

# 福岡市とその近郊で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染事例 由来株のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

椿本 亮<sup>1</sup>・財津修一<sup>1</sup>・池田嘉子<sup>1</sup>・石北隆一<sup>1</sup>・小田隆弘<sup>2</sup>

## Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Strains Isolated from Epidemic and Sporadic Cases in Fukuoka Area by Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Makoto TSUBAKIMOTO, Syuichi ZAITSU, Yoshiko IKEDA  
Ryuichi ISHIKITA, and Takahiro ODA

### 要 旨

1991年7月から1997年5月の間に福岡市とその近郊で発生した56例のO157感染事例から分離された95株について制限酵素 Xba IによるDNA切断パターンをパルスフィールドゲル電気泳動法によって比較した(PFGEパターン)。同一の集団発生事例や家族内感染事例から分離された株は一つの事例を除いて個々の事例内でPFGEパターンが一致した。そこで、個々の感染事例を代表する56株を選択してPFGEパターンによる型別を試みたところ、39 Typeに分けることができた。同じTypeに型別された株(事例)は発生時期が近接する傾向が認められた。また、PFGEパターンをもとに各O157株間の近似度を比較した結果、VT1+2産生株とVT2単独産生株はそれぞれに近い近似度を示した。今回の調査結果から、O157感染症が社会的に大きな問題となった1996年の事例から分離された株と全く同一のPFGEパターンを示す株が、すでにそれ以前にも存在していたことが明らかとなった。

**Key Words** : 福岡 Fukuoka , 腸管出血性大腸菌 O157 EHEC O157 , ペロ毒素 Verotoxin  
パルスフィールドゲル電気泳動 PFGE , 近似度 Similarity,

### 1 はじめに

腸管出血性大腸菌 O157(以下 O157)による集団発生事例が初めて報告されたのは1982年、米国のミシガン州とオレゴン州で発生したハンバーガーを原因とした事件であった<sup>1)</sup>。本邦においては1990年埼玉県幼稚園での発生が初めての集団発生事例であった<sup>2)</sup>が、以後1995年までに8例が報告されている<sup>3)</sup>。さらに1996年にはO157による大規模な事例が全国各地で発生し、福岡市においても1996年6月に保育園での集団

事例が発生した。各地での散発事例については1996年以前の報告も多く<sup>4, 5, 6)</sup>、福岡地区においても散発下痢症からのO157分離例が報告されている<sup>7)</sup>。

O157感染事例ではその感染源を明らかにするため、患者や食品、環境材料あるいは他の事例等から検出されたO157株との同一性(または近似度)を解析することが不可欠である。分離菌の同一性(近似度)を調べる方法としては毒素型別、生物型別、薬剤感受性試験、プラスミドプロファイル等のほか、近頃では細菌DNAの制限酵素による切断パターンを比較するRFLP(restriction fragment length polymorphism)、PCRを応用したRAPD(random amplified polymorphic DNA)等の分子生物学的手法を用いた遺伝子解析が試みられている。

1. 福岡市保健環境研究所 微生物課

2. 福岡市保健環境研究所 微生物課

(現所属: 中央区 衛生課)

そこで今回, 1996年に分離された菌株を中心に福岡市及び近郊で発生した O157 感染事例から分離された O157 株について, パルスフィールドゲル電気泳動法 (P F G E) を用いた R F L P による遺伝子解析を行ったのでその結果を報告する。

## II 材料および方法

### 1. 調査対象

1991年7月から1997年5月の間に福岡市とその近郊で発生した56例の O157 感染事例(散発40例, 集団発生1例, 家族内15例)から分離された95株を解析の対象とした(表1)。なお, 1991年7月から1994年9月の間に分離された13株については福岡大学医学部付属病院小児科 諸岡達也先生より供与を受けた株である。

### 2. H血清型別

分離菌株のH血清型別は国立感染症研究所の方法<sup>8)</sup>に準じて実施した。抗血清は市販の病原大腸菌免疫血清「生研」を使用した。

### 3. ペロ毒素(VT)型別

分離菌株はVT1, VT2にそれぞれ特異的なプライマー (TaKaRa 製)を用い, PCR法によりVT型別を実施した。PCRに使用するその他の試薬類も全て同社の製品を使用し, 反応条件等も指定に従った。

