

表6 *Campylobacter jejuni* の PFGE 画像解析の結果

制限酵素	菌株 番号	実施 年度	解析 画像数	認識 バンド数 (本)	トレランス1.2%		トレランス2.0%	
					100%一致 画像数 ^{a)}	近似度 (%)	100%一致 画像数	近似度 (%)
<i>Sma</i> I	6	18	8	9	5 (9), 3 (9)	98.2		
		19	7	9	7 (9)	100		
		20	7	9	6 (9)	84.7	7 (9)	94.1
	7	18	8	8	8	100		
		19	7	8	7 (8)	100		
		20	7	7, 8	3 (8), 2 (7)	73.7	4 (8), 3 (7)	93.3
<i>Kpn</i> I ^{b)}	6	18	7	12, 13, 14, 15	2 (13)	85.7		
		19	6	12, 13, 14	2 (13)	77.5		
		20	7	13, 14, 15	2 (13)	73.9	2 (13), 2 (14)	92.0
	7	18	7	10, 11, 12, 14	2 (14)	84.2		
		19	6	10, 12, 13, 14	2 (12)	87.0		
		20	7	11, 12, 14	2 (12), 2 (14)	79.3	2 (12), 3 (14)	88.8

a) カッコ内は認識バンド数

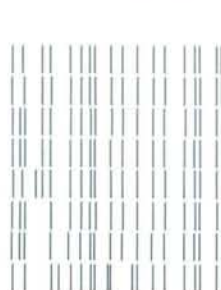
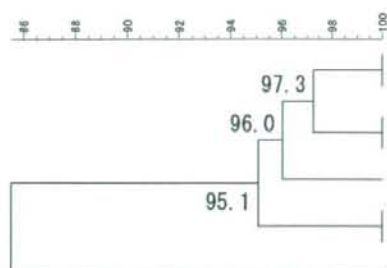
b) 18年度のスイッチタイムは他と異なる

表7 近畿ブロックにおける PFGE 解析事例と PFGE 法の検討報告

報告年度	No.	タイトル	報告機関	報告者
18年度	1	レジオネラ症患者発生に伴うレジオネラ属菌のPFGE解析	京都府保健環境研究所	藤原恵子、江崎久雄、森垣忠啓
	2	堺市におけるセレウス菌食中毒事例分離菌株の嘔吐毒産生性及びそれらの分子疫学的解析の検討	堺市衛生研究所	横田正春、大中隆史、山内昌弘、内野清子、下迫純子、中村武、田中智之
	3	下痢原性大腸菌の混合感染による修学旅行食中毒事例	大阪府立公衆衛生研究所	勢戸和子、田口真澄、山崎渉、塚本定三
19年度	4	複数保育施設での腸管出血性大腸菌O157集団発生事例	大阪市立環境科学研究所	小笠原準、長谷篤
	5	認可外保育施設におけるESBL産生細菌性赤痢の集団発生事例	堺市衛生研究所	下迫純子、山内昌弘、横田正春、大中隆史、田中智之
	6	グラム陰性菌からの非酵素法によるDNA抽出	兵庫県立健康環境科学研究センター	西海弘城
20年度	7	サルモネラ・エンテリティディスによる食中毒事例(奈良県)	奈良県保健環境研究センター	榮井毅、田邊純子、橋田みさを、大前壽子
	8	飲食チェーン店で発生した <i>Salmonella</i> Montevideo食中毒事件	大阪府立公衆衛生研究所	田口真澄、井上清、勢戸和子
	9	保育所における腸管出血性大腸菌O157集団感染事例	大阪府立公衆衛生研究所	勢戸和子、田口真澄、原田哲也

Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
GSD06

GSD06

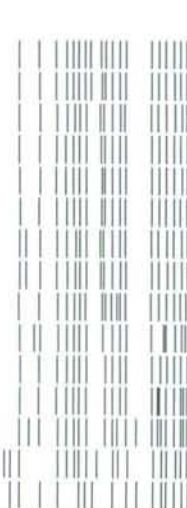
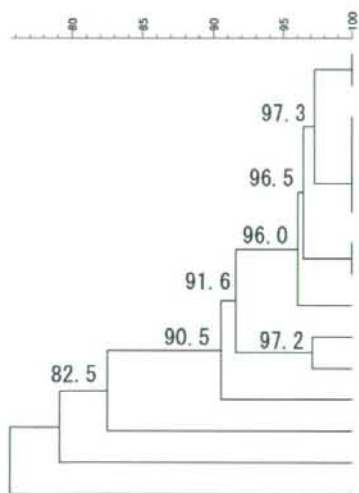


菌株	分離年月
A5	Jul. 08
A8	Sep. 08
A1	Jun. 07
A4	May. 07
A7	Aug. 08
A2	Aug. 07 家族 a
A6	Jul. 08
A3	Aug. 07 家族 a

図1 IS型 012057 214443 を示した EHEC O157 のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
GSD06

GSD06



菌株	分離年月	家族
● B12	Jun. 08	家族 f
● B13	Jun. 08	家族 f
△ B3	Aug. 07	家族 c
● B6	Oct. 07	家族 e
● B7	Oct. 07	家族 e
○ B14	Jul. 08	
△ B2	Aug. 07	家族 c
△ B4	Aug. 07	家族 c
△ B15	Sep. 08	
● B5	Sep. 07	家族 d
● B8	Oct. 07	
● B11	Jun. 08	
● B10	May. 08	
B9	Jan. 08	
B1	Jun. 07	

