

図 1

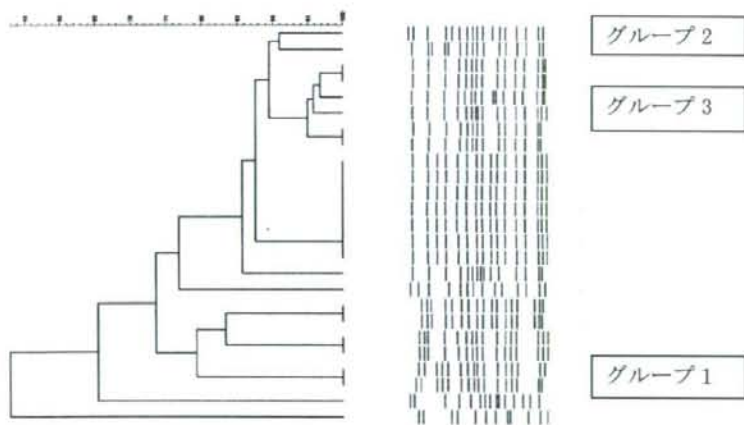


図 2

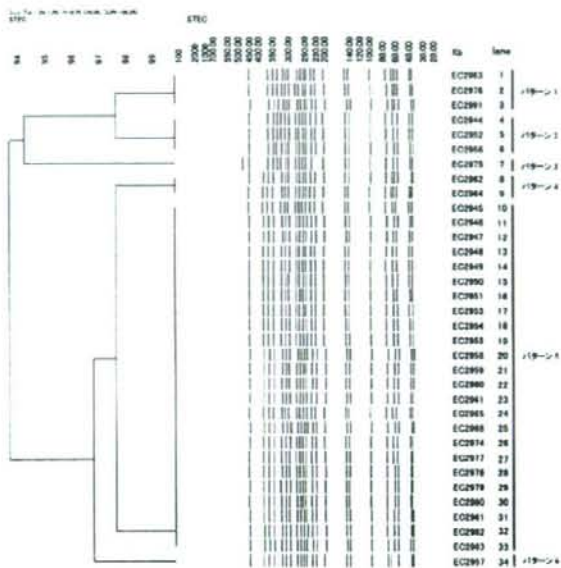


図 3

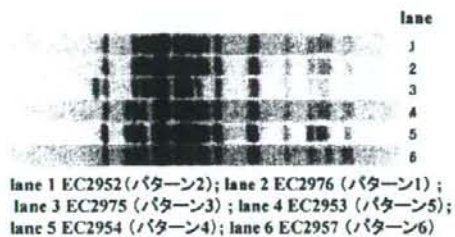


図 4

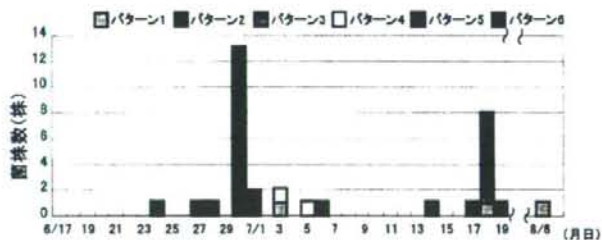


図 5

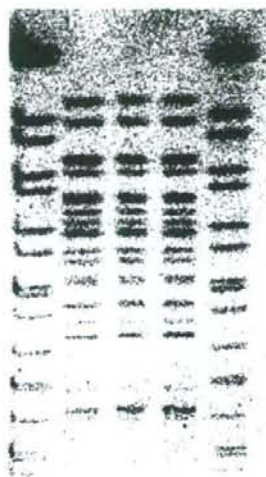
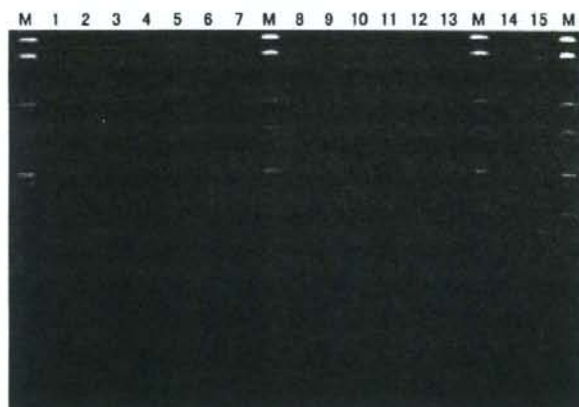
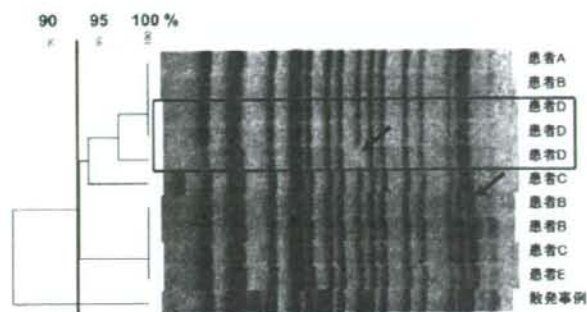


図6 両端はサルモネラマーカー



M: Molecular weight marker S. Braenderup H9812, Lane1~6及び15: 患者血液由来株  
 Lane7~13: 使用済み生食, Lane14: 消毒綿  
 制限酵素: Spe I, Switch Time: 5 to 25sec, 泳動時間: 22時間

