

東海地方と北陸地方由来株であった。平成20年度は25株について行ったところ平成19年度と同様、類似したバンドパターンを示し菌株間の相同性が90%以上を示したグループが3つ認められた。これら3つのグループは何れも異なった施設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る。

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ことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われる。全ての病原菌の泳動図を行政に還元している富山県をはじめ他の地研では活用例は年間1から3事例であった。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。今後の研究班活動でPFGE精度管理を行う際にはこれら食中毒菌も念頭に置いて実施すべきであると思われる。また、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班活動の精度管理が多少なりとも貢献したものと思われる。特にこれまでの精度管理では腸管出血性大腸菌のみを検体としてきたが、セラチア菌院内感染事例のようなそれ以外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

IS printing systemの検討から、本法はPFGEが同じか非常に類似した集団事例由来株は同一若しくはISパターンのひとつ異なるパターンに分かれたことからその解析力はPFGEと同程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関してはIS printing systemの方がPFGEより優れていることは明らかであった。今後実用化に向けての検

討課題として1) 集団事例発生時にIS printing system ver2のみで報告して良いか。2) PFGEとIS printing system ver2で結果が異なった場合どのように解釈するか。が考えられる。

E. 結論

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(0157:H7、026:H11、0111:HNM)を用いサルモネラマーカー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年度解析を行った17株のうち菌株間の相同性が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株は地理的に離れた東海地方と北陸地方由来株であった。平成20年度は25株について行ったところ平成19年度と同様、類似したバンドパターンを示し菌株間の相同性が90%以上を示したグループが3つ認められた。これら3つのグループにも平成19年度と同様、何れも異なった施設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る。

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 O157 をはじめ O26、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。今後の研究班活動で PFGE 精度管理を行う際にはこれら食中毒菌も念頭に置いて実施すべきであると思われる。また、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班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れ以外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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

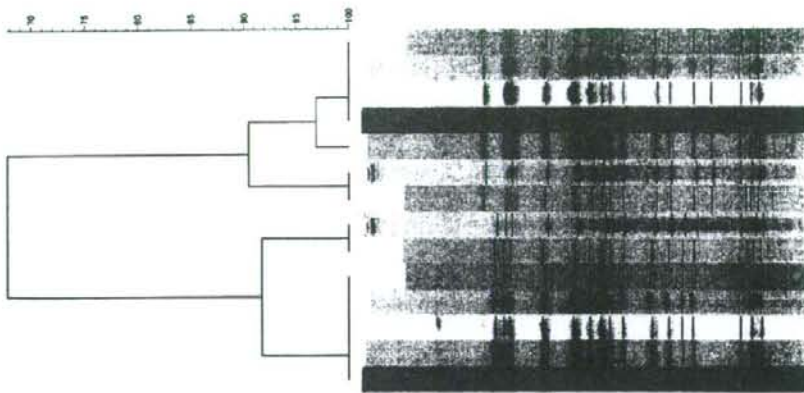
1. Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, Hayashi Y, Nakano M, Fukushima R, Katai A, Tanaka T, Hata M, Matsumoto M, Takahashi M, Sakae K. Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate d in Japan by detecting phage-derived open-reading frames. *J Appl Microbiol.* 2006 101

(4):938-47.

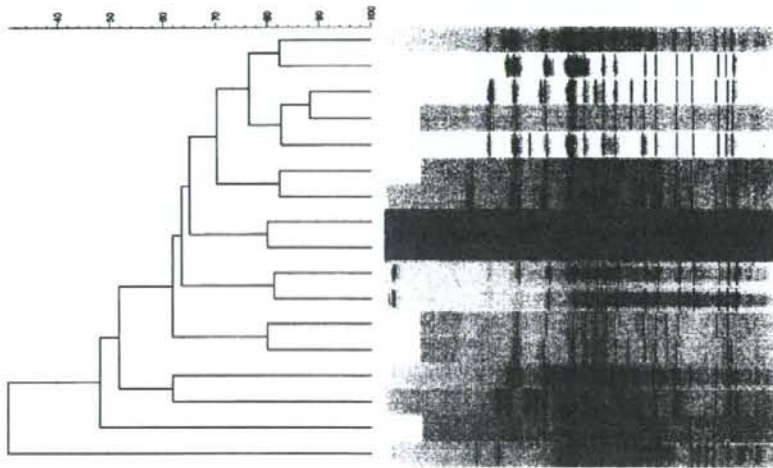
2. Tanaka D, Shima T, Isobe J, Watahiki M, Matsumoto M, Endoh M, Okuno R, Ogata K and Nagai Y. Epidemiology and Molecular Analysis of Group A Streptococci from Patients Involved in Food-Borne Disease Outbreaks in Japan between 1996 and 2003. *Jpn J Infect Dis.* 2006 59(3):202-203.
3. Tatsuno I, Sawai J, Okamoto A, Matsumoto M, Minami M, Isaka M, Ohta M, Hasegawa T. Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains. *Microbiology.* 2007, 153:4253-4260.
4. Matsumoto M, Suzuki M, Takahashi M, Hirose K, Minagawa H, Ohta M. Identification and epidemiological description of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains producing low amounts of Shiga toxin 2 in Aichi Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008, 61:442-445.

