

別紙 3 大阪公衛研の試料DNAの調製

寒天平板上のO157を200 μ lの精製水に懸濁させる。(MaF1 程度)



精製水で低融点アガロースを1%になるように溶解し、40 $^{\circ}$ C で保温



菌液200 μ lと等量の1% 低融点アガロースを加えよく攪拌、インサートモールド内に70 μ l
づつ分注（1 検体当たり4個作る）



氷中で1 時間放置



インサートモールド内の試料4個をチューブ中のLysozyme 溶液1ml に入れて37 $^{\circ}$ C で4 時間穏やかに振とう培養



Lysozyme 溶液を抜き取り、各チューブにProteinase K 溶液を1mlづつ加え、50 $^{\circ}$ C で1日間緩やかに振とう培養



1 検体 1 個の試料ゲルを半分にカットしてチューブ内の4mM Pefabloc SC を含むTE溶液 50
0 μ l に入れて50 $^{\circ}$ C で30分 2 回振とうして放置



溶液をTE 溶液1mlにかえて、氷中にて30分振とうして放置



試料を制限酵素バッファー200 μ lが入ったマイクロチューブに入れ氷中で振とうしながら30分
放置



制限酵素バッファーを抜き取り、制限酵素 XbaI (30U/sample) の入った制限酵素バッファー10
0 μ と交換し37 $^{\circ}$ C で振とうしながら一夜放置



試料を1%ゲルのウエルに入れ 0.5 \times TBE バッファー中で電気泳動

別紙 4 福岡保環研の試料DNAの調製

O157をトリプトソイブイオン培地で37℃、5時間振とう培養 (MaF1 程度)



菌液を遠心、上清を捨てて沈査にPett IV を 加え菌体を 2 回洗浄。遠心後、上清を捨ててPett IV を200 μ l 加え、菌液を懸濁する



精製水でクロモゾーマルアガーを1%になるように溶解し、70℃ で保温



菌液200 μ lと等量の1% クロモゾーマルアガーを加えよく攪拌、インサートモールド内に70-80 μ l ずつ分注 (1 検体当たり2個作る)



氷中で1時間放置



インサートモールド内の試料2個をチューブ中のLysis buffer 1ml に入れて50℃で一夜穏やかに振とう培養



1 検体 1 個の試料をチューブ内の1mM PMSF 溶液 1ml に入れて、室温で4時間放置



TE 溶液で、室温にて洗浄 (4時間4回)



試料ゲル1/4をマイクロチューブ内の制限酵素 *Xba*I (10U/sample) の入った制限酵素バッファ-100 μ l に入れ37℃で一夜放置



試料を1%ゲルのウエルに入れ 0.5 \times TBE バッファー中で電気泳動

使用試薬

Lysis Buffer: 5mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM EDTA(pH8.0), 1% N-Lauroyl Sarcosine, Proteinase K (1mg/ml)

別紙5 群馬衛環研の試料DNAの調製

寒天平板上のO157を200 μ lのMQ水に懸濁させる。(MaF1 程度)



MQ水で低融点アガロースを1%になるように溶解し、50 $^{\circ}$ Cで保温



菌液200 μ lと等量の1% 低融点アガロースを加えよく攪拌、プラグモールド内に約70 μ l づつ分注 (1 検体当たり 3 個作る)



氷中で30分間放置



プラグモールド内の試料3個をチューブ中のLysozyme 溶液1ml に入れて37 $^{\circ}$ Cで4時間穏やかに振とう培養



Lysozyme 溶液を抜き取り、各チューブにProteinase K 溶液を1mlづつ加え、50 $^{\circ}$ Cで1日間緩やかに振とう培養



1 検体 1 個の試料をチューブ内の1mM Pefabloc SC 溶液 1mlに入れて50 $^{\circ}$ Cで30分 2 回振とうして放置



溶液をTE 溶液1mlにかえて、氷中にて30分振とうして放置



試料を制限酵素バッファー500 μ lが入ったマイクロチューブに入れ氷中で振とうしながら30分 放置



制限酵素バッファーを抜き取り、制限酵素 *Xba*I (30U/sample) の入った制限酵素バッファー400 μ と交換し37 $^{\circ}$ Cで振とうしながら一夜放置



試料を1%ゲルのウェルに入れ 0.5 \times TBE バッファー中で電気泳動

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)

1mM Pefabloc SC: 1mM Pefabloc SC in TE(pH8.0)

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

別紙6 GenePath Kit による試料DNAの調製

O157をLB培地で37℃、一夜振とう培養。



菌液70~200μlを遠心、上清を捨てて沈査に精製水，またはWash buffer を加え菌体を1回洗浄。遠心後、上清を捨ててCell suspension buffer を150μl 加え、菌液を懸濁する



1.2% Embedding Agaroseを溶解し、50℃ で保温



菌液150μlと等量の1.2% Embedding Agaroseを加えよく攪拌、インサートモールド内に70-100μl ずつ分注（1 検体当たり2個作る）



氷中で1時間放置



インサートモールド内の試料2個をチューブに入れ，Lysis buffer 500μl，及びLysozyme(25 mg/ml)20μlを加えて37℃で2~18時間穏やかに振とう培養



Lysozyme 溶液を抜き取り、各チューブにWash buffer 1ml加え，試料をよく洗浄する。Wash bufferを抜き取り、Proteinase K buffer 500μl，及びProteinase K(>600U/ml)20μlを加え、50~55℃で1日間緩やかに振とう培養



