

- 之、大垣眞一郎、武田直和、片山和彦
多摩川河川水からのサポウイルスの検出および遺伝子解析
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
24. 片山和彦、岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、脇田隆字
マウスノロウイルスの複製機構の解析
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
25. 高木弘隆、遠矢幸伸、片山和彦、岡智一郎、杉山和良
マウスノロウイルス (MNV) のエタノール感受性と粒子、遺伝子への影響について検討
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月.
26. 片山和彦
「ノロウイルス研究の現状とマウスノロウイルスのノロウイルス研究への有用性」
第 147 回日本日本獣医学会学術集会、日本実験動物医学会シンポジウム、2009 年 4 月 2 日、栃木県宇都宮市
27. 本村和嗣、横山勝、大出裕高、中村浩美、守宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳、Norovirus Surveillance Group
ノロウイルス GII/4 の変異
ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、東京、2009 年 10 月 24 日.
28. 岡智一郎：
カリシウイルスの新知見
ウイルス性下痢症研究会第 21 回学術集会、東京、2009 年 10 月 24 日.
29. Kitajima M., Oka T.,., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.
Seasonal distribution and genetic diversity of noroviruses, sapoviruses, and Aichi viruses in river water in Japan.
15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.
30. Ueki Y., Shoji M., Okimura Y., Masago Y., Miura T., Omura T., Oka T.,., Katayama K., Takeda N., Noda M., Miyota Y.
Prevalence and genotypes of sapovirus in wastewater, oysters and gastroenteritis patients in Japan.
15th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. Greece, May 31-Jun 05, 2009.
31. Kitajima M., Oka T.,., Katayama K., Takeda N., Haramoto E., Katayama H., Ohgaki S.
Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in river water in Japan.
109th General Meeting of American Society for Microbiology. USA, May 17-21, 2009.
32. 片山和彦
日本獣医公衆衛生学会 シンポジウム 「今、問題の食中毒」
平成 22 年 1 月 31 日 宮崎市 「ワールドコンベンションセンター・サミット」
33. 片山和彦
希少感染症研修会
下痢症ウイルス ノロウイルス
平成 22 年 2 月 25 日 感染研戸山庁舎共用第一会議室
34. 三瀬敬治, カリシウェブについて. 第21

回ウイルス性下痢症研究会、2009年10月、東京

35. 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、脇田隆字、石井孝司、染谷雄一、白土東子「X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析」第29回日本糖質学会年会、高山 2009年9月

36. 染谷雄一、白土東子、武田直和、脇田隆字「ノロウイルス様中空粒子の大きさに影響を及ぼすアミノ酸残基置換」第57回日本ウイルス学会学術集会、東京 2009年10月

37. 熊谷安希子、久保田智巳、伊藤浩美、成松久、脇田隆字、石井孝司、染谷雄一、白土東子「X線結晶構造解析によるノロウイルスと血液型抗原の結合解析」第57回日本ウイルス学会学術集会、東京 2009年10月

38. 染谷雄一、白土東子、脇田隆字「ノロウイルス中空粒子の昆虫細胞での発現」日本薬学会第130会、岡山 2010年3月

39. Tomoyuki Tanaka, Daisuke Kato, Kunio Kamata, Tatsuya Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida, Hitoshi Tajiri, Masumi Okuda, Yoshiko Yamashita, Noritoshi Kitamoto and Naokazu Takeda.

Improved Norovirus rapid diagnostic kit, immunochromatography (IC) kit

-its advantages as a prophylactic tool-
The 4th Bangladesh-Japan Joint International Conference on Microbiology, Food safety and Hygiene. 2009.3 Nara, Japan

40. 本村和嗣、横山 勝、大出裕高、中村浩美、守 宏美、岡智一郎、片山和彦、神田忠仁、田中智之、武田直和、佐藤裕徳

ノロウイルスGII/4ゲノムとキャプシド構造の自然界での進化

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

41. 中田恵子、左近(田中)直美、入谷展弘、三好龍也、改田 厚、久保英幸、阿部仁一郎、後藤 薫、長谷 篤、内野清子、高橋幸三、田中智之、山崎謙治、加瀬哲男、高橋和郎、織田 肇

大阪府・大阪市・堺市の連携による大阪府内におけるノロウイルスの流行解析

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

42. 三好龍也、内野清子、李 天成、武田直和、北元憲利、田中智之

野生イノシシのE型肝炎ウイルス保有状況調査

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

43. 東方美保、齋藤博之、白土東子、田中智之、野田 衛

パンソルビン・トラップ法により汚染食品から回収したノロウイルス遺伝子検出条件

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

44. 齋藤博之、東方美保、白土東子、田中智之、野田 衛

食品のノロウイルス検査に向けたパンソルビン・トラップ法の実用化の検討

第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月 東京都

45. 田村 務、西川 眞、武田直和、田中智之、鈴木 宏

新潟県におけるGII.4ノロウイルス新変異株

[Apeldoorn317/2007/NL]に近縁なノロウイルスの検出動向

第 57 回日本ウイルス学会学術集会 2009
年 10 月 東京都

45. Tomoyuki Tanaka, Hitoshi Tajiri,
Masumi Okuda, Yoshiko Nakayama, Tatsuya
Miyoshi, Kiyoko Uchino, Hisaaki Yoshida,
Noritoshi Kitamoto Daisuke Kato, Kunio
Kamata and Naokazu Takeda.

DEVELOPED NOROVIRUS ANTIGEN DETECTION
IMMUNOCHROMATOGRPHY(IC) KIT WITH
ADVANTAGES OF PROPHYLACTIC TRIAGE IN
PEDIATRIC WARDS. The 13th Asian Pacific
Congress of Pediatrics and 3rd Asian
Pacific Congress of Pediatric Nursing.
2009.10. Shanghai, China

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

研究分担報告書

研究代表者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	渡辺治雄	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者		地方衛生研究所

研究要旨 腸管出血性大腸菌 (EHEC) 等の PFGE 解析による遺伝子型別に基づいて、分離株の動向を調べるとともに、分離株の解析情報と疫学情報を共有するためのネットワークである、PulseNet Japan の機能強化を目的として BioNumerics (BN) server によるオンラインシステムの構築を行った。本システムでは、画像等の解析ソフトウェアである BN 及び BN server を利用し、全国 6 ブロックの研究分担者が BN server 上のデータベースにアクセスして解析できるようになる予定である。2009 年に分離された EHEC の PFGE 解析結果は、BN による系統樹作成に基づくサブタイプ名の付与と PFGE パターンのデータベース構築に使用した。EHEC 0157 では、1606 株に対して 2009 年に分離された新しいサブタイプとして 716 種類、2008 年に分離されたことのあるサブタイプが 70 種類、その他が 43 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、351 株に対して 163 種類のサブタイプが見出された。一方、広域共通パターンを示す EHEC 株については、XbaI 消化でのパターンが同一と考えられる 0157 では、3 ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが 33 種類存在したが、そのうち 6 箇所以上の都道府県で分離されかつ BlnI 消化でも一致するパターンは 7 種類存在していた。2009 年 9 月に発生した、チェーンレストランにおける共通パターンを示す EHEC 0157 による広域事例では、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) でも大部分の株が同一リピート数を示した。一方、同時期に発生した、異なるチェーンレストランにおける EHEC 0157 による広域事例では、複数のパターンを示す株が分離された。

