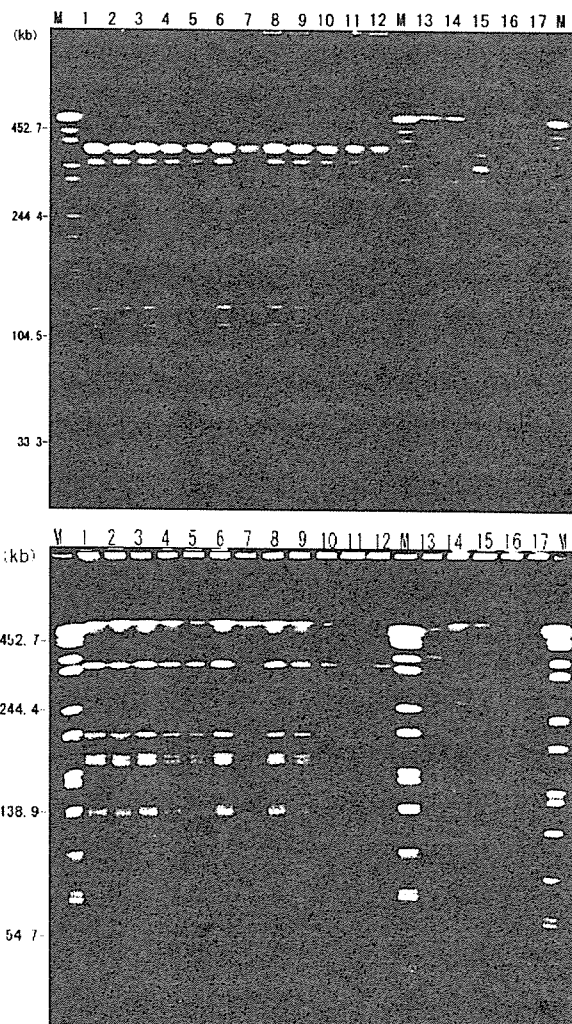


図 1 *C. jejuni* の PFGE パターン

(上: *Sma*I, 下: *Kpn*I)

1 : 原水

2 ~ 12 : 発症者便

13～15：別の食中毒事例株

16・17：サーベイ

### 考 察

制限酵素 *KpnI* を用いた場合は、*SmaI* に比べてバンドが不鮮明であった。この現象が菌によるものなのか、制限酵素によるものなのか、または、他の要因によるものなのかは今後検討したい。今回の事例関連株が2種類の制限酵素で切断しても、それぞれで同じパターンを示し、他の株とは違うパターンを示したことは、同じ由来であることをより強く裏付けている。また、原水由来株と患者便由来株が同じパターンを示したことにより、水系感染であることを明確に示したと考えられる。

### ②IS-printing System による O157 の解析報告

今回、IS-printing System の検討に参加する機会があり、その方法について検討した内容や解析結果を報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 材料 (使用菌株)

平成18年度(2月現在)に検出された O157:H7 (VT2) 3株, O157:HNM (VT2) 3株の計6株を使用した。

##### 2. 方法

推奨法に従い、2mm程度のコロニーを50μLの25mM NaOHに懸濁して95℃5分間加熱、4μLの1M Tris-HCl (pH7.0)を加えて中和後、1μLをTemplateとした。PCR条件(BIO RAD:iCycler)は96℃2分後、96℃20秒→64℃30秒→68℃

90秒の20サイクルで行った。電気泳動(ADVANCE:Mupid)は、Nusieve3:1(3%)を用いて0.5×TBEで1時間程度行った。なお、上記の方法に決定するまでにくつか検討を行っている。

・検討1：菌の濃度とTemplateの量について

1mmコロニー全量と2mmコロニー全量それぞれを白金線で掻き取って懸濁・Templateとした場合の比較。また、Templateの量を1μLと2μLにした場合の比較。

・検討2：泳動バッファーについて

1×TAEと0.5×TBEでの比較。また、IS-printing Systemとの比較として同株を用いたPFGEも行った。

### 結 果

IS-printing Systemの結果を表1に示す。O157:H7 (VT2) 3株 (No.1～3)は、2nd set PrimerにおいてNo.2と3が同じ結果を示した。O157:HNM (VT2) 3株 (No.4～6)は、1st・2nd set Primerともに同じ結果を示した。

併せて、PFGEパターンを図2に示す。O157:H7 (VT2) 3株 (No.1～3)はすべて違うパターンを示し、O157:HNM (VT2) 3株 (No.4～6)はすべて同一パターンを示した。

