

79980117

平成10年度厚生科学研究費補助金
（新興・再興感染症研究事業）

我が国におけるパルスネット
構築のための緊急研究
研究報告書

平成11年3月

主任研究者 水口康雄

千葉県衛生研究所

目 次

総括研究報告書	頁
我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究	1
水口康雄 千葉県衛生研究所	
分担研究報告書	
Pulse Netの評価と既存システムとの連携	7
渡辺治雄 国立感染症研究所	
Pulse Netの評価と既存システムとの連携	13
大月邦夫 群馬県衛生環境研究所	
腸管出血性大腸菌及び赤痢菌の解析条件の標準化	28
寺嶋 淳 国立感染症研究所	
腸炎ビブリオの解析条件の標準化	34
山井志朗 神奈川県衛生研究所	
我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究 (コレラ菌)	46
濱端 崇 国立国際医療センター研究所	
我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究 (カンピロバクター)	51
伊藤喜久治 東京大学大学院農学 生命科学研究所	
我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究 (毒素原性大腸菌)	57
甲斐明美 東京都立衛生研究所	
我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究 (サルモネラ)	64
仲西寿男 神戸市環境保健研究所	
我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究 (A群レンサ球菌)	73
水口康雄 千葉県衛生研究所	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

我が国におけるパルスネット構築のための緊急研究

主任研究者 水口 康雄 千葉県衛生研究所所長

研究要旨：食品流通の広域化に伴い、病原微生物により汚染された食品が全国的に出回り、いわゆる diffuse outbreak を起こすケースが最近注目を引いている。この diffuse outbreak の検出のため、異なった地域で分離された病原微生物が同じクローンに属するか否かを調べ、その結果を比較することが行われる。この比較をコンピューターネット上で行おうというのがパルスネットである。本研究においては、どのような微生物がパルスネットの対象になり得るのか、ネットを構築するに当たってはどのような点に注意を払うべきか、等について検討が行なわれた。それぞれの微生物毎に各分担研究者がパルスフィールド電気泳動条件を標準化し、その方法により型別が可能か否か、型別が疫学的に重要な情報を提供する事ができるか否か、異なる研究室で得られた結果を比較する事ができるか否か、等について検討を行った。その結果、微生物の種類により状況は異なるものの、型別は全ての微生物について可能であることが判明した。但し微生物の種類によっては、①分離される菌株の殆どが同一タイプに収束するため（*S. Enteritidis*）、ネットで比較する意味があまり無いと考えられるもの（サルモネラの場合、多数の血清型が存在するので、他の血清型については今後のデータが必要）、②データがまだ十分に集積されておらず、ネットでの比較対象として適当か否かの最終結論を得るまでには、より多くの菌株を用いた基礎的なデータが必要とされるもの（カンピロバクター、A群レンサ球菌、腸炎ビブリオ等）、③十分な基礎データが既に存在し、ネット構築により全国的な比較が可能であるが（腸管出血性大腸菌等）、目視による比較が極めて融通性に富み、正確な情報の把握が可能なのに反し、画像処理による解析には、PFGEの結果の画像が高品質のものでないと、補正の必要な場合があるもの。従って異なる研究室間の比較には十分な精度管理が必要であるもの、の大きく3つに分けられることが明らかになった。

また、ネットの構築には PFGE の比較のみでなく、その菌の血清型、毒素型、ファージ型や、その他の疫学情報を含めたデータの交換が可能なシステムにする必要があることが結論づけられた。

A. 研究目的

食品流通の広域化、外食の一般化等により、食品媒介性感染症は近年においても殆ど減少の気配を見せておらず、公衆衛生学的にも重要な問題として存在し続けている。その結果、病原微生物により汚染された食品が全国的に出回り、それぞれの地域

においては散発事例ととられるケースが実は同一の汚染を原因とする、いわゆる diffuse outbreak であったというケースが、最近注目を引いている。この diffuse outbreak をできるだけ早期に発見し、被害が広がるのを防ぐためには、それぞれの地域で分離された原因微生物が同一クローンに属する

か否かを解析すること、他の都道府県で分離された菌株の中に同一のパターンを示すものが存在すること、等の比較・検討をできるだけ短時間の内に行う必要がある。そのために考え出されたのが、解析に用いたパルスフィールド型電気泳動装置による泳動パターン（PFGEパターン）をコンピュータネットワーク上で比較検討できるシステムを作り上げることである。このいわゆるパルスネットの構築がどのような微生物で可能であるかについて検討する事、またネットを構築する上でどのような点に注意をすれば、より利用度の高いネットワークにする事ができるかについて検討することを目的とする。

B 研究方法

異なる研究室で行った型別に関する結果を比較するためには、PFGEによる泳動などをできるだけ同じ条件で行う必要があるものと考えられる。そこで、まずそれぞれの分担研究者毎に病原微生物の種類を割り当て、最も良い泳動パターンを得るためにPFGEを実施する際の条件の標準化、用いる制限酵素の種類等、についてその菌の型別に最適な条件の設定を行った。検討の対象とした菌は、腸管出血性大腸菌（寺嶋分担研究者）、毒素原性大腸菌（甲斐分担研究者）、カンピロバクター（伊藤分担研究者）、サルモネラ（仲西分担研究者）、コレラ菌（濱端分担研究者）、腸炎ビブリオ（山井分担研究者）、および近年になって注目を引くようになったA群レンサ球菌（水口分担研究者）の7菌種である。

次にその方法を用い、多数の菌株について実際に解析を行い、得られた結果から、当該菌種において型別が可能であるか、もし可能であるとすればどの程度の型に分類が可能か、可能であるとして、得られたPFGEパターンが比較分析できるか否か等について検討を行った。

一方、大月分担研究者は、国立感染症研究所において型別分類された同一の腸管出血性大腸菌を、全国8カ所の衛生研究所（北

海道立衛生研究所、秋田県衛生科学研究所、群馬県衛生環境研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、広島市衛生研究所、福岡県保健環境研究所及び沖縄県衛生環境研究所）に送付し、それぞれの方法により各研究室で得られたPFGEパターンが、比較検討可能か否かについてまとめを行った。

渡辺分担研究者は、Pulse Netの評価と既存システムとの連携について考察し、既に保健所、地方衛生研究所、厚生省、感染研の間のネットワークとして存在している食品保健総合情報システム（Food-Net）との連携が重要であることを結論づけた。

C. 研究結果と考察

1 PFGEの条件

まず、PFGEパターンに最も影響を与えると考えられる試料DNAの調製法、泳動条件などについて、いくつか方法を変えて検討が行われた（大月分担研究者、水口分担研究者）。すなわち、菌の培養条件、アガロースへの埋め込みの条件、溶菌の条件、使用する制限酵素の濃度、泳動条件、泳動装置等である。その結果、極端な条件を用いない限り、これらが泳動パターンに及ぼす影響は比較的少ないことが明らかになった。但し、これらの結論は全て目視による判定の結果であり、コンピュータ上で画像解析装置による比較が行われる場合、どの程度に影響するかについては考察されていない。