### 4. パルスフィールドゲル電気泳動(P F G E)

制限酵素は Xba I を使用し<sup>9)</sup>, 菌体からのDNA抽出, 制限酵素によるDNAの消化, およびパルスフィールドゲル電気泳動は以下の方法で実施した。

- 1) 感受性測定用ブイヨン(ニッスイ)10mlに菌を接種し, 37°C, 18時間振とう培養。
- 2) 培養液150μlをPett IV溶液(10mM Tris-HCl pH8.0, 1M NaCl)で2回洗浄。250μlのPett IV溶液に再浮遊させ, 同量の1.5% Chromosomal Grade Agarose(Bio-Rad) in Pett IV溶液と65°C下で混合し, プラグを作成。プラグの作成にはPlugMold(Bio-Rad)を使用。
- 3) 組織培養用6 well dishにCell strainer(FALCON 2360)をセットし, 0.1% ProteinaseK in lysis buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 1M NaCl, 100M EDTA, 0.5% Sarkosil, 0.2% Deoxycholic Acid, 0.5% Brij58)を5ml分注。56°C, 18時間振とうして菌体からDNAを抽出。

- 4) プラグをTE buffer(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)で洗浄後, 0.0175% PMSF in TE buffer で1時間×3回処理し, ProteinaseKを不活化。
- 5) プラグをTE bufferで洗浄後, 制限酵素Xba I (NEB)で37°C, 18時間処理しDNAを消化。Xba Iはプラグ50μlあたり25U使用。反応bufferは制限酵素添付のものを使用。
- 6) プラグを0.5×TBEで洗浄後, 電気泳動を実施。泳動装置はCHEF-DR III(Bio-Rad)を使用。泳動条件はBarretらの方法に準じた<sup>9)</sup>。
 

泳動条件 buffer: 0.5×TBE  
temperature: 14°C  
volt: 6V/cm  
pulse time: 5 sec~50 sec, 22 hour

### 5. P F G Eパターンによる各菌株間の近似度の算出とデンドログラムの作成

画像取り込み装置Gel Doc 1000(Bio-Rad)で電気泳動像をデジタル画像としてパーソナルコンピュータに保存し, 遺伝子解析用ソフトMolecular Analyst(Bio-Rad)を使用して, Xba IによるDNA切断バンドパターン(P F G Eパターン)をもとに各菌株の近似度を計算し, デンドログラムを作成した。(図1)

解析の対象とした全菌株間の近似度の計算にはJaccardの計算式を採用した。以下に計算式を示す。

$$\frac{N_{ab}}{N_a + N_b - N_{ab}} \times 100(\%)$$

$N_a$ : a株のバンド数

$N_b$ : b株のバンド数

$N_{ab}$ : a株とb株に共通するバンド数

クラスタリングはUPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)方式<sup>10)</sup>によって実施し, デンドログラム(系統樹)を作成した。なお, 今回の解析ではプラスミド由来のバンドの影響を避けるため<sup>11)</sup>, 100kbより短いサイズのバンドは解析の対象から除いた。

## III 結果

### 1. H血清型別結果

95株のうち93株がH7, 2株が非運動性であった。非運動性の2株はいずれも散発事例由来株で, 1株はVT1+2産生株, 他の1株はVT2単独産生株であった。(表1)。

