

それぞれ2レーンで泳動した。いずれも、菌株ごとにクラスターを形成していた。しかし類似度をみると、菌株No.3, No.4, No.6では95%以上の類似度を示したが、No.1, No.2のように少しバラツキが認められたものもあった。

3. 腸管出血性大腸菌の PFGE 解析の応用

6地研で経験した腸管出血性大腸菌による食中毒事例から分離された菌株について PFGE 解析を行った成績を別紙に示した。患者由来株と牛由来株の PFGE パターンが一致し、感染源が特定された事例があった（横浜市）。この他にも、実際の行政対応に PFGE 解析が使われた例の多い事が確認された。

4. サルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

3地研で経験したサルモネラ血清型 Enteritidis 事例および血清型 Newport 事例から分離された菌株について PFGE 解析を行った成績を別紙に示した。サルモネラの場合、*Xba*I および *Bln*I の2種類の制限酵素を用いることで、非常に効率よく解析を行うことができた。

5. IS-Printing system 解析

1) PCR 条件の検討

PCR サイクルの条件として、キットに付属のプロトコール条件（96°C20秒、64°C30秒、68°C1.5分、20サイク

ル）で行ったところ、増幅バンドが全く検出されなかった。そこで温度条件は一定のまま、サイクル数を25サイクルに増やしたところ、いずれの菌株もバンドが検出された（写真2）。

2) DNA 抽出法の検討

熱抽出およびアルカリ抽出で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。PCR反応のサイクル数は25サイクルで行った。その結果、アルカリ抽出を行った方がバンドの数が多く、鮮明であった。しかし、バンドが太くなりすぎる、薄いバンドが出現してしまう等、判定が困難なバンドが多かった（写真3, 4）。

3) IS-Printing system 解析と PFGE 解析の比較

2006年に分離された腸管出血性大腸菌0157 26株について IS-Printing system で解析を行った結果を表1に示した。異なる PFGE パターンを示した株は全て異なるコードを示した。一方、同じ PFGE パターンを示した株のうち2組は同じコードを、残りの2組は異なるコードを示した（表1）。このように IS-Printing system 解析では、非常に多様性に富む結果を得ることができた。またその多くは、PFGE 解析成績とほぼ相関する成績であった。しかしデータ集計の際、検出バンドの増幅量が異なるため、判定が困難な場合もあった。

6. VNTR 法の検討

別紙に示した通りである。

D. 考察

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株を各地研で PFGE 解析し、その成績を東京都健康安全研究センターに電送後、解析ソフトを用いて解析を試みた。本年度は、基本的ブロック作製方法の統一および写真撮影時の標準化を試みた。その結果、どの施設で行った場合も一部の菌株を除いて 90%以上の類似性が得られた。しかし太いバンドを1本と判定するか2本と判定するかで、結果に差が生じてしまうことから、太いバンドの場合、位置の選び方に注意が必要である。

各地方衛生研究所では、年によって担当者が代わることもあり、このような精度管理の必要性が示唆された。

また各地研では、いずれも実際に発生した集団および散発事例について PFGE 解析を実施し、それが行政に活用された事例を多く経験した。

新しい解析法である IS-Printing system 解析について検討した結果、PFGE 解析とほぼ同様の成績を得ることができた。本解析法は2種類のプライマーで PCR 反応を行い、出現したバンドの有無で比較する方法であるため、特別な技術を必要とせず、また解析日数も短いことから非常に有用であると示唆された。しかし、バンドの有無の判定が非常に重要である。よりきれいな泳動像を得るためには、DNA 抽出法や PCR サイクル条件、泳動用アガロースゲル、適切な染色および脱色法等の検討が必要である。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

〈学会発表〉

A.Kai, N.Konishi, H.Obata, Y.Shimajima, C.Monma, A.Nakama, S.Yamada, Epidemiological and bacteriological aspects of EHEC infection in Tokyo, 6th International Symposium on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections, Melbourne 2006

H. 知的所有権の取得状況

なし

写真1

共通菌株(O157)6株の11施設におけるPFGE画像

供試菌株:

腸管出血性大腸菌O157

No.1 E06553 (VT1+VT2)

No.2 E06305 (VT1+VT2)

No.3 E06564 (VT2)

No.4 E06565 (VT2)

No.5 E06385 (VT1+VT2)

No.6 E06695 (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:

レーン1 マーカー (写真左側)

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 菌株No.6

8 マーカー

9 菌株No.1

10 菌株No.2

11 菌株No.3

12 菌株No.4

13 菌株No.5

14 菌株No.6

15 マーカー(写真右側)