● : IS型 215457 311656
○ : IS型 215457 311654
△ : IS型 215455 311656

図2 類似した IS 型を示した EHEC O157:HNM のデンドログラム

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 年度～平成 20 年度総合研究報告書(分担報告)
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 中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者 上田 豊	鳥取県衛生環境研究所
黒崎守人	島根県保健環境科学研究所
竹田義弘 大原祥子 榊 美代子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
蔵田和正 石村勝之 伊藤文明 笠間良雄	広島市衛生研究所
富永 潔	山口県環境保健センター
宇佐美 実 澤田千恵子 下野生世	徳島県保健環境センター
久保由美子 砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
青木紀子 吉田紀実 田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
平松佐穂 松本紀子 絹田美苗 谷脇 妙	高知県衛生研究所
大島律子	岡山県環境保健センター

研究要旨

平成 18 年度から 20 年度に中四国地域で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株を用いてパルスフィールド電気泳動法と IS printing system を比較し、菌の遺伝子による疫学解析ツールとして両法の評価を行った。各県で分離された菌株間および中四国地域で分離された菌株相互の遺伝子解析を実施した結果、総合的な解析能力はパルスフィールド電気泳動法が IS-printing system より高かった。IS-printing system は迅速性・簡便性などの点から感染事例発生初期にスクリーニング的な使用が効果的で、両法は目的に応じた選択使用が有効であると思われた。

平成 18 年度と 20 年度に中四国地域で実施したパルスフィールドゲル電気泳動法による精度管理は、全体的には良好な結果が得られた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌(以下 EHEC) 感染症の発生は、今日では全国的に拡大し恒常化している。また、物流の発達により離れた地域で発生する diffuse outbreak の発生頻度も増え、遠隔地域で分離された菌株相互の関連性の解析には、遺伝子解析手法を用

いた疫学解析が有効である。従来から疫学解析に用いられているパルスフィールドゲル電気泳動法(以下 PFGE 法)は、検査法がやや煩雑で結果が出るまでに時間が掛かり、さらに技術の熟練を必用とする。これに対し、宮崎大学の林らが開発した IS-printing System は、PCR 法に基づく簡便・迅速な遺

伝子解析法である。本研究班では、平成18年度より IS-printing System を用いて検査を行い、泳動条件などの改良や PFGE 法、MLVA 法の結果と比較して疫学解析法としての有用性を検討した。また、中四国ブロックにおける PFGE 解析技術の確認と維持向上のため、PFGE の精度管理を実施した。

B. 研究方法

(1) 材料

平成18年度～平成20年度にかけて中四国地域の各県で分離された EHEC O157 株を用いて、IS-printing System、PFGE 法および MLVA 法により菌株相互の遺伝子解析を行った。また、EHEC 株を用いて、中四国地域の各施設の PFGE 法による精度管理を実施した。

(2) 方法

IS-printing System は、TOYOBO 製のキット (Version 2) を用い、取扱説明書に従って実施した。その後最適な泳動像を得るための条件について、検討を行った。検査結果は、バンドが検出された場合を「1」、検出されなかった場合は「0」と表記した。さらに各プライマーセット毎にスタンダードのテンプレートで増幅されるバンドの分子量の大きい物から3つずつに区切り、それぞれについて順に1, 2, 4ポイントを与え、検出されたバンドのポイントを足した数字を Api の同定コードに準じてコード化して表記した (表1)。PFGE 法は感染研ニュープロトコール (集菌はプレート法により行った。詳細は平成18年度の本報告書に準じた) に従って実施し、泳動像を画像解析ソフト (Fingerprinting II、Bio-Rad) で解析した。MLVA 法は広島市衛生研

究所において実施した (詳細は平成20年度分担研究報告書を参照)。

PFGE 法の精度管理については、平成18年度は愛媛県立衛生環境研究所から PFGE 泳動画像を参加6施設に電子メールで配付し、画像解析ソフトで解析した結果を比較した。平成20年度は岡山県環境保健センターから EHEC 菌株5株を8施設に配付し、PFGE 実施後の泳動像と画像解析結果を電子メールで当センターに返信してもらい、すべての施設の結果を再度クラスター解析し、比較検討した。

C. 研究結果

平成18年度～平成20年度に中四国地域の各県で分離された EHEC 株を用いて IS-printing System を実施した。泳動槽は通常どこの施設でも保有しているミュービッドを使用し、キットの取扱説明書に従って添付されている6X Loading Dyeを指定された位置まで泳動した。その結果、この条件では泳動時間が短いため、検出されたバンドの間隔が狭く判別が困難な状況であった。そこで泳動時間を更に延長して検出バンドがゲルー杯に展開するまで泳動したが、この場合添付の Loading Dye が泳動延長の早期にゲルから出てしまい、泳動の指標にならなかった。このためこれに代えて市販のキシレンシアノールと BPB を含む Loading buffer を用いた結果、泳動時間を延長した場合でも、キシレンシアノールがゲル内に止まり泳動状況の良い指標となった。泳動時間は、1st set primer の PCR 産物がミュービッドでは80分間、ミュービッドよりゲルが長い Pico-2 は120分間、2nd set primer の場合は、ミュービッドで80分間、Pico-2 は135分

間行った結果、良好な結果を得た(図 1~4)。

IS-printing System の結果は、各年度の分担研究報告書でも示したように、疫学的に関連のある同一家族由来株は同一のコードパターンを示し、疫学情報と良く一致していた。PFGE 法は、同じ IS-printing System コードパターンを示したグループの株を、更に詳細に区別することが多かった(表 2)。しかし、同一家族から分離された株間で PFGE 型が異なることがあり、この場合は PFGE 型のみではそれらの関連性が判断できない。IS-printing System コードパターンの情報があれば、より正確な判断が可能になると考える。一方、同じ PFGE 型のグループの株が異なった IS-printing System コードパターンを示す場合も見られ(表 3)、全てにおいて PFGE 法が IS-printing System より詳細な解析が可能とは言えなかったが、概ね PFGE 型別の解析能力が高かった。

