

が一眼のデジカメであったが、バンドの照度は撮影機器の違いに影響されていなかった。これらのことから、写真撮影時のバンド照度を統一する方法について検討する必要がある、さらに写真ファイルのサイズ等を一定の条件に合わせることも、PFGEの精度管理上重要である事が判明した。

## 2. プラグ作成時の菌量測定方法

SB株及び腸管出血性大腸菌を使用して、Misra法と暗視野顕微鏡による菌数測定について比較検討した。SB株でのMisra法と暗視野顕微鏡観察との比較で、誤差率が±50%を超えたものが8標本あった。そのなかで誤差が最も大きかったものは、Misra法が $9.4 \times 10^8$ 、顕微鏡観察が $3.4 \times 10^9$ で誤差率は240%であった。また、腸管出血性大腸菌では、誤差率が±50%を超えたものが7標本あった。このSB株の8標本と腸管出血性大腸菌の7標本について、再度、弱拡大で全体を観察したところ、菌塊状態になっている部分が見受けられ、カバーガラス内で均一化されていないことが判明した。そこで希釈液をよく攪拌し、標本を作り直して、観察視野を10カ所から16カ所に増やして菌数をカウントしたところ、誤差率は40%から60%の範囲内に収まり、±50%内に収まった標本が、SB株で93%、腸管出血性大腸菌で92%となった。誤差率±50%は、顕微鏡観察で得られた菌量が例えば、 $5.0 \times 10^8/\text{mL}$ となった場合、実際の菌量は $3.3 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9/\text{mL}$ となる。この菌液を使ってプラグを作成した場合、プラグ当たりの菌量は、 $1.1 \times 10^8 \sim 3.3 \times 10^8/\text{plug}$ となる。これは、PFGE泳動後のバンドにほとんど影響ない誤差範囲である。

プラグの菌量を一定にすることは、プラグを使った制度管理を行う上で重要である。この菌量測定法であれば、培地や培養時間などによる菌量の誤差よりも少ない誤差で菌液を調製でき菌量の違うプラグ作成も容易である。また、16カ所撮影し、菌数をカウントしても10分以内で測定ができるため短時間で菌量の確認が可能である。しかし、プラグ作成には支障がないものの誤差率がまだ高いので今後どのようにして精度を高めるか検討を重ねる必要がある。また、暗視野顕微鏡ではなく光学顕微鏡での測定方法についても今後検討していく必要があるだろう。

## E. 結論

今回の精度管理では、腸管出血性大腸菌 O157を使用したプラグによる精度管理を実施し、同一の菌量のプラグを使用しても写真撮影で相同性に差が出ることが判明した。

精度管理用プラグの作成方法として、菌量を暗視野顕微鏡で測定する方法は、平板培養法の菌量測定と比較して使用上支障ない測定方法であり、プラグ当たりの菌量を明らかにした精度管理用プラグの作成が可能であった。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

なし

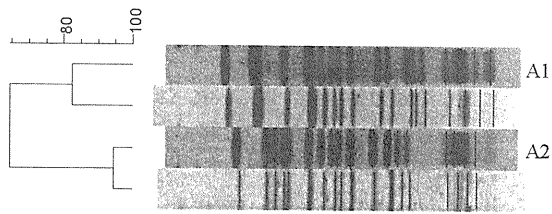


图 1 A 地研

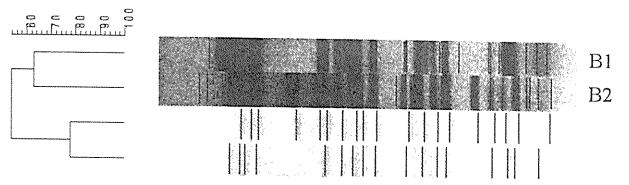


图 2 B 地研

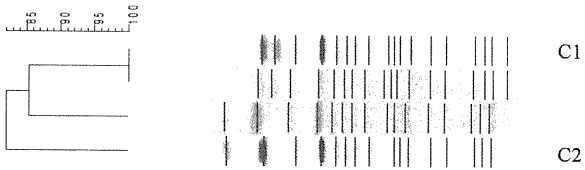


图 3 C 地研

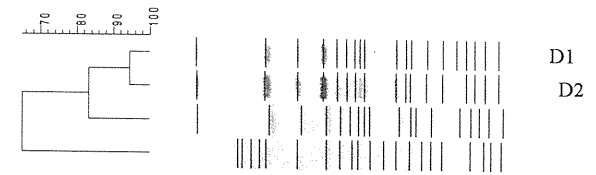


图 4 D 地研

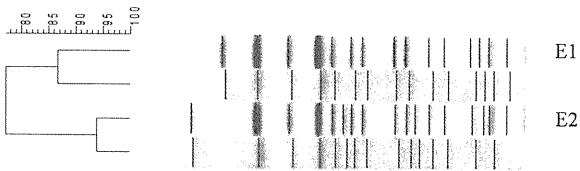


图 5 E 地研

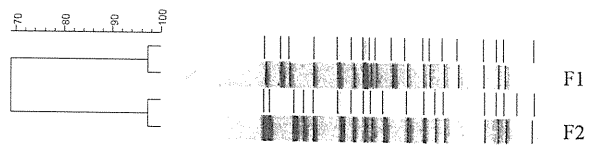


图 6 F 地研

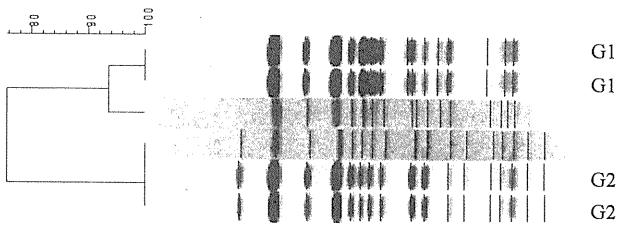


图 7 G 地研

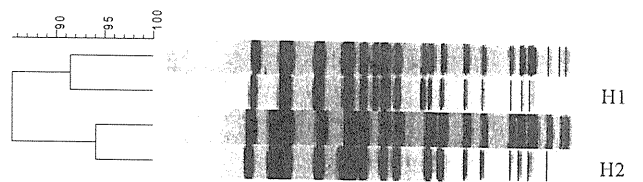


图 8 H 地研

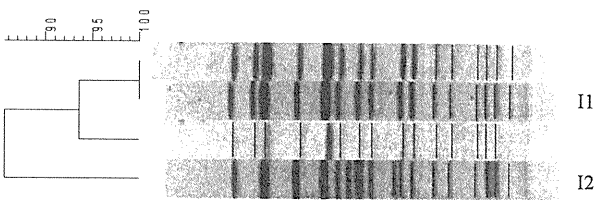


图 9 I 地研

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）  
「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」