写真1:施設1

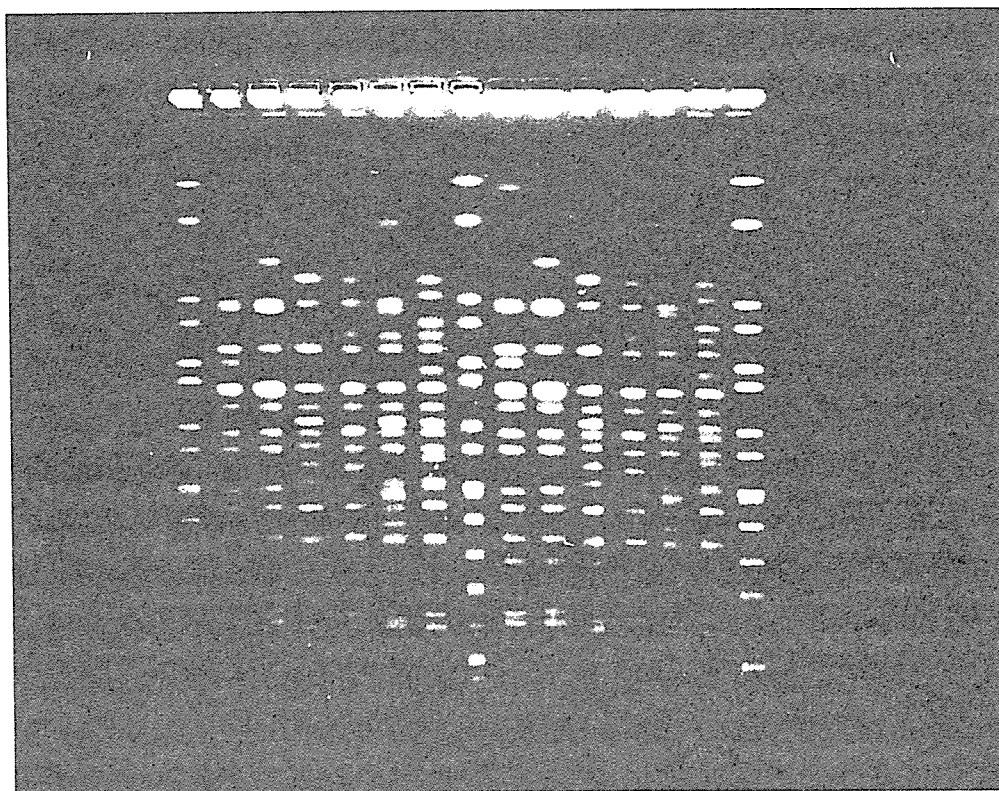


写真1:施設2

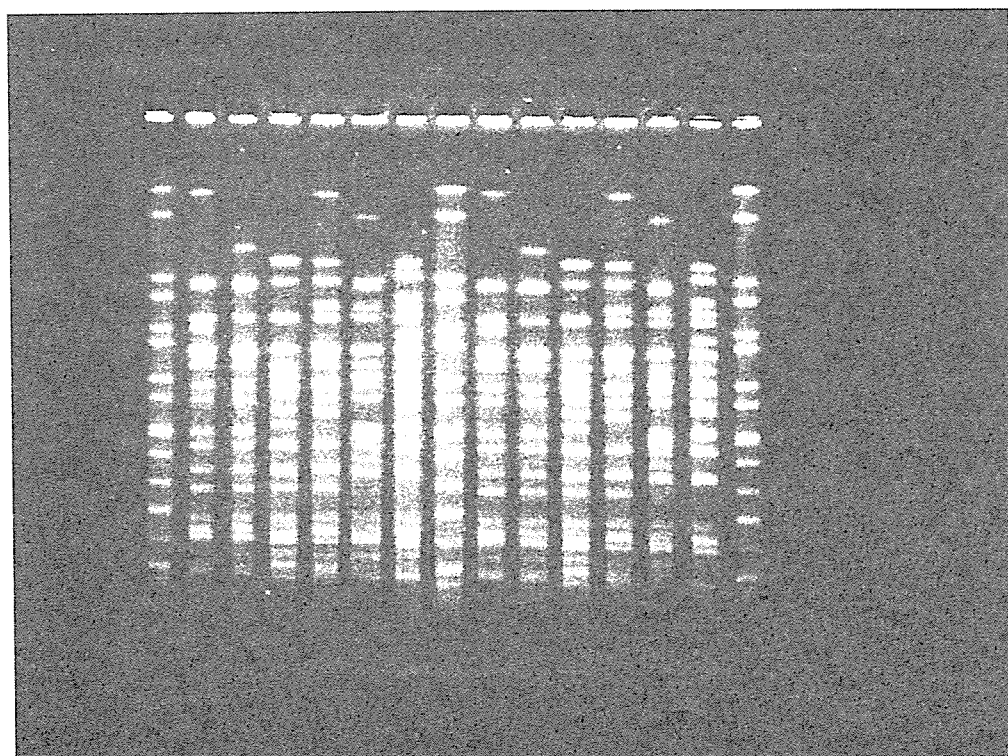


写真1:施設3

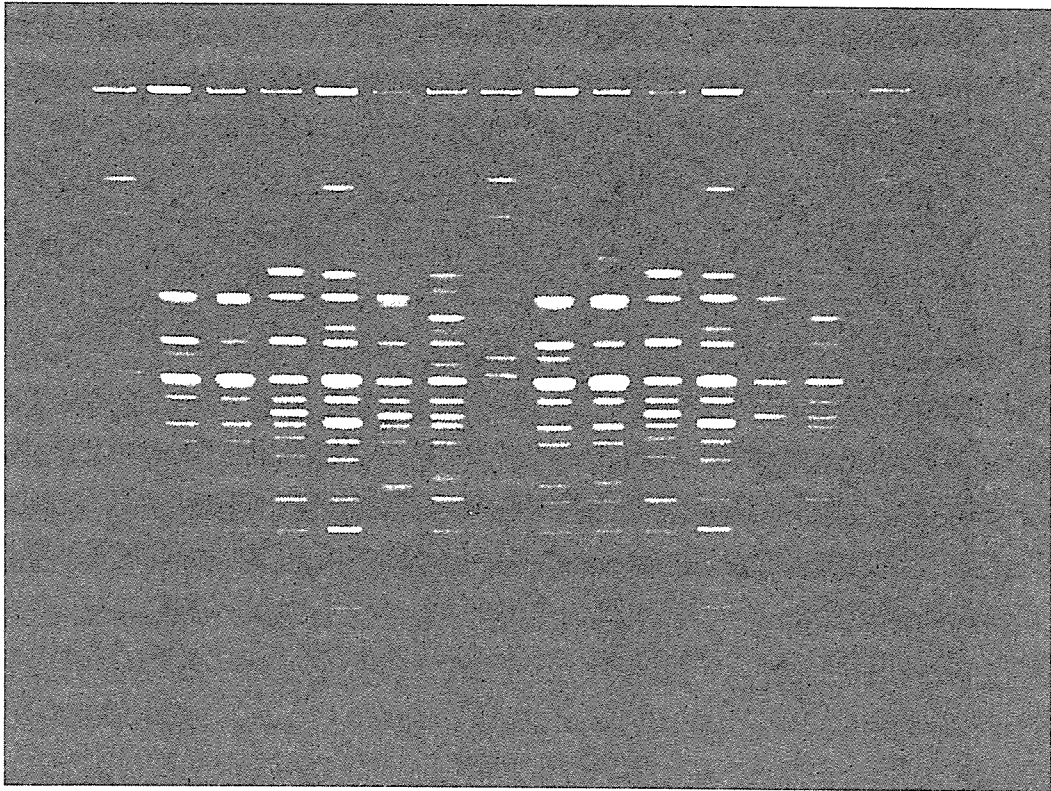


写真1:施設4