PMSF， Pefabloc SC処理またはWash bufferによる洗浄によってProteinase Kを不活化する。

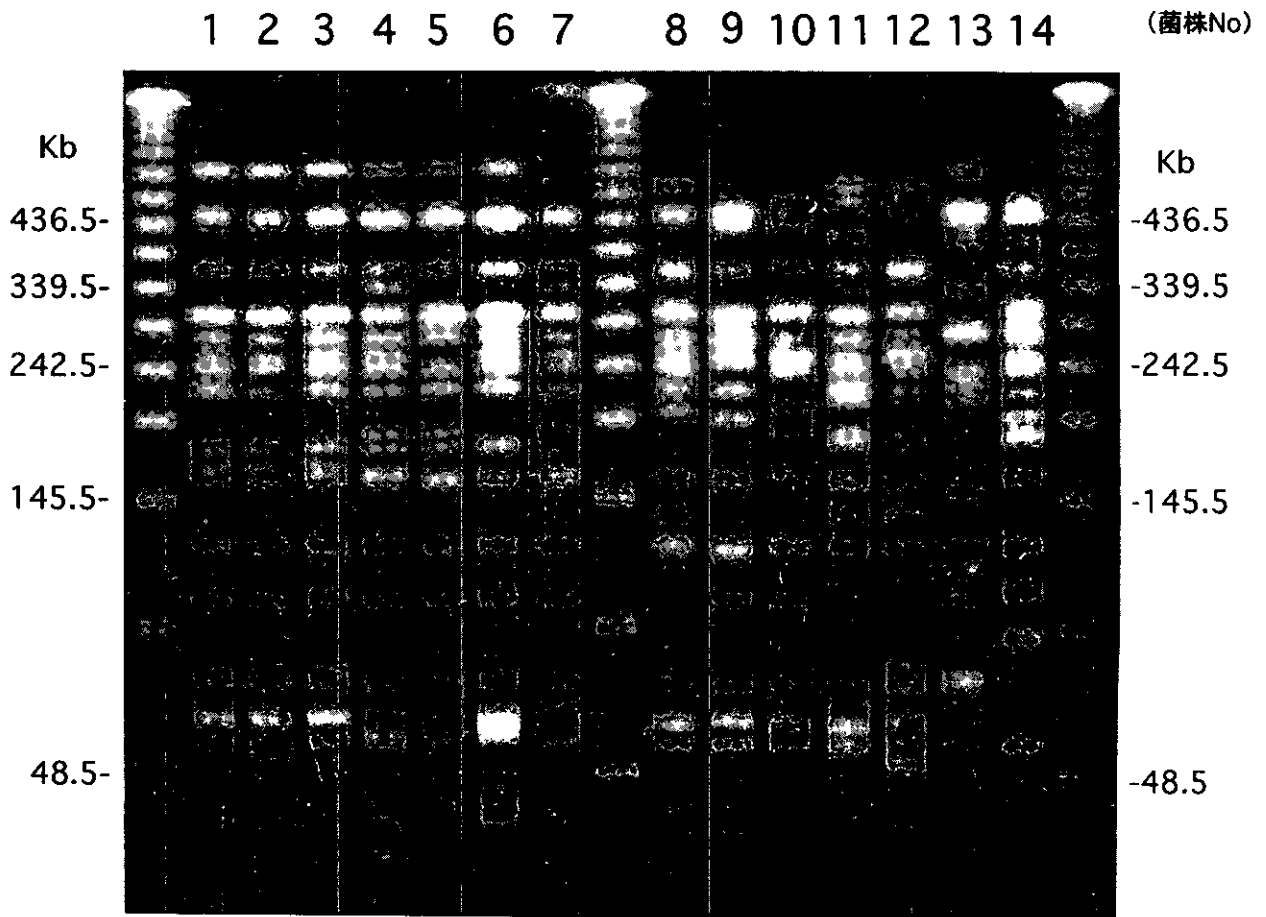


制限酵素 *Xba*I によって染色体DNAを切断



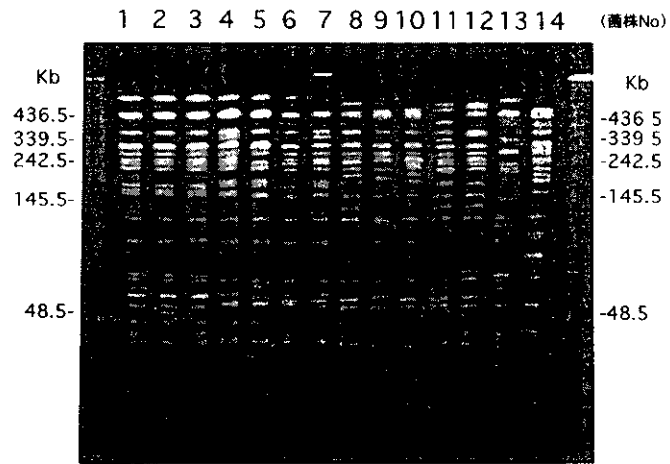
電気泳動

图 1



感染研

図2



愛知衛研

図3

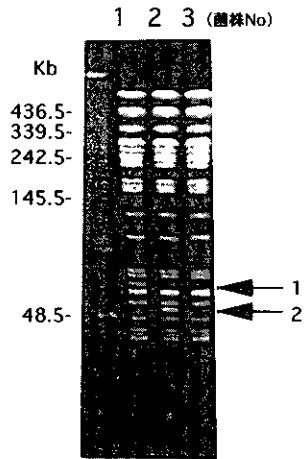


図4

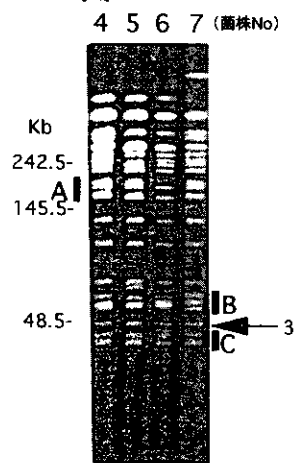