A. 研究目的

細菌性食品由来感染症の調査において、食品或いは患者由来株の細菌学的な解析を行

い、その結果を関係機関で共有することで、当該事例の早期探知、拡大阻止に結びつけることを目的とした。そのために、まず腸管出

血性大腸菌の PFGE 等による解析から国内分離株の遺伝子型に基づく動向を調べた。また、PFGE 解析結果のデータベースを共有するために、BN server の設置によるネットワークの構築を行った。

B. 研究方法

平成 21 年度に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析を行った。PFGE 解析結果のデータベース化を BioNumerics (Applied Maths 社) により行うとともに、結果については、E-mail により菌株送付機関に返信し、感染研のサーバー上で全国の地研の担当者に対して ID とパスワードの組合せによる限定公開を行った。全国 6 ブロックの研究分担者に対し、BN server との通信を行う端末を配布し感染研細菌第一部に設置したサーバーとの通信システムを構築した。また、本システムの導入を円滑に行うため、BN に基づくネットワーク全体に関する研修会を行った。MLVA については、米国 CDC が使用している 9 組の primer を用いて行った。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 社) で行った。また、fragment size marker としては、GeneFlow 625 ROX labeled (CHIMERx 社、米国) を使用し、Fragment Analysis には ABI-3130xl Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社) を用いた。PFGE 及び MLVA の結果は BioNumerics を用いた。

C. 研究結果

1. PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイプング

EHEC 0157 については、2009 年に分離・送付された 1606 株が、2009 年に分離された新

しいサブタイプとして 716 種類、2008 年に分離されたことのあるサブタイプが 70 種類見いだされ、集団発生由来株等がクラスターを形成した (図 1)。EHEC 026 についても同様に、集団発生由来株がクラスターを形成した (図 2)。後述するように、EHEC 0157 では散発事例由来株においても *Xba* I 消化による PFGE 解析結果において同一クラスターに属する分離株が検出された。0157 以外の血清群の株については、このようなクラスター形成をする広域散発事例由来株はみられなかった。

2. EHEC における広域共通パターンを示す株の解析

2009 年に分離された 1606 株の EHEC 0157 は、829 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 33 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されていた。これらのなかで、2007 年から連続して分離されていたパターンである TN c47、TN c57、及び N c293 が 2009 年においても見いだされた (図 3, 4)。分離時期に関しては、TN c47 が比較的限られた期間に分離されていた (3 月に 1 株、他はすべて 7 月) のに対して、TN c293 が約 5 ヶ月、TN c57 が約 3 ヶ月に渡って分離されていた。TN d654 及び d92 については、2008 年にも分離されたパターンであり、分離時期に関しては、それぞれ約 3 ヶ月及び 5 ヶ月であった (図 4, 5)。2009 年に初めて分離された TN e241 及び e99 については、TN e241 が全国展開しているチェーンレストラン A 関連事例由来株であり、2009 年 8 月下旬から 9 月にかけて集中的に分離されていたが、TN e99 に関し

ては、4～10月の約6ヵ月に渡って分離されていた（図5, 6）。一方、2009年9月に発生したチェーンレストランB関連事例においては、複数のPFGE-XbaIパターンが見出されたが、いずれのパターンも他地域における散発事例から分離されることはなかった（図7）。チェーンレストランA関連事例においては、TN e241とはわずかに異なる変異株も少数ながら分離されていたものの、大部分が同一パターンを示した。一方、チェーンレストランB関連事例においては、明らかに異なるパターンが複数検出された（図8）。また、チェーンレストランA関連事例由来である、TN e241の株では、PFGE-BlnI及びMLVAにおいても同一パターン、同一リポート数を示した。

3. BioNumerics server を利用したネットワークの構築

PFGE 解析結果に基づくデータベース構築をBNにより進めているが、研究分担者からオンラインで直接データベースにアクセスすることは現在までできていなかった。広域発生事例等についてはリアルタイムでの発生状況の把握が重要であるため、研究分担者からのオンラインによるデータベースアクセスを目的としてBN server によるオンラインシステムの構築を行った（図9）。感染研細菌第一部に設置したサーバーのURLを<http://jpulsenet.nih.go.jp/>とし、研究分担者の端末からBN version 6.1 を使用してアクセスすることが可能となった。サーバー内のデータベースには、細菌第一部のデータベースのコピーを設置する予定であるが、病原体、疫学情報等の種類やデータの品質に関する精度管理が必須である。

D. 考察

PFGE パターンが同一と思われる広域散発事例は毎年検出されているが、個々の事例についての関連性を示す疫学情報が見出されることは極めて稀である。2009年は、チェーンレストラン関連事例が別件で2件発生した。そのうちのチェーンレストランA関連事例では、個々の事例の大部分が単独の症例であったものの、全てが同一チェーンレストランAでの喫食歴があるなど、明らかな疫学的関連性を示しており、大部分でPFGEパターンの一致が認められた。一方、チェーンレストランB関連事例では、同一チェーンレストランBでの喫食歴などの疫学的関連性があるものの、PFGEパターンについては複数の異なるパターンが存在していた。したがって、関連散発事例においても必ずしも同一パターンの分離株のみが検出されるわけではないことがわかる。これらの二つの事例は、広域から分離される同一パターンを示すEHEC 0157において、共通感染源の存在を強く示唆する可能性があることを示す一方で、分離株に関する疫学情報が極めて重要な情報であることを明確に示している。

広域から分離されるパターン自体は年により変化しているが、2007年に出現して集団発生も引き起こしたTN e47については、2008年及び2009年においても数こそは少ないが、連続して分離されていることから、感染源が完全に消滅しているわけではないことが考えられた。また、PFGEパターンが一致するEHEC 0157においても、分離期間が長期間に及ぶ株ではMLVA等で変異が起こっている場合も示されていることから、その関連性につ

いては菌株解析を十分に行い、慎重な判断が必要である。

BN server によるデータベースのオンライン化は、解析結果の迅速な共有に向けた前進であると考えられる。今後、複数の解析情報入力によるデータ品質の揺らぎを最小限にとどめ、正確なデータを確保することが有用なデータベース構築に重要であると考えられる。

E. 結論

広域から分離される同一パターンを示す EHEC 0157 では共通感染源の存在を強く示唆する可能性があるが、分離株に関する疫学情報は菌株解析結果と同様、極めて重要な情報である。データベースのオンライン化が進んだが、今後、入力データの適切な精度管理を行い、正確なデータを確保することが有用なデータベース構築に重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T. : Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 47:2888-94, 2009
2. Izumiya H, Tada Y, Ito K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Terajima J,

Watanabe H. Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 58:1486-91, 2009

2) 学会発表

1. Jun Terajima, Sunao Iyoda, Tomoko Morita-Ishihara, Jiro Mitobe, Hidemasa Izumiya, Haruo Watanabe : Molecular Epidemiological investigation of enterohemorrhagic *E. coli* isolates in Japan 2006-2007. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, 2009
2. Sunao Iyoda, Naoko Honda, Shoji Yamamoto, Jun Terajima, Haruo Watanabe : LysR-type regulator A (LrhA) controls expression of LEE and non-LEE encoded virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections, Buenos Aires, 2009
3. Jun Terajima, Sunao Iyoda, Jiro Mitobe, Hidemasa Izumiya, Eiji Arakawa, Masatomo Morita, Tomoko Ishihara, Haruo Watanabe : Japanese PulseNet. 6th Annual International Collaboration of Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies Meeting, Tokyo, 2009
4. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄：最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について。第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009