図7



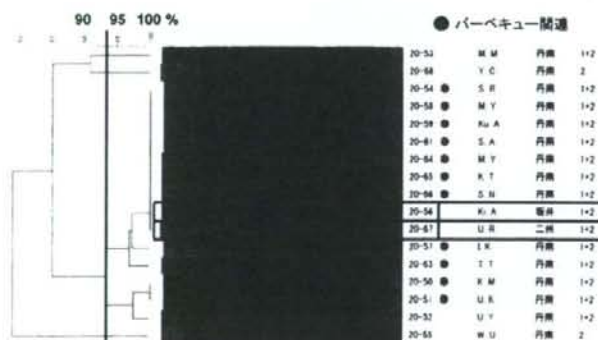
事例1 X店利用者由来EHEC O157:H7のPFGEパターン

図8



事例2 2008年7月 二州保健所管内の複数の焼肉店における散发型集団事例

図9



事例3 2008年9月に発生したバーベキュー喫食者由来等のO157:H7のPFGEパターン

バーベキュー関連では4つのパターン → 類似度は93%以上で近縁種

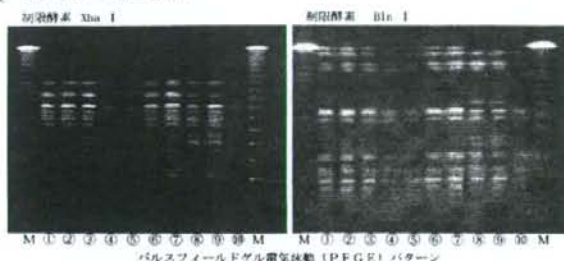
図10

EHECパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 解析結果

概要 029年6月17日に石川中央管内町の焼肉店を利用した1グループ及び18日に上記施設を利用した2グループが3グループよりEHEC0157が検出された。これらのグループに共通する飲食物は上記施設以外にないことより同施設を原因とする食中毒と断定した。検出日(8月28日:1\*4\*, 29日2\*4\*)

罹患者 7名(男3名, 女4名:5歳~50歳代), 腹痛・下痢・発熱

措置 8月31日から3日間の営業停止

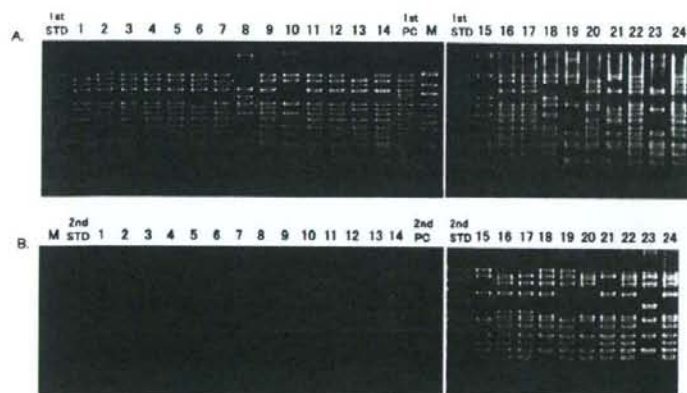


Xba I, 30unit/sample plug, 6.0r/cm, 2.2 - 54.2sec, 19hr, 14℃  
Bln I, 30unit/sample plug, 6.0r/cm, 2.2 - 54.2sec, 19hr, 14℃  
M: マーカー (λ Baddr)

→ No.	患者情報・親戚等	性 別
①	K, K 石川中央区	5歳 M
②	①の母 石川中央区	31歳 F
③	T, R 石川中央区	51歳 M
④	③の妻 石川中央区	49歳 F
⑤	③の長女 石川中央区	24歳 F
⑥	Y, T 金沢市	F
⑦	M, N 金沢市	F
⑧	対照 石川中央区	4歳 M (別事例)
⑨	対照 ⑤の父 石川中央区	42歳 M (別事例)
⑩	対照 南加賀区	69歳 F (別事例)

※コメント レーンNo①, ③~⑦までのDNA切断パターンは同一であり, レーンNo②は, レーンNo①とは1バンド違いであった。  
また, 対照としたレーンNo⑩のDNA切断パターンも同一であった。

図 11



IS-printing SystemによるマルチプレックスPCRの電気泳動像

M:ΦX HincII Marker; lane1~ lane24 表1菌株No.と一致。

1st STD, 2nd STD:電気泳動用陽性コントロール, 1st PC, 2ndPC:PCR用陽性コントロール

△: IS-printing System PCRにおけるエキストラバンド

図 12

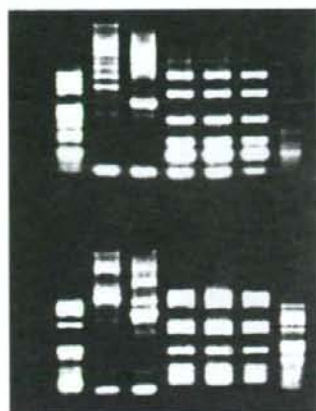


図 13 両端はマーカー、マーカーを除いた右 3 レーンが 3 散発事例由来株

表 1. 本報告に用いた腸管出血性大腸菌 O157

菌株 No.	発生時期	発生態様	血清型	ベロ毒素遺伝子	
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
1	2008.3	散発	O157:H7	+	+
2	2008.4	家族内感染	O157:H7	+	+
3	2008.4	散発	O157:H7	+	+
4	2008.5	散発	O157:H7	+	+
5	2008.5	家族内感染	O157:H7	+	+
6	2008.6	散発	O157:H7	+	+
7	2008.6	散発	O157:H7	+	+
8	2008.7	集団感染	O157:H7	-	+
9	2008.7	散発	O157:H7	+	+
10	2008.7	散発	O157:H7	-	+
11	2008.7	家族内感染	O157:H7	+	+
12	2008.7	散発	O157:H7	+	+
13	2008.8	家族内感染	O157:H7	+	+
14	2008.8	家族内感染	O157:H7	+	+
15	2008.8	家族内感染	O157:H7	-	+
16	2008.8	散発	O157:H7	+	+
17	2008.8	家族内感染	O157:H7	+	+
18	2008.8	散発	O157:H7	-	+
19	2008.8	散発	O157:HNM	+	+
20	2008.9	散発	O157:H7	+	+
21	2008.9	散発	O157:H7	+	+
22	2008.9	家族内感染	O157:H7	+	+
23	2008.10	散発	O157:H7	-	+
24	2008.10	散発	O157:H7	+	+