この点に関しては、腸管出血性大腸菌を用いて寺嶋分担研究者により検討が行われた。それによると判定に画像解析装置を用いた場合、同一研究室で同じ方法を用い、目視では全く同じに見えるパターンでも、PFGEによる泳動像の品質が高いものでないと、データの解析が複雑になり、補正が必要であること、時には補正が困難なケースもあった、としている。この点が実際にネットを作成した場合、大きな問題として残る可能性があり、より目視による比較に近い解析ソフトの開発が望まれる所であ

る。また PFGE パターンをできる限り高品質なものにするための精度管理が必要になるものと考えられた。

2 使用制限酵素について

個々の制限酵素はそれぞれ特有の認識・切断カ所を有することから、解析に有用なパターンを得るためには菌種により適当な制限酵素を選択する必要がある。既におおかたの菌種においては通常用いられる制限酵素は決まっているが、必ずしも定まっていない場合もある。そこで菌種によってはどのような制限酵素が適当であるかについての検討が行われた。その結果、腸管出血性大腸菌では *XbaI*、毒素原性大腸菌においては *XbaI*、または *NotI*、あるいはその両方、サルモネラでは *BlnI*、もしくは *XbaI*、カンピロバクターでは *SmaI*、*KpnI*、*ScaII* の3者の併用、コレラ菌は *NotI*、腸炎ビブリオは *SfiI* と *NotI* の併用、A群レンサ球菌では *SfiI* と *SmaI* の併用が望ましいことが明らかになった。但し、複数の制限酵素の併用は解析結果を複雑にし、ネット上での比較を困難にする可能性をもたらすため、今後更に検討を進める必要がある。

3 各菌種についての解析結果

1) 腸管出血性大腸菌 腸管出血性大腸菌については、既に膨大な数の株について解析がなされており、これまで我が国において分離された菌 (O157) は基本的には I~VII タイプに、更にいくつかのサブタイプに分けられている。1998 年の「いくら」による食中毒事例より集められた菌株について PFGE 解析を行った結果をスキャナーにより読み込んだ後、Molecular analysit(Bio-Rad 社) 画像解析ソフトにかけると、全般的にはタイプが一致するものの、条件によっては差が生じる場合があり、補正が必要であった。また O157 以外の腸管出血性大腸菌の場合、PFGE の解像度がやや不鮮明になることがあり、全ての腸管出血性大腸菌について、同一の条件で PFGE を行えるか否か、更なる検討が必要であった。赤痢菌に

ついては事例数が少なく結論を導く事はできなかった。

2) 毒素原性大腸菌 毒素原性大腸菌については、これまで我が国では PFGE による解析があまり行われていないため、まず PFGE 解析に最も適当と思われる条件について検討を試みた。その結果、制限酵素としては *XbaI*、または *NotI*、が適していることが判明した。*XbaI* では菌は4種類の、*NotI* では8種類のパターンに分類された。毒素原性大腸菌には多数の血清型が含まれることから、血清型、毒素型、等と組み合わせることにより diffuse outbreak の際の比較が可能と考えられた。

3) サルモネラ サルモネラは非常に多くの血清型に分けられているため、希にしか遭遇しない血清型による事例ではそれだけである程度の推測が可能である。全国で1,500名以上もの患者を出した「いか菓子」による *S.Oranienburg* の場合はまさにその例とあって良い。*BlnI*、もしくは *XbaI* を用いた PFGE 解析はその推測が正しいことを明らかにした。一方日常遭遇する血清型においては PFGE による解析は重要な情報を与えてくれると考えられる。しかしながら主に卵を汚染源とする *S.Enteritidis* の場合、解析の結果は種々の異なる事例より分離された菌であるにも関わらず、同一遺伝子型を示し、ネットでの比較はあまり意味を持たない事を示唆する結果が得られた。その他のポピュラーな血清型に関しての解析は今回は行っておらず、今後の研究を待たねばならない。

4) カンピロバクター カンピロバクターについては、これまで血清型別のみが行われてきており、遺伝子型別が可能か否かについては異なる意見が出されてきた。今回、いくつかの制限酵素を用いて PFGE による型別が可能か否かを検討したところ、*SmaI*、*KpnI*、*ScaII* の3酵素が利用可能である結果を得ることができた。ただし、このうちのひとつのみの酵素による解析では血清型による解析と殆ど変わらない結果が得られるため、これらの酵素の併用が必要であろう

としている。しかしながら、今回の解析に用いた菌株数が少ないこと、複数の酵素を用いた解析が必要であるとすれば、ネット上での比較がかなり複雑になり、その分困難になることも考えておかねばならず、今後更に菌株を増やして調べる必要があると考えられた。

5) コレラ菌 コレラ菌にも多数の血清型があるが、ここで解析されたのは公衆衛生学的に特に重要な O1 型と O139 型である。解析の結果、O139 型コレラ菌が出現した 1992 年以前に分離された O1 型のコレラ菌と以後に分離されたそれとでは、遺伝子型が全く異なることが明らかになり、O139 の流行以後に分離された O1 コレラ菌は以前のものとは異なるルートから派生したものであることが示唆された。

O139 コレラ菌については、各地で分離された菌は全て同一遺伝子型を示し、現状ではネットでの比較の意味がないものと考えられる。一方、O1 コレラ菌については特に O139 流行後の菌の PFGE 型別が問題になるが、必ずしも十分な数の菌株についての分析がなされておらず、どの程度のタイプに分けられるか、今後の検討が必要である。

6) 腸炎ビブリオ 腸炎ビブリオは、我が国で最も重要な食中毒の原因菌の一つである、やはり多数の血清型に分類されているが、多くの場合、患者から分離された菌と原因食からの菌の対応ができないことがこの菌の大きな問題点である。

その中で近年、O3:K6 血清型の菌による事例が増えてきているので、検討に値するものと考えられた。その結果、制限酵素としては *SfiI*、および *NotI* が有用である事が明らかとなった。解析にはどちらか単独の酵素でも可能と思われるが、片方の制限酵素では同一のパターンを示す菌株が他の酵素を使うと別のパターンに区別される事があり、両者の併用が必要であると結論づけている。

また全ての菌種に共通の問題点として、バンドの濃淡や分離の程度などによって解

析が困難になるケースが十分に考えられる事から、精度管理が重要であろうとしている。

7) A 群レンサ球菌 A 群レンサ球菌が飲食物を汚染し、それを喫食したヒトが咽頭痛、発熱等の臨床症状を呈する事例が、近年注目を引くようになってきている。食品とは関係ない形で感染を起こし、咽頭やその他の病巣から分離された菌株の PFGE 分析に関する報告は、いくつものなされているが、ここでは、食中毒様の発症形態をとった菌について解析を行った。

調べた酵素のうち、良好な結果をもたらしたのは *SmaI* および *SfiI* であった。腸炎ビブリオ同様、一つの酵素では同じパターンを示した菌株が他の酵素では異なるパターンを示す場合があることから、解析には両酵素を併用する事が望ましいと結論づけた。