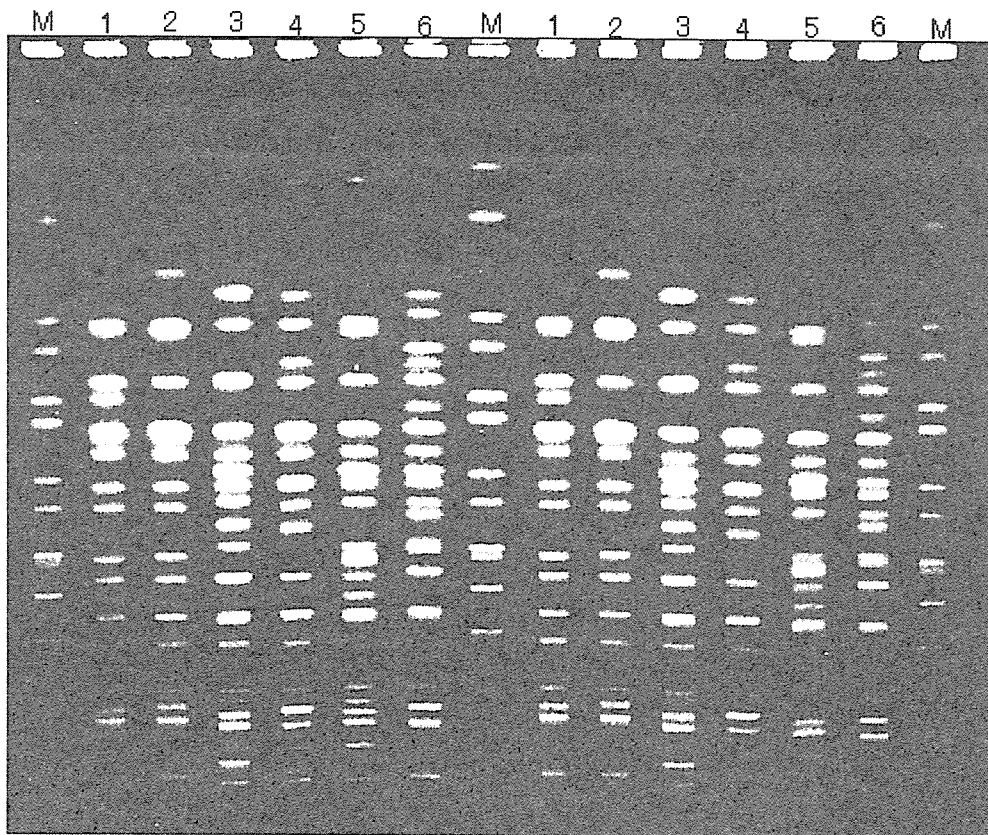


写真1:施設5

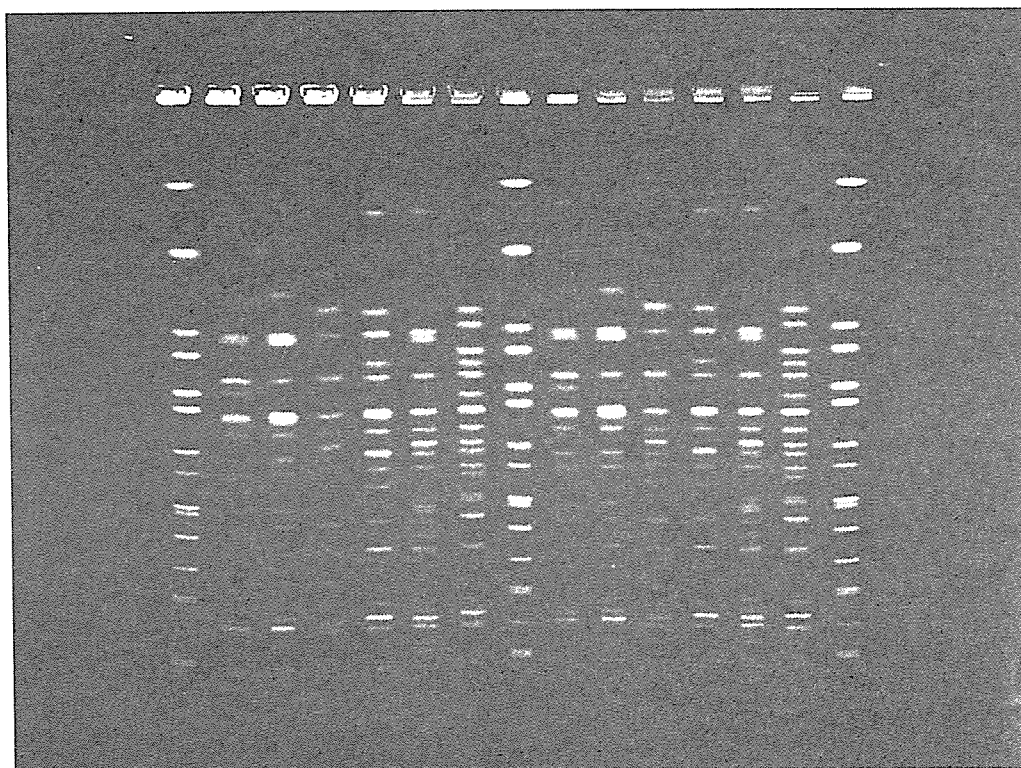


写真1:施設6

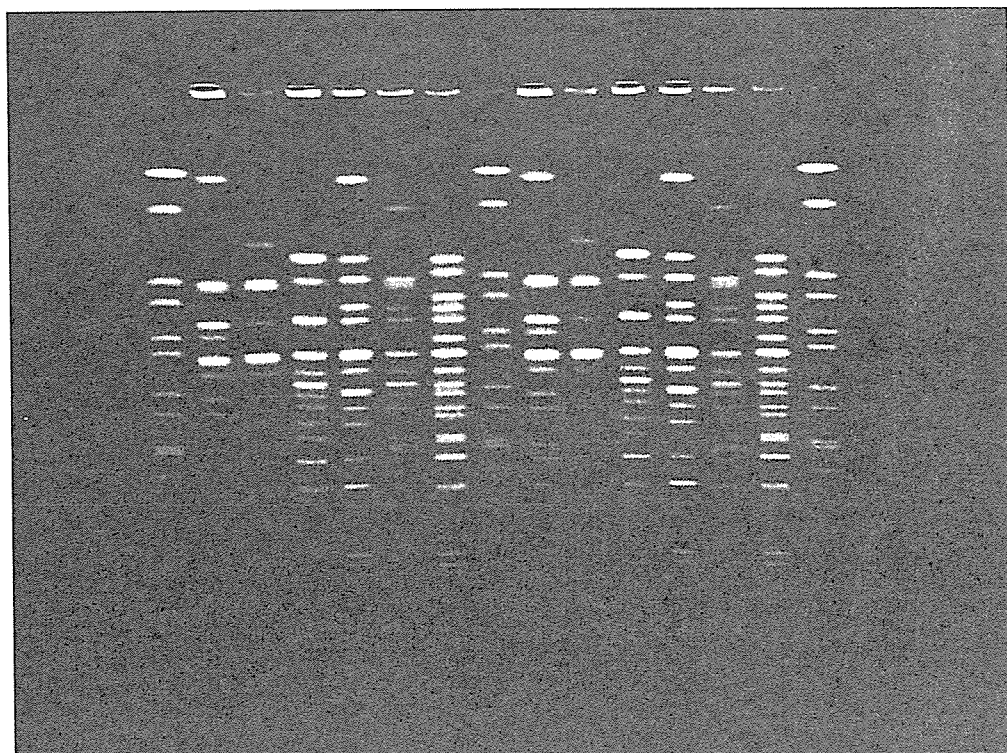


写真1:施設7

