



図 10 施設 J の泳動写真



図 11 施設 A の解析結果

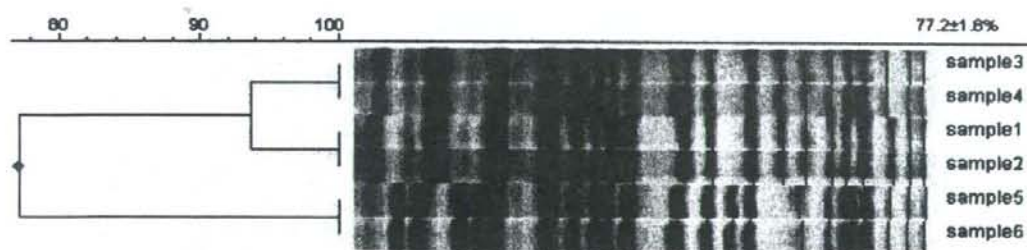


図 12 施設 B の解析結果

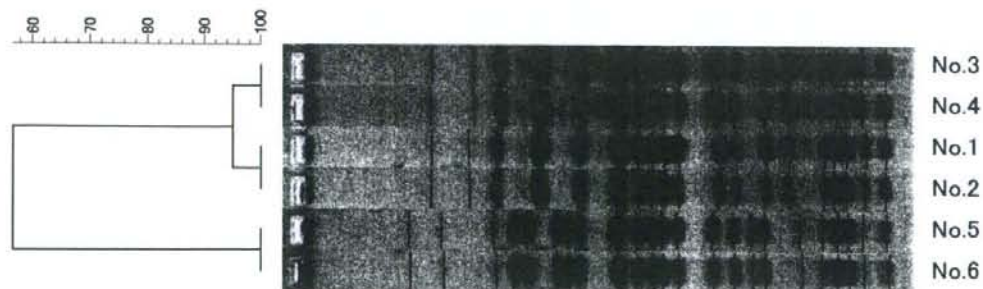


図 13 施設 C の解析結果



図 14 施設 D の解析結果



図 15 施設 E の解析結果



図 16 施設 F の解析結果



図 17 施設 G の解析結果



図 18 施設 H の解析結果



図 19 施設 I の解析結果

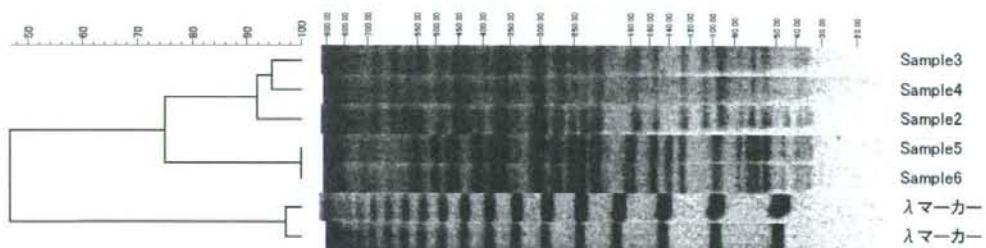


図 20 施設 J の解析結果

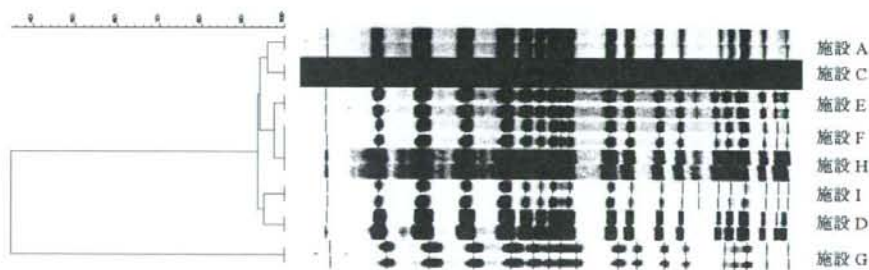


図 21 菌株 A の施設間格差

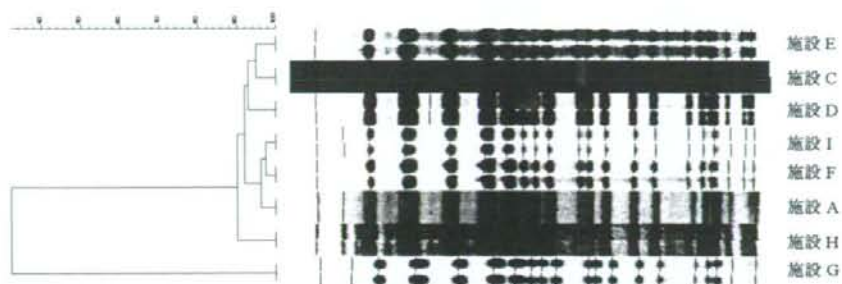


図 22 菌株 B の施設間格差

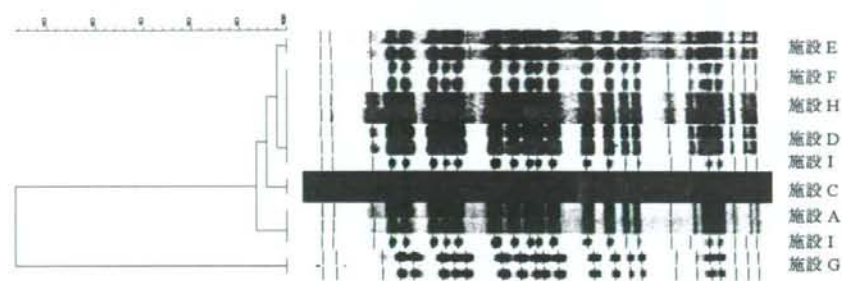


図 23 菌株 C の施設間格差

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 20 年度 研究分担報告書

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

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	土井 育子	茨城県衛生研究所
	馬淵 佐知子	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
	横山 栄二	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
	廣井 みどり	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、ほぼ同じ条件下で PFGE 解析を行い、結果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、多くは菌株ごとにクラスターを形成していたが、相同性が低い施設もあった。これは写真の解像度が低いあるいはバンドがシャープではないため、解析時のバンド読み取りでバンドの選択が困難であったためであると考えられた。施設によっては担当者が頻繁に交代する場合もあるため、共通菌株を用いた精度管理は、今後も行っていく必要がある。

IS-printing system 解析法（IS 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。アンケートの結果でも、IS 法は簡便であり、PFGE 法に代わる手法として非常に期待できるという結果であった。また、異なる施設間で、菌株の相同性を比較する場合は、PFGE 画像を電送し比較するよりも容易であった。しかし、IS 解析データをそのまま比較するのではなく、10 進法に変換して比較する等の工夫が必要であった。

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 O157 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。腸管出血性大腸菌等による Diffuse Outbreak (散在的集団発生) が起きた場合、感染源を迅速に特定し、拡大を防止するための策を早急に講じなければならない。分離菌株の迅速で正確な分子疫学的解析を行うためには、各地方衛生研究所で行う PFGE 解析法の技術レベルを常に一定に保つことが必要である。

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、PFGE 法以外の分子疫学解析法として、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 (IS 法) を実施し、その有用性および PFGE パターンとの相関性等について検討した。