図5

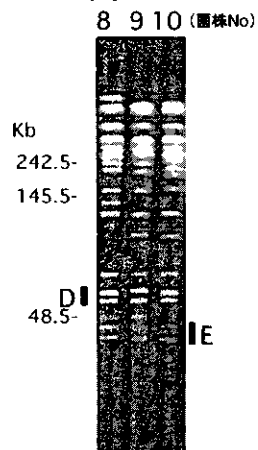


図6

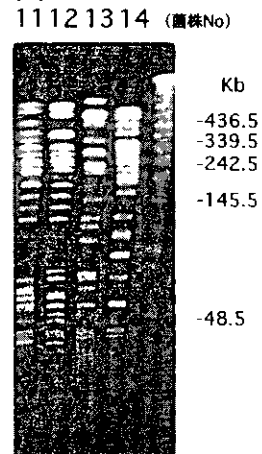


図7

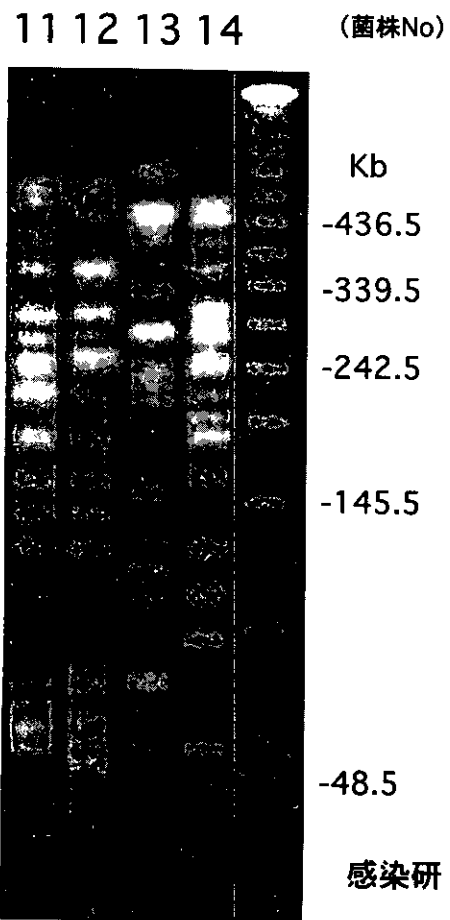


図8

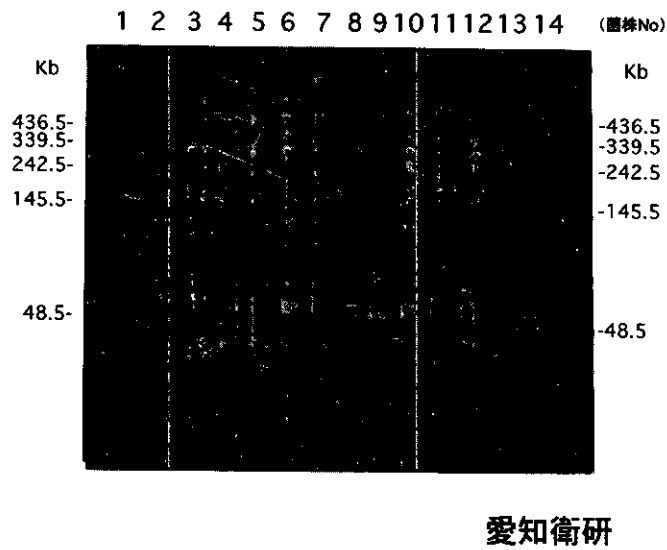
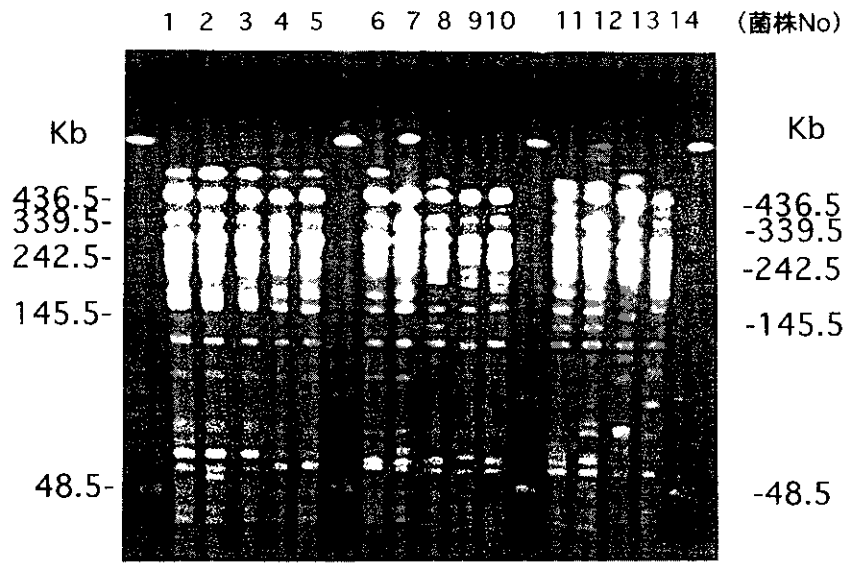
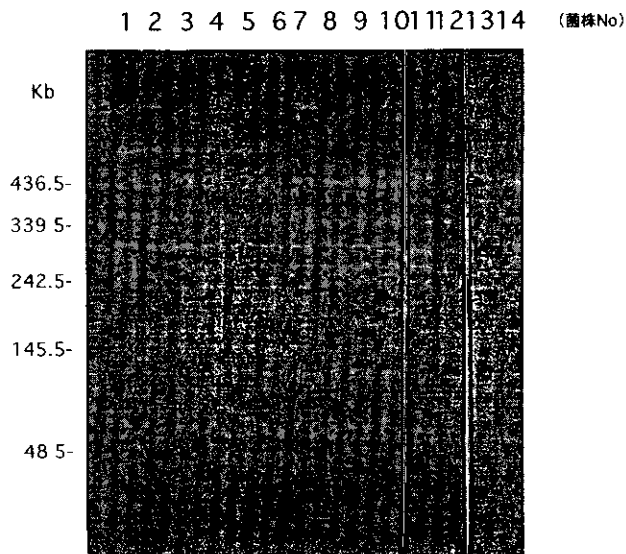