中四国地域の各施設で実施した PFGE 法による精度管理は、送信された同一の泳動画像を用いた解析(平成 18 年度)では施設により画像認識に差が見られ、クラスター解析でデンドログラムの形がやや異なる場合が見られた。送付した同一の菌株を使用して PFGE を実施し、得られた画像について解析を行った場合(平成 20 年度)も、各施設でクラスター解析を行うと画像認識に差が見られたが、各施設の泳動像をまとめて一人が解析した場合には、概ね良好な結果が得られた(図 5、6 および 7)。

D. 考察

PFGE 法は遺伝子解析による疫学解析

において有用な検査法として日常的に実施されている。しかし、本検査法は検査技術の習熟の程度により、結果に大きな影響が出る。また、検査に日にちが掛かり特別な機器を必要とするため、実施可能な施設が制限される。平成 18 年度から 20 年度にわたり本研究班で検討してきた IS-printing System は、PCR に基づいた遺伝子解析法であるため、より多くの検査施設で実施可能であり、簡易にしかも迅速な結果が得られる検査法として有用である事が確認された。解析能力は PFGE 法が IS-printing System に比べより詳細な識別が可能であったが、一方では同一家族由来株の IS-printing System コードパターンが同じ株間で、ヒトからヒトへの感染の間に発生したと考えられる変異により、PFGE 型が異なることがある。この場合は PFGE 法では泳動パターンを見ない限り、株間の類似性は判断できない。逆に PFGE 型が同一の株間で IS-printing System コードパターンが異なるケースでは、類似性は判断可能と思われる。これらのことから、両法は目的に応じて使用することで、最も有効な疫学解析手段になり得ると考える。本研究班に参加して検討した施設は地方衛生研究所であり、ほとんどの施設が PFGE の機器を保有し、最終的にはより詳細な解析能力がある PFGE 法を実施している。このため、日常業務での本キットの使用頻度はかなり少ないと思われるが、PFGE の機器を持たない保健所検査課などでは、本キットはかなり有用な疫学解析ツールになるものと考えられる。特に、迅速・簡便性を生かして EHEC O157 感染事例発生初期にスクリーニング的に使用することで、感染拡大防止や感染源究明のための行政対策上、有効な手段になるものと

思われる。ただ本キットの製造が平成 21 年に中止されることが決定されており、継続して使用するために必要な体制の整備が望まれる。

一方、PFGE 法による解析を頻繁に行う機会がある地方衛生研究所では、PFGE 法の精度管理は業務上重要であり、正確で安定した結果が求められる。送信した同一画像のクラスター解析では施設間に多少の差が見られ、検査者による画像認識の差が結果に影響したものと思われた。送付した同一菌株を用いて PFGE 法を実施した結果は、各施設によりバンドの有無や強弱に差があり、これが異なった画像認識に繋がるものと思われた。しかし、全ての施設の画像を一人がクラスター解析した場合は、概ね良好な結果が得られた。このことから、他施設との PFGE 法のデータのやり取りは、画像データについて行うべきであり、菌株相互の類似性の判定はクラスター解析結果のみに頼らず、全体的な泳動パターンの類似性を考慮して比較することが重要と考える。

E. 結論

疫学指標としてより詳細なデータを提供できる PFGE 法に比べて簡便・迅速な IS-printing System は、事例発生初期にス

クリーニング的に使用することが有用と思われる。行政的な早期対応が可能になると考える。また、PCR 法に基づいた IS-printing System は、特に PFGE の機器を持たない検査施設では、強力な疫学解析法として役立つものと思われた。一方、衛生研究所において PFGE 法による疫学解析は重要な業務であり、正確で安定した結果を提供できる技術を維持するため、今後も精度管理は必要と考える。

F. 研究発表

1. 大島律子、狩屋英明、中嶋 洋
新旧のバルスフィールド電気泳動装置による画像の比較検討
岡山県環境保健センター年報, 30, 99-100, 2006.
2. 中嶋 洋、大島律子、狩屋英明
Salmonella enterica serovar. Oranienburg による希な食中毒集団発生事例と分離菌の細菌学的検討
感染症学雑誌, 81, 242-248, 2007.

表1 IS printing systemによる増幅バンドサイズとコード化のためのポイント

1st set 結果

菌株No.		コード化のための point
PFGE型		
Primer No	Size (bp)	
1-01	974	1
1-02	839	2
1-03	742	4
1-04	645	1
1-05	595	2
1-06	561	4
1-07	495	1
1-08	442	2
1-09	405	4
1-10	353	1
1-11	325	2
1-12	300	4
1-13	269	1
1-14	241	2
1-15	211	4
eae	185	1
1-16	171	2
hlyA	137	4

2nd set 結果

菌株No.		コード化のための point
PFGE型		
Primer No	Size (bp)	
2-01	987	1
2-02	861	2
2-03	801	4
2-04	710	1
2-05	642	2
2-06	599	4
2-07	555	1
2-08	499	2
2-09	449	4
2-10	394	1
2-11	358	2
2-12	331	4
2-13	301	1
2-14	278	2
2-15	240	4
2-16	211	1
stx2	181	2
stx1	151	4

(1st set primer)

STD 1349 1350 1351 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 PTC



図1 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [ミュールビッド 80分間泳動]

(1st set primer)