平成 23 年度 研究分担報告書

関東ブロックにおける PFGE 法の精度管理および菌株の解析方法の検討

研究分担者	東京都健康安全研究センター	甲斐 明美
研究協力者	茨城県衛生研究所	白田 忠雄
	栃木県保健環境センター	内藤 秀樹
	群馬県衛生環境研究所	横田 陽子
	埼玉県衛生研究所	倉園 貴至
	千葉県衛生研究所	平井晋一郎, 横山 栄二
	神奈川県衛生研究所	古川 一郎
	横浜市衛生研究所	松本 裕子
	山梨県衛生環境研究所	植松 香星
	長野県環境保全研究所	笠原 ひとみ
	静岡県環境衛生科学研究所	廣井 みどり
	東京都健康安全研究センター	小西 典子, 齊木 大 尾畑 浩魅,

研究要旨：

腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌 5 株を用いて、PFGE 解析を行った結果。いずれも良好な泳動像であった。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。5 株とも、類似度は 90%以上であったが、全ての施設で 100 一致となった株は無かった。写真は非常に鮮明で、バンドの選択も適切に行なわれているのに近似度が低くなってしまいう株がある。何が問題で近似度が低くなるのか、今後検討していかなくてはならない。

共通株 5 株を IS 法で解析した結果、全ての施設で同じコードを得ることができた。IS 法はサンプルの調整容易で、非常に短時間に結果を得ることができるというメリットがあるため、自治体間で結果を比較する場合は、非常に有効な手段であることが明らかとなった。

新しい分子疫学解析法の 1 つである MLVA 法の導入を行なうために、2010 年分離株について MLVA 法を実施した。しかし、正確に増幅サイズを読み取れない場合や、蛍光強度が強くと解析できない検体等があった。サンプルの調整方法など、更に検討が必要である。

## A. 研究目的

広域的集団発生 (Diffuse outbreak) を迅速に発見し、いち早く拡大防止対策を講じるために、分離菌株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法などの分子疫学解析法が用いられている。また、複数の自治体で diffuse outbreak が発生したと推定される時には、PFGE 解析画像を相互に電送し比較解析することが試みられている。そのため各地研には、一定の精度を持った解析技術が求められている。そこで本研究では、関東ブロック 11 地方衛生研究所を対象に PFGE 法の精度管理を実施した。

一方、PFGE 法はブロック作製・電気泳動に時間がかかるため、やや迅速性に欠けるといふ欠点がある。この点を補うために、近年新しく IS-printing system (IS) 法や MLVA 法が開発され、一部試験的に実施されている。今回は、IS 法の有用性および PFGE 法との比較等の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. PFGE 法技術向上のための精度管理

#### 1) 供試菌株

各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として 2011 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 5 株 (VT1+VT2 産生株 3 株, VT2 産生株 2 株) を供試した。

#### 2) PFGE 解析

感染研プロトコールにより行なった。

アガロースゲルの作製 : 0.7mm プラグキャストを使用し、Seakem Gold Agarose (TAKARA, 1%) で作製した。使用する菌の濃度は、各施設の方法で行なった。

DNA 抽出法 : ProteinaseK (1mg/ml) , 1% N-lauroylsarcosine 0.5M EDTA(pH8.0)で 50°C, 18~20 時間行なった。

制限酵素処理 : 制限酵素 *Xba* I で処理した。

電気泳動用アガロース : 電気泳動用アガロースは Seakem Gold Agarose (1%) を使用した。

泳動条件 : 6V/cm, 2.2sec~54.2sec, 20 時間, buffer 温度 12°Cで行なった。泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの下から 1cm~1.5cm になるように、各施設で調整した。

サイズマーカー : *S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したものをを用いた。

PFGE 写真の撮影 : 各地研で通常行なっている方法で撮影した。ただし、アガロースゲルは、ウェルからアガロースゲルの先端までが大きく写るよう撮影した。

PFGE 解析成績の電送 : 各地研で解析した PFGE 画像を電子メールで送付した。

画像解析 : 各施設から送付された PFGE 画像を対象に BioNumerics を用いてデンドログラム解析を行った。

### 2. IS-printing system 解析

#### 1) 共通株を用いた精度管理

精度管理用の共通菌株5株について、各施設で IS 法により解析を行い、結果を比較した。

2) 2011年に分離された O157 株の内、同じ PFGE パターンを示した株について IS 解析を実施し、結果を比較した。

### 3. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例への応用

各地方衛生研究所で経験した PFGE 解析が有効に活用された事例について報告する。

### 4. PFGE 法実施状況についてアンケート調査の実施

地研で EHEC を PFGE 法で解析した後、どのような方法で行政に結果を報告しているかのアンケートを実施した。

### 5. MLVA 法の検討

疫学解析の1つとして新しい方法である MLVA 法の導入に向けて検討を開始した。腸管出血性大腸菌 O157 を対象とし、感染研 MLVA プロトコールに従って実施した。2010年6月および8~9月に流行した PFGE パターン T-1000 株 (スメア株) 16 株について MLVA 解析を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 共通菌株を用いた PFGE 解析の精度管理

腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌株 5 株を用いて、9 施設で行なった

PFGE 画像を写真 1 に示した。写真撮影は、各地研で通常行なっている方法で実施した。前年度は、写真の撮影方法までは指定しなかったため、各施設で写真の大きさにばらつきが認められたため、今年度はブロックを埋め込んだウェルからアガロースゲルの下まで、できるだけ大きく写すように統一した。いずれの施設でもシャープで明瞭なバンドが得られていた。

次に各施設で PFGE 解析をした写真を電送してもらい、電送された PFGE 画像をもとにデンドログラム解析を試みた。今回、ファイル形式を指定しなかったため、Excel や PowerPoint に貼り付けて送付された写真があった。このような写真は、tiff ファイルに変換後、解析を行ったが、解像度が著しく低くなってしまいバンドを選ぶのが困難であった。これらについては、郵送された写真をスキャナーで読み込み、解析を行った。

デンドログラム解析結果を図 1 に示した。菌株 No.1 から No.3 までは 9 施設中 8 施設が 100%一致であった。1 施設も 90%以上の類似度であった。菌株 No4 については、95%以上の類似度であるが、2 グループに分かれてしまった。写真を比較しても、泳動パターンにほとんど差が認められず、2 グループの差が何処にあるのか明確にはできなかった。No.5 については、7 施設では一致した。しかし、泳動距離が少し短い 2 施設分が外れてしまい、93%程度の近似度であった。

## 2. IS-printing system 解析

### 1) 共通株を用いた IS 法による解析

精度管理用の共通菌株5株について各施設で IS 解析を実施した。PCR 法でバンドが検出された場合を「1」、バンドが検出されない場合を「0」として判定表に記入し、比較した。今回の解析では、全ての施設で同一の結果であった（写真2、表1）。Primer set1の18本目のバンド（*hly*）が薄く、判定が難しい場合が認められた。また通常の PCR よりも泳動時間が長いため、バンドが歪んでしまう場合もあったが、判定に影響するものではなかった。

### 2) 同じ PFGE パターンを示した株の IS 法による解析

2011年に分離された O157のうち同じ PFGE パターン（T-1105g）を示した8株について IS 解析を実施した。IS 解析の結果、これら8株は3種類の IS パターンに分類された（写真3、表2）。IS型でC型に分類された3株は同じ施設で発生した O157 集団感染事例におけるデイサービス利用者と介護職員由来株であった。PFGE 法で同じパターンを示した場合、IS 法でさらに細かく分類できる可能性も示唆された。