B. 研究方法

1. 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、2008 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 5 株 (VT1+VT2 産生株 3 株、および VT2 産生株 2 株) を供試した。

2) PFGE 解析

感染研プロトコールにより行った。

アガロースブロックの作製: 0.7mm プラグキャストを使用し、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: 制限酵素 *Xba* I で処理した。

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: 6V/cm, 2.2sec~54.2sec, 20 時間, buffer 温度 12°C で行った。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。

サイズマーカー: *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。

3) 画像解析: 11 施設から送付された PFGE 画像を対象に、画像解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いてデンドログラム解析を行った。

2. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例および散发事例への応用

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。

3. IS-printing System 解析

1) IS-printing System 解析と PFGE パターンの相関性の比較

関東ブロック 5 施設に IS 試薬キット（東洋紡）を配布し、共通菌株 5 株および各地研で分離された 0157 株 15 株程度について IS 解析を行い、PFGE パターンと比較した。

2) IS 法解析結果の比較方法の検討

IS 法はプライマーセット 1 で 18 カ所、プライマーセット 2 で 18 カ所を増幅させ、出現したバンドのパターンを比較することで、菌株間の相同性を推定する方法である。バンドが有る場合を「1」、バンドが無い場合を「0」として判定した後、「0」および「1」の並びを 2 進法と想定し、その値を 10 進法に変換して比較した。

3) IS-printing System の評価

IS 解析についてアンケートを実施し、意見・感想をまとめた。

C. 研究結果

1. 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 5 株を用いて、11 施設（施設 1～11）で行った PFGE 画像を写真 1 に示した。染色が薄いためか、バンドが非常に薄く読み込むのに苦労した施設があった（施設 1 および施設 2）。また写真が粗くバンドを選ぶことが非常に困難であった施設もあった（施設 4 および施設 8）。

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 5 菌株をそれぞれ 2 カ所のレーンで泳動した。施設 4 の一部の株でクラスターから外れてしまうものがあったが、その他はいずれも、菌株ごとにクラスターを形成していた。

類似度をみると、菌株 No. 1 では 8 施設で 100% 一致となったが、1 施設は 90% 以下であった。その他の菌株では、類似度はいずれも 90% 以上であった。しかし、菌株 No. 2, No. 5 では、施設ごとにバラツキが認められた。菌株 No. 4 では 11 施設中 10 施設が 100% 一致となった。菌株 No. 2 は変異しやすい菌株であったためか、施設によっては 700kb 付近にバンドが出現し 500kb 付近のバンドが消えてしまったという現象が認められた。