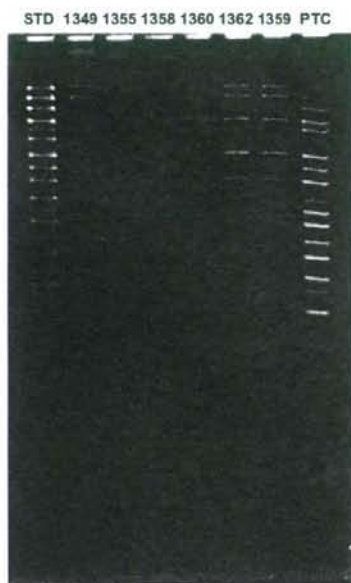


図2 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [TAITEC Pico-2 120分間泳動]

(2nd set primer)

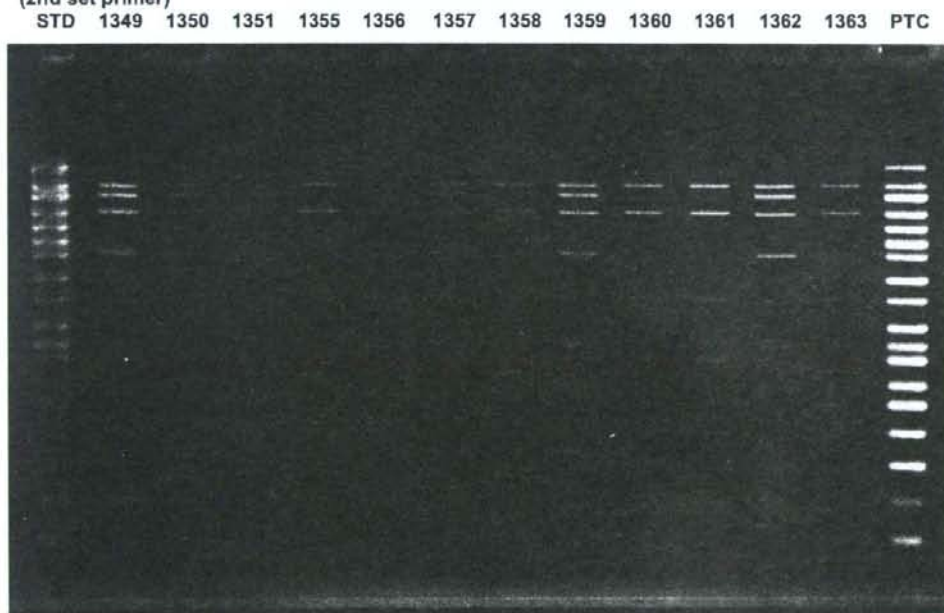


図3 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [ミューピッド 80分間泳動]

(2nd set primer)

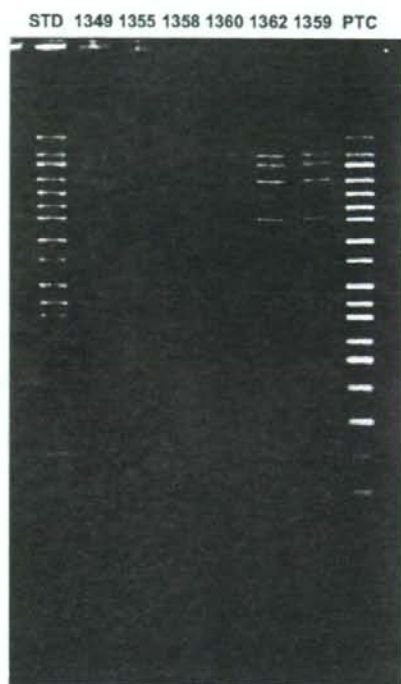


図4 岡山市で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [TAITEC Pico-2 135分間泳動]

表2 同一IS printing system コードパターンに対するPFGE型のバリエーション

IS コード		PFGE型	県名・No	バリエーション数	IS コード		PFGE型	県名・No	バリエーション数							
1st set	2nd set				1st set	2nd set										
012057	214443	d412	岡山2	2	317577	611756	d148	愛媛21	2							
		d413	岡山3				d148	愛媛22								
		d411	岡山4				d148	徳島2								
		d516	広島市11				d17	愛媛1								
		b858	山口2				d17	愛媛10								
b423	山口29	d17	愛媛2													
114057	303443	d179	山口14	2		317577	611757	d17		愛媛3	2					
		d180	山口15					d17		愛媛4						
a180	山口24	d17	愛媛5													
a206	広島市2	d17	愛媛6													
a206	広島市3	d17	愛媛8													
117177	601747	a206	広島市4	2	317577		650757	c283	香川15	2						
		a206	広島市5					d154	広島市13							
		d77	広島市6					d623	広島市14							
		d77	広島市7					a259	島根3							
		a206	広島市8					d174	山口5							
		a206	広島市9			d175	山口12									
213577	610644	a206	広島市10	2		317577	610646	a289	島根1		2					
		e004	島根2					a289	島根4							
a259	島根5	d173	山口4													
305057	311457	d277	愛媛17	2				317577	611653			d76	岡山5	2		
		d278	愛媛18		d418					岡山6						
305457	611642	d70	愛媛24	2	317577		611657			d526		広島市15	2			
		b47	岡山1							d169		山口3				
c47	徳島4	d170	山口8													
305555	711413	d246	島根6	2					317577	611657		d02			山口10	2
		d247	島根7									d200			山口23	
		d248	島根8			d28	山口26									
317575	611757	d359	香川16	2		317577	611757				d690	山口30			2	
		d136	香川17								d210	広島県4				
d136	香川18	e210	広島県5													
317577	611756	d73	愛媛12	2				317577		611859	e210	広島県6		2		
		d73	愛媛13		e210						広島県7					
		d73	愛媛14		a210		広島県8									
		d148	愛媛20		c816		広島県9									