学会発表

1. 鈴木匡弘、松本昌門 フェージ由来ORF検出によるMRSAの迅速遺伝子型別分類法の開発とその安定性の検証 第43回日本細菌学会中部支部総会 平成18年10月19、20日 岐阜市
2. 愛知県で検出された腸管出血性大腸菌O157の志賀毒素産生性に関する検討 松本昌門、鈴木匡弘、高橋正夫、皆川洋子、太田美智男 第11回腸管出血性大腸菌シンポジウム安曇野市 2007 8.23.
3. Matsumoto M, Suzuki M, Yamazaki M, Hiramatsu R, Toyama A, Minagawa H, Ohta M. Identification and epidemiological description of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains producing low amounts of Shiga toxin 2 in Aichi Prefecture, Japan 第43回日米コレラ細菌性感染症専門部会 平成20年11月17-19日 福岡市



平成 19 年度精度管理系統樹



平成 19 年度東海・北陸版パルスネット試行系統樹

1 PFGE 解析事例

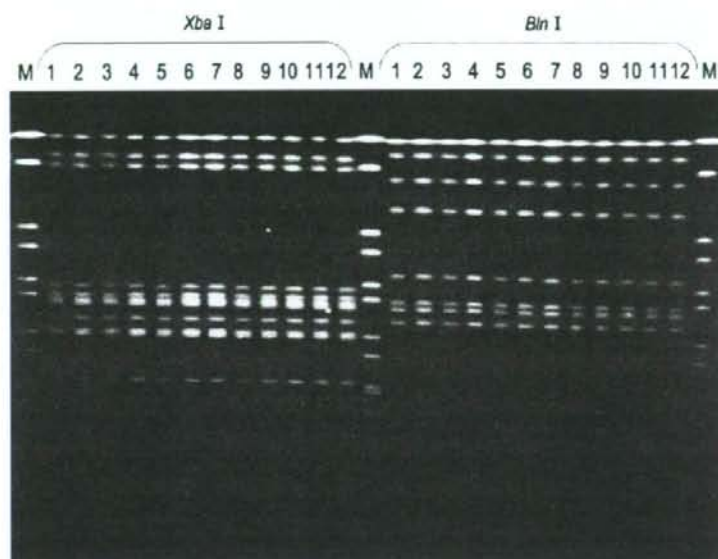
病院給食による Salmonella Enteritidis 食中毒事例

食中毒事例の概要

- ・原因施設：病院の給食施設
- ・摂食者数：677名
- ・患者数：112名
- ・発生期間：H18.11.8～11.13
- ・主な症状：発熱、下痢
- ・推定原因食品：鯖の味噌煮、白菜の五日浸し

PFGE 解析結果

患者6名、給食施設従業員16名、食品2検体から分離された Salmonella Enteritidis 24 株は、制限酵素 Xba I による PFGE のパターンがすべて一致した。また、このうち 12 株について行った制限酵素 Bln I による PFGE のパターンもすべて同一であった（写真は 12 株の制限酵素 Xba I 及び Bln I による PFGE 泳動像）。



レーン

1～3：患者

4～8, 11, 12：従業員

9：食品 鯖の味噌煮

平成 18 年行政還元事例

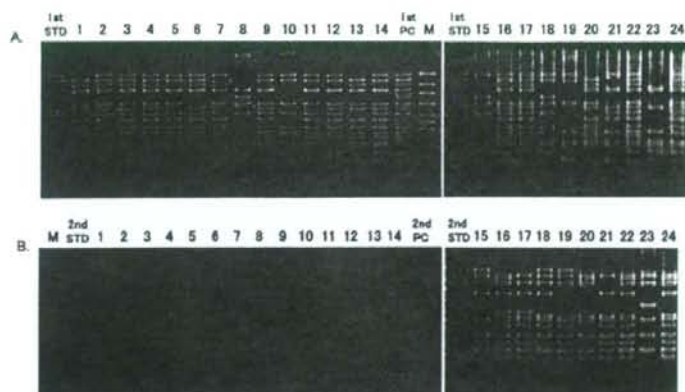


図1. IS-printing SystemによるマルチプレックスPCRの電気泳動像
M:ΦX HincII Marker; lane1～lane24 表1菌株No.と一致。
1st STD, 2nd STD:電気泳動用陽性コントロール, 1st PC, 2nd PC:PCR用陽性コントロール
△: IS-printing System PCRにおけるエキストラバンド

平成 20 年 IS printing System ver2 実施例

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 18～20 年度総合研究報告書（分担研究）

近畿ブロックにおける

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	岩崎由紀、河野智美	滋賀県衛生科学センター
	藤原恵子、野村憲一	京都府保健環境研究所
	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、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、福永真治	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、池端孝清	和歌山市衛生研究所
	田口真澄、坂田淳子	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

細菌性食中毒や感染症発生時に適切な行政対策をとるため、事例間の関連性を明らかにする必要があり、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。腸管出血性大腸菌（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の信頼性を確保するため、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。3 年間で技術的な施設間差はある程度解消され、施設によって画像のコントラストは多少異なるものの、正確なバンド認識の可能な画像が得られ、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、新しく開発された 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。しかし、共通の型別法として利用するためには、正確にバンド増幅を判定できる電気泳動像が必要であった。主要な食中毒原因菌である *Campylobacter jejuni* の PFGE 法について毎年プロトコルを改良して検討したところ、

SmaI と *KpnI* を用いた PFGE パターンは多様であり、集団発生由来株では同一のパターンを示したことから、*C. jejuni* の遺伝子型別法として実用可能であると推察された。しかし、施設間差の解消や標準化のためには、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、菌量やパルスタイムを検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