また、検討1・2の結果を図3に示す。Templateの量を1μLと2μLにした場合の違いはほとんどなく、1mmコロニーと2mmコロニーでの違いが大きかった。泳動バッファーについても、1×TAEと0.5×TBEとで明確な違いがあった。

表1 IS-printing Systemによる結果表

判定：バンド有り=1, バンド無し=0, 判定困難=2

Primer	1st set Primer Mix																備考	
	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	eae	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15		1-16
Size (bp)	974	905	839	742	645	595	547	495	442	405	353	325	300	269	241	211	171	非特異バンド
No. 1 O157:H7	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	
No. 2 O157:H7	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
No. 3 O157:H7	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1kbp以上
No. 4 O157:HNM	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	1	1	0	1	1	1kbp以上
No. 5 O157:HNM	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	1	1	0	1	1	1kbp以上
No. 6 O157:HNM	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	0	1	1	0	1	1	1kbp以上

Primer	2nd set Primer Mix																備考		
	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16		stx 1	stx 2
Size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151	非特異バンド
No. 1 O157:H7	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	
No. 2 O157:H7	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
No. 3 O157:H7	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
No. 4 O157:HNM	1	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	
No. 5 O157:HNM	1	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	
No. 6 O157:HNM	1	1	0	2	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	

表2 使用菌株の詳細と各試験方法の結果 (同じ結果には同じアルファベットを記載)

菌株No.	管轄保健所	性別	年齢	症状	発症日 (検体採取日)	関連性	PFGE (XbaI)	IS 1st	IS 2nd	
1	O157:7	県中	女	6	有	H18.6.18				
2	O157:7	いわき	女	3	有	H18.7.30			C	
3	O157:7	相双	女	45	無	(H18.9.7)			C	
4	O157:HNM	県中	男	3	有	H18.6.30	弟(患者)	A	B	D
5	O157:HNM	郡山市	女	6	有	H18.7.5	姉(患者)	A	B	D
6	O157:HNM	相双	女	4	有	H18.7.24		A	B	D

### 考 察

IS-printing System は通常の PCR と同じ手技・時間で結果が判明する。検討した結果、菌量は 2mm 程度のコロニーを掻き取るくらいに多めにし、また、泳動バッファを TAE ではなく TBE にする事で、泳動時間は長くなるものの、より鮮明なバンドが得られる事がわかった。

O157:HNM (VT2) 3 株 (No.4~6) は、表2のとおり、PFGE においても IS-printing System においても同じ結果となった。よって、No.4・5 は同事例のためもちろんであるが、No.6 についても同じ感染源が疑われた。

O157:H7 (VT2) の 3 株 (No.1~3) は、すべて関連性の確認されていない株である。しかし、No.2 と 3 は PFGE では全く違うパターンを示したものの、IS-printing System の 2nd set Primer で同じ結果を示した。よって、今の時点では PFGE の方が型別能が高い可能性が示唆された。ただ、IS-printing System は PFGE より手技が煩雑ではなく、半日ほどで結果が出るという利点もあるため、PFGE を行う前のスクリーニングとして有効ではないかと思われた。また、当所では 32 株ほど IS-printing System を行ったが、すべての株が 0 または 1 (バンドがない or ある) となる部分がいくつかみられた (1-02, 06, 07, 11, 2-05, 06, 08, 14)。その部分が改善されれば、より型別能の高い試験方法となるのではないかと考えられた。また、VT2 産生の株において stx1 にバンドが出たため、2nd set Primer の stx1 と stx2 は逆ではないかと思われた。