表3 同一PFGE型に対するIS printing system コードパターンのバリエーション

PFGE型	IS コード		県名・No	バリエーション数
	1st set	2nd set		
a206	117177	601747	広島市2	
	117177	601747	広島市3	
	117177	601747	広島市4	
	117177	601747	広島市5	
	117177	601747	広島市8	
	117177	601747	広島市9	
	117177	601747	広島市10	
	119199	801949	広島県11	
a259	213577	610644	島根5	
	613575	610646	島根3	
	613577	610646	島根1	
	613577	610646	島根4	
	815599	810848	広島県1	
	815599	810848	広島県2	
c304	317557	611653	山口22	
	317557	650653	広島市12	
d17	315577	611757	愛媛9	
	317577	611755	愛媛7	
	317577	611757	愛媛1	
	317577	611757	愛媛10	
	317577	611757	愛媛2	
	317577	611757	愛媛3	
	317577	611757	愛媛4	
	317577	611757	愛媛5	
	317577	611757	愛媛6	
	317577	611757	愛媛8	
d28	717557	611655	山口19	
	717557	611857	山口26	
d76	517557	611653	広島市1	
	717557	611653	岡山5	
	919559	811855	広島県13	

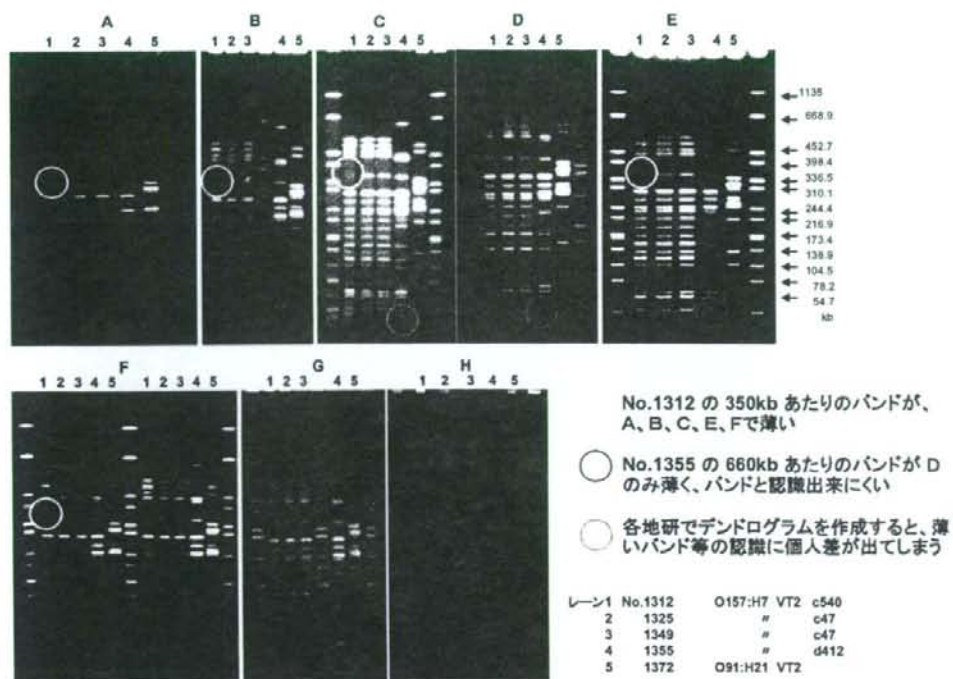


図5 2008 パルスネット中四国ブロック精度管理画像

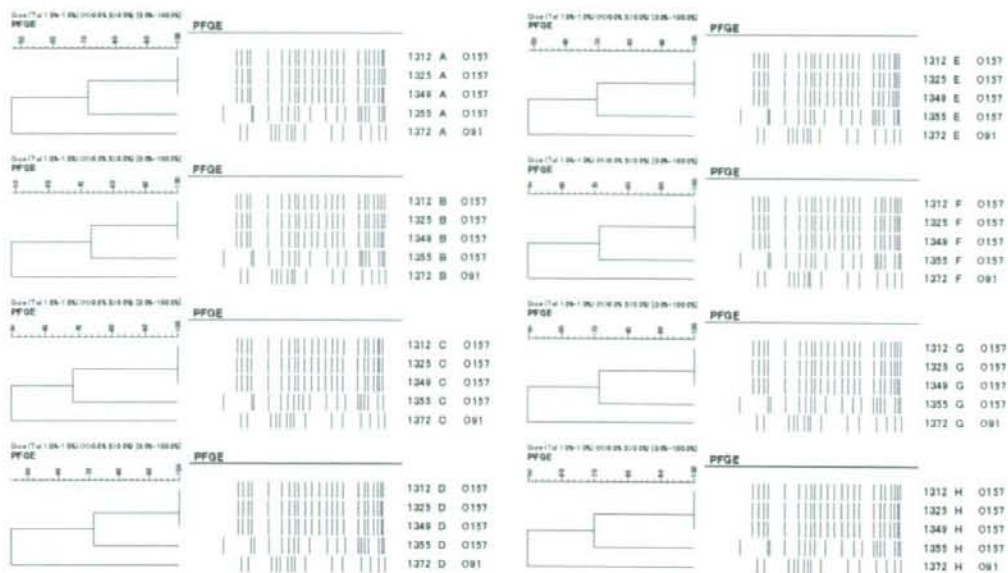


図6 各機関のPFGEによる系統樹

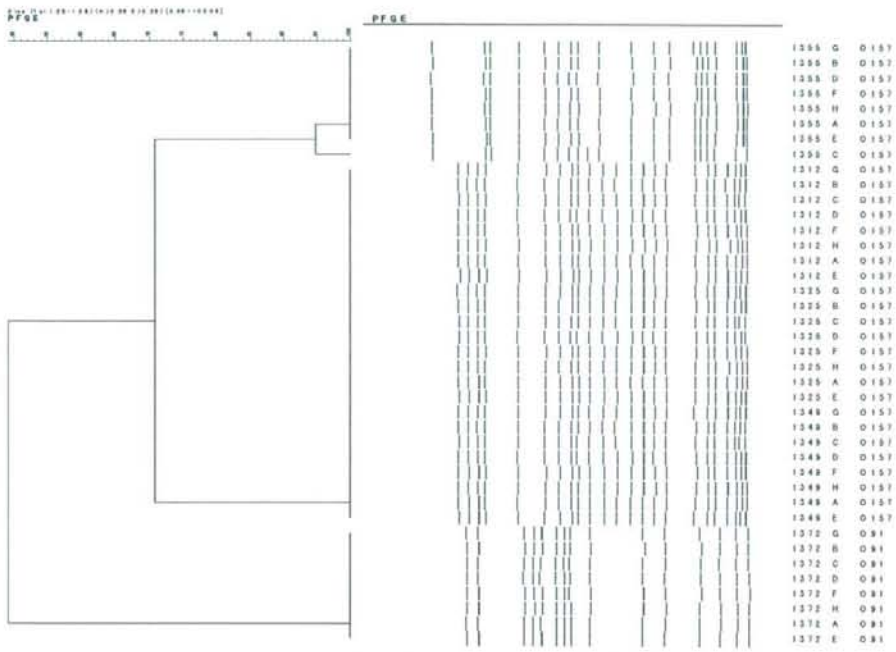


図7 全機関のPFGEによる系統樹

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み

研究代表者 寺嶋 淳 (感染症研究所・細菌第一部)
研究分担者 堀川 和美 (福岡県保健環境研究所)

研究協力者	尾崎延芳、瓜生佳世	福岡市保健環境研究所
	村瀬浩太郎、徳崎里美	北九州市環境科学研究所
	西 桂子、眞子純孝	佐賀県衛生薬業センター
	右田雄二、山崎省吾	長崎県環境保健研究センター
	江原裕子、植木信介	長崎市保健環境試験所
	松本一俊、八尋俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	岩永貴代、峯真由美、杉谷和加奈	熊本市環境総合研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	上野伸広	鹿児島県環境保健センター
	久高潤	沖縄県衛生環境研究所
	大岡 唯祐 ¹ 、林 哲也 ^{1,2}	宮崎大学・ ¹ 医学部、 ² フロンティア
	楠本 正博	動物衛生研究所・安全性研究チーム
	江藤良樹、中村祥子、小野塚大介、	福岡県保健環境研究所