## 3. PFGE 法が有効に活用された事例

各施設で経験した PFGE 解析が有効に活用された事例についてまとめた。

### 1) 同一外食チェーン店で発生した O157 による食中毒事例（別紙1）

### 2) 学校給食施設を原因とするサル

モネラ Enteritidis による食中毒事例（別紙2）

### 3) 飲料水が原因となった複数の腸管出血性大腸菌による食中毒事例（別紙2）

## 4. アンケート結果

各施設で実施した PFGE 法による解析結果を、どのように行政側へ活用させているかを知るために、アンケート調査を行なった。PFGE 結果の表記方法は、「番号表記」7施設、「画像表記」6施設、「デンドログラム作成」2施設であった。提供方法は、「番号のみ」あるいは「画像のみ」が各3施設、「番号+画像」が2施設、「番号+デンドログラム」が1施設、「番号+画像+デンドログラム」が1施設「解析結果を報告したことがない」が1施設であった。

## 5. MLVA 法の検討

2010年6月に都内で分離された流行株（O157, VT2）6株は全ての locus で同じリピート数であった。一方、8～9月流行株（O157, VT1+VT2）10株は、IS-printing system 解析では全て同一コードであったが、MLVA 法では、分離された10株中4株は1～2 locus で異なるリピート数が確認された。解析時、蛍光強度が強すぎたためにピークが振り切れてしまったことや、バックグラウンドにノイズが入っていたため、正確に増幅サイズを読み取れていない可能性が示唆された。今後、DNA 量やサンプル調整法について検

討し、安定した結果が出せるように整備していく予定である。

#### D. 考察

各地方衛生研究所で実施する PFGE 法の標準化を目的として、腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌株を配布し、各地研で PFGE 解析をした。その成績を東京都健康安全研究センターに電送後、画像解析ソフトを用いて解析を試みた。写真の撮影方法は、各地研で通常行なっている方法で実施したが、アガロースゲルをできるだけ大きく写すようにした。電送された写真をみると、いずれの施設も非常にシャープなバンドが得られており、分子量の小さいバンドまで、きれいに分離されていた。今年も 11 施設中 3 施設で担当者の異動があったが、多くの施設で非常にきれいな解析像を得られたことは、毎年行なっている精度管理の成果の 1 つであると考えられた。今回は、取り込んだ画像のファイル形式を指定しなかったため、画像そのものではなく、Excel ファイル等に添付した形式で送付された写真もあった。このような写真は、tiff 形式に変換後解析を行ったが、解像度が低く、バンドを選ぶのが困難であった。このような場合には、郵送された写真をスキャナーで読み込んで解析することで、デンドログラム解析を行うことができた。

共通株 5 株について IS 法での解析を行った結果、全ての施設で同じコードを得ることができた。IS 法はサンプルの調整も容易で、非常に短時間に結

果を得ることができるというメリットがある。自治体間でパターンを比較する場合、PFGE 法と合わせて IS 法の結果を送付することで、より正確で迅速な比較が可能となることが示唆された。

次に、同じ PFGE パターンを示した株について IS 解析を行い比較した。解析した 8 株は IS 法では 3 タイプに分類することができた。この様に、同じ PFGE 型を示す株の場合、更に細かく分類するためのサブタイピング法としても有効である可能性が示唆された。しかし、異なる PFGE パターンでも IS 法では同じコードになってしまう場合もあるため、結果の解釈が難しい場合もある。

各地研で実施した PFGE 解析結果の、行政への提供方法についてアンケートを実施した。PFGE 結果の表記方法としては 7 施設で「番号表記」を行っていた。また 6 施設では、「画像の提供」を行っていた。2 施設で「デンドログラム解析」を行っていた。多くは行政への活用がうまくいっている状況であった。

新しい分子疫学解析法の 1 つである MLVA 法の導入を行なうために、2010 年に分離された株について MLVA 法を実施した。正確に増幅サイズを読み取れなかった検体や、蛍光強度が強すぎて判定できない場合などがあった。安定した結果が出せるように、サンプルの調整方法など更に検討が必要である。

#### E. 結論

腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌 5 株を用いて、PFGE 解析を行った。いずれも良好な泳動像であった。

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。5 株とも、類似度は 90%以上であったが、全ての施設で 100 一致となった株は無かった。写真は非常に鮮明で、バンドの選択も適切に行なわれているのに近似度が低くなってしまいう株がある。何が問題で近似度が低くなるのか、今後検討していかなくてはならない。

共通株 5 株を IS 法で解析した結果、全ての施設で同じコードを得ることができた。IS 法はサンプルの調整容易で、非常に短時間に結果を得ることができるというメリットがあるため、自治体間で結果を比較する場合は、非常に有効な手段であることが明らかとなった。

新しい分子疫学解析法の 1 つである MLVA 法の導入を行なうために、2010 年分離株について MLVA 法を実施した。しかし、正確に増幅サイズを読み取れない場合や、蛍光強度が強く解析できない検体等があった。サンプルの調整方法など、更に検討が必要である。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

