

いくためには、定期的に精度管理を行っていくことが必要であると考えられた。

共通菌株を用いて、IS 解析を実施した結果、いずれの施設もほぼ同一の成績であった。しかし、バンドが見難く判定が困難な場合も認められた。今後改良のための検討が必要である。IS 法はバンドの有無を「1」と「0」の数値で表現するため、異なる施設間どうしで比較する場合、非常に容易である。PFGE 法に比べ多様性はやや劣るという報告もあるが、より短時間で結果が判るというメリットを生かし、活用方法を考えていく必要がある。今回、東京都および埼玉県で、PFGE 法では相同性が比較できない株（スメア株）が多く検出された。IS 法で解析しデータを比較することで、その一部の株は同一クローン由来であった可能性の高いことが明らかとなった。

#### E. 結論

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 5 株を用いて、11 施設で PFGE 解析を行った。多くの PFGE 画像ではシャープなバンドが得られており、良好なものが多かった。しかし、一部ではバンドの分離が不十分である施設も認められた。

各施設で実施した PFGE 画像をもとにデンドログラム解析を行った。今年度からは新しく通信機能を備えた BioNumerics を導入し、解析を試みた。同一菌株で施設間の比較をした結果、同じ菌株同士では同じクラスターを

形成していた。しかし、いずれの菌株も全ての施設が 100%一致となった株は無かった。今後その原因について更に検討していく予定である。

共通菌株を用い各施設で実施した IS-printing system 解析では、いずれの施設もほぼ同一の結果であった。

IS 法は解析結果がコード化されるため施設間の比較が容易である。施設間で分離菌株の比較を行う際は、PFGE 画像のみではなく、IS 解析結果を添付することで比較がしやすくなると考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

