

九州地区における食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究

— IS-printing System の精度管理 —

福岡県保健環境研究所	江藤良樹、市原祥子、堀川和美
福岡市保健環境研究所	麻生嶋七美
北九州市環境科学研究所	寺西泰司
佐賀県衛生薬業センター	西 桂子
長崎県環境保健研究センター	右田雄二
長崎市保健環境試験所	江原裕子
大分県衛生環境研究センター	緒方喜久代
熊本県保健環境科学研究所	徳岡英亮
熊本市環境総合研究所	杉谷和加奈
宮崎県衛生環境研究所	吉野修司
鹿児島県環境保健センター	濱田まどか
沖縄県衛生環境研究所	久高 潤

研究要旨

IS-printing system (ISPS) の精度管理を、九州ブロック 12 施設を対象に実施した。今回は、判定困難な「明瞭なエクストラバンド」をもつ 7 株の DNA を参加施設に配布した。その結果、精度管理に使用した 7 株の ISPS 型別は、12 施設のうち 8 施設が期待される結果と異なっていた。原因は、明瞭なエクストラバンドの誤判定、PCR エラー、薄いエクストラバンドの誤判定、アガロースゲル電気泳動におけるバンドの出現位置のズレ、及び、単純入力ミスの 5 項目であった。

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、異なる実験室や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、良好な電気泳動、適切な画像の保存、実験手技の習熟が求められる。また、PFGE は解析結果を得るまでに最短 3 日を要し、迅速性に欠けている。これらの理由から、より迅速かつ簡便なスクリーニ

ング手法が望まれていた。

宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157 株の IS629 によるゲノム構造多型を利用した、遺伝子型別手法である IS-printing system (ISPS) の開発が行われた¹⁾。この手法は、O157 のゲノム、及び、プラスミド上の IS629 の 32 カ所の挿入位置と病原性関連遺伝子 (*stx*₁、*stx*₂、*eae*、*hlyA*) を multiplex PCR により検出することが出来る。その手法は、①迅速であること、②数値化が容易であることが最大の利点である。九州ブ

ロックでは、この利点を生かし、共有データベースを用いたリアルタイムな情報共有を実施している。

ISPS 遺伝子型別結果の共有においては、各施設において正確に数値化されていることが、データの信頼性を確保する上で非常に重要となる。そこで九州ブロックでは、検査技術の向上・維持と判定の均一化を目的とし、精度管理を実施している。本年度も昨年度に引き続き、九州地区各地方衛生研究所(以下、施設)にDNAを配布し ISPS の精度管理を行った。

B. 研究方法

1. 精度管理に使用した菌株

7株(精度管理試料①～⑦)の O157 は、ISPS においてエクストラバンドが観察されたものを選択した。その泳動像を図1に示した。以前、ISPS を実施した際には、精度管理試料①、③、④、⑤、⑦は、標的遺伝子の増幅産物とはサイズが明らかに異なる明瞭なエクストラバンド(▶)が観察されていた。精度管理試料①、②、④、⑤、⑥、⑦は、標的遺伝子の増幅産物と僅かにサイズが異なる明瞭なエクストラバンド(→)があるため、標的遺伝子の出現位置に複数のバンドが重なるような電気泳動像が観察されていた。また、精度管理試料⑦は薄いエクストラバンド(*)が観察されていた。精度管理試料はマニュアルに従いアルカリ抽出を行い、DNA 抽出物を各施設へ送付した。

2. 精度管理実施環境

各施設で精度管理に使用された PCR 装置、電気泳動装置、画像取り込み装置等の機器類は、表 1 のとおりであった。また、DNA 抽出物の使用量、PCR 産物の泳動量、サイズマーカー、泳動時間については、表 2 に示した。

3. 結果の判定

電気泳動により得られた 36 本の遺伝子増幅産物の出現パターンを 2 進数(1, 0)で表現した後に 10 進数に変換し、11 桁の挿入配列の組み合わせ、固有の番号とした。

C. 結果

精度管理①～⑦から抽出した DNA を ISPS にて解析した結果を図 1 に示した。この結果を正解とした場合の各施設の結果を、表 3 に示した。12 施設のうち 8 施設が期待される結果と異なっていた。結果の異なった原因については、以下のことが考えられた。

1) 明瞭なエクストラバンドによる誤判定

今回の精度管理試料①、③、④、⑤、⑦は明瞭なエクストラバンドが観察されるが、今回の精度管理では、①、④、⑤、⑦について、エクストラバンドに関連する誤判定があった(表 3)。このうち、1st set primer mix で上から 2 番目(1-02)と 3 番目(1-03)の間に明瞭なエクストラバンドが観察される精度管理試料①で誤判定のあった施設の電気泳動像(図 2)では、電気泳動は問題ないが判定にて結果が異なったもの、電気泳動でバンドが太い、または、スメアなため判定が困難であるものがみられた。

2) PCR エラーによる誤判定

精度管理試料④において、2nd primer set Mix の上から 9 番目(2-09)のバンドが薄い、あるいは、全く増幅しなかったために誤判定があった施設が、それぞれ 1 施設ずつ認められた。この精度管理試料④の 2-09 のバンドは、12 施設中 7 施設においてバンドが薄く、1 施設では全くバンドが観察されなかった(図 3)。

3) 薄いエクストラバンドによる誤判定

精度管理試料⑦の 2nd primer set Mix の上から 1 本目(2-01)と 2 本目(2-02)の間に出現する薄いエクストラバンド(図 1 の*)を誤判定している施設が 1 施設あった。この位置には、薄いエクストラバンドが頻繁に出現することから、注意が必要である。また、泳動時間をマニュアルより延長することでも、判定が容易になると推測される。

4) PCR 増幅産物の DNA 量が濃すぎる為起きた誤判定

施設 6 において、アガロースゲル電気泳動のバンドが出現位置より低い位置に出たために起きた誤判定があった(図 4)。これは、PCR 産物の DNA 濃度が高いことから起きたと推測された。

5) 単純入力ミス

1)~4)の他に、3 施設で単純な入力ミスと考えられる誤判定があった。

D. 考察

今回の精度管理は、12 施設のうち 8 施設が期待される結果と異なっていた。このうち、配布した 7 株分の DNA のうち、4 株に出現する“明瞭なエクストラバンド”は、特に判定に注意が必要であると考えられた(表 3)。一方で、今回の精度管理試料のような“明瞭なエクストラバンド”の出現率は全体の数%程度であることから、施設に搬入される O157 株の ISPS 判定への影響は限定的であると考えられる。

正解率が 100%であった施設(1,2,4,9)では、精度管理での泳動時間が 90 分以上であった。このことから、今回のような紛らわしいエクストラバンドが観察される試料の誤判定を防ぐためには、可能な限り泳動時間を長くすることが有効だ

と思われた。また、誤解答のあった施設では、電気泳動のバンドが太く、また、スメアである施設が見られたことから、今回のような、誤判定を最小限に抑えるためには、増幅産物のアプライ量の調整(例えば、希釈)などを行い、電気泳動像をより鮮明にすることや、2~4 レーンごとにスタンダード置くなどの工夫が必要であると思われる。さらに、判定する際には、精度管理試料のようなバンドが稀に出ることを、常に意識し慎重に判定することが重要である。

また、精度管理試料④において、2nd primer set Mix の上から 9 番目(2-09)のバンドが、12 施設中 7 施設において薄く、1 施設では全く観察されなかった(図 3)。このように施設によりバンドの濃さが異なると、判定者によって結果が違ってくる恐れがある。そのため、誤判定を防ぐためにも、増幅効率が他のバンドと同じになるような工夫が必要になる。以前の検討で、アニーリング温度を 2~4℃下げることで、このバンドの増幅効率が良くなることを確認していることから、このバンドが薄い施設は応急処置的にアニーリング温度を下げるのが有効だと考えられた。

今後、このような誤判定を防ぐためには、プライマー濃度変更や温度条件、及び、電気泳動条件の検討を行い、必要であれば新たな統一プロトコールの作成が必要であると思われる。

参考文献

- 1) Ooka, T. *et al.* 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 47:2888-2894.