表1. 解析の対象とした事例と由来菌株の型別結果

事例 No.	発生時期	H血清型	ベロ毒素産生性		事例(分離菌株数)	PFGE Type
			VT1	VT2		
1	1991.7	7	+	+	散発 (1)	L
2	1991.7	7	+	+	散発 (1)	F
3	1991.7	7	-	+	散発 (1)	AA
4	1992.6	7	+	+	散発 (1)	U
5	1992.10	7	+	+	散発 (1)	A
6	1993.8	7	+	+	散発 (1)	K
7	1993.11	7	+	+	散発 (1)	L
8	1994.7	7	+	+	散発 (1)	V
9	1994.8	7	+	+	散発 (1)	C
10	1994.9	7	+	+	散発 (1)	M
-----						
11	1994.9	7	+	+	散発 (1)	B
12	1994.9	7	+	+	散発 (1)	AI
13	1994.9	7	+	+	散発 (1)	G
14	1996.6	7	+	+	集団発生 (27)*	D
15	1996.6	7	+	+	家族内 (2)	D
16	1996.6	7	+	+	散発 (1)	AG
17	1996.7	7	-	+	散発 (1)	AA
18	1996.7	7	+	+	散発 (1)	AG
19	1996.7	7	+	+	家族内 (2)	C
20	1996.7	7	+	+	散発 (1)	R
-----						
21	1996.7	7	-	+	家族内 (4)	X
22	1996.7	7	+	+	散発 (1)	O
23	1996.7	7	-	+	散発 (1)	X
24	1996.7	7	+	+	散発 (1)	D
25	1996.7	7	-	+	散発 (1)	Y
26	1996.7	7	-	+	家族内 (3)	AC
27	1996.7	7	-	+	散発 (1)	AB
28	1996.7	7	-	+	散発 (1)	AD
29	1996.7	7	+	+	散発 (1)	AH
30	1996.7	7	+	+	散発 (1)	S
-----						
31	1996.7	7	+	+	散発 (1)	A
32	1996.7	7	+	+	家族内 (3)	A
33	1996.7	7	+	+	散発 (1)	C
34	1996.7	7	+	+	家族内 (2)	A
35	1996.7	7	+	+	散発 (1)	E
36	1996.7	7	+	+	散発 (1)	C
37	1996.7	7	+	+	家族内 (2)	C
38	1996.8	NM**	+	+	散発 (1)	T
39	1996.8	7	-	+	散発 (1)	AM
40	1996.8	7	+	+	家族内 (2)	I
-----						
41	1996.8	7	+	+	散発 (1)	J
42	1996.8	7	+	+	散発 (1)	P
43	1996.8	7	-	+	散発 (1)	Z
44	1996.8	7	-	+	家族内 (4)	AB
45	1996.8	7	-	+	家族内 (2)	AE
46	1996.8	7	+	+	散発 (1)	AJ
47	1996.11	7	+	+	家族内 (6)	C
48	1996.11	7	+	+	家族内 (2)	W
49	1996.12	7	+	+	家族内 (4)	N
50	1996.12	7	+	+	散発 (1)	H
-----						
51	1996.12	7	+	+	散発 (1)	H
52	1996.12	7	+	+	散発 (1)	AF
53	1997.2	NM	-	+	散発 (1)	AL
54	1997.5	7	+	+	家族内 (4)	Q
55	1997.5	7	+	+	家族内 (2)	Q
56	1997.5	7	-	+	散発 (1)	AK

\*: 27株中11株を解析した \*\* : 非運動性

## 2. VT型別結果

調査した56事例95株のうち69株がVT1+2産生株, 26株がVT2単独産生株であった. 1例の集団発生事例, 15例の家族内感染事例から分離された株はそれぞれの事例内で同一の毒素産生パターンを示した. また, 事例数では42事例がVT1+2産生株によるもの, 14事例がVT2単独産生株によるものであった(表1).

## 3. XbaI消化DNAのPFGE

PFGEの結果, 1例の集団発生事例由来株および15例の家族内感染事例由来株は, 1例の家族内感染事例を除いてそれぞれの事例の中で同一のPFGEパターンを示した. 同一事例から異なるPFGEパターンの株が分離された事例No.47については, 分離された6株のうち5株(図1, lane 1,2,4,5,6)は同一のPFGEパターンを示したが, 1株(図1, Lane 3)は185kbのバンドが欠けている点以外の5株と異なっていた. Izumiyaらは1996年に大阪府堺市で発生した集団発生事例から分離されたO157株についてPFGEによる解析を実施し, 分離株が共通のPFGEパターンを示した事を明らかにすると共に, それぞれバンド数が1本づつ異なる2つの変異株の出現も報告している<sup>11)</sup>. 事例No.47についても6株中5株が同一のPFGEパターンであったこと, 残りの1株がバンド数で1本の違いがあったことから, この事例は同一菌による感染事例でありPFGEパターンの異なった1株は変異株と考えられた.