準備中

#### H. 知的所有権の取得状況

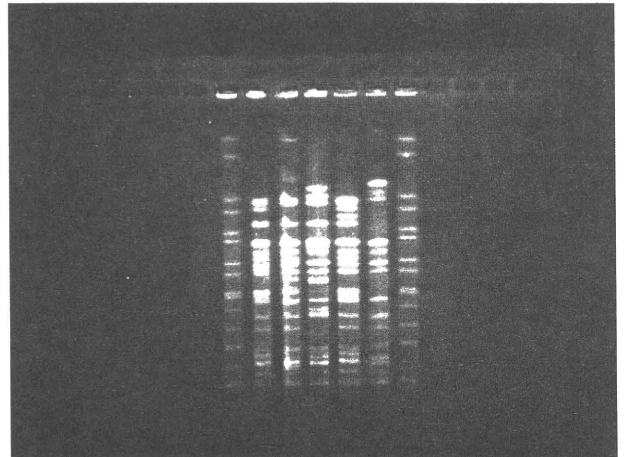
なし

写真1 共通菌株5株のPFGE画像

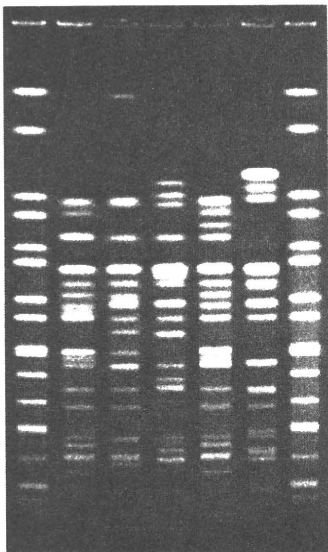
施設1



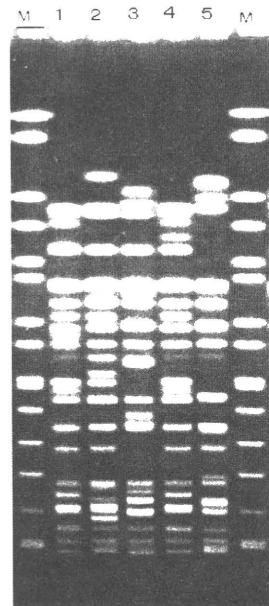
施設2



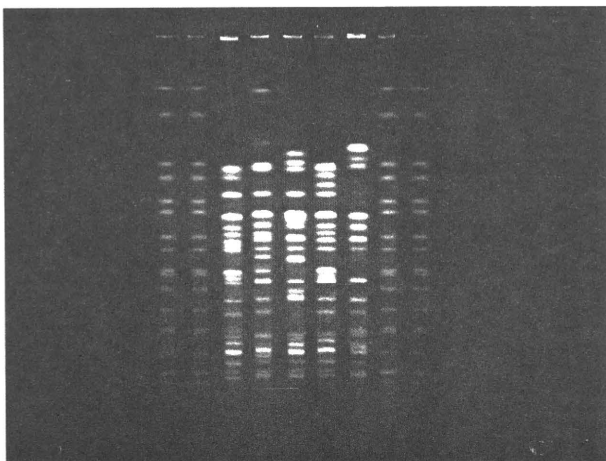
施設3



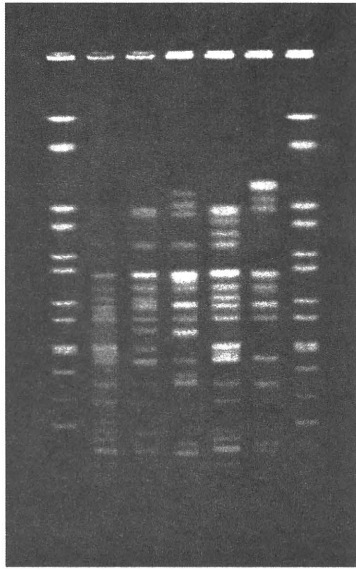
施設4



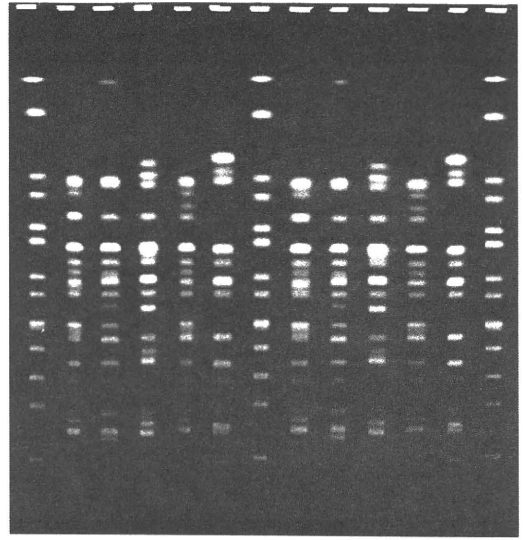
施設5



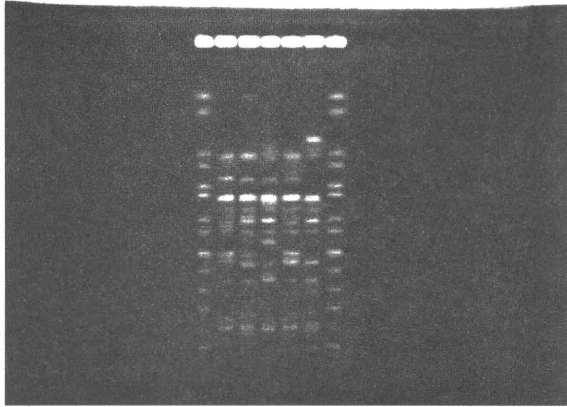
施設6



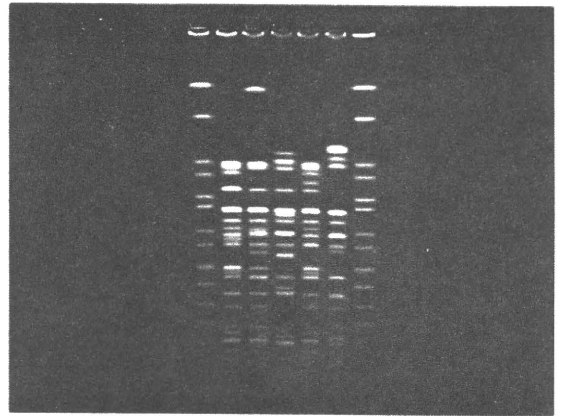
施設7



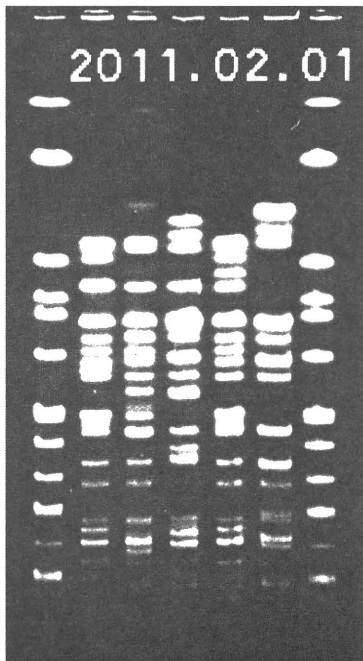
施設8



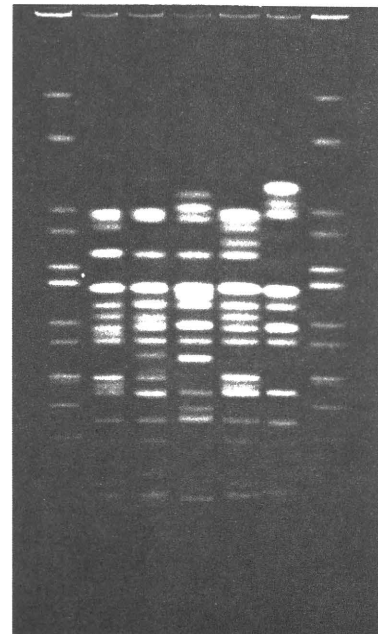
施設9



施設10



施設11



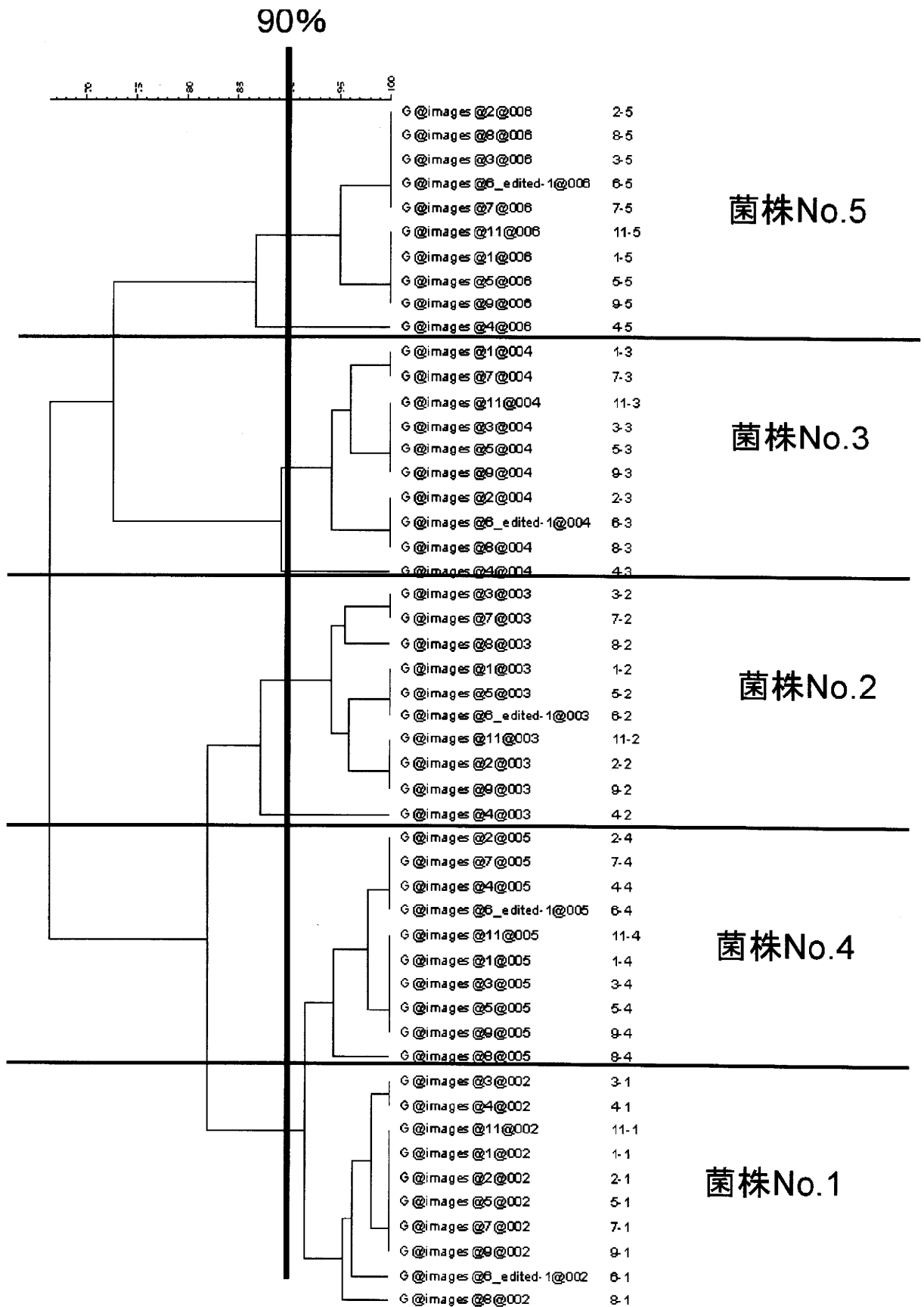


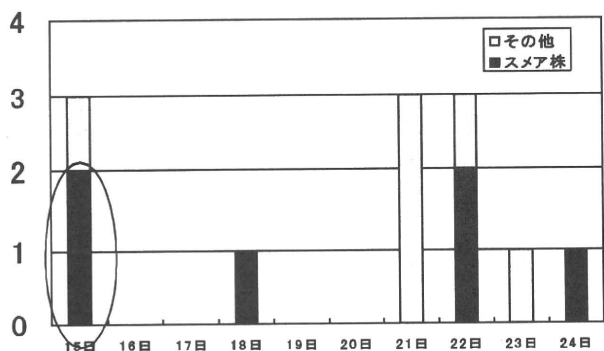
図1 各施設で実施した共通菌株5株のデンドログラム

# 事例1 PFGEパターンT-1000(スメア)を示す株の流行

東京都健康安全研究センター

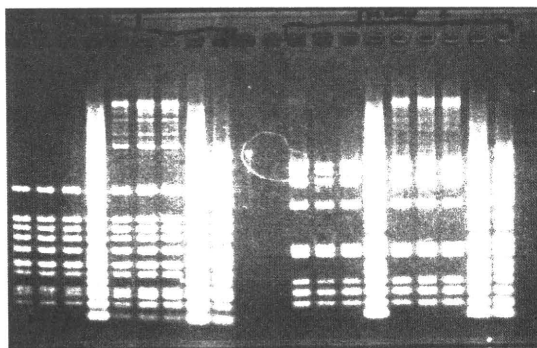
## 1. 6月の流行(O157, VT2)

2010年6月15日～24日までに搬入されたO157 12株のうち6株がT-1000型であった。



菌株搬入状況 (2010年6月)

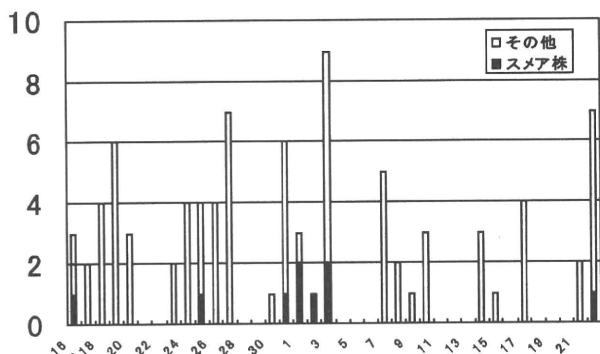
家族



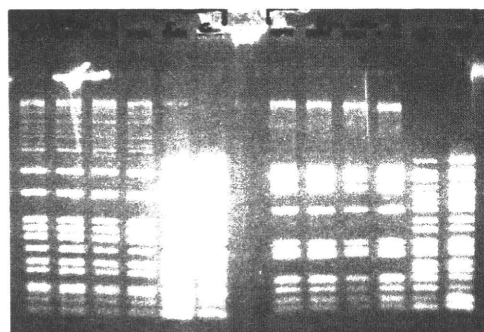
IS法による解析

## 2. 8～9月の流行(O157, VT1+VT2)

8月16～9月22日までに搬入されたO157株 87株のうち9株がT-1000型であった。



焼肉店で発生した食中毒事例  
(患者および牛レバ刺し由来株)