表2 IS-printing SystemによるO157サブタイプングパターン

Primer	Size	菌株No.																							
Seq.	(bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
I-01	974	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-02	839	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-03	742	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-04	645	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-05	598	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-06	561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-07	498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-08	442	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-09	405	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-10	353	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-11	325	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-12	300	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-13	289	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-14	241	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-15	211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
seq	185	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I-16	171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HyaA	137	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-01	887	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-02	801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-03	801	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-04	710	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-05	642	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-06	589	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-07	550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-08	499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-09	448	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-10	394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-11	358	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-12	331	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-13	301	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-14	278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-15	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-16	211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
stx2	181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
stx1	151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- \* 1: 1-02よりやや下にバンドあり  
 \* 2: 1-08, 2-10よりやや上にバンドあり

表3. 供験菌のIS-PrintingサブタイプとPFGEパターン

IS-Printing サブタイプ・ PFGEパターン 組み合わせ	IS-Printing サブタイプ	PFGE パターン	菌株No.	株数
A	I-1	P-1	1, 20	2
B	I-1	P-11	13	1
C	I-2	P-2	14, 16	2
D	I-2	P-5	5	1
E	I-3	P-3	2, 3, 4	3
F	I-4	P-4	11, 12	2
G	I-5	P-6	6	1
H	I-6	P-7	7	1
I	I-7	P-8	8	1
J	I-8	P-9	9	1
K	I-9	P-10	10	1
L	I-10	P-12	15	1
M	I-11	P-2	17	1
N	I-12	P-13	18	1
O	I-13	P-14	19	1
P	I-14	P-15	21	1
Q	I-15	P-16	22	1
R	I-16	P-17	23	1
S	I-17	P-18	24	1

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 20 年度分担研究報告書

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

研究分担者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河野智美	滋賀県衛生科学センター
	中嶋智子	京都府保健環境研究所
	平野 隆	京都市衛生公害研究所
	小笠原準	大阪市立環境科学研究所
	中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	横田正春	堺市衛生研究所
	西海弘城	兵庫県立健康環境科学研究所
	黒川 学	神戸市環境保健研究所
	川西伸也	姫路市環境衛生研究所
	榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	金澤祐子	和歌山市衛生研究所
	池端孝清	和歌山市衛生研究所
	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

近畿ブロックは 2 府 4 県が近接し、腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症やカンピロバクター食中毒の患者が複数の自治体にまたがって発生することが多い。感染の規模や実態を把握するため、聞き取り調査に加えて分離菌の精査と比較に基づいた科学的な裏付けが求められる。EHEC の遺伝子解析法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法の有用性は確立されているが、共通の疫学指標として使用するため、近畿ブロックの 11 衛生研究所で同一の菌株を用いた精度管理を行い、施設間差および 3 人の解析者による変動を検討した。その結果、施設によって画像のコントラストは多少異なるものの、小さいバンドが比較的明瞭に区別できる画像が得られ、いずれの解析者でも菌株ごとに高い近似度を示した。また、実際に関連性の疑われた 2 人の分離株について、別々の施設で実施した電気泳動像を電送で交換し、菌株の同一性を確認した。*Campylobacter jejuni* の PFGE 法については、昨年度のプロトコルを改良して 7 衛生研究所で検討したところ、サイズの小さいバンドが明瞭になったものの、バンド認識の困難な太すぎるバンドがみられた。そのため



配布株の近似度は、*Sma*I 切断、*Kpn*I 切断ともにトレランス 1.2%では 73.7-84.7%にとどまっていた。トレランス 2.0%の解析で近似度 88.8-100%を示したが、バンド数の多少やサイズの大小にかかわらず、明瞭なバンドに区別できるよう、菌量やスイッチタイムを検討する必要があると考えられた。EHEC O157 の IS-printing System については、感染者の多い自治体で 1 年間に分離された 127 株をすべて型別し、型別能力では PFGE 法におよばないが、事例間の関連性や広域流行株の探知に、迅速性に優れたスクリーニング型別法として有用であることが確かめられた。

#### A. 研究目的

多発する EHEC 感染症とカンピロバクター食中毒について事例間の関連性を明らかにするため、分離菌を共通の疫学指標で比較し、同一性を判定する必要がある。EHEC の細菌学的疫学解析法として、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法による遺伝子解析の有用性は確立されているが、共通の疫学指標として使用するため、近畿ブロックの 11 衛生研究所において同一の菌株を用いた精度管理を行い、施設間差および解析者による変動を検討した。さらに実用例として、隣接した自治体へ届出のあった感染者の関連性を確認するため、2 衛生研究所で分離株の PFGE 型別を実施し、PFGE 画像を電送で交換して比較解析した。また、EHEC O157 の IS-printing System について、昨年度は 7 衛生研究所で試用スクリーニング法として有用であることを確認したが、一部の株について判定に施設間差が見られたことから、今年度は分離菌株数の多い 1 衛生研究所で PFGE との整合性を検討した。

カンピロバクター食中毒の主たる原因菌である *Campylobacter jejuni* は、Lior 血清型

別や Penner 血清型別によって、分離株の異同が判断されているが、いずれの方法によっても型別不能である株が頻りに分離されることから、7 衛生研究所で PFGE 法の有用性を検討してきた。昨年度は制限酵素 *Sma*I と *Kpn*I を同じスイッチタイムで実施したが、*Kpn*I でサイズの小さいバンドが不明瞭になる傾向がみられたので、今年度はプラグ作製方法の改良を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

