

「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	伊豫田淳	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	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
研究協力者	小野塚大介	福岡県保健環境研究所
研究協力者	河原隆二	大阪府公衆衛生研究所
研究協力者		地方衛生研究所

研究要旨 平成 22 年度の本研究において構築した、BioNumerics (BN) server によるオンラインシステムのデータベースを充実させた。また、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 0157 の迅速な遺伝子型別に資する目的で、IS-printing system (ISPS) のデータベース構築を進めた。2011 年に分離された EHEC について PFGE 解析を行い、その遺伝子型別に基づいて分離株の動向について調べた。2011 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、1215 株に対して 2011 年に分離された新しいサブタイプとして 502 種類、2010 年に分離されたことのあるサブタイプが 46 種類、その他が 59 種類見いだされた。また、EHEC 026 では、430 株に対して 164 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 16 種類存在したが、そのうち 5 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 6 種類存在していた。同様に 026 では、7 県の散発事例から同一 XbaI パターンがみいだされ、BlnI 消化でもパターンが一致していた。

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。

B. 研究方法

平成 23 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う (URL; <http://www0.nih.go.jp/~terajima/opn/index.html>) とともに、「感染症サーベイランスシステム」(NESID)で公開した。BN server内のデータベースで、EHEC 0157の代表的な遺伝子型のデータを追加し、全国6ブロックの研究分担者からの直接アクセスに対応した。EHEC 0157の ISPSのデータベースに関しては、福岡県及び大阪府で稼働している同システムを基盤として、全国に対応することを目的として細菌第一部のサーバー内にデータベースの設置を行った。いずれのアクセスも、分担研究者の ID とパスワードが必要となっている。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 を用いて解析した。

### 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ピング

EHEC 0157 については、2011 年に分離・送付された 1215 株が、2011 年に分離された新しいサブタイプとして 502 種類、2010 年に分

離されたことのあるサブタイプが 46 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 及び 026 では散发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。

#### 2. EHEC0157 及び 026 における広域共通パターンを示す株の解析

2011 年に分離された 1215 株の EHEC 0157 は、502 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 16 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、特に分離地域数の多いパターンについて、5 ヶ所以上の異なる都府県から分離されデンドログラム上でクラスターを形成している株を、そのパターン名である Type No. (TN) で表示した (図 3~7)。TN f93 は、2010 年に広域株として分離されたパターンであるが、2011 年にはさらに広域で分離されていた (図 3)。TN f93 の株は、MLVA ではほぼ同一のタイプに分類され、2010 年分離株と 2011 年分離株は大部分が single locus variant であることが明らかになった (図 8)。TN c227 は、集団発生由来株であり 5 都県に分布しているものの、その遺伝子型についてはほぼ同一のものと考えられた。026 については、すべてが散发事例由来株であり、分離時期が 4 月から 9 月に及んでいるが *Xba*I 及び *Bln*I によるパターンが一致していた (図 7)。

#### 3. ISPS を利用したデータベースの構築 感染症発生動向調査による報告数において、

EHEC ではそのうちの血清群 0157 がその 7 割程度を占めており、迅速な発生探知が対策をとるうえでも重要である。PFGE に比べて解析能力ではやや劣るものの、ISPS は迅速かつ容易に結果が得られる方法として、本研究班でもその精度管理が行われてきた。特に、九州ブロック及び近畿ブロックではそれぞれ ISPS を利用した情報共有化システムが構築され（分担研究報告；九州ブロック、近畿ブロック参照）、稼働してきている。そこで、全国の各地研が利用できるシステムの構築を目的として、福岡県保健環境研究所及び大阪府公衆衛生研究所のデータベースシステムを基に、感染研細菌第一部に設置されているサーバー内に ISPS データベースを設置した。今後、データベースの拡充を進めつつ機能更新を行う予定である。

#### D. 考察

PFGE パターンが同一と考えられる EHEC 0157 が複数の都道府県における散発事例から分離されている。2011 年では、5 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 6 種類存在していた。特に、2010 年にやはり広域から分離されていた TN f93 の PFGE パターンを示す株が、2011 年には、17 府県から分離されており、集団発生事例も含まれていた。集発事例では原因食品からも EHEC 0157 が分離されており遺伝子型も一致していたが、その他の多数の散発事例においては原因が不明である。また、MLVA の結果から、2010 年と 2011 年の TN f93 を示す株の MLVA タイプは single locus variant となりわずかながら違いがあるものの、2011 年の大部分の株では MLVA タイプが一致している

ことが明らかになった。したがって、2011 年の TN f93 の EHEC 0157 では、相互の関連性があり得ると考えられるが、疫学的な関連性を示す情報は得られていない。ISPS データベースの構築は、既に当該システムを稼働させている、分担研究者；堀川和美（福岡県保健環境研究所）及び勢戸和子（大阪府公衆衛生研究所）の多大な協力のもとに可能となった。今後、サーバー内データの精度管理とともに、全国的なアクセスに柔軟に対応する機能更新が必要と考えられる。

#### E. 結論

広域発生事例を迅速に探知するために、ISPS の迅速性を生かすとともに、BN server による PFGE データベースの継続的な更新が必要である。さらに、正確な情報蓄積に向けて、MLVA の活用が重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 誌上発表

1. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真；腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向。食品衛生研究、61、7-15、2011

2. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原明子、大西 真、渡辺治雄；腸管出血性大腸菌サーベイランス 感染症サーベイランス—その役割と展望 臨床と微生物、38、59-63、2011