小西典子，尾畑浩魅，齋木大，門間千枝，仲真晶子，甲斐明美：多種類の

PFGE パターンを示す腸管出血性大腸菌 O157 による Diffuse outbreak について，第 85 回日本感染症学会総会，2011 年，東京．

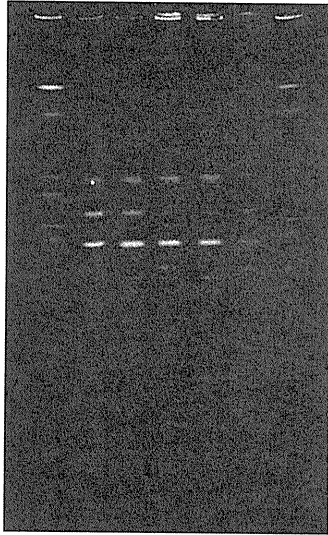
#### H. 知的所有権の取得状況

なし

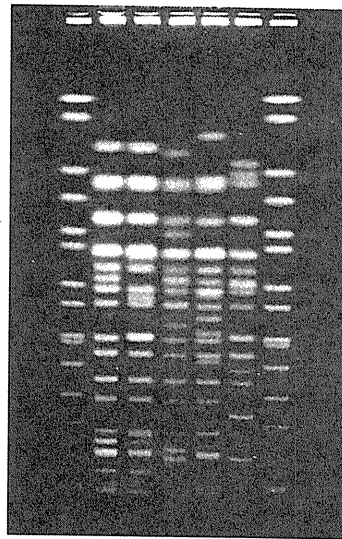


写真1 共通菌株5株のPFGE画像

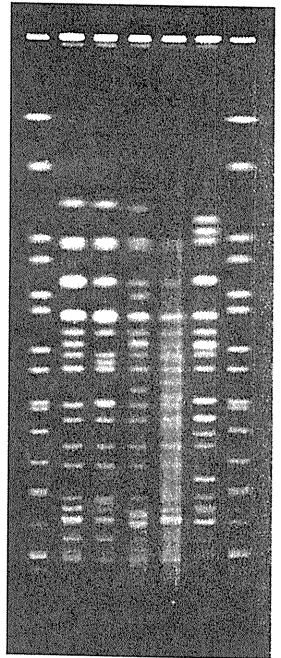
施設2



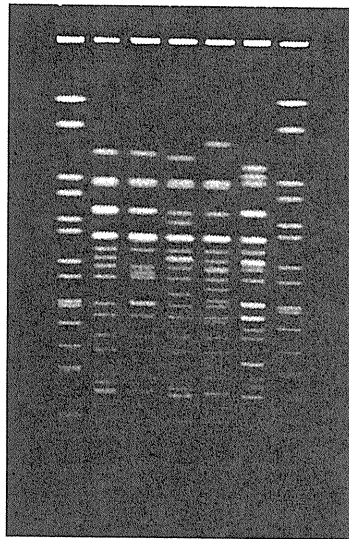
施設4



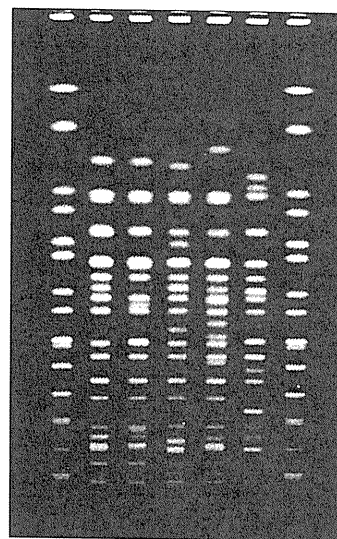
施設5



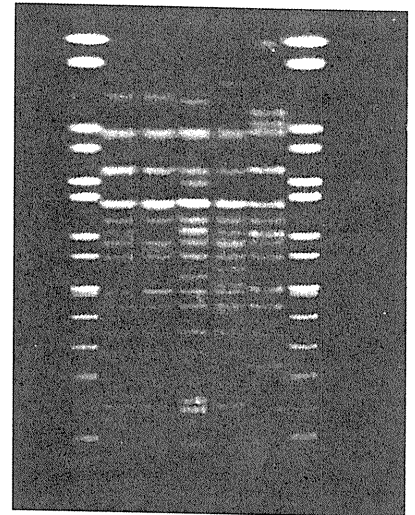
施設6



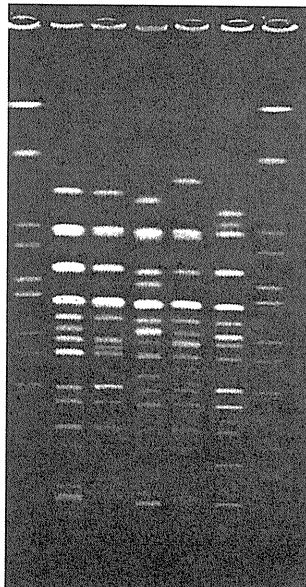
施設7



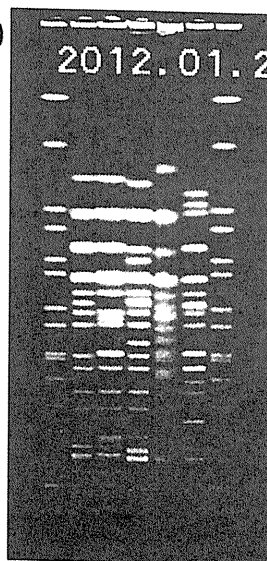
施設8



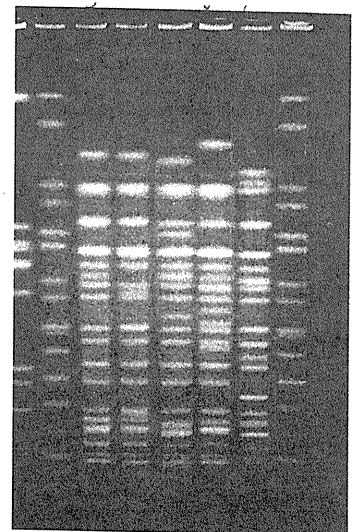
施設9



施設10



施設11



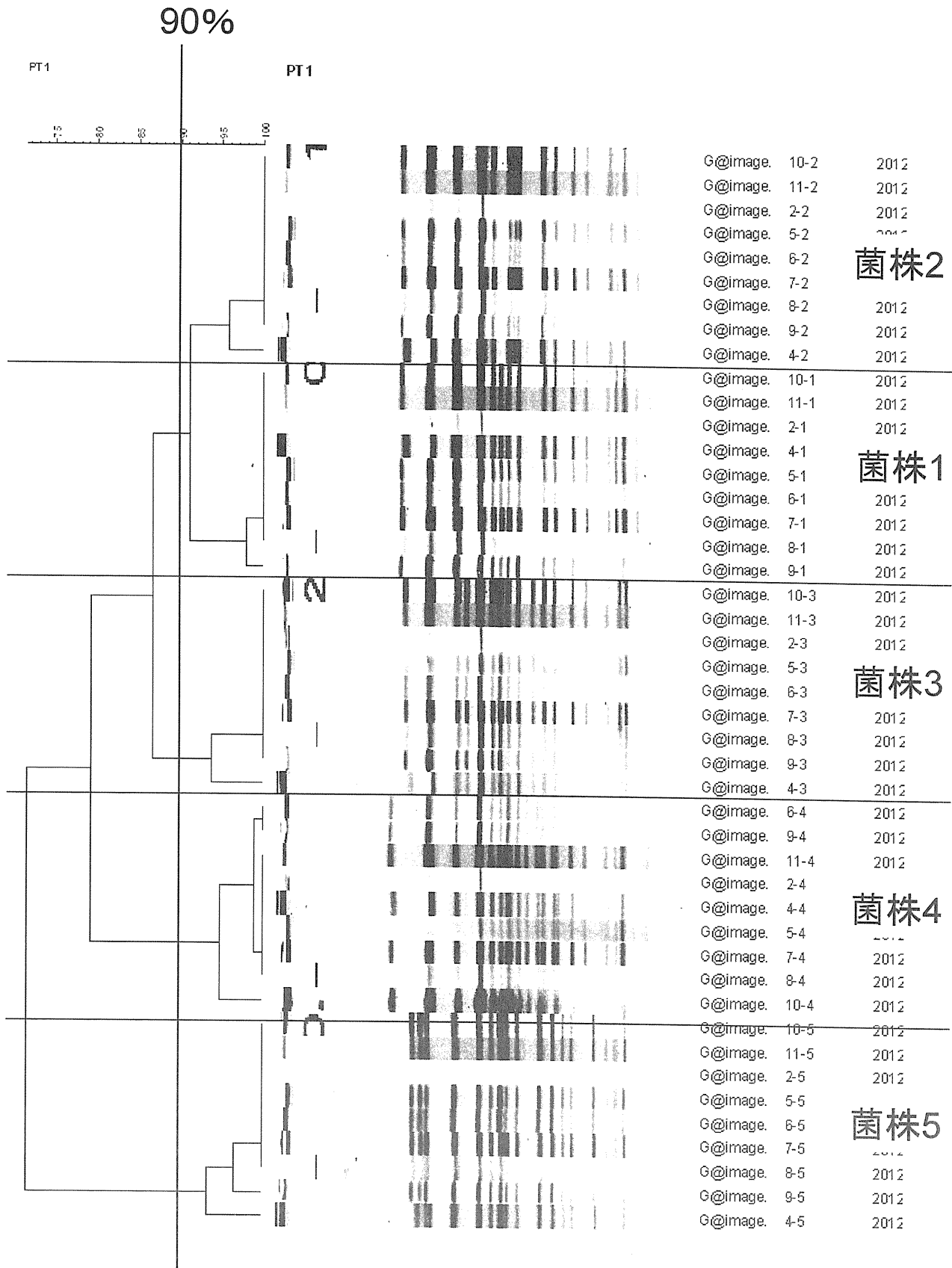


図1 各施設でPFGE解析した共通菌株のデンドログラム

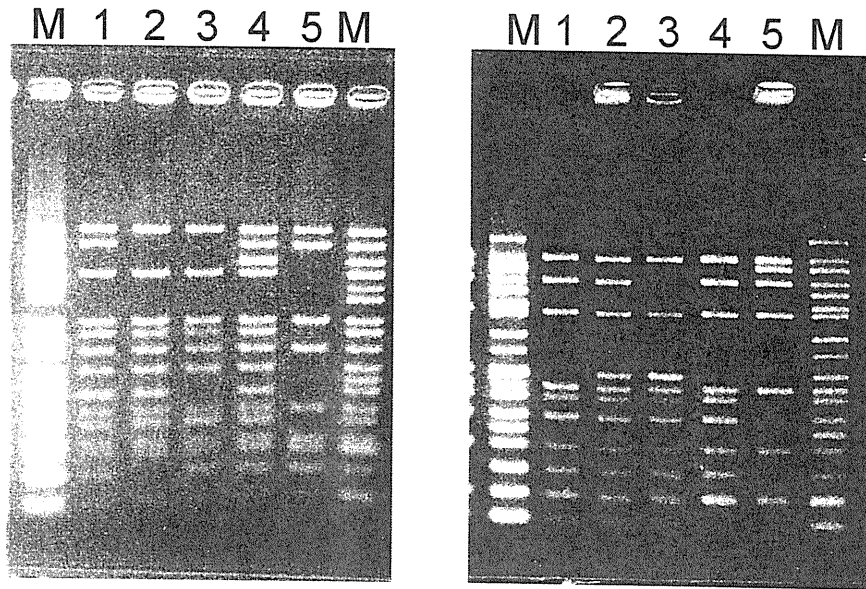


写真2 共通菌株5株のIS-printing System解析

表1 共通菌株5株のIS-printing System解析結果

衛研名:

実施日: 年 月 日

Primer set 1		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	備考 非特異バンド	PFGE 型
No.	Primer No. 菌株No. Size(bp)	1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137		
1	共通株No.1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
2	共通株No.2	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1		
3	共通株No.3	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1		
4	共通株No.4	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		
5	共通株No.5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1		

Primer set 2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	備考 非特異バンド	PFGE No.
No.	Primer No. 菌株No. Size(bp)	2-01 987	2-02 861	2-03 801	2-04 710	2-05 642	2-06 599	2-07 555	2-08 499	2-09 449	2-10 394	2-11 358	2-12 331	2-13 301	2-14 278	2-15 240	2-16 211	stx2 181	stx1 151		
1	共通株No.1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1		
2	共通株No.2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
3	共通株No.3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
4	共通株No.4	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0		
5	共通株No.5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		

