

較する場合、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。

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

各地研の技術力を均一化することを目的として、腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌株 (5 株程度) を各地研で PFGE 解析後、成績を東京都健康安全研究センターで比較検討した。毎年、菌株によっては類似度に多少のバラツキが認められたが、概ね 90% 以上の高い類似度であった。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場合等では類似度が低くなってしまった。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。

PFGE 法以外の分子疫学解析法として IS-printing System 法の有用性について検討した結果、本法は PFGE 法と比較して非常に短時間で結果が判定できることや、試薬の調整等も容易なことから、PFGE 法に代わる手法として期待できることが分かった。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

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

2) Fumihiko Kawamori, Midori Hiroi, Tetsuya Harada, Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, Takashi Masuda and Norio Ohashi; Molecular typing of Japanese *Escherichia coli* O157:H7 isolates from clinical specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE, J Med Microbiol. 57, 58-63, 2008.

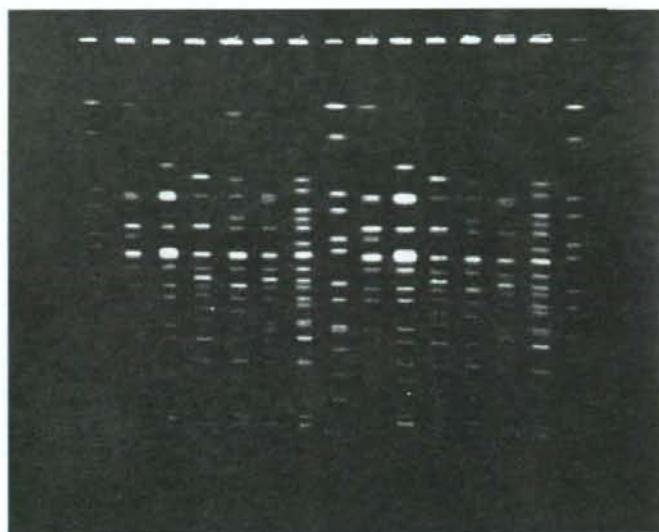
3) 東京都健康安全研究センター 微生物部食品微生物研究科：学生食堂で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による大規模食中毒事例—東京都，病原微生物検出情報 (国立感染症研究所)，29, 5, 4-5, 2008.

4) 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

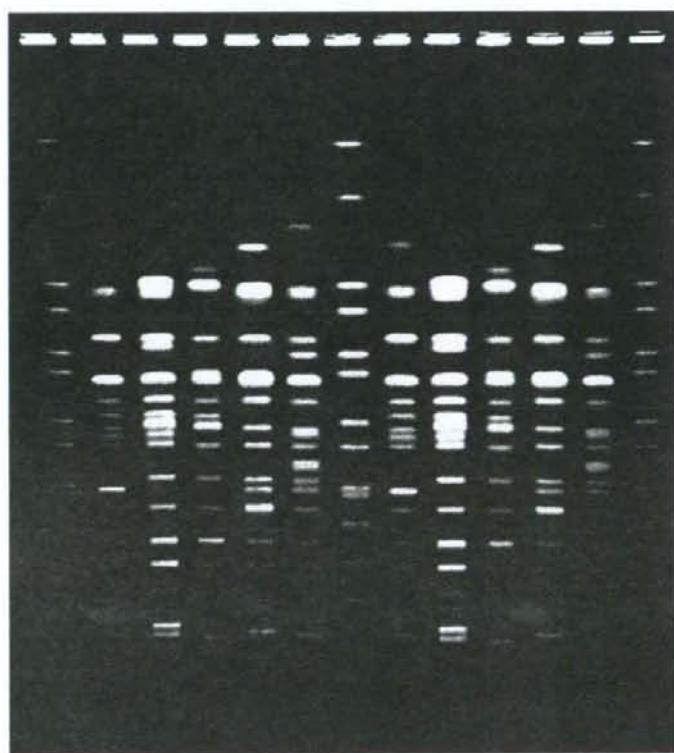
#### H. 知的所有権の取得状況

なし

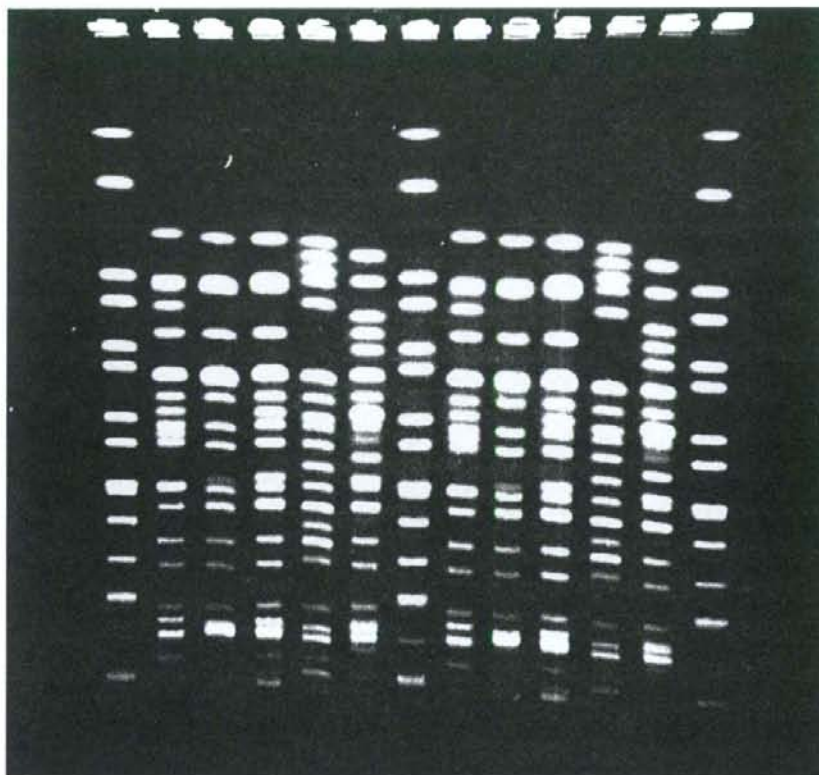
写真1 各施設で検討した腸管出血性大腸菌O157共通菌株の  
PFGE画像



平成18年度(5株)



平成19年度(5株)



平成20年度(5株)