3. 寺嶋 淳；生食と腸管出血性大腸菌 特集 生食のリスク。公衆衛生 76 巻、19-23、2012

2) 学会発表

1. 寺嶋 淳 ; 最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 第32回日本食品微生物学会学術総会、東京、2011
2. Jun Terajima , Sunao Iyoda, Hidemasa Izumiya, Takehito Saitoh, Jiro Mitobe, Tomoko Morita-Ishihara, Makoto Ohnishi, Haruo Watanabe Molecular Epidemiological Investigation of Enterohemorrhagic E. coli Isolates in Japan IUMS Sapporo, 2011
3. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、大西 真 2010年の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会、大阪市、2011

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 (1219 entries)  
(2011/1/2 - 12/6) Tol : 1.2%

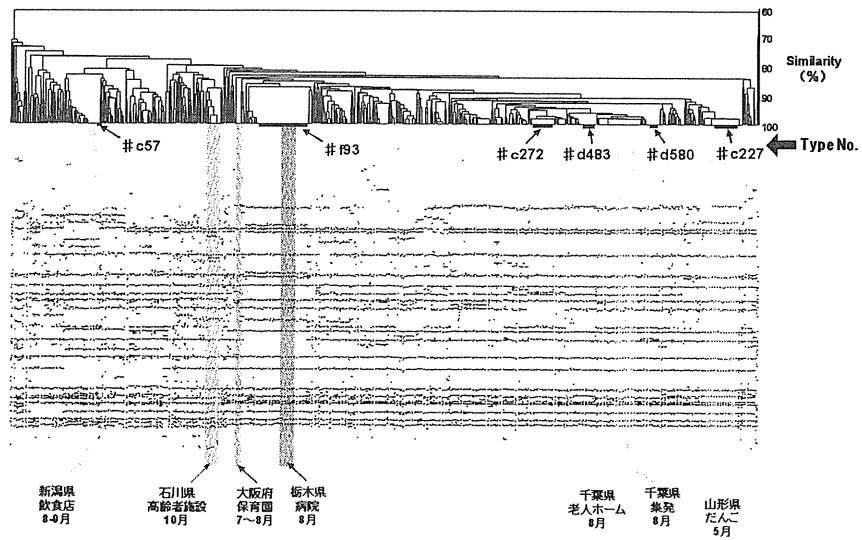


図 2

Dendrogram of EHEC O26:H/-isolates in Japan (459 entries)  
(2011/1/7 - 11/30) Tol : 1.2%