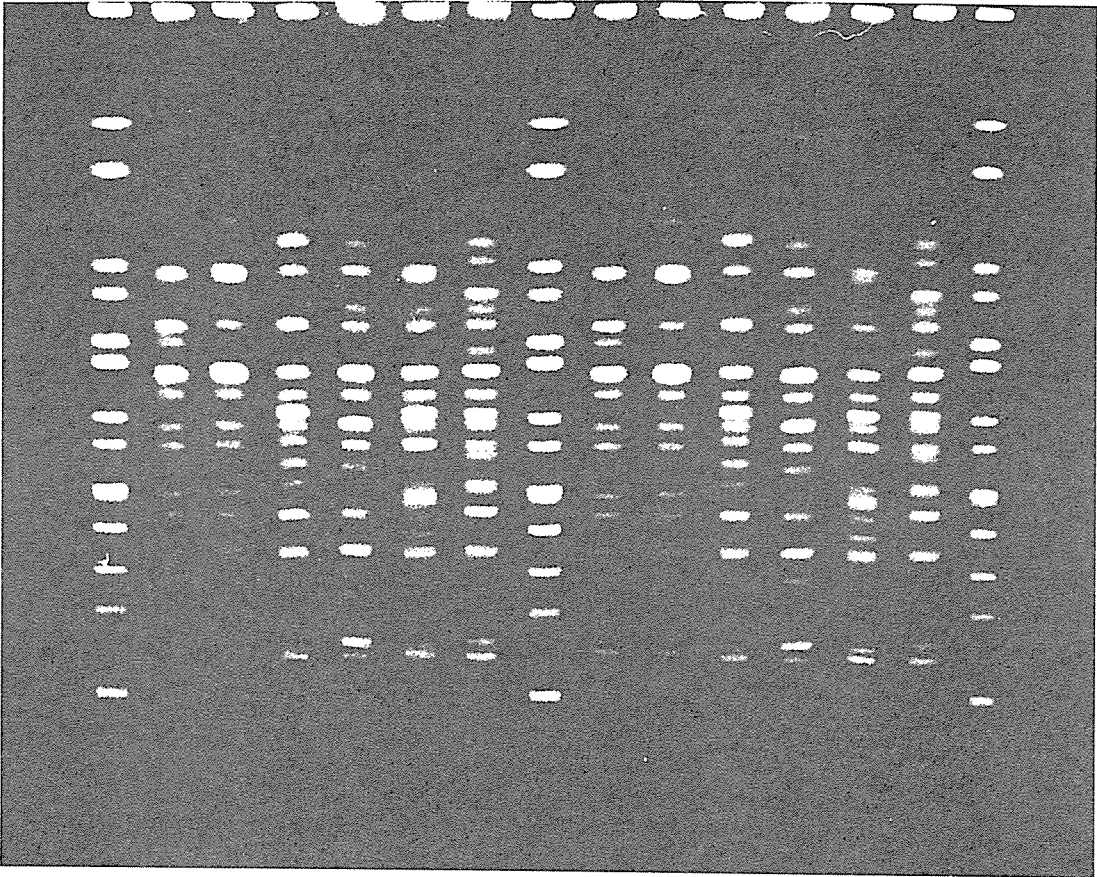


写真1:施設8

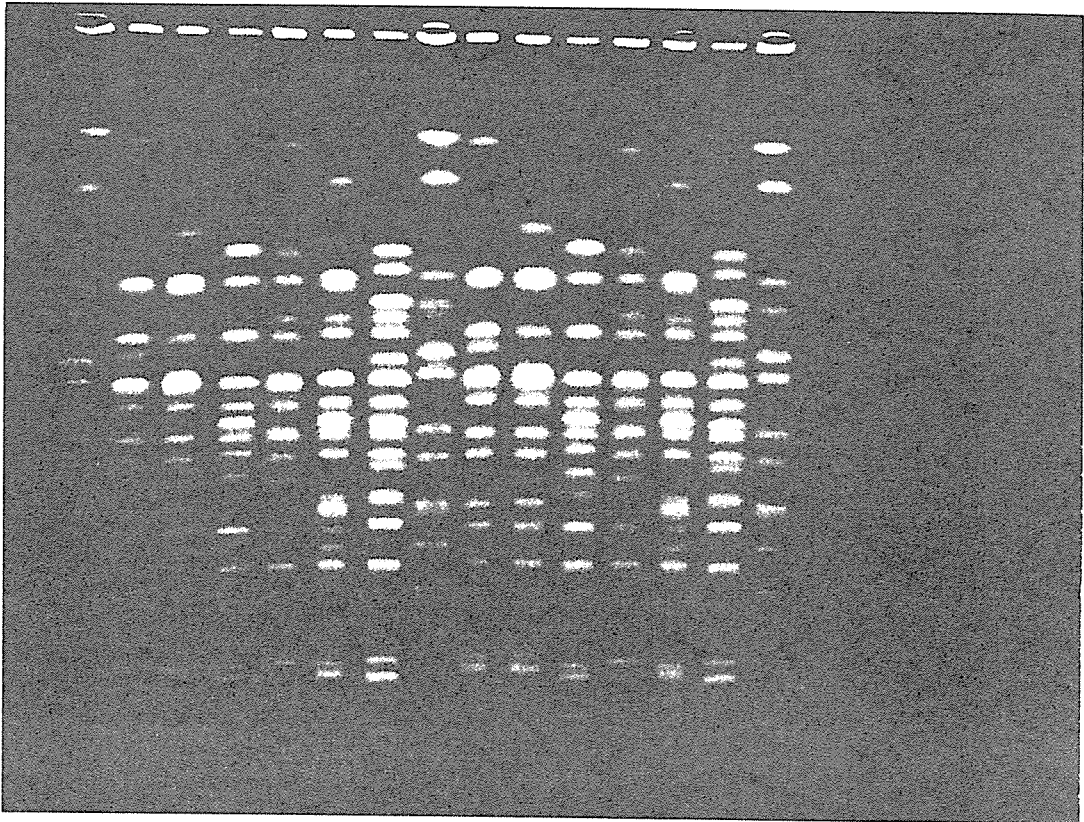


写真1:施設9

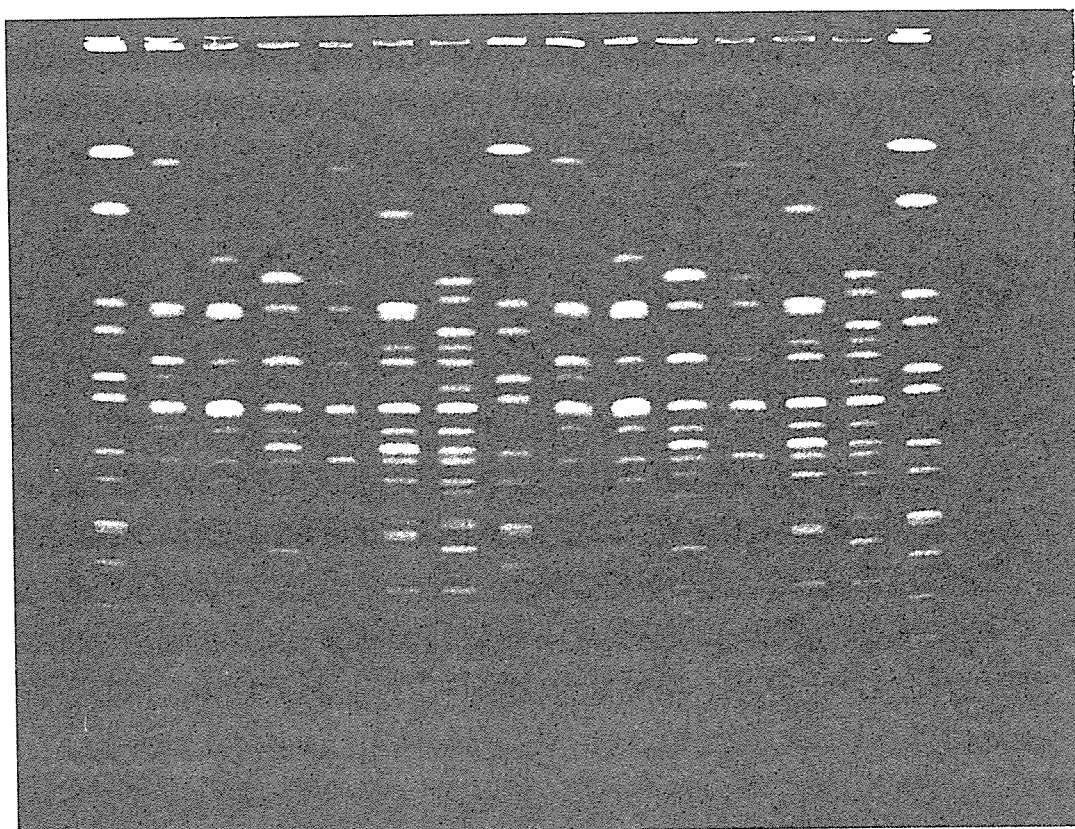


写真1:施設10