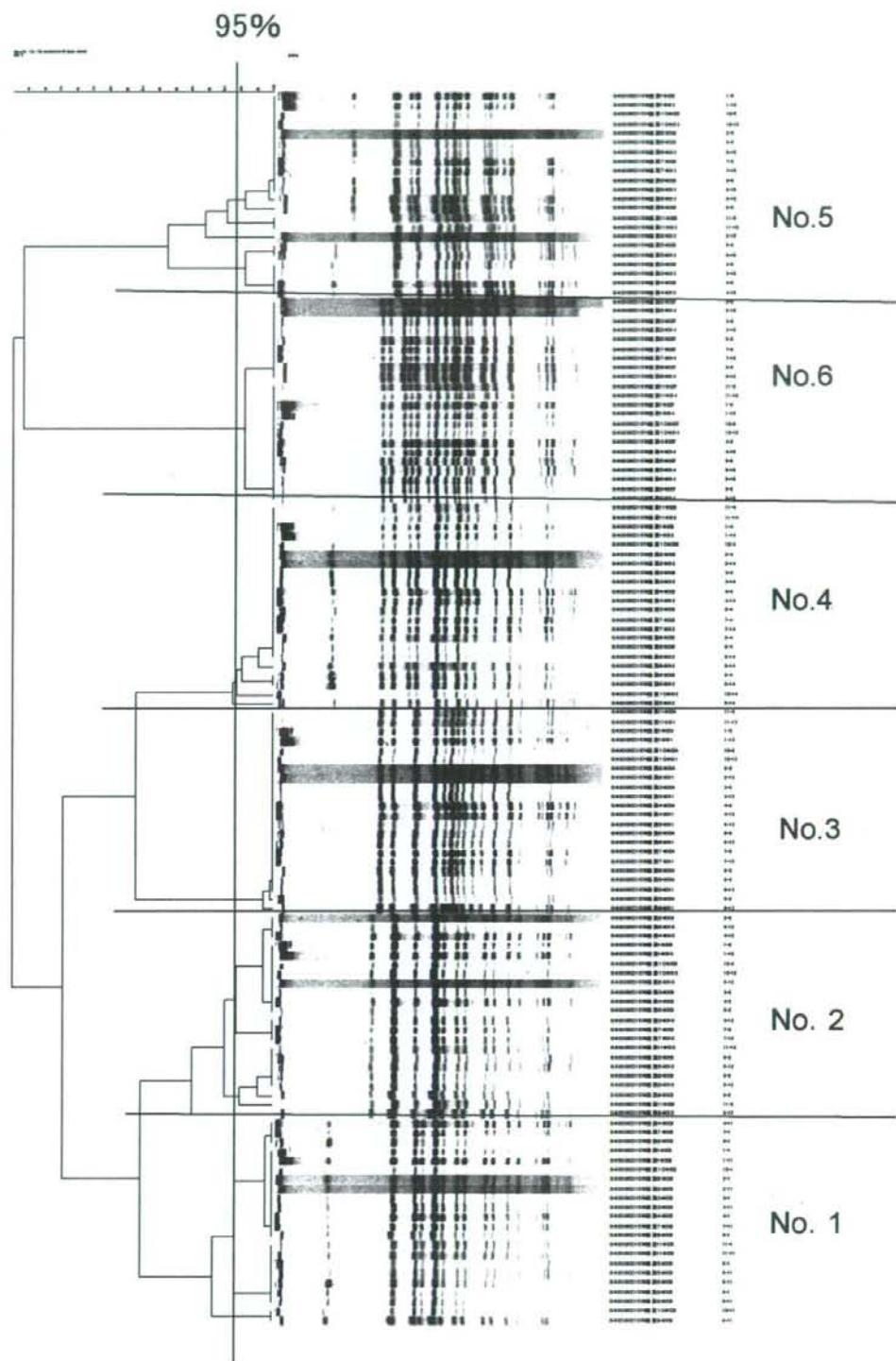


図1 11施設で実施した共通菌株(6株)のデンドログラム  
(平成18年度)



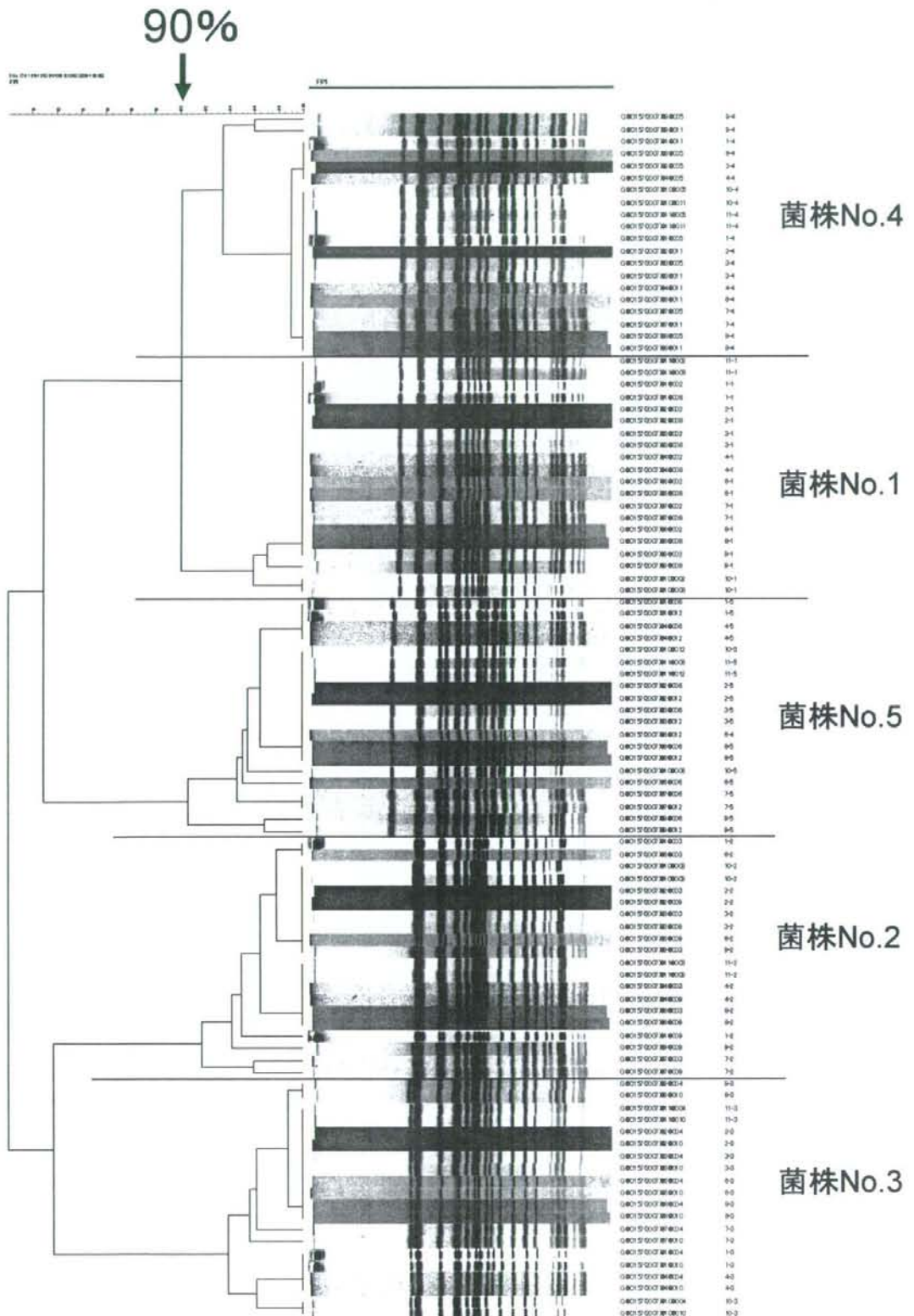


図2 11施設で実施した共通菌株5株のデンドログラム  
(平成19年度)