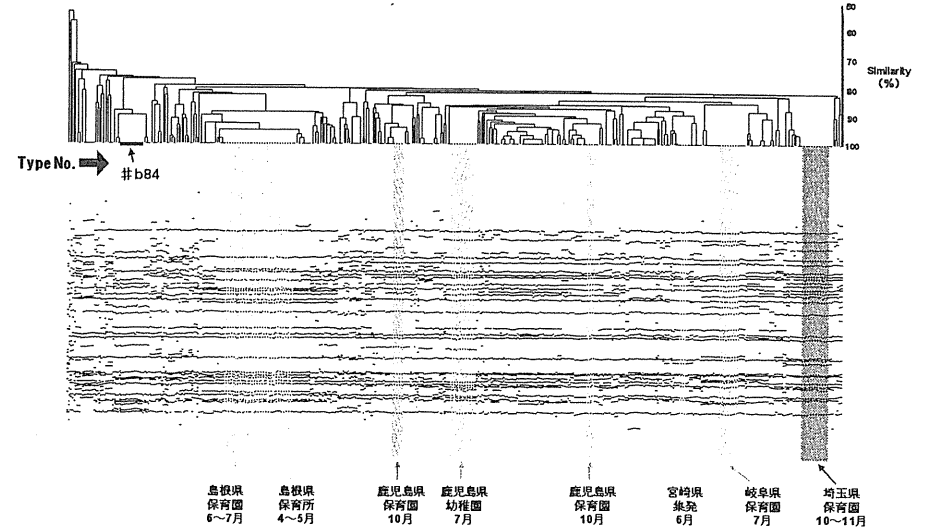


図 3

2011年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

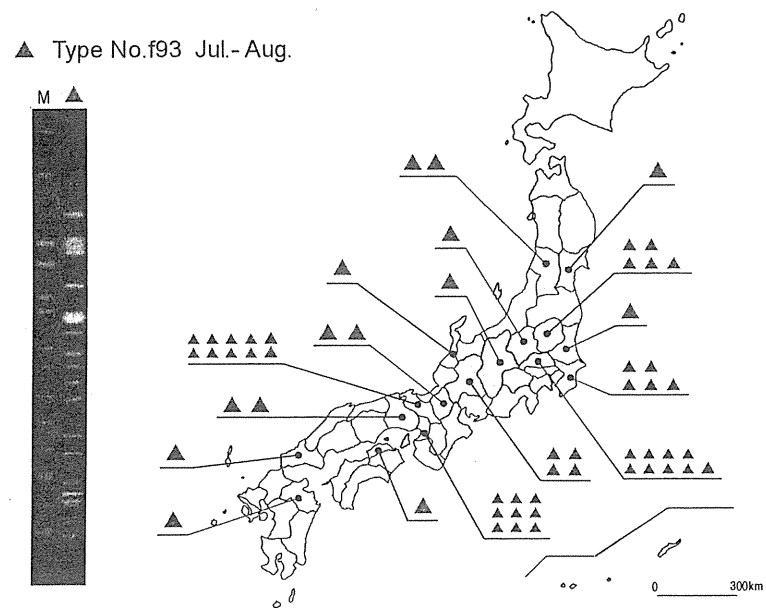


図 4

2011年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

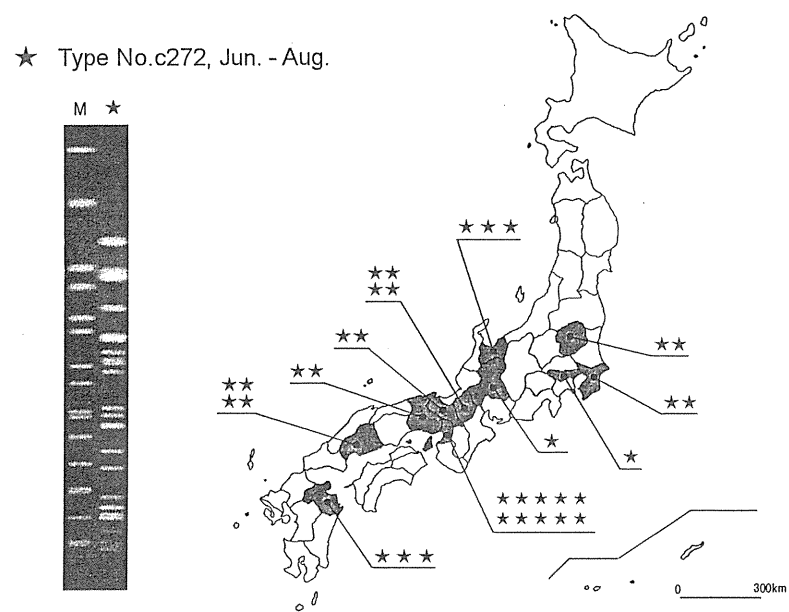


図 5

2011年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

Type No.d483, Mar.- Aug.  
Type No.d580, May - Sep.

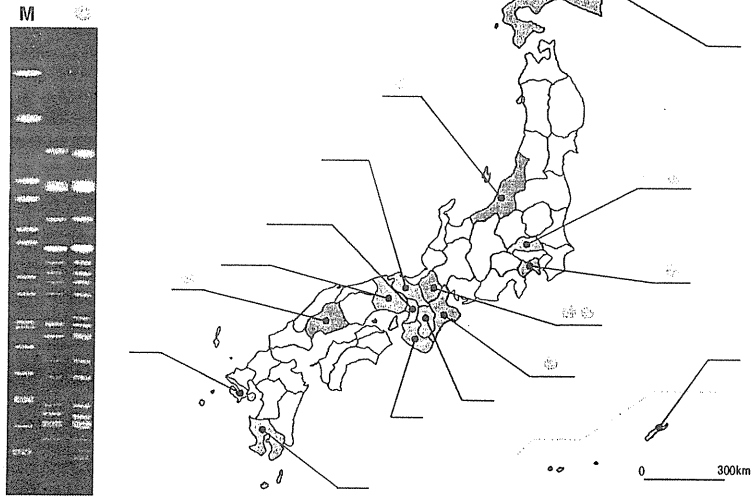
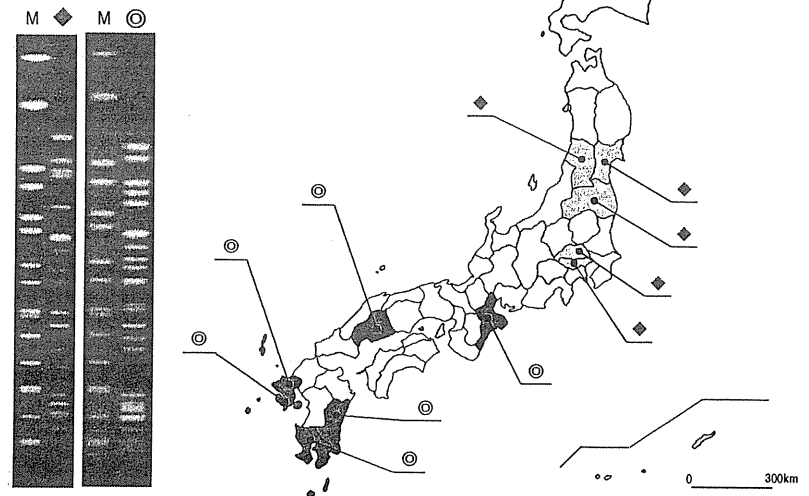


図 6

2011年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

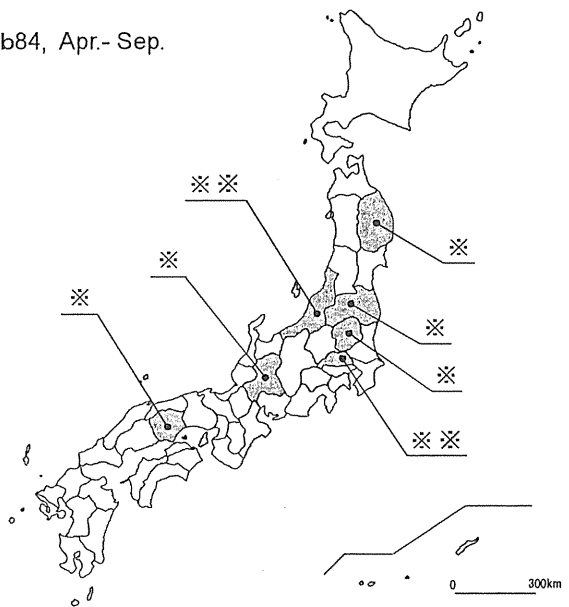
◆ Type No.c227, May  
◎ Type No.c57, Jul.- Oct.