PFGE の精度管理には、2008 年に大阪府で分離された EHEC O157:H7 5 株 (菌株 1-5) を用い、*Xba*I で切断されることを確認の上、11 施設に配布した (表 1)。PFGE 画像解析の実用例には、2008 年 9 月に和歌山市内の医療機関と大阪府内の保健所で分離された EHEC O157 を使用した。IS-printing System の検討には、大阪府内で 2008 年に分離された EHEC O157 127 株を使用した。C. *jejuni* は、2005 年と 2006 年に大阪府で分離された 2 株 (菌株 6、7) を 7 施設に配布し、各施設で分離、保存している菌株 3 株を加えて同時に PFGE を実施した (表 1、

表2)。

## 2. PFGE 法

### 2-1. EHEC

平成 15 年度に示された感染研新プロトコールの Proteinase K 処理を 50℃一夜、制限酵素 *XbaI* 処理を 37℃ 2 時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した(表 3)。実用例では同時に *BlnI* 切断も実施した。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *XbaI* 切断を使用した。プラグ作製および電気泳動には SeaKem Gold Agarose (タカラ) の使用を指定したが、制限酵素や泳動用バッファーなど他の試薬は、各施設で日常使用している製品を用いた。泳動時間は 19 時間を目安として、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ようにした。また、泳動像はサイズマーカーの Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できることを条件とした。

### 2-2. *Campylobacter jejuni*

昨年のプロトコールを改良した「*Campylobacter* PFGE Protocol-Kinki ver.3」で実施した(表 3)。この方法は CDC のホームページで公開されている PulseNet USA のプロトコールを前項の感染研新プロトコールに準じて改変したもので、ver.3 では①菌液濃度をマックファーランド 3 に調整する、②制限酵素 *SmaI* の切断に使用するプラグは通常の半分の大きさにする、③ Pefabloc SC 溶液反応後のプラグ洗浄を 2 回にする、④制限酵素の反応時間を一夜に統一する、の 4 点を変更した。サイズマーカー

一には EHEC と同じく *S. Braenderup* H9812 の *XbaI* 切断を使用した。なお、プラグ作製および電気泳動には SeaKem Gold Agarose の使用を指定したが、制限酵素などその他の試薬は各施設で日常使用している製品を用いた。

## 3. PFGE 画像の解析

EHEC O157 精度管理株と *C. jejuni* の PFGE 画像は、実施施設から施設 X (A 解析者) に電子メールで集約した。EHEC O157 の画像は CD に記録して施設 Y (B 解析者) および施設 Z (C 解析者) に郵送し、3 施設で FingerprintingII バージョン 3 (Bio-Rad) を用いて解析した。*C. jejuni* は、施設 X (A 解析者) のみで解析した。EHEC 実用例では、和歌山市衛生研究所と大阪府立公衆衛生研究所で PFGE 画像を交換して解析した。

いずれも、バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 5%、ショルダー感度 0 で行い、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%および 2.0% (*C. jejuni* のみ) でデンドログラムを作成した。

## 4. IS-printing System (IS) と PFGE の比較

IS 法は、IS-printing System Version 2 (東洋紡) の 2 種類のプライマーセット (セット 1、セット 2) と反応液を用い、説明書に記載の条件で PCR を実施した。電気泳動装置は GelMate2000 (東洋紡) を使用し、3% アガロースゲル (NuSieve GTG : SeaKem

GTG : = 2:1) と 0.5xTBE バッファーを用い、100V で Standard DNA の 18 本のバンドが明瞭に分離されるまで 120-140 分泳動した。判定はプライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」とし、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに割り当てた「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット 1、セット 2 の順に 12 桁で表して IS 型とした (表 4)。PFGE との整合性について、感染研 PFGE Type No. および集団事例由来株は大阪府立公衆衛生研究所で実施した PFGE パターンと比較した。

#### 5. 薬剤感受性試験

EHEC O157 PFGE の実用例と IS-printing System の検討に使用した株は、センシ・ディスク (BD) を用いた薬剤感受性試験を実施した。使用薬剤は、アンピシリン (ABPC)、クロラムフェニコール (CP)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、ナリジクス酸 (NA)、ホスホマイシン (FOM)、シプロフロキサシン (CPF)、セフトキシム (CTX)、セフトキシム (CPDX)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤 (ST) の 12 薬剤である。

#### C. 研究結果

##### 1. EHEC O157 の PFGE 精度管理

11 施設から電送された PFGE 画像は、いずれも目視でサイズマーカーの Band 9、Band 10、Band 16 が認識できた (図 1)。自動バンド認識後に各解析者が目視補正を行

い、デンドログラムを作成した (図 2-4)。いずれの解析者でも菌株ごとにクラスターを作っており、その近似度は 91.6-100%であった (表 5)。

A 解析者は、菌株 2 で全画像が 100%一致したほか、菌株 1 でも 10 画像が 100%一致し、97.4%と高い近似度を示した (図 2、表 5)。菌株 4 では認識バンド数は 19-22 本とばらつきが見られたが、認識バンド数 20 本の 5 画像と 21 本の 4 画像が 100%一致しており、11 画像の近似度は 96.7%であった。菌株 3 も認識バンド数 20 本の 5 画像と 21 本および 22 本の 2 画像ずつが 100%一致し、近似度 95.7%のクラスターを作っていた。菌株 5 は認識バンド数が 20-23 本とばらつき、20 本と 23 本の 3 画像ずつが 100%一致していたが、11 画像の近似度は 92.1%と最も低値であった。