一方泳動の条件を種々に変えた場合、どの程度パターンに影響を及ぼすかを検討したところ、多少の条件の変更は目視で観察する限り、支障を来さなかったが、極端な条件の変更ではやはり影響が大きい事が明らかになった。

4 パルスネットの評価と既存システムとの連携について

これまで、diffuse outbreak であることを証明したケースの代表的な例としては「いくら」の O157 事件がある。既に稼働していた食品保健総合情報処理システム Food-Net(Food-Info-Net)で異常発生が明らかになり、菌株が感染研で解析された結果、同一クローンによる事例である事が証明された。しかし全国の殆どの地研に PFGE 解析装置が普及した現在、菌株を集約するのではなく、解析結果を比較するためのネット構築がより理にかなっていると考えられる。ただし問題点としては、比較する PFGE に高い精度管理が要求されるは既に述べた通りである。

パルスネットの効果的な利用法としては、集団感染事例を把握した時、発生 2 4

時間以内に Food-Net により、異常発生あるいは異常集積が見られるか否かを調べ、全ての場合に PFGE 結果を電送するのではなく、異常発生が見られる事例を中心に活用することが考えられる。また各地研の技術レベルを上げるために、研修事業を定期的に行う必要がある。

将来は PFGE に代わって DNA 解析法などが取り入れられることも予想される。

D. 結論

食品流通の広域化に伴って生じる散在的集団発生 (diffuse outbreak) を迅速に把握し、被害の拡大を防ぐため、各地研が行った PFGE パターンの比較をコンピューターネット上で行う、パルスネットを構築するにあたっては、以下の条件が満たされることが必要である。

1) 既に存在している Food-Net との連携、各種疫学情報を含めたデータの交換が可能なシステムとして構築すること。

2) 目視では問題がなくとも、画像解析ソフトで行う場合、高い精度の解析結果が要求される。精度管理や PFGE に関する研修事業が必要である。

3) 対象となる細菌の菌種や血清型により事情が異なる。菌種や血清型によっては、基礎的なデータを更に積み重ねる必要がある。

分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（新興・再興研究事業）
分担研究報告書

Pulse Net の評価と既存システムとの連携

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌部長

研究要旨：ひとつの都道府県を越えた食中毒の散在的集団発生 (diffuse outbreak) を迅速に把握し行政的対応を行うためのシステム、「食品保健総合情報処理システム」が厚生省、保健所、地方衛生研究所、感染研の間で稼働している。そこに菌の DNA 解析に基づいた情報解析システム (Pulse-Net あるいは DNA-Net) を連携させることにより、情報の科学的な質をより一層高め、集団発生への迅速なる対応を計れるようにすることを目指す必要がある。

A. 研究目的

近年、食中毒が大規模化の傾向にあり、被害者の数も増加してきている。特に、「イクラ」の O157 汚染による腸管出血性大腸菌感染症の集団事例、卵を原因とするサルモネラ感染症の増加、サルモネラ・オラニエンブルグの汚染による「バリバリイカ」事件、海外渡航歴のない国内コレラ感染者の増加、井戸水等を原因とする集団赤痢の発生等と話題に事欠かない現状である。これらの食中毒性感染症の特徴のひとつは、各地で発生している散発事例が、実は同一の汚染を原因としている事例・つまり散在的集団発生 (diffuse outbreak) であるというケースが明らかになってきたことである。そのような発生を迅速に把握するシステムを構築し、被害の拡大を防ぎ、国民の健康を守る必要がある。

B. 研究方法・結果・考察

I: 既存のシステム (食品保健総合情報処理システム) (図 1)

保健所、地方衛生研究所、厚生省、感染研のネットワークにより、食中毒を迅速に検知し解析するシステム「食品保健総合情報処理システム」(仮称 Food-Info-Net or Food-Net) が現在稼働している。その概要は、以下の通りである。

①保健所あるいは地方衛生研究所が各地で発生している食中毒事件の情報をコンピューターネット (Wish-Net) で 24 時間以内に厚生省及び国立感染症研究所に届ける。

②経時的あるいは地域的に異常発生が見られるかについて GIS を用いた解析を国立感染症研究所で行い、その結果を厚生省、各地研、保健所等に連

絡する

③異常発生のみられるところの菌株の遺伝学的解析を各地研あるいは国立感染症研究所で行う

④その結果を汚染食品の究明およびその回収等の行政的対応に生かす。それにより感染の拡大を未然に防止する。

II：その成功例（図1）

上記のシステムがうまく機能したひとつの最近の事例として、1998年6月に発生したイクラを汚染原因とするO157事件がある。富山、神奈川、東京等に異常な集属するEHEC O157の発生があることがGISシステムを用いて明らかにされた（図1-1及び2）。各地域における疫学的解析結果により汚染されたイクラを喫食したことによる食中毒であることがわかった。PFGEを用いてのDNA解析により各地域の菌の遺伝型が一致し、お互いに関連性がある事件であることが判明した（図1-3）。さらに、それらのイクラの生産元が同一の業者であることが判明し、当該業者のイクラを回収することにより、それ以上の被害の発生を未然に防ぐことができた（図1-4）。我が国においてとられた未然処理型対応の画期的事件であったといえる。この解明には、菌のDNA解析技術が多なる貢献をした。つまり、各地で分離された菌のDNA型を解析することにより、各地域で分離された菌のDNA型が同一であることを証明し、たとえば地域が離れているところで発生した事件であっても

お互いに関連性がある集団発生（いわゆる散在的集団発生：diffuse outbreak）であることを科学的に証明したことである。

III. 今後の改良点

上記のような事例において、関連する菌をすべて感染研に集めて、同一条件下でPFGEの解析をした経緯がある。しかし、今や、殆どの地研にPFGE試行のための装置が整備された現状においては、各地研でPFGE解析を行うことが理にかなったことであろう。異常発生が見られた菌株のDNA解析結果を各地研から中央センター（感染研が適しているであろう）に集約し、そこで菌株の関連性を解析し、その結果を再び各地研に還元し、各事例の解析に活用する。あるいは、中央センターのデータを各地研が自由にアクセスすることを可能にし、各地研独自の解析ができるようにする。このようなシステム（DNA-Net,あるいはPulse-Net）を構築することが必要と思われる。（現在はPFGEが最適と思われるが、将来的にはもっと精度の高い或いは精度管理しやすいDNA解析法がでてくるであろうことが予想されるので、DNA-Netと呼ぶことが適当かもしれない）

VI. Pulse-Net(DNA-Net)について

Pulse-Net(DNA-Net)の定義＝異常発生が見られるEHEC等の菌株のPFGEパターン(現時点ではPFGEを使用するが、将来的には精度および精度管理の面でさらに優れたものがで

た場合には変更可能)を地研から電送で中央センター(感染研)に集約し、その結果を解析し、広域集団発生の迅速把握および対策に結び付ける。

1. 意義:

①日本全国で分離される菌株のPFGE型のデータを集約できる

②その結果を解析することにより、広域集団発生の把握を可能とする。

2. 問題点

①異なる施設で行ったPFGEデータを集積し、その比較解析を可能にするためには、技術における高い精度管理が要求される。(菌株を一カ所に集め、同一ゲルでPFGEを行う方が精度管理上は容易である)

②広域で起こる集団発生の把握に、一括集約型は有効であるが、そのような事例は、1996-1998年までのデータからして年に数例にすぎない。

3. 解決点(図2)

上記の利点・問題点を考慮し、効率的に広域的集団発生を把握するために以下のような方法を提案する。

①EHEC感染者及び食中毒事例の情報を、発生24時間以内に、オン・ラインで感染研に報告する既存のシステム(食品保健総合情報処理システム; Food-Info-Net)との連携を計る。

②Food-Info-Netとの連携を計ることにより、すべての菌株のPFGEの結果を電送するのではなく、異常発生、異常集積の見られる事例を中心にPulse-Netを活用し、効率化を図る。

4. 促進点・検討点:

①各地研で分離された菌株の解析を

各地研が行うことは、広域事例ばかりでなくその地域だけで起こっている事例の把握にも重要である。各地研の技術の均一化及び精度管理をおこなうために、PFGE等の研修事業を定期的に行う。

C. 結論

広域で発生する食中毒、腸管感染症を迅速に感知し、その拡大をすばやく阻止し、犠牲者をできるだけ少なくするシステムの構築は、国民の健康を守る上で不可欠である。既存の食品保健総合情報処理システム(Food-Info-Net)に菌のDNA解析システム(DNA-NetあるいはPulse-Net)を連携させることにより、より迅速性を高めることが可能である。

D. 研究発表

①Watanabe, H., Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., Iyoda, S., and Tamura, K. Molecular epidemiological analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections in Japan. Jap.J.Med.Sci. Biol. 51:S115-S123. 1998.

②Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, K., and Watanabe, H. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan. Emerg. Inf. Diseases. 5:301-302, 1999.

③Watanabe, H., Terajima, J., Izumiya, H., Wada, A., and Tamura, K. Molecular analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated

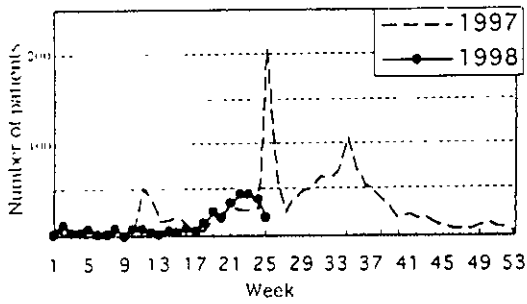
in Japan and its application to epidemiological investigation. Pediatrics International. 41:202-208, 1999.

④ Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., and Watanabe, H. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-sushi ingestion. Jap. J. Infect. Diseases. 52:51-52.1999.