わが国の食生活を取り巻く環境は著しく変化しており、保存技術や輸送方法の進歩によって食品が広域に流通し、長期間にわたって消費されるようになってきている。このため、病原細菌で汚染された食品を原因とする感染症が地域的、時間的に離れて発生する可能性が高く、事例間の関連性を迅速に見極め、感染の拡大を防ぐことが重要である。特に、EHEC 感染症は患者発生が7月から9月に集中し、2府4県が近接する近畿ブロックでは複数の自治体にまたがって感染者が発生することも多い。事例間の関連性を明らかにするため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、近畿ブロックの11衛生研究所において共通の疫学指標として使用するため、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。また、より迅速な遺伝子解析法として宮崎大学林哲也先生らのグループによって開発された IS-printing System について、実施上の問題点を検討するとともに、その型別能力を PFGE 法と比較、評価した。細菌性食中毒として事例数の多い *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繁に分離される。そこで、EHEC と同様に PFGE 法による遺伝子解析が実施可能であるか検討し、プロトコルの改良を試みた。各自治体で発生した事例についても、PFGE 法を始めとする細菌学的疫学解析を実施し、その結果を原因究明や感染症対策に還元することを目指した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

PFGE の精度管理には、実施年に大阪府で分離された EHEC O157:H7 5 株 (菌株 1~5) を用い、*XbaI* で切断されることを確認の上、11 施設に配布した (表 1)。IS-printing System の検討には、各施設で分離あるいは収集された EHEC O157 で、国立感染症研究所で実施された PFGE Type No. (PFGE 型) の明らかな株を使用した。*C. jejuni* の PFGE は、共通株として 2005 年と 2006 年に大阪府で分離された 2 株 (菌株 6、7) を実施施設に配布し、各施設で分離、保存している菌株を毎年 2~10 株を加えて供試した。

2. PFGE 法

(1) EHEC

平成 15 年度に示された感染研新プロトコルの Proteinase K 処理を 50°C 一夜、制限酵素 *XbaI* 処理を 37°C 2 時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した。サイズマ

ーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba*I 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) *Campylobacter jejuni*

CDC のホームページで公開されている PulseNet USA の方法を、前項の感染研新プロトコールに準じて改変した「*Campylobacter* PFGE Protocol-Kinki」で実施した(表2)。平成18年度は PulseNet USA にしたがって *Sma*I と *Kpn*I では異なるスイッチタイムで泳動したが、平成19年度以降は *Kpn*I を *Sma*I と同じスイッチタイムに変更した。平成20年度は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 *Sma*I の切断に使用するプラグは通常の半分の大きさにする、③Pefabloc 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、サイズマーカーには EHEC と同じく *S.* Braenderup H9812 の *Xba*I 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、平成18年度と19年度は同一ロットの制限酵素(ロッシュ)を使用した。平成20年度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。

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%、シールド感度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%(平成20年度の *C. jejuni* のみ) でデンドログラムを作成した。

4. IS-printing System (IS法)

平成18年度は、IS-printing System Version 1 (東洋紡) を使用し、テンプレートの調製はボイル法で、電気泳動は各施設で Standard DNA のバンドが明瞭に分離される条件で行った。平成19年度以降は、プライマーセットの一部を変更しプライマー以外の反応液を混合した Version 2 のキットで実施した。テンプレートの調整はアルカリ溶解法で行い、陽性対照としてキットに添付の Template Mix を使用した。電気泳動には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、Standard DNA の18本のバンドが明瞭に分離される条件で行った。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。

C. 研究結果

1. EHEC O157 の PFGE 精度管理

毎年11施設からPFGE画像が電送されたが、平成18年度は施設5で菌株2がスミアになり、バンドパターンが得られなかった。また、平成19年度は、施設2の電気泳動像の一部が欠落していたため解析から除外した。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が認識できたが、平成18年度と19年度は画像全体が白っぽくコントラストの弱い画像も見られ、特に平成19年度の施設5は全体的にバンドが不明瞭であった。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ところ、平成18年度はB解析者では菌株ごとにクラスターを作っていたが、A解析者とC解析者では泳動パターンの似たH18-3とH18-5が混在してクラスターを作り、さらにC解析者では他の株のクラスターに入ったり、クラスターを作らない画像がみられた(表3)。平成19年度は、いずれの解析者も施設5の画像で認識バンド数のばらつきが多く、B解析者とC解析者は菌株ごとにクラスターを作ったが、H19-2では施設5の画像を加えると近似度が大幅に低値を示した。A解析者は他の解析者よりも施設5の認識バンド数が少ない傾向があり、特にH19-2、H19-3、H19-5では

他の画像と同一性を評価することができなかった。平成20年度は、画像のコントラストは施設によって多少異なっていたが、サイズの小さいバンドが比較的明瞭に区別できていた。そのデンドログラムは、いずれの解析者でも菌株ごとにクラスターを作り、近似度は91.6-100%と高い値を示した。

2. IS-printing Systemの検討

平成18年度はVersion1のキットを使用し、5施設で75株を型別したが、同一PFGE型を示した株でIS型が一致していたのは26株中8株で、同一施設のPFGE型一致株で異なるIS型に判定されたものもあった。電気泳動像の中には、菌株によって増幅バンドに強弱がみられる、非特異バンドが観察される、バンド間隔が近接するなど判定が困難な画像もみられた。また、セット1にはO157の保有しているインチミン遺伝子*eae*のプライマーが含まれているが、施設によっては陰性と判定された株が多く、PCRの成否に疑問が残った。平成19年度はキットがVersion2に変更され、PCRの陽性対照が添付された。7施設で194株について型別したところ、同一PFGE型を示した35タイプ94株のうち、25タイプ65株はタイプごとにIS型も一致していたが、残りの株はEHECヘモリジン遺伝子が陰性、または大きいサイズのバンドで判定が異なっていた。一方、家族や同行者など同一事例でPFGEパターンが1-7本異なる株でも同じIS型を示していた。電気泳動用に推奨されるアガロースとバッファーを明示したが、施設によっては使用アガロースが異なり、特に大