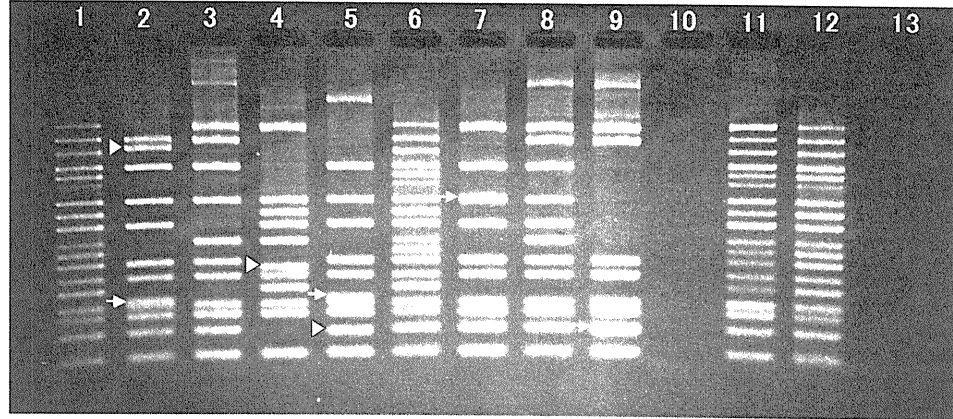
表 1. 九州各施設の IS-printing System に使用した周辺機器

Lab.	PCR機器		DNA 添加量 (μ l)	電気泳動装置			画像取り込み装置	
	メーカー	型式		メーカー	型式	泳動時間	メーカー	型式
1	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid-exU	70-90分	BIO-RAD	Gel Doc XR
2	AB	GeneAmp9700	1	ELCHROM SCIENTIFIC	SEA 2000	100分	Alpha Innotech	Alphamager Mini
3	ASTEC	PC320	1	ADVANCE	Mupid	70分	BIO-RAD	Gel Doc 2000
4	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid	120分	BIO-RAD	Gel Doc XR
5	BIO-RAD	iCycler	1	ADVANCE	Mupid-exu	90分	ATTO	Printgraph typeCX
6	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid	70分	TOYOBO	FAS-III
7	BIO-RAD	Tetrad2	1	ADVANCE	Mupid	70分	BIO-RAD	Gel Doc XR
8	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid-2 plus	70分	BioImage	Gel Print INFINITY
9	ASTEC	PC818	1	東洋紡	GelMate2000	100分	POLAROID	MP-4
10	AB	GeneAmp9700	0.5	ADVANCE	Mupid	75分	BIO-RAD	Chemi Doc XRS+
11	AB	Veriti	1	ADVANCE	Mupid	85分	CANON	CanoSCANLiDO200
12	BIO-RAD	C-1000	1	ADVANCE	Mupid	70分	BIO RAD	GEL Doc XR+

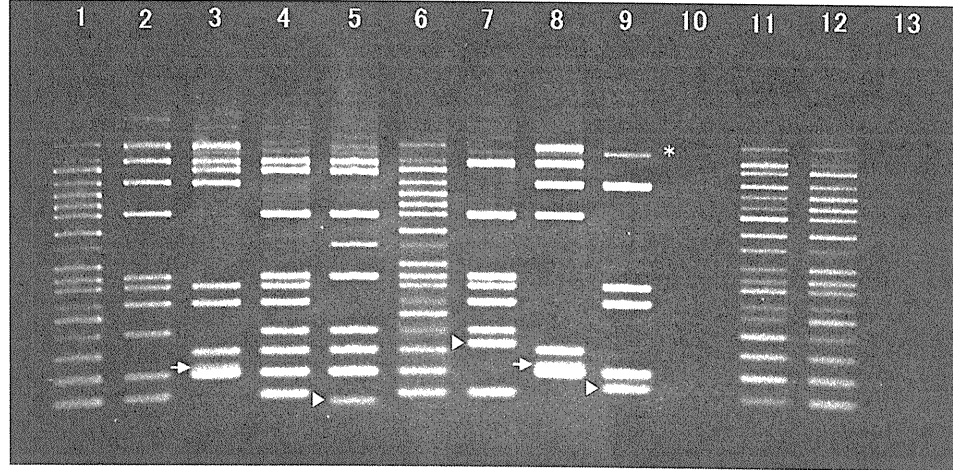
表 2. 九州各施設の電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

Lab.	泳動バッファー (TBE)			泳動mixture 混合比 (μ l) dye + amplicon	PCR産物 泳動量 (μ l)	サイズマーカー		
	メーカー	品番	使用濃度			メーカー	品番	Lording Dye
1	日本ジーン	318-90041	$\times 0.5$	1+5 (1/2希釈)	5	アプロサイエンス	SP-2210	プレミックス
2	invitrogen	15581-044	$\times 0.5$	1+5	1	bms	BC-BRG10001	TOYOBO RE-DYE
3	ナカライテスク	35432-41	$\times 0.5$	1+5	2	SIGMA	MBMA 100BP-S	TOYOBO RE-DYE
4	SIGMA	T4415-11	$\times 0.5$	1+5	5	コスモバイオ	39881	TOYOBO RE-DYE
5	BIO-RAD	161-0733	$\times 0.5$	1+5	5	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO RE-DYE
6	BIO-RAD	161-0733	$\times 0.5$	1+5	5	TaKaRa	3407A	TOYOBO RE-DYE
7	日本ジーン	318-90041	$\times 0.5$	1+5	5	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO RE-DYE
8	TAKARA	T905	$\times 0.5$	0.5+2.5	1	TOYOBO	DNA-035	TOYOBO RE-DYE
9	TaKaRa	T905	$\times 0.5$	1+5	5	TaKaRa	3407A	TOYOBO RE-DYE
10	ナカライテスク	35440-31	$\times 0.5$	1+2	2	TaKaRa	3407A	TOYOBO RE-DYE
11	日本ジーン	318-90041	$\times 0.5$	1+5	5	TaKaRa	3422A	TOYOBO RE-DYE
12	BIO-RAD	16-10733	$\times 0.5$	1+2	3	使用せず		

1st set primer Mix



2nd set primer Mix



▶ 標的遺伝子の増幅産物とはサイズが明らかに異なる明瞭なエクストラバンド
 ▶ 標的遺伝子の増幅産物と僅かにサイズが異なる明瞭なエクストラバンド
 * 標的遺伝子の増幅産物とはサイズが異なる不明瞭なエクストラバンド