B 解析者の画像解析では、菌株 1 で 9 画像、菌株 2 で 10 画像が 100%一致し、それぞれ 97.4%、98.9%と高い近似度を示した (図 3、表 5)。菌株 3 は認識バンド数が 20-22 本とややばらついていたが、バンド数ごとに 100%一致画像が多く、11 画像で近似度 96.0%のクラスターを作っていた。菌株 4 は認識バンド数 20 本の 6 画像と 21 本の 3 画像が 100%一致していたが、11 画像の近似度は 93.0%にとどまっていた。菌株 5 は認識バンド数が 20-24 本とばらつきが大きかったが、バンド数の異なる画像でも 100%一致を示しており、11 画像の近似度は 93.6%であった。

C 解析者は、菌株 1-4 でいずれも認識バンド数に 2 本のばらつきが見られたが、菌



株 1 と 4 では 8 画像が、菌株 2 はバンド数 18 本の 6 画像と 2 画像が、菌株 3 はバンド数 21 本の 5 画像と 20 本および 21 本の 2 画像ずつが 100%一致し、それぞれ 11 画像で 96.0-96.8%の近似度を示した(図 4、表 5)。菌株 5 では認識バンド数が 19-23 本とばらつきが見られ、20 本の 5 画像と 19 本の 2 画像は 100%一致していたが、11 画像の近似度は 91.6%と低値であった。

## 2. EHEC O157 の PFGE 解析の実用例

2008 年 9 月 6 日に和歌山市へ EHEC O157 感染症の届出のあった患者が大阪府内にあるグループホームの入所者であったことから、関係者を調査したところ、9 月 16 日にスタッフである 29 歳男性から EHEC O157 が検出された。このスタッフは週 1 回のボランティアで患者との関わりが少なかったことから別経路での感染も疑われ、分離株の PFGE 解析を実施することになった。分離株はともに、O157:H7 (VT1 および VT2 産生) で ABPC、SM、TC に耐性を示した。患者由来株 1 株とスタッフ由来株 3 株(同一平板から 3 コロニー釣菌したもの)の PFGE 画像は、*Xba*I 切断、*Bln*I 切断ともに同じパターンを示していた(図 5)。同時期に大阪府内で分離され、ABPC、SM、TC に耐性を示した散发下痢症患者由来株 2 株も同一パターンを示した。

## 3. IS-printing System と PFGE 法の比較

VT1 陽性株 1 株、VT2 陽性株 80 株、VT1 および VT2 陽性株 46 株の合計 127 株について検討したところ、セット 1 では 6-15

本、セット 2 では 6-12 本の増幅が見られたが、一部の株では非特異バンドも増幅されていた(図 6)。特に O157:HNM の多くは、セット 1 で約 800bp 付近に明瞭なバンドが見られ、1-03 との区別が困難であった(図 6c)。セット 1 に含まれる *eae* は全株で増幅されたが、*hlyA* は 1 株で陰性と判定された。IS 領域を増幅するプライマーでは、1-05、1-11、2-05、2-06、2-14 は全株で増幅が見られなかった。

保育園集団事例で 18 人から分離された 24 株について IS 法を実施したところ、初発患者由来株を含む 23 株は同じ IS 型を示したが、1-16 が増幅されず異なる IS 型を示した株が 1 株みられた。PFGE 解析では、全員同じパターンを示す株(感染研 Type No. d129)があったが、5 人からは 1-2 本異なるパターンを示す株が同時に分離されていた。IS 型の異なる株の PFGE パターンは d129 と 1 本異なっていたが、同じ感染者から分離された他の 2 株は IS 法、PFGE 法ともに初発患者由来株と同型を示した。

家族や同行者など感染者が 2 名以上のグループ事例は 12 事例あり、6 事例(16 株)は事例ごとに IS 型、PFGE 型とも一致していた(表 6)。5 事例(15 株)は事例内で PFGE 型に 1-2 本の違いがみられたものの IS 型は一致していたが、事例 7 の 2 株は IS 型が大きく異なり、PFGE 型および薬剤耐性パターンも異なっていた。散发事例由来株のうち 29 株は IS 型、PFGE 型とも他とは異なるタイプを示した。発症時と服薬後の 2 回 O157 が分離された患者の株は、PFGE パターンが 1 本異なっていたが、IS 型は一致

していた。残りの 39 株は、グループ事例を含む他の事例と同じ IS 型を示しており、PFGE 型では区別される株でも IS 型は一致していた (表 7、表 8)。PFGE 型が一致し IS 型が異なる株はなかった。

### 3. *C. jejuni* の PFGE 型別法の検討

7 施設から送られてきた *C. jejuni* の PFGE 画像は、プラグ作製時の菌濃度を変更したことから、サイズの小さいバンドは明瞭であったが、大きいサイズのバンドでは過ぎてバンド認識の位置の判定が困難な画像も見られた (図 7)。

*Sma*I のバンド数は少なく、配布株である菌株 6 はいずれの画像も 9 本、菌株 7 は 7 本または 8 本と認識された。各施設株 21 株も 5-10 本であった (図 7、表 9)。トレランス 1.2% で作成したデンドログラムで、菌株 6 は 6 画像で 100% 一致していたが 7 画像の近似値は 84.7% と低く、バンド数の異なる施設 10 菌株 9 (◆) が菌株 6 のクラスターに含まれていた (図 8a)。菌株 7 も認識バンド数 8 本の 3 画像と 7 本の 2 画像がそれぞれ 100% 一致していたが、7 画像は施設 4 菌株 10 (◇) を含む近似度 73.7% のクラスターを作っていた。各施設株は、施設 3 の集団発生由来株である菌株 8 と 9 (●) および施設 8 の菌株 8 と 9 (○) が 100% 一致していた。トレランス 2.0% でデンドログラムを作成すると、菌株 6、菌株 7 とともに 7 画像でクラスターを作り、その近似度はそれぞれ 100%、93.3% と高い値を示した (図 8b)。トレランス 1.2% で菌株 6、菌株 7 のクラスター内に含まれていた施設