図9



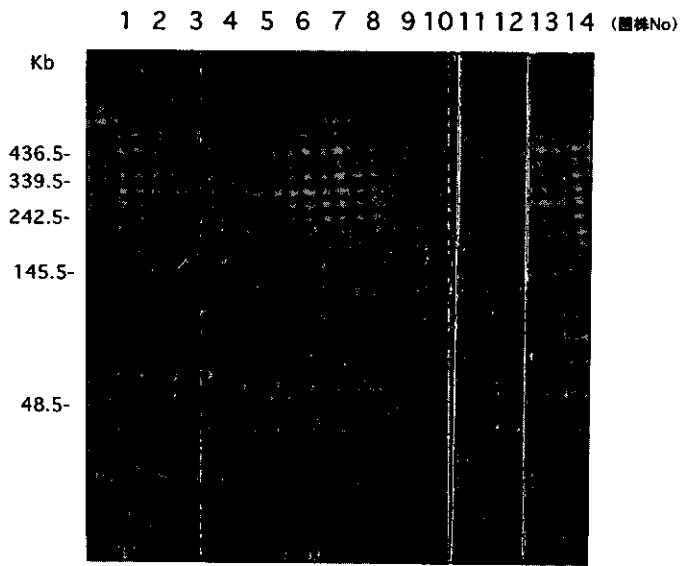
大阪公衛研

図10



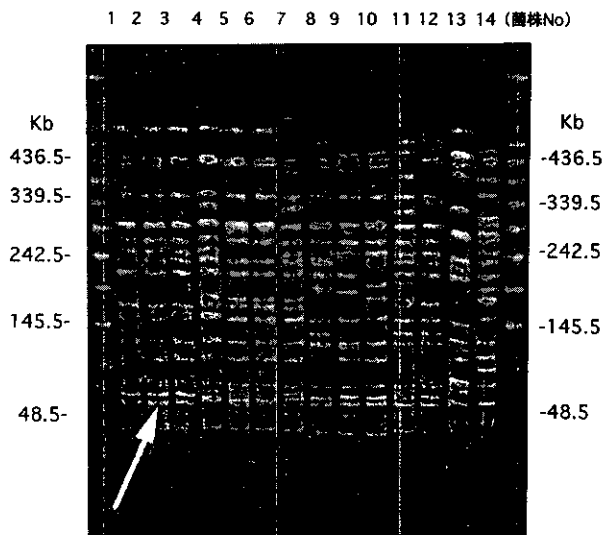
福岡保環研

図11



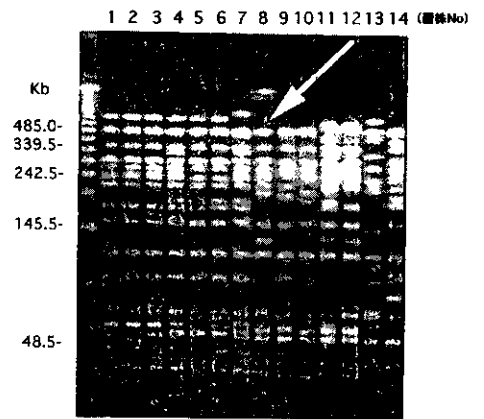
福岡保環研

図12



北海道衛研

図13



秋田衛科研

厚生科学研究費補助金（厚生省新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

腸管出血性大腸菌及び赤痢菌の解析条件の標準化

分担研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌部

研究要旨：O157:H7 を主体とした腸管出血性大腸菌に対して PFGE による解析を行い、その結果の解釈を標準化するために、Bio-Rad 社のイメージ解析ソフトである Molecular analyst を使用した。その結果、現在までの目視による分類基準とほぼ合致する cluster が形成された。特に、1998 年の 5 月及び 6 月に分離された 421 株の O157:H7 の菌株のなかで、同時期に発生したイクラによる散発例が 1 グループを形成することが明らかになった。しかしながら、このような疫学情報からグループ化し得る事例でも画像のデータとして入力する際には相当な補正が必要であった。単独の研究室の結果でも高度の補正を必要とすることから、多数の研究室間でのデータを標準化するためには PFGE の結果に対して、厳密な精度管理を行う重要性が再確認された。また、機動的なネットワークを構築する上で、画像だけの情報のやり取りではなくて、疫学情報等を含めたデータの交換が可能であるシステムの構築が必要であると考えられた。

研究目的：現行の腸管出血性大腸菌の PFGE による解析は、目視によるパターン認識に基づいてその型別の判定を行っている。より迅速な情報の収集および対応を実現するためには、各地方衛生研究所等からなるオンラインのネットワークを構築することが重要であると考えられる。そのためには、腸管出血性大腸菌および赤痢菌に対して行うパルスフィールド電気泳動法による遺伝子解析条件の標準化が必要であると同時に、その解析結果の解釈方法あるいは基準の標準化も行うことが必要となる。本分担研究では、1998 年に分離された腸管出血性大腸菌および集団発生由来の赤痢菌を用いて、PFGE の解析結果を解釈する標準的な基準を設定

することを目的とする。具体的には、現行の型別結果と画像解析ソフトを用いた cluster analysis の解析結果の比較を行い、解析結果の互換性を保持する上で必要な解析条件の最適化を検討する。

研究方法：1998 年に分離された腸管出血性大腸菌と集団発生事例由来の赤痢菌に対して、CHEF DR III system (Bio-Rad 社製)を用いて PFGE を行った。腸管出血性大腸菌に対する PFGE の解析には、主として O157:H7/H-を用いたが O26 の解析結果も合わせて検討した。PFGE の泳動条件は腸管出血性大腸菌については、電圧 6 V/cm、パルスタイム 4 sec - 8 sec、13 時間、パルスタイム 8 sec - 50 sec、9 時間の

2段階のプログラムを組み合わせ、循環させる泳動 buffer(0.5xTBE)の温度は 12°Cに設定した。赤痢菌の場合には、パルスタイムを 5 sec – 50 sec、21 時間の条件で、電圧、泳動 buffer の温度は同じ条件を用いた。制限酵素としては、どちらの場合も Xba I を用いた。PFGE の結果は、電気泳動像の写真をスキャナーにより読み込んでデジタル化した後、画像の解析ソフトとして Molecular analyst (Bio-Rad 社製) を用いて cluster analysis を行い dendrogram を作成した。

研究結果：集団事例由来の腸管出血性大腸菌 O157 および赤痢菌ともに設定した泳動条件で良好な結果が得られた(図 1)。1998 年に分離された腸管出血性大腸菌のうち、5 月から 6 月に発生した事例由来株、421 株について、目視によるパターンの分類と Bio-Rad 社のイメージ解析ソフトである Molecular analyst を使用した cluster analysis を行い、両者の結果を比較した。泳動条件としては常時同一条件を使用したにもかかわらず、季節の変動等による温度変化などによりゲル上の DNA 断片の移動度に差が生じた。また、異なる機種(CHEF DR II, Bio-Rad 社； Navigator, Pharmacia)を用いた場合には、同一条件の設定においても PFGE パターンに微少な相違が生じた。これらの相違は目視による型別では問題とならなかったが、Molecular analyst による dendrogram 作成時には補正の困難な場合もあった。上記の 421 株の解析結果においては、全般的

には目視によるパターンの型別と Molecular analyst による解析結果はよく一致するものであった(図 2)。1998 年に分離されたその他の血清型の腸管出血性大腸菌として、O157 に次いで報告数の多い O26 についても PFGE による解析を行った。O157 以外の血清型の分離菌では、O26 をはじめとして PFGE の解像度がやや不鮮明となる場合があった。O26 の分離株、240 株についての解析結果から、dendrogram 上では約 10 グループに大別できたが、それぞれの分離菌は同一事例由来で同一パターンと見られるものでも dendrogram 上では同一位置に重なる場合がほとんどなかった(図 3)。すなわち、O26 についても、近縁ではあるが同一ではない多数の遺伝子型の菌が分離されていることが示唆された。Molecular analyst を用いる解析では PFGE の結果であ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なものとなった。また、個々の PFGE のデータを補正するためにもそれぞれの分離菌の関連を示唆するような疫学情報が極めて重要であった。赤痢菌については、事例数も少なく多様性による dendrogram を作成する際の補正が必要となるか否かについては検討できなかった。Dendrogram の作成による解析から、1998 年に発生したイクラによる散发例由来株は、5 月 6 月に分離された 421 株の O157:H7 の菌株のなかで 1 グループを形成した。しかしながら、このような疫学情報からグループ化し得る事例でも画像

のデータとして入力する際には相当な補正が必要であった。

考察：PFGEの結果である画像の品質が高いものであれば、その情報をデジタル化して画像解析を行うことができる。さらに、その結果はオンライン化されたネットワークを利用して複数の機関で共有することが可能である。したがって、高品質の画像を得るためのPFGE解析技術の統一性と安定性が重要な要素となる。腸管出血性大腸菌に関しては、O157以外の血清型の分離菌では、O26をはじめとしてPFGEの解像度がやや不鮮明となる場合があったことから、すべての腸管出血性大腸菌に対して同一泳動条件によるPFGEを適用することが困難な場合が存在するかもしれない。しかしながら、画像処理の際に補正を実施することが、複数の泳動条件を設定せずに済む現実的な対応であると考えられる。

以上から、単独の研究室におけるPFGEの結果でも高度の補正を必要とすることから、多数の研究室間でのデータを標準化するためにはPFGEの結果に対して、厳密な精度管理を行う重要性が再確認された。また、画像処理の際に必要な補正を行う上で、PFGEの結果だけでなく分離菌に関する様々な疫学情報が非常に重要であると考えられた。したがって、機動的なネットワークを構築するためにも画像だけの情報のやり取りではなくて、疫学情報等を含めたデータの交換が可能で