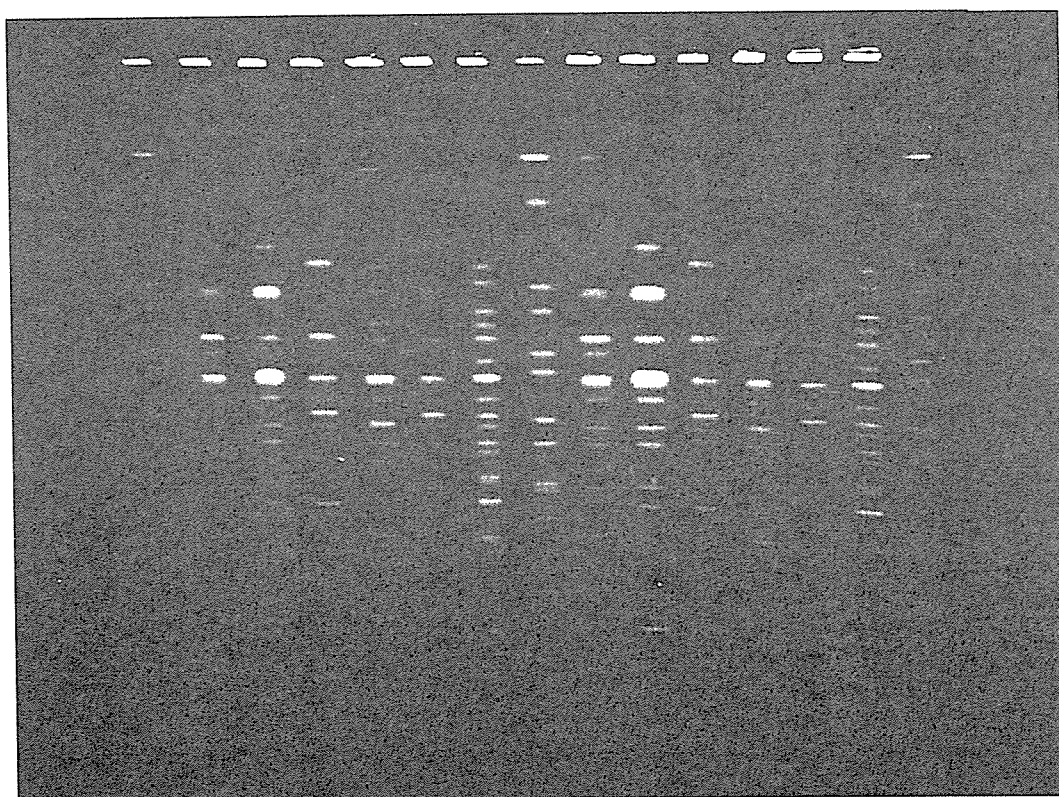
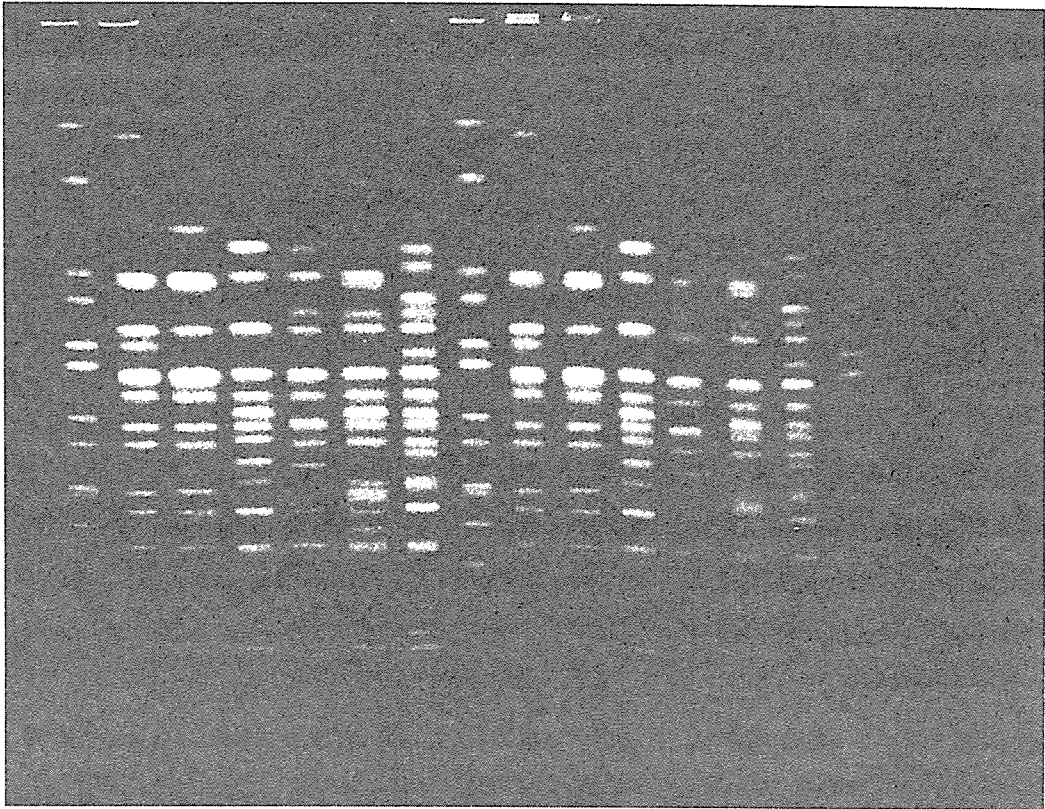


写真1:施設11



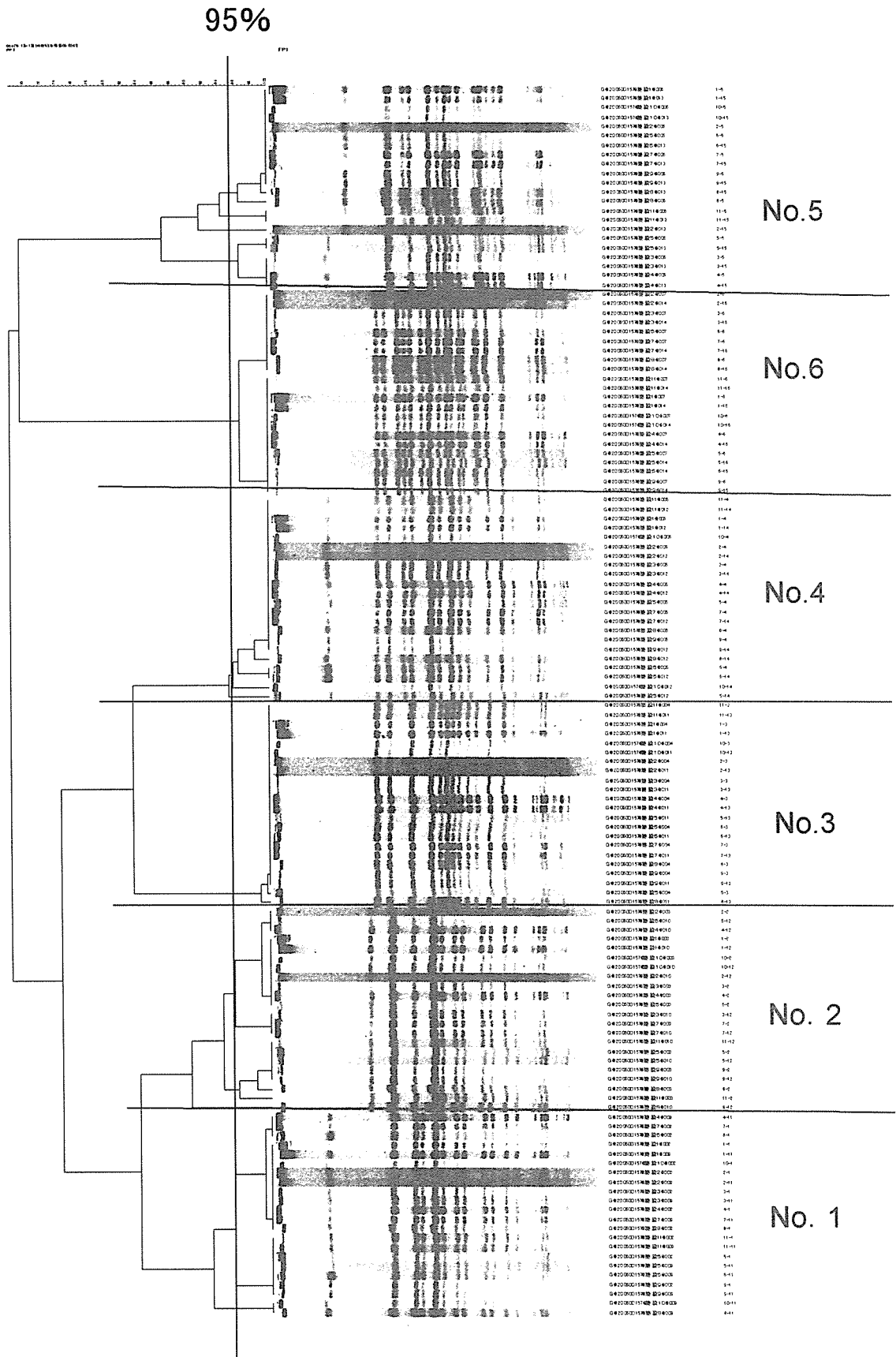
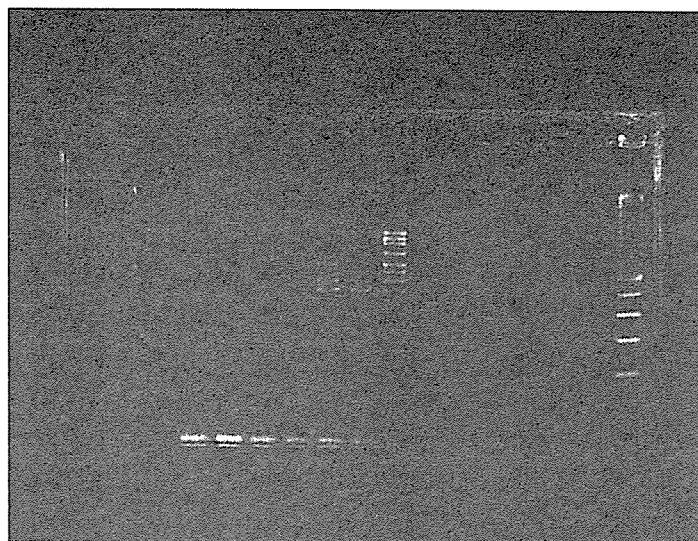


