第 26 回獣疫学会学術集会

教育講演

分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制：パルスネットについて

○寺嶋 淳*・伊豫田淳・泉谷秀昌・三戸部治郎・石原朋子・渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌第一部

Network System of Foodborne Disease Surveillance Based on Molecular Epidemiological Investigations—PulseNet Japan

Jun TERAJIMA*, Sunao IYODA, Hidemasa IZUMIYA, Jiro MITOBE,
Tomoko ISHIHARA and Haruo WATANABE

National Institute of Infectious Disease, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

Summary

PulseNet Japan is a network system for utilizing epidemiological information and the results of laboratory investigations of foodborne illness outbreaks. We have been analyzing DNA pattern of foodborne pathogens such as enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) isolates by the use of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The method, capable of discriminating genotypical difference of the isolates, enabled us to find the contaminated food such as salmon roe which was the causative agent for the multiprefectural outbreaks in Japan. PFGE results of the isolates and other epidemiological information have been accumulated to construct database for foodborne bacterial pathogens for sharing and making use of the information among municipal public health institutes, National Institute of Infectious Diseases and the Ministry of Health, Labor and Welfare.

病原体の検出・同定方法はほぼ確立され、さらに改良されつつあるが、いわゆる細菌性感染症においては、従来の生物学的な表現型に基づく同定鑑別法では同じ血清型に属する株 (strain) 間の鑑別はできない。したがって、菌種あるいは血清型以下をより詳細に鑑別する必要がある事例では、患者由来株或いは原因食品由来株について、分子生物学的手法を用いて遺伝子型別を行うことが多くなっている。現在、食中毒原因菌の解析に汎用され菌株間の識別に威力を発揮している方法の一つにパルスフィールドゲル電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) がある。PFGE では、染色体やプラスミド DNA を比較的稀に切断する制限酵素を用いて生ずる大きな DNA 断片を

特殊な電気泳動装置にかけて分離し、観察される泳動像の多型性を比較することができる。PFGE の結果は泳動像であるため、複数の研究室において解析結果を比較する際には、鮮明な泳動像が必要でありどの研究室においても標準化された方法を使用していることが重要である。このような標準化プロトコールと基準株を使用した PFGE により食品媒介性細菌感染症における分離株の解析を行い、患者情報等の疫学情報とリンクさせ、関連機関における情報共有により感染源解明あるいは感染の拡大防止に役立てることが PulseNet Japan (以下、パルスネット) の目的となっている (図 1)。米国では CDC (Centers for Disease Control and Prevention) を中心として、米国内の州立公衆衛生研究所、FDA (Food and Drug Administration) および USDA (United States Department of Agriculture) の研究室間で 1995 年より PulseNet が運営されている¹⁾。国立感染症研究所細菌第一部では、1996 年に EHEC O 157 による感染症が大発生した際に PFGE による解析を

連絡先：寺嶋 淳*

国立感染症研究所細菌第一部 第一室

〒162-8640 新宿区戸山 1-23-1

Tel : 03-5285-1111

E-mail : terajima@nih.go.jp

図1 標準パルスフィールドゲル電気泳動法の情報ネット（菌の型の情報の共有）

開始し²⁾、その後も各地で分離され感染研に送付された EHEC、サルモネラ、赤痢菌、これら菌などの分子疫学的解析を PFGE により行っている。これにより、食品から菌が分離された例ではその食品由来株と患者由来株の比較、複数の集団発生由来株の比較、ある集団発生例と見かけ上の散発例分離株の比較が可能になっている。

現在のところ、パルスネットを構成する研究機関は、国立感染症研究所と日本全国の地方衛生研究所等である。食中毒事例の解析・探知では、患者由来株の解析とともに疫学情報が必須であり、各機関における分離株の解析結果を比較するためには、前述したように PFGE の精度管理が重要であるが、最終的な感染原因菌の特定は疫学情報との組み合わせにより導き出されているものである。

以下に腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 を中心として、散発事例が広域に及んで多発した事例について述べる。2001 年 3-4 月にかけて首都圏を中心とした 1 都 6 県では牛肉タキおおよびローストビーフを原因食とした O157 による事例、また近畿・北陸の 3 県ではチェーンレストランのサイコロステーキを原因食とした O157 による事例が発生した³⁾。これらの事例では、食品と原材料の冷凍輸入牛肉から O157 が分離され、その菌の PFGE パターンがそれぞれの事例内の患者分離株の PFGE パターンと一致した（図 2）。

EHEC O157 以外でも、*Salmonella* Oranienburg に汚染

された乾燥イカの加工品を原因食として、1998 年末～1999 年 5 月にかけて広域の食中毒事件が発生した。加工品が全国に流通したことなどから患者総数は 1,505 名にのぼった。この事例においても、患者由来株と原材料の乾燥イカからの分離株の PFGE パターンは一致した。その他にも、2001 年 11 月下旬から西日本を中心に、輸入カキによる *Shigella sonnei* の広域食中毒が発生し、2002 年 1 月 30 日までに 30 都道府県で 160 例の赤痢患者が報告された。疫学調査から判明した 28 名の患者の共通喫食品であった輸入カキ及び患者から分離された *Shigella sonnei* の遺伝子解析結果から、これらの株がともに同一の PFGE パターンを示していることが明らかになった⁴⁾（図 3）。

以上のように、特に広域に及ぶ食中毒事例においては PFGE による解析結果が重要な情報となることが多い。一方、近年の EHEC O157 による散発事例においては、疫学的関連性が不明であるが PFGE パターンが一致する株が少なからず分離される。同一 PFGE パターンを示す株が必ずしも同一クローンの株であるとは限らず、感染源が不明で疫学的関連性も明らかではない状況では、分離株の同一性を検証するためには PFGE 以外にも菌学的な解析情報が必要である。現在では、PFGE 以外の解析方法の一つとして、Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) 等の DNA 解析方法の利用が始まっている。2005 年の散発事例に由来する EHEC O157 株

図 2 2001 年 3 月～4 月に発生した，O157：H7 による事例由来株の PFGE パターンと分離地

図 3 2001 年 11 月～12 月に分離された *S. sonnei* 株の PFGE パターン

における MLVA の結果から、1) 長期間に及ぶ同一 PFGE パターンを示す株にも遺伝的な多様性が見つかる場合があること、また、2) 同一 PFGE パターンでかつ MLVA においても同一タイプを示す株があることが示されている⁵⁾。したがって、1) では、感染源が異なる可能性が示唆される一方で、2) では、これらの散発事例由来株が未確認の集団発生事例を形成している可能性が考えられる。食中毒菌に対する MLVA での解釈基準は、まだ明確な基準が示されているとは言い難く、今後疫学的な裏づけを伴った MLVA 解釈基準の設定が必要である。

参考文献

- 1) <http://www.cdc.gov/PULSENET/>
- 2) Watanabe, H, et al., Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 infection by two different genotypes-strains in Japan, 1996. *Lancet* 348, 831-832, 1996
- 3) Terajima J, et al., Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 68-73, 2006
- 4) Terajima, J., et al., A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. *Microbiology and Immunology* 48, 49-52, 2004
- 5) Pei Y, et al., Molecular Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 Isolates Dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Jpn J Infect Dis.* 61, 58-64, 2008