10 菌株 9 (◆) と施設 4 菌株 10 (◇) は、それぞれ菌株 6、菌株 7 と 94.1%、84.4% の近似度であった。施設 3 の菌株 8 と 9 (●) および施設 8 の菌株 8 と 9 (○) は 100% 一致していた。

*Kpn*I の切断パターンは *Sma*I に比べバンド数が多く、特に Band 10 (167.1Kb) 以下に集中していた (図 7)。配布株の認識バンド数は、菌株 6 が 13-15 本、菌株 7 が 11-14 本と画像によりばらついていた (表 9)。施設 8 の菌株 10 は *Kpn*I では全く切断されなかった。トレランス 1.2% で作成したデンドログラムでは、菌株 6 は 2 画像が 100% 一致していたが、各施設株 4 株を含んだ 11 画像で近似度 73.9% のクラスターを作った (図 9a)。菌株 7 は認識バンド数 12 本と 14 本の 2 画像ずつがそれぞれ 100% 一致していたが、7 画像では施設 4 の菌株 10 (◇) を含んだクラスターになり、近似度は 79.3% であった。トレランス 2.0% でデンドログラムを作成すると、菌株 6 のクラスターには施設 11 菌株 9 が、菌株 7 ではトレランス 1.2% と同様に施設 4 菌株 10 (◇) が含まれたが、近似度はそれぞれ 92.0%、88.8% と高い値を示した (図 9b)。*Sma*I 切断で 100% 一致を示した施設 3 の菌株 8 と 9 (●) および施設 8 の菌株 8 と 9 (○) は、*Kpn*I 切断でもトレランス値にかかわらず 100% 一致していた。

### D. 考察

近畿ブロックでは毎年 EHEC O157 を用いて PFGE の精度管理を実施し、技術的な施設間差は解消されてきている。11 施設の

電気泳動像は、施設によって画像のコントラストは多少異なるものの、小さいバンドが比較的明瞭に区別できていた(図1)。画像解析の結果は、3人の解析者がいずれも菌株ごとに近似度90%以上、特に菌株1、2および3は95%以上と良好な結果が得られた(表5)。菌株5は、他の株に比べて近似度が低値であったが、Band 14(76.8Kb)以下の小さいサイズのバンドの本数が多く、画像によって認識バンド数がばらついたためと考えられた(図2-4)。菌株4は、A解析者とC解析者では近似度96%以上を示したが、B解析者では10画像で近似度96%以上のクラスターを作ったものの施設4の画像を加えると近似度は93.0%と低くなった(図3)。これは、最も小さいバンドの位置が施設4の画像は他の画像と離れた位置に認識されたため、その原因として施設4の特に7レーンのサイズマーカーBand 15、Band 16が不鮮明であったことが考えられる(図1)。

このように、PFGE解析では画像によって、あるいは解析者によってある程度バンド認識に差が生じるが、精度管理用に送付した5株全ての画像解析で高い近似度を示したことから、本法は信頼性の高い疫学指標であると言える。2008年9月に発生した事例では、2箇所の衛生研究所で実施されたPFGE画像を電送で比較し、同一型であることを確認できた(図5)。EHECは四種病原体であり、煩雑な菌株譲渡手続きや輸送は迅速な疫学解析の妨げとなる。したがって今後は、菌株を保有する施設でPFGEを実施し、画像を送り合って比較すること

が薦められる。

迅速で簡便な疫学指標として期待されるIS-printing Systemについては、集団事例由来株でIS型の一致しない株が1株みられたが、同一人からは一致する株も分離されており、不一致株はプライマー1-16のアニーリング部位に変異が入った可能性が考えられる。これ以外では同一事例でPFGEが1-2本異なる株はIS型が一致し、同一PFGE型でIS型の異なる株はなかった(表6-8)。事例7は、母親同士が友人と一緒に食事をしてしたが、分離株のPFGE型だけでなく毒素型や薬剤耐性パターンも異なることから、感染源が異なるものと推察された。グループ事例と散発事例由来の合計103株のうち最も多い12株がIS型013055 214443を示し、PFGEでもd68および1本異なるd144、d367の3つのタイプに型別されていた(表7)。これらの株は、7-8月に大阪府北部で分離されており、さかのぼり調査の結果共通の感染源が疑われた。また、IS型345457 311652を示した株が散発事例由来で5株あったが、このうち6月-9月に分離された4株のPFGE型は2007年4月から分離されている広域流行タイプc57であった。IS型012057 214443を示した5株のように、IS型は一致してもPFGE型は異なる場合も多いが、上記のように事例間の関連性や広域流行株の探知に、スクリーニング法として有用であることが確かめられた。菌株によっては判定困難な非特異バンドが増幅されることや、増幅が強く太いバンドではStandard DNAと移動度が異なって見える場合もあり、正確な結果を得るた



めには明瞭な電気泳動像が必要であると考  
えられた。

C. *jejuni* の PFGE については、昨年 *KpnI*  
切断でサイズの小さいバンドの画像が薄く  
なる傾向がみられたことから、菌液濃度を  
高くし、*SmaI* 切断には *KpnI* の半分の大き  
さのプラグを使用するようプロトコルを  
変更した。これにより昨年よりも明瞭な  
PFGE 画像になった施設もあったが、バン  
ドが太くなりすぎて中央と両端の移動度が  
異なる「カマボコ様」になり、各バンドの  
ピークを判定するのが困難な画像もみられ  
た。これまで、配布株である菌株 6 と菌株  
7 の *SmaI* 切断は全画像で認識バンド数が一  
致し高い近似度を示していたが、今年度は、  
トレランス 1.2% のデンドログラムでバンド  
数やバンド位置の異なる株が配布株のクラ  
スターに入り近似度が低い結果になった。  
トレランスを 2.0% に変更すると、菌株 6 は  
全画像が 100% 一致し、菌株 7 も認識バン  
ド数ごとに 4 画像と 3 画像が一致して高い  
近似度を示した。*KpnI* でも同様で、配布株  
の菌株ごとの近似度は、トレランス 1.2% で  
は菌株 6、菌株 7 とともに 70% 台にとどま  
っており、トレランス 2.0% で 90% 前後の値  
が得られた。各施設株の画像解析で、*SmaI*  
切断で 100% 一致した 2 組の株は *KpnI* 切断  
でも同一のパターンを示した。このうち、  
施設 8 の 2 株は、分離年が隔たっており関  
連性を示唆する情報は得られなかったが、  
施設 3 の 2 株は集団発生由来株で、PFGE  
型別が疫学情報を裏付ける結果であった。  
C. *jejuni* の PFGE 型別において、*KpnI* 切断  
は電気泳動ゲルの下半分にバンドが集中し