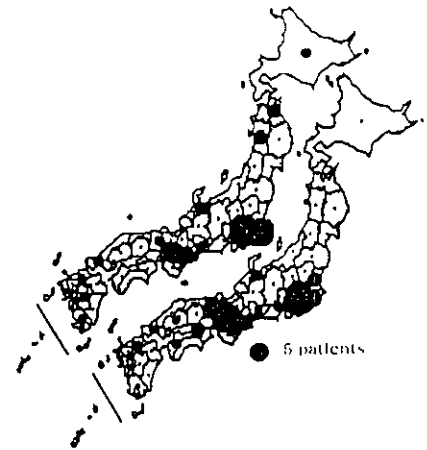
E. 知的所有権の取得状況
特許、実用新案件登録；なし

図1。既存の Food-Info-Net とその成果

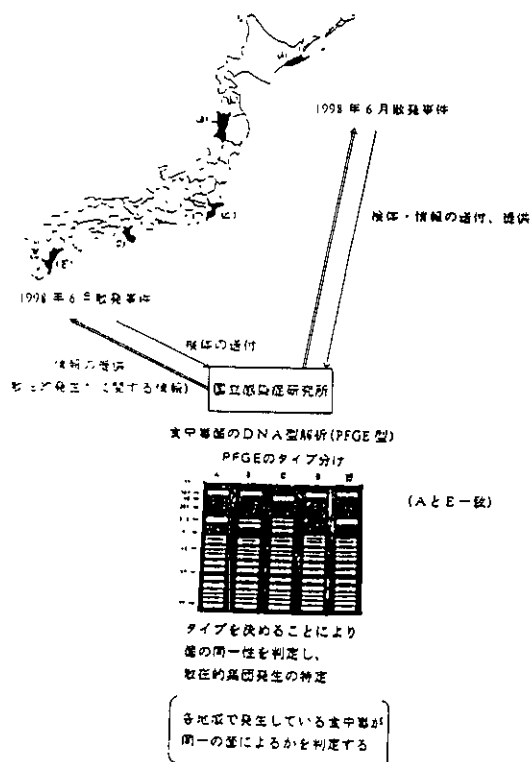
1. 週毎の EHEC O157 患者の数



2. 地域別 EHEC O157 発生状況



3. 既存の Food-Info-Net の様式



4. イクラの汚染による diffuse outbreak の解析事例

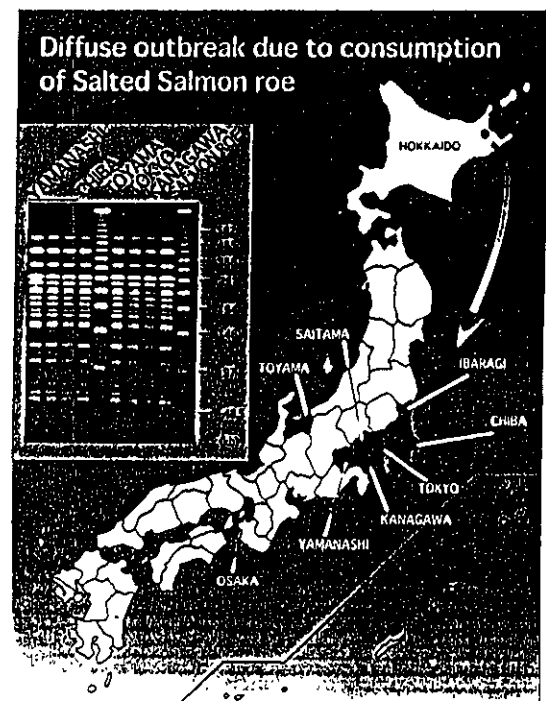
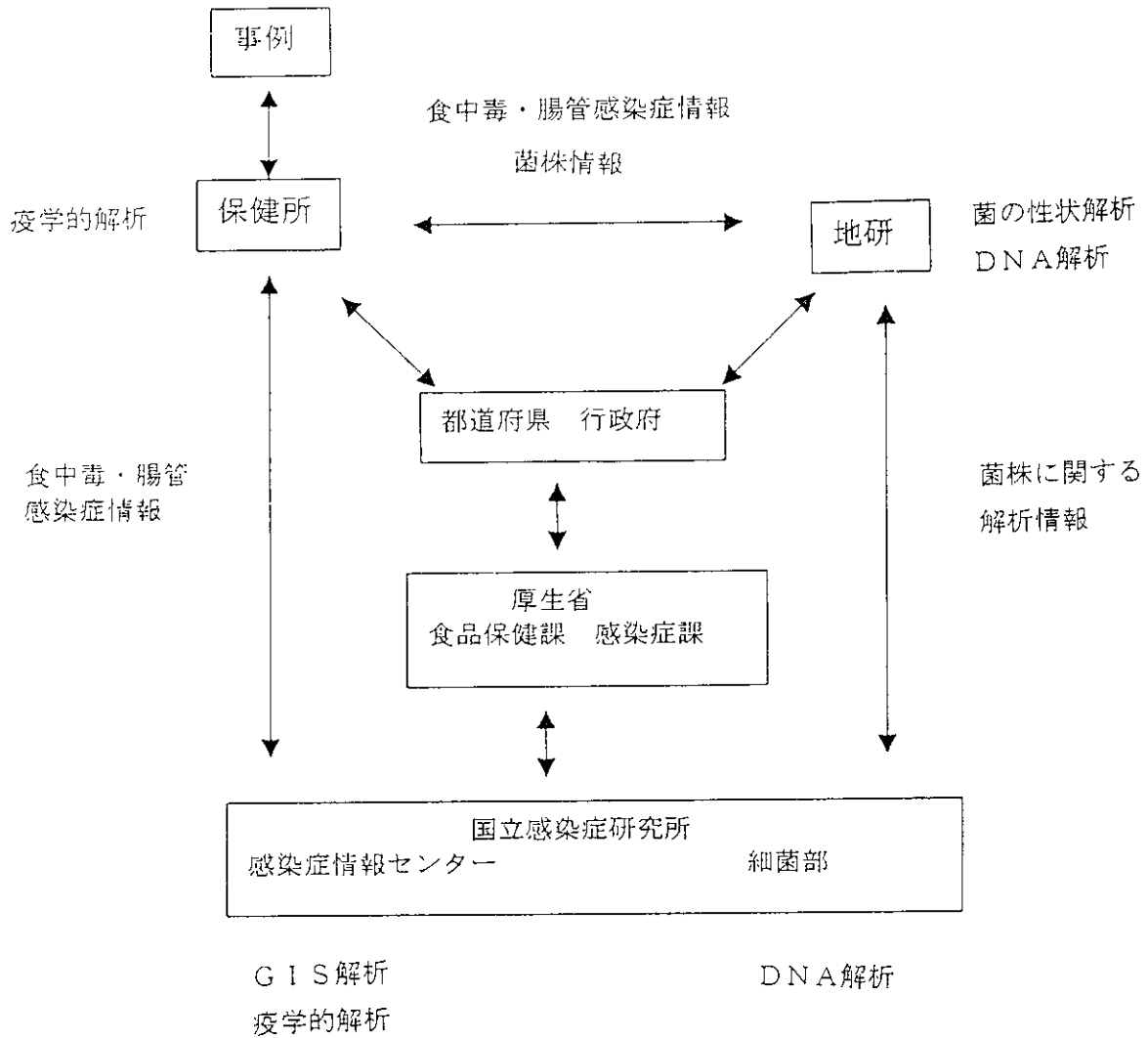


図 2

Food-Info-Net と DNA-Net(or Pulse-Net) の関係による outbreak
および diffuse outbreak の迅速なる検知



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・Pulse Net の評価と既存システムとの連携

分担研究者 大月邦夫 群馬県衛生環境研究所

研究協力者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所

研究要旨

我が国におけるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いた病原菌の型別分類のための情報ネットワーク『パルスネット』構築に向けての検討資料とするために、国立感染症研究所（感染研）において型別分類された腸管出血性大腸菌0157の14株について、感染研及び全国8ヶ所の地方衛生研究所（地衛研）（北海道立衛生研究所、秋田県衛生科学研究所、群馬県衛生環境研究所、愛知県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、広島市衛生研究所、福岡県保健環境研究所、沖縄県衛生環境研究所）でPFGEを実施し、その泳動パターンについて比較検討した。その結果、泳動条件の違い、及び不十分な制限酵素処理によると考えられる原因から泳動パンドの確認がやや困難な場合が1、2の菌株について1、2の地衛研で認められたが、それ以外については感染研とこれら8地衛研で得られたPFGEの泳動パターンは全ての株について一致していた。これらの問題点は菌株の処理条件や泳動条件の統一、及び同一株について感染研と地衛研で同時にPFGEを実施することによって十分解決しうるものと考えられた。また、PFGEの地衛研における整備率は都道府県で100%、指定都市で83%、その他の政令市・特別区で31%であり、地衛研全体としても85%（62/73）であった。

以上のことから、感染研と全国の地衛研が既存のPFGEシステムを基本とした『パルスネット』の構築が可能であることが強く示唆された。

Key words：パルスネット（Pulse Net）、腸管出血性大腸菌（EHEC）、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）

研究協力者、所属（職名）：長野秀樹 北海道立衛生研究所（研究職員）、八柳 潤 秋田県衛生科学研究所（主任）、黒澤 肇 群馬県衛生環境研究所（主任）、松本昌門 愛知県衛生研究所（主任）、小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所（主任研究員）、山岡弘二 広島市衛生研究所（生物科学部長）、堀川和美 福岡県保健環境研究所（専門研究員）、久高 潤 沖縄県衛生環境研究所（研究員）

研究協力者：国立感染症研究所 細菌部

A. 研究目的

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）による細菌の型別分類は、我が国においては国立感染症研究所（感染研）をはじめとして全国の地方衛生研究所（地衛研）の多くで疫学調査の一環として日常業務的に行なわれており、特に腸管出血性大腸菌 0157、赤痢菌、サルモネラ、溶血連鎖球菌

等については現在すでに広く実施されている。そしてこのPFGEによる細菌の型別判定は、これらの病原菌による集団発生の感染源、及び感染ルート

の解明に欠くことができない手段となっている。このような状況から我が国において、0157のPFGEタイプの標準化を行なう必要性が高まり、その検討資料を得るために厚生科学特別研究事業の分担研究として『地方衛生研究所と国立試験研究機関との機能分担・機能連携の在り方に関する研究 1. パルスフィールドゲル電気泳動法による検査法の標準化に関する共同研究』が行なわれた。同研究における感染研と全国3地衛研での結果から、我が国における「腸管出血性大腸菌 0157のPFGE パターンによる型別分類の標準化」の実現の可能性が示唆された。