あるシステムの構築が必要であると考えられた。

現在までに蓄積されたO157のPFGEによる解析結果から、遺伝子型で分類すると非常に多様性に富む分離菌株が存在していることが明らかになった。したがって、今後検出される分離菌株の遺伝子型についても新しい型が次々と出現することが予想され、同一の遺伝子型と考えられる分離菌株の検出自体がdiffuse outbreak等の集団発生の存在を示唆するものとなることが十分考えられる。このような場合には、疫学的な情報に基づく異常発生の探知がPFGEの解析結果などよりも先行し得る。オンライン化された情報ネットワークがより効率よく稼動するためにも、PFGEの解析結果にとどまらない疫学情報も含めた情報交換が必要であろう。

結論：オンラインによる画像のデータを交換する上で、データ自体の精度が厳密に管理されている必要性が示唆された。また、データ構築を補強する意味でも疫学情報等を含めた総合的な情報交換を可能にする必要性が示唆された。

研究発表

1. 論文発表：

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in Japan (1999) J. Terajima, H. Izumiya, A. Wada, K. Tamura, and H. Watanabe. Emer. Infect. Dis. 5, 301–302
Detection of a multi-prefectural *E. coli*

O157:H7 outbreak caused by contaminated ikura-sushi ingestion (1999) J. Terajima, H. Izumiya, S. Iyoda, K. Tamura, and H. Watanabe. Jpn. J.of Infect. Dis. 52, 52 - 53

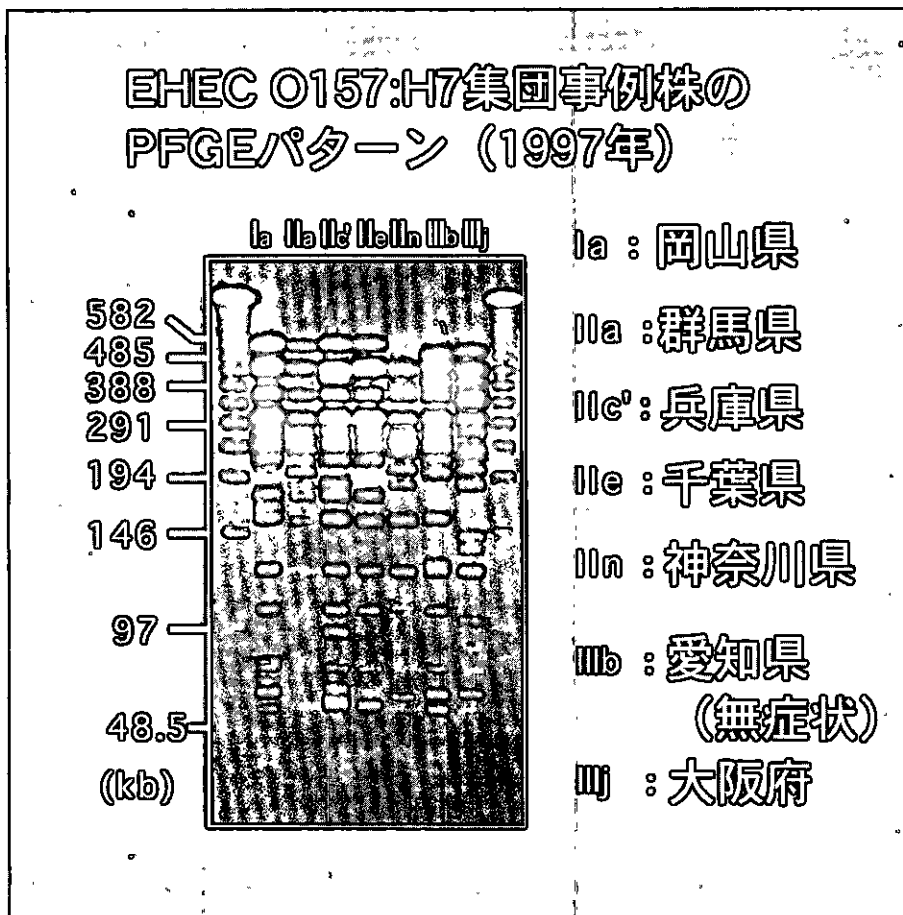
2. 学会発表 :

1997 年における腸管出血性大腸菌 O157:H7 のパルスフィールド電気泳動法による動向調査、(1998) 第 71 回日本細

菌学会総会

O157:H7 を中心とした EHEC の最近の動向、(1998) 第 3 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム

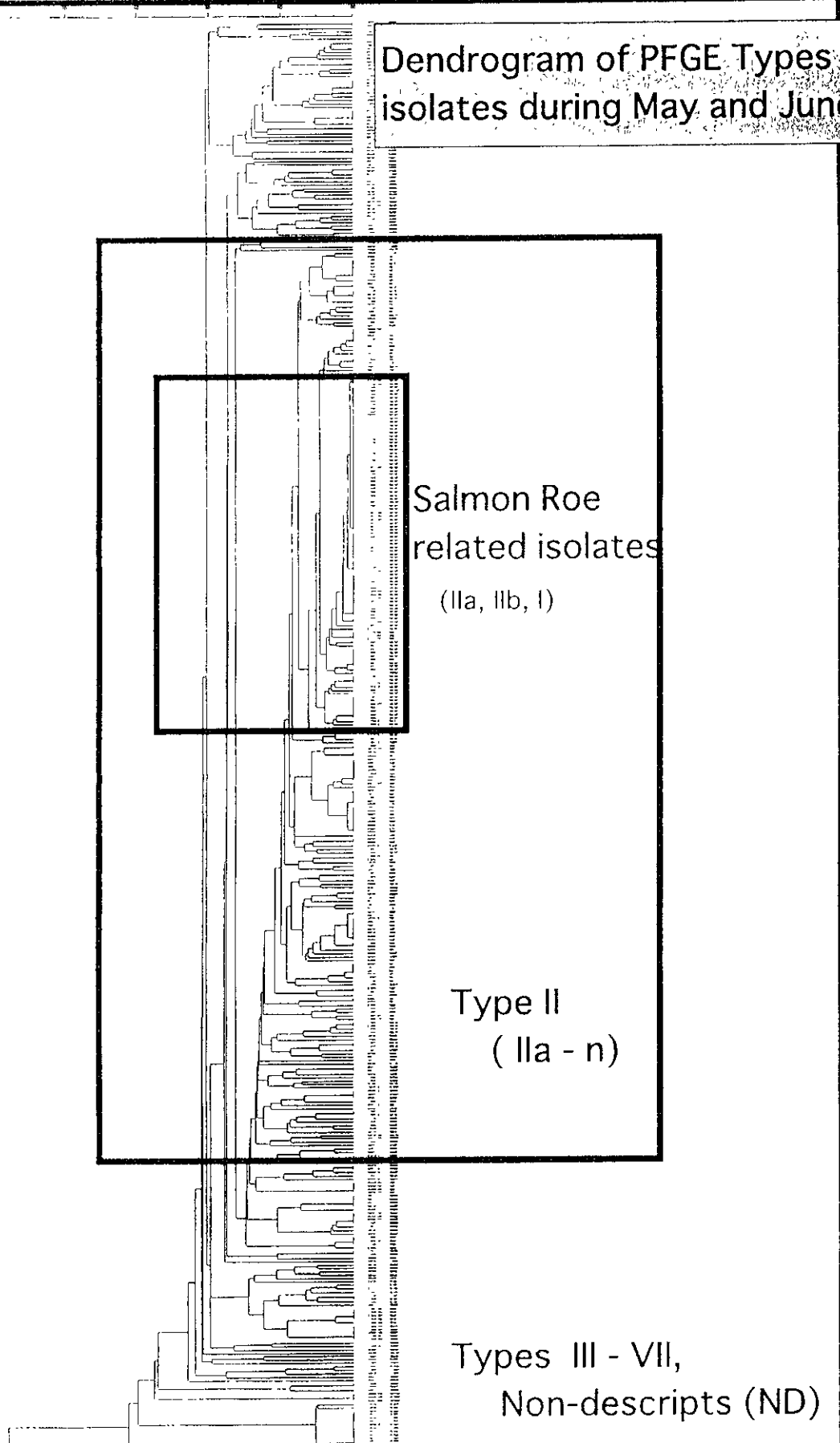
Molecular epidemiological analysis of Escherichia coli O157:H7 isolates in Japan from 1997 to 1998, (1998) 34th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel



(図 1)

Dendrogram of PFGE Types of EHEC O157 isolates during May and June in 1998

(図 2)



The dendrogram shows the genetic relationships between various EHEC O157 isolates. It is a vertical tree structure where the horizontal lines represent the genetic distance between isolates. The tree is divided into several major clusters. The top cluster is labeled 'Salmon Roe related isolates (IIa, IIb, I)'. Below this is a larger cluster labeled 'Type II (IIa - n)'. The bottom cluster is labeled 'Types III - VII, Non-descriptors (ND)'. The x-axis at the bottom is labeled 'Degradation'.

Salmon Roe
related isolates
(IIa, IIb, I)

Type II
(IIa - n)

Types III - VII,
Non-descriptors (ND)

Degradation



(图 3)

腸炎ビブリオの解析条件の標準化

分担研究者 山井志朗 神奈川県衛生研究所細菌病理部長

研究要旨 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) 染色体 DNA のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による制限酵素切断パターンを解析した。供試した 86 株の *V. parahaemolyticus* 血清型 O3:K6 は *Sfi*I 切断パターンによって 27 型に、また、*Not*I 切断パターンにより 28 型に分類された。両酵素の切断パターンは互いにほぼ相関したが、一方の制限酵素で同一のパターンに属する菌株が他方では異なるパターンを示す場合があった。その結果、両成績の組み合わせによって 38 型に分類された。以上の成績から、*V. parahaemolyticus* の PFGE による解析には、*Sfi*I 及び *Not*I の併用によって可能と思われた。しかしながら、軽微なバンドパターンの差異の解釈及び O3:K6 以外の血清型についてはさらなる検討が必要と思われた。

研究目的

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は、我が国における主要な細菌性食中毒の原因菌であり、その発見以降、本菌感染症の発生事例が後を絶たない。おもな感染経路は本菌に汚染された海産物の喫食と考えられている。本菌は、海中に棲息し、夏期に海水温度が上昇すると増殖し、魚介類の汚染が起こるとされている。物流が発達した現在、仮に病原菌に汚染された食品が市場に流通した場合、広域の発生、いわゆる Diffuse Outbreak を引き起こす可能性がある。このとき、汚染源、原因菌及び感染経路を特定するには、患者や環境等から分離された複数の菌株について詳細な性状を検査し、型別を行う必要がある。それら由来が異なる菌株の型別の結果を比較することで分離菌株間の異同が明らかとなり、初めて、汚染源、原因菌及び感染経路の特定が可能となる。近年、同一菌種内或いは同一血清型内における分子遺伝学的多形性に着目し、これに基づいて菌株間の異同を判定

しようとする方法として、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による DNA パターンの比較が行われている。

米国 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) では、PulseNet と称し、CDC と地方衛生研究所に相当する機関とを繋ぐコンピューターネットワークを構築し、送信された分離菌株の PFGE パターンのデータベース化と各機関への還元を行っている。これによれば、菌株を CDC に送付することなく PFGE パターンを CDC に集積することとなるので、菌株の分離から PFGE パターン解析に要する時間が短縮され、疫学調査の初動態勢が迅速になるものと思われる。そこで、全国各地で分離された菌株の PFGE パターンを比較するには、泳動方法及びパターン解析法の標準化が必須である。本研究の目的は、*V. parahaemolyticus* 分離株の PFGE 法による DNA パターン解析に基づく型別法を検討することである。昨今、本菌感染症患者から分離された血清型の多くは O3:K6 であ

り、またその発生は日本国各地で知られている。このような現況で DNA 型別を行うにあたっては、同一血清型内におけるサブタイピングが可能であってこそ、その真価が発揮されよう。そこで本研究では、おもに血清型 O3:K6 について検討を行った。

研究方法

使用菌株：*V. parahaemolyticus* O3:K6 は、1981 年から 1998 年に日本国並びに A 国、B 国、C 国及び D 国で分離された患者、食品及び環境由来の 86 株を用いた。このうち 55 株は川崎市衛生研究所より、また、18 株は国立感染症研究所より分与された。O3:K6 以外の血清型として、A 国の下痢症患者から分離された O4:K8、O6:K46、O8:K41 及び O3:K48 並びに E 国の下痢症患者から分離された O4:K68 のそれぞれ 1 株ずつが国立感染症研究所より分与された。ゲルプラグの作製：1%NaCl を含むハートインフュージョン寒天平板培地にて、37℃、一晚培養した菌体を、10 mM Tris-HCl (pH7.2), 20 mM NaCl, 100 mM EDTA に懸濁し、マクファーランド 4 に調製した。40 µL の菌液に、予め溶解後 50℃ に保温した 1.4% 低融点アガロースを等量混合してプラグモールドに固化しゲルプラグとした。