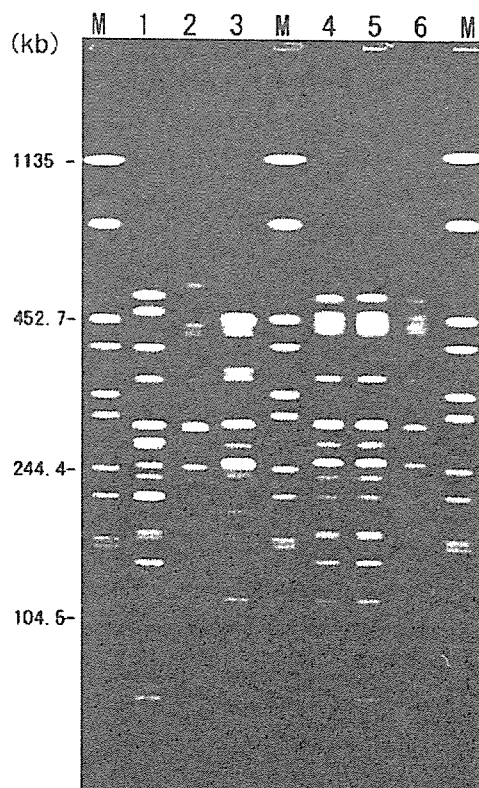


図2 XbaI による PFGE パターン  
1~3 : O157:H7, VT2  
4~6 : O157:HNM, VT2

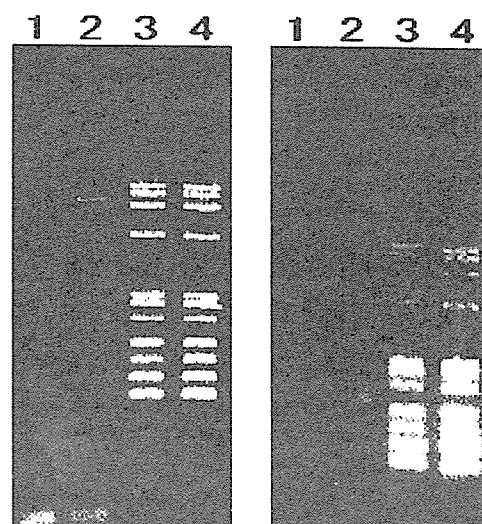


図3 検討1・2の結果

1 : 1mm コロニー, 1 $\mu$ L  
2 : 1mm コロニー, 2 $\mu$ L  
3 : 2mm コロニー, 1 $\mu$ L  
4 : 2mm コロニー, 2 $\mu$ L  
左の写真 : 0.5 $\times$  TBE  
右の写真 : 1 $\times$  TAE

## サルモネラ食中毒事例および散発サルモネラ症患者から分離された *Salmonella* Montevideo の PFGE 解析

宮城県保健環境センター

齋藤紀行 平塚雅之 菅原直子 小林妙子 渡邊節 山田わか  
谷津壽郎 秋山和夫 廣重憲生

### 要約

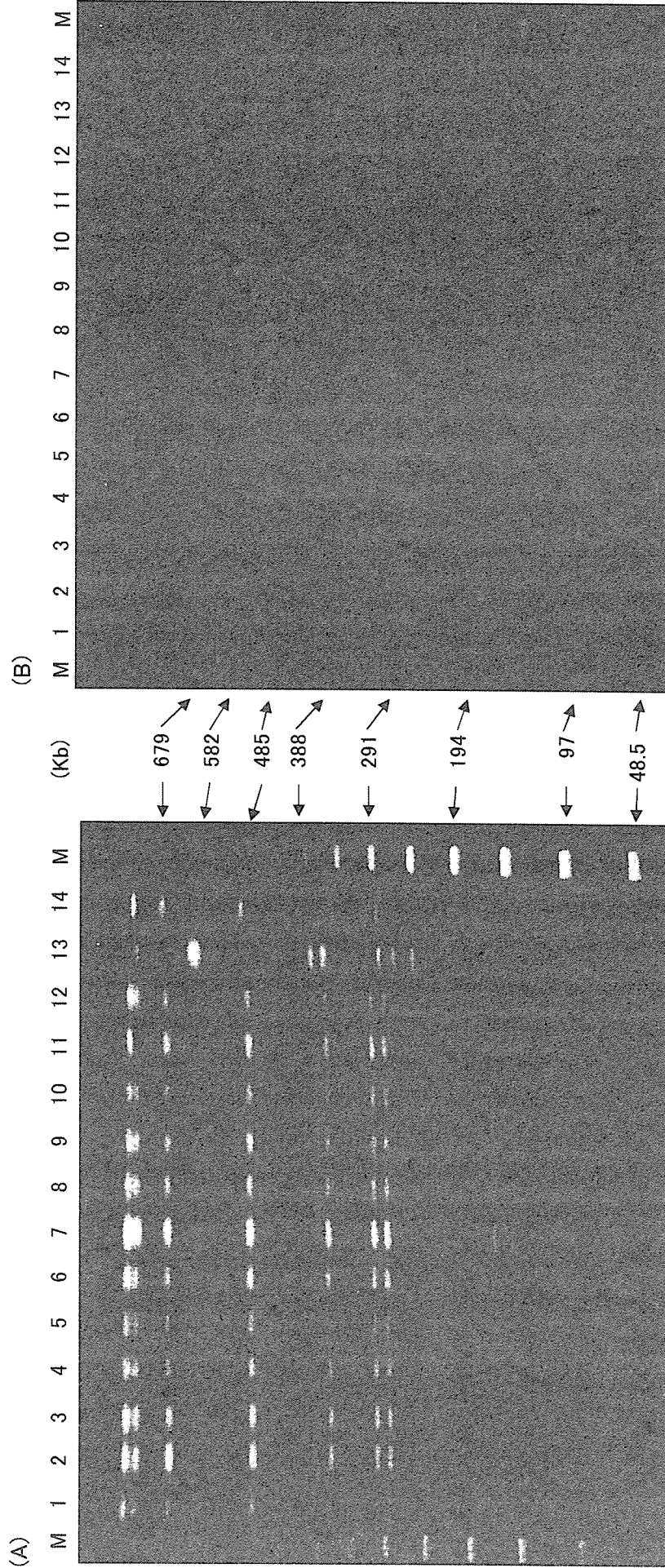
平成 17 年 8 月、宮城県内の老人介護保健施設で食中毒が発生し、患者、サラダおよびその材料のカイワレ大根から *S. Montevideo* が検出され、サラダを原因食品とするサルモネラ食中毒と断定された。当該施設に冷凍保存されてあったカイワレ大根中の菌量は 960MPN/g と算定され、約 10g を 1 人分のサラダとして使用していたことから、1 人当たりの摂取菌量は約 10,000MPN 以下と推定された。カイワレ大根は県外の芽物生産農場で生産され、調理当日当該施設が市場から購入していた。