今回、0157を含めた病原菌のPFGE を用いた型別分類に関する情報のネットワーク（パルスネット）の構築に向けての検討材料とすることを目的

として、感染研においてすでに型別分類された14株の0157を用いて感染研と全国の8地衛研においてPFGEを実施し、同一株の泳動結果の比較検討を行なった。また、全国の地衛研に対してアンケートを送付し、PFGE関連機器の整備状況を調査した。

B. 研究方法

[I] PFGEの実施と泳動図の比較検討

ア) 菌株：感染研においてPFGEタイプIからVIIに型別分類された8組の合計14株の0157を用い、北海道立衛生研究所（北海道衛研）、秋田県衛生科学研究所（秋田衛科研）、群馬県衛生環境研究所（群馬衛環研）、愛知県衛生研究所（愛知衛研）、大阪府立公衆衛生研究所（大阪公衛研）、広島市衛生研究所（広島市衛研）、福岡県保健環境研究所（福岡保環研）、及び沖縄県衛生環境研究所（沖縄衛環研）の全国8地衛研でPFGEを実施した。

ただし、愛知衛研、大阪公衛研、福岡保環研を除く5地衛研においては、検体送付時の手違いからか菌株5, 6は同一株（ともに3地衛研における菌株5と思慮される）を用いたものと考えられた。

イ) 試料DNAの調製：感染研では「腸管出血性大腸菌0157の検出・解析等の技術研修会」（平成9年、国立感染症研究所 細菌部）で示された方法で、8地衛研では以下の方法により実施した。すなわち、愛知衛研と福岡保環研では、それぞれの地衛研で従来から実施している方法と感染研の方法で、大阪公衛研では感染研の方法、群馬衛環研は従来から実施している方法を用いた。また、北海道衛研、広島市衛研、沖縄衛環研ではバイオラド社の GenePath Kitを用い、秋田衛科研では同社の CHEF Bacterial DNA Plug Kitを用いて実施した。なお、それぞれの地衛研における試料DNAの調製法の概略を別紙1から6に示した。

ウ) 制限酵素：8実施機関とも *Xba* I を用いた。ただし、福岡保環研はサンプル当たり10ユニット、愛知衛研は20ユニット、秋田衛科研、群馬衛環研、大阪公衛研、沖縄衛環研は30ユニット、北海道衛研、広島市衛研は50ユニットを使用していた。

エ) 泳動条件：愛知衛研、大阪公衛研、広島市衛研は、感染研の（上記技術研修会で示された）条

件で実施した。その他の5地衛研では、それぞれの施設独自の泳動条件で行なっていた。全施設における泳動条件を下表（表1）に示した。

表 1

北海道衛研	6V/cm、120°、4→50s 22hr、14°C
秋田衛科研	6V/cm、120°、4→8s 11hr、 8→50s 9hr、14°C
群馬衛環研	6V/cm、120°、4→8s 9hr、 8→50s 13hr、14°C
愛知衛研	200V、4→8s 6hr、8→4s 1min、 4→8s 6hr、8→50s 10hr
大阪公衛研	200V、4→8s 6hr、8→4s 1min、 4→8s 6hr、8→50s 10hr
広島市衛研	6V/cm、120°、4→8s 12hr、 8→50s 10hr、14°C
福岡保環研	6V/cm、120°、5→50s 22hr、14°C
沖縄衛環研	6V/cm、120°、4→8s 11hr、 8→50s 10hr、14°C

オ) 機種：感染研・北海道衛研・群馬衛環研：バイオラド社製 CHEF DR III、秋田衛科研：バイオラド社製 CHEF DR II、愛知衛研：ファルマシア社製 LKB2015 Pulsaphor、大阪公衛研：ファルマシア社製 Gene Navigator、広島市衛研・沖縄衛環研：バイオラド社製 Gene Path、福岡保環研：バイオラド社製 Mapper DR III

カ) 泳動パターンの検討：感染研の泳動写真と各地衛研での泳動写真を比較し、同じ菌株が同一の泳動パターンであるか否かを検討した。

[II] PFGEの整備状況調査

地衛研全国協議会加盟の全73地衛研を対象に試験検査機器（PFGE）の整備状況についてアンケート調査を実施した。（アンケート回収率100%）

C. 研究結果

[1] PFGEの実施と泳動図の比較検討

1. 愛知衛研と感染研の泳動結果の比較

(1) 0157の14株について、愛知衛研の方法で試料DNAの調製を行い、愛知衛研の機種 LKB2015 Pulsaphor（ファルマシア社）で泳動させた泳動図と、感染研で感染研の方法でDNAの調製を行い、感染研の機種CHEFDR III（バイオラド社）で泳動

させた泳動図との比較：

図1には感染研で型別分類を行った0157の14株の泳動図を示した。また図2に愛知衛研の方法で得られた14株全株のPFGEの泳動図を示した。菌株1から10 (PFGEタイプI, II, III) の泳動図の特徴につき、感染研からのコメントに基づきグループ毎に比較検討を行なった。

図3には菌株1から3 (PFGEタイプIa, Ib, Ic) の泳動図を示した。コメントには「PFGEタイプIa, Ib, Icの特徴は約70kb付近のバンドの有無、すなわちタイプIa, Ibではそれぞれ約70kb付近のバンドが認められ、タイプIcではバンドが認められない。」とある。当所での泳動図の菌株番号1、2 (タイプIa, Ib) では共に約70kb付近のバンドが認められ (矢印1、2)、菌株3 (タイプIc) ではバンドが認められず、コメントと一致していた。

図4に菌株4から7 (PFGEタイプII) の泳動図を示した。コメントは「菌株4から6 (PFGEタイプIIa, IIb, IIe) の特徴はB領域における2本のバンドの存在で、一般に下のバンドが上よりも明るい。また、菌株4はA領域に3本のバンドが認められ、一番下のバンドがやや太い。菌株5はこのA領域の3本のバンドが菌株4より細い。菌株6は他の菌株に比べてC領域のバンドと矢印3のバンドが接近しているという特徴がある。また菌株7 (PFGEタイプIIj) はB領域にその他の菌株より1本多い3本のバンドが認められる。」である。これらの特徴も感染研からのコメントと全く一致していた。

図5に菌株8から10 (PFGEタイプIII) の泳動図を示した。「このタイプの特徴はD領域における2本のバンドの存在と、上のバンドが下のバンドよりやや明るいことである。菌株8と9 (PFGEタイプIIIa, IIIb) の違いは、E領域が明瞭に2本のバンドに分かれる (菌株8) か、太いバンドと細いバンドになる (菌株9) かである。」これらの特徴も感染研からのコメントと全て一致していた。

さらに、菌株11から14 (PFGEタイプIV, V, VI, VII) の当所での泳動図 (図6) も感染研のもの (図7) と全く一致していた。

(2) 愛知衛研において感染研の方法で試料DNA

の調製を行い、LKB2015 Pulsaphorで泳動させた泳動図と感染研での泳動図との比較：

図8に当所で得られた14株の泳動図を示した。(1) の愛知衛研の方法で試料DNAの調製を行なった場合と比較し (図2) バンドの鮮明さはやや劣るもののPFGEタイプの判別は十分可能で、かつ、感染研の泳動図と泳動パターンは14株全てについて一致していた。バンドの鮮明さの違いは当所が感染研の方法に不慣れであったためと思われる、今後十分に改善可能なものと考えられた。

