

平成 12 年度厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

総括・分担研究報告書

パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究

主任研究者 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌部

## 目 次

- 1 . 平成 12 年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版 ..... 1  
主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
- 2 . 平成 12 年度総括研究報告書  
パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 5  
主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所
- 3 . 平成 12 年度分担研究報告書
  - (I) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 10  
分担研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所
  - (II) 北海道・東北・新潟ブロック
    - a) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 23  
分担研究者 矢野昭起 北海道立衛生研究所  
研究協力者 齋藤紀行 宮城県保健環境センター
    - b) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 25  
分担研究者 矢野昭起 北海道立衛生研究所
    - c) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 31  
研究協力者 藤田晃三 札幌市衛生研究所
    - d) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究  
－秋田県において平成 12 年に発生した EHEC 事例から分離された  
O157 : H7(VT-2)の PFGE パターンの比較について ..... 34  
研究協力者 微生物部細菌担当 秋田県衛生科学研究所
    - e) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 39  
研究協力者 宇佐美 智 岩手県衛生研究所
    - f) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 42  
研究協力者 加藤一夫 福島県衛生公害研究所

- g) STEC のベロ毒素遺伝子保有と PFGE パターン ..... 49  
 研究協力者 齋藤紀行 宮城県保健環境センター
- h) パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
 標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 58  
 研究協力者 早坂晃一 山形県衛生研究所
- (III) 関東・甲・信・静岡ブロック  
 パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
 標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 ..... 64  
 分担研究者 甲斐明美 東京都立衛生研究所
- (IV) 東海・北陸ブロック  
 東海・北陸地方で平成 8 年から 12 年に検出された腸管出血性大腸菌 O26 の  
 分子疫学的解析 ..... 102  
 分担研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所
- (V) 近畿ブロック
- a) 腸管出血性大腸菌とサルモネラにおけるパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法に  
 よる解析の利用に関する研究 ..... 107  
 分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所
- b) *Salmonella* Enteritidis による食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動に  
 よる遺伝学的解析 ..... 110  
 研究協力者 青木喜也 吉田 哲 市川啓子 奈良県衛生研究所
- c) 滋賀県における腸管出血性大腸菌の分子生物学的疫学解析 ..... 113  
 研究協力者 石川和彦 林 賢一 滋賀県立衛生環境センター
- d) パルスフィールドゲル電気泳動法による腸管出血性大腸菌 O157 の解析に  
 関する研究 ..... 115  
 研究協力者 森野吉晴 山下晃司 金澤祐子 上野美知  
 太田裕元 北口三知世 岩崎恵子  
 辻澤恵都子 旅田一衛 和歌山市衛生研究所
- e) 腸管出血性大腸菌 O157 集団発生事例の遺伝学的解析 ..... 119  
 研究協力者 田口真澄 勢戸和子 河原隆二  
 大阪府立公衆衛生研究所  
 分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所
- f) 散発下痢症患者由来サルモネラの分子疫学的解析 ..... 123  
 研究協力者 田口真澄 勢戸和子 河原隆二  
 大阪府立公衆衛生研究所  
 分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所

(VI) 中国・四国ブロック

パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の  
標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究 …… 128

分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所

(VII) 九州ブロック

九州 12 機関におけるパルスネット構築に向けた基礎的研究

ー腸管出血性大腸菌 O157 事例における PFGE の方法

及び画像解析について …… 142

分担研究者 堀川和美 福岡県保健環境研究所

協力研究者 河野喜美子 宮城県衛生環境研究所

真子俊博 福岡市保健環境研究所

森下正人 北九州市環境科学研究所

森屋一雄 佐賀県衛生研究所

野口英太郎 長崎県衛生公害研究所

海部春樹 長崎市保健環境試験所

宮坂次郎 熊本県保健環境科学研究所

藤井幸三 熊本市環境総合研究所

淵 祐一 大分県衛生環境研究センター

上野伸広 鹿児島県環境保健センター

久高 潤 沖縄県衛生環境研究所

平成12年度厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要板

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝新興・再興感染症研究事業

研究課題名＝パルスフィールド電気泳動法（pulsed-field gel electrophoresis, PFGE）の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究