一方、食中毒が発生した同時期、量販店より購入した同農場産の市販カイワレ大根および散発サルモネラ症患者から *S. Montevideo* が検出された。食中毒由来、市販カイワレ大根由来および散発サルモネラ症患者由来の *S. Montevideo* について PFGE 解析した結果、PFGE パターンが一致したことから、3 者は同一菌由来と考えられ、当該施設での食中毒発生と散発サルモネラ症発生にカイワレ大根が関与した可能性が推察された。

Fig.1. PFGE patterns of *Salmonella*. Montevideo digest with *Blan* I (A) and *Xba* I (B). Lane 1, 2 : strain MK1, 2 isolated from symptom person, respectively. Lane 3, 4 : strain MK9, 10 isolated from symptomless person, respectively. Lane 5, 6 : strain MK25, 26 isolated from food staff, respectively. Lane 7 : strain MK27 isolated from salad. Lane 8 : strain MK28 isolated from white radish sprout. Lane 9, 10 : strain MK31, 32 isolated from commercial white radish sprout, respectively. Lane 11, 12 : strain MK29, 30 isolated from sporadic salmonellosis person, respectively. Lane 13 : strain of *Salmonella* Bareilly (*Salmonella* O7) isolated from sporadic salmonellosis person. Lane 14 : strain of *Salmonella* Enteritidis (*Salmonella* O9) isolated from sporadic salmonellosis person. M : Aladder.



Figure 1.



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために  
必要な情報に関する研究」

平成18年度 分担研究報告書

関東ブロックにおける PFGE 法の精度管理および PFGE 以外の  
解析方法の検討

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
協力研究者	矢萩かをる	茨城県衛生研究所
	船渡川圭次	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
	石原ともえ	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	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	長野県環境保全研究所
	川森 文彦	静岡県環境衛生科学研究所
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	小西 典子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株を各地研で感染研プロトコールに従い、ほぼ同じ条件下で 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解析ソフトを用いて解析を試みた結果、いずれの地研で解析した場合においても非常に類似度が高く、技術力が均一化してきていることが確認された。

IS-Printing system 解析法は PFGE 成績とも非常に良く相関し、有用な方法であることが確認された。しかし、バンドの有無を正確に判断できる泳動像を得るためには、DNA 抽出法等、更に検討が必要である。

A. 研究目的

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、腸管出血性大腸菌 0157 やサルモネラ等の集団発生や散在的

集団発生の感染源究明に利用されており、その有用性が確認されている。また各地方衛生研究所と国立感染症研究所を結び、PFGE 解析情報を共有す

るシステムやデータベースも構築されつつある。より迅速に散在的集団発生を見つけ、感染源を究明していくためには、迅速で正確な分子疫学的解析が必要である。そのためには、各地方衛生研究所で行う PFGE 解析法の技術レベルが常に一定でなくてはならない。