5. 伊豫田 淳、本田尚子、山本章治、寺嶋 淳、渡辺治雄：腸管出血性大腸菌におけるLEEとエンテロヘモリシンの多重発現制御機構。第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009
 6. 大岡唯祐、小椋義俊、井口 純、Md Asadulghani、中山恵介、小林秀樹、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也：腸管出血性大腸菌（EHEC）及び腸管病原性大腸菌（EPEC）におけるLEE領域の多様性解析。第82回日本細菌学会総会、名古屋、2009
 7. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄：地研・感染研のネットワークによるEHEC感染症の動向把握。第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009
 8. 勢戸和子、田口真澄、坂田淳子、原田哲也、寺嶋 淳：IS-printingによる志賀毒素産生性大腸菌O157の遺伝子型別。第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009
 9. 杉本典彦、寺嶋 淳、伊豫田淳、嶋 謙介、呉 育羅、日野根谷 淳、朝倉昌博、渡邊治雄、山崎伸二：志賀毒素ファージを標的とした腸管出血性大腸菌O26及びO111の簡便・迅速なDNAフィンガープリンティング法の開発：第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、泉佐野市、2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

図 1

Dendrogram of EHEC O157:H/-isolates in Japan (1645 entries)
(2009/1/1-12/31) Tol : 1.2%

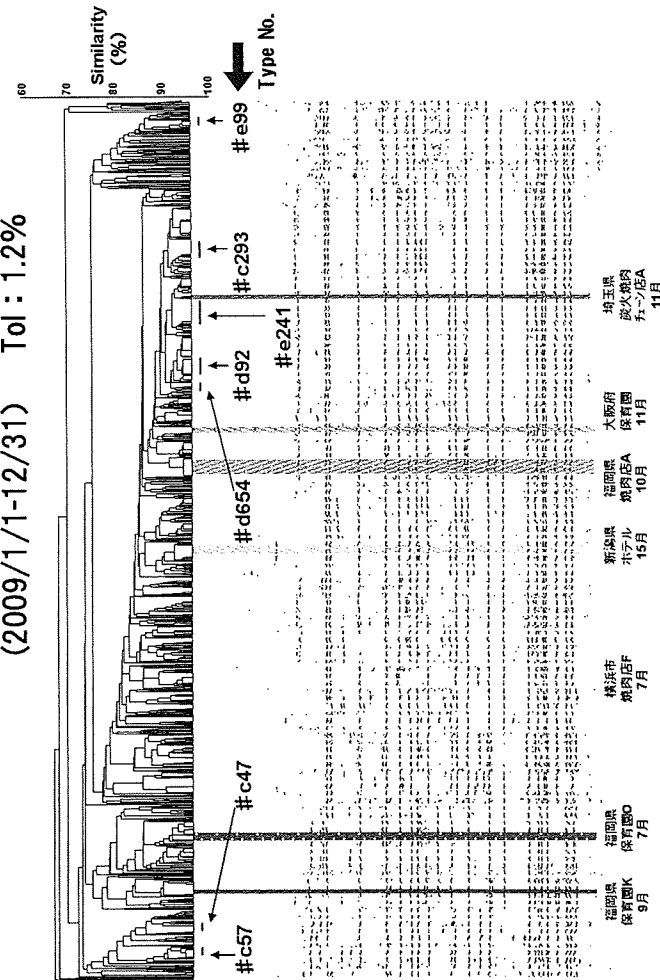


図 2

Dendrogram of EHEC O26 isolates in Japan (369 entries)
(2009/1/1-12/31) Tol : 1.2%

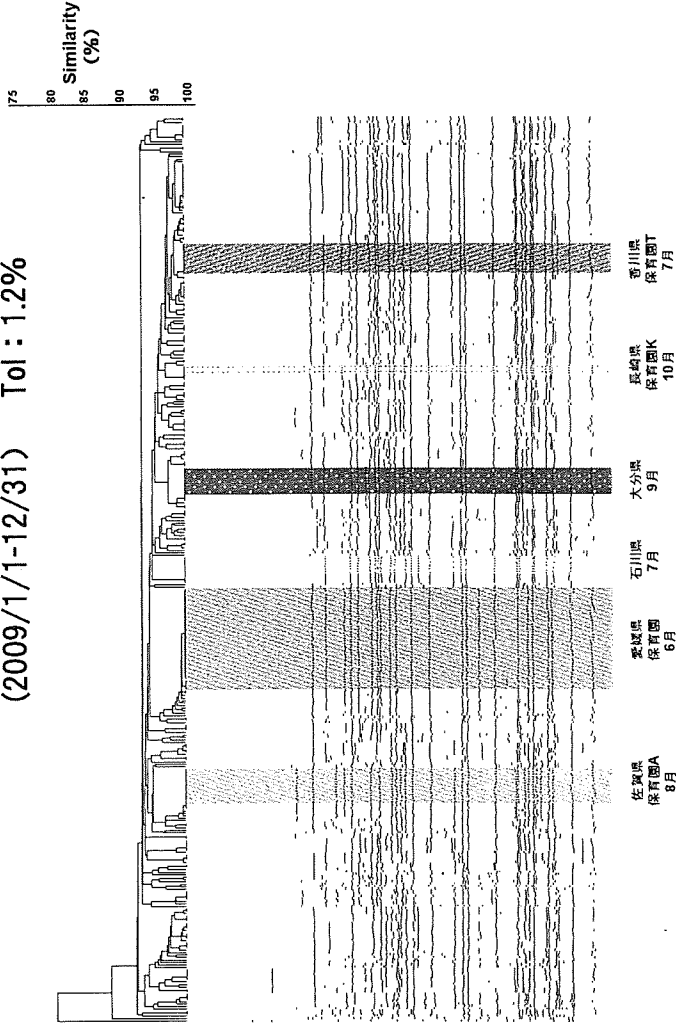


図 3

2009年 PFGEパターン的一致している事例の分布図 (I)