IS法による解析

### IS法による解析結果

- ・散発事例では、いずれも関連は認められなかった。
- ・埼玉県でもスメア株が4株検出されたため、IS法による解析を実施し比較した結果、埼玉県由来の3株と東京都6月分離株のISパターンが一致したことから、これらの株の由来は同一である可能性のあることが示唆された。
- ・PFGE解析では比較できない株についてはIS解析が有効であることが確認された。

## 事例2 EHEC食中毒事例由来O157分離株のPFGE法による解析

栃木県保健環境センター

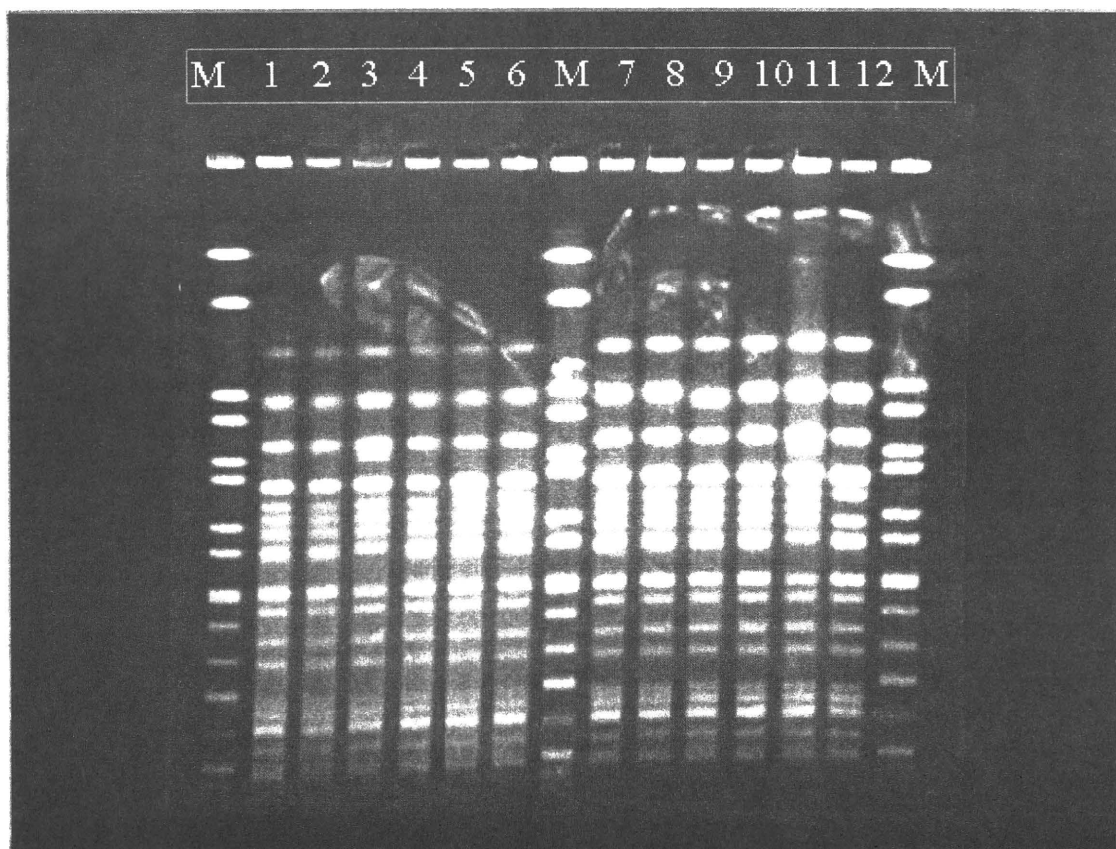


表2 PFGEに用いた食中毒事例由来O157分離株(平成22年度 栃木県)

菌株No.	年齢	性別	発生時期	発生態様	菌種	(毒素型)	感染研TypeNo.
1	8	M	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f173
2	10	F	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f171
3	12	F	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f174
4	11	M	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f171
5	10	F	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f171
6	3	M	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f171
7	12	M	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f173
8	17	F	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f171
9	8	M	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f172
10	16	F	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f173
11	28	F	H22.8	集団発生	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f173
12	38	M	H22.8	保菌者	EHECO157:H7	(VT1,VT2)	f241

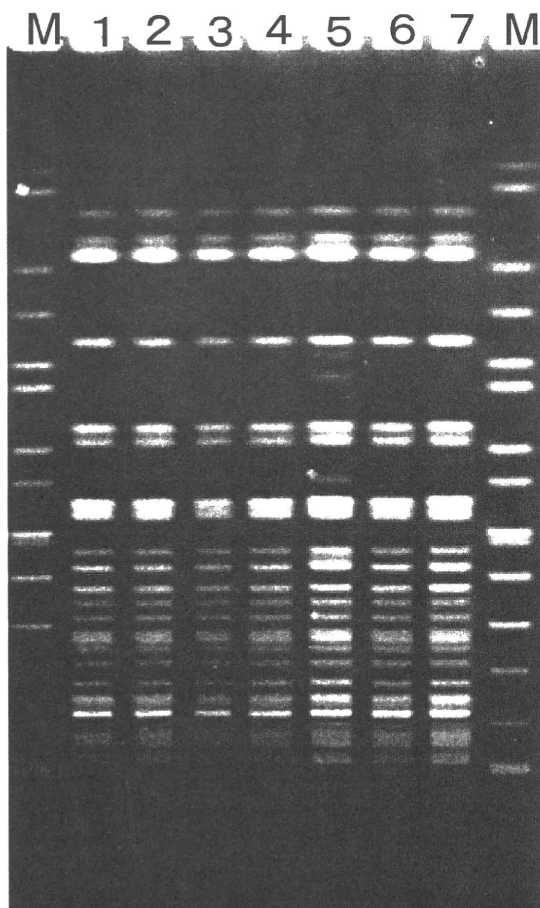
2009年8月に原因施設は特定されなかったが、祭りに出店していた店舗で販売された食品が原因食品とされた食中毒事例が発生した。祭りの参加者33名が発症し、PFGEを実施した結果、PFGEパターンはお互い類似しており、集団発生事例等で見られる変異パターン(バンド2~3本の違い)に該当すると判断された。

### 事例3 O157による集団事例

埼玉県衛生研究所

#### 事例概要

6月初旬に県北部の保育園においてO121:H19(VT2)集団感染事例が発生し、園児、職員など対象者145名の検査を実施したところ、園児及びその家族10名が菌陽性となった。初発患者を含めた発症者は1歳児クラスに集中し、保育園が提供した食事による患者発生とは考えられなかった。そのため保育園内での日常生活において感染が拡大したものと考えられた。



レーンNo.	菌株No.	血清型	毒素型	備考
1	EC10014	O121:H19	VT2	
2	EC10015	O121:H19	VT2	
3	EC10017	O121:H19	VT2	
4	EC10018	O121:H19	VT2	
5	EC10019	O121:H19	VT2	
6	EC10022	O121:H19	VT2	
7	EC10023	O121:H19	VT2	

Marker:S.Braenderup H9812/*Xba* I digest

制限酵素: *Xba* I

泳動条件

6 V/cm

2.2sec~54.2sec

19時間

buffer温度12°C

使用機器: CHEF DR II (BioRad)

## 事例4 2010年度に当所に送付されたO157散発事例由来株のPFGE解析

神奈川県衛生研究所

2010年度に当所に送付されたO157のうち、VT1&2およびVT2産生の主な菌株についてPFGE解析を行った。このうちVT2産生株であるレーンNo.10、11および12の菌株は、親子(No.11、No.12)および関係者(No.10)から分離され、疫学調査の結果から家庭内の同一感染源による事例由来であると推測された。これらの菌株のPFGEによる解析では、No.10およびNo.11が同一パターンであったが、No.12は上記2菌株との共通バンドに加えさらにバンド数が7本多いパターンであった。クラスター解析により算出された類似度は、No.10およびNo.11が98.6%を示したのに対し、No.12との類似度は90.2%および90.8%であった。