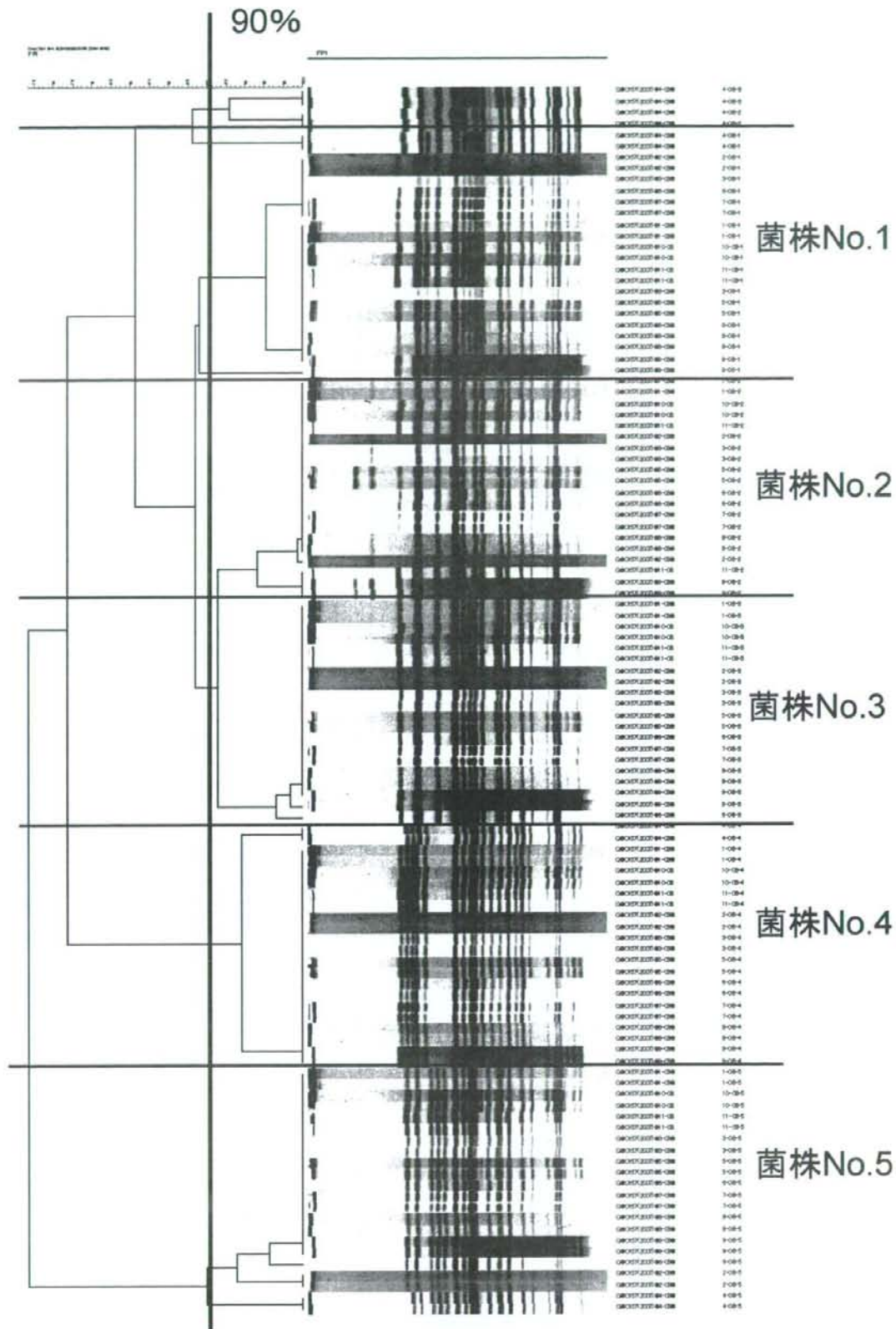


図3. 11施設で実施した共通菌株5株のデンドログラム  
(平成20年度)

表1. 腸管出血性大腸菌集団事例および散発事例の  
PFGE解析の応用例

## 平成18年

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

## 平成19年

1. 焼肉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. EHEC O157(VT1+VT2)散発事例（神奈川県衛生研究所）
3. 横浜市内の焼肉店を原因とするEHEC O157(VT1+VT2)による食中毒事例（横浜市衛生研究所）
4. O157による集団事例（長野県環境保全研究所）
5. 焼肉店を原因とした食中毒事例（東京都健康安全研究センター）

## 平成20年

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）

\* 詳細は各年度報告書参照



表2. サルモネラ食中毒事例へのPFGE解析の応用例

## 平成18年

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

## 平成19年

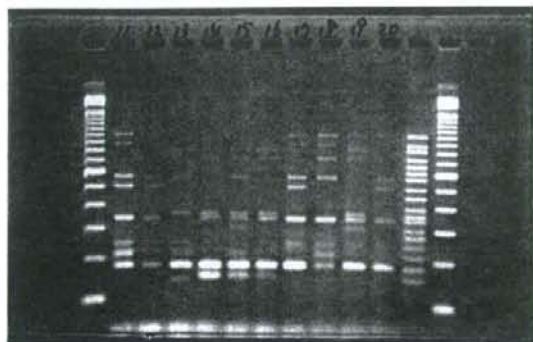
1. 2007年に発生したサルモネラ食中毒事例（埼玉県衛生研究所）
2. *Salmonella* 血清型 Typhimurium による食中毒事例（横浜市衛生研究所）
3. *Salmonella* 血清型 Typhimurium による食中毒事例（長野県環境保全研究所）
4. *S. Enteritidis* 食中毒事例の概要および分離株のPFGE画像（静岡県環境衛生科学研究所）

\* 詳細は各年度報告書参照



## 写真2. IS-Printing system解析を行うためのサンプルDNA調整法の検討

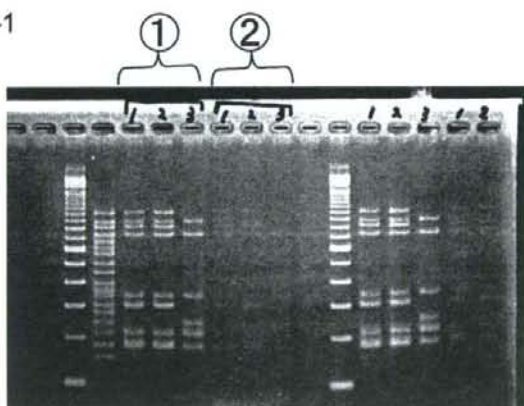
写真A



DNA抽出法:熱抽出のみ  
電気泳動:3%アガロース  
(Agarose S, ニッポンジーン)

IS-printing解析:Ver.1キット

写真B-1

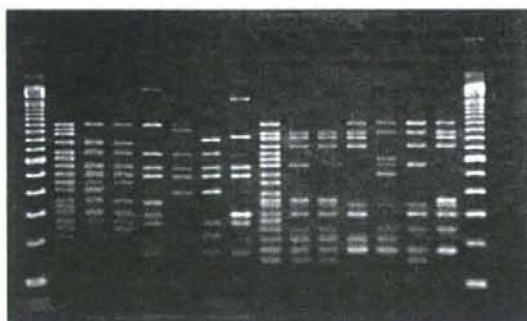


試料:① TSB, 37°C18時間培養  
→10倍希釈  
② TSB, 37°C18時間培養  
→100倍希釈

DNA抽出法:アルカリ処理  
電気泳動:3%アガロース  
(Agarose S, ニッポンジーン)

IS-printing解析:Ver.1キット

写真B-2



試料:TSB, 37°C18時間培養→10倍希釈

DNA抽出:アルカリ処理  
電気泳動:3%アガロース  
(NuSieve:Seakem=2:1)

IS-printing解析:Ver.1キット

表3 IS-printing 法についてのアンケート結果

質問	回答	回答数	意見等
1. 試薬の調整は？	簡単 問題ない 煩雑	6 5 0	
2. DNAの抽出方法は？	平板からアルカリ抽出 平板から熱抽出(ポイルのみ) 平板から精製キットを使って その他	6 0 0 4	・液体培養→アルカリ抽出 ・液体培養→Insta Gene Matrix(Bio Rad)で抽出
3. PCR反応は？	簡単 問題ない 煩雑	6 5 0	
4. 泳動用ゲルやBufferは マニュアル通りに行ったか？	行った 行わない	8 3	・NuSieve 3.1 Agarose 3% ・ゲル組成: 2%LDNA Agarose (Cambrex) ゲルサイズ: 200mm × 150mm 泳動buffer: ×1 TBE 泳動装置: サブマージ・アガロース30(Atto) bufferをiceで冷却して循環品柄泳動した ・3%和光純薬アガロース
5. 電気泳動の時間は？	60分 70分 75分 90分 7時間	3 2 1 4 1	
6. PCR結果を読むのは？	簡単 問題ない 煩雑 判断に迷う部分がある	0 6 0 5	(判断に迷った部分) ・分子量が小さいバンド ・小さいサイズの増幅バンドが薄くなっているため、 明るさの違う写真を2種類撮って確認した ・2nd setの分子量が大きいところが読みにくい ・バンドが多すぎて読みにくい
7. PFGEパターンと相関性は あると思うか？	相関性あり(ある程度) PFGEよりも細かく分けられる PFGEのほうが良い	10 0 1	
8. PFGEに代わる手法として？	期待できる 改良が必要 困難	9 0 0	・もう少し、バンドの分離がよいと思った ・バンド数を4本程度のmultiplexとし、増幅サイズを500bp 以下にすればMupidでも簡単に行える
9. このキットを実際を使って みたいと思うか	是非使いたい 時と場合によっては使いたい コストがかからなければ使いたい 使いたくない PFGEの方が良い	0 1 4 0 0	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
研究分担報告書