- レーン
- 1 : 1st or 2nd set standard DNA
 - 2 : 精度管理試料①
 - 3 : 精度管理試料②
 - 4 : 精度管理試料③
 - 5 : 精度管理試料④
 - 6 : 1st or 2nd set standard DNA
 - 7 : 精度管理試料⑤
 - 8 : 精度管理試料⑥
 - 9 : 精度管理試料⑦
 - 10 : negative control
 - 11 : positive control
 - 12 : 1st or 2nd set standard DNA
 - 13 : -

- サンプル
- Loading dye 1.0 μ l
 - amplicon 2.5 μ l
 - H₂O 2.5 μ l
- } 6 μ lをアプライ
- Loading dye 1.0 μ l
 - Marker (94781F8) 0.5 μ l
 - H₂O 4.5 μ l
- } 6 μ lをアプライ
- 泳動装置 Mupid®-exU
 - 泳動条件 100V、90min
 - 気温 23 °C
 - ゲル量 100ml

統合結果

Name	10進数	Results																																		
		1st set primer Mix														2nd set primer Mix																				
		1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	1-16	hlyA	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	sbx1	sbx2
精度管理試料①	57733536074	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
精度管理試料②	27384601163	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
精度管理試料③	66322101185	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
精度管理試料④	30418917704	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
精度管理試料⑤	40551307593	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
精度管理試料⑥	25789717323	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
精度管理試料⑦	18792830979	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

図1 精度管理に使用した菌株と IS-printing System の結果

表3. 各施設の誤解答のバンドと正解率

Lab.	試薬 Lot	精度管理試料番号							施設毎の 正解率
		①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	
1	94781F8	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
2	0651A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
3	0651A	1-03	—	—	—	2-16	—	2-01	4/7 (57%)
4	05122J5	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
5	05122J5	1-03	—	—	2-9	2-16	—	<i>stx</i> ₁	3/7 (43%)
6	0651A	—	2-04, 2-05	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
7	91520A6	1-15	—	—	<i>stx</i> ₁ , 1-15	—	—	<i>stx</i> ₁	4/7 (57%)
8	02252C4	1-03, 2-15	—	—	2-9	—	—	<i>stx</i> ₁	4/7 (57%)
9	1201A	—	—	—	—	—	—	—	7/7 (100%)
10	05122J5	—	1-02, 2-04	—	<i>stx</i> ₁	—	—	—	5/7 (71%)
11	0651A	1-03	—	—	—	—	—	—	6/7 (86%)
12	01223A5	1-03	—	1-12	<i>stx</i> ₁	2-16	—	<i>stx</i> ₁	2/7 (29%)
各試料の正解率		6/12 (50%)	10/12 (83%)	11/12 (92%)	7/12 (58%)	9/12 (75%)	12/12 (100%)	7/12 (58%)	

* 太字 は、明瞭なエクストラバンドを誤判定したものを示す

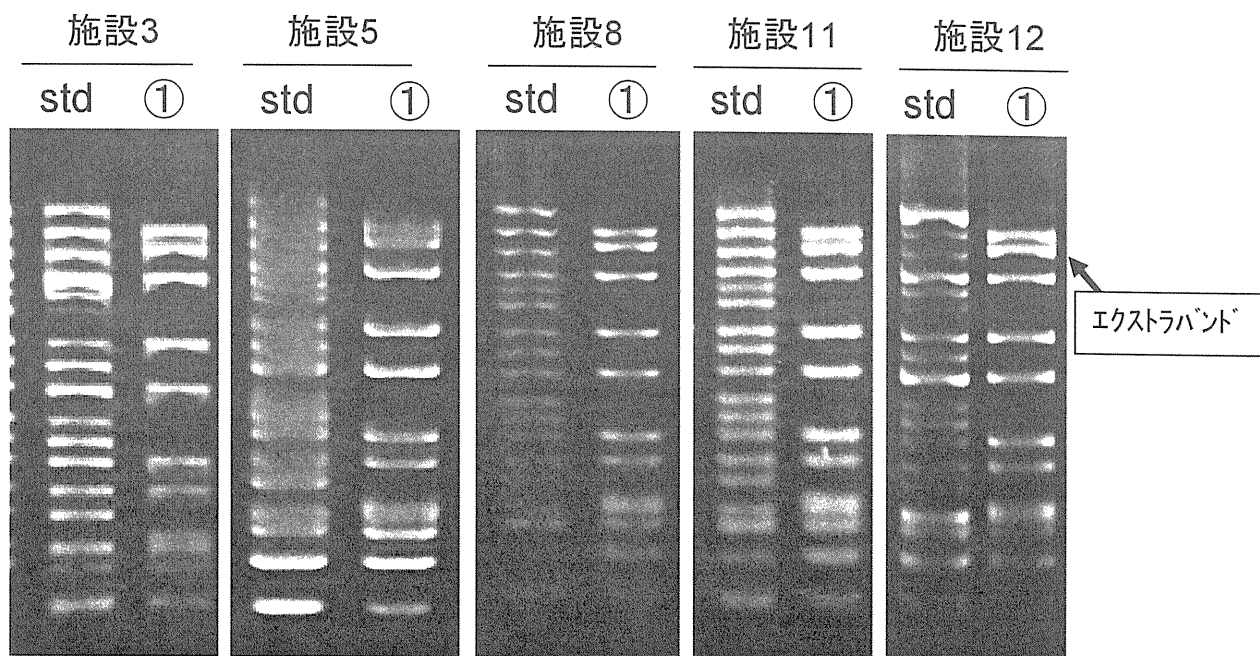


図2 精度管理試料①で不正解であった施設の電気泳動像 (1st set primer Mix)

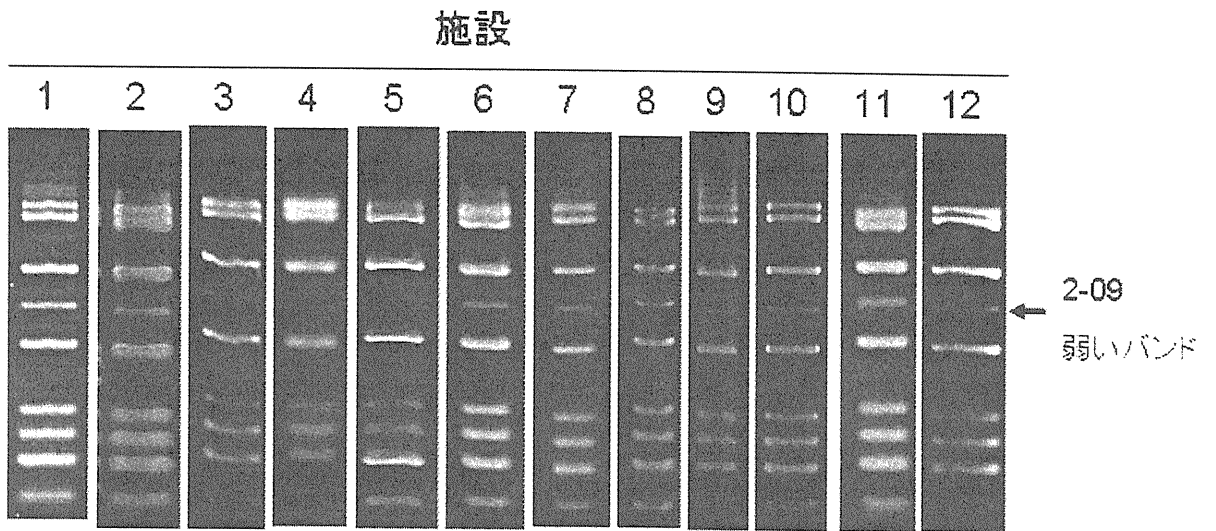


図3 各施設の精度管理試料④のアガロースゲル電気泳動像 (2nd primer set Mix)