2. 大阪公衛研と感染研の泳動結果の比較

大阪公衛において感染研の方法で試料DNAの調製を行い、大阪公衛の機種 Gene Navigator (ファルマシア社製) で泳動させた泳動図と、感染研において感染研の方法でDNAの調製を行い、感染研の機種 CHEF DR III (バイオラド社) で泳動させた泳動図との比較：

大阪公衛研で行われた14株の泳動図を図9に示した。大阪公衛研と感染研の泳動パターンを比較したところ、14株の全てについて両者は完全に一致していた。

3. 福岡保環研と感染研の泳動結果の比較

(1) 福岡保環研の方法で試料DNAを調製し、独自の泳動条件下でMapper DR III (バイオラド社) を用いて泳動を行なった泳動図と、感染研での方法・機材 (CHEF DR III、バイオラド社) による泳動図との比較：

福岡保環研独自の方法で得られた泳動図を図10に示した。福岡保環研の泳動条件は感染研に比べ、分子量の小さいバンドより大きいバンドの分離がよい条件であった。そのため、PFGEタイプI (菌株1から3) の特徴である約70kb以下のバンドの有無や、100kb以下に存在するバンドの特徴によってPFGE型の分類がなされるPFGEタイプII (菌株6) 及びPFGEタイプIII (菌株8から10) の判別がやや困難であった。

(2) 福岡保環研において感染研の方法を用いて試料DNAの調製を行い、同上の機材を用いて泳動を行った泳動図と、感染研で得られた泳動図との比較：

感染研の方法でDNAを調製した場合には、100kb以下のバンドも良好に分離され (図11)、感染

研の泳動図との比較も容易であった。この方法による福岡保健研と感染研の泳動パターンを比較したところ、14株の全てについて両者は完全に一致していた。

4. 北海道衛研、秋田衛科研、群馬衛環研、広島市衛研、及び沖縄衛環研と感染研の泳動結果の比較

広島市衛研は感染研と同一の条件で泳動を行っていたが、他の4地衛研はそれぞれ独自の条件で泳動を行っていた(表1)。北海道衛研の条件は分子量の小さなバンドより大きいバンドの分離が良い条件であったために、100kb以下の領域に存在するバンドにより型別分類される菌株2の場合(PFGEタイプI)、その領域に確認される2本のバンドの判別がやや困難であった(図12、矢印)。また、秋田衛科研における条件では、菌株8の485kb付近のバンドが確認できなかった(図13、矢印)。この原因としては、泳動図の上方に制限酵素によって消化されなかったと考えられる大きな分子量の染色体DNAの断片が認められたことから、制限酵素による処理が不十分であったことによるものと考えられた。しかしこれら例外的な場合を除いては、感染研とこれらの5地衛研で得られた泳動図を比較すると、菌株1から10(PFGEタイプIからIII)のそれぞれのタイプの特徴である100kb以下の領域におけるバンドは鮮明に捕らえられており、5地衛研の泳動図を用いて容易にそれぞれの菌株のPFGEタイプの型別分類が行なうことは可能であった。また、菌株11から14の泳動図に関しても、5地衛研で得られた泳動図は感染研で得られたものと一致していた。

[II] PFGEの整備状況

都道府県の地衛研では100%(47/47)、指定都市では83%(10/12)の施設で整備されていたのに対し、政令市・特別区の施設における整備率は31%(5/16)であった。しかしながら、地衛研全体としてみても85%(62/73)、都道府県・指定都市の地衛研をみると97%(57/59)と、そのほとんどの施設で既に整備がなされていた。

E. 結論

我が国におけるPFGEを用いた病原菌の型別分類のための情報ネットワーク『パルスネット』構築に向けての検討資料とするために、感染研及び全国8カ所の地衛研においてPFGEタイプの異なる腸管出血性大腸菌O157の14株について、その泳動パターンを比較検討した。その結果、泳動条件の違い、及び不十分な制限酵素処理によると考えられる原因から泳動バンドの確認がやや困難な場合が極く少例では認められたものの、ほとんどの菌株については感染研と全国8地衛研で得られたPFGEの泳動パターンが一致していた。今回の研究で明かとなった問題点は、菌株の処理条件や泳動条件の統一、及び保存・再送付等における人為的ミスを防止するためにも、同一株については可能な限り感染研と地衛研で同時にPFGEを実施することによって、十分に解決される問題であると考えられた。また、PFGEの整備状況の調査から、全ての都道府県の地衛研で既に整備がなされているだけでなく、指定都市の80%以上の地衛研においても整備されていることが判明した。

以上のことから、感染研と全国の地衛研が既存のPFGEシステムを基本として用いた『パルスネット』構築の可能性は十分に存在することが示唆された。

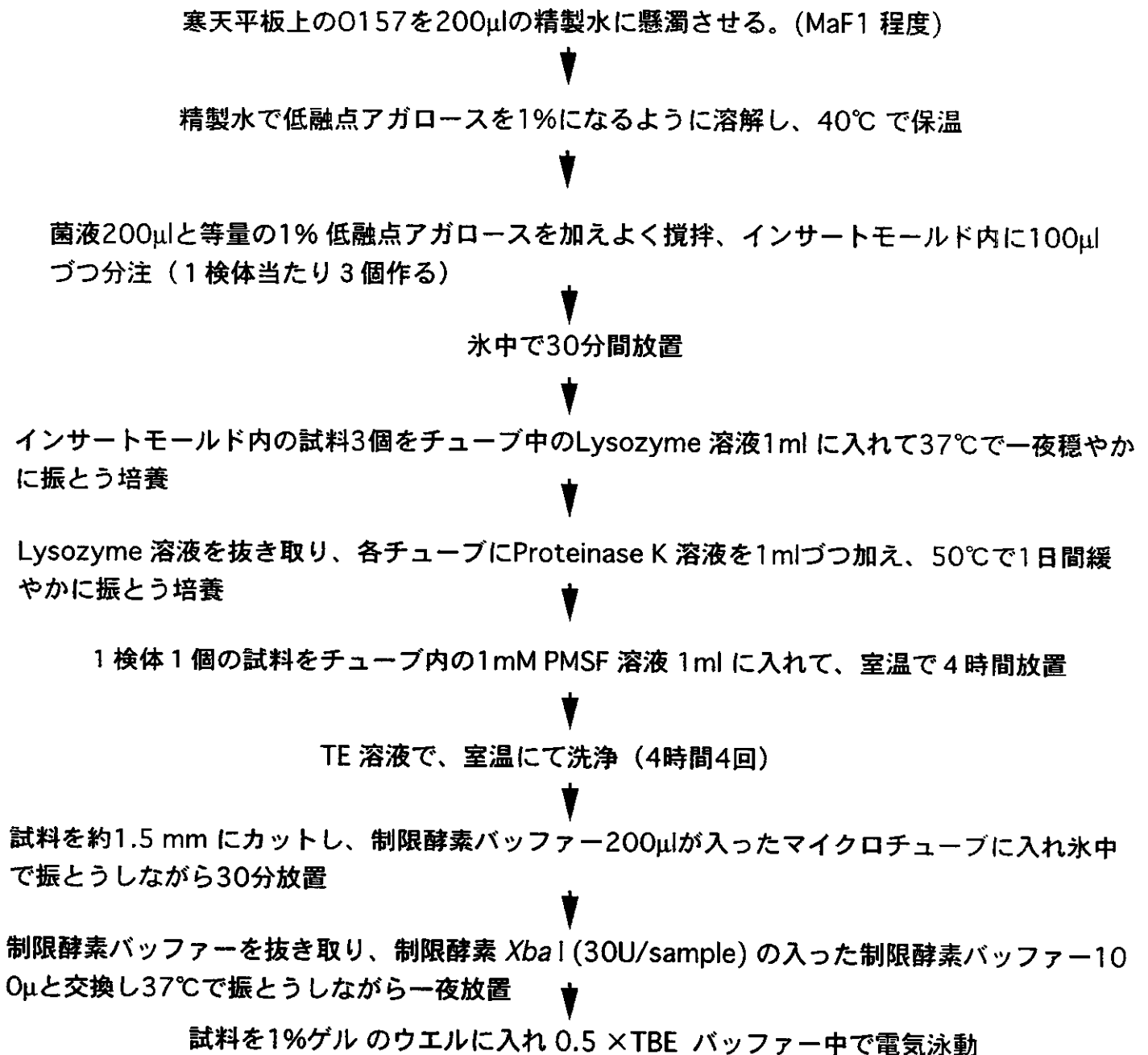
F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。