全ての家族内および集団発生事例がそれぞれ同一菌によって引き起こされたものであると考えられたことから, 各事例を代表する56株についてPFGEパターンによる型別を行った. 全く同一のPFGEパターンを示す株を同一Typeとした結果56株は39Type(TypeA~AM)に型別された(表1, 図3). その中で複数の株が同一のTypeに型別されたもの, すなわち同一起源に由来する菌によって複数の感染事例が引き起こされた可能性が高いと考えられたものは, TypeA(事例No.5, 31, 32, 34), TypeC(事例No.9, 19, 33, 36, 37, 47), TypeD(事例No.14, 15, 24), TypeH(事例No.50, 51), TypeL(事例No.1, 7), TypeQ(事例No.54, 55), TypeX(事例No.21, 23), TypeAA(事例No.3, 17), TypeAB(事例No.27, 44), TypeAG(事例No.16, 18)の10Typeであった(図2, Lane1~10). TypeAでは4事例中3例(No.31, 32, 34)が1996年7月に発生した事例であったが, No.5は1992年10月に発生していた. TypeCでは6事例中4事例(No.19, 33, 36, 37)が1996年7月に, No.47が同年11月に発生したが, No.9

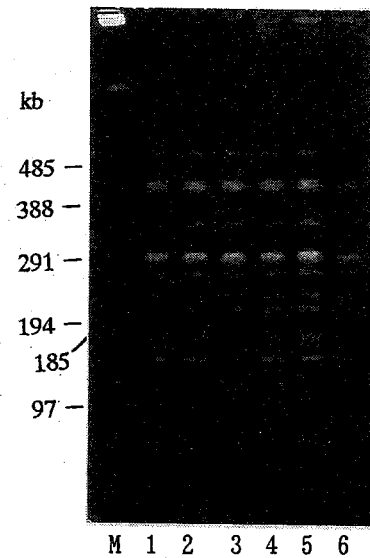


図1. 事例No.47から分離されたO157株のPFGEパターン

M: molecular weight marker (Lambda ladder)  
Lane1~6: 患者および感染者由来株

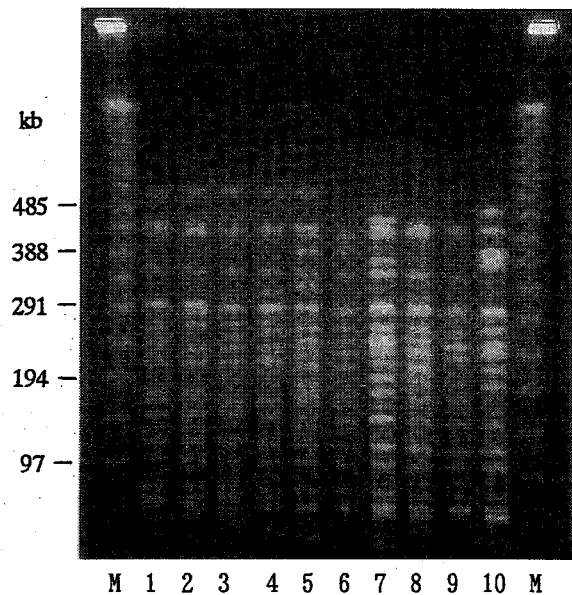


図2. 複数のO157株が同一パターンを示したPFGE Type

M: molecular weight marker (Lambda ladder)  
Lane1:TypeA, Lane2:TypeC, Lane3:TypeD  
Lane4:TypeH, Lane5:TypeL, Lane6:TypeQ  
Lane7:TypeX, Lane8:TypeAA, Lane9:TypeAB  
Lane10:TypeAG

は1994年8月に発生した事例であった. また, TypeAAの2事例のうちNo.17は1996年7月に, No.3は1991年7月にそれぞれ発生した事例であった. 以上のようにO157感染症が社会的に大きな問題と