増幅バンド : 有り→(1), 無し→(0), 判定困難→2

写真3 同じPFGEパターンを示した株におけるIS-printing System 解析

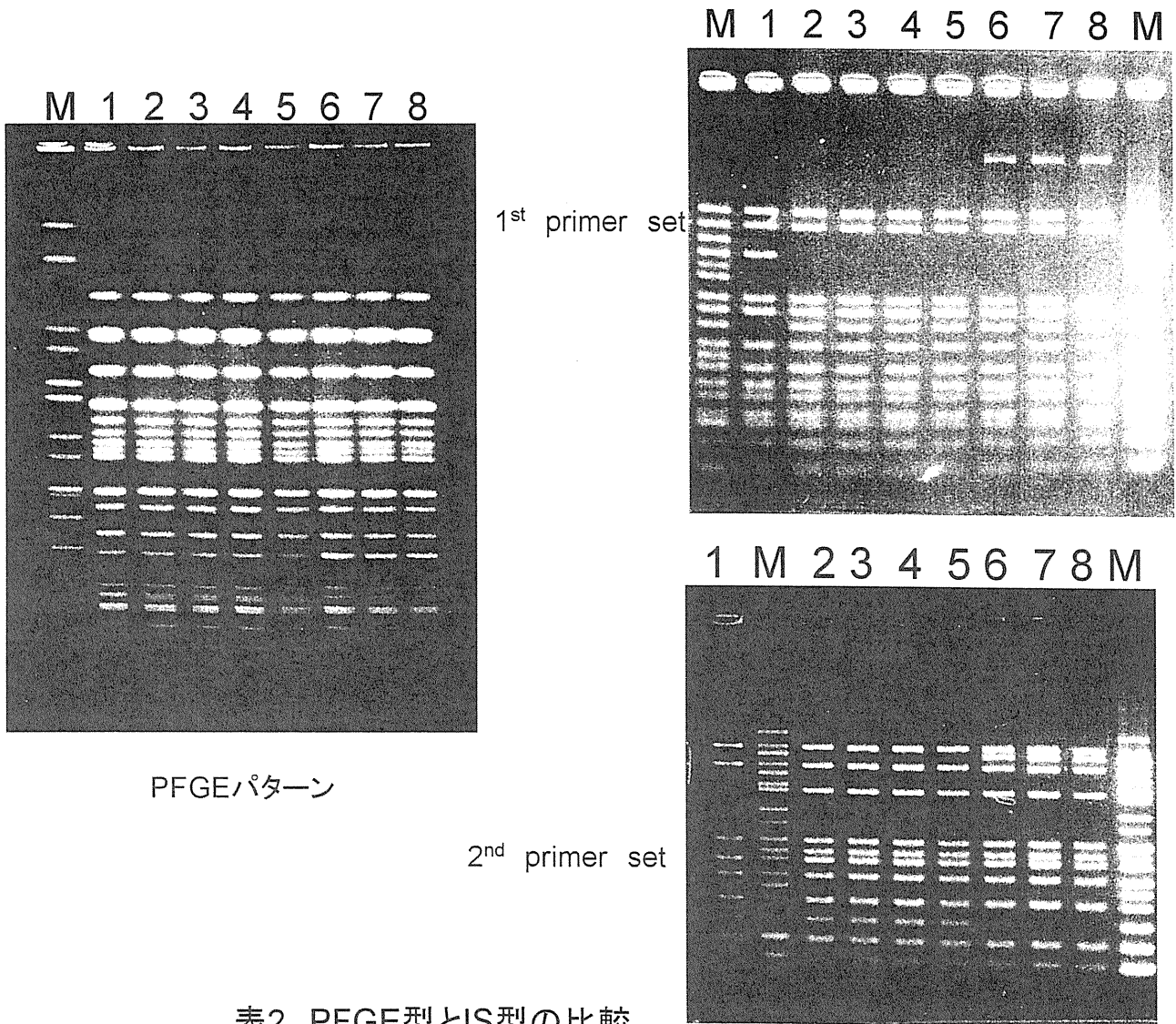


表2 PFGE型とIS型の比較

レーン	分離月	由来	関連	PFGE型	IS型
1	7月	散发事例		T-1105g	A型
2	7月	食品(ホルモン)		T-1105g	B型
3	7月	散发事例		T-1105g	B型
4	8月	散发事例		T-1105g	B型
5	9月	散发事例		T-1105g	B型
6	8月	集団事例	デイサービス利用者	T-1105g	C型
7	9月	集団事例	デイサービス介護職員	T-1105g	C型
8	9月	集団事例	デイサービス利用者	T-1105g	C型

表3 アンケート結果

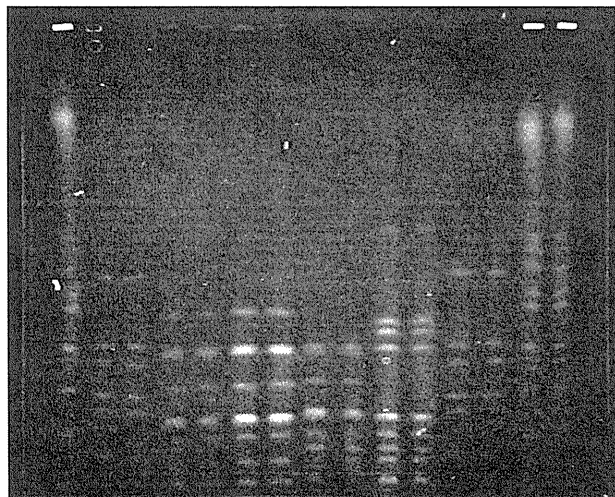
PFGE結果の表記方法	施設数
番号をつける	7
<ul style="list-style-type: none"> <li>{ 独自番号</li> <li>{ 感染研番号</li> <li>{ 独自+感染研番号</li> </ul>	4
	1
	2
画像	6
<ul style="list-style-type: none"> <li>{ 紙ベース</li> <li>{ 電子</li> </ul>	4
	2
デンドログラム作成	2

提供方法	施設数
番号のみ	3 (独自番号1, 感染研番号1, 両方1)
画像のみ	3
番号+画像	2
番号+デンドログラム	1
番号+画像+デンドログラム	1
なし	1



◎EHEC事例について

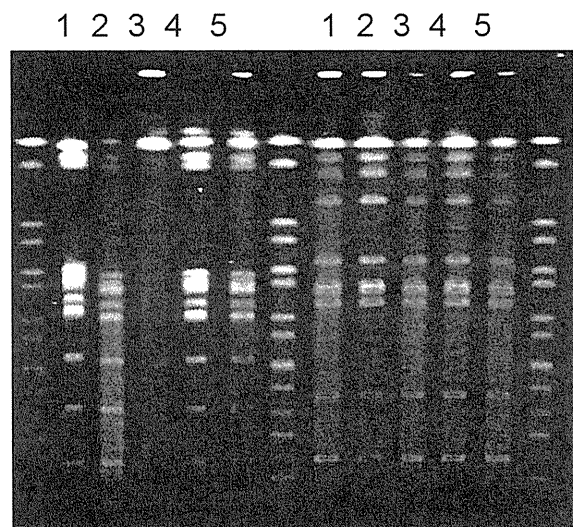
平成23年8～9月に、食品製造に係わる施設の従事者を対象に定期検便を実施したところ、同一外食チェーン店の複数の店舗の従事者から、腸管出血性大腸菌O157が検出された。そこで、当研究所において、これらの菌株について制限酵素Xba IIによる処理でPFGEを実施したところ、両者は異なったバンドパターンを示した。これにより、それぞれの施設における従事者におけるO157の感染源は、異なっていることが示唆された。



M, *S. cerevisiae* S, *S. Braenderup* H9812  
 1, 他事例O157株 2, A店従事者 3, B店従事者

◎サルモネラ食中毒事例について

平成23年3月、学校給食施設を原因とする広域食中毒事例が発生した。当該施設で調理された給食を喫食した児童および生徒、調理従事者、職員2055人のうち364人が食中毒様の症状を呈した。細菌検査の結果、患者便、調理従事者便および検食のもやしのナムルから*Salmonella* Enteritidisが検出された。そこで、これらの菌株について制限酵素Xba IおよびBln IIによる処理でPFGEを実施したところ、両制限酵素ともすべての菌株で同一のバンドパターンを示した。これにより、サルモネラに汚染されたもやしのナムルを介して広まったサルモネラ食中毒事例であることが示唆された



M. *S. Braenderup* H9812  
 1. A小学校患者  
 2. B小学校患者  
 3. C中学校患者  
 4. 従事者  
 5. 調理品

Xba I

Bln I

制限酵素Xba I およびBln I によるPFGE

## 飲料水が原因となった複数の腸管出血性大腸菌による食中毒事例

2011年7月23日、医療機関から管轄保健所に、EHEC O121 (VT2) 及び O145 (VT1) の混合感染の患者 (A小学校児童) 1人の届出があった。患者の家族5人と患者が通うA小学校の同学年の有症者1人について検便を行ったところ、7月27日児童1人から初発例と同じEHEC O121及びO145が検出された。A小学校は、7月14日から15日にかけて県中部の宿泊施設を利用した行事を実施しており、行事に参加した児童及び教員の38人中15人が消化器症状を呈していたことから、行事参加者全員の健康調査及び検便を行ったところ、行事参加者21人からEHEC O103 (VT1)、O121及びO145が単独又は混合で検出された。さらに、同一郡内のB小学校でもA小学校の1週間前に当該施設を利用していたことが判明したため検便を行ったところ、児童2人からEHEC (O103、O145) が検出された。施設の飲料水の検査を行ったところ、EHEC O121が検出された。飲料水分離株1株と患者分離株4株 計5株についてPFGEを実施したところ、患者株1株に1本の差異があった以外は同一パターンを示した(図)。また、患者から分離されたEHEC O103 26株 及びO145 12株についてPFGEを実施したところ、一部分離株で1～3本の差異が見られたものの大多数は同一パターンを示した。患者の共通食はこの施設が提供した食事だけであること、施設の使用水から検出されたEHEC O121が患者由来株とPFGEパターンが一致したことなどから、この施設で提供した食事を原因とする食中毒と断定された。