別紙1 国立感染研の試料DNAの調製



使用試薬

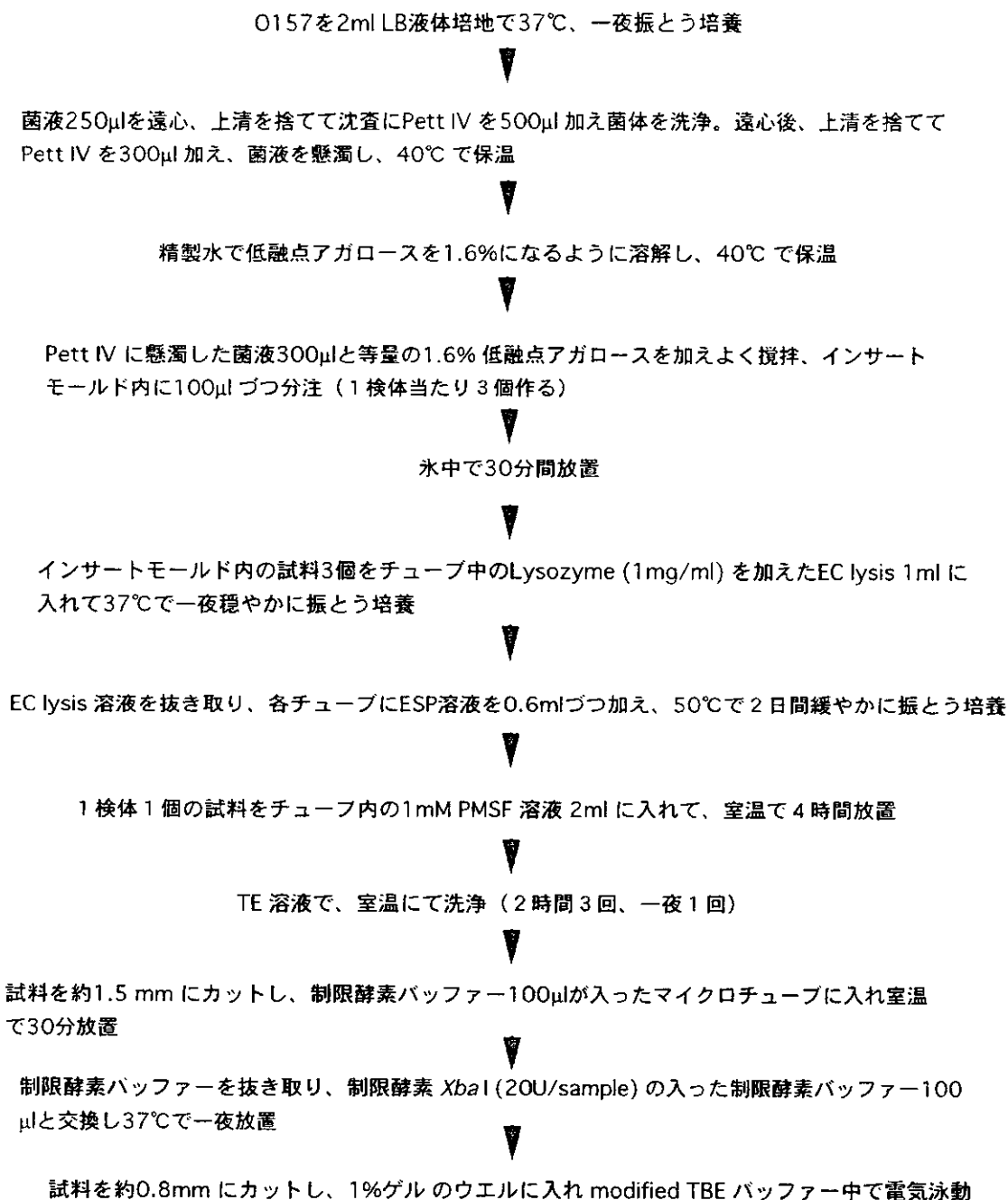
Lysozyme 溶液: 500mM EDTA(pH8.0), Lysozyme (1mg/ml)

Proteinase K 溶液: 500mM EDTA(pH8.0), 1% N-Lauroyl Sarcosine, Proteinase K (1mg/ml)

1mMPMSF 溶液: 1mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride in TE 溶液

0.5 × TBEバッファー: 50mM Tris Base, 50mM ホウ酸、1mMEDTA

別紙2 愛知衛研の試料DNAの調製



使用試薬

Pett IV溶液: 10mM Tris-HCl (pH7.6), 1M NaCl

EC Lysis: 6mM Tris-HCl (pH7.6), 1M NaCl, 100mM EDTA(pH7.5),
0.5% Brij 58, 0.2% Deoxycholate, 0.5% N-Lauroyl Sarcosine

ESP溶液: 0.5M EDTA(pH9.0-9.5), 1% N-Lauroyl Sarcosine, Proteinase K (1mg/ml)

1mMPMSF 溶液: 1mM Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride in TE 溶液

modified TBEバッファー: 100mM Tris Base, 100mM ホウ酸、0.2mMEDTA