溶菌：各プラグは、24 穴マイクロプレートのウェルに入れ、各ウェルに 2 mg/ml lysozyme を溶解した 6 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0.5% Brij58, 0.2% deoxycholate, 0.5% sodium lauroyl sarcosine を 1 mL ずつ分注した。37℃ 3 時間インキュベートした後ウェル内の溶液を除去し、0.2 mg/ml proteinase K を溶解した 0.5 M EDTA (pH 9.0), 25 mM EGTA, 1% sodium lauroyl sarcosine を 1 mL ずつ分注した。56℃ にて一晚後、ウェル内の溶液を除去し、1 mM

phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を含む TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 1 mM EDTA) を 1 mL ずつ加え 1 時間室温にてインキュベートした。この過程をもう一度繰り返した。再びウェル内の溶液を除去し、PMSF を含まない TE 溶液を 1 mL ずつ加え 1 時間室温にてインキュベートした。この過程をもう一度繰り返し、ゲルプラグの使用時まで 4℃ にて保存した。

制限酵素処理：制限酵素処理には *Sfi*I 及び *Not*I を用いた。プラグを滅菌スパーテルで 4 分割し、予め 600 µL の TE 溶液を入れた 1.5 mL マイクロチューブに移し、その後 TE 溶液を除去した。制限酵素を除く 2 倍濃度の制限酵素反応用緩衝液を 50 µL 入れ、室温で 10 分間インキュベートした (Lin et al, J Bacteriol, 174:1662, 1992)。チューブ内の溶液を完全に除去し、20 単位の制限酵素を含む 1 倍濃度の制限酵素用緩衝液を 50 µL 入れた。*Sfi*I 処理を行うチューブにはミネラルオイルを 50 µL 重層した。*Sfi*I 処理は 50℃、*Not*I 処理は 37℃ にて一晚行った。

PFGE：電気泳動は、CHEF Mapper により、泳動用緩衝液として 0.5 × TBE (1 × TBE 90 mM Tris, 90 mM ホウ酸, 2 mM EDTA) を用いて 1%アガロースゲルを作製し、14℃、6.0V/cm 定電圧にて 20 時間行った。スイッチングタイムは 0.5 から 63 秒まで直線的にランピングさせた。泳動後のゲルは臭化エチジウム染色し、紫外線下で観察した。

tdh 遺伝子並びに *trh1* 及び *trh2* 遺伝子・腸炎ビブリオ検出用 Primer Set (宝酒造) を用いて PCR 法によって検出した。

ウレアーゼ試験：Kaysner ら (Appl Environ Microbiol, 60:3020, 1994) によって行った。Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 解析：Okuda ら (J Clin Microbiol, 35:1965, 1997) の方法により行った。

薬剤感受性試験：O3 K6 分離株に関し、ampicillin (ABPC)、chloramphenicol (CP)、kanamycin (KM)、tetracycline (TC)、streptomycin (SM)、sulfamethoxazole/trimethoprim 合剤 (ST)、ofloxacin (OFLX) 及び 2,4-diamino-6,7-dihydroxypteridin (O/129, 150 μ g) についてディスク法にて行った。

研究結果

血清型 O3 K6 株の *Sfi*I 切断パターン：血清型 O3 K6 の 86 株のうち 85 株について、*Sfi*I 切断パターンでは約 20 ~ 800kb に、15 ~ 20 本のバンドが観察され、菌株間の比較が可能であった。ただし、300kb 付近には broad なバンドを認めた。1 株についてはバンドパターンが得られずスメア状になった。図 1 のレーン 1 ~ 7 に示した *Sfi*I 切断パターンに対し、それぞれ SA ~ SG の暫定名を与えた。タイプ SA、SC 及び SF に属する菌株についてはバンド 1 本以上の差異によって細分類し、アラビア数字を添えて表現した。たとえば、タイプ SA に属する菌株は、もっとも多くの株に観察されたパターン (SA1) と比較して 2 ~ 5 本のバンドの差異が観察され、計 16 パターンに分類された。タイプ SC 及び SF に属する菌株は、それぞれ、6 及び 2 パターンに分類された (図 3)。

血清型 O3 K6 株の *Not*I 切断パターン：*Not*I 切断パターンは、約 20 ~ 800kb に 18 ~ 20 本の DNA バンドを認め、菌株間の比較が可能であった。ただし、900kb 以上に分子量を特定できない 1 本のバンドが観察された菌株を認めた。*Sfi*I 切断パターンのタイプ分けと同様に、9 つの暫定タイプ (NA ~ NI) に大別した (図 2)。タイプ NA、NB、NC 及び NF に属する菌株についてはバンド 1 本以上の差異によって細分類し、アラビア数字を添えて表現した (図 4)。

*Sfi*I 切断パターンと *Not*I 切断パターンの比較：細分類の結果、*Sfi*I 切断パターンによって 27 に、*Not*I 切断パターンによって 28 に型別された。両パターンは互いにほぼ相関したが、一方の制限酵素パターンにおいて 1 つの型に属する菌株が他方により区別される場合があり、両制限酵素パターンの組み合わせにより 38 型に分類された (表 1)。

PFGE パターンと *tdh* 及び *trh* 遺伝子との関連：*Sfi*I 切断パターンによってタイプ SA で *Not*I 切断パターンによってタイプ NA に属する菌株 (以下、タイプ SA-NA) に属する 65 株はすべて 1996 ~ 1998 年に分離され、*tdh* 遺伝子を保有するが *trh* 遺伝子を保有していなかった。また、すべてウレアーゼ試験陰性であった。これらの菌株は *Sfi*I 及び *Not*I 切断パターンによって、それぞれ 15 種に型別された。また、両者の組み合わせで 22 種に型別されたが、バンドの差異は 4 本以内と僅かであった。タイプ SB-NB に属する 6 株はすべて 1981 年に分離され、*tdh* 遺伝子を保有するが *trh* 遺伝子を保有していなかった。また、すべてウレアーゼ試験陰性であった。これらは、*Sfi*I 切断パターンが一致したが、*Not*I 切断パターンではバンド 1 ~ 2 本の差異によって 4 パターンに区別された。ヒト及び食品から分離された菌株で同一の PFGE パターン (SB-NB2) が観察された。一方、タイプ SC-NC に属する 7 株は、すべて *tdh* 遺伝子を保有せず *trh* 遺伝子を保有していた。PFGE パターンはバンド 1 ~ 4 本の差異で僅かに異なっていた。また、ウレアーゼ試験は陽性であった。分離年は 1981 から 1996 年であった (表 1)。

血清型 O3 K6 以外の PFGE パターン：血清型 O3 K6 以外の PFGE パターンを図 5 に示した。E 国で分離された血清型 O4 K68 の PFGE パターンは O3 K6 にみられたパ

ターンのひとつである SA1-NA3 に酷似した。それ以外の血清型の PFGE パターンはすべて、このたび供試した O3:K6 において観察されたどのパターンとも異なっていた。