	野田多美枝、濱崎光宏、	
	村上光一、竹中重幸	

研究要旨 九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組みに向けた基礎的研究について、九州地区 12 地方衛生研究所の参加により平成 18 年、19 年、20 年の 3 カ年間実施した。本研究では、1) IS-printing System に関する基礎的研究、2) PFGE が実施可能な状態にある菌種を増やすために方法論等について検討すること 3) 食中毒および感染性胃腸炎事例について検討すること 及び 4) 新規遺伝子解析法の導入検討 について実施した。

各課題、3 年間で得られた成果は次のとおりである。1) IS-printing System の基礎的実験及び PFGE との比較検討実験を行い、IS-printing System は新規遺伝子解析法として有用であり、行政現場に迅速に科学根拠として細菌学的疫学データを還元し得る解析法であることが判明した。2) *Campylobacter jejuni* および *Legionella* 属菌についての PFGE 方法等について検討し、マニュアルを作成し緊急時に対応可能な状態にした。3) 各機関で原因究明がなされた食中毒および感染症 9 事例について詳細な情報を提供した。4) IS-printing System、*Legionella pneumophila* の SBT および下痢原性大腸菌の遺伝子解析法について研修会を行い、行政検査に新規遺伝子検査法導入および整備に貢献した。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段である。しかし、異なるゲルで泳動された DNA パターンを比較するには、「安定した PFGE マーカーの供給、良好な泳動及び画像の保存」などが必須である。また、PFGE は解析結果を得るまでに最短 3 日以上を要し、迅速性に欠ける。これらの理由から PFGE 実施前にスクリーニングとして使用可能な細菌学的疫学情報が望まれている。これらのニーズに応えるべく宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157 株のゲノム構造多型を有効に利用し、デジタル化可能な検査結果を得ることの出来る菌株識別システムが開発された。本システムの実用化のため、九州地区 12 地方衛生研究所(地研)で試験運用による改良への情報提供及び検証を行った。また、病原体の解析方法の改良及びマニュアル化を行うとともに実際に発生した事例について細菌学的データを疫学的に解析した。さらに、広域における食品由来感染症等について迅速に探知するために、将来的に導入・整備すべき新規遺伝子解析法について研鑽することを目的とした。

B. 研究方法

1. IS-printing System に関する基礎的研究

(1) IS-printing System PCR 条件検討

[平成 18 年度]

研修会を行ったのち、IS-printing System に用いる PCR 条件を検討するため、全バンドが検出できる 1st set および 2nd set 用 template mix を用いて、DNA 濃度、DNA ポリメラーゼ量及び PCR サイクル数について、計 12 条件について検討した(表 1)。