# 図 7

## 2011年 PFGEパターン的一致している事例の分布図

※ O26 Type No.b84, Apr.- Sep.





厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)  
研究課題名(課題番号):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  
(H21-新興-一般-003)

平成 23 年度 分担研究報告書

分担研究課題名: 「腸管出血性大腸菌の血清型に関する研究」

研究分担者: 伊豫田淳(国立感染症研究所・細菌第一部)

研究協力者: 勢戸和子(大阪府立公衆衛生研究所), 井口純(宮崎大学),  
磯部順子(富山県衛生研究所), 清水俊一(北海道立衛生研究所), 甲斐明美(東京健康安全研究センター), 松本昌門(愛知県衛生研究所), 中嶋洋(岡山県環境保健センター), 堀川和美(福岡県保健環境研究所), 寺嶋淳(国立感染症研究所・細菌第一部), 大西真(国立感染症研究所・細菌第一部)

## 研究要旨

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌(EHEC)は血清群 O157, O26, O111 で全体の 80%以上を占めるが、これら以外の O 血清群による EHEC も毎年多数分離されている。2011 年にデンマークの血清学研究所(Statens Serum Institut: SSI)は O182-O186 と O1F1 からなる計 6 種類の新規 O 血清群を定義した。そこで本研究では、これまでに既存の O 血清群に型別されなかった国内分離の EHEC 株のうち、2007 年以降 2011 年までに分離された 99 株についてこれらの O 血清群に該当するかどうか解析した。その結果、集団事例を含む 28 株が血清型 O183:H18 であることが明らかとなり、分離頻度としては O157, O26, O111, O103, O145, O91, O121, O165 について国内で 9 番目に多い EHEC の O 血清群であることが判明した。

国内で原因菌が分離されないものの、EHEC 感染が原因と考えられる重篤な症例(溶血性尿毒症症候群:HUS)において、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価を測定することで EHEC 感染症の確定診断が可能である。しかし、その測定法についてはこれまで国内で統一したプロトコールが存在しなかった。本研究では、2011 年に発生した焼き肉チェーン店における O111 による集団発生事例を受け、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価のプロトコールを策定し、本研究班の分担研究者を通じて全国に伝達した。

### A. 研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC)の約 80%以上は血清群 O157, O26 または O111 の O 血清群に分類されるが、これら以外の O 血清群の EHEC による感染事

例も毎年多数報告されている。本研究では 2011 年にデンマークの血清学研究所(Statens Serum Institut: SSI)で新たに定義された O 血清群(O182-O186 と O1F1)について、国内で分離された EHEC の分布解析を行い、新規 O 血清群による国内の EHEC 感染状況につ

いて明らかにすることにした。

国内で原因菌が分離されないものの、EHEC 感染が原因と考えられる重篤な症例（溶血性尿毒症症候群：hemolytic uremic syndrome [HUS]）において、HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価を測定することで EHEC 感染症の確定診断が可能である。しかし、その測定法についてはこれまで国内で統一したプロトコールが存在しなかった。2011 年に富山県を中心に発生した焼き肉チェーン店における O111 による集団発生事例では菌が分離されない HUS 症例が数多く発生したことを受け、本研究で HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価のプロトコールの策定を行うことにした。

## B. 研究方法

### 1) 血清型別

デンマーク血清学研究所（Statens Serum Institut: SSI）から購入した新規抗大腸菌抗血清 O182 O182-O186, O1F1 を用いて、既存の方法に従って型別を行った。

### 2) 血清型別用菌株

全国の地方衛生研究所・保健所等から送付された EHEC 株のうち、感染研・細菌第一部で実施した血清型別から、既存の O 血清群に型別出来なかった OUT (Q untypable) の 99 株を使用した。

### 3) 血中抗体価測定に関するアンケート調査

HUS 患者由来の血清中抗大腸菌抗体価の測定について各衛生研究所等での実施状況をアンケートで調査した。調査項目は、1. 調査実績の有無（過去または現在）、2. 実績がある場合の検査方法の概略、3. 今後の検査予定、であった。本研究班の研究分担者を介

して全国の地方衛生研究所へ電子メールでアンケートを送信し、回答は各衛研の担当者から直接感染研へ返信するよう依頼した。

### 4) 血中抗体価測定法プロトコールの策定

3)のアンケート調査結果を基に、最も検査頻度の高かった大阪府公衆衛生研究所・細菌部のプロトコール（試験管法）および国立感染症研究所・細菌第一部のプロトコール（プレート法）のハイブリッド版を作製した。

## C. 研究結果

1) 血清群 O182-O186, O1F1 の分布解析：2007 年以降 2011 年までに国内で分離された EHEC 株のうち、OUT となっていた 99 株について、SSI から購入した新規 O 血清群の分布解析を行った。その結果、O182 が 3 株、O183 が 28 株、O186 が 4 株存在し、残りの 64 株は依然として OUT であることが判明した。最も分離数の多かった O183 の H 型はすべて H18 であり、血清型 O183:H18 の EHEC による感染事例が数多く発生していることが明らかとなった。症状別にまとめると、これまでに O183:H18 の EHEC による血便発症例は 1、下痢発症例が 12、その他または無症状事例が 16 で HUS 発症例はなかった。

2) 血中抗体価測定に関するアンケート調査結果：全国の 78 研究所のうち、検査未実施機関が 42（うち、3 機関は過去に検査実績有り）、現在実施中の機関が 11（秋田県、山形県、千葉県、東京都、横浜市、名古屋市、滋賀県、大阪府、福岡県、佐賀県、宮崎県）で、実施不明が 20 機関であった。このうち、大阪府と横浜市では従来からの検査実績が感染研より多かった。