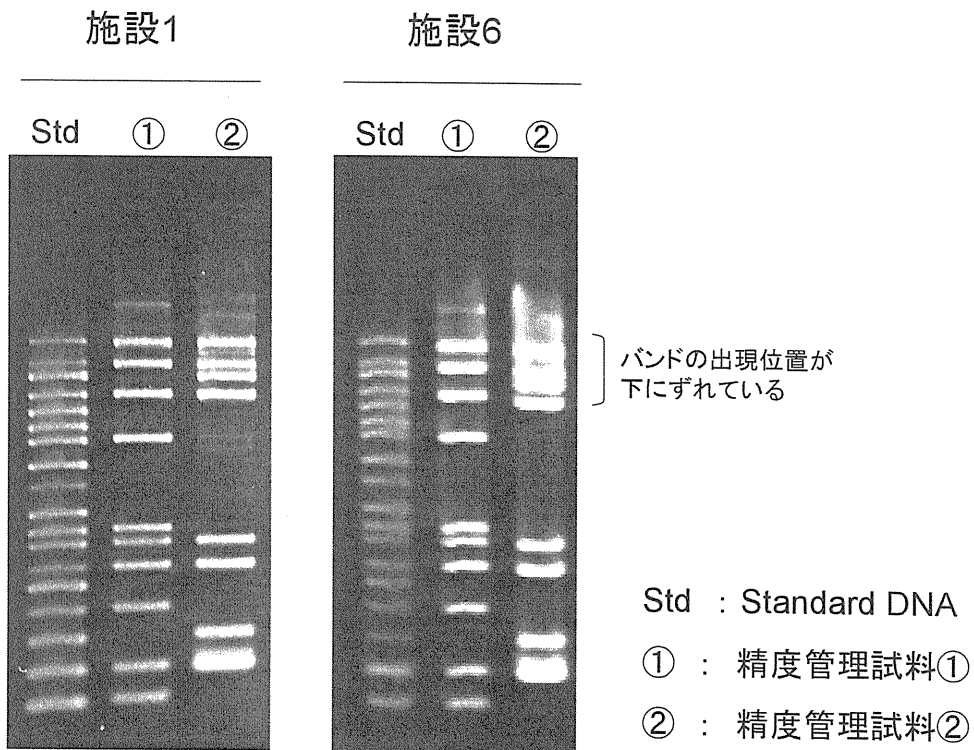


図4 バンドの出現位置がずれたアガロースゲル電気泳動像

IS-printing System の活用により
集団事例の解明・感染拡大防止に寄与した 2 事例

大分県衛生環境研究センター 微生物担当
緒方喜久代、佐々木麻里、成松浩志

要旨

平成 18 年度以降、迅速かつ簡便に疫学解析を行うため、IS-printing System (insertion sequence の分布を利用した multiplex PCR による EHEC O157 サブタイピング法) の導入に向けた取組みを行ってきた。平成 23 年の 8 月終わりから 9 月初めにかけての短期間に、EHEC O157 の散発事例が集積したため、入手した菌株について、随時、IS-printing System による遺伝子解析を試み、行政サイドへ迅速な情報還元を行い、その有用性について検討したので報告する。

【事例 1】

平成 23 年 8 月 29 日、N 市内の医療機関から腸管出血性大腸菌 (EHEC O157 : H7、VT1&2) 感染症の発生について、管轄の K 保健所に届け出があった。疫学調査の結果、患者らは同年 8 月 20 日から 8 月 22 日の間に、N 市内の焼肉店 K を利用した 5 グループ 21 名中 10 名が、腹痛、下痢等の食中毒症状を呈していたことが判明した。

医療機関および保健所から入手した菌株は、定法に従って同定し、EHEC O157 に特異的な生化学的性状を確認した。VT 遺伝子および VT 型の確認は PCR 法で実施した。

IS-printing 法は市販の IS-printing

System (東洋紡) を用い、プロトコールに従って実施した。サンプルの調製は、クロモアガー O157 培地に発育した 1mm 程度のコロニーを、推奨法であるアルカリ溶解法で処理して行った。ゲル作製および泳動に使用する buffer は 0.5×TBE を使用した。その結果、解析に用いた分離菌株はいずれも同じ IS パターンを示した。

以上の疫学調査と遺伝子解析の結果より、K 保健所は焼肉店 K の営業者に対し、営業停止及び施設整備改善を命令し、迅速に感染拡大防止を図った。

【事例 2】

平成 23 年 8 月 31 日、O 市内の医療機

関から、「8月26日（金）にO市内の飲食店Aを利用した3名が下痢・腹痛等の食中毒様症状を呈している。」との連絡がO市保健所にあった。

調査の結果、患者グループは8月22日（月）にも別の飲食店Bで食事をしており、同日、同じ飲食店Bで食事をした他のグループ4名のうち2名も下痢・腹痛等の症状を呈していたことが判明した。解析に用いた分離菌株はいずれも同じISパターンを示した。それらの結果により、O市保健所は飲食店Bを原因施設とした食中毒事件とし、感染拡大防止を図った。飲食店Bが共通であったこと、飲食店Aからは他に患者発生がなかったことから判断であったが、野菜など広域に流通する食品が原因とするならば、他に原因

施設等が存在し、個々に発生した事例が偶発したことも考えられる。飲食店Aと飲食店Bの共通食材、仕入れ状況なども念頭に入れ、調査をする必要性を痛感した事例であった。

これら2事例により、IS-printing法は、PFGE法に比べて迅速かつ簡便であること、得られる泳動結果の当該バンドの有無を「1」「0」と数値で表記することにより菌株間の比較をしやすいことなどから新たな疫学解析手段として、行政現場での即応に役立つことが示された。今後、さらに行政ニーズに即応できるよう標準化するため、精度を確保し、解析能を検証するために実績を重ねる必要がある。

IS-printing および PFGE 解析により、
牛レバー刺しが原因と推定された腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例

福岡市保健環境研究所

麻生嶋七美、本田己喜子、樋脇弘

要 旨

2011 年 8 月に、市内医療機関より管轄保健所に腸管出血性大腸菌 O157 患者 1 名の感染症発生届が提出された。患者の家族 3 名について検便を実施したところ、1 名から腸管出血性大腸菌 O157:H7(*stx2*) (以下 O157) が分離され、さらに、この家族らが喫食した牛レバー刺しの残品からも O157 が分離された。これらの患者由来 2 株と、残品由来 1 株の計 3 株の O157 は、IS-printing System による解析で同じ IS コードが得られた。また、これら 3 株のパルスフィールド・ゲル電気泳動法のパターンも同一であった。したがって、本事例は、菌の分子疫学的解析および保健所の実施した疫学調査の結果から、牛レバー刺しを原因食品とする食中毒事例であることが判明した。また、本事例では、分子疫学的解析にパルスフィールド・ゲル電気泳動法に加えて、IS-printing System による解析を併用したが、本法では菌分離後の解析時間が大幅に短縮され、解析結果を迅速に行政部門へ提供することが可能であった。