写真の解像度が低く、バンドの位置が選びにくかった写真や、バンドがシャープではないために、どこを選択したらよいか迷う写真があった。

菌株 No. 2 と No. 3 は PFGE パターンで比較するとバンドが 2 本異なるのみであったが、全施設で完全に区別することができた。

2. 腸管出血性大腸菌の PFGE 解析の応用

5 地研で経験した腸管出血性大腸菌による食中毒事例や散発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表 1 に示した。千葉、埼玉、東京では、8 月後半～9 月前半にかけ

て同一 PFGE パターン株の 0157 が多数検出されたため、同一感染源とする Diffuse outbreak が疑われた。患者の喫食調査等を再度行ったが、感染源を特定することは出来なかった (3. キムチを原因食品とした腸管出血性大腸菌 0157 集団感染事例における検査および行政対応とその問題点, 千葉県衛生研究所を参照)

3. IS-printing System 解析

1) IS-printing System 解析と PFGE パターンの相関性の比較

関東ブロック 6 施設 (A~F) において、精度管理に用いた菌株 5 株および各地研で分離された 0157 株 15 株程度について IS 法で解析を行い、PFGE 法と比較した。施設 A で分離された 15 株について PFGE パターンと IS パターンを比較した結果、2 法の相関性は非常に高かった (表 2)。

共通菌株 5 株の IS 解析結果を表 3-1, 3-2 に示した。いずれの施設も IS 法の結果は全て同様であった。しかし、「プライマーセット 1」で非特異的バンドがあると答えた施設が 2 施設あった。

2) IS 法解析結果の比較方法の検討

IS 法は 0157 遺伝子を合計 36 カ所増幅させ、出現したバンドのパターンを比較することで、菌株間の相同性を推定する方法であるが、バンド数が多数であるため、菌株間の比較は容易ではない。そこで増幅バンドが認められた場合を「1」、バンドが認められない場

合を「0」として判定した後、「0」および「1」の並びを 2 進法と想定し、その値を 10 進法に変換して比較した。「プライマーセット 1」ではバンド No.1~9, No.10~18 の 2 カ所に、「プライマーセット 2」では No.1~9, No.10~16 の 2 カ所に区切り 10 進法に変換した。ベロ毒素型はそのままの表記とした。この方法で菌株 NO.1 を解析した場合、「プライマーセット 1」で増幅した場合「110100111-101101111」という結果が「423-367」という数値に変換されるため、菌株間の比較が容易となった (表 4)。

3) IS-printing System の評価

IS 解析についてのアンケート結果を表 5-1, 5-2 にまとめた。試薬の調整や PCR 反応そのものについては、比較的簡便であり問題はなかった。電気泳動時間は 90 分が 3 施設、60 分が 2 施設と、施設により異なっていた。

PFGE パターンとの相関性については 5 施設で相関性ありと回答し、全ての施設で PFGE 法に代わる手法として期待できるとした。しかし分子量の小さいバンドが読みにくいいため、明るさの異なる写真を 2 枚撮って判定した施設もあった。

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。昨年度に引き続き、基本的なブロック

作製方法の統一および写真撮影時の標準化を試みた。解析結果の類似度は、供試する菌株によっても大きく異なるが、今回の5株においては、いずれの菌株でも高い類似性が得られた。しかし、菌株によっては多少のバラツキが認められ、特に写真の解像度が低く、バンドの位置が選びにくかった写真やバンドがシャープではない場合等では類似度が低くなってしまった。

今年度の関東ブロックは11施設中3施設で担当者の異動が認められた。PFGE法は操作が複雑であるため、技術が伝承されにくいという欠点がある。常に技術力を一定に維持していくためには、定期的に精度管理を行っていくことが必要であると考えられた。

また各地研では、いずれも実際に発生した集団および散发事例について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。複数の自治体にまたがって同一PFGEパターンの0157が流行した場合、どの時点でどの様な情報を共有していけばよいか等が課題となった事例もあった。今後、自治体間のPFGEパターンの共有化や流行株情報の共有化をどのように行っていくかを検討する必要がある。

IS解析では実際に分離された0157を対象にIS解析を行い、PFGE解析と比較した結果、PFGEパターンが明らかに異なっている場合ではIS解析でもパターンは異なっており、両者はよく相関していた。共通株5株についてIS解析の結果を送付してもらい菌株の

相同性について解析した結果、全ての施設で結果が一致した。IS法は「数値」として表されるため、PFGE画像を電送して比較するよりも、菌株間の比較が容易であった。しかし菌株の相同性を比較する場合、得られた結果をそのまま比較するのは容易ではないため、10進法の数値に変換して比較する等の工夫が必要であった。