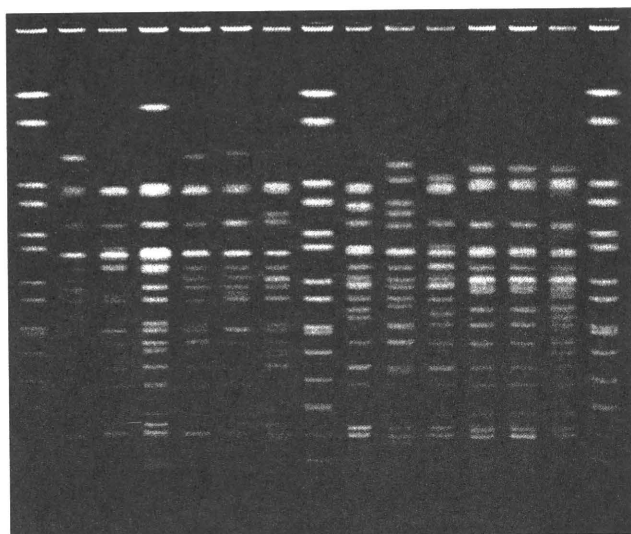


図1 PFGEパターン  
 レーンNo. 1-6 : VT1&2産生株  
 レーンNo. 7-12 : VT2産生株  
 M : *Salmonella* Braenderup H9812  
 8 12 11 10 9 7  
 3 6 2 1 5 4  
 泳動条件:6V、2.2-54.2s、19h

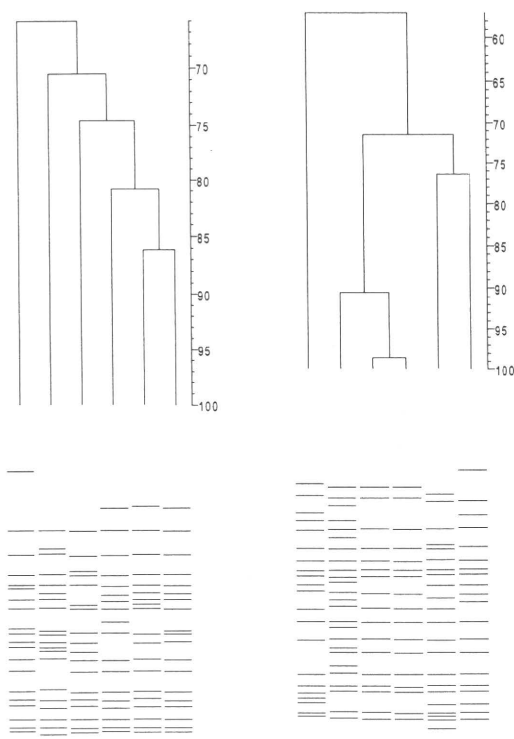


図2 デンドログラムによる解析結果  
 番号は図1のレーンNo.と同様



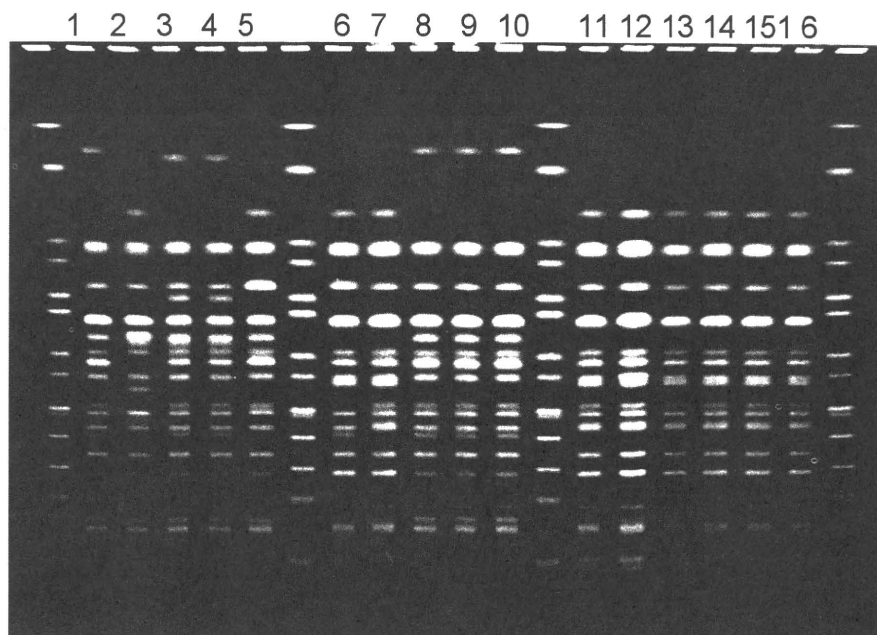
## 事例5 焼肉チェーン店における EHEC O157による広域散発食中毒について

横浜市衛生研究所

2009年12月から2010年1月にかけて、横浜市内に本社のある焼肉チェーン店を利用した EHEC O157 (VT1 & VT2) 患者らの発生が、沖縄県と関東近県で散発的に見られた。患者らが利用したのは沖縄県と関東地方合わせて13店舗で、患者14人と無症状病原体保有者1人が確認された。疫学的調査、各店舗から収去した牛サガリ(横隔膜)からEHEC O157 (VT1 & VT2) が複数検出されたこと及びこれらのPFGEパターンが患者のPFGEパターンと一致したことから牛サガリを原因食品とした広域食中毒事例であることが判明した。

当所では、牛サガリの汚染状況を調査するため、自主回収後倉庫に冷凍保管されていた牛サガリ42検体からEHEC O157 (VT1 & VT2) の検出を行い、その結果15検体が陽性となった。

市内で発生した患者株1株と、牛サガリ株15株についてPFGEを行った。その結果、加工日が異なる検体から同一のPFGEパターンが検出されたことや、同一加工日でも異なるPFGEパターンが検出されていることなどから、輸入時に既に牛サガリが複数のEHEC O157に汚染されていたと考えられた。また、国内の加工業者においてスライス加工した際に汚染が拡大した可能性も考えられた。

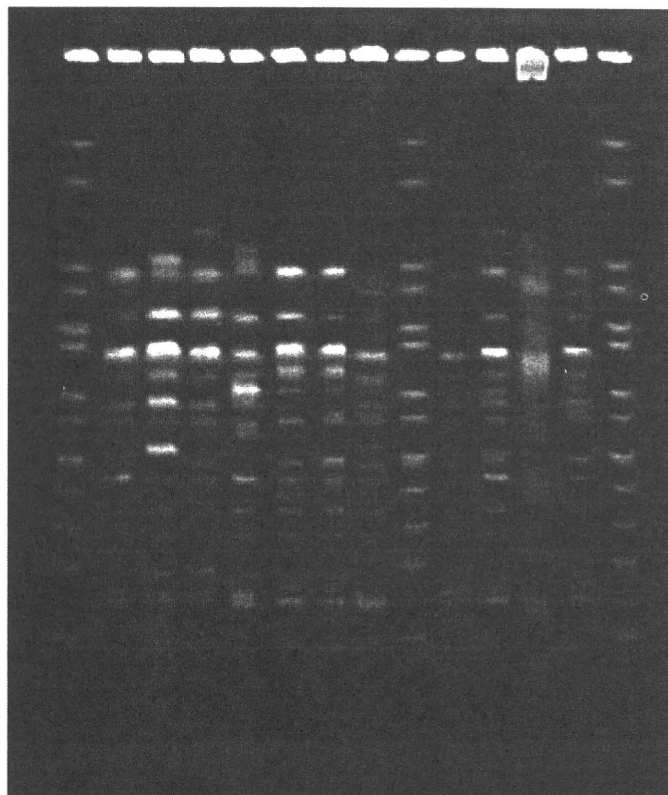


レーン No.	由来	加工日	PFGEパターン
1	患者		A
2	牛サガリ	2009/11/25	B
3	牛サガリ	2009/12/1	C
4	牛サガリ	2009/12/2	C
5	牛サガリ	2009/12/16	D
6	牛サガリ	2009/12/17	E
7	牛サガリ	同上	F
8	牛サガリ	同上	A
9	牛サガリ	同上	A
10	牛サガリ	同上	A
11	牛サガリ	同上	F
12	牛サガリ	2009/12/18	F
13	牛サガリ	同上	F
14	牛サガリ	同上	F
15	牛サガリ	同上	F
16	牛サガリ	同上	F