A. 事例の概要

2011 年 8 月 8 日に、市内医療機関より腸管出血性大腸菌 O157 患者 1 名の感染症発生届が管轄保健所に提出された。保健所の聞き取り調査で、この患者は 8 月 3 日から、腹痛、水溶性下痢、血便および発熱の症状を呈しており、発症する 4 日前に、牛レバー刺し(市内の精肉店で購入)を家族 2 名と喫食していたことが判明した。そして、この家族 2 名も軟便を呈していた。

当研究所にはこの患者の同居家族 3 名(うち 1 名は牛レバー刺しの喫食なし)の糞

便と牛レバー刺しの残品が搬入され、検査を実施することとなった。

B. 検査方法

1. 糞便からの分離

亜テレル酸カリウム添加(2.5 mg/L)ソルビトールマッコンキー培地(Oxoid)、CT-SMAC 培地(Oxoid)およびクロモアガー O157 培地(CHROMagar)を用いて直接分離(37°C, 18~20 時間培養)を行うとともに、Tryptic Soy Broth 培地(BD)にて、37°C で 6 時間培養した増菌液を免疫磁気

ビーズ (Dynabeads anti-E.coli O157, invitrogen) で濃縮し、菌の分離を行った。

2. 牛レバーからの分離

Tryptic Soy Broth 培地で、37°C、6 時間前培養後、ノボピオシン加 mEC 培地 (栄研化学) で、42°C、20~24 時間増菌培養を行い、CT-SMAC 培地とクロモアガー O157 培地を用いて、菌の分離を行った。また、免疫磁気ビーズによる濃縮菌液からの分離も行った。

3. 菌の同定

生化学的性状試験、血清型別 (デンカ生研) および PCR 法 (O-157 PCR Typing Set Plus, タカラバイオ) による *stx* 遺伝子の検出と型別を行なった。

4. 分子疫学的解析

IS-printing System (以下 IS 法, 東洋紡) は添付プロトコールにしたがって実施し、解析は、福岡県保健環境研究所作成の解析ソフトを用いて行った。パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (以下 PFGE) は国立感染症研究所が作成したプロトコールにしたがって実施した。

C. 検査結果

牛レバー刺しを喫食した 2 名中 1 名および残品の牛レバー刺しから、腸管出血性大腸菌 O157:H7 (*stx2*) (以下 O157) が分離された。医療機関から分与された初発患者由来の菌株、喫食者 1 名からの分離株および残品由来株の計 3 株の O157 は、いずれも同一の生化学的性状を示した。また、IS 法による解析では、3 株とも、同じ IS

コード (30671622280) であり、PFGE パターンも同一であった (Fig. 1, Fig. 2)。

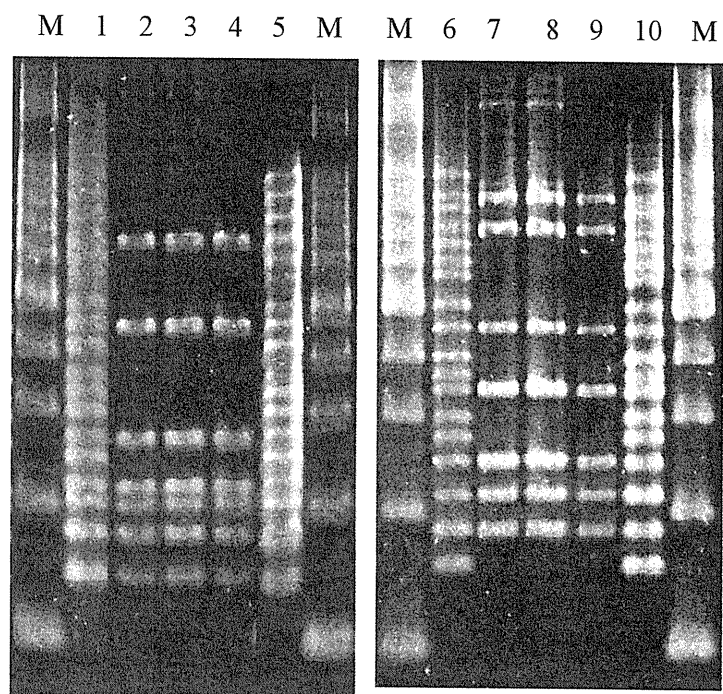
D. 結論

本事例で分離された 3 株の O157 は、分子疫学的解析により、遺伝子型が一致した。その結果、保健所の疫学調査結果が裏付けられ、牛レバー刺しが原因食品であると特定された。本事例において、分子疫学的解析に IS 法を併用したことにより、菌分離後の解析時間が大幅に短縮され、解析結果を迅速に行政部門へ提供することが可能となった。したがって IS 法は PFGE 法とともに、食中毒発生時における原因食品の特定に有用なツールであると考えられる。

平成 23 年 7 月に厚生労働省より、牛レバーを生食で提供しないよう指導を徹底することが通知されているが、現実には、依然として提供している店舗も散見されるようである。したがって、今後も消費者等に対して、牛レバーを生で喫食せず、中心部まで十分に加熱して喫食するよう注意喚起をしていく必要があると考える。

E. 研究発表

なし



←PCR by 1st set primers mix→ ←PCR by 2nd set primers mix→

Fig. 1. Electrophoresis patterns derived from IS-printing system for the 3 strains of O157.

M: 100 bp DNA ladder, lane 1: standard DNA, lane 2: patient-1 with 1st onset diarrhea, lane 3: patient-2 (patient-1's family), lane 4: calf's liver, lane 5: positive control, lane 6: standard DNA, lane 7: patient-1, lane 8: patient-2, lane 9: calf's liver, lane 10: positive control.

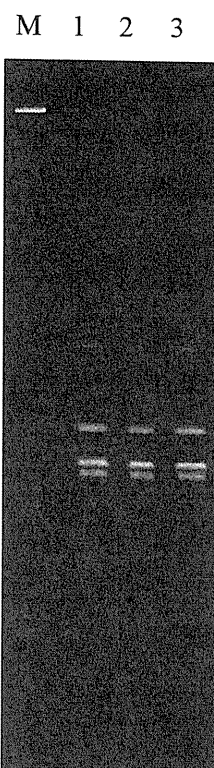


Fig. 2. PFGE patterns with *Xba*I for the 3 strains of O157.

M: *Salmonella* Braenderup H9812, lane 1: patient-1 with 1st onset diarrhea, lane 2: patient-2 (patient-1's family), lane 3: calf's liver.