図1 11施設で実施した共通菌株(6株)のデンドログラム

写真2 IS-Printing system の検討:

PCRサイクル数の違いによるバンドの検出状況

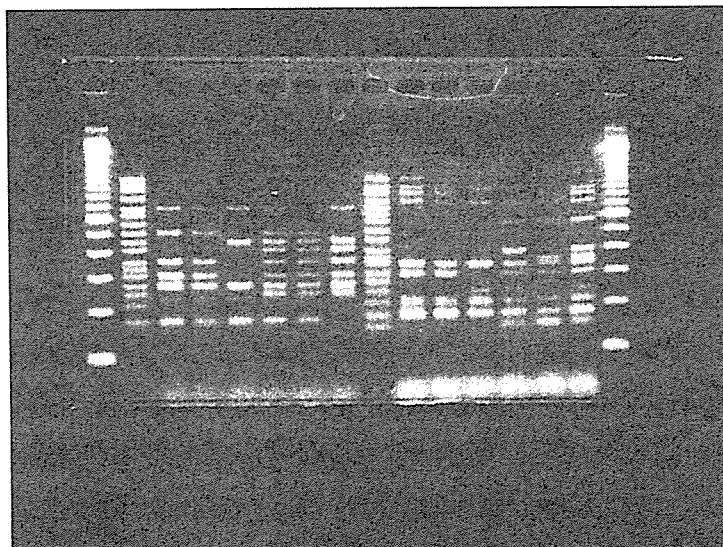


菌株No. 1~6
左側:25サイクル
右側:20サイクル

3%アガロース
(Agarose S,ニッポンジーン)

写真3 IS-Printing system の検討:

熱抽出法によるDNAの抽出



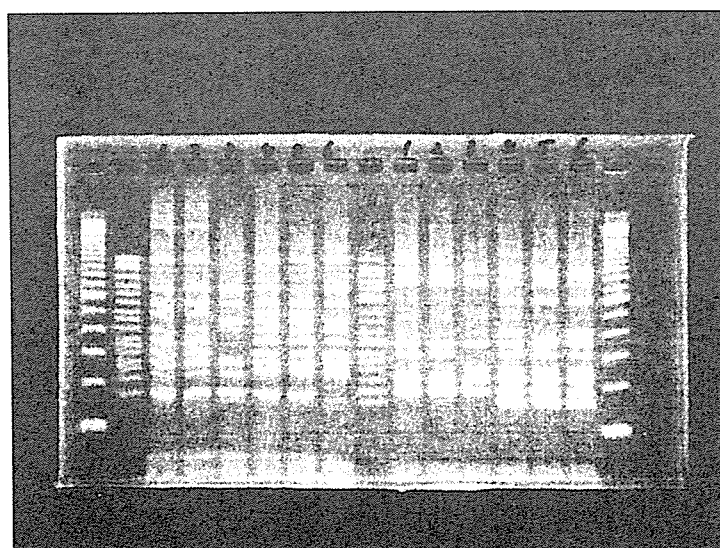
菌株No.1~6
左側:Primer 1
左側:Primer 2

PCRサイクル:25サイクル

3%アガロース
(Agarose S,ニッポンジーン)

写真4 IS-Printing system の検討:

アルカリ抽出法によるDNAの抽出



菌株No.1~6
左側:Primer 1
左側:Primer 2

PCRサイクル:25サイクル

3%アガロース
(Agarose S,ニッポンジーン)

表1. 腸管出血性大腸菌O157のPFGE法とIS-Printing Systemでの解析法の比較

No.	菌株No	毒素型	PFGE型	IS-Printing System						
				Primer 1 (17バンド)			Primer 2 (18バンド)			
1	06600	VT2	T-0614	000010	001000	010001	010100	000001	000110	10
2	06677	VT1+2	T-0605	000010	011110	011101	001000	100111	100111	11
3	06679	VT1+2	T-0634	000010	011110	111101	001100	100011	101111	11
4	06681	VT1+2	T-0635	001010	010100	110000 +2	110100	100011	101011	11
5	06605	VT1	ヌメア	000010	011110	110001	001100	100011	000101	10
6	06680	VT2	T-0602t	100010	110100	010000 +1	110000	110001	021110	10
7	06682	VT2	T-0602s	000010	010100	000001	110000	110001	000100	10
8	06684	VT2	T-0647	000010	010100	111101 +1	011000	100010	000110	+1
9	06686	VT1+2	T-0602m	000110	011010	111101	011100	000011	000100	11
10	06687	VT1+2	T-0602v	000110	011110	111100	011100	100011	101111	11
11	06689	VT2	T-0602u	110010	110100	000001 +1	110000	110001	000100	10
12	06693	VT2	T-0610f	000000	110100	010001	110100	100001	000110	10
13	06696	VT2	T-0614e	000010	010100	000001	110000	110001	000100	10
14	06851	VT2	T-0610g	000010	110100	000001	110000	110000	000110	10
15	06853	VT2	T-0616d	100000	110100	110001	011100	100011	000100	10
16	06854	VT1+2	T-0626e	100110	101110	111100	011100	100011	101111	11
17	06856	VT1+2	T-0633	100010	110100	011100	110100	200000	101111	11
18	06857	VT2	T-0610e	100000	110120	111101	110000	210000	110110	10
19	06596	VT2	T-0610c	000010	0100010	110001	111100	000001	100110	10
20	06598	VT2	T-0610c	000010	0100010	110001	111100	000001	100110	10
21	06695	VT2	T-0638	001000	110000	110001	111100	000011	101010	10
22	06852	VT2	T-0638	001000	110000	110001	111100	000011	101010	10
23	06672	VT1+2	T-0610d	000010	111101	111101	000100	100101	100111	11
24	06675	VT1+2	T-0610d	000010	001110	111100	011101	100111	101111	11
25	06674	VT1+2	T-0602j	000000	011110	111101	000000	100011	100111	11
26	06688	VT1+2	T-0602j	000110	011010	110001	011100	000011	000100	11