## 事例6 腸管出血性大腸菌O157のPFGEパターン

山梨県衛生県境研究所

M 1 2 3 4 5 6 7 M 8 9 10 11 M



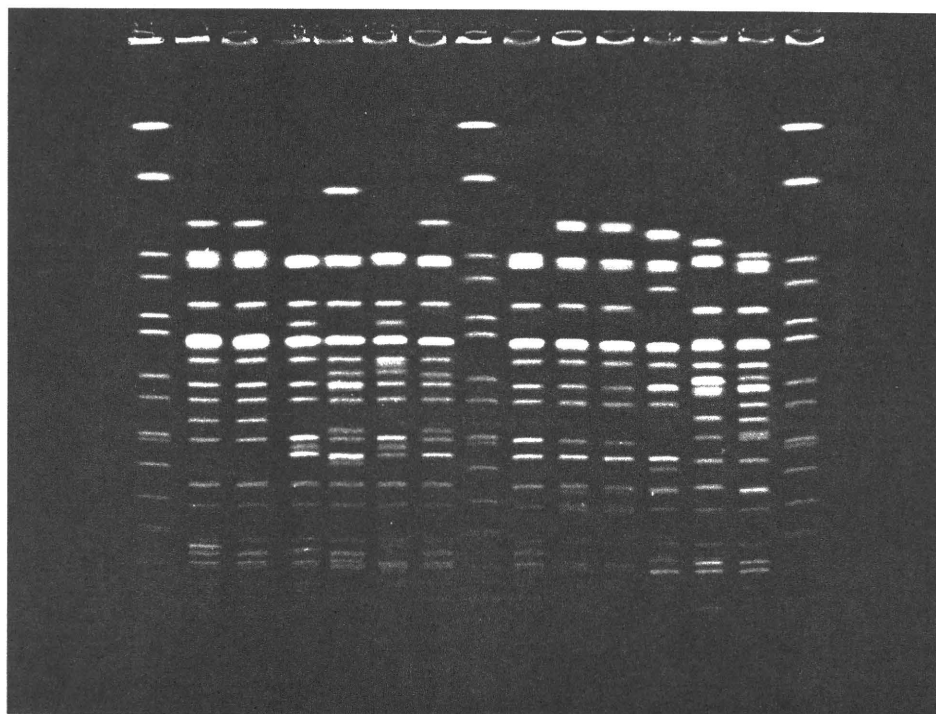
M: マーカー S. Braenderup H9812株

- |                  |                 |
|------------------|-----------------|
| 1: 3月29日発症       | 8: 9月16日発症(9の弟) |
| 2: 無症状(6月11日受入れ) | 9: 9月12日発症(8の姉) |
| 3: 6月 8日発症       | 10: 11月16日発症    |
| 4: 7月25日発症       | 11: 1月15日発症     |
| 5: 7月16日発症       |                 |
| 6: 無症状(5の母)      |                 |
| 7: 8月 9日発症       |                 |

## 事例7 平成22年度 EHEC O157集団／散発事例株

長野県環境保全研究所

No.	分離年月	血清型	毒素型	年齢	性別	摘要
1	2010.9	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	1	F	A集団感染事例 代表株 ①
2	2010.9	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	3	M	A集団感染事例 代表株 ②
3	2010.8	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	92	M	散発事例
4	2010.8	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	20	F	散発事例
5	2010.9	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	18	F	散発事例
6	2010.10	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	23	M	散発事例
7	2010.10	O157:H7	Stx <sub>1+2</sub>	41	M	散発事例
8	2010.8	O157:H7	Stx <sub>2</sub>	86	F	B集団感染事例 代表株
9	2010.11	O157:H7	Stx <sub>2</sub>	5	M	散発事例
10	2010.8	O157:H7	Stx <sub>2</sub>	4	M	散発事例
11	2010.8	O157:H7	Stx <sub>2</sub>	28	M	散発事例
12	2010.9	O157:H7	Stx <sub>2</sub>	3	M	散発事例



## 事例8 *Salmonella* Nagoya食中毒事例の概要および分離株のPFGE画像

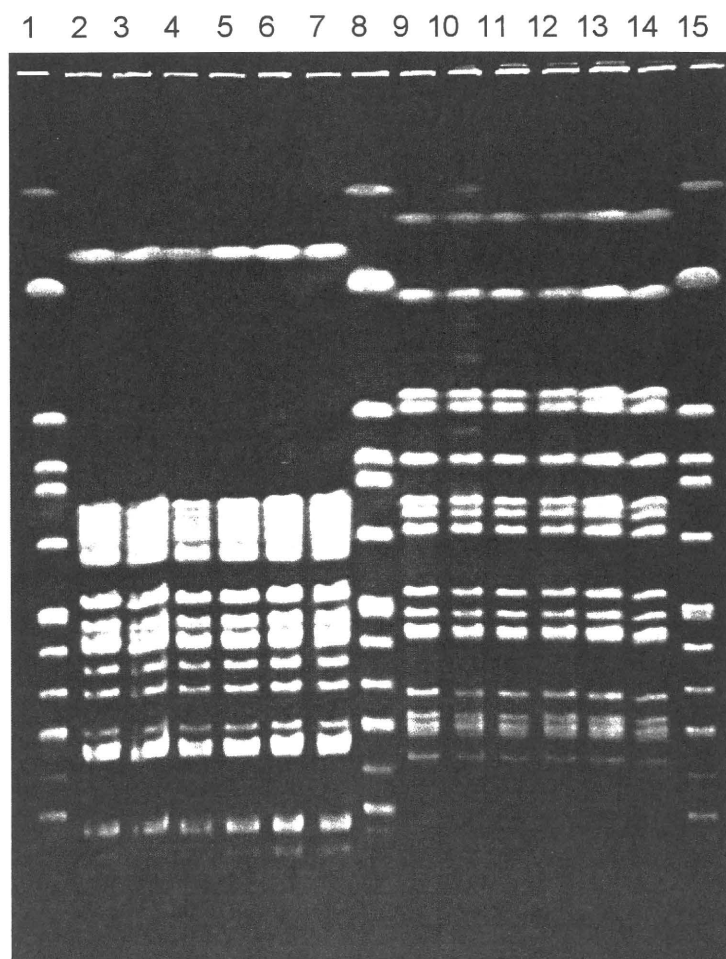
静岡県環境衛生科学研究所

### 概要:

平成22年6月5日に静岡県富士市内の病院において、病院給食(朝食)を喫食した入院患者等174人中37人が、6月7日午前5時から、発熱、下痢を主徴とする症状を呈し、医師の診察を受けたところ、食中毒と診断された。

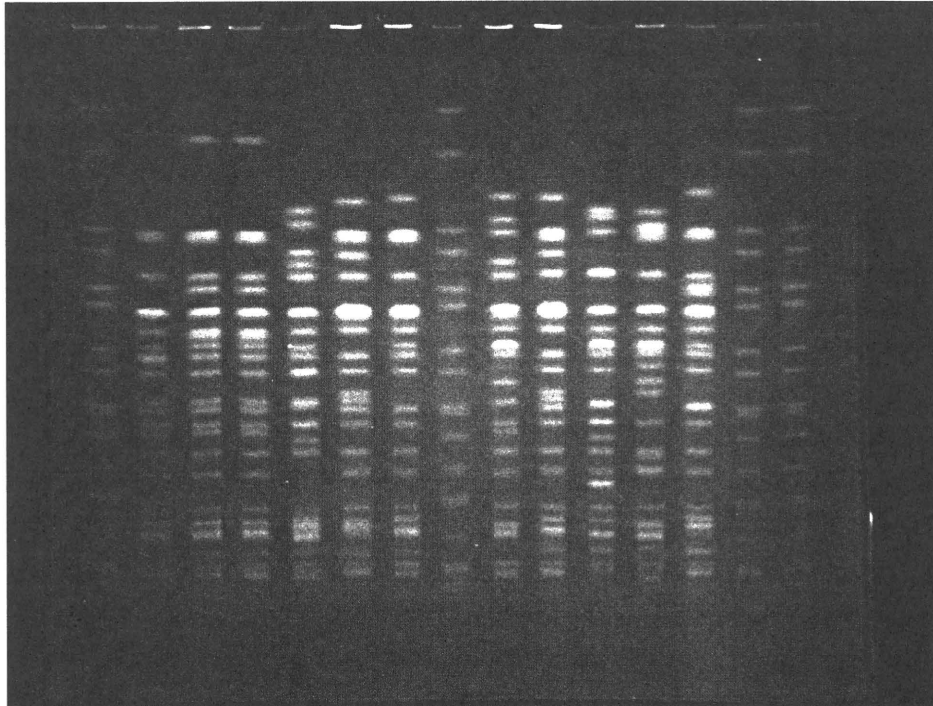
1,8,15レーン : DNAサイズマーカー(*S. Braenderup* H9812)  
2~7,9~14レーン : 患者由来株