研究期間（年度）＝2000－2002

主任研究者＝渡辺治雄（国感染症研究所）

分担研究者＝ 矢野昭起（北海道立衛生研究所）、甲斐明美（東京都立衛生研究所）、松本昌門（愛知県衛生研究所）、小林一寛（大阪府公衆衛生研究所）、田中博（愛媛県立衛生研究所）、堀川和美（福岡県保健環境研究所）、寺嶋淳（国感染症研究所）

研究目的＝近年、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ピプリオ、赤痢等の腸管感染症（食中毒を含む）の大規模化あるいは、散在的集団発生（diffuse outbreak；一見散発事例の多発にみえるが実は同原因で起こっている集団事例であるケース）の事例がかなりみられるようになり、被害の拡大及び多くの犠牲者を認めるようになってきている。被害の拡大を未然に防ぐためには、感染および汚染原因の究明が不可欠である。そのためには、患者情報をもとにした食中毒・感染症情報とその情報を科学的に裏付けするための菌学的情報の結合が重要となる。現在、厚生省の対応部局感染症研究所の感染症情報センターを結ぶ「感染症新法」に基づく「患者情報」と「食品保健総合情報処理システム；Food-Info-Net」が稼働中である。この情報システムに、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）により解析された菌学的情報システム（パルスネット）を結合させることにより、感染症の集団発生および diffuse outbreak を迅速に発見し、その拡大を防止させるための対策に結びつかせる必要がある。そのため

には、地方衛生研究所と国立感染症研究所間のネットワークの構築、及びそのネットワークの感度を高めるための、PFGE 技術の精度管理（方法の標準化、技術の質の恒常化、解析方法の均一化、情報の還元方法の統一化等）の均一化と維持が不可欠である。当研究に於いては、上記のことを遂行する予定である。このネットワークが確立された折には、現在以上に菌学的解析結果の還元が迅速及び正確になり、感染症の拡大防止に役立つことが期待できる。

研究方法=PFGE のネットワーク化にとって最も重要な点は、技術の均一化、およびその精度管理である。全国に74ある地方衛生研究所（地研）の技術的レベルが必ずしも一定レベルでないので、一度にネットワーク化を図るのは必ずしも効率的とはいえない。そこで、2000年度は、6つに分けたブロックから2つの代表する地研に参加していただき、各種の菌について PFGE 解析を行い、その有効性、および精度の検討を行う。さらに新しく作成したソフトをつかって処理された PFGE 画像をインターネットを用いて感染研に電送するシステムの試行、及び送られた画像を解析した結果を還元する試行を行う予定である。以下にその具体化を記す。

- 1) 精度管理：PFGE 解析の精度管理を行い、参加する地方衛生研究所の技術のレベルの一定化を図る
- 2) 技術研修会：精度管理を維持するための一つとして、マニュアルに準じた技術研修会を開催する。
- 3) PFGE 解析：PFGE で解析した菌の DNA 情報を、インターネット経由で感染研に送り、感染研のサーバーにデータを蓄積させる。
- 4) データベースの作成：過去の腸管出血性大腸菌、サルモネラ等の PFGE データのデータベース化を行う。
- 5) 解析：各地研から送られてくる PFGE データ間および過去のデータとの比較検討を行い、菌学的相関性を調べる。Diffuse outbreak の可能性がある場合には、その結果を各地方の現場、感染症情報センター、厚生省の担当部局に迅速に通報し、実地疫学的調査に役立たせる。
- 6) 実際の事例と PFGE 結果との解析間にどのような相関があるのかを、実例毎に詳細に解析し、データの信頼性についての検討を深め、今後の事例解析に活用できるようにする。
- 7) 各地研での活動：ブロック毎の精度管理の実施を行い、技術のレベルアッ