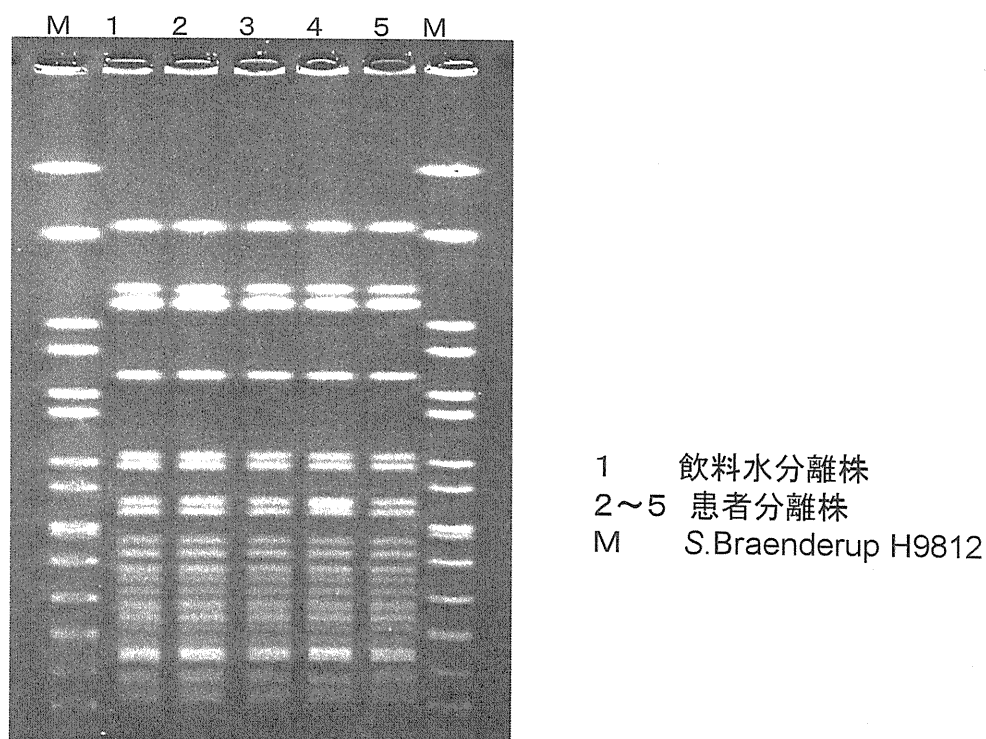


図 EHEC O121 PFGE泳動像

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

分担研究・東海・北陸地方 11 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）と PCR 型別法である IS printing System の腸管出血性大腸菌 0157 精度管理と PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査

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  
竹内由香 豊田市衛生検査所  
山本新也 豊橋市保健所

研究要旨

東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所（施設）による 3 株の腸管出血性大腸菌 0157 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）と PCR 型別法である IS printing System の精度管理を実施した。その結果、PFGE に関しては、検体 1 では 11 施設全体の相同性は 93.8% と 3 検体中最も高率であった。検体 2 は 11 施設の泳動図は全体で 88.6% と 3 検体中最も低い相同性であった。検体 3 の 11 施設の泳動図は全体で 92.1% の相同性であった。従って、何れの検体も相同性約 90% とこれまでと同様に良好な結果であった。また、IS printing System 精度管理に関しては、11 施設のうち 8 施設では 3 検体全て正しく型別が行われていた。しかし、3 施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。これらの原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスメアーになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。従って、来年度以降も精度管理を実施し、IS printing System のデータベース化のための技術向上を図りたい。

行政への還元に関する調査では平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研から 3 件の事例報告があった。具体的には 1) 保育所における腸管出血性大腸菌 026 集団感染事例、2) 介護老人福祉施設における腸管出血性大腸菌 0157 集団感染事例、3) 仕出し弁当を原因とする 026 食中毒事例。またこれ以外に散发下痢症患者由来サルモネラ属菌（09:-:-）PFGE 解析結果も報告された。



## A. 研究目的

我が国では、0157 による diffuse outbreak (散在的集団発生) を迅速に検出するためのシステムである「パルスネットジャパン」稼働のため、国立感染症研究所 (感染研) と全国の各地域ブロック代表の 5 地方衛生研究所 (地研) が協力して平成 12 年度より研究班活動を行なっている。研究班活動の結果などを基に構築される「パルスネットジャパン」では、各地研が都道府県内で検出された 0157 についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行い、その泳動図を感染研に電送し、感染研でこれら泳動図について解析ソフトを用いて比較を行なう。もし同一もしくは非常に類似した泳動図が複数の異なった都道府県から得られた場合には diffuse outbreak の発生が強く疑われ、迅速な diffuse outbreak の検出、及びその疫学情報の裏付けが可能となる。

本システムが円滑かつ信頼性を持って稼働するために最も重要な点は、「異なった地研で同一の PFGE 型の 0157 について PFGE を実施した場合、解析ソフトを用いてその泳動図を比較するとその相同性が 100% となる。」ことである。

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のブロック内への周知、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 of 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) の調査を行ってきた。

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 23 年度の活動内容は 1) PFGE 及び 0157 の PCR 型別法 IS printing System (東洋紡) 精度管理を当所から送付した 3 株の 0157 を用いて東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所 (以下施設と略す) にて実施し、一層の PFGE 画質の向上と IS printing System のデータベース化のための技術向上をはかる。2) 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知ることがを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 精度管理

#### [I] 送付菌株

3 検体の 0157 (検体 1 から 3) を精度管理に用いた。これら 3 株の腸管出血性大腸菌 0157 は愛知県内で検出され、その愛知衛研番号とベロ毒素型は検体 1. 2007-96, VT2 ; 検体 2. 2008-3, VT1&2 ; 検体 3. 2011-161, VT2 である。その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研に

において市販の病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて行なった。

#### [II]方法

愛知県衛生研究所（愛知衛研）よりそれぞれ3検体を10施設（石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、岡崎市総合検査センター、福井県衛生研究所、三重県保健環境研究所、名古屋市衛生研究所、豊田市衛生試験所、豊橋市保健所）に送付した。そして、愛知衛研を含む11施設において、送付された3検体についてPFGEを実施した。PFGE実施条件に関しては、サルモネラマーカーの使用を統一した。10施設のPFGEの泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「BioNumerics Version 6.0」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。IS printing Systemに関しては、方法は添付のマニュアルに従って行い、得られた泳動図及び結果のエクセルファイルは愛知衛研にメールにて電送し、解析を行った。

## 2. 行政への還元に関する調査

平成23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。

### C. 研究結果

#### 1-1. PFGE 精度管理

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体1から3の泳動図の解析を行い系統樹を作成した。

検体1に関しては11施設全体の相同性は93.8%と3検体中最も高率であった。11施設の泳動図は9施設が100%の相

同性で含まれる1つの大きなクラスターが認められた。残り2施設はそれぞれ独立に存在していた。

検体2については11施設の泳動図は全体で88.6%と3検体中最も低かい相同性であった。このうち4施設の泳動図は100%で一致した。残り7施設の泳動図はそれぞれ個別に存在したが、お互いの相同性は1施設を除いて90%以上であった。