アンケートの結果からもIS法はPFGE法に代わる手段として期待できることが示唆された。

E. 結論

腸管出血性大腸菌0157の共通菌株を各地研でほぼ同じ条件下でPFGE解析を行い、その成績を解析ソフトを用いて解析した結果、ほぼ菌株ごとにクラスターを形成していたが、相同性が低くなってしまった施設もあった。これは写真の解像度が低く、バンドの位置が選びにくかったことや、バンドがシャープでないために、バンドの選択が困難であったために低くなってしまったことが示唆された。施設によっては担当者が頻繁に交代する場合もあるため、共通菌株を用いた精度管理は、今後も行っていく必要がある。

IS-printing system解析法(IS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。各地研へのアンケートの結果でも、IS法は簡便であり、PFGE法に代わる手法として非常に期待できるという結果であった。また、異なる施設間で、菌株の相同性を比較する場合は、PFGE

画像を電送し比較するよりも容易であった。しかし IS 解析データをそのまま比較するのではなく、10 進法に変換して比較する等の工夫が必要であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 東京都健康安全研究センター 微生物部食品微生物研究科：学生食堂で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による大規模食中毒事例－東京都，病原微生物検出情報(国立感染症研究所)，29, 5, 4-5, 2008

2) 横山栄二：キムチを原因食品とした腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例における検査および行政対応とその問題点，第 21 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会，2009，横浜市

H. 知的所有権の取得状況

なし

写真1

共通菌株(O157)5株のPFGE画像(施設1~11)

共通菌株:

腸管出血性大腸菌O157

No.1 E08636 (VT1+VT2)

No.2 E08964 (VT1+VT2)

No.3 E08967 (VT1+VT2)

No.4 E08648 (VT2)

No.5 E08657 (VT2)

DNAサイズマーカー:

S.Braenderup H9812

電気泳動条件:

6 V/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 マーカー

8 菌株No.1

9 菌株No.2

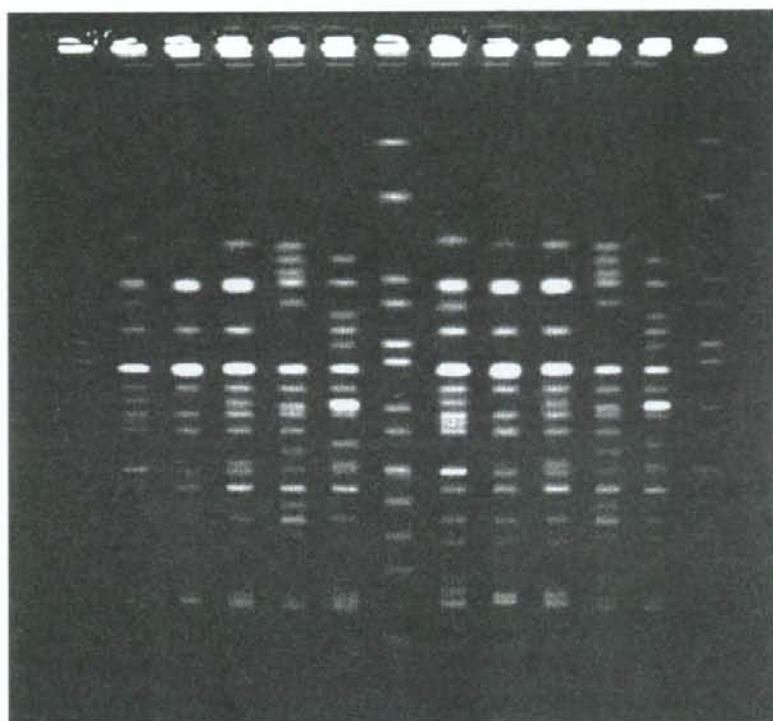
10 菌株No.3

11 菌株No.4

12 菌株No.5

13 マーカー(写真右側)