プを図る。ブロック毎の事例解析を行い、PFGE 解析の各事例調査における有用性に関して検討を行う。

## 結果と考察

1. 6つに分けたブロックから2つの代表する地研に参加していただき、各種の菌について PFGE 解析を行い、その有効性、および精度の検討を行った。限られた地研におけるデータ間のバラツキは、許容範囲であることが分かった。
2. 各地研で行った PFGE 画像の転送に関する解析ソフトの開発が完成に近づいている。PFGE データの解析そのデンドログラム解析によるクラスタリング解析用のソフトは機能し始めた。又、解析結果を還元するシステムとしては、情報の秘匿を考慮して WISH ネットワークで関連する地方衛生研究所へ開示する予定であり、そのネットの責任部署である統計情報部との交渉を進めている。
3. パルスフィールド電気泳動法(PFGE)およびファージ型のタイピング法により、患者、保菌者、食品、動物等より分離された腸管出血性大腸菌の解析を行った。その結果、PFGE 及びファージ型は多種にわたることが明らかになった。疫学的に同一汚染源と考えられる分離株は、同一の PFGE パターンを示すが、汚染源が異なると PFGE パターンにも明らかな差が認められた。それらの結果をデンドログラム、及びシストグラムを用いてより量的変化として解析すると、相同性の高いものは一つのクラスタリングを形成するため、関連性がある菌株の集積性を判定しやすいことが分かった。そのパターンの違いは、全体的には数百にも及んでいた。腸管出血性大腸菌の染色体DNAのこの多様性を利用することにより、全く同一の PFGE パターンを示す菌株が地域を越えて分離された場合には、その汚染原因の関連性の存在、つまり diffuse outbreak である可能性を示唆するものと思われる。
4. 上記の結果に基づき、2000年度に分離された腸管出血性大腸菌約2000株の解析より、実際にクラスターを形成しているものがいくつか確認された。その結果と、疫学的データを重ね合わせると、地域を越えて発生した diffuse outbreak(例えば、あるレストランのサイコロステーキで広域に発生した事例等)と一致しており、有用性が確認された。
5. 各地域において、各地研同士での解析結果の比較が行われた。O157 ばかりでなく、サルモネラ、赤痢菌での PFGE を用いた解析が疫学的解析の科学的確認に有用であることが示された。

## 結論

- ①PFGE 解析は、腸管出血性大腸菌の疫学調査において、菌株間の関連性を科学的に同定するのに有用であり、特に diffuse outbreak の迅速なる検出に効果を発揮する。
- ②PFGE の精度管理は、一定の結果を得ることが可能であるが、そのためにはコントロールの設定と、それなりの経験を要する。
- ③インターネットを使った画像の転送、その解析結果の還元についてのシステムの構築に向けて機動し始めている。



## 平成12年度総括研究報告書

パルスフィールド電気泳動法 ( pulsed-field gel electrophoresis,PFGE) の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌部長

EHEC O157 感染者の数は毎年 3,000 人ぐらいが報告されており、ここ数年減少傾向はみられない。全国的に散発事例が多く発生しているが、その中には一見お互いに関連性がなさそうであるが、実際は一つの汚染原因によるいわゆる diffuse outbreak の事例がかなり見られる様になってきている。それらの迅速なる発見により被害の拡大を未然に阻止し、犠牲者の数を減らすことが要求されている。数千株を用いての PFGE 解析の結果、O157 のゲノム構造は多様性に富んでいることから、以下の関連性が明らかにされた；汚染源が同一であることがわかっている分離菌は、その PFGE パターンがほぼ同一クラスターに位置すること、及び PFGE パターンがデンドログラム上で同一のクラスターに属しているもののなかで一見散発と思われる事例について、疫学的調査を行うと、その中には明らかに共通の原因が考えられるものがあることが判明した。このことは、PFGE 解析は、集団事例の確認のためばかりでなく、diffuse outbreak を迅速に検知するためにも有効であることを示した。その科学的結果を利用した Pulse-net の構築に向けての準備が完了に近づいてきている。各地方衛生研究所において行われた PFGE の精度管理の結果も、引き続き研修等の精度管理が必要ではあるが、現在の PFGE 解析の質が、ネットワーク化に向けて対応可能であることを示した。

分担研究者：

矢野昭起（北海道立衛生研究所）  
甲斐明美（東京都立衛生研究所）  
松本昌門（愛知県衛生研究所）  
小林一寛（大阪府公衆衛生研究所）  
田中博（愛媛県立衛生研究所）  
堀川和美（福岡県保健環境研究所）  
寺嶋淳（国感染症研究所）