### 3) 血中抗体価測定法プロトコールの策定：

2)のアンケート調査から、大阪府公衆衛生研究所の検査実績が最も多く、検査実績に基づいた検査プロトコールもすでに確立されていた。そこで、大阪府の検査プロトコール(試験管法)を土台に、感染研での検査プロトコール(プレート法)を取り入れたハイブリッド版を作製し、以下に示す血中抗体価検査プロトコールとして策定した。なお、感染研のプロトコールは、2011年に富山県を中心として発生したO111による重症事例に関連して、菌が分離されなかったいくつかのHUS事例(富山県、大阪市、仙台市、横浜市依頼分)について解析した結果、すべての事例において、HUS発症事例の90%以上を占める7つのEHEC O血清群(O157, O26, O111, O103, O145, O121, O165)のうち、O111だけの抗体価上昇が確認され、富山の事例と同様にO111のEHECによるHUS症例として確定診断することが可能となった。

#### <プロトコール>

#### HUS患者血清中の抗大腸菌抗体価測定法

##### 1. 抗原液の作製と保存

1) EHEC感染が疑われるHUS患者から分離されるEHECのうち、国内で起因菌として分離頻度が高い7種類の大腸菌O血清群の分離株(O157, O111, O26, O103, O145, O121, O165)を用いる注。用いる菌株は、0.5% (W/V) アクリフラビンに非凝集性(もしくは100℃30分加熱で非沈殿性)、または1 mg/l の TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride) を含む antibiotic medium 3 平板培地でスムーズ型集落(実体顕微鏡観察で表面に凹凸が少なく、

TTCの色素でよく染まっているもの)を選択するのが望ましい。

2) 深型シャーレで1 cm以上の厚さにTSAを作製し(または大試験管[19 mm×160 mm程度の大きさのもの]で作製したTSA斜面培地に)、菌を全面塗布して37℃一夜培養する。

3) 2-5 mlの生理食塩水(生食水)またはPBSにTSA発育菌を全て掻き取って濃厚に懸濁し、121℃で1時間オートクレーブする。

4) 遠心分離(スイングローター等で1,500-2,000×g, 15分間)後、上清を捨て再度2-5 ml程度の生食水またはPBSに懸濁する。遠心洗浄をさらに1-2回繰り返し、最後に200×g, 5分間遠心し、上清に2%ホルマリン加生食水(PBS)を等量加え、37℃で1時間静置したものを抗原として使用する。作製した抗原は4℃で数ヶ月は保存可能である。

抗原液の標準化: 抗原液は、あらかじめデンカ生研の抗血清を用いて、凝集価を測定しておく。新しく抗原液を作製した場合は、同一ロットの抗血清で同じ凝集価を示すことを確認してから使用する。

5) 使用に際しては生食水またはPBSで遠心洗浄し、濁度をMcFarland No.3.0となるように調整し、抗原液とする。

##### 2. 血清の非働化

HUS患者血清は56℃30分で非働化し、10,000×gで1分間程度遠心した後の上清を使用する。

##### 3. 抗体価測定法

###### 3-1. 試験管法

1) ガラス試験管(12 mm×90 mm)を使用する抗原数(ここでは3種類)×8列並

べ、1列の1本目に生食水 1,080  $\mu$ l を、1列の2-8本目に生食水 600  $\mu$ l を分注する。

2) 1列の1本目に血清 120  $\mu$ l を加えて10倍希釈液とし、よく混合した後 600  $\mu$ l を2本目へ移し、2-8本目まで2倍階段希釈する。

3) 1列目の希釈液を 200  $\mu$ l ずつ2列目と3列目に移す。

4) 各列に、濃度を調整した抗原液を各 200  $\mu$ l 加える(血清の最終希釈濃度は20倍から2,560倍までとなる)。別の試験管に生食水 200  $\mu$ l と抗原液 200  $\mu$ l を加え、抗原液だけの対照とする。

5) 試験管立てごと軽く揺すって混合し、50°Cの恒温水槽で一夜静置する。

6) 凝集の有無を観察し、血清の希釈倍数を抗体価とする。

### 3-2. 96穴プレート法

1) 血清の希釈は試験管法と同様にガラス試験管を用いて10倍希釈から1,280倍希釈まで行う(容量は血清量または検査する抗原の種類によって適宜変更する)。

2) 丸底(U底)96穴プレート(ふた付き、コーティングなし)に抗原 25  $\mu$ l と希釈血清 25  $\mu$ l を加え、プレートミキサー等で十分混和する(血清の最終希釈濃度は20倍から2,560倍までとなる)。

3) 52°Cで1時間静置する。

4) 室温に戻して1-2時間後に凝集の有無を観察し、血清の希釈倍数を抗体価とする。最終判定は室温で一夜放置後、翌日に行う。陽性コントロールとしてデンカ生研のウサギ抗血清に各抗原液を混合したもの、陰性コン