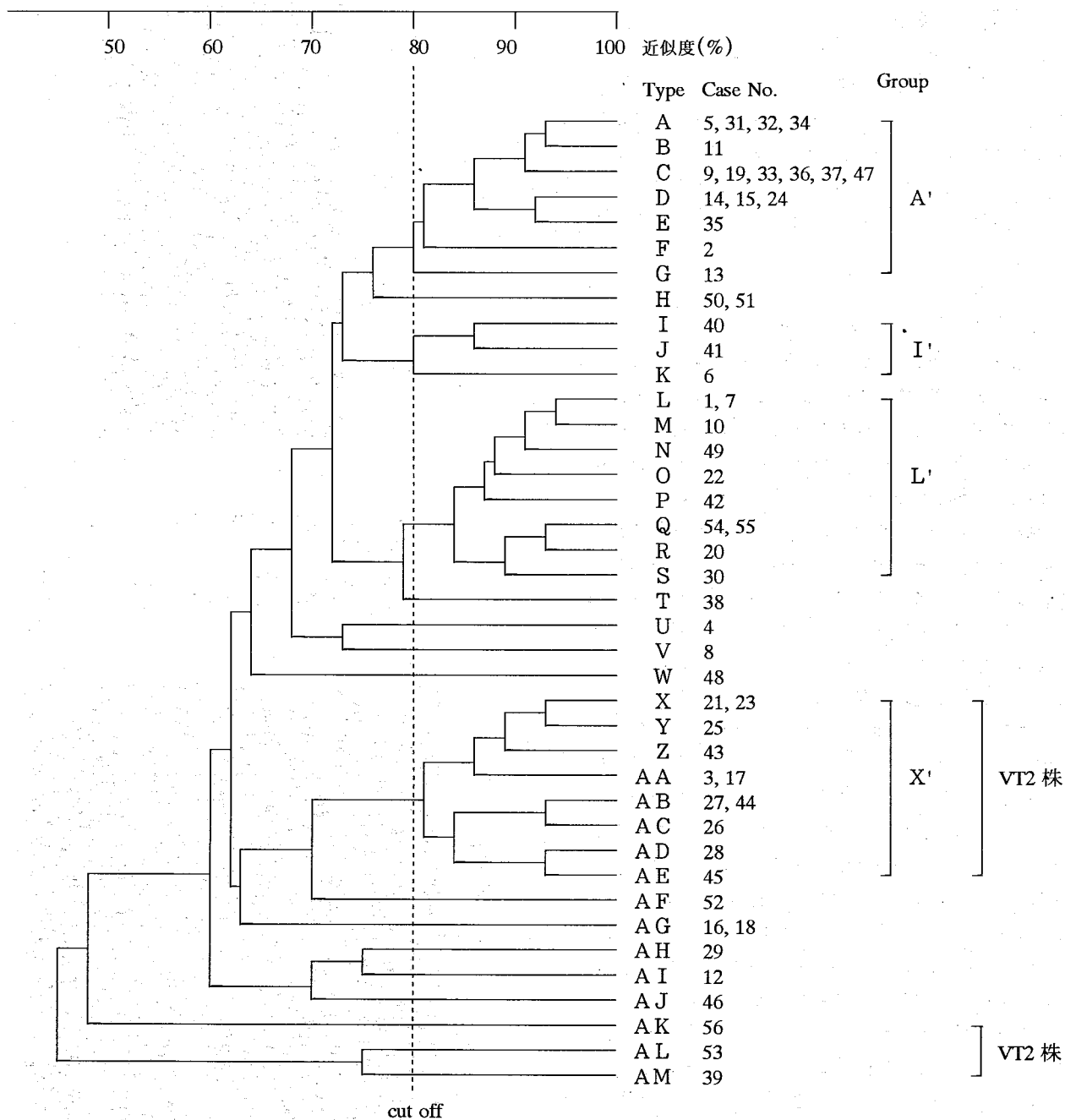


図3. 56例のO157感染事例由来株(56株)のPFGEパターンによるType分けと各Typeの近似度(デンドログラム)解析, および近似度80%を基準にした各Typeのグループ分け