☆ Type No. c47, Mar-Jul
● Type No. c57, Jul-Sep

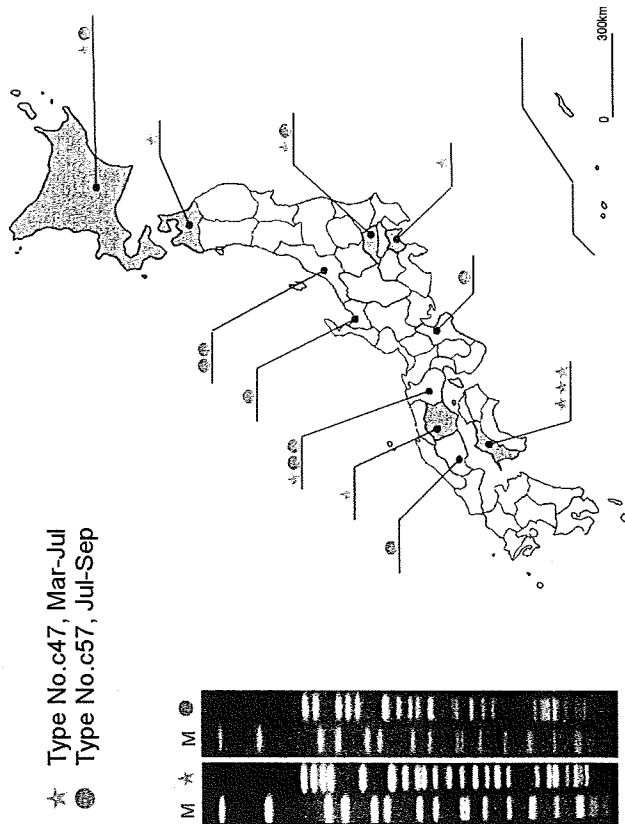


図 4

2009年 PFGEパターン的一致している事例の分布図 (II)

◎ Type No. c293, Jul-Sep
○ Type No. d92, May-Nov

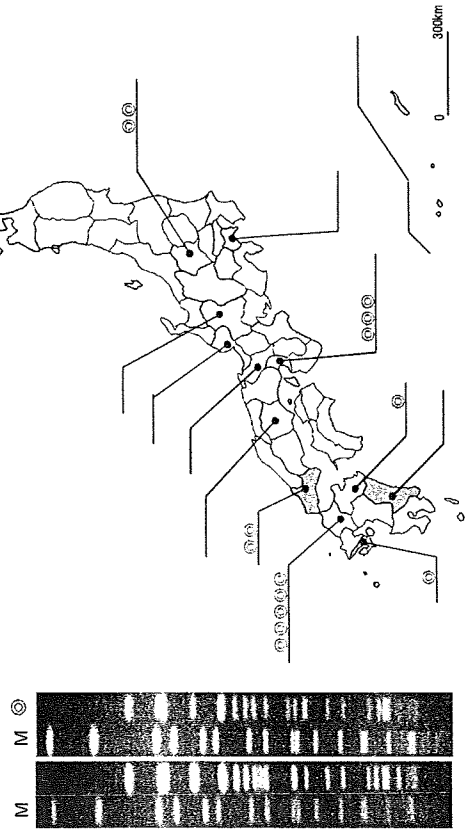


図 5

2009年 PFGEパターンの一致している事例の分布図 (III)

- ▲ Type No. e99, Jul-Oct
- Type No. d6554, Jul-Oct

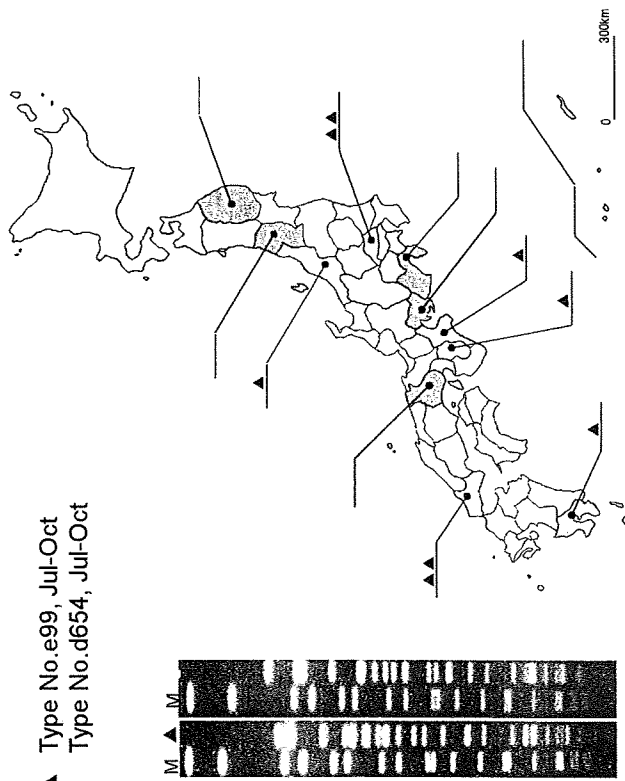


図 6

チエーンレストラノA関連EHEC O157:H7 TN e241の分布図

- ★ Type No. e241, August, 2009

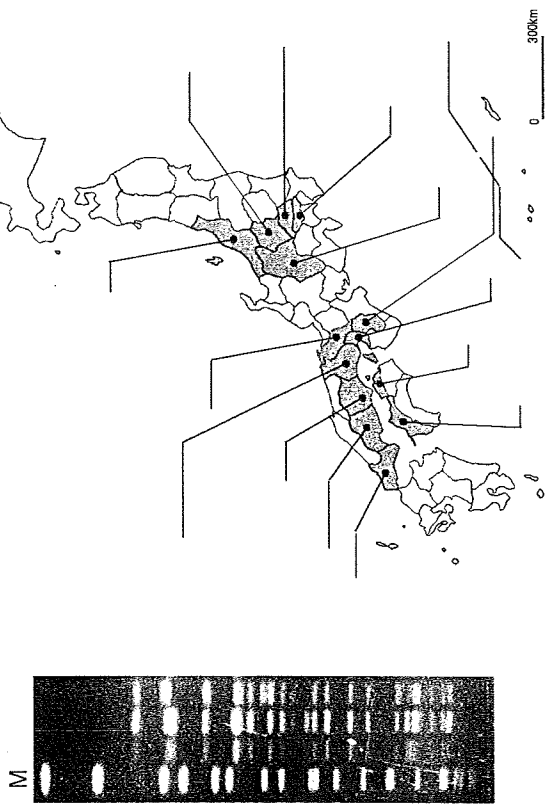


図7

チエーンレストランB関連EHEC O157:H7 の分布図

M ☆

Type No : e235, e236, e242,
e247, e280, etc.
August, 2009

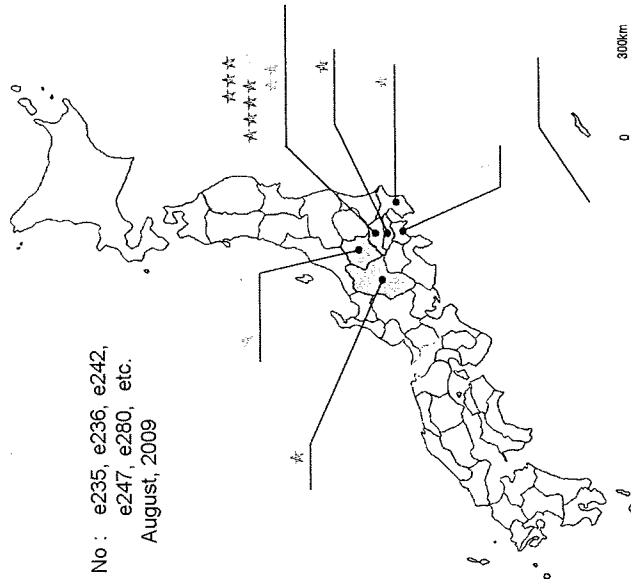
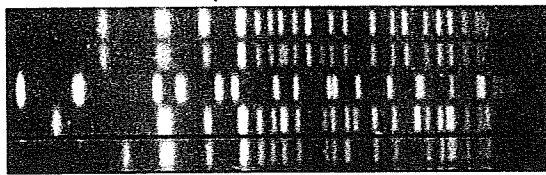
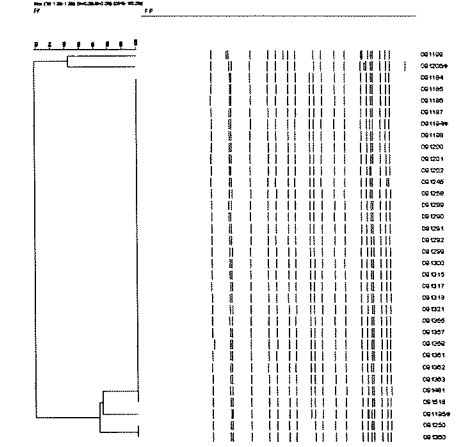