感染症発生動向調査（菌株収集）事業で探知した
Salmonella Enteritidis Diffuse outbreak について

佐賀県衛生薬業センター 細菌課

西桂子、成瀬佳菜子、甘利祐実子、諸石早苗、吉原琢哉、眞子純孝

要旨

2011 年 11 月、感染症発生動向調査（菌株収集）事業において医療機関と臨床検査機関から同時期にサルモネラ菌株（O9）が 16 検体提供され、全て *Salmonella* Enteritidis と確認された。PFGE による遺伝子型別及びフェージ型別は一致していた。患者が通院した医療機関が所在する地域に偏りがあったことから、共通食材の流通などの Diffuse outbreak を疑った。情報共有した保健福祉事務所の患者の聞き取りで共通の洋菓子店を利用していたことが判明し、さらに調査した結果、洋菓子店を原因施設とするサルモネラ食中毒と判断した。

A. はじめに

佐賀県衛生薬業センターでは、感染症発生の予防及びまん延の防止を目的に感染症発生動向調査（菌株収集事業）、すなわち地域の中核医療機関等の臨床検査室（微生物部門）の病原体検出数の情報及び菌株（A 群溶血性レンサ球菌、サルモネラ、下痢原性大腸菌（O1 以外））を収集し、病原性の確認、血清型別等の検査を実施している。

今回この事業で収集された菌株から *Salmonella* Enteritidis による Diffuse outbreak を探知したので報告する。

B. 研究目的

2011 年 11 月、菌株収集事業において臨床検査機関及び医療機関でサルモネラ O9 又はサルモネラ O9 :HG と確定された検体が 16 検体提出されたため同定検査を実施し、これらの感染源・感染経路の関連性の有無を調べるためにパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による遺伝子型及びフェージ型を調べ、比較解析した。

C. 研究方法

1. 材料及び検査方法

F 医療機関から提出された 1 検体と臨

床検査機関（A～E 医療機関が検査依頼）から提出された 15 検体を用いて確認検査を実施した。また原因施設と推測された洋菓子店の従業員便 9 検体、施設の拭き取り 6 検体、原材料 4 検体、洋生菓子 15 検体の合計 34 検体について食中毒菌の分離同定方法のマニュアルに基づいてサルモネラ菌の検査を実施した。

2. PFGE による遺伝子解析

国立感染症研究所の方法を基に作成した「大腸菌のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 九州ブロックマニュアル（2005）」に準拠し、制限酵素は *Xba* I（ロッシュ）を用いて実施した。

3. *Salmonella* Enteritidis のフェージ型別

選定した 6 検体について、国立感染症研究所の細菌第一部に依頼した。

D. 研究結果

1. 事例の概要

11 月中旬に臨床検査機関から「11 月に入りサルモネラを多数検出している」という情報提供を受けた。直ちに臨床検査機関へ検体提供の協力依頼と感染症担当課へはサルモネラ患者の発生について情報提供を行った。当所では提供株の検査を実施、感染症担当課及び食品衛生担当課は管轄保健福祉事務所へ情報提供を行った。管轄保健福祉事務所は疫学調査に対して理解を得られた F 医療機関の協力を得て、3 例の患者への聞き取り調査を実施した。その結果、3 事例とも共通の洋菓子店の洋生菓子を喫食していること

が判明した。このことを受け当初協力が得られなかった医療機関に対しても管轄保健福祉事務所が直接説明し、協力を得て調査を進めたところ 18 例（16 家族）のすべてにおいて、発症日の 1～13 日前に共通する洋菓子店を利用していることが判明した（表 1）。原因施設と推測された洋菓子店の従業員便、施設拭き取り、原材料、食品からサルモネラ菌は検出されなかったが、管轄保健福祉事務所は調査の結果他に共通する食べ物や行動がなかったことから、洋菓子店を原因施設としたサルモネラ食中毒と判断し、施設に対して 3 日間の営業停止を出すとともに、感染拡大防止と再発防止対策（原因究明）の指導を行った（表 2）。

2. PFGE 遺伝子

1 3 検体について実施。全て遺伝子型別は一致した（図 1）。

3. フェージ型別

6 検体（各医療機関 1 検体ずつ選定/患者番号 2、11、12、14、16、17）について検査依頼した。結果は全て 47 であり、最近では比較的多く検出されている型であった。佐賀県で昨年度に検出された *Salmonella* Enteritidis 8 株のフェージ型は RDNC（6 件）、47（1 件）、14b（1 件）であった。

E. 考察

平成 23 年度に入ってから 10 月末までの菌株収集事業において、サルモネラ菌株の提出は 11 件であった。10 月は 1 件の報告しかなかったにも関わらず、11 月に

入り 16 件も報告されたことは異常事態であると考えられた。16 検体中 13 検体は *Salmonella* Enteritidis で PFGE 遺伝子型及び一部はファージ型別も一致していることから、共通の感染源により発生した Diffuse outbreak であることが示唆された。原因推定施設の従業員便、施設の拭き取り、原材料、食品からサルモネラ菌は検出されなかった。これは、原因食品が流通してから原因施設が特定されるまで時間を要したため、または、サルモネラによる食材器具等の汚染が短期間に限られていた可能性等が推測された。

E. 結論

今回の事例は、感染症発生動向調査(菌株収集)事業により探知できた

Salmonella Enteritidis による Diffuse outbreak で、事業の目的である早期探知につながった。

食品及び施設の拭き取り検体等からの菌の検出は確認できなかったものの、疫学調査から発症したすべての患者が共通した店舗の食品を喫食していたことから、原因施設を特定できた。

謝辞

ファージ型別試験をしてくださった国立感染症研究所 細菌第一部 泉谷秀昌先生に深謝します。

表 1. 発生の概要

1)	発生年月日	平成23年11月2日(水曜日)午後4時(初発)
2)	発生場所	A市、B市、C市、D町、E町
3)	原因施設	洋菓子店
4)	原因食品	当該施設で提供された洋生菓子
5)	病因物質	<i>Salmonella</i> Enteritidis
6)	摂食者数	50名
7)	患者数	16家族18名(男8名:2歳~12歳、女10名:1歳~10歳) 全て受診(内6歳男児1名入院)
8)	摂食年月日	平成23年11月1日(火曜日)~10日(木曜日)
9)	症 状	水様下痢15名、嘔吐4名、腹痛10名、 発熱14名(37.5℃~40.1℃)
10)	潜伏期間	1日 ~ 13日(平均約3.9日)