RAPD パターン及び薬剤感受性試験：PFGE パターン SA1-NA3 を示す 1 株の RAPD パターンにおいて、他の株にはみられないバンドが検出された (図 6)。薬剤感受性試験の結果、CP、TC、ST、OFLX 及び O/129 に対しては 90%以上の株が感受性を示し、他は中等度耐性であった。KM 及び SM に対し約半数が感受性或いは中等度耐性であった。一方、90%以上の株が ABPC に耐性であった。

考察

過去に公表された PFGE パターン：これまでに、PFGE 法による *V. parahaemolyticus* の型別は Wong ら (J Clin Microbiol, 34:1535, 1996) が、制限酵素として *Sfi*I を用い、スイッチングタイム 3 ~ 80 秒で解析を行っている。彼らは、少なくとも 10 以上の K 血清型を含む菌株 (O 血清型は不明) を供試し、大部分の株で 48 ~ 727kb に約 10 数本の明瞭なバンドを示したため、基本的には用いた解析条件を推奨している。また、PFGE パターンは血清型とは連関がなかったと報告している。さらに、耐熱性溶血素 (TDH) 陰性の株でも PFGE パターンは多様であったと報告している。この点については、本研究においても確認された。

本研究において観察された PFGE パターン：私どもは、同一血清型内でのサブタイプングを検討するため、地理的に離れた地域で、また、年代的にもさまざまな時点で分離された菌株を収集し得た血清型 O3:K6 を中心に解析を行った。本研究で供試した菌株は、*Sfi*I 及び *Not*I を用いた場合の PFGE

パターンに、20 ~ 800kb に 10 数本のバンドが観察され、菌株間の比較が可能であった。しかし、*Sfi*I 切断パターンでは、300kb 付近に broad なバンドが出現し、一方、*Not*I 切断パターンでは、900kb 以上に分子量を特定できないバンドが出現する菌株が存在した。また、一方の制限酵素では同一のパターンを示す菌株が他方の制限酵素パターンで区別される場合があった。このような例は他の菌種でも報告されている (Murase et al, Microbiol Immunol, 39:673, 1995)。以上の成績から、*V. parahaemolyticus* の PFGE による型別には、*Sfi*I 及び *Not*I を併用することで可能と思われた。

O3:K6 以外の血清型については、PFGE パターンに関する基礎データの集積がほとんどないため、さらなる検討が必要と思われた。特に、O4:K68 の 1 株は O3 K6 にみられたパターン SA1-NA3 と酷似したパターンであったが、このような現象に対する合理的な意義付けは現在のところ無い。本血清型は、1998 年に東京都内で発生した食中毒及び海外渡航者下痢症から多く分離されている (尾畑ら、第 72 回日本細菌学会総会、1999) ことから今後その動向が注目される。

O3:K6 において観察された PFGE パターンのバリエーション：このたび供試した 86 株 PFGE パターンは *Sfi*I と *Not*I の組み合わせで 39 種類に型別されたものの、アルファベットで表現した「タイプ」内ではパターンの差異がバンド数本と、きわめて類似性が高かった。しかも、その差異を生じせしめた原因は図 7 に示したように、DNA 断片の insertion 及び deletion、或いは point mutation による制限酵素切断部位の欠失及び付加等で説明される genetic event (Tenover et al, J Clin Microbiol, 33:2233, 1995) であった。たとえば、パターン SA1 と SA9 とのあいだの差異は、SA1 の約

240kb のバンドに約 10kb の DNA 断片の付加によって 240kb のバンドが消失しこれよりやや大きいバンドが出現したため、パターン SA9 が生じたと考えられた。反対に、SC1 にみられた約 380kb の DNA 断片ではその一部が欠失したため SC4 にみられるような約 350kb のバンドが出現したと考えられる。さらに、SC1 における 650 及び 530kb 付近にみられる 2 本のバンドの分子量の合計は、SC4 における 630 及び 550kb 付近のバンドのそれに近似し、且つ、上述の deletion によるバンドシフト以外に SC1 と SC4 の差異はない。したがって、SC1 の 630 及び 550kb のバンドは *Sfi*I 切断部位によって互いに隣接し、その部位が point mutation によって消失するとともに約 20kb 離れた部位に新たな *Sfi*I 切断部位が出現したため、SC4 にみられる 650 及び 530kb のバンドを生じせしめたものと思われた (図 7)。Tenover らは、集団事例発生由来株の PFGE パターンを解析する際を想定し、その事例の原因となった株から生じうる変異株のバンドパターンをシュミレーション化し、genetic event の数とパターンの差異に寄与したバンドの数から原因菌とその変異株との近縁度について論じている。その理論を適用すれば、このたび観察された PFGE における各タイプ内のパターンの多くは、1 乃至 2 つの genetic event で説明されるため (図 7)、互いに closely 若しくは possibly related と解釈されよう。このような実例は *Salmonella* Enteritidis の集団事例において報告されている (Murase et al, Microbiol Immunol, 40 873, 1996)。すなわち、集団事例の原因菌の PFGE パターンの 1 バンドに制限酵素切断部位を 1ヶ所獲得させるような変異が生じたため低分子量の 2 本のバンドを出現させた。しかも、それらの分子量の和は原因菌の変異が生じる前のバンドの分子量に近似した。

O3 K6 にみられた主要 3 タイプ：以上のような観点から、本研究における *tdh* 陽性の菌株のうち、近年日本各地及び各国で分離されたほとんどは PFGE タイプ SA-NA に属していたため、その起源がきわめて近かったと考えられる。一方、1981 年に分離された *tdh* 陽性株 (タイプ SB-NB) とは比較的隔たった起源に由来するものと思われる。タイプ SA-NA 及び SB-NB に属する PFGE パターンを示す株が諸外国や、食品・環境からも分離されていることは興味深い。1980 年から 1990 年代にかけて分離された *trh*I 陽性の株 (タイプ SC-NC) は 1 つのクローンに由来する可能性が示唆された。

PFGE 解析の問題点：PFGE パターンの解析における問題点のひとつは、軽微なバンドパターンの差異をどのように評価するかという点である。現在多くの研究者は、これまで述べてきたように、パターンの差異に寄与したバンドの本数を拠り所としている。しかしながら私どもは、*V. cholerae* 分離株において、PFGE パターンでは 1 乃至 2 本の僅かな差異を示す株同士であっても、*ctx* 遺伝子を検出するプローブがハイブリダイズするバンドの分子量が全く異なっていた例を経験している (未発表データ)。また、志賀毒素産生性大腸菌 O157 においては、*stx* 遺伝子の脱落にともない、PFGE パターンにバンド 1 乃至 2 本の軽微な変化が生じたことを報告している (Murase et al, Curr Microbiol, 38 48, 1999)。パターンの解析におけるもうひとつの問題点は、解釈を標準化することである。異なるゲル同士を比較するために分子量マーカーや基準株を置くレーンが必要となり、作業効率の低下は避けられない。また、目視によるバンドパターンの比較には限界があるため、画像解析装置及びソフトウェアを利用することが望ましい。コンピューター