2~7レーン 制限酵素:*Xba* I, 9~14レーン 制限酵素:*Bln* I



事例9 O157分離株のPFGEパターン

千葉県衛生研究所



検査開始 年月日	検体 番号	管轄	RPLA		保存 番号	備 考
			VT 1	VT 2		
2.19	75-1				CSH10001	
1.05	2	松戸	+	+	CEC10001	A焼肉関係
1.13	11	松戸	+	+	CEC10003	A焼肉関係
1.15	2-3	松戸	+	+	CEC10006	A焼肉関係
3.18	143-1	海匝	-	+	CEC10010	家族内感染:T
7.09	303-2	船橋	+	+	CEC10032	家族内感染:S
8.09	417-2	市川	+	+	CEC10047	家族内感染:I
9.30	536	松戸	-	+	CEC10075	家族内感染:Ta
10.1	546	印旛	+	+	CEC10096	家族内感染:Sa HUS患者の家族
10.08	563-1	習志野	-	+	CEC10097	家族内感染:F
10.21	598-2	松戸	-	+	CEC10106	家族内感染:Te
10.21	599	千葉市	+	+	CEC10107	家族内感染:N

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方9地方衛生研究所及び衛生試験所によるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）活用状況調査とPCR型別法（IS printing system及びPOT法）の実施

主任研究者 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  
北川恵美子 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

研究要旨

1) PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査

平成22年度東海・北陸9地方衛生研究所及び衛生試験所（地研）の行政への還元に関する調査では、それぞれ8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8地研の泳動図は疫学調査等に活用されるのに十分な画質を有していた。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2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、0145、サルモネラ、及びエンテロバクタークロアカであった。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、及び院内感染原因菌も念頭に置いて実施すべきであると思われた。また、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、エンテロバクターのようなそれ以外の病原菌の集団事例に対しても十分応用可能であることが証明された。

2) 0157のPCR型別法であるIS printing system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のみで報告して良いか。2) PFGEとIS printing system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。

3) 黄色ブドウ球菌のPCR型別法であるPOTの実施

6地研で行った検討ではPOT型とエンテロトキシン型及びコアグラージェ型はよく一致し、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POTの方がPFGEより優っていた。よって本法はPFGEと同様、集団発生時の疫学解析の有力な手段とな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 0157 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、0157、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) PFGE 精度管理、2) 東海・北陸ブロック地方衛生研究所(地研)及び衛生試験所 PFGE 担当者を愛知衛研に集め、PFGE 実施手順に関する研修会の実施、3) 0157 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 0157 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 0157 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 22 年度の活動内容は 1) 東海・北陸ブロック各地研が 0157 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。2) 0157 の PCR 型別法 IS printing system ver2 (東洋紡)及び黄色ブドウ球菌の PCR 型別法である Cica Geneus Staph POT KIT (関東化学)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. 行政への還元に関する調査

平成 22 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。

### 2. IS printing system ver 2 の実施

添付のプロトコールに従い東海・北陸 7 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。

### 3. Cica Geneus Staph POT KIT の実施

東海・北陸ブロック内 7 施設で検出された黄色ブドウ球菌について Cica Geneus Staph POT KIT (関東化学)を実施した。方法は添付のマニュアルに従って行った。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、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. PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査と IS printing system の実施

東海・北陸 9 地研のうち 8 地研(福井県、富山県、岐阜県、岐阜市、三重県、名古屋市、岡崎市、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(福井県、岐阜市、名古屋市、愛知県)が 2 事例であった。また、IS printing system ver2 は東海・北陸 9 地研のうち 7 地研(石川県、富山県、岐阜県、岐阜市、三重県、名古屋市、愛知県)では今年度発生した集団発生株、若しくは散發事例株について実施した。なお図、表は G. 研究発表の後に県、市別に掲載した。

福井県: 1) サルモネラ食中毒事例の PFGE (XbaI 処理) 事例概要: 平成 22 年 10 月 8 日探知。健康福祉センターが調査した結果、患者らは 10 月 2 日、3 日に飲食店において食事をしており、食事した 9 名中 6 名が下痢、発熱等の症状を呈していた。患者および従事者の便ならびに施設の拭き取り検体からサルモネラ・インファンティスが検出され、同施設で提供された料理を原因とする食中毒と断定された。

2) 0145:HNM の家族内事例株および散発事例株の PFGE (*Xba*I 処理)。12, 13 は、7 月 26、27 日に発症し、8 月 3 日に届出。16 は健康保菌者。12, 13, 16 はそれぞれ、同一家族由来。

13, 16 は発症の 2 日前に、同一店舗で焼肉を喫食。21 は、8 月 16 日に発症し、8 月 22 日に届出。発症の 5 日前に焼肉 (ホルモン含む) を喫食。患者の住所が 12, 13, 16 と比較的近かった (同一保健所管内) ことから、PFGE を実施したが、毒素型は異なっていた。

富山県は富山県において発生した EHEC 感染事例と PFGE・IS-Printing 実施 (2010 年 1 月—9 月)を行った。

このうち、0157(stx1 stx2) 感染事例 (表 1、事例 No. 3 を除く No. 1-8 の 7 件) について分離株の PFGE および IS-Printing による型別を行い、各事例の関連性について検討した。PFGE は標準化プロトコールに基づいて行い、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 dendrogram 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。IS-Printing は IS-Printing kit 添付プロトコールに従って行った。IS-Printing により得られた PCR 反応の陽性パターンを、大阪府立公衆衛生研究所のコード変換法 (平成 20 年度報告書参照) に準じ、12 桁の数値からなる IS-コードに転換した (表 2)。

富山県衛生研究所 細菌部 木全恵子 嶋智子 柏島伊津子 金谷潤一 磯部順子 倉田毅 綿引正則

平成 22 年 1 月～9 月にかけて富山県で発生した EHEC 感染事例は 9 件であり、散発 6 件、家族内感染事例 2 件、集団感染事例 1 件であった。血清型および毒素保有型による内訳は 0157(stx1 stx2) 7 件、0157(stx2) 1 件、O111(stx1) 1 件であった。このうち、0157(stx1 stx2) 感染事例 7 件のうち、4 件は 8 月に発生していた (表 1 事例 5-事例 8)。また、集団感染事例は保育所を中心とした感染事例であり、感染者は 22 名 (有症者 11 名、無症状保菌者 11 名) であった (表 1 事例 6)。

その結果、感染者由来分離株は事例ごとに異なる PFGE パターンおよび IS-コードを示した (表

2、図 1)。また、事例 6 (集団感染事例) では 3 つの PFGE パターンおよび 2 つの IS-コードを示した (表 2、図 1 レーン 3-5)。これらは PFGE パターンでは 1-2 バンド、IS コードでは 1 バンド異なるのみであった (表 2)。2010 年 8 月には事例 6 を含めた 4 件の 0157(stx1 stx2) 感染事例が発生しており (表 1 事例 5-8)、関連性を疑い PFGE 及び IS-Printing による解析を行った。しかし、いずれの事例の分離株も PFGE パターンもしくは IS-コードの一致はみられず、関連性は低いと考えられた。

岐阜県は今年度に県内で分離された 23 株の EHEC 0157 について、制限酵素 *Xba*I による PFGE を行った。PFGE 型別結果は、疫学情報及びパルスネットの PFGE 型別結果と一致した。また、IS printing system ver2 については供試菌株：平成 20 年 5～8 月に岐阜県内で分離された EHEC 0157 12 株 (散発、家族内、集団発生 各 4 株)。テンプレートの調製：アルカリ溶解法。泳動ゲル：3% アガロースゲル (NuSieve GTG:SeaKem GTG = 2:1)。泳動 Buffer：0.5×TBE。泳動条件：100 V、60 分。結果及び考察：泳動像において 1kb 以上の高分子量側に非特異バンドが多く見られたが、判定に影響することはなかった。供試した 12 株の IS-printing 型別の結果は、パルスネットによる PFGE 型別結果とすべて一致した。また家族内や集団発生といった疫学情報とも一致した。従って今回の結果においては、IS-printing System は PFGE と同等の識別能力であった。IS-printing System は PFGE にはない迅速性、簡便性という特長から、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。

岐阜市は *E. coli* (EHEC) および *Enterobacter cloacae* の PFGE を実施した。レーン 1, 6 及びレーン 2, 7 は、2010 年 8 月に岐阜市内の病院で分離された EHEC 0157 である。患者はいずれも同一の焼肉店で生肉等を喫食しているが、喫食日は異なっている。レーン 1, 6 とレーン 2, 7 ははっきりと確認できるバンドの違いは 2 本程度であり、かなり近縁の菌であるといえる。レーン 3, 8、レーン 4, 9、レーン 5, 10 は飲食店のふき取り検体から分離した *Enterobacter cloacae* である。PFGE 上ではすべてバンドが一致しており、同一の菌であるといえる。また IS-printing