研究分担 平成18～20年度東海・北陸地方9地方衛生研究所による1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を用いた腸管出血性大腸菌の精度管理、2) 集団事例発生時の PFGE 解析結果の還元調査、3) IS printing system ver2 の PFGE との比較検討

研究代表者 寺嶋 淳 国立感染症研究所  
研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所  
研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所  
本庄峰夫、児玉洋江 石川県保健環境センター  
白木 豊 岐阜県保健環境研究所  
田中保知 岐阜市衛生試験所  
木全恵子 富山県衛生研究所  
中根邦彦 岡崎市総合検査センター  
石畝 史 福井県衛生研究所  
岩出義人 三重県保健環境研究所  
藪谷充孝 名古屋市衛生研究所  
奥村喜代子 豊田市衛生検査所

研究要旨

精度管理

平成19年度は東海・北陸地方9施設において2検体の腸管出血性大腸菌 0157 を用い、平成20年度は腸管出血性大腸菌3検体を用いサルモネラマーカ使用を統一して精度管理を実施した。

その結果、何れの年度も9施設のうち7施設の泳動図は解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。施設間の相同性の比較を行なったところ、何れの検体においても90%以上(90.4%から99.1%)と高率であり良好な結果が得られた。また、平成20年度には1施設でPFGE担当でない職員が担当者の指導のもとPFGEを実施し泳動図を作成した。これら泳動図は何れも良好な画質で系統樹解析においても他の泳動図と高い相同性を示した。以上の結果から、これまでの研究班活動で実施した精度管理は十分にその成果が表れているものと思われる、毎年PFGE担当者が1名～2名程度変わる東海・北陸ブロック内地研でもPFGE泳動図の画質の維持が可能であると思われた。

「東海・北陸ブロック版パルスネット」の試行

平成19年度、20年度何れも東海・北陸地方で検出された0157の解析を行ったところ、菌株間の相同性が80%若しくは90%以上を示すグループが複数認められた。これらグループには異なった地方の菌株が含まれていた。以上の結果から同一若しくは類似した遺伝子型の0157が東海・北陸地方に継続的に存在していることが明らかとなった。また、そのような0157を「東海・北陸ブロック版パルスネット」で検出できたことは今後の「東海・北陸ブロック版パルスネット」本格稼働の可能性を大きくするものと思われた。

行政への還元に関する調査

平成18、20年度東海・北陸9地研の行政への還元に関する調査ではそれぞれ5地研でPFGEの結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。これら5地研の泳動図は疫学調査等に活用されるに十分な画質を有していた。行政に還元された集団事例由来病原菌は0157をはじめ026、セラチア菌、サルモネラ、赤痢菌及びカンピロバクターであった。平成20年度には社会的にも大きな問題となったセラチア菌院内感染事例が発生したが、行政へ迅速に良質な泳動図を提供できたことは当該活動の精度管理が多少なりとも貢献したものである。特にこれまでの精度管理では検体として用いた病原菌は腸管出血性大腸菌のみであったが、セラチア菌院内感染事例のようなその他の病原菌の事例に対しても十分応用可能であることが証明された。

IS printing system ver2の実施

3年間のIS printing systemとPFGEとの比較検討の結果、その解析力はPFGEと同程度であるが、その簡便性及び迅速性はPFGEより優れていることが明らかとなった。若干の非特異バンドが出現するものの、集団事例発生時にはその迅速性、簡便性の利点を生かしてPFGEと同時に使用すればお互いの利点を生かし、有用な疫学情報が得られることが期待される。



## A. 研究目的

我が国で腸管出血性大腸菌 O157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働に向けた研究班活動が平成 12 年度から平成 20 年度まで行われた。

愛知県衛生研究所 (愛知衛研) ではこれまでの研究班活動として、O157、サルモネラ、赤痢菌の PFGE 実施統一プロトコール作成、及び愛知県下で過去 10 年間に検出されたサルモネラ、赤痢菌それぞれ約 150 株について PFGE を行い、そのバンドパターンのデータベース作成、また東海・北陸ブロック内の活動として 1) 年 1 回から 2 回の O157 の PFGE 精度管理、2) 東海・北陸ブロック地方衛生研究所 (地研) PFGE 担当者を愛知衛研に集め、PFGE 実施手順に関する研修会を実施 (平成 17 年 1 月)、3) O157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行った。

これらの研究班活動の成果として毎年 PFGE 担当者が 1 名～2 名程度変わることのある東海・北陸ブロック内地研においても精度管理のなかで同一 PFGE 型 O157 の PFGE バンドパターンの各地研相同性を約 90% 若しくはそれ以上まで高めることができた。このことから東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の O157 等集団発生の際にも疫学的資料として用いるに足る良質な画質を提供することが可能であると思われる。

平成 18 年度から 20 年度までの 3 年間、感染研及び全国の 5 代表地研との間で「パルスネットジャパン」稼働のために全国の地研 PFGE 画質の向上を目的として新たに研究班活動の開始が決定された。その主な活動は、PFGE 精度管理を当所から送付した腸管出血性大腸菌を用いて 9 地方衛生研究研 (以下 9 施設と略す。) にて実施し PFGE 画質の向上をはかることを目的とした。

また各施設で平成 19、20 年度検出された O157 の泳動図について当所で解析を行い、東海・北陸ブロック版パルスネットの試行も併せて行った。

さらに東海・北陸ブロック各地研が O157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、そ

の結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行い、PFGE 画像がどの程度活用されているかを調査した。また、この 3 年間で O157 の PCR 型別法 IS printing system ver2 (東洋紡) についてブロック内施設において解析力、簡便性及び迅速性について PFGE 法との比較検討等を行った。

## B. 研究方法

### 1. 精度管理

平成 19 年度

#### [I] 送付菌株

2 検体の O157 (検体 1、2) を精度管理に用いた。これらは散発及び集団事例に由来する 2 株の腸管出血性大腸菌 O157 で愛知県内で平成 19 年度 (検体 1: 愛知衛研菌株番号 2007-96、及び検体 2: 2007-101) に検出された。その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて行なった。

#### [II] 方法

愛知衛研よりそれぞれ 2 検体を 8 施設 (石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県科学技術振興センター保健環境研究部、名古屋市衛生研究所、豊田市衛生検査所) に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設 (仮に施設 A から I とした。) において、送付された 2 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、サルモネラマーカーの使用を統一した。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

平成 20 年度

#### [I] 送付検体

3 検体の腸管出血性大腸菌 (検体 1、O157:H7; 検体 2、O26:H11; 検体 3、O111:HNM (非運動性)) を精度管理に用いた。これらは散発事例に由来する 3 株の腸管出血性大腸菌で愛知県内で平成 20 年度に検出された。その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌



株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて行なった。

#### [II]方法

##### 1. 腸管出血性大腸菌を用いた精度管理

愛知衛研よりそれぞれ3検体を8施設（石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県保健環境研究所、名古屋市衛生研究所、岡崎市総合検査センター）に送付した。そして、愛知衛研を含む9施設において、送付された3検体についてPFGEを実施した。PFGE実施条件に関しては、サルモネラマーカーの使用を統一した。8施設のPFGEの泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