なった1996年に発生した事例由来の株と同じPFGEパターンを示す株が,すでにそれ以前にも存在していたことが明らかとなった。

また,今回調査した56事例のうち半数以上の33事例が1996年6月から8月の夏季に発生した事例であったことも影響していると考えられたが, TypeD, X, AB, AGにはその間に発生した事例が集中していた。しかし, TypeHの2事例No.50, 51は共に1996年12月の発生, またTypeQの2事例No.54, 55は共に1997年5月の発生であるなど, 同Typeの株が検出された事例は

発生時期が近接する傾向が認められた。

#### 4. PFGEパターンによる近似度解析

材料と方法に記載した計算法に従い56株(事例)のデンドログラムを作成した(図3)。

TypeA~AMの39Type間の近似度が最も高いところは93.7%(TypeLとMの近似度), 最も低いところが45.0%であった。複数の株が同一Typeに型別されたもののうちTypeA, C, Dは互いに高い近似度を示

した。また、今回調査対象とした56事例には14例のVT2単独産生株による事例が含まれていたが、近似度解析の結果11事例がTypeX～AEのクラスターに集中した。その他の3事例は近似度50%以下の dendrogram 上で最も離れたクラスター (TypeAK, AL, AM) に位置した。なお、非運動性株による2事例 (No.38, 53) はTypeT, ALにそれぞれ位置した。

今回の調査および Izumiya らの報告<sup>11)</sup>より、同一感染事例から分離された O157 株については全く同一の PFGE パターン (近似度100%) を示すか、少数の変異株が出現した場合でも PFGE パターン上の変化はバンド数1本程度 (近似度90%以上) であるという結果が得られた。すなわち任意の2株について PFGE パターンを比較した場合、パターンの違いがバンド1本以下であれば、その2株は同一起源に由来する株である可能性が極めて高いと考えられた。

バンド数で何本までの違いであれば同一起源に由来する株であると考えて良いのかという疑問について科学的に証明された明確な基準は未だ示されていないが、CDCの Tenover らは PFGE パターンをもとにした菌株間の関連性についての判断基準を提案した<sup>12)</sup>。その提案によると、PFGE パターンとして少なくとも10本以上のバンドがあった場合に任意の2株を比較した時、2本あるいは3本以内のバンド数の違いであればその2株は密接な関連性がある株であると判断できるとしている。仮にこの判断基準を参考にしたとすれば、今回調査対象とした O157 事例の PFGE Type 間の近似度でバンド数3本程度の違いに相当するのは近似度80%付近であった。そこで dendrogram を近似度80%の線でカットし、39 Type についてさらにグループ分けを試みた (図3)。その結果 TypeA～G が Group A', TypeI, J, K が Group I', TypeL～S が Group L', TypeX～AE が Group X' にまとめられ、全体としては17グループに分けられた。Group A' には7 Type 17事例、Group I' には3 Type 3事例、Group L' には8 Type 10事例、Group X' には8 Type 11事例がそれぞれ属し、Group A', Group L', Group X' の3つが10事例以上を含む大きなグループとなった。

#### IV 考察

食中毒菌の疫学的解析法には毒素型別、生物型別、薬剤感受性試験、プラスミドプロファイル、そして PFGE 等いくつかの手法が用いられている。その手法に求められる条件としては次のような事が考えられる。

1. 比較的安定した性状のものであること

2. 結果の再現性が良いこと

3. 型別能力が高いこと

今回我々は PFGE による O157 株の型別と近似度の解析を実施した。型別の結果56株は多数の39 Type に型別された。また、数年の期間を隔てて発生した別々の事例から同一の PFGE パターンを示す株が分離されたことなどから、PFGE による疫学解析法は上記の3条件をほぼ満たしていると考えられた。