次いで、DNA の抽出方法、濃度及び DNA が

リメラーゼ量について検討した。検討条件は、計 12 とおりであり、要約を表 2 に示した。

(2) IS-printing System の有用性についての検討

平成 18 から 20 年度、各地研での保有株を用い、IS-printing System の有用性について検討した。PCR 条件は、本研究での結果を基に設定した。解析には、解析ソフト Stata を用いた。また、近似度の計算は Matching 法を用いた。

2. PFGE 対応菌種の拡大

(1) レジオネラ属菌の PFGE の精度管理、および九州各機関で検出された *Legionella pneumophila* serogroup 1 の PFGE による比較解析

PFGE の精度管理: 精度管理用菌株は、国立感染症研究所(感染研)から分与されたレジオネラ属菌標準菌株 3 株を使用した。PFGE の方法は、感染研のプロトコールを一部変更して実施した。

L. pneumophila SG1 の解析: 各地研で分離・保存されていた 90 株について実施した。解析は、Fingerprinting™ II (BIO-RAD) を用いた。

(2) *Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討

プロトコールの検討: 制限酵素、ホルマリン処理および遠心洗浄操作について検討した。

PFGE の精度管理: 改良したマニュアルに基づき、熊本県(*Campylobacter* 九州地区レファレンスセンター)が保有する 3 株を用いて実施した。

3. 食中毒及び感染性胃腸炎事例の検討

平成 19 年及び 20 年の 2 年間、九州地区地研で発生した事例について検討した。

4. 新規遺伝子検査法の整備

研究期間3年間、研修会を開催した。

C. 研究結果

1. IS-printing System に関する基礎的研究

(1) IS-printing System PCR 条件検討

1st primer set: *eaeA*遺伝子(495bp)検出用 primer set は、一部のPCR 機器では増幅率が悪く、改良の必要性が認められた。また、1st set の1kb 付近の3種 primer set で増幅されたPCR 産物のサイズが近似しているため、分離が十分でなく判定が困難である場合が多く、primer set の再検討が望まれた。この結果を踏まえ、1st set *eae* 遺伝子の(495bp)を185bpと、同様に ECs1313 (905bp, SpLE1)が561bpに変更された。また、病原因子の確認の意味から *hlyA* が1st set に加えられた。

2nd primer set: 480bp 付近(449bpと499bpの間)および230bp 付近(211bpと240bpの間)にエキストラバンドが検出される場合が多く、誤判定に注意を要することが明らかとなった。一方、1kb 付近のバンドがスタンダードマーカーとずれる点に関しては、判定に関わる問題であるため、マーカーとサンプルの塩濃度を含めた組成を同じにすることが望まれた。また、100bp ladderとサンプル(スタンダードマーカーも含めて)との移動度の違いについては、ladder 添付の loading buffer 等の組成の違いなどによると考えられるが、サイズ判定にはスタンダードマーカーを基準として用いるため、ladder の泳動に改良が必要であることが判明した。また、鋳型 DNA 過多によりPCR 産物量が多く、増幅バンドの移動度に影響を及ぼしている可能性がある場合には、例えば泳動するサンプル量を減らし、該当するバンドの移動度を再確認するなどの対応が必要であることが分かった。一方、検出バンドが薄い場合、

個人によって判定が異なる可能性が高くなることから、偽陰性を防ぐためにも、反応時には standard template DNA をPCR コントロールとして加え、サンプルとの増幅効率を比較するなど、再検の必要性の有無を的確に判定する基準を設ける必要がある。さらに、泳動用のゲルは、PFGE 同様に泳動像の良否に影響し、バンド認識に大きく影響するため、ゲルの作製および泳動はマニュアルに従って厳格に遂行されなければならない(図1)。

(2) IS-printing System の有用性についての検討

平成18年度: 178株について解析した結果、PFGE Type が115パターンに、IS Type では66パターンに分類され、PFGE の約半分の型別数であった。同一パターンを示すIS Type はAからCc の29種類のパターンがあった。しかし、1st primer set *eae* 遺伝子(495bp)の検出にばらつきが見られることや、2nd primer set で得られるPCR 産物のサイズが近似しているなどの影響から、誤判定が多いなどの問題点が明確となった。

平成19年度: 267株について解析した結果、PFGE Type が159パターンに、IS Type では105パターンに分類され、PFGE の約3分の2程度の型別数であった。しかし、平成19年度は改良されたIS-printing system Ver.2を使用し、1st set の *eae* および新たに加えられた *hlyA* 遺伝子の検出されない株があり、これらの株が元々両遺伝子を保有していないのか、検出できなかったのかについて精査するため、平成20年度にこれらの菌株について宮崎大学にて検証した。これらの株は、いずれも両遺伝子を保有していることが判明したため、再度各地研にて再実験を行った。その結果、各地研においても両遺伝子は検出された。両遺伝子が陰性であった原因について

ては、PCR マシンによる影響が大きいことが考えられたが、詳細については更なる検討が必要と考えられた。

平成 20 年度：解析を行った 237 株中 18 株は、*eae*、*hlyA* が陰性であったため、これらを除いた 219 株について比較検討を行った。その結果、IS- printing が 74 タイプ、PFGE が 140 タイプに分類された。PFGE の分類は、IS- printing の分類の約 2 倍であった。