きいサイズのバンドの判定に施設間差がみられた。このことから、平成 20 年度は分離数の多い施設 X のみで実施し、PFGE 型との整合性を調べた。1 年間に分離された集団発生由来株を含む 127 株が、IS 型で 51 タイプ、PFGE 型で 79 タイプに区別された。集団事例由来株で IS 型の一致しない株（プライマー 1-16 が陰性）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、1-2 本異なる 5 タイプの PFGE 型で同一の IS 型を示した。家族やグループ事例由来株は、IS 型、PFGE 型ともに一致、あるいは PFGE パターンが 1-2 本異なる株でも IS 型は一致し、同一 PFGE 型で IS 型の異なる株はなかった。複数の PFGE 型で IS 型が一致することも多く、施設 X でその類似度を検討した。すなわち、平成 19-20 年度に実施した施設 X の結果（209 株）を集計し、6 事例以上で同一 IS 型を示した株について、PFGE を実施した。IS 型 012057 214443 を示した 7 事例由来 8 株は、2 株ずつ 3 組で 100% 一致し、A3 を除く 7 株で 95.1% の近似度を示した。A3 は、A2 の家族であるが、感染研 PFGE 型でも 7 本異なっていた（表 4、図 1）。O157:HNM 15 株は 6 事例 8 株（●）で IS 型が一致し、1 株（○）は毒素型の異なるためセット 2 の *stx2* が、2 事例 4 株（△）はセット 1 のプライマー 1-16 が陰性と判定されていた（表 5）。15 株のデンドログラムは、由来や IS 型にかかわらず 100% 一致した画像があり、B1、B9、B10 を除く 12 株で近似度 90.5% のクラスターを作った（図 2）。B10 は、他の 7 株と同じ IS 型を示したが、セット 2 のプライマー 2-05 付近に非特異バンドの増幅がみられる

点が異なっており、PFGE パターンも異なっていた。IS 型の大きく異なる B1 と B9 は、他の株との近似度が 80% 以下であった。

3. *C. jejuni* の PFGE 型別法の検討

制限酵素は毎年 *Sma*I と *Kpn*I を使用したが、配布株、各施設株ともに *Sma*I は切断されるバンド数が少なく、*Kpn*I ではバンド数は多いものの、マーカーの Band 10（167.1Kb）以下に集中した。平成 18 年度のスイッチタイムでは *Kpn*I で小さいバンドが近接し、バンド認識の難しい画像もみられた。配布株の近似度は、*Sma*I 切断で 98.2% と 100% であったが、*Kpn*I 切断は 85% 前後であった（表 6）。平成 19 年度は *Kpn*I を *Sma*I と同じスイッチタイムで泳動し、若干サイズの小さいバンド間隔が広がったが、バンドが薄く画像によって認識バンド数や位置にばらつきがみられた。そのため、*Sma*I では配布株の画像が 100% 一致したが、*Kpn*I では 77.5% と 87% にとどまり、改良されたとは言い難い結果であった。平成 20 年度は、サイズの小さいバンドが明瞭になるようプラグ作製時の菌濃度を増し、バンド数の少ない *Sma*I ではプラグサイズを半分にした。また、*Kpn*I では未消化バンドが観察されやすいことから、Pefabloc SC 溶液反応後の洗浄を 2 回に制限酵素反応を一夜に統一した。しかし、サイズの小さいバンドが明瞭になったものの、大きいバンドが過ぎて正確にバンド認識することができず、これまで高い近似度が得られていた配布株の *Sma*I 切断パターンでも 70-80% 台の近似度を示した。トレランス値を 1.2% から 2.0% 変更して

デンドログラムを作成し、*Sma*I、*Kpn*Iともに88.8-94.1%の近似度を得ることができたが、プラグ作製時の菌濃度についてさらに検討が必要である。

各施設株は3年間で73株供試したが、*Sma*Iでは切断されるものの*Kpn*Iでは切断されずバンドパターンの得られない株が1株みられた。平成18年度と平成20年度には*Sma*Iで100%一致した株が2組ずつあり、平成20年度の2組は*Kpn*Iでも100%一致したが、平成18年度の2組は70%程度の近似度であった。

4. PFGE法を用いた事例解析

各自治体で発生した集団感染症や食中毒について、聞き取り調査に加えて分離株の遺伝子解析を実施し、事例間の関連性や原因食品を明らかにした。また、PFGE法の改良にも取り組んだ(表7)。

(1) *Legionella pneumophila*

2006年2月、京都府内にある温泉の利用者が呼吸器不全に陥り、レジオネラ尿中原の検出によりレジオネラ症と診断された。患者の喀痰からは*Legionella pneumophila* 1群が分離され、露天風呂の浴槽水など3検体から*L. pneumophila* 1群が、ヘアーキャッチャーから*L. pneumophila* 型別不能が分離された。*L. pneumophila* 1群の患者由来株と環境由来株について制限酵素 *Sfi*Iを用いたPFGE解析を行った結果、患者株、浴槽水由来株、吐出口由来株は100%一致し、吸込口由来株も近似度約91%を示した。これにより、本事例の感染源は当該施設の露天風呂であることが示唆された。