(diffuse outbreak；一見散発事例の多発にみえるが実は同原因で起こっている集団事例であるケース) の事例がかなりみられるようになり、被害の拡大及び多くの犠牲者を認めるようになってきている。被害の拡大を未然に防ぐためには、感染および汚染原因の究明が不可欠である。そのためには、患者情報をもとにした食中毒・感染症情報とその情報を科学的に裏付けするための菌学的情報の結合が重要となる。現在、厚生省の対応部局感染症研究所の感染症情報センターを結ぶ「感染症新法」に基づく「患者情報」と「食品保健総合情報処理システム；Food-Info-Net」が稼働中で

### A. 研究目的

近年、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、赤痢等の腸管感染症（食中毒を含む）の大規模化あるいは、散在的集団発生

ある。この情報システムに、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) により解析された菌学的情報システム (パルスネット) を結合させることにより、感染症の集団発生および diffuse outbreak を迅速に発見し、その拡大を防止させるための対策に結びつかせる必要がある。そのためには、地方衛生研究所と国立感染症研究所間のネットワークの構築、及びそのネットワークの感度を高めるための、PFGE 技術の精度管理 (方法の標準化、技術の質の恒常化、解析方法の均一化、情報の還元方法の統一化等) の均一化と維持が不可欠である。当研究に於いては、上記のことを遂行する予定である。このネットワークが確立された折りには、現在以上に菌学的解析結果の還元が迅速及び正確になり、感染症の拡大防止に役立つことが期待できる。

## B. 研究方法

PFGE のネットワーク化にとって最も重要な点は、技術の均一化、およびその精度管理である。全国に 74 ある地方衛生研究所 (地研) の技術的レベルが必ずしも一定レベルでないので、一度にネットワーク化を図るのは必ずしも効率的とはいえない。そこで、2000 年度は、6 つに分けたブロックから 2 つの代表する地研に参加していただき、各種の菌について PFGE 解析を行い、その有効性、および精度の検討を行う。さらに新しく作成したソフトをつかって処理された PFGE 画像をインターネットを用いて感染研に電送するシステムの試行、及び送られた画像を解析した結果を還元する試行を行う予定である。以下にその具体化を記す。

1) 精度管理：PFGE 解析の精度管理を行い、参加する地方衛生研究所の技術のレベルの一

定化を図る

2) 技術研修会：精度管理を維持するための一つとして、マニュアルに準じた技術研修会を開催する。

3) PFGE 解析：PFGE で解析した菌の DNA 情報を、インターネット経由で感染研に送り、感染研のサーバーにデータを蓄積させる。

4) データベースの作成：過去の腸管出血性大腸菌、サルモネラ等の PFGE データのデータベース化を行う。

5) 解析：各地研から送られてくる PFGE データ間および過去のデータとの比較検討を行い、菌学的相関性を調べる。Diffuse outbreak の可能性がある場合には、その結果を各地方の現場、感染症情報センター、厚生省の担当部局に迅速に通報し、実地疫学的調査に役立たせる。

6) 実際の事例と PFGE 結果との解析間にごとの様な相関があるのかを、実例毎に詳細に解析し、データの信頼性についての検討を深め、今後の事例解析に活用できるようにする。

7) 各地研での活動：ブロック毎の精度管理の実施を行い、技術のレベルアップを図る。ブロック毎の事例解析を行い、PFGE 解析の各事例調査における有用性に関して検討を行う。

## C. 研究結果と考察

### 1. PFGE の解析の有用性

2000 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 を約 2000 株について PFGE を行い、それを dendrogram および sistrogram を用いて解析を行った。その結果、O157 のゲノムは全体で数百以上のパターンに別れ、多様性に富んでいることが明らかになった。原因が同一であることがわかっている分離菌は、

ほぼ同一クラスターに位置し、デンドログラム上では汚染原因が異なるものからの分離菌とは明らかに異なるクラスターに属していた。また逆に、一見散発と思われる事例について、デンドログラム上で同一のクラスターに属しているものに関して疫学的調査を行うと、その中には明らかに共通の原因が考えられるものがあることが判明した。これらの結果から、PFGE 解析は、