本研究では、関東ブロック 11 地方衛生研究所を対象に、PFGE 法の技術向上のための精度管理を行った。また、より正確な分子疫学的解析を行うために、PFGE 法以外の解析方法として、宮崎大学・林哲也教授らのグループによって開発された IS-Printing system 解析法および VNTR 法について、その有用性および問題点について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 各施設で使用している泳動装置および写真撮影装置について

各施設で使用している泳動装置および写真撮影装置の種類について各施設にアンケートをとり、使用状況について調べた。

### 2. PFGE 法技術向上のための精度管理

#### 1) 供試菌株

各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として、2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 (VT1+VT2 産生株および VT2 産生株、各 3 株) 6 株を供試した。

#### 2) 感染研プロトコールによる PFGE 解析

ブロックの作製：0.7mm プラグキャスターを使用し、SeaKem Gold Agarose (TAKARA, 1%) で作製した。使用する菌の濃度は各施設の方法で行った。

DNA 抽出法：1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) で 50°C, 18~20 時間行った。

制限酵素処理：EHEC は制限酵素 *Xba* I で、サルモネラは制限酵素 *Xba* I および *Bln* I を用いた。

電気泳動用アガロース：電気泳動用アガロースは SeaKem Gold Agarose (1%) を使用した。

泳動条件：EHEC は、6V/cm, 2.2sec~54.2sec, 20 時間, buffer 温度 12°C で行った。ただし泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの下から 1 cm~1.5 cm になるように、各施設で調整した。サルモネラは、6V/cm, 2.2sec~63.8sec 20 時間, buffer 温度 12°C で行った。

サイズマーカ：*S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したものを用いた。

PFGE 写真の撮影：ウェルからゲルの先端までを、できるだけ大きく撮影するようにした。

PFGE 解析成績の電送：各地研で解析した PFGE 画像を電子メールで送付した。

画像解析：画像解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いて解析を行った。

### 3. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例および散発事例への応用

各地研で分離された腸管出血性大

腸菌について PFGE 解析を行い、有用性を検討した。

#### 4. サルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

各地研で分離されたサルモネラについて PFGE 解析を行い、有用性を検討した。

#### 5. IS-Printing system 解析

##### 1) PCR 条件の検討

付属のプロトコール条件に従って行い、検討した。

##### 2) DNA 抽出法の検討

熱抽出 (95°C, 10 分間) およびアルカリ抽出 (50  $\mu$ l の 25mM NaOH 液に菌を懸濁し, 95°C, 5 分間加熱, 4  $\mu$ l の 1MTris-HCl pH7.0 で中和) で DNA 抽出したものをテンプレートとして PCR 反応を行い、電気泳動後の写真を比較した。

##### 3) IS-Printing system 解析と PFGE 解析の比較

異なる PFGE パターンを示す 0157 菌株 18 株, および同じ PFGE パターンを示した 4 組 8 株, 合計 26 株について IS-Printing system で解析を行い、PFGE 型と比較した。

#### 6. VNTR 法の検討

別紙に示した通りである。

#### C. 研究結果

##### 1. 各施設で使用している泳動装置および写真撮影装置について

Fingerprinting II を用いた解析で

は、写真の大きさや解像度が、なるべく一定であることが望ましい。そこで各施設で使用している機器の種類について 11 施設についてアンケートを実施した。その結果、使用している電気泳動装置は、CHEF DR III : 4 施設, CHEF Mapper : 3 施設, CHEF DR II : 2 施設, Genepath System : 2 施設であった。

また、写真撮影装置の保有機種は以下のとおりであった。

Densitograph (ATTO) : 2 施設,  
Fluor-S MultiImage,  
Gel Doc 2000 (Bio-Rad),  
Polaroid MP4 Type667 film,  
Gel logic 200 Imaging System (Kodak),  
東洋紡 UV サンプル撮影装置 FAS-III,  
トランスイルミネータ TM-36 型 (フナコシ),  
POLAROID MP4 LAND CAMERA,  
Polaroid (機種不明),  
Image Saver AE-6905C (ATTO),  
Polaroid 600ES : 各 1 施設  
(1 施設では 2 種の装置を使用)

##### 2. PFGE 法技術向上のための精度管理

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 6 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。各施設ともバンドの分離が良く、非常にシャープであり、解析の基準として適していることが確認された。一部の施設で、泳動像の歪み (スマイリング) が認められたが、解析に大きく影響するものではなかった。

各地研から電送された PFGE 画像をもとに、デンドログラム解析を行った成績を図 1 に示した。各施設 6 菌株を