(2) *Bacillus cereus* (セレウス菌)

2006年4月に飲食店の調整した昼食弁当が原因と疑われるセレウス菌食中毒が発生した。患者の吐物および便からの分離株(2株)と、弁当残品や弁当箱のふきとり、調理施設のふきとりから分離された株(計7株)について*Sma*IによるPFGE解析を行ったところ、9株は同一パターンを示し、比較対照に用いた別事例由来株や収去食品由来株(計11株)とは異なっていた。PFGEによる分子疫学的解析は、セレウス菌食中毒事例においても分離菌株の細菌学的相同性の検討に有用であると認められた。

(3) 下痢原性大腸菌

2006年10月に大阪府内の2つの小学校で修学旅行の旅館が原因と考えられる集団食中毒事例が発生した。両校は一日違いで同じ旅館を利用しており、検便の結果30人から21種類59株の下痢原性大腸菌が分離された。毒素原性大腸菌(ETEC)は血清型や毒素産生性で菌株の異同がある程度区別できたが、腸管凝集接着性大腸菌(EAEC)はO型別不能株が多かったため、生化学的性状試験や薬剤感受性試験に加え、*Xba*Iを用いたPFGEを実施した。両校で最も多い6人ずつから分離されたEAEC OUT:H8が同じパターンを示し、ETECCとともにEAECが原因菌の一つであることを強く示唆する結果が得られた。大腸菌のO血清型はO1~O181までであるが、国産市販血清ではこのうち43タイプしか型別できず、ラフ株が見られることから、型別不能株の異同の判断にPFGEが有用であるといえる。

(4) 腸管出血性大腸菌(EHEC)

2007年8月に大阪市にEHEC感染症の届出のあった3歳女児がA保育園に通っていたことから、同園を調査したところ、8人の園児からEHECが分離された。さらに、A園園児が他の3つの保育施設(B園、C園、B乳児センター)でも保育を受けていたことがわかったため、各園でも調査を実施し、C園園児9人からEHECを分離した。分離株はいずれもO157(VT2産生)で、当初A園からC園に感染が拡大したと考えられたが、PFGE解析の結果、A園園児は同一パターンを示したものの、C園園児は7株が同一パターン、残りの2株はそれぞれ異なるパターンの3タイプに区別され、いずれもA園園児とは異なっていた。PFGE解析によりA園とC園では感染源が異なることが判明し、適切な指導を行うことができた。

また、2008年には大阪府でも保育所で集団感染が発生した。本事例では7月30日に届出のあった1歳女児が保育所へ通所していたことから、園児および職員の検便を実施し、一時保育利用者を含む園児13人、園児の家族2人、職員3人からEHEC O157(VT2産生)を分離した。PFGEおよびIS型別の結果から、分離株は同一起源であり、一日だけ一時保育を利用した園児や、閉園中に菌分離陽性になった園児も含め、保育所内で感染が広がったことが示唆された。

(5) *Shigella sonnei*

2006年10月に、堺市内の同一認可外保育施設に通園している子供3名の細菌性赤痢の発生届が出された。届出患児以外にも発熱・下痢等の症状を呈する園児が数名いることが判明し、検便の結果、13名(園児10

名、保護者3名)から*Shigella sonnei*を分離した。13菌株は、セフトキシムなど6薬剤に耐性を示し、Extended-spectrum β -lactamase産生性であることが判明した。XbaIによるPFGE解析を実施した結果、12株のパターンは100%一致し、1株は2本異なったものの他の株との近似度は97.4%と高く、同一由来菌による集団感染であることが確認できた。

(6) *Salmonella* Enteritidis

2008年8月に奈良県内のグループホームの夏祭りで、提供された飲食物が原因と考えられる集団食中毒事例が発生した。糞便検査の結果、患者および調理従事者のうち4名から*Salmonella* Enteritidis(SE)が分離されたほか、残食のちらし寿司からSEが分離された。これらの菌株について、制限酵素BlnIを用いたPFGEを実施したところ、同じパターンを示し、SEに汚染されたちらし寿司(錦糸卵)が集団食中毒の原因であることを強く裏付ける結果が得られた。

(7) *Salmonella* Montevideo

2007年9月に近畿地区で広域に発生した飲食チェーン店を原因施設とする*Salmonella* Montevideo食中毒事件について、発生原因究明のためPFGE解析を行った。患者および従業員由来株はすべて同一のPFGEパターンを示したが、本事件発生以後にも同一のPFGEパターンを示す菌が散発保菌者から分離されており、保菌者からの2次汚染を防止するためにも、*S. Montevideo*の動向を監視し、汚染源を明らかにする必要があると考えられた。

(8) グラム陰性菌からの非酵素法による

DNA 抽出

PFGE 法の DNA 調製には、通常溶菌酵素やタンパク分解酵素などの酵素類が使われるが、酵素類の代わりに高濃度の尿素を用いて染色体 DNA を抽出する非酵素法の可否を検討した。その結果、本法は大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌及び腸炎ビブリオに適用可能であることが確認された。非酵素法は、proteinase K の不活化操作を省略できる、proteinase K やプロテアーゼインヒビターである PefablocSC といった高価な試薬や複雑な組成のバッファーを必要としないという点で優れていた。