##### 2. 東海・北陸ブロック版パルスネットの試行 平成19年度

東海・北陸ブロック内8施設で検出された0157（菌株の分離年月、散発・集団等の詳しい情報は要求しなかった。）について各施設でPFGEを実施し、得られた泳動図をメールで愛知衛研に電送した。そして愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いてその解析を行った。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

##### 平成20年度

東海・北陸ブロック内5施設で平成20年度に検出された25株の0157について各施設でPFGEを実施し、得られた泳動図をメールで愛知衛研に電送した。そして愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いてその解析を行った。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

##### 3. 行政への還元に関する調査

##### 平成18年度

平成18年4月から12月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による集団事例の際にPFGEを行い保健所、及び県庁（市役所）に報告した事例について、その件数及び代表1事例について事例の概要、PFGE泳動図を愛知衛研に送付した。

また、該当する事例がない地研については今年度、各地研で検出された病原菌についてPFGEを行い、菌株情報（分離年月、由来等）及びその泳動図を愛知衛研に送付した。

##### 平成20年度

平成20年4月から12月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による集団事例の際にPFGEを行い保健所、及び県庁（市役所）に報告した事例について、事例の概要、PFGE泳動図を愛知衛研に送付した。

##### 4. IS printing system ver2（東洋紡）の実施 平成18年度

添付のプロトコールに従い東海・北陸6地研で検出された0157について行い、その代表泳動図、菌株情報及び結果を愛知衛研に送付した。なお試供菌株数、PFGEとの比較検討は各地研が独自に行った。

##### 平成19年度

東海・北陸ブロック内9施設で検出された0157についてIS printing system（東洋紡）を実施した。方法は添付のマニュアルに従って行った。なお、解析に用いた菌株の株数、由来等は各施設任意で行った。

##### 平成20年度

東海・北陸ブロック内2施設で検出された29株の0157についてIS printing system（東洋紡）を実施した。方法は添付のマニュアルに従って行った。なお、解析に用いた菌株の株数、由来等は各施設任意で行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 精度管理

##### 平成19年度

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体1、2の泳動図の解析を行い系統樹を作成した。なお9施設のうち2施設ではそのPFGE画像の質が低かったため解析を行うことができなかった。これら2施設の泳動図は写真の濃淡が非常に濃いため、特に低分子領域のバンドの判別が困難であった。そこで以下の結果は7施設について記述した。

検体1に関しては7施設全体の相同性は90.4%と高率であった。7施設の泳動図は2つの

大きなクラスターに分かれ、ひとつのクラスターには5施設が含まれ、もうひとつのクラスターには残りの2施設が含まれた。前者の5施設が含まれたクラスターはさらに2つに分かれたが、両者の相同性は96.9%と高率であり、4施設ではその相同性は100%であった。また後者2施設の相同性は100%を示した。

検体2については検体1と同様に2つの大きなクラスターに分かれたが9施設全体の相同性は91.7%と検体1に比べて高かった。ひとつのクラスターには5施設が含まれ、もうひとつのクラスターには残りの2施設が含まれた。前者ではその相同性が100%を示した。残りの2施設でも両者の間の相同性は100%を示した。今年度は1昨年度認められた同一検体を配布したにもかかわらず一部施設で高分子量領域において明らかにバンドパターンが異なるという一部の0157株に認められる遺伝的な不安定さが施設間の相同性が低い原因となった。今年度は用いる検体を複数回PFGEを実施しその安定性を確認した。このことも今年度各施設間の相同性が高まった一因と考えられる。

平成20年度

愛知衛研及び各施設より当所に送られた泳動図の解析を行い系統樹を作成した。なお9施設のうち1施設ではそのPFGE画像の質が低かったため解析を行うことができなかった。この施設の泳動図は写真の濃淡が非常に薄いため、特に低分子領域のバンドの判別が困難であった。また1施設はPFGE機器修理のため実施できなかった。そこで以下の結果は7施設（愛知衛研は2泳動図）について記述した。

検体1（0157）に関しては7施設全体の相同性は99.1%と高率であった。7施設のうち6施設が相同性100%でひとつのクラスターを形成した。残り1施設もこのクラスターと相同性99.1%と非常に高い相同性を示した。

検体2（026）については4施設が相同性100%を示し、ひとつのクラスターを形成した。残りの3施設はこのクラスターとそれぞれ97.5%、97%、90.8%の相同性を示しそれぞれ単独でクラスターを形成した。

検体3（0111）に関してはそれぞれ3施設と2

施設が相同性100%であった。これら5施設は相同性96%でひとつのクラスターを形成した。一方、残りの2施設はそれぞれ相同性94.2、90.7%の相同性を示しそれぞれ単独でクラスターを形成した。また、今年度愛知衛研はPFGE担当でない職員2名が担当者の指導のもとPFGEを実施し泳動図を作成した。これら泳動図は何れも良好な画質で系統樹解析においても他の泳動図と高い相同性を示した。

2. 東海・北陸ブロック版パルスネットの試行  
平成19年度

7施設から電送された17株（各施設2から3株）の泳動図について系統樹を作成した。その結果、類似したバンドパターンを示し菌株間の相同性が80%以上を示すグループが6つ認められた。これら6つのグループのうち3つは同一施設由来の2株であったが、残り3施設は異なった施設由来株であった。さらに1グループの2株は東海地方と北陸地方由来株であり地理的にも異なった地域由来であった。

平成20年度

5施設から電送された25株（各施設2から12株）の泳動図について系統樹を作成した（図2）。その結果、異なった施設間の菌株で菌株間の相同性が90%以上を示すグループが3つ認められた。これら3つのグループの詳細は1）異なった2施設の相同性が100%であったグループ、2）異なった2施設の相同性が90.9%であったグループ、3）4施設由来6株が含まれるグループで全体の相同性は95%であった。さらに6株のうち2株は異なった2施設由来で相同性が100%であった。

3. 行政への還元に関する調査

平成18年度

東海・北陸9地研のうち5地研（富山県、岐阜市、岐阜県、福井、愛知県）では今年度集団発生の際にPFGEを実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は4地研（岐阜市、岐阜県、福井、愛知県）が1から3事例であった。富山県は0157をはじめ腸管出血性大腸菌に関しては集団、散发事例全ての菌株、2類感染症菌については集団事例全ての菌株についてPFGEを実施し、結果を行政への還元していた。



代表1事例の概略は、富山県は平成18年8月に保育園で発生した園児、職員及び家族74名が感染した0157の集団事例であった。分離された0157のPFGEバンドパターンは同じか非常に類似したパターンであった。岐阜市は市内で平成18年2月及び5月に発生した3つのカンピロバクター食中毒事例であった。これら事例では血清型別不能株が多く認められたが、PFGEでは型別可能でありPFGEの有用性が示された。岐阜県は*Salmonella* Enteritidisによる食中毒事例であった。平成18年11月に病院給食を原因として摂食者677名中患者112名の大型食中毒であった。患者と原因食から分離されたPFGE型は同一であった。福井県は1飲食店が原因と考えられる0157食中毒事例であった。平成18年7月に家族2名を含む3名が0157に感染した。3名から分離された0157バンドパターンは同じか非常に類似したパターンであった。愛知県は同一地区内で続発した*Shigella flexneri* 2aの集団事例であった。患者2名から分離された*Shigella flexneri* 2aのバンドパターンは同一であった。

平成18年度行政への還元がなかった残り4地研(石川県、三重県、豊田市、名古屋市)に関しては各地研で検出された0157をはじめサルモネラ、赤痢菌についてPFGEを実施した。その概略は、石川県は平成18年に発生した0157、赤痢菌及びカンピロバクターの集団事例についてであった。3事例何れも同一集団事例由来株は同じバンドパターンであった。三重県は県下で検出された集団、散発事例由来29株の0157についてPFGEを行った。5家庭内事例由来株はそれぞれの事例内で同じ若しくは非常に類似したバンドパターンであった。豊田市は市内で検出された18株の0157についてPFGEを行った。3集団事例由来株(1食中毒疑い、2家庭内事例)は事例内では同一若しくは非常に類似したバンドパターンであった。しかし、散発事例由来株とはそのバンドパターンは異なっていた。名古屋市は平成18年に検出された12株の0157についてPFGEを行った。3家庭内事例由来株は同一事例株は同じバンドパターンであった。しかし散発事例由来株とは異なっていた。東海・北陸9地研のPFGE泳動図は何れも良質で目視