検体3の11施設の泳動図は全体で92.1%の相同性であった。2施設、及び5の泳動図はそれぞれ100%で一致した。残り4施設の泳動図はそれぞれ個別に存在した。

これまでのPFGE精度管理で同一検体を配布したにもかかわらず施設によって高分子量領域において明らかにバンドパターンが異なるという一部の0157株に認められる遺伝的な不安定さが認められた。今年度も施設によって高分子量もしくは低分子量領域にやや薄いバンドやぼやけたバンドが出現していた。なお図1には11施設のPFGE泳動図を示した。

#### 1-2. IS printing System 精度管理

11施設中3施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。具体的には施設Aでは検体2で1本のバンドを認識することが出来ず、検体3では2本のバンドを認識出来ず、2本のバンドは存在していないのにも関わらず認識していた。施設Bでは検体1から3で1本のバンドを認識出来ず、検体1、2では存在しないバンドを認識していた。施設Cでは検体3で1本のバンドを認識出来ず、検体1から3で1本のバンドが薄く認識出来なかった。これらの原因として1) 高分子量領域でバンドが濃くスメアーになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。な

お3施設の結果のエクセルシートと泳動図を図2に示した。残り11施設のうち8施設では3検体全て正しく型別が行われていた(図3)。

## 2. 行政への還元に関する調査

平成23年4月から12月までの間に東海・北陸各地研から3件の事例報告があった。

### 1. 保育所における腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例

#### 事例の概要

- ・原因施設：T市内の保育所(児童数70人、職員数：22人)
- ・感染者数：17名
- ・発生日：平成23年7月25日
- ・終息日：平成23年8月22日
- ・原因菌：腸管出血性大腸菌 O26:H11 VT1

#### PFGE 解析結果

感染者17名から検出された腸管出血性大腸菌 O26 について、制限酵素 Xba I による PFGE を実施したところ、17株すべての泳動パターンが一致した。

### 2. 介護老人福祉施設食中毒事例

<概要>平成23年10月3日18時頃、K市内の医療機関からM保健所に、10月2日に医療機関を受診したK市内の介護老人福祉施設Aの入所者1名の便から腸管出血性大腸菌 O157 が検出されたと報告があった。

保健所による調査の結果、この施設に隣接する施設Bでも、10月1日から10日下痢等の症状を呈する患者が発生していることが判明した。患者は2施設計9名、全員が入院しており、9名全員の便から腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) が検出された。

これらの施設の入所者や利用者の食事は、全て介護老人福祉施設Aで調理しており、保存食の検査で、9月25日の昼食に出された「大根おろしと大葉の和え物」から

患者と同じ腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) が検出されたことから、施設で調理した食事が感染源となった食中毒と断定した。

#### <PFGE による解析結果>

介護老人福祉施設Aおよび隣接施設Bの入所者の便から分離された菌株および保存食から分離された菌株No.3~11のDNA切断パターンは全て同一であった(図4)。

### 3. 仕出し弁当を原因とする O26 食中毒

平成23年6月に、T県内の施設A、Bが製造した仕出し弁当を喫食したうち、約20名が腹痛、血便、発熱等の食中毒症状を呈した。調査を行ったところ、施設Aの弁当を喫食した25名および施設Bの弁当を喫食した有症者1名からO26:H11(stx1)が検出された。施設A、Bの弁当喫食者から分離されたO26のPFGEパターンは同一であった。

これらの施設には、共通してK県内の食品加工業者から「添え野菜」が納入されていた。施設A、Bの検食についてO26の検査を行ったところ、施設Bの「添え野菜」からO26が検出された。施設Aの検食には「添え野菜」が残されておらず、他食材からもO26は検出されなかった。「添え野菜」から検出されたO26と弁当喫食者から検出されたO26の病原因子遺伝子およびPFGEパターンは同一であった。さらに、共通の「添え野菜」が納入されていたK県内の施設Cの弁当を喫食した有症者1名からもO26が検出され、富山県内患者および「添え野菜」から検出されたO26とPFGEパターンが一致した。

これらの結果から、今回の食中毒は共通食材「添え野菜」が原因で発生したものであると考えられた。

### 4. 散発下痢症患者由来サルモネラ属菌 (O9:-:-) PFGE 解析

2011年にF県内で散発下痢症患者から検出されたサルモネラ属菌(O9:-:-)20株のうち19株のPFGEパターンは類似して

いた（相同性 85%）（図 5）。

#### D. 考察

PFGE 泳動図の相互比較のために重要と考えられる PFGE 実施条件として 1) サルモネラマーカの使用、2) PFGE 泳動条件の統一がある。今年度の精度管理ではこのうちサルモネラマーカ使用のみ統一としたが、PFGE 泳動条件の統一は全ての施設で行われていた。解析を行なった 11 施設の泳動図に関して 3 検体とも全体の相同性は約 90%であったが、2 から 9 施設では相同性 100%が得られた。今後、全体の相同性を 100%に近づけるためには菌株自体の変異も関係していると思われるが、各施設の画質の向上に加え、各施設から電送された泳動図は大きさや明るさにかなりバラツキがあることからこれらの統一を行うことが必要であると思われる。

初めての試みとして IS printing system 精度管理を実施した。11 施設中 8 施設では 3 検体何れも正しく型別を行うことが出来た。しかし、残りの 3 施設では一部若しくは 3 検体全て、バンドを正しく認識することが出来なかった。これまでの東海・北陸ブロックでの IS printing system の試行から非特異バンドの出現は指摘されていたが、型別に大きく影響を及ぼすものではなかった。今回、正しくバンドを認識出来なかった原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスマアになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短い等が考えられた。このうち、1) と 4) に関しては、プロトコールに従って正しく行えば解消される問題と考えられた。2) と 3) の問題点に関しては、試薬、PCR 機器の不都合等が考えられる。また、これまでの研究班活動の結果から、IS printing system の解析力は PFGE とほぼ同

程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関しては IS printing system がはるかに PFGE より優っていることは明らかとなっている。従って、来年度は今年度の試みをさらに発展させ、解析する 0157 の菌株数の増加、菌株の分離年月、散発・集団等の情報の追加を行い「IS printing system によるデータベース構築」を進めたい。

#### E. 結論

東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所（施設）による腸管出血性大腸菌 0157 を用いた精度管理を実施した。PFGE はサルモネラマーカを使用し、PFGE 型の異なる 3 検体（検体番号 1 から 3）について行った。その結果、検体 1 に関しては 11 施設全体の相同性は 93.8%と 3 検体中最も高率であった。11 施設の泳動図は 9 施設が 100%の相同性で含まれる 1 つの大きなクラスターが認められた。検体 2 については 11 施設の泳動図は全体で 88.6%と 3 検体中最も低い相同性であった。このうち 4 施設の泳動図は 100%で一致した。検体 3 の 11 施設の泳動図は全体で 92.1%の相同性であった。2 施設、及び 5 の泳動図はそれぞれ 100%で一致した。

IS printing system 精度管理に関しては、11 施設のうち 8 施設では 3 検体全て正しく型別が行われていた。しかし、3 施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。これらの原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスマアになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。

平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研から 3 件の事例報告があった。