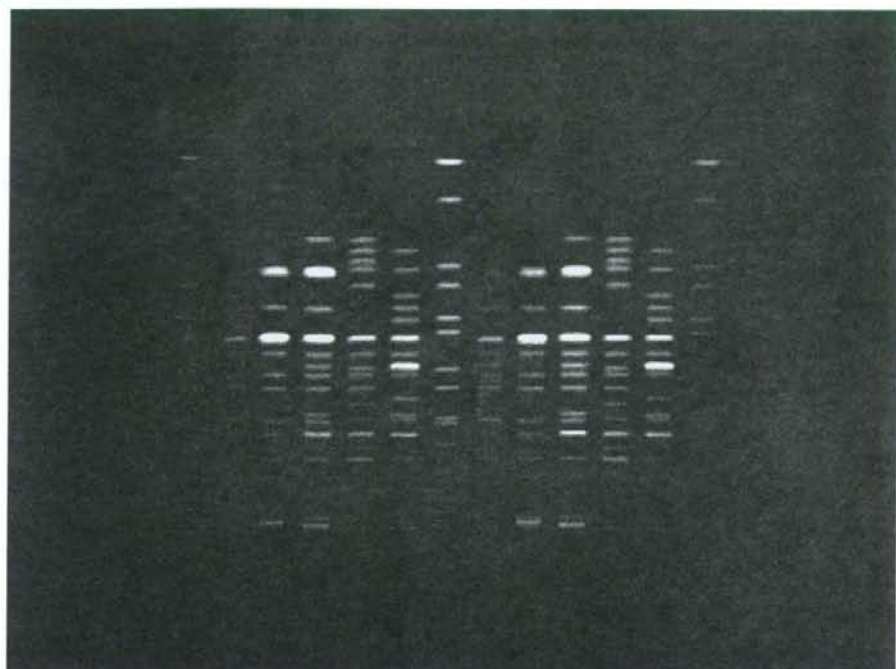
施設1



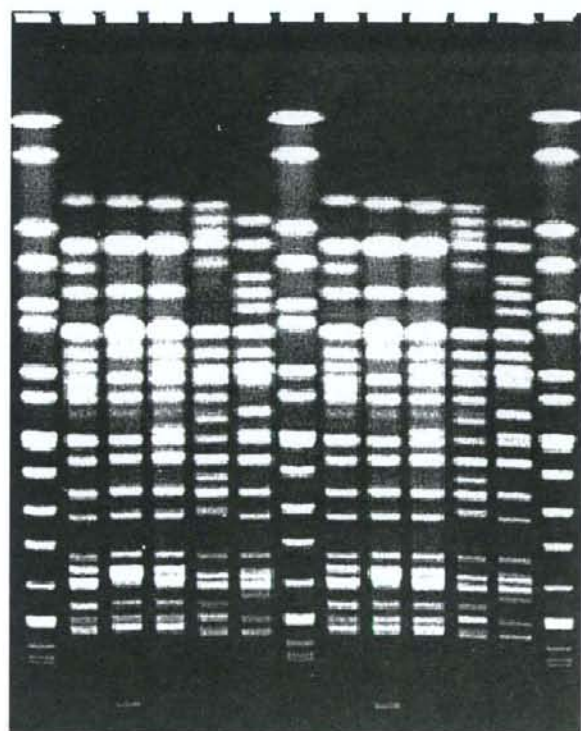
施設2



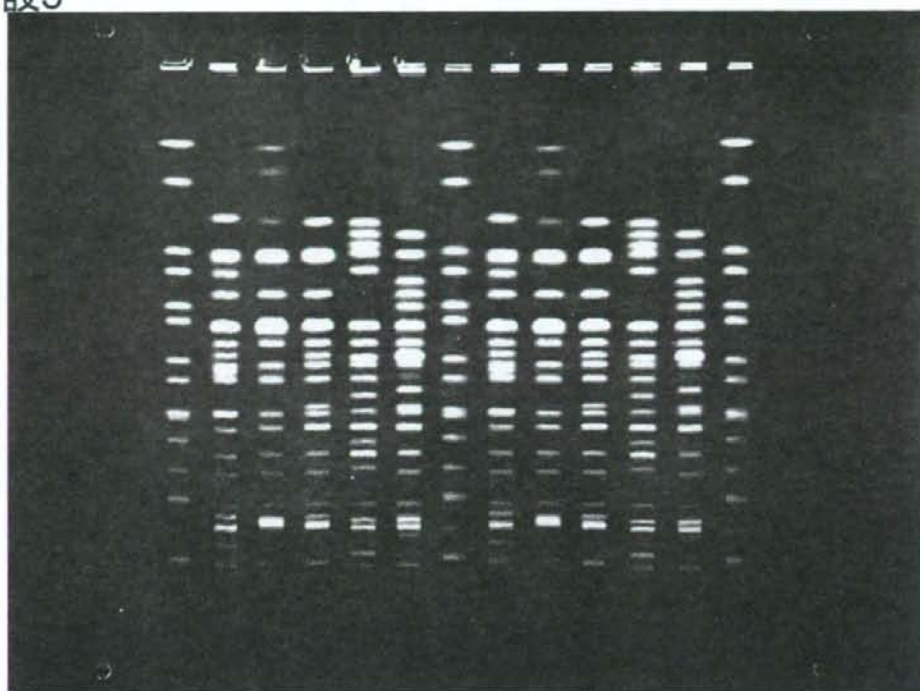
施設3



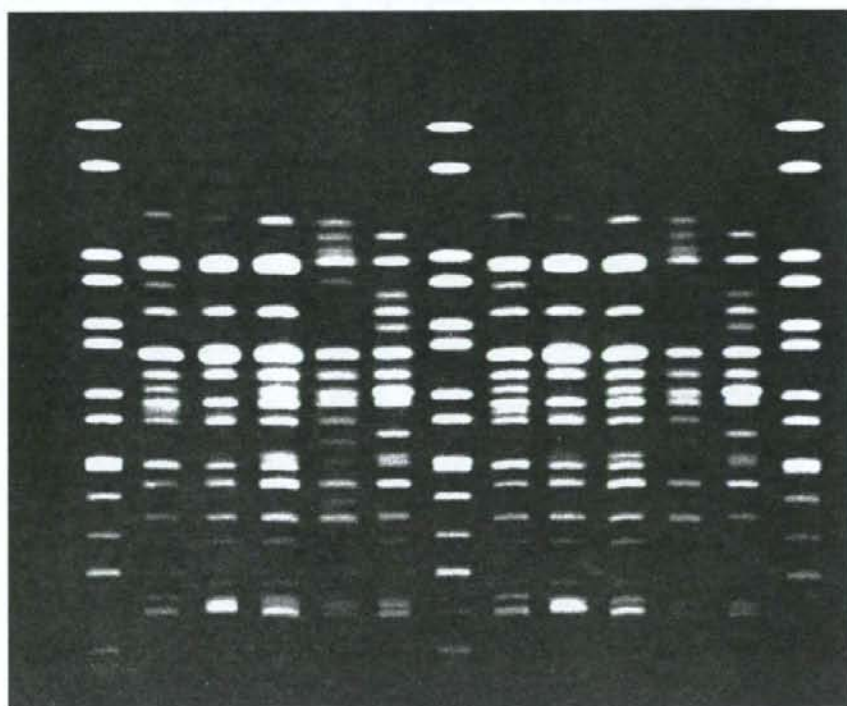
施設4



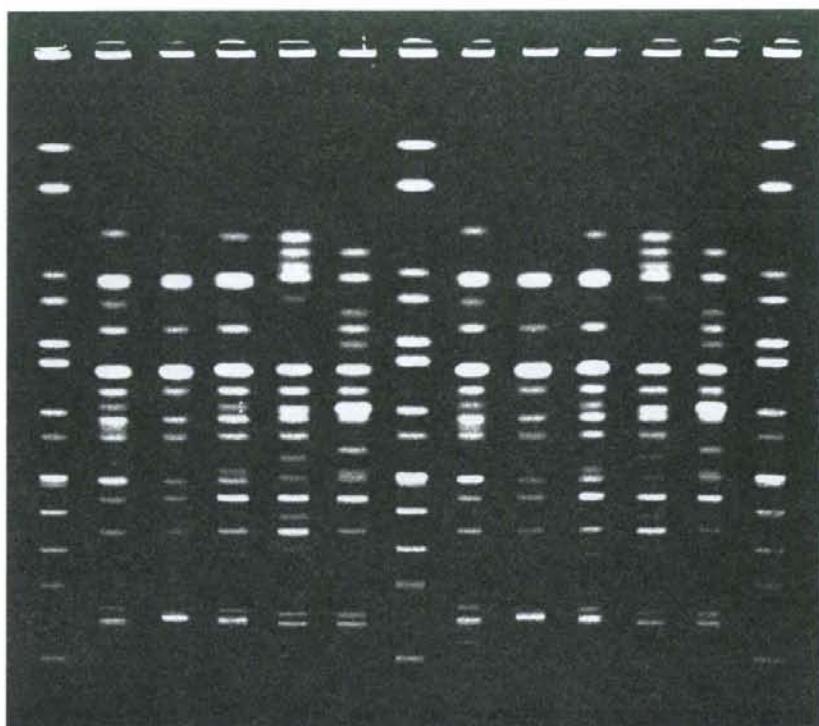
施設5



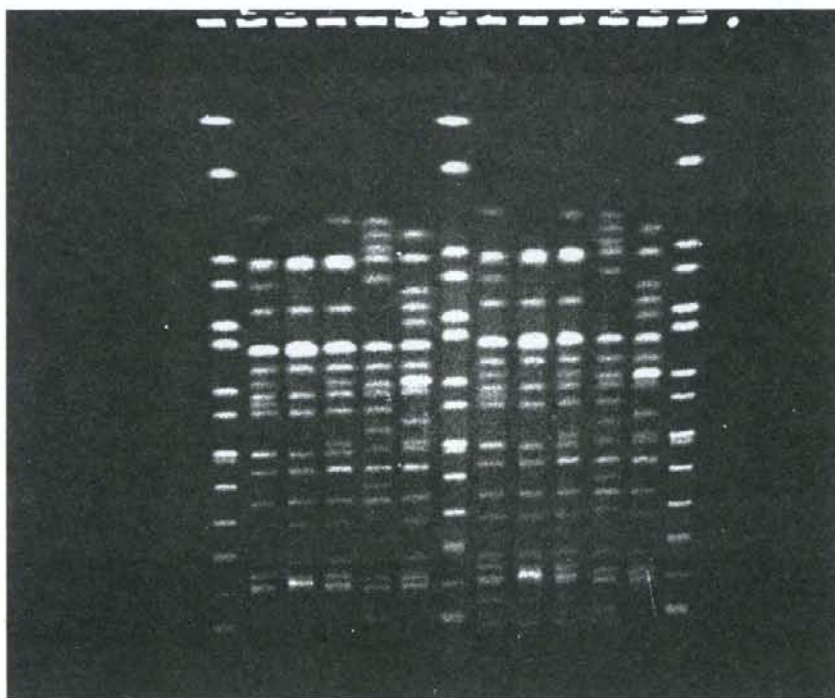
施設6



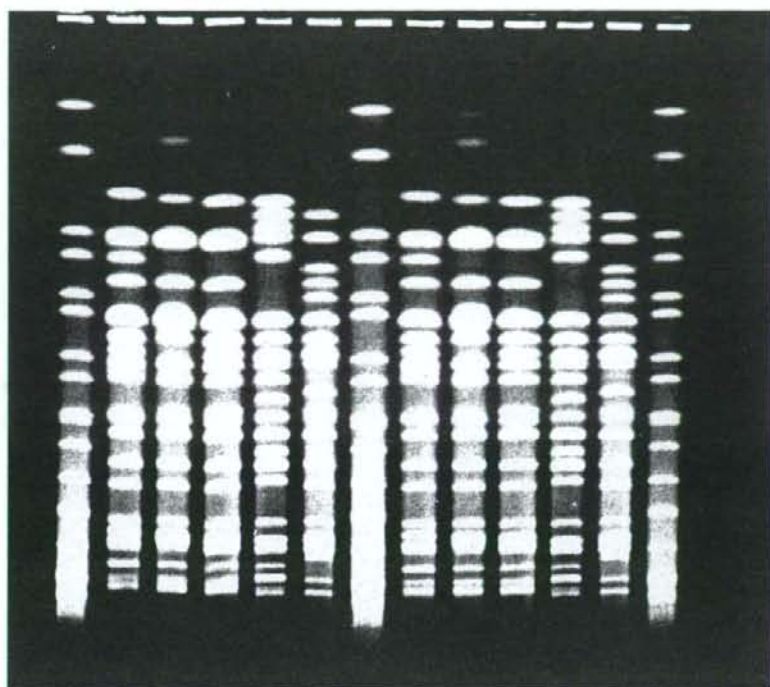
施設7



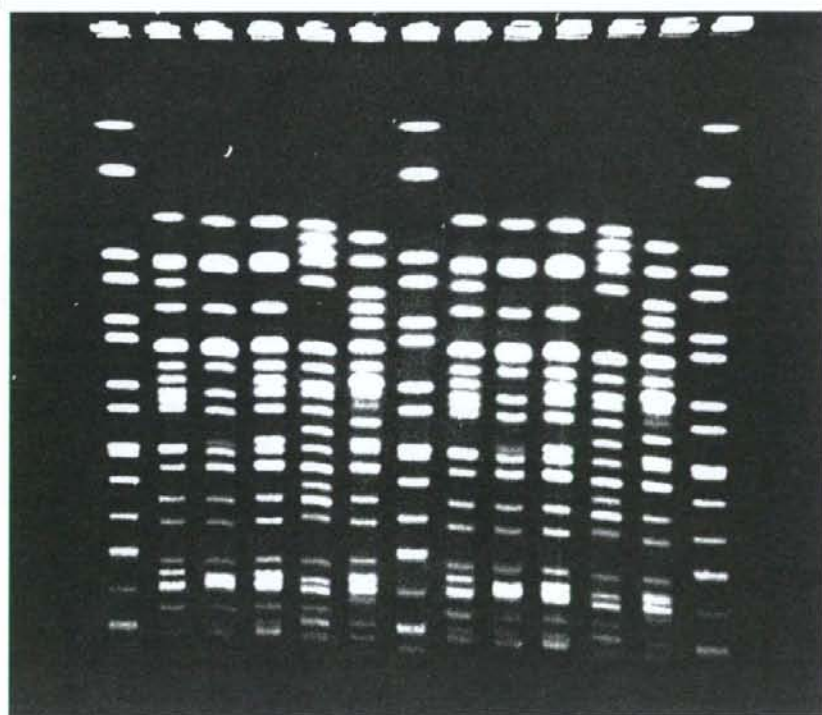
施設8



施設9



施設10



施設11

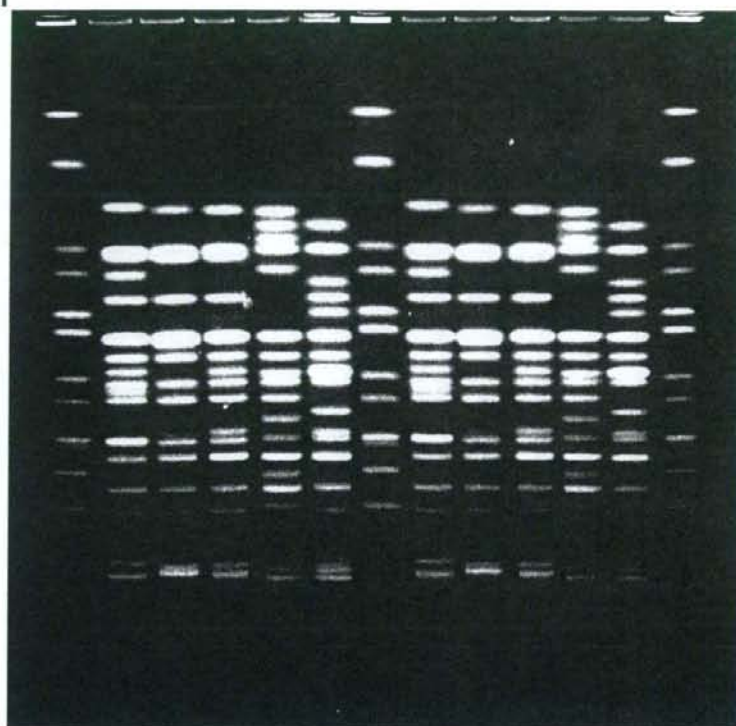


表 1. PFGE が有効に活用された事例

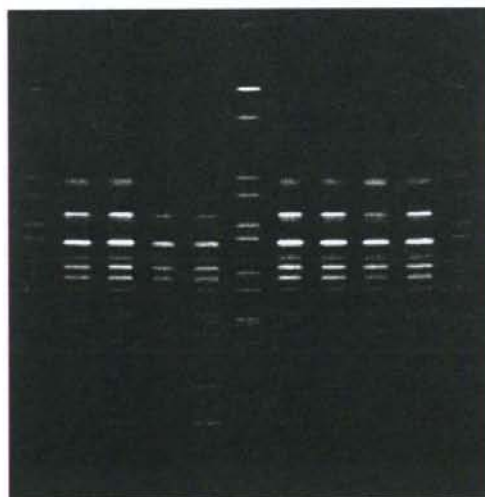