トロールとして生食水またはPBSに各抗原液を混合したものをそれぞれ使用し、凝集の有無を確認する。

### 4. 判定

1) 試験管法：抗体価陽性域は最終希釈倍率が320倍以上、80-160倍は疑陽性域、40倍以下は陰性域と判定する。

96穴プレート法：抗体価陽性域は最終希釈倍率が160倍以上、40-80倍は疑陽性域、20倍以下は陰性域と判定する。

2) 疑陽性域の場合は、採血日の異なる血清で再検査をすることが望ましい。

3) 陽性コントロール、陰性コントロールの結果を確認する。

4) 特定のO血清群に凝集が見られることを確認する(ただし、2種類以上のO抗原に対して凝集が見られる血清も存在する)。

注：状況に応じて使用する抗原の種類を決定する。集団発生等ですでに特定のO血清群のEHECが分離されている場合などは、当該O血清群と代表的なO血清群(O157, O26, O111など)に絞る。国内のHUS事例のおよそ80%はO157のEHECが原因となっており、O26とO111を併せた3種類のEHECで全体のおよそ85%を占める。使用する分離株には指定はないが、検査ごとに陽性コントロール(デンカ血清による凝集あり)および陰性コントロール(生食水またはPBSによる凝集なし)の結果を確認する。

参考文献：小林一寛，田口真澄，勢戸和子，吉矢邦彦，村上城子. 下痢患者におけるベロ毒素産生性大腸菌血清学的診断法について. 感染症学雑誌 70(1):80-86. 1996.

#### D. 考察

・ 血清型 O183:H18 の EHEC による感染事例については、今後の動向に注視する必要がある。なお、他の研究成果 (Iguchi et al., 2011 : 研究発表) から、これら血清群 O183 はボイド赤痢菌 (*Shigella boydii*) 10 型と同一の抗原であることが明らかとなり、デンカ生研から販売されているボイド 10 型の血清で EHEC O183 株の凝集反応が確認された (当該論文発表時は O183 であることがわからなかったため、OSB10 という名前になっている)。

・ 上記の HUS 患者血清中の抗大腸菌抗体価測定法については今後多くの検査実績結果を基に改訂を重ねる必要がある。特に、プレート法における陽性判定は血清の 160 倍希釈以上での凝集が基準となっているが、これについては議論の余地がある。HUS 以外の症例において、症状や発症からの日数等と血中抗体価の関係について詳細な検討が必要であると思われる。

#### E. 結論

・ 新規 O 血清群の解析から、O183:H18 による EHEC の感染事例が明らかとなった。

・ 菌不分離の HUS 症例における患者血清中の抗大腸菌抗体価測定法について、地方衛生研究所における検査状況を把握すると共に、共通の検査プロトコールを策定し、全国に配布した。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

・ Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M; EHEC Study Group. Emergence of a novel Shiga

toxin-producing *Escherichia coli* O serogroup cross-reacting with *Shigella boydii* type 10. *J Clin Microbiol.* 2011. 49: 3678-3680.

分担研究者： 伊豫田淳

H23年度の成果：

1. 菌不分離のHUS患者由来血清中の抗大腸菌抗体価測定法のプロトコールの確立と配布

菌不分離のHUS(溶血性尿毒症症候群)症例について患者血清中の抗大腸菌抗体価(血清型別解析からHUS症例に多いO血清群を選定:国内HUS例の95%以上をカバー)を検出し、EHECの確定診断とする。

1) O157とO111の重複感染が疑われた重症患者(H23年 富山県)における確定診断 --- O111によるHUS症例と確定した。

2) 寺嶋班の分担研究者を介して検査プロトコールの地方衛研への配布(完了)

2. 新規O血清群  
(O182-O186, OIF1) EHEC  
の国内での分離状況

大腸菌のO血清群:  
これまでは、O1-O181 (blank #: O31,  
O47, O67, O72, O93, O94, O122)ま  
で定義されていた。

新規O血清群: O182-O186 and  
OIF1 (tentative name?) がデンマー  
クの血清学研究所から2011年に販売  
が開始された(ヨーロッパでのEHEC  
分離頻度に基づく新規O血清群)。

新規O血清群のEHEC(2010-2011年)

Year	O183*	O186	OUT
2011	6	1	12
2010	11	6	20**

\* すべて血清型 O183:H18.

\*\* 牛由来のEHEC O104:H24 *stx2+* *aggR-* (ドイツ集団発生株  
O104:H4 [*aggR+*] とは異なる) を含む

O183:H18の分離状況(2010-2011年)

	分離衛研	感染研番号	VT		症状
2011年	熊本	110688-110696	2	集発	下痢(料理屋での集団食中毒, EPEC検出)
	北海道	110599	1	散発	無症状
	宮城	110907-110908	1+2	散発	無症状
	福岡	111413	1	散発	無症状
2010年	福岡市	100421	1	散発	無症状
	山形	100518	1	散発	無症状
	福岡	101365	1	散発	下痢、腹痛
	宮崎	101715	1	散発	無症状
	宮崎	101716	1	散発	軟便、腹痛
	宮崎	101717	1	散発	無症状
	熊本	102843-102846	2, 1+2	集発	無症状(保育園集発・O111:H-STEC検出)
重症者由来	宮崎	082564	1	散発	血便
	福岡市	041075	1	散発	血便

2007-2011年に細菌第一部に送付されたEHEC (上位10血清群)

O	総数	血便	HUS	デンカ
O157	9563	3789	169	+
O26	2108	343	1	+
O111	462	76	7	+
O103	267	36	-	+
O121	236	78	7	+
O145	230	57	2	+
O91	153	3	-	+
O165	56	28	2	+
O183	28	1	-	-
O5	24	4	-	-

O183 と O5 は市販(デンカ生研社製)血清になし.