図8

2009年8月下旬～9月にかけて発生した、広域食中毒事例由来O157:H7株の
デンドログラム

チエーンレストランA関連株



チエーンレストランB関連株

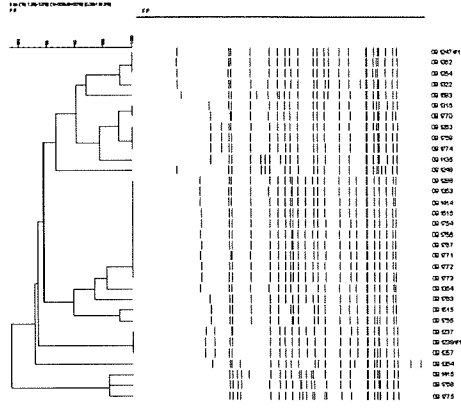
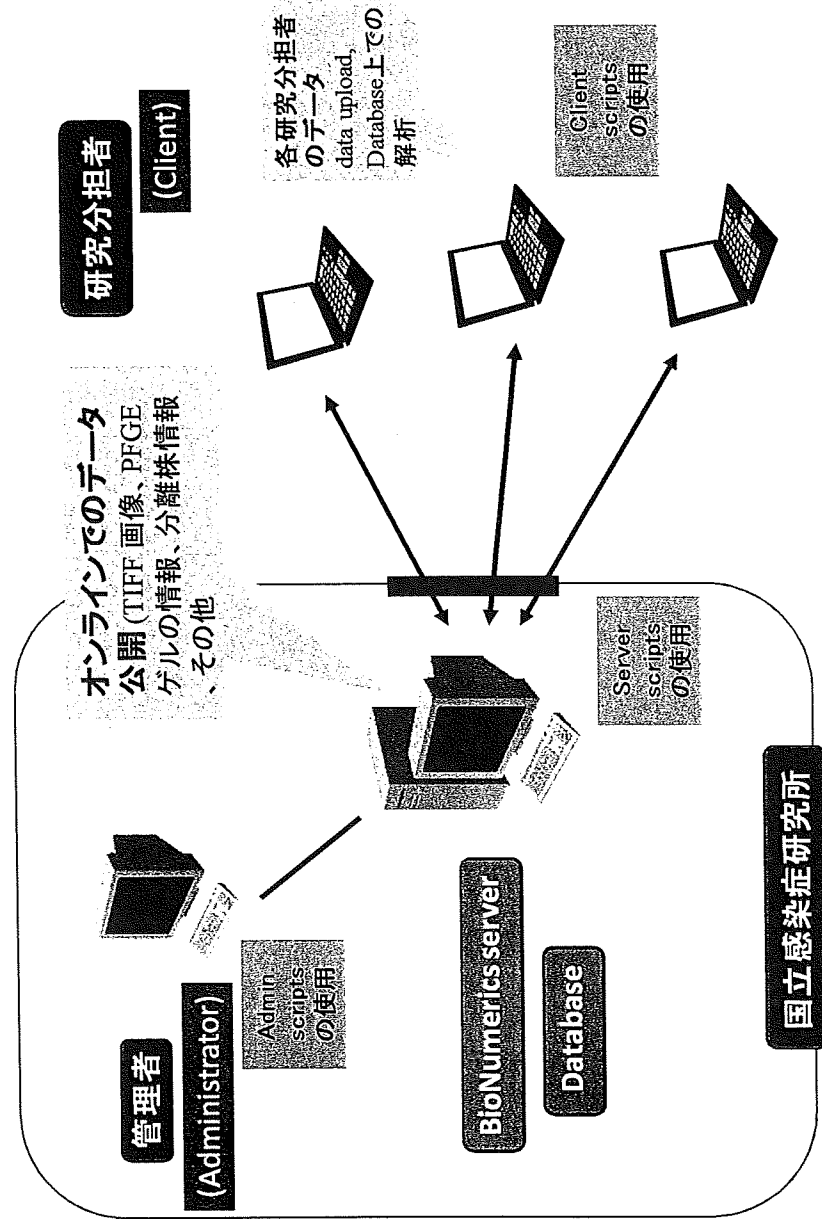


図 9

PulseNet Communication の概要



厚生科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
平成 21 年度分担研究報告書

「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動システムの
精度管理方法の検討

分担研究者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
協力研究者	山口 敬治、森本 洋、池田 徹也	北海道立衛生研究所
	和栗 敦	青森県環境保健センター
	八柳 潤	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	沖村 容子、高橋 恵美	宮城県保健環境センター
	金子 紀子	山形県衛生研究所
	菅野 奈美	福島県衛生研究所
	細谷 美佳子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地 敬	札幌市衛生研究所
	勝見 正道	仙台市衛生研究所

研究要旨：パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法によるパルスネットの構築のためには、各検査施設における精度管理が重要であり、北海道・東北・新潟ブロックでは平成 18 から 20 年度に行われた「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」の中で、共通の生菌を送付して行う精度管理以外の方法としてプラグ送付による精度管理方法について検討を行った。今回、プラグ作成部分の精度管理方法として、各地研が分子マーカーとして使用している *Salmonella* BraenderupH9812 株でプラグを作成し 1 地研に送付して、制限酵素処理、PFGE を行い、泳動像を解析する方法を試みた。その結果、送付によるプラグの破損等は認められず、ブロック内 10 地研のうち 8 地研がクラスター分析（類似係数：Dice、デンドログラムタイプ：UPGMA、トレランス設定：1.0%）で 99%以上の相同性を得ることができた。しかし、残り 2 地研のうち 1 地研は 310.1Kbp のバンドが 2 本に別れ、他の 1 地研は、452.7Kbp のバンドがずれていた。この 2 施設については、保存株の変異が考えられた。プラグのやり取りにより PFGE の精度管理を行う方法は、輸送コストの軽減と、生菌を送る場合のリスクをなくすだけでなく、プラグ作成段階と制限酵素処理以降の精度管理とをそれぞれ確認できる利点があることが明らかとなった。

A. 研究目的

食中毒事件発生時に行う疫学調査は、食品由来感染症の拡大を防ぐと共に、再発防止のために大変重要なものである。近年、腸管出血性大腸菌 O157 やカンピロバクター等の原因菌の DNA を用いた

分子疫学的分析が感染源究明に利用され、その有用性が報告されている。その中でパルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE）法は、特に優れた分子疫学的解析法であり、国立感染症研究所を中心にデータベースの構築（以下 Pulse-net）が進ん