図 1. *Salmonella* Enteritidis 分離株の PFGE パターン

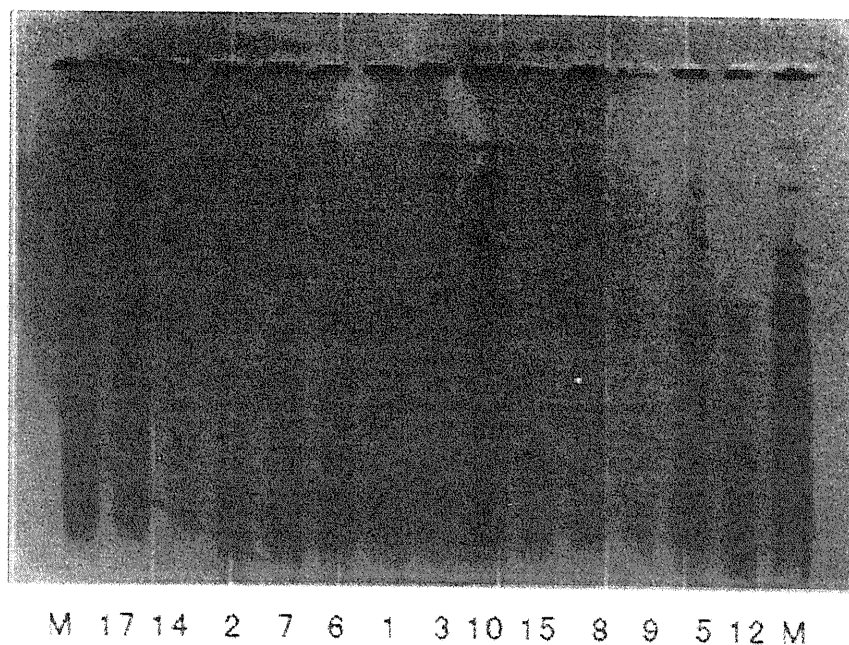


表2. 患者情報

○患者情報

番号	医療機関名	年齢	学校等	購入日	喫食 ケーキ名	喫食時間	発症日時	主な症状
1	A	2歳	保育園		プリンアラモード	11月3日 夕方	5日(土) AM7時	水様下痢・嘔吐 発熱(39℃)
2		12歳	小学生	11月2日	モンぷりんロール	11月4日	7日(月) 昼12時	発熱(39℃) 水様下痢・嘔気
3		3歳	保育園		シュークリーム	11月10日 夕方	12日(土) AM11時	発熱(40℃) 水様下痢
4		7歳	小学生		白色ホールケーキ	11月3日	16日(水) PM5時	軟便・腹痛
5	B	9歳	小学生		チーズケーキと ロールケーキ2口	11月1日 夜	6日(日) AM8時	水様下痢 発熱(38℃)
6		6歳	幼稚園	11月6日	ロールケーキ (フルーツトッピング)	11月7日 夜	11日(金) PM6時	水様下痢・腹痛
7		4歳	保育園	11月2日	白色ホールケーキ	11月2日	9日(水) AM8時	軟便
8		3歳	未就園	11月3日	白色ホールケーキ	11月3日 夜	6日(日) PM7時	水様下痢・腹痛
9		3歳	未就園	11月5日	ロールケーキ	11月5日昼	6日(日) 12:00	水様下痢 発熱(38℃)
10		7歳	小学生		チョコのホールケーキ	11月1日 夜	3日(木) PM8時	発熱(39℃) 水様下痢・腹痛
11	4歳	未就園		チョコのホールケーキ	11月1日 夜	2日(木) PM4時	発熱(40℃) 水様下痢 腹痛・嘔吐	
12	C	6歳	保育園	11月4日	ホールケーキ(白)	11月4日	6日 時刻不明	水様下痢 発熱(39℃)
13		1歳	保育園				7日 朝	水様下痢 発熱(38℃)
14	D	3歳	保育園		生チョコホールケーキ	11月7日 夜	10日(木) 午後	発熱(39℃) おう吐 水様下痢
15	E	3歳	未就園		白色ホールケーキ	11月5日	7日(月) PM6時	発熱(38.9℃) おう吐・軟便・腹痛
16		7歳	小学生		チョコのホールケーキ	11月5日 11月6日	13日(日) AM8時	発熱(37.5℃) 水様下痢・腹痛
17	F	4歳	保育園		白色ホールケーキ	11月3日 夜	6日(日) 0時	発熱(38.5℃) 腹痛・水様下痢
18	G	10歳	小学生	11月13日	ロールケーキ	11月13日 夜	19日(土) PM5時	発熱(39℃) 腹痛・水様下痢

平成 23 年度 厚生労働省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」
分担者報告書

ノロウイルスゲノムの分子進化

研究分担者	片山 和彦	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	村上 耕介	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部
研究協力者	ハンスマン・グ ラント	国立感染症研究所	ウイルス第 2 部

研究要旨

ヒトに感染するノロウイルスは、冬季ウイルス性胃腸炎の原因ウイルスとして、更に冬季に多発する集団食中毒の原因ウイルスとして知られている。ノロウイルスに関して病原性発現機構を加味した、新規 NoV 分類法を開発し、国際協調の元、CaliciWeb 等のウイルスデータベース上に公開した。NoV 抗原性変化だけでなく、ウイルスの質の変化を分子疫学的に解析できるようにする。本年度は、ノロウイルスの遺伝子組み換え解析に対応した新規分子疫学的解析手法の確立を行った。

A. 研究目的

ノロウイルス (NoV) には、5 つの genogroup が存在する。このうち、ヒトに感染する NoV の genogroup は、GI, GII, GIV である。GI, GII にはそれぞれ 20 種類に上る genotype が存在する。NoV の genotyping は、構造タンパク質 VP1 コード領域の塩基配列により、分別されてきた。しかし、昨年度、それより上流にコードされる非構造タンパク質領域 (ORF1) に NoV の病原性など重要な性質を反映する遺伝子が存在する可能性を見いだした。また、NoV は非構造タンパク質コード領域 (ORF1) と構造タンパク質コード領域 (ORF2) との間でゲノムの組み替えを高頻度で引き起こすことも明らかにした。本研究では、ゲノム全長塩基配列をできるだけ多くの genotype クラスタに属する株で決定し、分子疫学的解析を行うとともに、各種ウイルスタンパク質の機能を調べ、ゲノムの組み替えを考慮に入れた新たな genotyping 法を構築することを目指している。本年度は、さらに全長塩基配列解析を進め、ORF1 内

部の塩基配列が高度の保存された領域を検索するとともに、新規 genotyping 法を確立することを試みた。また、新規 genotyping 法に利用可能な CaliciWeb 上のゲノム全長基準配列を充実させた。

B. 研究方法

1. 病原性発現機構の解析

昨年度は、NoV のプロトタイプである NV68 株の ORF1 にコードされる 6 種類の非構造タンパク質のうち、p22 (3A-like protein) を CMV プロモーター下流にクローニングし、このプラスミドを HEK293T 細胞に導入して、共焦点レーザー顕微鏡により、細胞内動態を観察した。本年度は、NoV の GII.3 である U201 株、GII.4 である Saga1 株、GII.3, 4 のキメラウイルスである TCH04-577 株の p22 (3A-like protein) 解析を行った。

2. NoV の全塩基配列解析

Genogroup GI の genotype クラスタのうち、全

塩基配列の決定されていないクラスターを選択し、そのクラスターに属する野外流行株の全塩基配列を決定した。また、genogroup GII の genotype クラスターについても、同様に野外株を選択した。合計 18 株のゲノム全長塩基配列を PCR direct sequence, 5' RACE, 3' RACE を用いて決定した。CaliciWeb データベース上に登録された全長塩基配列と、18 株の新規塩基配列を Clustal W を用いてアライメントした。

全長塩基配列は、genome 5' 末端から、ORF1-ORF2 ジャンクション領域まで、ORF2-3' end までの 2 領域 (非構造タンパク質領域と構造タンパク質領域) に分けて、再度 Clustal W でアライメントし、Kimura 2 パラメーター法を用いて、genetic distance を算出した。それぞれの領域の分子系統樹を近隣結合法 (NJ 法) によって作製し、互いに比較検討した。

3. プライマーデザインと RT-PCR

全長塩基配列のアライメントを用いて、高度に保存された領域を検索し、ORF1-ORF2 ジャンクション領域上流約 1 Kb 付近に、新規 sense プライマーを設計した。設計した新規プライマーと、G1SKR または G2SKR を用いて RT-PCR を行い、約 1000~1300 bps の増幅産物を確認した。また、ORF1 内でゲノムの組み替えが起きていないことを調べる目的で、ゲノム N-terminal protein コード領域の解析を目的とした増幅用プライマーセットをゲノム 5' 末端から 1000-2000 塩基付近にデザインした。