System は患者 2 名、接触者 1 名由来計 3 株について実施した。その結果、3 株のバンドパターンは全て一致していた。

岐阜市民病院入院患者及び接触者から分離された腸管出血性大腸菌 0157 の IS-Printing System の結果報告。

平成 22 年 11 月に岐阜市民病院より地域保健課へ腸管出血性大腸菌 0157 患者の届出があった。当所で患者接触者 3 名のうち 2 名の検便を実施した結果、1 名から腸管出血性大腸菌 0157 が分離された。そこで岐阜市民病院から患者菌株（衛試 1274 株）を取り寄せ、接触者菌株（衛試 1273 株）との比較検討を行った。

接触者検便の増菌菌液から分離されたコロニーの性状は、クロモアガー0157TAM 培地上で藤色のコロニー、CT-SMAC 培地上では白色でやや透明なコロニーであった。大腸菌免疫血清による O 抗原型別を行ったところ、混合 3 血清及び 0157 単味血清で凝集を認めた。グラム染色ではグラム陰性桿菌であった。API20E 等で生化学的性状を確認したところ、Escherichia coli と一致した。これらの結果から、腸管出血性大腸菌 0157 であると同定した。VT 遺伝子型別の結果、VT2 遺伝子が検出された。また、市民病院入院患者から分離された腸管出血性大腸菌 0157 株の VT 遺伝子型別を行ったところ、VT2 遺伝子が検出された。

三重県は 2010 年に三重県で検出された腸管出血性大腸菌 026 9 株を PFGE で解析した。その結果、Lane 2~4 の集団事例由来 3 株と Lane 5 の散發事例由来 1 株が同一パターンとなった。また、Lane 8 と 9 の散發事例由来 2 株が同一パターンとなった。

北勢地域で検出された腸管出血性大腸菌 0157 について IS printing 解析を行った。2010 年 7 月から 9 月に桑名・四日市市保健所管内で検出された 23 株の腸管出血性大腸菌 0157 を IS printing により解析を行った。23 株が 10 パターンに分類され、パターン A が散發事例由来 7 株と家族内事例由来 3 株の計 10 株あり、Diffuse outbreak が疑われた。また、Lane 12 及び 13 は、1 つの家族内事例から分離された株であったが異なるパターンを示した。

名古屋市は今年度市内で発生した 0157 集団事例株 8 株、及び保育園で発生した 026 集団事例

株 1 2 株について PFGE を実施した。その結果、0157 では 8 株中 7 株の PFGE バンドパターンが一致した。IS-printing System は集団事例由来 8 株株について実施した。その結果、8 株中 7 株はバンドパターンは全て一致していたが、1 株は異なっていた。また、その結果は PFGE と一致していた。

岡崎市では本年 6 月から 7 月にかけて、EHEC 0157 による感染症が多発した。調査の結果、多くの感染事例では焼肉を食べており、そのうちの 1 事例において、患者からの分離株 (A-123) と当該焼肉店の従業員からの分離株 (A-124) の PFGE がほぼ一致し、当該焼肉店による食中毒が強く疑われた。また、同一家族内感染 (A-108~A-113) においても PFGE を実施することで、同一菌株による感染であると推定された。6 月から 7 月に集中して発生した 0157 菌株の PFGE を実施することで、事件にならなかった事例も含め、多くの検出菌株が同一又は類似の株であることが推定された。

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 細菌・飲料水グループ

腸管出血性大腸菌 O157 IS-printing 法の検討

[目的]2010 年に、石川県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例 15 例について、

IS-printing 法を実施し、PFGE 法と IS-printing 法を比較しその有用性について検討した。

[使用菌株]2010 年に石川県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例 15 例から分離された 17 菌株を使用した。菌株の詳細については、表 1 のとおりである。

[方法]

1) IS-printing 法

IS-printing System キットを使用した。

なお、3%アガロースゲルには、NuSieve GTG : SeaKem GTG=2 : 1 を使用し、0.5×TBE

buffer を用い、Mupid で 100V、80 分、電気泳動を行った。

2) PFGE 法

国立感染症研究所による解析結果を使用した。

[結果および考察]使用菌株 17 株は、PFGE 法では 12 タイプ、IS-printing 法では 7 タイプに

型別され（表 2、図 1、図 2）、PFGE 型が同一である菌株は、IS-printing コードも同一を示した。一方、PFGE 型が f75、f140、f198、f199、f379 については、同一の IS-printing コードとなった。このことから、IS-printing 法の識別能力は PFGE に比べ、若干劣るものの、有用な分子疫学型別法であると思われた。

今回、PFGE 型の 1 バンド違いの家族内事例を検討したところ、No. 8 と No. 9 については、

同一の IS-printing コードであったが、No. 11 と No. 12 については、IS-printing コードはバンド 1 本の差がみられた。IS-printing コードの場合、どのくらいのバンドの差であれば、相同ありと解釈できるのか、さらに検討が必要であると思われた。

愛知県では集団事例株を含む 18 株の 0157、及び散发事例由来 026 の 6 株について PFGE を実施した。その結果、18 株の 0157 では 3 つのバンドパターンが認められた。さらにその結果は、IS-printing System の結果と一致していた。また、6 株の 026 の PFGE パターンは 3 つのパターンに分かれた。

## 2. Cica Geneus Staph POT KIT の実施

東海・北陸 9 地研のうち 6 地研（石川県、富山県、岐阜県、岐阜市、三重県、岡崎市）では食中毒由来、及び院内感染由来株について POT を実施した。なお図、表は G. 研究発表の後に県、市別に掲載した。

### 1) 食中毒由来黄色ブドウ球菌

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 細菌・飲料水グループ

〔目的〕黄色ブドウ球菌食中毒と判断するには、分離された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型、エンテロトキシン型別が一致することが因果関係判定の重要な基準となる。しかし、コアグラゼ型別やエンテロトキシン型別は、結果が判明するのに 2、3 日要し、迅速性に欠ける。一方、近年、MRSA の分子疫学解析の手法として POT 法が開発され、その有用性が確認されている。今回、食中毒調査で分離された黄色ブドウ球菌の菌株について、POT 法を行い、コアグラゼ型およびエンテロトキシン型、PFGE 解析と比較し、

迅速な型別法としての有用性を検討した。

### 〔使用菌株〕

食中毒関連調査で分離された黄色ブドウ球菌 14 株について実施した。内訳は、患者 5 名から分離された 10 株、従業員 1 名の手指の拭き取りから分離された菌 1 株、冷蔵庫内部の拭き取りから分離された 1 株、フキン拭き取りから分離された 2 株である。なお、菌株の由来、コアグラゼ型、エンテロトキシン型については、表 1 のとおりである。

### 〔POT 法〕

シカジーニアス DNA 抽出試薬により DNA 抽出を行い、POT キットを用いて解析した。電気泳動は、4%アガロースゲル（Certified PCR Agarose (BIO-RAD)）、1×TBE buffer を用い、Mupid で 90 分行った。また、DNA size standard には 100bp DNA ladder (TaKaRaBio) を使用した。

### 〔結果〕

使用菌株 14 株について、POT 法を行った結果、コアグラゼ型およびエンテロトキシン型、由来が同一であった No. 5 および No. 6（患者 C 糞便）、No. 7 および No. 8（患者 D 糞便）、No. 9 および No. 10（患者 E 糞便）、No. 11、No. 12 および No. 13（従業員 G の手指拭き取り、冷蔵庫内部拭き取り、フキン拭き取り）の各々の POT パターンは一致した（表 2、図 1、2）。また、それらは、PFGE 解析においても、同一 DNA パターンであった（図 3）。

### 黄色ブドウ球菌 PFGE 解析

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 細菌・飲料水グループ

〔目的〕2010 年に発生した食中毒事例において、患者糞便および拭き取りから分離された黄色ブドウ球菌 14 株について、PFGE 解析を行い、相同性を確認した。

〔使用菌株〕食中毒関連調査で分離された黄色ブドウ球菌 14 株について実施した。内訳は、患者 5 名から分離された 10 株、従業員の手指の拭き取りから分離された 1 株、冷蔵庫内部の拭き取りから分離された 1 株、フキン拭き取りから分離された 2 株である。なお、菌株の由来、コアグラゼ型、エンテロトキシン型について

は、表1のとおりである。

[方法]PFGE 法は、使用菌の PFGE 用アガロースブロック (Certified Megabase Agarose

(BIO-RAD) を Lysozyme および Lysostaphin 処理、ProteinkinaseK 処理を行った後、制限酵素 Sma I (ニッポンジーン) 消化処理を行った。そして、ブロックを 1%アガロースゲル