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ある程度解消されてきた。平成 18 年度は精度管理に用いた H18-3 と H18-5 の PFGE パターンが似ていたこともあり、2 名の解析者では混在したクラスターになったほか、別の株のクラスターに含まれたり、クラスターを作らない画像もみられた。平成 19 年度も画像によっては認識バンド数が大きく異なり、近似度が求められない場合もあったが、平成 20 年度は、3 名の解析者がいずれも菌株ごとに近似度 90% 以上を示す良好な結果が得られた。これは、施設によって画像のコントラストは多少異なるものの、サイズの小さいバンドが比較的明瞭に区別できていたためであると考えられた。これまでの研究で、解析者によって大きいサイズのバンドを 1 本あるいは 2 本と異なって認識する傾向がみられたが、画像解析

の結果には大きな影響を与えていなかった。むしろ小さいサイズのバンド認識の違いが近似度を左右しており、今後も 100Kb 以下のバンドまで明瞭に判別できる画像が安定して得られるよう、技術の継承と電気泳動装置や写真撮影装置などの維持管理が必要である。感染症法の改正で EHEC が特定病原体に指定され、菌株の搬送や分譲手続きが煩雑になっていることから、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機会が増えると考えられる。したがって、近畿ブロックでは精度管理を継続することが望ましい。

新しく開発された IS 型別法については、1 年目は 5 施設、2 年目は 7 施設で実施し、実用化に向けての問題点が明らかになった。すなわち、キットの改良により PCR 反応の成否は確認できるようになったが、施設によっては電気泳動像に難点があり、判定に影響を与えていると推察された。特にサイズの大きいバンドで間隔が狭く、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明瞭な電気泳動像が必要であると考えられた。しかし、施設 X での 2 年間にわたる検討の結果、同一 PFGE 型の株は IS 型も一致し、事例内で PFGE パターンが 1-3 本異なる場合でも同じ IS 型を示したことから、同一 PFGE 型で IS 型の異なる株はみられなかったことから、IS 法は遺伝子型別法として有用であると考えられた。全 DNA を比較する PFGE 法に比べ、insertion sequence (IS) の分布に由

来する 32 箇所の領域を調べる IS-printing System では型別能力が低くなり、施設 X でも由来や感染源 PFGE 型の異なる株が同じ IS 型を示した。全例は確認していないが、菌株数の多い IS 型について PFGE 解析を行ったところ、菌株 A1-A8 は 7 株で近似度 95.1%、菌株 B1-B15 は 12 株で近似度 90.5% を示し、多少の例外はあるものの IS 型の一致した株は PFGE パターンも類似することが明らかになった (図 1、図 2)。一方、施設 X の集団事例由来株や O157:HNM の PFGE 解析から、プライマー 1-16 の判定が異なっても PFGE パターンは同一または非常に近縁であり、プライマーによって型別における重要度に差があると推察された。IS 法は PFGE のように特別な装置を必要とせず、迅速性に優れている。また、結果を数値化して簡易にデータベース化できる反面、電気泳動画像の善し悪しが判定結果を左右するため、共通の型別法として利用するために電気泳動条件の標準化が必要である。

C. jejuni の PFGE については毎年プロトコールを改良し、小さいサイズのバンドがある程度明瞭になってきたが、課題も残った。制限酵素の選択やスイッチタイムは、外国との比較を可能にするため PulseNet USA の方法に準じたが、*KpnI* 切断で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に難点があった *SmaI* 切断はバンド数が少ないものの多様な泳動パターンを示した。しかし、少ないバンドを正確な位置で認識することが重要であり、バンドが太すぎる電気泳動画像は不適切であるこ

とが示された。したがって、今後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、菌量やパルスタイムを検討する必要があると考えられた。しかし、各施設で 3 年間に実施した 73 株の泳動パターンは多様であり、集団発生由来株では同一のパターンを示したことから、*C. jejuni* の遺伝子型別法として実用可能であると推察された。

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。これを維持するためには、各施設で技術の継承を図るとともに機器類の保守管理も重要である。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。しかし、正確な結果を得るために、18 本の Standard DNA が十分なバンド間隔で明瞭に区別できる電気泳動画像が必要である。*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、菌量やパルスタイムを検討する必要があるが、遺伝子型別法として利用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G.研究発表

1.誌上发表

- 1) 久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、濱野米一、勢戸和子、山崎 涉、河原隆二、依田知子、石橋正憲、塚本定三、堤 千津、足立和人：学校給食によるカンピロバクター集団食中毒 - 大阪府，病原微生物検出情報，27:172-173, 2006.
- 2) Seto, K., Taguchi, M., Kobayashi, K., Kozaki, S.: Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.*, 69:1215-1222, 2007.
- 3) Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., Tsukamoto, T.: Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.*, 56:1467-1473, 2007.
- 4) Shimosako, J., Onaka, T., Yamanouchi, M., Yokota, M., Nakamura, T., Fujii, F., Matsumoto, E., Shibata, H., Fukuda, M., Tanaka, T.: An Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Shigella sonnei* at a Day Care Nursery in Sakai City, 2006., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:408-409, 2007.
- 5) 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.

- 6) Yamazaki, Y., Seto, K., Taguchi, M., Ishibashi, M., Inoue, K.: Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiology*, 8:94, 2008.