小さいサイズのバンド認識が難しいこと、  
また未消化バンドが比較的多いことが難点  
であった。一方、*SmaI* 切断はバンド数が少  
ないものの泳動パターンが多様であること  
から疫学指標として有用であると考えてき  
たが、今年度の結果から、少ないバンドを  
正確に認識することが重要であり、バンド  
が太すぎる電気泳動像は不適切であること  
が示された。したがって、今後はプラグ作  
製の菌量をさらに検討するとともに、  
*KpnI* 切断で小さいサイズのバンドが明瞭に  
区別できるようなスイッチタイムを設定す  
る必要がある。

#### E. 結論

EHEC の PFGE 型別法を近畿ブロックで  
共通の疫学指標に用いるため、施設間差を  
最小限にすることが課題であるが、明瞭に  
バンド認識できる電気泳動画像であれば、  
各施設で多少コントラストの異なる画像で  
あっても、画像解析で高い近似度を得るこ  
とができた。ブロック内で関連性の疑われ  
る事例が発生した場合には、各施設で実施  
した PFGE 画像を電送で交換し、菌株の異  
同を判断することが可能である。また、IS-  
printing System は型別能力では PFGE 法に  
およばないが、迅速性に優れ簡便な EHEC  
O157 型別法としてスクリーニングに有用  
であると考えられた。*Campylobacter jejuni*  
の PFGE 型別では、バンド数の多少やサイ  
ズの大小にかかわらず、明瞭なバンドに区  
別できるよう、菌量やスイッチタイムを検  
討する必要があるが、疫学指標として利用  
可能であると考えられる。

F.健康危険情報

なし

cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. BMC Microbiology, 8:94, 2008.

G.研究発表

1.誌上発表

1) 勢戸和子：患者発生現場でのバイオセーフティ 腸管出血性大腸菌－正しい知識で正しく予防, BMSA会誌, 19:85-89, 2008.

2) Yamazaki, Y., Seto, K., Taguchi, M., Ishibashi, M., Inoue, K.: Sensitive and rapid detection of

2.学会発表

1) 勢戸和子, 田口真澄：非典型的性状を示す志賀毒素産生性大腸菌 O157, 第 82 回日本感染症学会総会 (2008 年 4 月, 松江)

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 PFGEの精度管理などに用いた配布株

菌株番号	菌種	分離年月	備考
1	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2008年7月	PFGE型 d140
2	EHEC O157:H7 (VT2)	2008年7月	PFGE型 d143
3	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2008年7月	PFGE型 d142
4	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2008年7月	PFGE型 d141
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2008年8月	PFGE型 c57
6	<i>Campylobacter jejuni</i>	2005年11月	Penner血清型 A群
7	<i>Campylobacter jejuni</i>	2006年6月	Penner血清型 D群

表2 *Campylobacter jejuni* PFGE 実施株

施設	菌株番号	菌株の由来	施設	菌株番号	菌株の由来
No.1	6	配布株	No.9	6	配布株
	7	配布株		7	配布株
	8	食中毒 (2008年4月)		8	食中毒 (2008年)
	9	食中毒 (2008年6月)		9	食中毒 (2008年)
	10	食中毒 (2008年6月)		10	食中毒 (2008年)
No.3	6	配布株	No.10	6	配布株
	7	配布株		7	配布株
	8	老健施設集団発生 (2008年)		8	食中毒 (2004年)
	9	老健施設集団発生 (2008年)		9	食中毒 (2007年)
	10	散発事例 (2007年)		10	食中毒 (2007年)
No.4	6	配布株	No.11	6	配布株
	7	配布株		7	配布株
	8	食中毒 (2008年)		8	食中毒 (2008年4月)
	9	食中毒 (2007年)		9	食中毒 (2008年8月)
	10	食中毒 (2007年)		10	食中毒 (2008年5月)
No.8	6	配布株			
	7	配布株			
	8	食品 (2004年)			
	9	散発 (1995年)			
	10	散発 (1996年)			

表3 EHEC O157 および *Campylobacter jejuni* の PFGE プロトコール

	PFGE New Protocol - Kinki	<i>Campylobacter</i> PFGE Protocol - Kinki ver.3 (下線部は変更点)
菌の前培養	TSB 一夜培養液	平板培地
菌液調整	培養液200 $\mu$ lを遠心集菌し、滅菌蒸留水200 $\mu$ lに再懸濁する	食塩加PBS 500 $\mu$ lに菌を懸濁し、1回洗浄後MacFaland 3に調整する
菌のアガロース ブロック包埋	1% SeaKem Gold agarose in DW 50°C Cell suspension 200 $\mu$ l + 1% agarose 200 $\mu$ l	1% SeaKem Gold agarose in DW 50°C Cell suspension 200 $\mu$ l + 1% agarose 200 $\mu$ l
菌体処理	1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl-sarcosine in 0.5M EDTA, pH8.0 1ml 50°C, over night	1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl-sarcosine in 0.5M EDTA, pH8.0 1ml 50°C, over night
洗浄と制限酵素 前処理	4mM Pafabloc SC in TE 500 $\mu$ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min Enzyme buffer for <i>Xba</i> I 200 $\mu$ l on ice, 20min	4mM Pafabloc SC in TE 500 $\mu$ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min, <u>twice</u> Enzyme buffer for <i>Sma</i> I or <i>Kpn</i> I 200 $\mu$ l on ice, 20min
制限酵素処理	30unit/sample enzyme buffer 100 $\mu$ l 37°C, 2hr	40unit/sample enzyme 100 $\mu$ l 25°C ( <i>Sma</i> I), 37°C ( <i>Kpn</i> I) <u>over night</u>
電気泳動	6V/cm, 2.2 - 54.2s, 19h 14°C, 0.5xTBE	6V/cm, 6.8 - 35.4s, 18h 14°C, 0.5xTBE
マーカー	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I)	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I)