でいる。しかし、PFGE は手技や解析者の違いによる施設間格差が生じることが多く、Pulse net には各施設の精度管理が欠かせないものである。PFGE の精度管理方法としては、共通の菌株をそれぞれの施設に送り、プラグを作成し、制限酵素処理、泳動、泳動結果の解析を行って、施設間格差を最小限にすることが行われている。この方法は、PFGE の全行程を確認することができ、それぞれの施設の問題点を確認する上で有用であるが、その反面、病原菌をそれぞれの施設に配布しなければならず、輸送コストの面や、輸送時の事故による病原菌の流出等のリスクが伴う。

これらのリスクを回避する方法として、北海道・東北・新潟ブロックでは、プラグを送付して精度管理を行う方法について検討してきた。平成 18～20 年度に行われた「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」において、共通の菌株で作成したプラグをブロック内協力地研に送付し、制限酵素処理、PFGE、結果解析を行い、プラグ送付による精度管理方法の有用性を明らかにしてきた。

今回、プラグを使った PFGE 精度管理方法の検討の一環として、ブロック内各地研が保存している PFGE 用 マーカー 菌株、*Salmonella* BraenderupH9812 株（以下 SB 株）を使用し、プラグ作成までの精度管理方法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

各地研で PFGE 用マーカーとして保存している SB 株を使用した。

2. プラグの作成

それぞれの地研で行っているプロトコールに従い、制限酵素処理前の段階まで処理した。

3. 輸送方法

輸送用バッファーとしては、北海道衛研で通常プラグ保管用に使用している 0.5M EDTA (pH8.0) を使用した。2mL のマイクロチューブ（丸底スクリュウキャップタイプ）にバッファー1.5mL を加え、これにサンプルプラグキャストの 1 プラグ

を 4 等分して入れ、蓋をしてパラフィルムでシールし通常郵便で送付した。

4. 制限酵素処理

制限酵素は *Xba* I (TaKaRa) を使用し、制限酵素量は、30units/plug、処理温度 37°C、処理時間 6 時間で行った。なお、制限酵素処理の前処理として、TE バッファーで 30min 平衡化し、制限酵素用バッファーを使って氷上で 30min 平衡化した。

5. PFGE

各地研から送られたプラグは、同時に処理を開始し、コームにのせる切り出し幅をほぼ 2mm になるように心がけ、同一条件で PFGE できるように注意した。パルスフィールドゲル電気泳動装置 CHEFF DRII (BIO-RAD) を使用し、泳動条件は、6V、2.2～54.2sec、21hr、buffer 0.5×TBE、温度 14°C で実施した。

また、マーカーとしては Lambda ladder (BIO-RAD) を使用した。

6. 結果の解析

泳動結果の解析は、Fingerprinting II を使用し、クラスター解析の条件は、類似係数：Dice、デンドログラムタイプ：UPGMA、トレランス設定：1.0%で行った。

7. アンケート調査

各施設に対し、使用菌量の確認方法、プラグ用アガロースの種類、Plug mold の種類、Proteinase K の処理方法、PFGE のプロトコールについて調査した。

C. 研究結果

各地研からプラグが届くまでにかかった日数は 1～3 日で、7 施設で 2 日目に到着した。到着したプラグには肉眼的な破損等は認められなかった。

1. アンケート調査

使用菌量の確認方法としては、濁度計を使用している地研が 2 地研、マックファーランド比濁法が 2 地研、ペレットの目視が 1 地研、白金耳によるかき取り量が 2 地研でブrossの培養時間による

方法が2地研、OD₆₁₀=0.6の標準液を作成してこれと比較する方法が1地研であった。

プラグ用アガロースは9地研でSeaKem Gold Agaroseを使用し、Nusieve3:1 Agaroseが1地研であった。濃度は、最終濃度を0.5%にしている地研が6施設で、0.3%が3施設、0.6%が1施設であった。また、プラグモールドは、全ての地研がサンプルキャスター0.7mm (BIO-RAD)を使用していた。

Proteinase Kの濃度は、8地研で1.0mg/mL、1.5mg/mLが1地研、5.4%が1地研であった。処理温度は全ての地研が50°Cで、処理時間はOver Nightが4地研、2時間が2地研、2時間~Over Nightが1地研、16~24時間が3地研であった。

制限酵素未処理プラグの保存方法としては、0.5M EDTA (pH8.0)を使用しているところが2地研、PK処理液が4地研、TEバッファーが4地研であった。保存温度は、全ての地研で4~10°Cであったが、保存期間は1日~2年とまちまちであった。

なお、PFGEのプロトコールは、全ての地研で感染研Newプロトコールに準拠していた。

2. PFGEの結果

スメア状態となりバンドが確認できない地研はなかった。泳動像では、J地研、E地研のバンドが濃く、B地研のバンドがやや薄かった。しかし全ての地研で167.1と173.4Kbpのバンドの分離は確認できた。B地研で310.1Kbpのバンドが2本に別れていた。また、H地研で452.7Kbpのバンドが398.4Kbpのバンド側へずれていた。

3. クラスタ解析ソフトによる解析

クラスタ解析結果では、8地研が100%の相同性を示したが、J地研が99%の相同性であった。また、バンドに違いが認められた残り2地研のうちB地研が96%で、H地研が93%であった。

D. 考察

前回と同様、送付により肉眼的なプラグの損傷やバッファーの液漏れは認められず、PFGEの結果への影響も認められなかった。菌株の送付に比

べプラグの送付は、輸送コストの軽減と病原菌輸送に伴うリスクを排除できる利点があり有用であった。

各地研での菌量の決め方はそれぞれ濁度計を使用が2地研、マックファーランド比濁法が2地研、ペレットの目視が1地研、白金耳によるかき取り量が2地研でブrossの培養時間による方法が2地研、OD₆₁₀=0.6の標準液を作成してこれと比較する方法が1地研と異なっており、バンドが濃かったJ地研がマックファーランド比濁法(5~6)、E地研が白金耳によるかき取り量(1小白金耳)によって菌量を決定していた。また、バンドがやや薄かったB地研ではブrossによる一夜培養液200μLを使用してプラグを作成していた。泳動像を肉眼で確認する限りにおいて2地研を除くその他の地研でバンドの違いは認められなかったが、クラスタ解析ソフトによる分析結果では、J地研の相同性が100%とはならなかった。これは、バンドの濃さの違いにより各バンドのピークの高さが他の地研と異なったために、100%の相同性にならなかったものと思われ、プラグ作成段階での菌量が影響を与えたものと考えられた。プラグの菌量は、バンドの濃さに影響を与えるため、菌量をいかに均一化するかが、プラグ作成段階での重要管理点となると思われる。菌量を一定にするには、菌量を数値化する方法が適当と思われ、濁度計による方法が確実であるが、手間がかかりさらには、機器の汚染のリスクがあるため、もっと簡易的に菌量を均一化する方法が望まれる。プラグの菌量については、濁度計等の濁度で判断する方法以外には、ブrossによる一夜培養、遠心後のペレットのサイズ、白金耳によるかき取り量等があげられる。今回の調査でも、それぞれの菌量の調整方法が行われていた。J地研とB地研を除く各地研のバンド照度はほぼ同等であり、菌量の確認方法で大きな違いはなかったことは、それぞれの確認方法の違いよりも、濃度調整の基準の違いが影響していると思われる。今後、菌量の確認方法として、どの菌種においても同様に簡易かつ安定的な方法を検討する必要があると考える。