PFGE -Type が同じで IS-printing の ID が異なる株は、4 グループあった(表 5)。PFGE-Type b423 は地研 3 と地研 7 の各 1 株で 2nd primer no.9 が、PFGE-Type d599 は地研 10 の 2 株で 1st primer no.1 の各 1 箇所が異なっていた。PFGE-Type d121 は地研 3 と地研 7 の各 1 株で 1st primer no.3 と 2nd primer no.11 の 2 箇所が、PFGE-Type d524 は地研 1 の 3 株と地研 3 および地研 4 の各 1 株の計 5 株で 2nd primer no.6 と no.7 の 2 箇所が異なっていた。地研 10 を除く 3 グループは、相互はいずれも隣接した県であった。IS-printing System の ID コードが同一で PFGE -Type が異なる菌株群は、31 グループあった。31 グループ中 18 グループは VT1+2 産生株、13 グループは VT2 単独であった。各グループ内での菌株間の関連性を見ると同一県、同一市である場合が殆どである。さらに同一家族や同一保育所で、互いに関連株であることが明白な事例が多い。3 地研以上のグループは VT1+2 のグループでは 6 グループ、VT2 のグループでは 2 グループあり、これらは diffused outbreak が示唆された。

2. PFGE 対応菌種の拡大

表 3 に示す 2 課題について実施した。

(1) レジオネラ

[精度管理] 標準菌株 3 種について、6 機関

で PFGE を実施した画像を比較解析した。3 菌株とも、各機関の PFGE パターン間で 90%以上の相同性が見られ、そのうち 1 菌株では 100%一致した。[分離株の PFGE パターン比較解析] 6 機関で分離された *L. pneumophila* SG1 90 株について PFGE を実施し、得られた画像を比較解析した結果、100%の相同性を示す菌株が 12 グループあったが、そのうち 8 グループは同じ施設から分離された株であり、他の 4 グループも同じ県の分離株であったことから、由来が同一又は関連がある可能性が考えられた。逆に、同じ施設からの分離株でも、浴槽の違い、貯湯タンクの違いなどで、異なる PFGE パターンを示した。その他の由来の関連のない株は、株間で概ね 85%以下の相同性で、PFGE パターンは多型を示した。なお SG1 では、浴槽水と冷却塔水で、クラスターが異なる傾向が見られた。

(2) *Campylobacter jejuni* の PFGE プロトコール

感染研から示された腸管出血性大腸菌のマニュアルを一部変更したマニュアルを新たに作成した(図 2)。簡略化のためのホルマリン処理の省略、それに伴う菌へのストレス減のための遠心洗浄操作の省略の 2 点を改良した。また、制限酵素の検討を 22 株に用いて実施した。分離その結果、*SmaI* で 16 パターン、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* で 19 パターンに分類された。泳動パターンが同一になったものは *SmaI* では 5 組(うち 1 組が 3 株、残り 4 組が 2 株ずつ)、*KpnI* 及び *SmaI+KpnI* では 3 組(2 株ずつ)であった。いずれの制限酵素処理でも同一パターンを示した菌株の組み合わせは、2 組(2 株ずつ)であった。拠って、第一選択に *SmaI* を第二選択で *KpnI* を使用することが推奨される。

3. 食中毒及び感染性胃腸炎事例の検討

平成 19 年及び 20 年度の事例検討は、表 4 に示す 10 課題で、いずれも貴重な報告であった。

4. 新規遺伝子検査法の整備

新規遺伝子解析法の整備及び導入のため、平成 18 年、19 年及び 20 年 3 課題について実施した(表 5)。これらの研修により、各地研の細菌学的データの解析結果の還元にも貢献できた。

D. 考察

IS-printing System Ver.1 は、いくつかの改良が必要であることが判明し、Ver.2 が作製された。九州地区で本キットを試験的に使用した結果、他機関と菌株の比較をするためには、忠実に検査方法を再現した正確な検査結果が必要であった。そのためには基本的な PCR トレーニングや PCR 機器の精度管理などが重要であることが再確認された。

IS-printing System は、2 セットの Multiplex PCR により O157 の 36 遺伝子を検出し、その有無によって菌株を比較する方法であり、コード化が容易である。本研究においてコード化するプログラムを開発し、簡単に誰でも比較できることが可能となった。平成 18 年から 20 年までの 3 年間、九州地区で分離された 682 株について、IS-printing System と PFGE の解析結果を比較検討した。IS-printing のパターン数は、PFGE パターン数に比べ約半分、同一パターン示す株の疫学的データは、diffused outbreak を示唆する内容であった。今後、プログラムの配布と IS のコードを共有することにより、各地研単独および地研間の比較が可能となり、行政への情報還元が迅速に行うことができると考えられる。

一方、O157 以外の食品由来感染症の細菌学的疫学指標をデータベース化するために、2 菌

種の PFGE 統一マニュアルを作成した。これらの活動は、レファレンス地研を核として実施した。さらに、研修活動を行うことにより、技術の導入を図った。この実技を伴った研修は研修内容のみならず、日常検査技術の継承にも繋がるものであり、継続的な実施が必要である。

E. 結論

1. IS-printing System

九州地区 12 地研で、試作 IS-printing System の改良および実用化に貢献した。また、本キットを利用した解析を 3 年間実施し、PFGE との関連性および疫学情報との相関性について検討を行い、有用な解析法であることを実証した。また、本法は、1 日で結果が得られるため、行政的に迅速な情報還元となることが分かった。

2. 「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化」の拡大

本研究では O157 以外の菌種について、PFGE のマニュアルを作成し、PFGE による食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化の拡大を図った。また PFGE 以外の菌株間の相同性を解析方法を導入のためのブロック研修を行い、次世代の解析方法について検討・検証を行った。これらの活動により、検査技術の向上並びに検査ネットワークの構築ができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中村祥子、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、堀川和美、福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌について、福岡県保健環境研究所年報、2008、35、59-64.

2. 学会発表

- 1) 江藤良樹、中村祥子、濱崎光宏、村上光一、