表4 IS-printing System の増幅バンドサイズと判定のコード変換

セット1																		
Primer No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	<i>eae</i>	1-16	<i>hlyA</i>
Size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定例	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	3		0				5			4		5			7			

セット2																		
Primer No.	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	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
Size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定例	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	6		1				1			6		4			2			

表5 EHEC O157 の PFGE 画像解析における各解析者の近似度と認識バンド数

菌株	解析者	近似度(%)	100%一致画像数 <sup>a)</sup>	認識バンド数(本) <sup>b)</sup>
1	A	97.4	10 (19)	<u>19</u> , 20
	B	97.4	9 (19)	<u>19</u> , 20
	C	96.8	8 (19)	18, <u>19</u> , 20
2	A	100.0	11 (18)	<u>18</u>
	B	98.9	10 (18)	<u>18</u>
	C	96.0	6 (18), 2 (18)	17, <u>18</u> , 19
3	A	95.7	5 (20), 2 (21), 2 (22)	<u>20</u> , 21, 22
	B	96.0	4 (22), 2(22), 2 (20), 2(21)	20, 21, <u>22</u>
	C	96.7	5 (21), 2 (20), 2 (21)	20, <u>21</u> , 22
4	A	96.7	5 (20), 4 (21)	19, <u>20</u> , 21, 22
	B	93.0	6 (20), 3 (21)	<u>20</u> , 21
	C	96.4	8 (20),	19, <u>20</u> , 21
5	A	92.1	3 (20), 3 (23)	20, 21, <u>23</u>
	B	93.6	2 (22), 2 (20), 2 (21と22), 2 (23と24)	20, 21, <u>22</u> , 23, 24
	C	91.6	5 (20), 2(19)	19, <u>20</u> , 21, 22, 23

a) カッコ内は認識バンド数

b) 下線は該当する画像が最も多かったバンド数



表6 大阪府グループ事例由来株のISコードとPFGE型別の比較

事例番号	性別	年齢	血清型	毒素型	IS型	PFGE型	薬剤耐性
1	M	5	O157:HNM	1+2	<b>215457 311656</b>	d66	感受性
	M	42	O157:HNM	1+2	<b>215457 311656</b>	d66	感受性
	F	39	O157:HNM	1+2	<b>215457 311656</b>	d66	感受性
	F	14	O157:HNM	1+2	<b>215457 311656</b>	d67 <sup>a)</sup>	感受性
	F	10	O157:HNM	1+2	<b>215457 311656</b>	d66	感受性
2	M	3	O157:H7	1+2	<b>717557 611657</b>	d140	ABPC,SM,TC
	F	6	O157:H7	1+2	<b>717557 611657</b>	d140	ABPC,SM,TC
	M	7	O157:H7	1+2	<b>717557 611657</b>	d140	ABPC,SM,TC
	F	4	O157:H7	1+2	<b>717557 611657</b>	d140	ABPC,SM,TC
3	M	38	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d68	感受性
	F	4	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d144 <sup>b)</sup>	感受性
	F	4	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d68	感受性
4	M	8	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d68	感受性
	M	47	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d68	感受性
5	F	7	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d68	感受性
	F	4	O157:H7	2	<b>013055 214443</b>	d367 <sup>b)</sup>	感受性
6	F	1	O157:H7	1+2	<b>154047 303446</b>	d141	ABPC,SM,ST
	M	6	O157:H7	1+2	<b>154047 303446</b>	d141	ABPC,SM,ST
7	M	9	O157:H7	1+2	<b>111557 710417</b>	d142	SM,TC,CP
	F	5	O157:H7	2	<b>012057 214443</b>	d143	感受性
8	F	40	O157:H7	1+2	<b>717577 611657</b>	d111	感受性
	F	8	O157:H7	1+2	<b>717577 611657</b>	d111	感受性
	F	5	O157:H7	1+2	<b>717577 611657</b>	d111	感受性
9	M	0	O157:H7	2	<b>114057 303443</b>	d351	感受性
	F	33	O157:H7	2	<b>114057 303443</b>	d351	感受性
	F	78	O157:H7	2	<b>114057 303443</b>	d351	感受性
10	M	33	O157:H7	2	<b>215457 605243</b>	d257	感受性
	F	34	O157:H7	2	<b>215457 605243</b>	d366 <sup>c)</sup>	感受性
11	F	18	O157:H7	2	<b>105057 303443</b>	d503	感受性
	F	17	O157:H7	2	<b>105057 303443</b>	d503	感受性
12	F	42	O157:H7	2	<b>155047 301443</b>	d718	感受性
	F	12	O157:H7	2	<b>155047 301443</b>	d719 <sup>d)</sup>	感受性
	F	14	O157:H7	2	<b>155047 301443</b>	d720 <sup>e)</sup>	感受性

a) d66と1本異なる

b) d68と1本異なる

c) d257と1本異なる

d) d718と2本異なる

e) d718と1本異なる