(Seakem®Gold Agarose (TaKaRa Bio) 、0.5×TBE buffer を用い、CHEF DRIII System

(BIO-RAD) で PFGE を行った。なお、泳動は 6 V/cm、パルス角度 120 度、スイッチングタイム 1 秒~40 秒で 20 時間行った。対照として、DNA size standard である Lambda Ladder

(BIO-RAD) を泳動した。

[結果] 使用菌株 14 株について、PFGE 解析を行った結果、従業員 G の手指拭き取りから分離された No. 11、冷蔵庫内部拭き取りから分離された No. 12 およびフキン拭き取りから分離された No. 13 の 3 株の DNA パターンは一致した (図 1)。また、患者 C 糞便から分離された No. 5 と 6、患者 D 糞便から分離された No. 7 と 8、患者 E 糞便から分離された No. 9 と 10 についても、各々、同一パターンを示した。

[考察] 本食中毒は、疫学調査および細菌検査の結果から、黄色ブドウ球菌を原因とする食中毒であると判断されている。その根拠のひとつは、拭き取り(従業員 G 手指、冷蔵庫内部、フキン)から分離された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型およびエンテロトキシン型が一致したことである(患者糞便と拭き取り検体のコアグラゼ型およびエンテロトキシン型が一致しなかった理由として、原因である黄色ブドウ球菌は、加熱されたため、患者糞便から検出されなかったと推測されている。なお、当該食品の残品がなかったため、食品中のエンテロトキシン試験は実施できなかった)。今回、PFGE の結果において、それら拭き取りから分離された菌株の DNA パターンが一致したことから、さらにこれらが相同である確率を高めることができた。また、同一由来でコアグラゼ型、エンテロトキシン型が一致している菌株は、同一 DNA パターンを示し、コアグラゼ型、エンテロトキシン型が不一致の菌株は、DNA パターンも異なっていた。

以上のことから、黄色ブドウ球菌の PFGE 解析は、分子疫学解析として有用な方法であることが示唆された。

富山県衛生研究所 細菌部

木全恵子 嶋智子 柏島伊津子 金谷潤一 磯部順子 倉田毅 綿引正則

本年度パルスネット研究班課題として、黄色ブドウ球菌の POT 型別法の有効性について検討を行った。POT 法はマルチプレックス PCR による遺伝子型別法であり、主に MRSA の分子疫学的解析において有効である。今回、この POT 法により、MRSA 以外の黄色ブドウ球菌(食中毒事例など)について POT 型別法の有効性を検討した。

供試菌：解析対象は表 1 に示した。No. 1-9 は同一食中毒事例により分離された黄色ブドウ球菌であり、No. 10-14 は同一施設の検便により得られた黄色ブドウ球菌である。

方法：これらの株についてシガジーニウス分子疫学解析 POT キット(関東化学)添付プロトコールに従い、POT 型別法を行った。得られた PCR 産物の電気泳動には 4%アガロース(Nusieve GTG Agarose : SeaKem GTG Agarose=2:1 混合、1×TBE buffer)を、泳動装置には Mupid ミニゲル電気泳動装置を用いた。PCR 陽性をスコア 1、陰性をスコア 0 として各 PCR 産物の POT 係数を乗じ、POT1、POT2、POT3 のグループごとに加算した(表 2)。

PFGE は標準化プロトコールに基づいて行った。プラグの溶菌処理は 67ug/ml Lysostaphin(Wako)添加処理(37℃ 一晚反応)後、Proteinase K 処理を行った。PFGE は、制限酵素 SmaI を用い、泳動条件(1-40s 20 時間泳動、14℃)で行った。得られた画像は FingerPrintingII によりデンドログラム解析を行った。

結果と考察：菌株の POT 型は分離検体の各由来(No. 1-9 および No. 10-14)ごとにコアグラゼ型また PFGE パターンに対応しており(表 1、図 1)、食中毒事例及び施設検便などの同一集団の複数検体より分離された黄色ブドウ球菌から同一クローン株を迅速に検索するには有効であると思われた。黄色ブドウ球菌の検査において、1 つの検体からコアグラゼ型の異なる黄色ブドウ球菌が分離されることは多い。このため食中

毒検査の場合、原因となった黄色ブドウ球菌と常在するブドウ球菌を区別し、検査対象を絞り込む必要がある。まず、病原因子であるエンテロトキシンやコアグララーゼ型の同定を行う（エンテロトキシン型別の場合は PCR もしくは RPLA を、コアグララーゼ型別は抗血清による血漿凝固中和を用いる）。しかし、1 株につきエンテロトキシン型別では 5 タイプ、コアグララーゼ型別では 8 タイプの型別を行うため、複数株の型別には多大な労力と時間が必要である。さらに、PFGE による型別を行う場合は、グラム陽性菌であるためプラグ作製に Lysostaphin と Proteinase K 処理の 2 段階による溶菌作業を伴うため、PFGE の作業工程は 4 日程度の労力と時間が必要となる。POT 法による型別は同一クローン株を検出することができ、特に食中毒発生時に原因食品等の迅速な検査に利用できると思われる。MRSA の場合と異なり、今回 POT 型別を行った食中毒事例や検便由来の黄色ブドウ球菌の POT 型別で PCR 陽性のスコアは全体に低い傾向であった。このため、今後は食中毒事例や施設検便等で分離された黄色ブドウ球菌について各型別のデータの集積を行い、POT 型の型別能を検証すること、各コアグララーゼ型や PFGE 型別との関係についての検討が必要であると考えられる。

岡崎市は 3 食中毒由来 32 株について実施した。その結果、POT パターンは PFGE の結果と一致し、さらにエンテロトキシン型、コアグララーゼ型ともよく一致していた。

## 2) 院内感染由来株等

### 岐阜県

供試菌株：平成 12～18 年に岐阜県内の 3 病院で分離され、PFGE 検査が実施された MRSA 約 400 株の中から、PFGE 型や発生状況をもとに 12 株を選択した。また対照として愛知衛研から分与された POT 型既知の 2 株（愛知番号 2003B069、2002N281）を加えた計 14 株を供試した。

- ・テンプレート調製：Cica Geneus DNA 抽出試薬
- ・泳動ゲル：4% NuSieve 3:1
- ・泳動 Buffer：0.5×TBE
- ・泳動条件：100 V、67 分

結果及び考察

## ○泳動像

取扱説明書に記載されているように femA のバンドが薄くなる株があったが、POT 型別のバンドはすべて明瞭に検出された。非特異バンドもほとんどなく、また IS-printing のようにバンド間隔が狭い所がないため、判定は容易であった。

## ○PFGE との比較

PFGE 型が同一の 2 組（No. 1, 2 及び 3, 4）は、POT 法では各々異なる型を示した。これは PFGE 型が同一の株の中から、あえて分離された年及び病院が異なる株を選択したためと思われる。また逆に PFGE 型が異なるが、同一の POT 型を示した株（No. 1, 4）もあった。これら以外の PFGE 型が異なる 8 株は、POT 法においてもすべて異なる型を示した。従って、供試株数は少ないが POT 法は PFGE と同等の識別能力を持つと思われた。

## ○POT1 の値による流行クローンの判定

複数の病院で複数年にわたって多数分離されていた PFGE 型 A, B の株（No. 1～4）は、すべて POT1 の値が NY/Japan クローンを示す 93 となった。また小児流行クローンの POT1 型 73 を示した No. 6 の株は、NICU で分離された株であった。

PFGE と同等の型別結果が迅速簡便に得られるのみでなく、このような有用な情報が得られる POT 法は、MRSA による医療関連感染の対策において非常に有効と思われた。

## 岐阜市

### コメント

衛試 1206～1212 株は、平成 21 年 10 月に行われた薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会に参加した際に、実習で使用した菌株を分与していただいた株である。衛試 1039～1042 株は、2005 年 7 月に岩手大学から分与していただいた株である。今回、研修後初めて POT 法を行った。取り扱い説明書が非常にわかりやすく手技も簡便であった。薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会のテキストに、実習で使用した菌株の POT 型の記載があったので、当所の実験結果と比較した。レーン No. 5 とレーン No. 7 の POT1 が少し違ったが、その他の菌株は POT1、POT2、POT3 共に一致した。MRSA の場合 POT1 は 64 以上となる。レーン No. 1～レーン No. 7 は MRSA であるため POT1 が 64