にてバンドパターンの認識を容易に行うことが可能であった。

平成20年度

東海・北陸9地研のうち5地研(富山県、名古屋市、三重県、福井県、石川県)では今年度集団発生の際にPFGEを実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は4地研が1事例、1地研が3事例であった。その概略を以下に示す。

富山県：保育所において発生した腸管出血性大腸菌026集団感染事例について 富山県衛生研究所 細菌部 木全恵子 嶋智子 清水美和子 金谷潤一 磯部順子 倉田毅 綿引正則

## 1. 概要

平成20年6月下旬から8月初旬にかけて、富山県内の保育所において腸管出血性大腸菌026:H11(VT1+,以下026)による集団感染が発生した。感染者は34名であり、その内訳は園児30名、家族等接触者4名であった。有症者は8名(感染者の24%)であり、全て保育園であった。給食や環境調査からは026を検出することができなかったこと、互いにトイレを共用していた幼児2クラスに感染者が集中していたことから保育園内のヒト-ヒト感染が推察されたが、感染源・感染経路を特定することはできなかった。

## 2. PFGEによる遺伝子解析

感染者34名についてその分離菌株のPFGE解析を行った。PFGEは標準化プロトコールに基づいて行った。得られたPFGEの泳動像の解析は解析ソフトFingerPrinting IIを用いて行った。FingerPrinting IIによるデンドログラム解析にはUPGMA法とDice係数を用いて行い、トレランス値は1.2%とした。

デンドログラム解析と目視による確認を行った結果、026分離菌株34株は6つのパターンに分類された。最も多かったパターン5は34株の71%を占める大きなクラスターを形成していた。パターン5とバンド数の異なるパターン1~4を示した菌株は34株中10株(29%)であった。

本事例で検出された6つのPFGEパターンのうち、パターン4及びパターン6はパターン5と1バンド違いであった。また、パターン1はパターン2と1バンド違いであった。パターン4は本事例の前期(6月末から7月初め)に分離され

た。初発患者より検出されたパターン 2 は本事例の前期(6月末)のみ検出された。一方パターン 5 とパターン 1 は本事例の全般にわたり検出された(また、パターン 3 はパターン 2 と類似度 94.4%であった)。

本事例では感染が確認され、治療・菌陰性化後、再度本菌が検出された園児が 3 名報告された。このうち 2 名からは治療前と同一 PFGE パターンの株が検出された。しかし、残りの 1 名からは治療前はパターン 2 の株が、治療後はパターン 3 の株が検出された。この 1 名の場合、治療の前後で異なるパターンの株が検出された理由として、別のパターン株に感染した可能性、あるいは初回感染菌が感染者の腸内から完全に排除されず変異した形で排出された可能性等が挙げられた。

名古屋市：散发事例 3 名から分離された O157 : H7, Stx 2 について PFGE をおこなった。同日に同一プールを使用していたがその他の接点、喫食状況を含む共通点は認められなかった。PFGE の結果 3 株は同一のものである可能性が高いと報告した。

三重県：点滴を原因とするセラチア菌院内感染事例、2008 年 6 月に発生した院内感染事例で、182 検体を当研究所で検査を実施した。その結果、使用済み点滴パック 7 検体、血液 1 検体及び消毒綿 1 検体から *Serratia liquefaciens* を検出した。未使用の生食、点滴添加剤、添加剤入り生食は、7 日間増菌を行ったものの菌の発育は認められなかった。また、*S. liquefaciens* を検出した消毒綿が入っていた容器の液中の一般細菌数は 105/mL であった。当所で検出した *S. liquefaciens* 9 株と A 及び C 総合病院で患者血液から分離した 6 株の PFGE を行ったところ、制限酵素 Spe I で処理した DNA のパターンが全て一致し、使用した 13 薬剤に全て菌株が感受性を示した。

福井県：事例 1、2008 年 4 月 4 日、5 日に EHEC O157 感染症として医療機関より届出があった患者 A および C について、保健所が調査した結果、患者 A は 3 月 28 日に、患者 C は 27 日に同一焼肉店 (X 店) で生レバーおよびホルモン等を喫食していた。X 店で患者と食事を供にした 2 グループ計 15 名および患者家族 17 名の糞便検査を当

センターにて実施した結果、患者 A のグループ 1 の 2 名のうち 1 名 (B) から、患者 C のグループ II の 13 名のうち 1 名 (D) から EHEC O157 を検出した。また、保健所管内で 4 月 6 日の報道発表に気付いて医療機関を受診し、4 月 10 日に EHEC O157 が検出された患者 E は、3 月 29 日に X 店で生レバー等を喫食しており、計 5 名から検出された。PFGE の結果、A 由来株、B 由来の 3 株中 1 株および D 由来株の 3 株中 2 株は同一パターンであり、D 由来の残り 1 株は 1 本のバンドが欠けたパターンであった。また、B 由来の残りの 2 株、C 由来の 2 株中 1 株および E 由来株は同一パターンで、A 由来株などとは 1 本のバンドの違いであり、全体の類似度は 93%以上であった。

事例 2、2008 年 7 月 16 日、医療機関から保健所に EHEC O157 感染症の届出があった。患者 A は家族 4 名と 7 月 5 日に焼肉店 V で、生レバーおよびホルモン等を喫食しており、同日に同店を利用した他のグループのうち 1 グループ 3 名も同様の症状を呈していた。7 月 14 日にも届出が 2 件 (患者 B および C) あり、患者 B は家族 6 名と 7 月 4 日に、患者 C は家族 2 名と 7 月 6 日に焼肉店 V で生レバー等を喫食していた。さらに、7 月 10 日に届出があった患者 D は家族 3 名と飲食店 W で、7 月 14 日に届出があった患者 E は家族 3 名と飲食店 X で、それぞれ牛さしおよびホルモン等を喫食していた。飲食店 W および X の肉の仕入れ先は焼肉店 V と同じ Z 店であった。一方、7 月 18 日に届出があった患者 F は家族 2 名と飲食店 Y で喫食していたが、飲食店 Y の仕入れ先は Z 店ではなかった。当センターにおける糞便検査の結果、焼肉店 V の従事者 2 名 (G、H) とその家族 1 名 (K)、患者 A の同行者 1 名 (I) および患者 C の同行者 1 名 (J) から EHEC O157 が検出された。計 11 名由来株の PFGE の結果、すべて同一パターン (b142) であった。

事例 3、2008 年 8 月 30 日に保健所に医療機関から EHEC O157 の届出があった 2 名は、8 月 23 日にバーベキューを喫食していた。バーベキュー参加者は 53 名で、医療機関における検査ではその他に有症者 4 名中 2 名、当センターにおける検査では有症者 4 名中 1 名および無症者 41 名中 7 名から O157 が検出された。合計すると、検査を実施した 51 名中 12 名から検出された。PFGE



の結果、4つのパターン（主なパターンはb142）が確認され、類似度は93%以上であった。また、同時期に発生した散発の2事例株でも同一パターンを示す株が確認された。は平成18年8月に保育園で発生した園児、職員及び家族74名が感染した0157の集団事例であった。分離された0157のPFGEバンドパターンは同じか非常に類似したパターンであった。

石川県：H20年8月17日に石川中央管内N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グループ計3グループ7名より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から同施設を原因とする食中毒と断定した。