2.学会発表

- 1) 勢戸和子、田口真澄、山崎涉、塚本定三、小林一寛：大阪府における minor serotype STEC の検出状況と分離株の細菌学的特徴, 第10回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2006年8月, 東京)
- 2) 久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、勢戸和子、山崎 涉、河原隆二、塚本定三、堤 千津、足立和人：学校給食によるカンピロバクター集団食中毒, 第27回日本食品微生物学会 (2006年9月, 大阪)
- 3) 福永真治、押部智宏、近平雅嗣、兼子めぐみ、田中哲也、柴折浩幸：兵庫県内の食鳥処理場から分離されたカンピロバクターの分子疫学的解析, 平成18年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会 (2006年9月, 東京)
- 4) 福永真治、押部智宏、近平雅嗣：下痢症患者から分離された変異型 *stx2* 遺伝子保有大腸菌 O128:HNM の性状, 平成18年度日本獣医公衆衛生学会 (近畿) (2006年10月, 大阪)
- 5) 山本京子、河野通大、三谷亜里子、藤原恵子、時武正明、安藤明典、星野桃子、上田郁夫：食鳥処理場由来カンピロバクター属菌の PFGE 遺伝子解析による汚染状況の

- 一考察, 平成18年度日本獣医公衆衛生学会 (近畿) (2006年10月, 大阪)
- 6) 勢戸和子、田口真澄、塚本定三: 大阪府で分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O165 の細菌学的特徴, 第80回日本細菌学会総会 (2007年3月, 大阪)
- 7) 勢戸和子: 多種類の下痢原性大腸菌が検出された集団下痢症事例, 第28回衛生微生物技術協議会 (2007年7月, 岡山)
- 8) 下迫純子, 横田正春, 大中隆史, 田中智之, 柴田仙子: 保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例, 第50回日本感染症学会中日本地方会学術集会 (2007年10月, 神戸)
- 9) 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 EHECのPFGE精度管理供試菌株

実施年度	菌株番号	血清型	毒素型	分離年月	PFGE型
平成18年度	H18-1	O157:H7	VT1, VT2	2006年4月	b23
	H18-2	O157:H7	VT1, VT2	2006年4月	a259
	H18-3	O157:H7	VT1, VT2	2006年7月	b274
	H18-4	O157:H7	VT1, VT2	2006年7月	a458
	H18-5	O157:H7	VT1, VT2	2006年8月	b272
平成19年度	H19-1	O157:H7	VT2	2007年3月	c23
	H19-2	O157:H7	VT2	2007年5月	c47
	H19-3	O157:H7	VT1, VT2	2007年8月	c228
	H19-4	O157:H7	VT1, VT2	2007年8月	c440
	H19-5	O157:H7	VT1, VT2	2007年10月	c704
平成20年度	H20-1	O157:H7	VT1, VT2	2008年7月	d140
	H20-2	O157:H7	VT2	2008年7月	d143
	H20-3	O157:H7	VT1, VT2	2008年7月	d142
	H20-4	O157:H7	VT1, VT2	2008年7月	d141
	H20-5	O157:H7	VT2	2008年8月	c57

表2 *Campylobacter jejuni* の PFGE プロトコール

	平成18年度 <i>Campylobacter</i> PFGE Protocol - Kinki	平成19年度 <i>Campylobacter</i> PFGE Protocol - Kinki ver.2 (下線部は変更点)	平成20年度 <i>Campylobacter</i> PFGE Protocol - Kinki ver.3 (下線部は変更点)
菌の前培養	平板培地	同左	同左
菌液調整	食塩加PBS 500 μ lに菌を懸濁し、2回洗浄後 MacFaland 1~2に調整する	同左	食塩加PBS 500 μ lに菌を懸濁し、1回洗浄後 <u>MacFaland 3</u> 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 μ l +1% agarose 200 μ l	同左	同左
菌体処理	1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl-sarcosine in 0.5M EDTA, pH8.0 1ml 50°C, over night	同左	同左
プラグの洗浄	4mM Pafabloc SC in TE 500 μ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min	同左	4mM Pafabloc SC in TE 500 μ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min, <u>twice</u>
制限酵素前処理	Enzyme buffer for <i>Sma</i> I or <i>Kpn</i> I 200 μ l on ice, 20min	同左	同左
制限酵素処理	40unit/sample enzyme 100 μ l 25°C (<i>Sma</i> I), 37°C (<i>Kpn</i> I) 2h - over night	同左	40unit/sample enzyme 100 μ l 25°C (<i>Sma</i> I), 37°C (<i>Kpn</i> I) <u>over night</u>
電気泳動	<i>Sma</i> I 6V/cm, 6.8 - 35.4s, 18h 14°C, 0.5xTBE <i>Kpn</i> I 6V/cm, 5.2 - 42.34s, 18h 14°C, 0.5xTBE	<i>Sma</i> I, <u><i>Kpn</i> I</u> 6V/cm, 6.8 - 35.4s, 18h 14°C, 0.5xTBE	同左
マーカー	<i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I)	同左	同左