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

1. 埼玉県衛生研究所
 - (1) EHEC O157集団感染事例
 - (2) EHEC O111集団感染事例
2. 千葉県衛生研究所 EHEC O157事例
3. 神奈川県衛生研究所 EHEC O157食中毒事例
4. 横浜市衛生研究所
搾乳体験でSTEC O157による感染が疑われた事例
5. 長野県環境保全研究所
EHEC O157散発事例
6. 東京都健康安全研究センター
O157食中毒事例 Diffuse outbreak

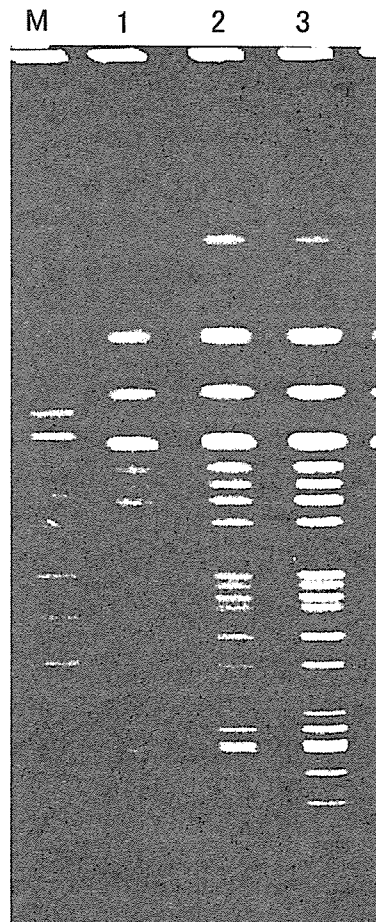
サルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

7. 埼玉県衛生研究所
*Salmonella*血清型Enteritidisによる食中毒事例
8. 静岡県環境衛生科学研究所
 - (1) *Salmonella*血清型Newport食中毒事例の概要および分離株のPFGE画像
 - (2) *Salmonella*血清型Enteritidis食中毒事例の培養および分離株のPFGE画像
9. 東京都健康安全研究センター
*Salmonella*血清型Enteritidisによる食中毒事例

1. 埼玉県衛生研究所

(1) EHEC O157集団感染事例

2006年5月中旬に下痢、腹痛、血便の症状を呈した女兒から腸管出血性大腸菌O157:H7(VT1&2)が分離された。疫学調査の結果、親戚宅で行われたバーベキューに参加していたことが判明し、接触者検便で親戚4名からも同型菌が分離された。この4名はいずれも無症状であった。

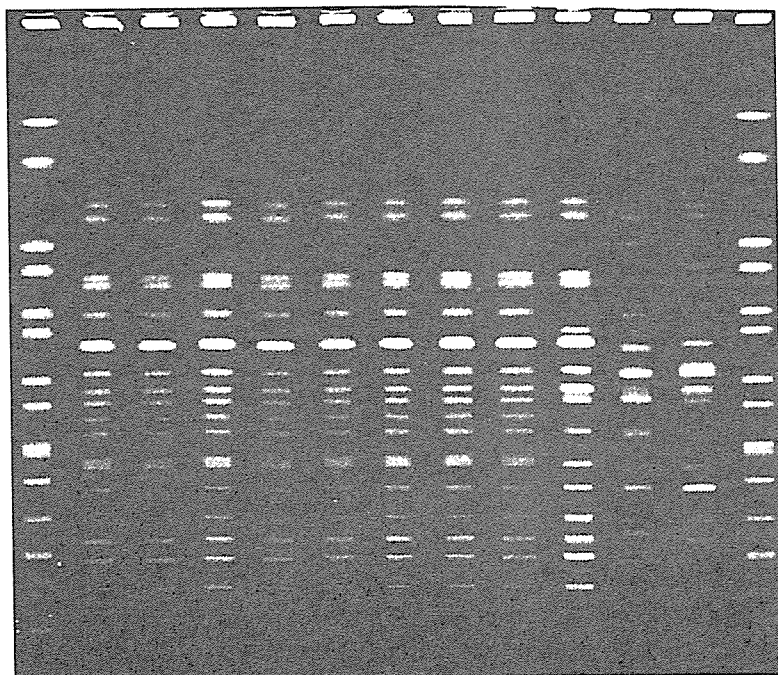


M: *Salmonella* Braenderup H9812/ *Xba* I digestion
1: Sa06230(患者)
2: Sa06231(接触者)
3: Sa06232(接触者)

1. 埼玉県衛生研究所

(2) EHEC O111集団感染事例

2006年4月初旬、下痢、発熱、嘔吐の症状を呈し、HUSを発症した男児から腸管出血性大腸菌O111:HNM(VT1 & 2)が分離された。接触者検便の結果、患者家族3名を含む12名から同型菌が分離された。感染源及び感染経路は不明であったが、分離株のPFGEパターン及び薬剤耐性試験の結果は一致した。



M: *Salmonella* Braenderup H9812/ *Xba* I digestion

- 1: EC06004
- 2: EC06005
- 3: EC06006
- 4: EC06007
- 5: EC06011
- 6: EC06012
- 7: EC06015
- 8: EC06013
- 9: EC06008
- 10: EC05099
- 11: EC04060

集団事例分離株

同時期県内散发事例分離株

2005年分離株

2004年分離株

2. 千葉県衛生研究所 EHEC O157 事例

事例 1

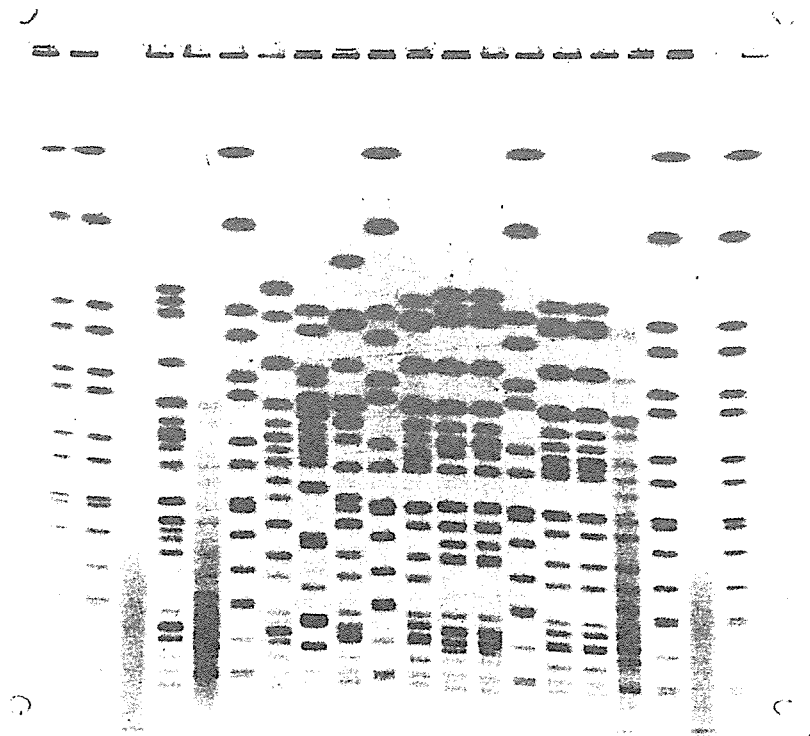
過敏性大腸炎で通院中の患者Aから EHEC O157 (VT1)が検出された。保健所の調査により、職場で患者Aと共通の弁当を喫食していた同僚Bおよび弁当製造施設の従業員Cから EHEC O157 (VT1)が検出された。同僚Bおよび従業員Cは無症状保菌者であった。