①疫学的に同一原因と考えられる事例の菌株の解析を通し、その同一性を科学的に確認することに利用できるばかりでなく、  
②一見散発に見えるが PFGE が同一クラスターに属する場合には diffuse outbreak である可能性を考えて再調査を行う必要性を示唆した。

ゲノムの多様性は、O157 ばかりでなく、O26 についても明らかにされている。

## 2. PFGE ネットワークの貢献

上記の結果から、PFGE のネットワークを構築することにより、①各地方衛生研究所で行った PFGE 結果をお互いに交換し情報交換を高めること、②PFGE 解析結果を国立感染症研究所に集積し、データベースを作成し、そのデータベースを元に、現在起こっている事例が他の事例と関係しているのかの調査を行い、いわゆる diffuse outbreak を迅速に検知する、ことに貢献できるものと考えられる。diffuse outbreak の早期の発見は、その汚染物質の回収等の措置をおこなわせ、その後の事例の発生を未然に防ぎ犠牲者の数を最小限に食い止めることを可能とする。

## 3. PFGE network(Pulse-net Japan)の構築

現在のネットワークの概要は以下の通りである。

a) 分離された菌株について各地方衛生研究

所で PFGE 解析を行う

- b) 解析されたデータを画像処理し DNA イメージとその関連情報を、Internet 経由で国立感染症研究所に電送する
- c) 電送されたデータをデータベース化する
- d) 送られてきた菌株データの比較解析；現在分離されている株間あるいは過去の株との比較を行い、それらの相違を調べる。デンドログラム、シストグラム解析
- e) 関連性が強い株が見出された場合にはその情報を担当部署に連絡し、疫学解析に利用してもらう
- f) 解析結果の情報を随時 WISH net を使用し、各地方衛生研究所に公開する

各地方衛生研究所においては公開されたデータを活用して保健所等との連携において、疫学解析に使用する。PFGE のデータと関連情報のリンクを計る。

## 4. 地方衛生研究所における検討

各地方衛生研究上においては、そこで分離された菌株 (EHEC O157,サルモネラ等) について PFGE および疫学解析を行い、それらの相関性について調査を行った。その結果、PFGE の有用性を確認した (各分担研究者の報告書を参照してください)。

## 5. PFGE の標準化および精度管理

各ブロック毎の地方衛生研究所において、基準株を用いての PFGE の精度管理が行われた。解析ソフトでお互いの画像を解析できる程度の質が確保できているようであるが、研究者が移動で変わったりすることがあるので、技術の質を維持するために、定期的な研修および精度管理を行うことが必要である。

## 6. 問題点

解析ソフトおよびネットワークのためのプログラムの開発がほぼ完了に近づいているので、画像送付、その解析、還元の一連の流れの試行が可能になってきている。ただ、問題は、解析ソフトの値段が高価（200万円以上）なため、現在の研究費では配賦できる範囲に限られている点である。まずは、各ブロックで2地研に代表となっただきネットワーク化の試行を行う予定である。ただし、ソフトを購入できる地研は随時参加可能である。

## D. 結論

EHEC O157 感染症は全国的に散発事例が多く発生しており、事件数に於いても分離菌株数に於いても、この数年減少していない。むしろ、明らかな diffuse outbreak の事例が増加しているようである。多数株を用いた PFGE 解析の結果、O157 のゲノムは多様性を示し、汚染原因が同一と考えられるもの以外はほとんどがお互いに異なる PFGE パターンを示していた。このことは、PFGE 解析は、集団事例の確認のため及び diffuse outbreak を迅速に検知するために有効であることを示した。O22 についても同様な結果が見られた。その科学的結果を利用した Pulse-net の構築に向けての準備が完了に近づいてきている。各地方衛生研究所において行われた PFGE の精度管理の結果も、引き続き研修等の精度管理が必要ではあるが、現在の PFGE 解析の質が、ネットワーク化に向けての大きな障害にはなっていないことを示した。