今回の調査で2地研のSB株でバンドの変異が認められた。B地研では、310.1Kbpのバンドが2本に別れていた。また、H地研で452.7Kbpのバンドが398.4Kbpのバンド側へずれていた。これらは、菌株の変異の可能性が高く、保存方法等について検討する必要があると考える。SB株はPulse-net上で基準となるマーカーであり、SB株のバンドの違いは、クラスター分析に大きな影響を与えるため、各地研で保存しているSB株について、定期的な確認が必要となる。今回の菌株の変異は明らかな違いがあるため、それぞれの地研での確認が可能だと思われるが、細かい変異の場合、気が付かずに使用してしまう場合も考えられることから、SB株の管理方法、確認方法についても今後統一したプロトコルの作成を検討する必要があると思われる。

今回の調査では、プラグ作成段階の精度管理方法として各地研のSB株を使用して行ったが、バンドの変異を起こした2地研を除く8地研で99%以上の相同性が得られており、北海道・東北・新潟ブロック内でのプラグ作成までの処理については、概ね良好な状態にあると考える。

また、2地研でSB株の変異と思われるバンドの違いが認められたことは、今回の調査方法で、マーカーとして使用するSB株の状況確認も可能であり、マーカー株の確認方法としても有用な方法の1つであると思われる。

プラグの送付による精度管理方法では、プラグの作成段階の精度管理と、制限酵素処理・PFGE・

画像解析段階の精度管理をそれぞれ、別個に行うことが可能であり、今回の調査で、北海道・東北・新潟ブロックでの精度管理として、統一した菌量の調整方法の検討と制限酵素処理・PFGE・画像解析部分の精度管理を重点的に行うことで、さらにPFGEの精度を向上させられることが判明した。

E.結論

プラグを使った精度管理方法において、輸送における、プラグの破損やPFGEの泳動結果への影響は認められなかった。

プラグ作成までの処理において、プラグの菌量の調整方法が重要であり、手軽に菌量の測定を行う簡易的な方法を検討する必要がある。

マーカー用に保存されているSB株について、2地研で菌株の変異と思われるバンドの変化が認められ、SB株の保存方法と定期的な確認方法の検討が必要であると考えます。

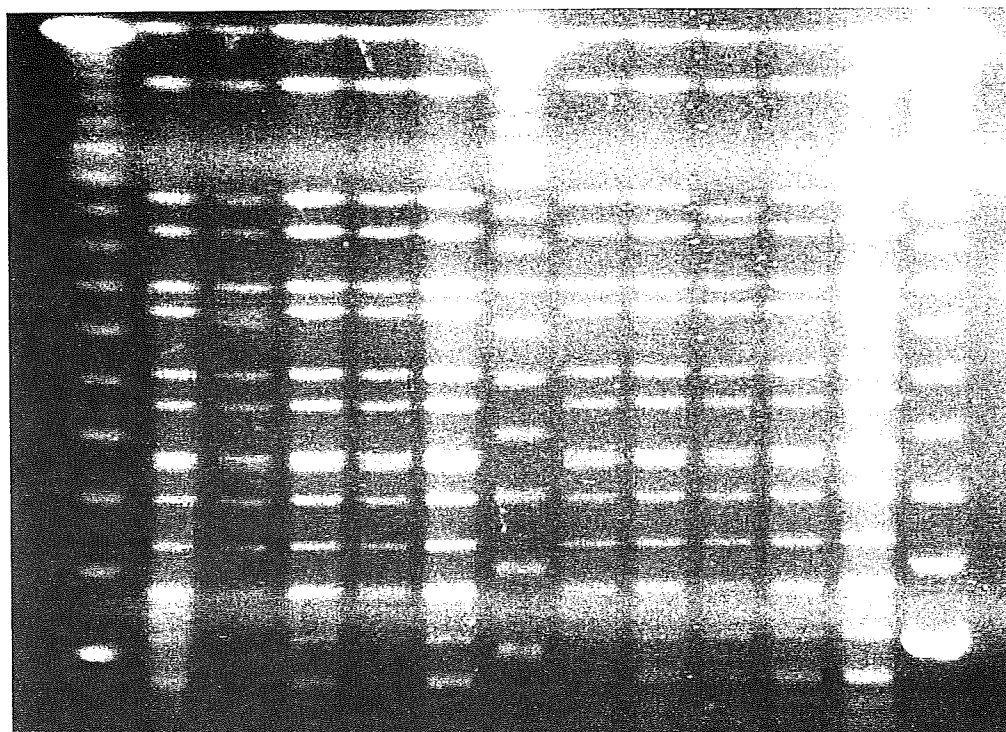
プラグの送付による精度管理は、PFGEの精度管理方法として、プラグ作成段階と制限酵素処理・PFGE・画像解析段階に分けて検討することが可能であり有用であった。

F.健康危機情報

特になし

G.研究発表

なし



M A 地研 B 地研 C 地研 D 地研 E 地研 M F 地研 G 地研 H 地研 I 地研 J 地研 M

M : Lambda ladder (BIO-RAD)

PFGE 装置 : CHEFF DR II 6V,2.2~54.2Sec,21hr Buffer 0.5×TBE 14°C

図1 各地研 SB 株 PFGE 泳動像

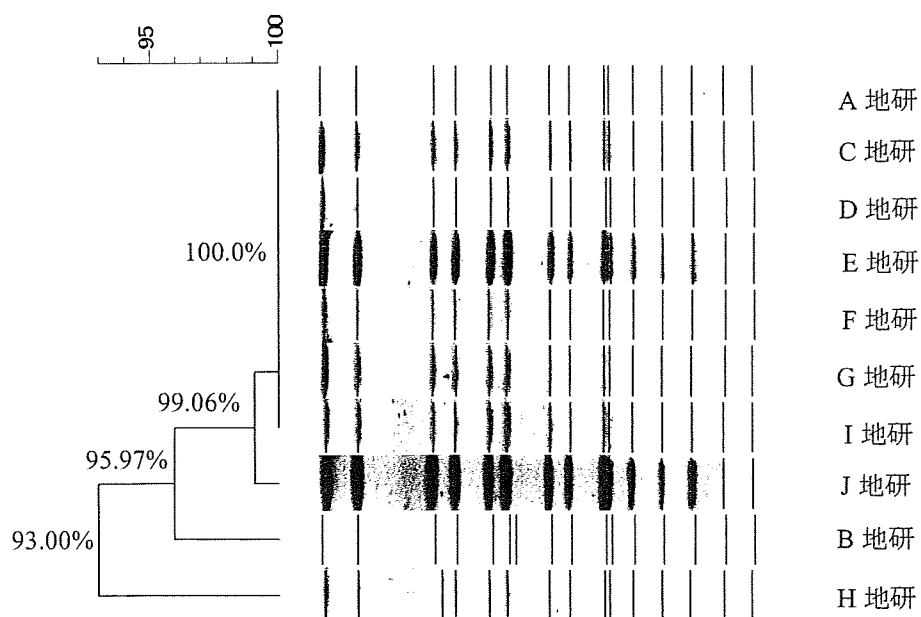


図2 デンドログラム

「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

2008 年に北海道で発生した *Campylobacter* 食中毒事例

分担研究者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
協力研究者	山口 敬治、森本 洋、池田 徹也	北海道立衛生研究所