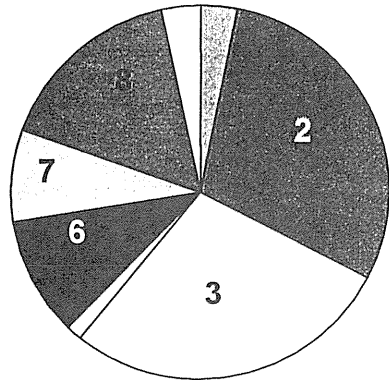
### 3. 国内で最も分離頻度の高い血清型O157:H7の系統解析(クレード解析)

PCRまたはMLSTによる系統解析

--- clade 8: 米国で分離されたO157:H7の系統株で高病原性と考えられている。

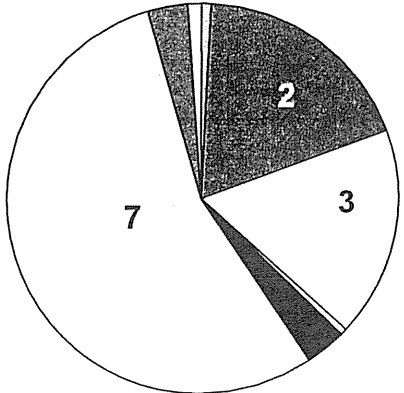
--- clade 8による国内集団発生事例の検出:  
2008年東京 M大学、2010年三重県 中高一貫校感染事例。

HUS由来株



N=323

無症状保菌者由来株



N=376

Fisher's Exact Test

clade 7 vs others: 3.4E-43

clade 8 vs others: 3.5E-9

clade 7 は無症状保菌者由来株に、clade 8 はHUS由来株に有意に多い。

「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  
精度管理と精度管理用試料の作成方法の検討について

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
	野呂 キョウ	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
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	瀬戸 順次、鈴木 裕	山形県衛生研究所
	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	新井 礼子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地 敬	札幌市衛生研究所
	千葉 久子	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（以下 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、その精度管理方法の一つとして、北海道・東北・新潟ブロックではプラグのやり取りによる精度管理方法について検討を行い、一定の成果を得ることができた。

今回、PFGE の精度管理として、各協力地研で分離した腸管出血性大腸菌 O157 菌株を使ってプラグを作成し、このプラグを北海道衛研に送付するとともに、各施設において PFGE を行い、その泳動像をメールにより送付する方法で比較した。送付されたプラグを北海道衛研で酵素処理し泳動した結果と、各地研で酵素処理後泳動した泳動像を比較したところ 4 地研は 90%以上の相同性を得ることができたが、2 地研で粗動性は 90%以下であった。この 2 地研の泳動像は、肉眼的には、バンドは一致しているものの、バンドの照度が強かったり、写真ファイルのサイズが大きいため縮小等の作業で解像度が下がってしまったため相同性が下がった可能性があった。また、プラグの取り間違いと思われる不一致もあった。

プラグを使った精度管理を行う上で、精度管理用プラグの菌量が重要となる。そこで、プラグ作成時の菌量測定方法として、暗視野顕微鏡を使った菌量測定方法について検討を行った。

#### 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 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 構築のためには各施設の精度管理が欠か

せない。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ため、定期的な外部制度管理を行う上で問題がある。

これらのリスクを回避し、定期的な精度管理実施方法として、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、昨年は、これまでにプラグを使った制度管理方法の検討で得られた結果を元に、共通外部制度管理の実施方法について検討を行った。今回、プラグ送付による精度管理として、各協力地研で作成したプラグを北海道衛研に送付し、併せて、各地研で泳動した泳動像をメールにて送付してもらい、それぞれを比較することで精度管理を実施した。

PFGE の精度管理を行う上でプラグ内の菌量は重要なファクターとなる。菌量が少ない場合、バンドが薄く認識できないバンドが出てくるし、多い場合は、バンドが太くなり近接するバンドが分離できなくなる。これらのことから、プラグ作成時の菌量を一定の範囲内にすることが重要となる。そこで、実際にプラグ内の菌量を測定する方法として、暗視野顕微鏡を用いた菌量測定法について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 精度管理

各協力地研で分離した腸管出血性大腸菌各 2 株を使ってそれぞれのプロトコールでプラグを作成した。作成したプラグの半分を北海道衛研に送付してもらい、残りを各地研で制限酵素 (*Xba* I) 処理し、各地研のプロトコールに従い PFGE を行い、泳動像をメールで送付してもらった。この泳

動像と北海道衛研で行った泳動を比較することで精度管理を実施した。

### 2. プラグ作成時の菌量測定方法

菌株として、SB 株と、北海道衛研で分離した腸管出血性大腸菌 O157 を使用した。SB 株からは、30 コロニーを腸管出血性大腸菌は 10 株 50 コロニーを試験に供した。それぞれの菌株は、平板培養により単一コロニーを作成し、その 1 コロニーを LB broth, Lennox (DIFCO 製) 10mL に摂取して、37°C で 18~24 時間培養した。培養液を 6 段階希釈し、Misra 法により菌数を測定するとともに、10 倍希釈液または 100 倍希釈液を使用して暗視野顕微鏡にて菌数を測定した。

顕微鏡用試料は、希釈液を 3  $\mu$ L スライドガラスにマウントし、これに 18 $\times$ 18 のカバーガラスをかけて作成した。菌数測定は、ニコンの位相差コンデンサー付き顕微鏡を使用し、対物レンズ  $\times$ 20 と  $\times$ 40 を用いて、顕微鏡写真撮影用 CCD カメラ (DCE-2 : アズワン株式会社) にて暗視野観察で撮影した。撮影は 10 視野を偏らないよう注意しながら行い、それぞれの菌数をカウントして平均を出し、次式を用いて 1mL 当たりの菌数を算定した。なお、画像の面積は、マイクロメーターを撮影し算出した。

$$\text{カバーガラス内の菌液量} = 3 \mu\text{L}$$

$$\text{カバーガラスの面積} = 324\text{mm}^2$$

$$\times 20 \text{ の時の画像の面積} = 5.3 \times 10^2 \text{mm}^2$$

$$\times 40 \text{ の時の画像面積} = 1.3 \times 10^2 \text{mm}^2$$

1mm<sup>2</sup> 当たりの菌液量は、

$$3 \mu\text{L} \div 324\text{mm}^2 = 9.3 \times 10^{-3} \mu\text{L}/\text{mm}^2$$