## E. 発表業績

1. Arakawa,E., T.Murase, M. Matsushita, T.

Shimada, S. Yamai, T. Ito, and H. Watanabe. Pulsed-Field Gel Electrophoresis-Based Molecular Comparison of *Vibrio cholerae* O1 Isolates between Domestic and Imported Cases in Japan in 1997. *J. Clin. Microbiol.* 38:424-426. 2000

2. Chida T, Okamura,N. Ohtani ,K. Yoshida,Y, Arakawa,E. and Watanabe,H. The complete DNA sequence of the O antigen gene region of *Plesiomonas shigelloides* srotype O17 which is identical to *Shigella sonnei* Form I antigen. *Microbiol Immunol.* 44 : 161-172.2000

3. Osawa,R., Wada,A., Iyoda,S., Yamai,S., and Watanabe,H. Variation of shiga toxin-converting phages from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan. *J. Medical Microbiol.* 49:565-574. 2000

4. Sameshima,T., Akiba,M., Izumiya,H.Terajima,J., Tamura,K., Watanabe,H., and Nakazawa,M. *Salmonella* Typhimurium DT104 from livestock in Japan. *Jpn.J.Infect.Dis.* 53:15-16. 2000

5. Terajima,J., Izumiya, H., Wada, A., Tamura, k. and Wataabe, H. Molecular epidemiological investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan. *J. Appl. Microbiology.* 88: 99S-105S. 2000

6. Kai. Watanabe, Karube. Rapid detection of PCR products of *Escherichia coli* O157:H7 in human stool samples using surface plasmon resonance. *FEMS Immunol. Medic Microbiol.*29:283-288. 2000

7. Iyoda,S., Tamura,K., Itoh,K.,Izumiya,H, Terajima,J. and Watanabe,H. Inducible stx2-phages are lysogenized in the enteroaggregative and other phenotypic *Escherichia coli* O86:HNM isolated from patients FEMS Microbiol. Lett. 191:7-10, 2000

8.Yokoyama,K., Horii,T., Yamashino,T., Hashikawa,S., Barua,S., Hasegawa,T., Watanabe,H., and Ohta,M. Production of Shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference to the membrane vesicle-associated toxins. FEMS Microbiol.Lett.192:139-144.2000

平成 12 年度厚生科学研究 新興再興感染症 研究事業

研究課題名：「パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者 寺嶋 淳

国立感染症研究所 細菌部 主任研究官

研究要旨 PFGE による解析方法の標準化を行うために、統一された PFGE 方法の提示を行いその方法に基づいて行った結果を収集しつつある。1996 年に設定した実験条件よりも PFGE 解析ソフトでの解析のために推奨されている実験条件により近づけつつ、過去のデータとの相互比較が可能である範囲に変更を留めた。感染研に送付された腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分離株を用いて PFGE を上記の条件に基づいて行い PFGE 解析ソフトによる解析、データベースの構築を行った。同一施設における解析結果の蓄積においては上記の条件で支障なくデータベースが構築可能であり、2000 年に発生していたと考えられる diffuse outbreak の探知に有効であることが示唆された。

## 1. PFGE の標準化

1996 年に EHEC による感染症が続発した際に設定した PFGE の解析条件は当時は十分有効であったが、その後解析株数が増大し多数の泳動パターンが出現するにつれ目視によるバンド認識も困難な場合も生じ、下記の表に示すとおり PFGE の泳動条件も若干の変更を行って来た。また、PFGE のパターンの解析ソフトによる読み取り解析を行う場合にもゲル上でのバンド分布の密・疎が少なく均一な分布が推奨されており、過去のデータとの比較が可能でありかつ望ましい泳動条件として現在の条件を設定した。EHEC 以外の菌種に関しては、過去のデータの蓄積も膨大な量ではないので一般的に用いられている条件設定で問題はないと考えられる。EHEC の解析条件に関しても、現在は年間約 2000 株の解析を行うことが可能であるような実験条件の設定がされており米国 CDC(Centers for Disease Control and Prevention)の PFGE の条件とも若干の相違があり将来的には少なくとも泳動条件に関しては統一的な条件に向けて変更する可能性も有りうる。