表3 EHEC O157のPFGE画像解析の結果

菌株	解析画像数	解析者	認識バンド数(本) ^{a)}	クラスターを作った画像数	クラスターの近似度(%)	100%一致画像数
H18-1	11	A	<u>18, 19, 20</u>	11	92.5	8
		B	<u>18, 19, 20</u>	11	93.5	6
		C	<u>18, 19</u>	10 ^{b)}	94.0	8
H18-2	10	A	<u>19, 20, 21</u>	10	97.1	7, 2
		B	<u>19, 20</u>	10	97.4	8, 2
		C	<u>17, 19, 20</u>	11 ^{b)}	94.1	5, 3
H18-3	11	A	<u>16, 17, 18</u>	22 ^{c)}	89.4	8
		B	<u>17, 18</u>	11	97.2	10
		C	<u>14, 16, 17, 18</u>	21 ^{c), d)}	95.1	8
H18-4	11	A	<u>18, 19</u>	11	97.3	9, 2
		B	<u>16, 18</u>	11	94.1	10
		C	<u>18</u>	11	100	11
H18-5	11	A	<u>16, 18, 20</u>	22 ^{c)}	89.4	8
		B	<u>18</u>	11	100	11
		C	<u>17, 18</u>	21 ^{c)}	95.1	10
H19-1	10	A	<u>12, 18, 19</u>	9 ^{e)}	94.0	5, 2
		B	<u>18, 19</u>	10	90.0	6
		C	<u>16, 18, 19</u>	10	90.5	3
H19-2	10	A	<u>9, 21, 22</u>	9 ^{c)}	97.0	7
		B	<u>16, 22</u>	9 ^{e)}	99.5	8
		C	<u>17, 20, 21, 22</u>	9 ^{c)}	95.0	6, 2
H19-3	10	A	<u>15, 19, 20</u>	9 ^{e)}	97.5	7
		B	<u>19, 20</u>	10	94.5	8
		C	<u>18, 19, 20</u>	10	96.0	6, 2
H19-4	10	A	<u>17, 19, 20, 21, 22</u>	10	90.0	4, 2
		B	<u>19, 20, 21</u>	10	94.0	5, 4
		C	<u>18, 19, 20, 21</u>	10	95.0	4, 2
H19-5	10	A	<u>17, 18, 19</u>	9 ^{e)}	97.0	7
		B	<u>18, 19</u>	10	93.5	9
		C	<u>17, 18, 19</u>	10	95.5	6, 2, 2
H20-1	11	A	<u>19, 20</u>	11	97.4	10
		B	<u>19, 20</u>	11	97.4	9
		C	<u>18, 19, 20</u>	11	96.8	8
H20-2	11	A	<u>18</u>	11	100.0	11
		B	<u>18</u>	11	98.9	10
		C	<u>17, 18, 19</u>	11	96.0	6, 2
H20-3	11	A	<u>20, 21, 22</u>	11	95.7	5, 2, 2
		B	<u>20, 21, 22</u>	11	96.0	4, 2, 2, 2
		C	<u>20, 21, 22</u>	11	96.7	5, 2, 2
H20-4	11	A	<u>19, 20, 21, 22</u>	11	96.7	5, 4
		B	<u>20, 21</u>	11	93.0	6, 3
		C	<u>19, 20, 21</u>	11	96.4	8
H20-5	11	A	<u>20, 21, 23</u>	11	92.1	3, 3
		B	<u>20, 21, 22, 23, 24</u>	11	93.6	2, 2, 2, 2
		C	<u>19, 20, 21, 22, 23</u>	11	91.6	5, 2

a) 下線は該当する画像が最も多かったバンド数

b) 1画像はH18-2のクラスターに含まれた

c) H18-3とH18-5でクラスターを作った

d) 認識バンド数14本の画像はクラスターを作らなかった

e) 施設5の画像はクラスターが大きく離れていた

表4 IS型 012057 214443 を示した EHEC O157 の由来と感染研 PFGE 型

菌株番号	事例	性別	年齢	分離年月	血清型	毒素型	PFGE型
A1	散発	F	13	Jun.07	O157:H7	2	b519
A2	家族a	M	23	Aug.07	O157:H7	2	c253
A3	家族a	F	27	Aug.07	O157:H7	2	c251 ^{a)}
A4	散発	M	24	May.08	O157:H7	2	c654
A5	散発	M	31	Jul.08	O157:H7	2	c614
A6	グループb	F	5	Jul.08	O157:H7	2	d143
A7	散発	M	21	Aug.08	O157:H7	2	d258
A8	散発	F	53	Sep.08	O157:H7	2	d370

a) c253と7本異なる

表5 類似した IS 型を示した EHEC O157:HNM の由来と感染研 PFGE 型

菌株番号	事例番号	性別	年齢	分離年月	血清型	毒素型	IS型	PFGE型
B1	散発	F	43	Jun.07	O157:HNM	1+2	315555 311407	c114
B2	家族c	F	32	Aug.07	O157:HNM	1+2	△ 215455 311656	c225
B3	家族c	M	10	Aug.07	O157:HNM	1+2	△ 215455 311656	c226 ^{a)}
B4	家族c	M	31	Aug.07	O157:HNM	1+2	△ 215455 311656	c246 ^{b)}
B5	家族d	F	13	Sep.07	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	c436
B6	家族e	F	6	Oct.07	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	c696
B7	家族e	F	7	Oct.07	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	c619 ^{c)}
B8	散発	M	62	Oct.07	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	c697
B9	散発	M	19	Jan.08	O157:HNM	1+2	311057 310457	d9
B10	散発	M	28	May.08	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	d65
B11	散発	M	60	Jun.08	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	c697
B12	家族f	M	5	Jun.08	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	d66
B13	家族f	F	14	Jun.08	O157:HNM	1+2	● 215457 311656	d67 ^{d)}
B14	散発	F	53	Jul.08	O157:HNM	1	○ 215457 311654	d135
B15	散発	M	75	Sep.08	O157:HNM	1+2	△ 215455 311656	d494

a) c225と3本異なる

b) c225と1本異なる

c) c696と1本異なる

d) d66と1本異なる