2. プライマー

全長塩基配列のアライメントより、genome 5' 末端から約 4100 塩基付近の領域 (ORF1-2 ジャンクション領域から約 1 Kb 上流) に認められた高度保存領域にプライマーをデザインした。プライマーは、GI, GII それぞれにデザインした。GI プライマーを以下に示した。NVGIuni4223S20 (5'-AARAATGAYGAYTGGAATGG-3')、NVGIuni4271S29 (5'-CARGCDGCVCAYGCHAAYARYATGTWTGA-3')、NVGIuni4274S26 (5'-GCDGCNCAYGCHAAYARYATGTWTGAG-

3')、NVGIuni4442S23 (5'-GGNCCVTTYTGTGABGCYATAAA-3')。GII プライマーを以下に示した。NVGIIuni4229S23 (5'-GTDGGNAWGAAYAWRAATGARGA-3')、NVGIIuni4292S20 (5'-CAYTATGAYGCWGAYTAYTC-3')、NVGIIuni4295S26 (5'-TATGAYGCWGAYTAYTCNMGNTGGGA-3')、NVGIIuni4769S19 (5'-CGNGAYCCNGCDGGNTGGT-3')

ゲノム N-terminal protein コード領域の増幅用プライマーセットを以下に示した。GI プライマーを以下に示した。NoVGIuni1115A20 (5'-CCCATRAANGTCCARTCACA-3')、NoVGIuni1718A23 (5'-ATVCCDGGDGGVCCACACATCAT-3')、NVGIIuni2790A26 (5'-TCHCKRTCYTNAGRTAYTCYTCWAT-3')。GII プライマーを以下に示した。NVGIIuni2658A23 (5'-TTRTTYTNCCYTTYTTDCCYTC-3')、NVGIIuni2730A23 (5'-TTRWAYTCNCRMTMYTCYTCATC-3')、NVGIIuni2790A26 (5'-TCHCKRTCYTNAGRTAYTCYTCWAT-3')。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。組換え DNA 実験は全て国立感染症研究所の承認を得た上で実験計画に基づいて、認定施設内で実施した。

C. 研究結果、考察

U201 株の P22 の発現は、細胞内のタンパク質の輸送システムに影響を与え、小胞体からトランスゴルジへのタンパク質輸送が正常に行われなくなった。P22 発現細胞は、小胞体上で新規合成されるタンパク質が、トランスゴルジに輸送されることなく、小胞体とトランスゴルジの間に蓄積し、巨大なスポット上のタンパク質だまりを作ることが明らかになった。蓄積部分は、ER とシスゴルジの昼間部に存在し、COP によるタンパク質輸送、ゴルジ体の再生機構に著しい影響を与えていることが明らかになった。つまり、p22 の発現は、GI. 1 prototype NoV, NV68 株でも、GII. 3 NoV, U201 株でも、同様に、細

胞内で行われているタンパク質の輸送システムに干渉し、タンパク質の逆行性輸送を阻害していることが明らかになった。この結果は、GII.4 Saga-1 株でも、GII.4/3 キメラウイルスの TCH04-577 株でも同様であった。逆行性輸送の阻害効率の定量的比較は、できなかつたが、上記研究結果から、NoV の非構造タンパク質が宿主細胞に影響を与え、病原性に関与している可能性が示唆された。つまり、ORF1 にコードされる非構造タンパク質は、宿主とのより密接なインタラクションにより、ウイルス増殖の制御を行っており、宿主細胞内で NoV 複製効率に基づく選択圧を強く受けている可能性がある。つまり、ORF1 と ORF2-3 では、機能的な制約の性質が異なっており、別々の進化様式を取っている可能性がある。

新たな hNoV 18 株の全長塩基配列の解析により、GI.1-14, GII.1-10, 12, 15, 16, 18, のゲノム全長のアライメントに初めて成功した。GI のみをアライメントすると、genome 5' 末端から約 1000 nt-2000 nt, 4100nt - 4500 nt, 5100 nt - 5400 nt に高度に塩基配列の細損された領域が存在することが明らかになった。GII の場合も、ほぼ同様の位置に高度に塩基配列の保存された領域が存在した。これらの領域は、それぞれ、N-terminal protein - NTPase ジャンクション領域、RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の N-terminal 領域、ORF1-2 ジャンクション領域であった。ORF1-2 ジャンクション領域を除く 2 つの領域は、それぞれのタンパク質のアミノ酸配列が高度に保存された領域であるため、コドン 1, 2 の塩基配列保存性が高く、コドン 3 に多様性が認められた。RdRp に認められる特徴的な YGDD モチーフは、すべての RNA をゲノムに持つウイルスの RdRp に普遍的に存在することが知られている。しかし、驚いたことに、このモチーフよりも上流の領域に高度に塩基配列の保存された領域が存在していた。

hNoV のゲノム組み替えを解析するためには、ゲノム組み替えのブレイクポイントである ORF1-2 ジャンクション領域の上流 1000 nt から Capsid N/S 領域 300 nt ほどの約 1000 nt - 1300 nt の塩基配列を決定し、ORF1 領域、Capsid N/S 領域それぞれ別々に分子系統解析を実施するのが望ましい。そこで、RdRp N-terminal 領域から Capsid N/S 領域の約 1300 nt を増幅するために、RdRp N-terminal 領域に sense

プライマーを GI, GII それぞれにデザインした。プライマーは、多様性の認められたコドン 3 に混合塩基を組み入れ、20 - 30 nt の長さとし、SKR シリーズとの組み合わせで Semi-nested RT-PCR が実施可能であるように配置した。

逆転写並びに PCR は、transcripter high fidelity RT (Roche), GXL DNA polymerase (TAKARA) を用いた検討の結果、SKR シリーズとの semi-nested RT-PCR により、GI では、約 1100 nt、GII では、約 1000 nt の増幅産物が得られることが明らかになった。一方、ゲノム 5' 末端から N-terminal protein, NTPase のジャンクション領域をターゲットとした RT-PCR もそれぞれ、1200-1500bps の増幅産物が得られることが確認された。

RdRp 領域から Capsid N/S 領域にかけての増幅産物の塩基配列を決定し、RdRp 領域と Capsid N/S 領域に分けて分子系統解析を行ったところ、RdRp 領域のクラスターと、Capsid N/S 領域のクラスターとで、異なるクラスターに位置するキメラウイルスが多数確認された。キメラウイルスは、RdRp 領域の分子系統解析と、N-terminal protein 領域の分子系統解析が一致しており、ORF1 内部でゲノムの組み替えを起こしていないことが推測された。キメラウイルスの頻度は、GI, GII 共に約 50% であった。ORF1 が GI, ORF2, 3 が GII、もしくはその逆で、ORF1 が GII, ORF2, 3 が GI であるようなキメラウイルスは発見できなかった。

NoV におけるキメラウイルスの出現頻度は、エンテロウイルスやフラビウイルス、トガウイルスなど、その他のプラス一本鎖 RNA ウイルスよりも明らかに高い値であり、RNA セグメントをゲノムとして有するインフルエンザウイルスや、ロタウイルスのリアソータント出現頻度に近かった。今後、全長塩基配列が決定されていない NoV の genotype クラスターに属する株の塩基配列解析を継続し、時間軸に沿ってデータを蓄積して、解析することが、NoV の流行を理解する上で極めて重要である。

D. 結論

本研究により、全 GI, GII genotype クラスターの内、約 70% の全長配列が明らかにされた。本研究により、NoV のゲノム組み替えの解析に必要な、