#### 4. IS printing system ver2の実施

平成18年度

##### 1) PFGE との解析力の比較

東海・北陸6地研（富山県、岐阜市、岐阜県、豊田市、福井県、愛知県）においてIS printing systemの検討を実施した。各地研が実施した試供菌株数は4株から31株であった。6地研のうち4地研はPFGEとの解析力の比較を行った（但し、IS-printing Systemでは、バンドが薄く判定困難なため判定可能な部分のみで比較した株を含む）。

以下にPFGEとの解析力の比較を行った4地研の結果の概略を示す。富山県では前述した保育園での集団事例由来株4株についてPFGE及びIS printing systemを実施した。PFGEバンドパターンの非常に類似した4株のISパターンは全て同じであった。岐阜県は18株の0157について実施した。PFGE型別結果の比較はPFGEでのバンドパターンが同じであった5組10株は、すべてIS printing Systemにおいても各々同じパターンを示した。PFGEでバンドパターンが異なる18株では、2組4株がIS printing Systemにおいて同じパターンを示したが、それ以外の株はすべて異なるパターンを示した。PFGEでバンド1本のみ異なる3組6株では、IS printing Systemにおいては各々同じパターンを示した。豊田市は14株について行った。同一PFGE型であった1食中毒疑い6株のISパターンはひとつのパターンが異なる3つ型に分かれた。しかし同一PFGE型であった1家庭内事例由来2株は同

一ISパターンであった。愛知県では31株について実施した。何れも同一若しくは非常に類似したPFGE型であった6集団事例由来株は1事例ではISパターンは同じであった。4事例ではISパターンはお互いにひとつのパターンが異なる2つのISパターンに分かれた。また1事例では2つのISパターンに分かれたが、そのパターンは4つ異なっていた。また、IS printing systemはPFGEでDegradationとなり型別不能であった1株についても型別可能であった。これらの結果からIS printing systemの解析力はPFGEと同程度と考えられた。

IS printing systemのみ実施した2地研についての概略は、岐阜市は4株の0157について実施した。菌株の由来は不明であるが、4株中3株は同じ、1株は異なるISパターンであった。福井県は22株について実施した。

##### 2) IS printing system を使用しての評価

以下に各地研から寄せられたIS printing systemを使用しての評価を示した。

長所

1. 迅速性、簡便性に優れ、特に集団感染発生時の確認等においては有用である。

難点

1. 不明瞭なバンドがあった。撮影後目視でチェックしておくと思われたが、検体数や出現バンド数が多いと、確認が煩雑で、チェックミスが生じやすい。
2. *eae* primerのPCRが増幅されないか、非常に薄い。
3. アガロースS（和光純薬）を用いたためか、バンド間が接近しすぎて若干判定に戸惑った。

その他

1. Loading Dyeの青い色素がゲルから流れ出てなくなってしまうまで泳動したほうが増幅バンド間の距離が最大になり確認しやすいと思われた。
2. 100bpのDNA ladderと一緒に泳動するとバンドサイズの確認になる。
3. Standard DNAをそれぞれのset Primer Mixの系の両側に泳動し、両端の各Primer No.のバンドを直線で結ぶと、バンドの有無を確認しやすい。また、数検体おきにStandard DNAを入れるようにしたほうが、バンドの確認がしやすい

と思われる。

4. 泳動像を見てバンドの確認をしながら、結果を記入していく様子を準備しておくといふと思われた。添付文書のデータ集計表だと、泳動像で見た場合と並び方が縦横逆になる。

平成19年度

printing system ver2 を実施した結果の概略を以下に示した。

愛知県：志賀毒素2低産生株12株を含む計16株について実施した。その結果、低産生株のなかに IS printing system ver2 でバンドの違いが2から3本の類似したパターンを示すグループ（2株と3株が含まれる。）が2つ認められた。これら2つのグループ内の0157はPFGEでもそれぞれ相同性80%以上を示した。

石川県：23株について実施した。同一PFGEパターンを示す8組計17株ではPFGEで同一パターンを示す株は全て IS printing system ver2 でも同一のパターンを示した。また散发事例由来株1株のパターンは17株とは異なっていた。

岐阜県：19株について実施した。その結果、PFGEでのバンドパターンが同じであった2組4株は、IS printing system ver2 においても各々同じパターンを示した。PFGEでバンドパターンが異なる17株は、IS printing system ver2 では11のパターンに分けられた。この時、PFGEでバンドパターンが異なり、IS printing system ver2 において同一パターンとなった組合せは、1組を除きPFGEでのバンド差が1～2本の株であった。

岐阜市：7株について実施した。これら7株の IS printing system ver2 のパターンは全て異なっていた。これら7株のうち stx2f 遺伝子をもつ063はstx2は増幅されなかった。

富山県：30株について実施した。これらの株のうち5株の IS printing system ver2 のパターンは同一であった。また、4株では非特異バンドが認められた。

福井県：9株について実施した。これら9株のうち2株の IS printing system ver2 のパターンは同一であった。

三重県：23株について実施し、4つの家庭内事例由来株（各事例2株）についてPFGEとIS p

rinting system ver2 の結果を比較した。その結果、1事例では2株のパターンがPFGEと IS printing system ver2 で一致した。2事例ではPFGEでは2株のパターンが一致したが、IS printing system ver2 ではパターンはバンド1、2本異なっていた。残りの1事例ではPFGEでは2株のパターンはバンド3本異なっていたが、IS printing system ver2 ではパターンが一致した。名古屋市：4株について実施した。その結果、これら4株の IS printing system ver2 パターンは異なっていた。

豊田市：6株について実施した。その結果、これらの株のうち2株の IS printing system ver2 のパターンは同一であった。また非特異バンドが1株に認められた。

IS printing system ver2 を実施しての感想

- ・マニュアルに推奨されていた泳動槽（GelMate 2000）は当所にはないので、なるべく長い泳動距離を稼ぐため、Bio-RadのサブセルGTを使用した（ゲルサイズ10cm）。100Vで泳動したところ、Loading dyeの青色がゲルの終端まで流れるのに長時間を要したためか、バンドパターンがやや歪んでしまった（泳動中の温度上昇はおおむね3℃程度…smiling?）。

- ・Version 1 では別々になっていた polymerase、dNTP、10×bufferなどがpremixされたmaster mixになっていたため、PCR反応液の調製が非常に簡単で便利になった。

- ・取扱説明書の推奨法通りに実施することにより、特に条件を検討する必要もなく、安定した明瞭なバンドが得られ、結果判定も容易になった。

- ・識別能力の点では、IS printing system ver2 はPFGEに比べて出現パターン数が少なく、やや劣ると思われた。しかし、PFGEでバンドパターンが異なり、IS printing system ver2 でパターンが一致した株は、多くが疫学的な関連性のある株であった。このため、疫学的な解析能力としては、それほど差はないと思われた。一方、IS printing system ver2 はPFGEにはない迅速性、簡便性という特長を持ったため、集団感染発生時等の迅速検査法として有用であると思われる。

- ・Primer1-11, 12, 15, eaeが判定しづらかった。S



TD DNA でも Primer1-5 は薄かった。約 300kb 以下のバンドがぼやけて見にくい。2nd-PCR で約 900kb に非特異バンドが出現した。

・昨年度のキットと比べ、Mix の試薬が多くなっていましたので、反応混液の作成が簡単になった。

・昨年と同様、100bp の DNA Ladder を一緒に泳動すると、バンドサイズの確認ができるので、便利であった。

・取扱説明書に例示されている検出バンドの記録様式が、昨年度のものより使いやすい。

・電気泳動に使用するアガロースは、NuSieve GTG : SeaKem GTG = 2 : 1 を奨励すると取扱説明書にあったが、当所では通常、既製品の NuSieve 3 : 1 Agarose (NuSieve : SeaKem = 3 : 1) を使用しており、NuSieve GTG と SeaKem GTG をそれぞれ準備していないため、NuSieve 3 : 1 Agarose と 0.5×TBE で 3%アガロースゲルを作成して使用した。以下の点は、その影響かもしれない。