研究要旨:2008 年に北海道内で発生した *Campylobacter* 属菌による食中毒事例は、17 事例で患者数は 130 名であった。このうち、北海道衛生研究所で患者由来の菌株を入手した 5 事例 24 株について、性状試験、Penner 型別、及びパルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE）法による分子疫学解析を行った。5 事例中 2 事例については、同一地域で同一時期に発生したもので、PFGE によるクラスター分析で 97.8% の相同性を示したが、この 2 事例については、疫学調査上で共通するものはなかった。他の 3 事例は、PFGE によるクラスター分析で相同性は認められなかった。

A. 研究目的

Campylobacter 属菌による食中毒事件の場合、食材から菌が検出されることが少なく、原因食材の究明が困難な場合が多々ある。2008 年北海道内で発生した *Campylobacter* 属菌による食中毒事件は 17 事例で患者数は 130 名であったが、その多くが原因食品を特定できていない。そこで、今回、2008 年に北海道内で発生した *Campylobacter* 属菌による食中毒の内、北海道衛生研究所で菌株を入手した 5 事例 24 株について、性状試験、Penner 型別、及び PFGE による分子疫学解析を行い *Campylobacter* 属菌による食中毒の原因究明方法について検討を行った。

B. 研究方法

保健所において食中毒患者から分離した *Campylobacter jejuni* 24 株を使用し、*Campylobacter* 属菌の性状試験（Corkscrew 状運動性、オキシダーゼ、カタラーゼ、37°C 好気培養による発育、25°C・42°C 微好気培養、ナリジク酸・セファロチン感受性試験、馬尿酸塩加水分解試験、インドキシル酢酸加水分解試験）、Penner 型別を実施した。

PFGE については、m-CCDA（OXOID）上で、*Campylobacter* 属菌の典型的な形態を示したコロニーを MUELLER-HINTON broth（MERCK）で 24 時間培養後、培養液を遠心し、ペレットのサイズが 2mm 程度になるまで濃縮し、10%ホルマリン加 TE（pH8.0）で 30 分間処理した後、TE で 3 回洗浄した。洗浄後 150 μ L の TE に懸濁し、Lysozyme を加えて 37°C 30 分間処理し、1% SeaKem Gold Agarose 150 μ L を加えてサンプルプラグキャスター 0.7mm（BIO-RAD）でプラグとした。プラグは、Proteinase K で 50°C Over Night 処理し、制限酵素 Kpn I により酵素処理後、CHEFF DR II（6V、Initial Switch time 0.5s、Final Switch time 35.0s、20hours、0.5 \times TBE、14°C）で電気泳動した。クラスター分析は、Fingerprinting II（類似係数：Dice、デンドログラムタイプ：UPGMA、トランス設定：1.0%）を使用した。

C. 研究結果

事例 1 は、摂食者数 33 名中患者 16 名で原因施設は A 地域の飲食店であった。原因食品は当該飲食店での提供食品であったが、特定されるまでには至っていない。事例 2 は摂食者数 10 名中患者 9

名で原因施設は A 地域の飲食店であった。原因食品は当該飲食店での提供食品であったが、特定されるまでには至っていない。事例 3 は、原因食品とも不明であったが道外旅行先で鶏の刺身を喫食していた事例であった。事例 4 は道内旅行先 B 地域で摂食した鶏の揚げ物が原因と思われる事例で、事例 5 についても道内旅行先 B 地域での摂食が原因と思われる事例であった。どの事例についても食材から *Campylobacter* 属菌は分離されていない。また、事例 1 と事例 2 については、同一地区ではあるもののそれぞれ異なる飲食店であり疫学調査上でも共通点は認められなかった。

各菌株の性状試験、Penner 型別の結果は表 1 のとおりであった。すべての株はオキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性、37°C 好気培養及び 25°C 微好気培養で発育せず、42°C 微好気培養で発育し、暗視野顕微鏡下で Corkscrew 運動を示した。馬尿酸塩加水分解陽性、インドキシル酢酸加水分解陽性で、ナリジク酸感受性、セファロチン耐性で、ナリジク酸耐性株は認められなかった。Penner 型別では、事例 1 の 11 株中 8 株が O 群で、残り 3 株は型別不能（以下 UT）であった。事例 2 の 7 株中 5 株が O 群で 2 株が UT、事例 3 では、1 株が F 群で、3 株が UT、事例 4 は C 群、事例 5 は UT であった。

PFGE の結果は図 1 のとおりで、事例 1 の 11 株と事例 2 の 7 株は、97.81% の相同性を示しクラスター Ca08A に分類した。事例 3 の 4 株も 96.01% の相同性を示し Ca08B に分類した。事例 4 は Ca08C に、事例 5 は Ca08D にそれぞれ分類した。

D. 考察

今回の 5 事例については、いずれも疫学調査上は関連性のない事例であったが、事例 1 及び事例 2 は Penner 型別で O 群が中心となり、PFGE においても同一クラスターに分類された。喫食調査では、それぞれ共通する食材は認められず、また、食材からの *Campylobacter* 属菌の分離もなかったが、事例 2 においては、とりわさと若鶏の唐揚げの提供があり、鶏肉の *Campylobacter jejuni* 汚染の可能性が強く示唆された。事例 1 においては、提

供食材に鶏肉は含まれておらず、また、*Campylobacter* 属菌による汚染の可能性が低い食材のみが使用されていた。これらのことを考えると、事例 1 においては、*Campylobacter jejuni* の 2 次汚染の可能性が高いと思われるが、疫学調査においては、同店舗での鶏肉の使用状況等は調査されていなかった。

Campylobacter 属菌による食中毒では、その潜伏期間が長く、また、*Campylobacter* 属菌の特徴として死滅しやすいため、原因食品の究明に至らないことが多く、再発防止等の対策が取りづらい。今回の各事例についても、原因食材の特定には至らなかったが、A 地域で同時期に発生した事例 1 と事例 2 から分離された *Campylobacter jejuni* が PFGE で同一のクラスターに分類され、Penner 型別でもほぼ一致した結果が得られたことは、共通する何らかの原材料の *Campylobacter* 汚染が原因として考えられ、同時期に流通していた鶏肉等を調査することで、原因食材の究明につながる可能性があると思われた。

E. 結論

2008 年に北海道で発生した *Campylobacter* 属菌による食中毒事例のうち、5 事例 24 株について性状試験、Penner 型別、PFGE を実施した結果、2 事例は、同一のクラスターに分類される *Campylobacter jejuni* が原因であることが判明した。他の 3 事例については、疫学調査上も、PFGE の結果も同様に、関連性のないものであった。

この 2 事例は、同一地域で同一の時期に発生しており、両施設に共通する何らかの原材料が *Campylobacter jejuni* に汚染されていた可能性が高いと思われ、同時期に流通していた鶏肉等を調査することで、原因食材の究明につながる可能性があると思われた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

なし