PFGE パターンを基にした菌株間の近似度解析についてはその方法自体の正当性が証明されているわけではないが、今回の結果では dendrogram 上で VT1+2 産生株、VT2 単独産生株はそれぞれに近い近似度を示し、H 血清型別や VT 型別の結果ともまったく一致した。この結果は PFGE パターンによる近似度解析の有効性を強く示唆するものと考えられた。一方、今回調査した O157 株のように型別された PFGE Type の数が多岐にわたる場合、どの程度の近似度であれば同一起源に由来する株であるのかということが研究者の大きな関心を集めている。今回は Tenover らの報告<sup>12)</sup>を参考に80%の近似度で線引き (cut off) してグループ分けを試みた。このグループ分けの結果から推論すると、1996年を中心として福岡市とその近郊で発生した56例の O157 感染事例は、それぞれ別の同一起源に由来すると考えられる大きな2つのグループ Group A', Group L', およびその他11の小グループからなる VT1+2 産生株群と、同一起源に由来すると考えられる大きな1つのグループ Group X', および3つの小グループからなる VT2 単独産生株群によって引き起こされていたと考えられた。しかし、現時点で明確な判断基準が示されていない以上、PFGE パターンの近似度を基にしたグループ分けに関してはあくまでも推論の域を出ないことを考慮しておくべきであろう。

逆に O157 に対するこの型別率の高さが実際の食中毒発生時には汚染源の追跡調査等に非常に有効な手段になると考えられた。ただし、Type A, C, D などの比較的出現頻度が高い Type の株による事例が発生した場合、患者由来株とその他の環境由来株との同一性の判定は他の疫学解析法を組み合わせるなどして慎重に行う必要があると考えられる。

また、どのような PFGE パターン株の検出頻度が高いのか、現在流行している PFGE パターンはどのようなものなのかといった疫学情報を得るためには日常的に PFGE パターンのデータを蓄積しておく事が重要である。さらに新たな O157 感染事例の発生に際して PFGE 解析を行う場合、これら PFGE データの蓄積が汚染源調査等に有効な示唆を与えてくれるものと考えられる。

なお、本報告の一部は第56回日本公衆衛生学会総会(1997年10月, 神奈川)に於いて発表した。

謝辞: 今回の調査の関して1996年以前に分離されたO157株を分与していただいた福岡大学医学部付属病院小児科 諸岡達也先生に深謝します。

## 文 献

- 1) Wells, J. G. et al. : Laboratory Investigation of Hemorrhagic Colitis Outbreaks Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype, *J. Clin. Microbiol.*, 3, 18, 512 ~ 520, 1983
- 2) 城 宏輔 : 埼玉県某幼稚園で流行した *E. coli* O157:H7 による出血性大腸炎, *臨床と微生物*, 4, 18, 457 ~ 465, 1991
- 3) 伊藤 武, 甲斐 明美 : 腸管出血性大腸菌食中毒の発生状況, *医学のあゆみ*, 13, 178, 909 ~ 914, 1996
- 4) 小野 准子, 他 : 札幌市において3事例に検出した Vero 毒素産生大腸菌について, *札幌市衛研年報*, 20, 57 ~ 59, 1993
- 5) 河野 喜美子, 他 : 1994年に宮崎県で発生した Vero 毒素産生性大腸菌による散発下痢症について, *宮崎県衛生研究所年報*, 6, 41 ~ 45, 1994
- 6) 安藤 光広, 他 : 糞便より大腸菌 O157:H7 を検出した溶血性尿毒症症候群の兄妹例, *感染症誌*, 9, 65, 1188 ~ 1193, 1991
- 7) 諸岡 達也, 他 : 散発性腸炎小児からの Vero 毒素産生性大腸菌の分離, *感染症誌*, 2, 67, 122 ~ 126, 1993
- 8) 国立感染症研究所 細菌部 : 腸管出血性大腸菌 O157 の検出・解析等の技術研修会マニュアル, 1997
- 9) Barrett, T. J. et al : Laboratory Investigation of a Multistate Food-Borne Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Phage Typing, *J. Clin. Microbiol.*, 12, 32, 3013 ~ 3017, 1994
- 10) 西田 英郎, 佐藤 嗣二 : 実例クラスター分析, 内田老鶴園, 1992
- 11) Izumiya, H. et al : Molecular Typing of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates in Japan by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *J. Clin. Microbiol.*, 7, 35, 1675 ~ 1680, 1997
- 12) Tenover, F. C. et al : GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing, *J. Clin. Microbiol.*, 9, 33, 2233 ~ 2239, 1995