ゲルイメージ 060704.tiff

lane 11: 患者A

lane 15: 同僚B

lane 16: 従業員C



事例2

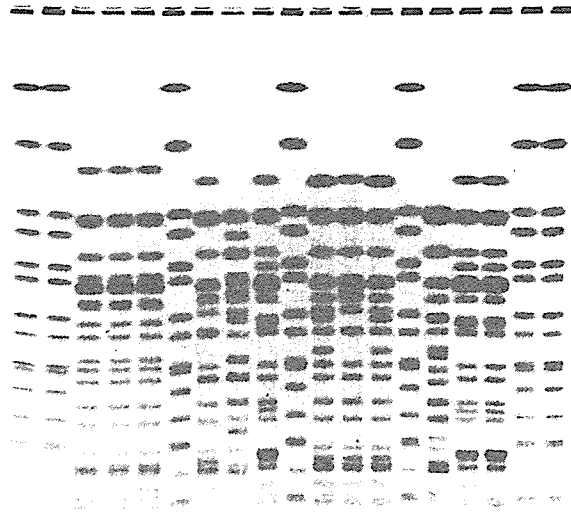
保育園において、6名の児童がEEHC O157 (VT1, VT2)に感染した。感染者から家族への2次感染は発生しなかった。

ゲルイメージ SAVE05.tif

lane 3: 4歳の女の子

lane 4: 3歳の男の子

lane 5: 5歳の女の子

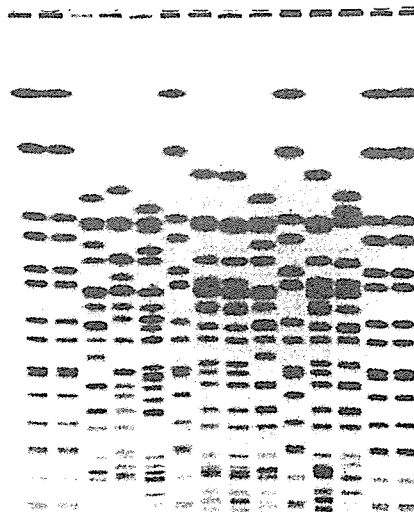


ゲルイメージ 060723.tif

lane 7: 2歳の女の子

lane 8: 3歳の男の子

lane 11: 4歳の女の子



3. 神奈川県衛生研究所 O157 食中毒事例

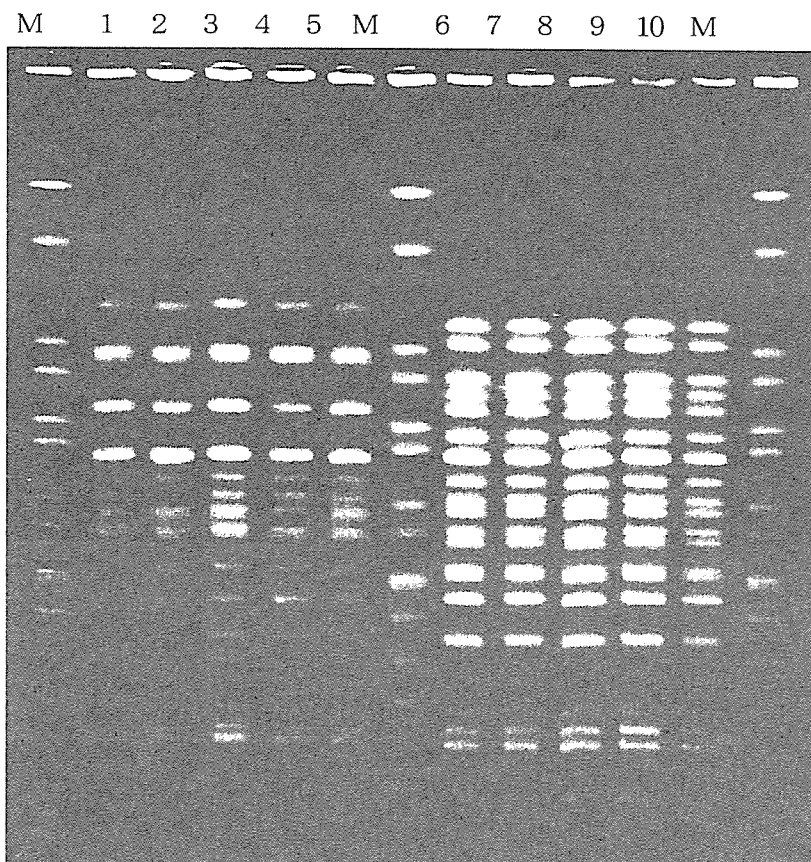
食中毒事例

事例1 : O157 : VT1・2

1～5は同一食（バーベキュー）を喫食した2家族の食中毒と考えられた事例が、同時期に同じ血清型および毒素型を示した患者由来株の PFGE 解析により、地域に拡大した食中毒であることが判明した事例である。1・2・3はバーベキュー関係者で2はバンドが1つ異なるが初発者1の家族である。一方、4・5はバーベキューと関連はないが近隣に在住する患者由来の菌株で、同じバンドを示した。原因食は不明である。

事例2 : O157 : VT2

6～10は藤沢市で平成18年9月から10月に起こった焼肉レストランにおける食中毒事例で、神奈川県・横浜市・東京都の複数の自治体にまたがった感染事例であった。6・7は患者由来株、8は調理従事者で保菌者由来株である。また、9は東京都、10は横浜市から分与された菌株の PFGE 結果で、すべてのパターンが一致した。原因食は回収できなかった。

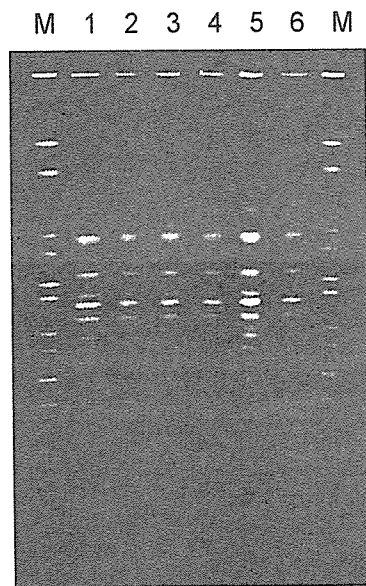


M : マーカー : *Salmonella* Braenderup

4. 横浜市衛生研究所

搾乳体験で STEC O157 による感染が疑われた事例

2006年10月初旬に市内A区在住の家族2名から STEC O157:H7 (VT1&2) が検出され、この家族が9月末にB区の牧場の搾乳体験に参加していたことから、搾乳体験牛等のウシ5頭の糞便を検査したところ、2頭から O157:H7 (VT1&2) が検出された。続いて10月中旬に同じく9月末に同牧場の搾乳体験に参加していたC区の家族2名からも STEC O157:H7 (VT1&2) が検出された。これら6株の *Xba*I を用いたパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) の結果は同一パターンであり、搾乳体験による感染事例であることが示唆された。



- 1 : A 区患者由来株
- 2 : A 区家族由来株
- 3 : ウシ由来株
- 4 : ウシ由来株 (搾乳体験牛)
- 5 : C 区患者由来株
- 6 : C 区家族由来株
- M : *Salmonella* Braenderup H9812

全て *Xba*I 処理