1. 飲食店が原因施設と疑われた O157 食中毒事例
群馬県衛生環境研究所
2. 腸管出血性大腸菌 O157 VT2 散発例の PFGE 解析
群馬県衛生環境研究所
3. キムチを原因食品とした腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例に
おける検査および行政対応とその問題点
千葉県衛生研究所
4. 2008 年度に当研究所に送付された O157 による散発事例由来株に
ついて
神奈川県衛生研究所
5. 飲食店が原因とされた小規模事例および家族内感染事例
神奈川県衛生研究所
6. 横浜市内の焼肉店を原因とする EHEC O157 (VT1&2 産生) による
食中毒事例
横浜市衛生研究所
7. 山梨県で発生した散発事例 O157 株の PFGE パターン
山梨県衛生公害研究所

1. 飲食店が原因施設と疑われた O157 食中毒事例

群馬県衛生環境研究所

2008年8月14日、県内の医療機関から管轄の保健所へO157による4件の腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症発生届が提出された。喫食状況等の調査から、届出された4名は別々のグループ(4グループ計13名)で、同管内の同じ飲食店を利用していたことが判明した。喫食日は8月3日から6日で多少ことなるが、腹痛、下痢を訴え、うち3名は血便を呈していた。また、翌日には県内の別の保健所へも同様の1件の発生届が出され、原因調査から同飲食店で喫食していたことが分かった。本調査から、この5グループは事前の接触はなく、共通利用施設は同店のみであることから、同店を感染原因施設と推定した。検査はなく、拭き取り5検体、従事者便7検体からも本菌を含む食中毒原因菌は検出されなかった。さらに県内の別の医療機関から18日に2名、21日に1名(18日届出の姉)の同届出が管轄する保健所へ提出され、原因調査から同飲食店での喫食が分かった。21日に届出の1名は家族内(姉妹)での二次感染が疑われた。この飲食店では8月3日から6日にかけて全てのグループに焼肉を提供しており、14日に届出の2名は生肉(ユッケ)を喫食していた。この7グループから分離されたO157の8株について、薬剤感受性試験およびパルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)による遺伝子解析を実施した。薬剤感受性試験では8株は使用した12剤に感受性であった。制限酵素XbaIを用いたPFGE解析では、供試8株はDNAパターンが全て一致した。本事件では複数のグループからEHEC O157が分離されたこと、事前に感染を疑う接触がないこと、共通飲食店で喫食したこと等の疫学調査とPFGE解析結果から、同店が提供した食事を原因とする集団食中毒事件と断定した。患者発生が複数の保健所にまたがっていたが、疫学情報とPFGEによる遺伝子解析とが有効に活用された事例であった。

M 1 2 3 4 M 5 6 7 8 M



M : Marker

(S. Braenderup H 9812)

Lane 1 : 3歳 男性

Lane 2 : 74歳 "

Lane 3 : 19歳 女性

Lane 4 : 50歳 "

Lane 5 : 12歳 "

Lane 6 : 24歳 男性

Lane 7 : 2歳 女性 (妹)

Lane 8 : 6歳 " (姉)

Lane 1 : S病院

Lane 2-5 : T病院

Lane 6-8 : N病院

制限酵素 Xba I