・泳動距離の影響があると思われるが、バンドサイズが小さなものになるほど、バンドがぼやけてしまい、シャープさに大きく差が出ると感じた。

・Standard DNA と Loading Dye を Mix した各 PCR 産物を同時に泳動したところ、移動していく色素の位置に少しずつずれが生じた。(Standard DNA のほうがやや早く移動していきました) 泳動が進むにつれ、バンドはぼやけていったため、差はわからなくなった。

・染色後の泳動像を確認したところ、Standard DNA と Template Mix のバンド位置にずれはなく、他の検体とのずれもないと思われた。

・Standard DNA と Loading Dye に含まれる 2 色の色素は、泳動が進むとかなりぼやけていた。そのため、青色色素をゲルの末端付近まで泳動しようとしたとき、色素の位置が確認し難く、染色後、もう少し泳動した方がよかったと思われた。

平成 20 年度

2 施設で検出された O157 について IS printing system ver2 を実施した結果の概略を以下に示した。

「IS-printing System による腸管出血性大腸菌

O157 サブタイピング法の検討について」

富山県衛生研究所 細菌部主任研究員 木全恵子  
今回、我々は平成 20 年度パルスネット研究班検討課題として昨年度に引き続き、IS-printing System による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法の検討を行った。IS-printing System による O157 サブタイピングは宮崎大学・林教授らにより開発された IS (insertion sequence) の分布をマルチプレックス PCR により検出する O157 サブタイピング法である。

方法：供試菌は平成 20 年度に当県で発生した腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) 感染事例より分離された O157 24 株を用いた。鋳型 DNA はキレックス DNA 抽出法により調製した。キレックス DNA 抽出は以下の方法で行った。5%キレックス-TE pH8.8 に菌体を懸濁し、100℃で 10 分加熱したのちに、遠心 (12000rpm 5 分) 分離を行った。得られた上清を鋳型 DNA として PCR に用いた。調製した全ての鋳型 DNA の濃度を吸光度 OD260 より計算した。各鋳型 DNA を 5 ng/μl ~ 10ng / μl に希釈し、2 μl (10ng ~ 20ng 当量) をマルチプレックス PCR による O157 サブタイピングに用いた。PCR 条件及びアガロース電気泳動は IS-printing System の推奨条件に従い、3%アガロース (NuSieve GTG Agarose : SeaKem GTG Agarose = 2 : 1 混合) と 0.5×TBE buffer を、泳動装置には Mupid ミニゲル電気泳動装置を用いた。電気泳動時のバンドの乱れを防止し、安定した泳動像を得るために、泳動に用いるアガロースゲルと泳動バッファーはあらかじめ 4℃で冷却し、使用した。

結果と考察：供試菌の IS-printing System サブタイピングにおいて陽性コントロールとは異なる大きさの PCR 産物が 2 株より検出された。これらの PCR 産物の電気泳動バンドは一部を除き、非常に濃く明瞭であり、陽性コントロールの PCR 産物のバンドと非常に近い位置であった。陽性コントロール PCR 産物とは異なる大きさのこれらの PCR 産物の鑑別に関しては電気泳動によるバンド分離能等電気泳動条件の向上のほか、サブタイピング上での取り扱いと解釈に注意が必要であると考えられる。今回供試菌 24 株の IS-printing System サブタイプと PFGE パターンを比

較した結果、PFGE 解析では 18 パターン、IS-printing System によるサブタイプは 17 パターンに分岐した。各供試菌の IS-printing System サブタイプと PFGE パターンを表 3 に示した。各供試菌の IS-printing System サブタイプと PFGE パターンの組み合わせでは 19 組であった。供試菌 24 株のうち、IS-printing System サブタイプ 1 タイプに対して PFGE パターンが 1 パターンであった組み合わせは 15 組 18 株であった。特に 2 組の PFGE パターンと IS-printing System サブタイプの組み合わせ E、F は複数の株において検出された。これらの株はいずれも感染発生時期が近接していたが各事例における疫学的関連性は不明であった。このことから今回用いた供試菌株 24 株のうち IS-printing System サブタイプと PFGE パターン IS-printing System サブタイプの相関性が見られた株は 18 株 (75%) であった。また、1 つの IS-printing System サブタイプに対し複数の PFGE パターンが検出された組み合わせは A (供試菌 No. 1 と No. 20)、B (供試菌 No. 13)、C (供試菌 No. 14 と No. 16)、D (供試菌 No. 5) であった。このうち組み合わせ B の P-11 は P-1 と 2 本、組み合わせ D の P-5 は P-2 と 4 本、それぞれ PFGE でのバンドパターンが異なっていた。組み合わせ M (供試菌 No. 17) については、PFGE パターン P-2 であったが IS-printing System サブタイプは I-11 であり、サブタイプ I-2 と 2 バンドパターンが異なっていた。名古屋市：散发事例 3 名から分離された 0157 : H7, Stx 2 について IS printing system ver2 をおこなった。同一日に同一プールを使用していたがその他の接点、喫食状況を含む共通点は認められなかった。IS printing system ver2 の結果から 3 株は同一のものである可能性が高いと推測された。

#### D. 考察

##### 精度管理

PFGE 泳動図の相互比較のために重要と考えられる PFGE 実施条件として 1) シャープなバンドが得られるサルモネラマーカの使用、2) PFGE 泳動条件の統一がある。平成 19 年、20 年度の精度管理ではこのうちサルモネラマーカの使

用のみ統一としたが、PFGE 泳動条件の統一は全ての施設で行われていた。これら 2 つの条件は過去の精度管理において常に強調したことであることから各施設で自ずと統一できたものと思われる。平成 19 年度、解析を行なった 7 施設の泳動図に関して 2 検体とも全体の相同性は約 90% であったが、2 から 5 施設では相同性 100% が得られた。今後、全体の相同性を 100% に近づけるためには各施設の画質の向上に加え、1) サルモネラマーカの検討。具体的にはこれまで各施設で保存していたが、愛知衛研が凍結保存してあるマーカを用事送付して最大限マーカを同じにする。2) 各施設から電送された泳動図は大きさや明るさによりバラツキがあることからこれらの統一を行うことで全体の相同性の向上が期待できるものと思われる。また参加した 9 施設のうち 2 施設の PFGE 泳動図が解析ソフトで解析することが困難であった。これら 2 施設の泳動図はバンドの分離は充分であると思われるが、明るさに欠け特に低分子量領域ではバンドの判別が困難であった。このことから今後の精度管理では前述のように泳動図を写真撮影する際の条件を付けることも必要であると思われる。平成 20 年度ではこれまで用いてきた 0157 に加え 026、0111 を加えたが、大半の施設で 0157 と同様良質な画像が得られ、異なった施設間で高い相同性が認められた。具体的には 026 の場合には 90.8%、0111 の場合には 90.7% と 0157 の場合 (99.1%) には及ばないものの高い相同性であった。これはこれまでの精度管理の成果と思われる。特に、愛知県では PFGE 担当の経験がない技術者が 1 回の PFGE 研修で高質な泳動図を作成することが可能であった。これは毎年 PFGE 担当者が 1 名～2 名程度変わる東海・北陸ブロック内地研においても十分技術の伝承が可能であり 1 施設において良好な画質を意義することが可能であることを示している。

##### 東海・北陸ブロック版パルスネット」の試行

平成 19 年度解析を行なった 17 株のうち類似したバンドパターンを示し菌株間の相同性が 80% 以上を示すグループが 6 つ (13 株) 認められた。これらグループのうち 3 つは異なった施設由来株であり、さらに 1 グループの 2 株は