同一施設内における実験系では、異なる PFGE 解析装置等による解析でも十分互換性のあるデータが得られたが、複数の異なる施設における実験系で十分互換性のあるデータが得られるか否かが今後の課題である。すなわち、PFGE の標準化と同時に十分な精度管理が必要となる。このために、感染研で既に解析済みである保存株を精度管理用の試供株として一部の地方衛生研究所に配布した。今後、地研における分離株の解析と同時にこれらの試供株の解析も行い、各解析施設での精度管理に利用していただく予定である。また、PFGE の技術研修等を行い、各施設での技術的な解析能力の均一性を高めてゆく方針である。さらに、PFGE の解析結果をインターネット

経由で電送し画像認識まで行うためには、電送する画像の解像度も含めて、解析可能であるための十分な品質が保持されていなくてはならない。標準化された条件での解析結果の電送が相互に十分利用可能であるような通信条件を現在検討中である。

	1996年時		1998以降		その他菌種 CHEF DR III Step 1
	EHEC CHEF DR II		EHEC CHEF DR III		
	Step 1	Step 2	Step 1	Step 2	
Initial switch time	4	8	4	8	5
Final switch time	8	50	8	50	50
Run time	12 hrs	10 hrs	9 hrs	13 hrs	20 - 22 hrs
Angle	120°				
Gradient	6.0 V/cm				
Temperature	10 - 12 °C (Buffer temperature)				
Ramping factor	linear				

## 2. データベースの作成

感染研に送付された EHEC の分離株については、PFGE の結果を解析するソフトとして現在 GelCompar II (Applied Maths 社)を使用してデータベースを作成している。感染研に送付される年間約 2000 株の EHEC の分離株について GelCompar II による解析を行い、*dendrogram* の作成を行った。そのうち、O157:H7/-の血清型 1200 株についてその PFGE パターンを解析し *dendrogram* を作成すると、ほとんどの分離株は、それぞれ異なるパターンを示しており、PFGE による遺伝子型が非常に多様であることが確認された。さらに、同一パターンであり分離日時や場所のことがなる、いわゆる *diffuse outbreak* の可能性のある事例由来株が複数のパターンについて存在することが明らかになった。これらの分離株は、*dendrogram* 上でそれぞれクラスターを形成しファージ型も同一であるなど同一クローンである可能性が高く、共通汚染源由来株である可能性が強く示唆された (図 1, 2 参照)。EHEC の遺伝子型の多様性については、O157:H7/-の血清型だけでなく、O26 等、他の血清型についても保持されていることが明らかになった。また、*diffuse outbreak* の探知に際して、PFGE の解析結果だけでは不十分で患者情報等の疫学情報が必要不可欠であることが確認された。

## 3. 解析結果還元システムの構築

PFGE による解析結果はもちろんのこと、患者情報等の菌株に関する疫学情報も正確にかつ迅速に知りうるシステムの構築が重要であることから、オンラインのシステムによる公開を予定している。個人に関する情報は一切含まれないものの、プライバシーの保護には十分の配慮をすべきことから、解析結果等の公開に関しては、厚生労働省および地研・保健所等で構成されているネ

ネットワークである WISH 上での公開を予定している。感染研での解析結果を WISH 上のサーバーにおいて公開し、1 ヶ月単位をメドに更新し 6 ヶ月分程度を閲覧できるようなシステムを検討中である（別紙 1 - 7 を参照）。

#### 今年度以降の計画

PFGE の技術的な標準化を強力に進めてゆくことが、このシステムが効率的に運用される極めて重要な条件であるため、今後も技術研修等を含めて解析技術の統一化を計って行く。より使い易い解析ソフトにするため、現在ソフトの日本語化を行っており、その試供品を提供しながら実用化に向けて改良を重ねる予定である。技術的な困難さから、現在 6 地研程度の参加に限定している数を解析精度の保証が得られ次第順次増やしてゆき、全国に広げてゆく予定である。

#### 参考文献

1. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-Sushi ingestion. Jpn. J. Infect. Dis. 52, 52-3; J. Terajima, H. Izumiya, S. Iyoda, K. Tamura, H. Watanabe.
2. Terajima J, Izumiya H, Wada A, Tamura K, Watanabe H. Molecular epidemiological investigation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan. J Appl Microbiol 2000;88:99S-105S.