1 画像当たりの菌液量

対物  $\times$ 20 の場合

$$9.3 \times 10^{-3} \times 5.3 \times 10^2 = 4.9 \times 10^4 \mu\text{L}$$

対物  $\times$ 40 の場合

$$9.3 \times 10^{-3} \times 1.3 \times 10^2 = 1.2 \times 10^4 \mu\text{L}$$

画像内の菌数を A、1mL 当たりの菌数を X とすると、

$$\times 20 : X = A \div (4.9 \times 10^6) = A \times 2 \times 10^6 / \text{mL}$$

$$\times 40 : X = A \div (1.2 \times 10^6) = A \times 8 \times 10^6 / \text{mL}$$

## C. 研究結果

### 1. 精度管理

プラグは各地研発送後1～2日で到着した。

いずれの地研から送付されたプラグも破損は認められなかった。

アンケート調査から、7地研が平板培養から菌塊を取り菌液調整し、3地研が液体培地により培養後菌液を調製していた。菌量の測定方法は、濁度計が3地研、OD値を測定した懸濁液と比較する方法が1地研、光度計(OD600nm:0.7)が1地研、培養時間が3地研、白金耳による掻き取りが2地研で、前回の調査とは若干の違いが認められた。また、制限酵素量は、ほとんどの地研が30U/plugで、処理時間は、4時間が3地研、2時間が3地研、10時間以上が4地研で、こちらも前回の調査とは異なる結果となった。

各地研から送られてきたプラグを使用して、北海道衛研でPFGEを行った泳動像と、各地研から送られてきた泳動像には、バンドの照度の違いがあるものの肉眼的にバンド位置に差は認められなかった。しかし、これらの泳動像をクラスター解析ソフトで解析したところ、2菌種共に90%以上の相同性が得られた地研は4地研で、1菌種が90%以上の相同性を得た地研は3地研、2菌種とも90%以上の相同性が得られなかった地研が2地研あった。1菌種のみ相同性がとれた地研の内、地研側の泳動像が90%以上の相同性を示し、PFGE時にプラグの取り間違いをした可能性が高いと思われるものがあつた。また、1地研では、マーカーの照度が高いため、クラスター解析時にバンド位置の補正にずれが生じ相同性がとれなかったものがあつた。2菌種とも相同性がとれなかった地研では、写真全体の照度が高い地研が1地研、写真のサイズが大きいためにサイズの変更時にバンドサイズにずれが生じたと思われるものが1地研あつた。

### 2. プラグ作成時の菌量測定方法

18～24時間培養後のSB株の菌数は、Misra法で平均が $1.4 \times 10^9$ 、最大が $3.2 \times 10^9$ 、最小が $5.2 \times 10^8$ であつた。また、暗視野顕微鏡観察では、平

均が $1.6 \times 10^9$ 、最大が $4.6 \times 10^9$ 、最小が $5.0 \times 10^8$ であつた。それぞれの菌液での誤差率は、最大で240%、最小で0%であつた。腸管出血性大腸菌では、Misra法で平均 $6.5 \times 10^8$ 、最大が $2.4 \times 10^9$ 、最小が $2.8 \times 10^8$ であつた。暗視野顕微鏡観察では、平均で $6.9 \times 10^8$ 、最大が $1.8 \times 10^9$ 、最小が $2.3 \times 10^8$ であつた。それぞれの菌液での誤差率は、最大で267%、最小で0%であつた。

誤差率が±50%以内に収まったものは、SB株で73%、腸管出血性大腸菌で84%であつた。

誤差率の高かつたものについて、視野全体を確認すると菌の塊が認められ、カバーガラス内で菌が均一化されていない状態であつた。これらの菌液について、再度十分攪拌して顕微鏡標本を作製したが、完全に菌が均一化されなかった。そこで、これらの標本について、観察視野を16カ所に増やして菌数測定を行ったところ、誤差率は40～60%に改善された。

## D. 考察

### 1. 精度管理

今回、各地研で作成した腸管出血性大腸菌O157のプラグを使って精度管理を行った。プラグ当たりの菌量は1地研を除いてほぼ $1.0 \times 10^8$ /plugと推定された。今回の精度管理では、4地研で90%以上の相同性が得られたが、90%の相同性が得られなかったところが2地研あつた。この2地研については、1地研が写真のバンドの照度が高くバンドが解析ソフトで太くなり、相同性が得られず、また、もう1地研は、写真ファイルのサイズが大きく縮小した際の画質の低下などによるバンドのずれが原因と考えられた。今回の精度管理では、同一のプラグを使用して1地研とそれぞれの地研間で検証する方法を行ったが、この方法では、使用するプラグが同一であるので、同一の菌量での検証が行えた。これにより、バンド照度の違いの原因としてそれぞれでの写真撮影の条件の違いが相同性の違いに影響を与えることが検証された。今回の写真撮影は、7地研でゲル写真撮影装置を使用し、2地研がポラロイドカメラ、1地研