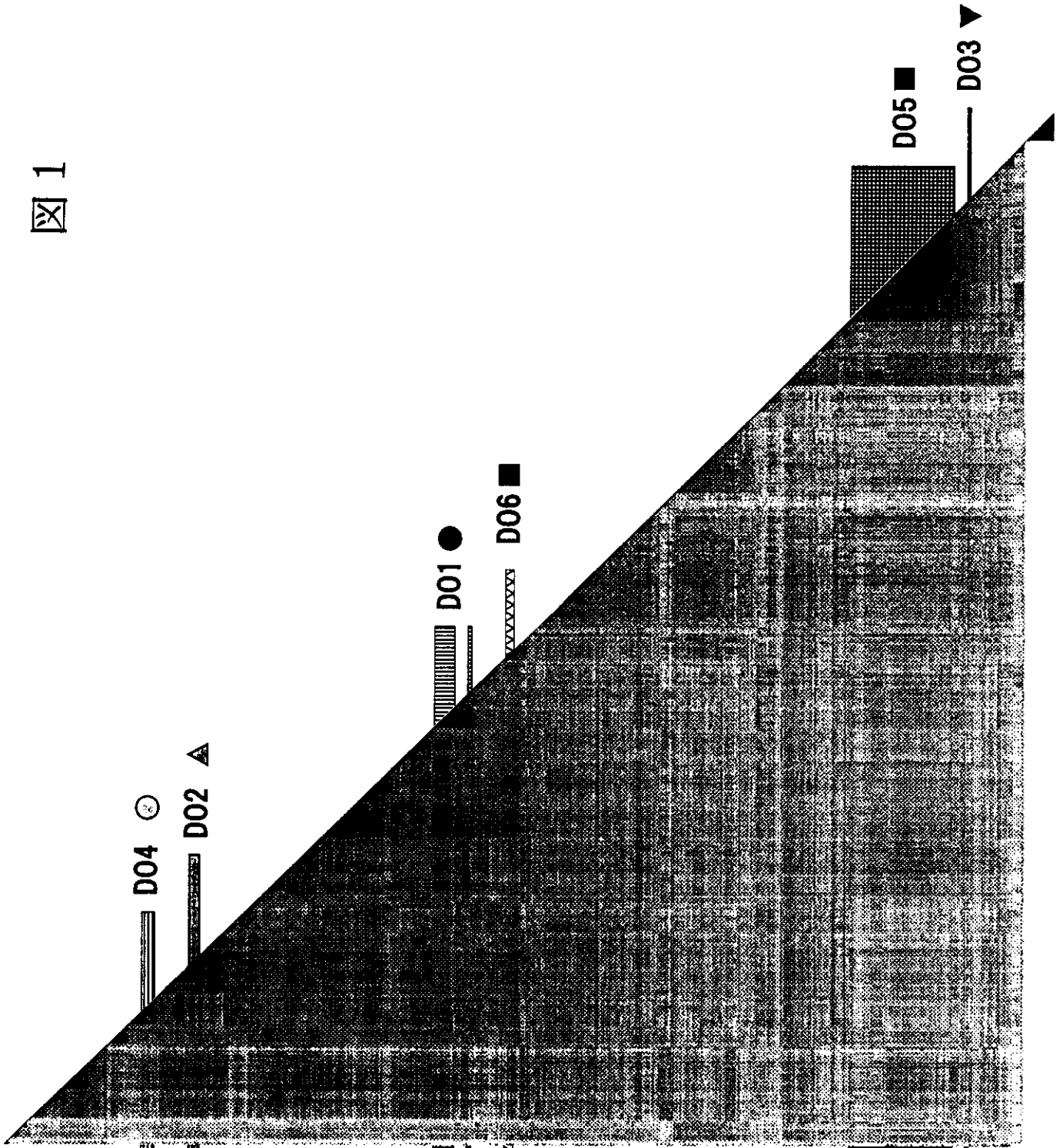
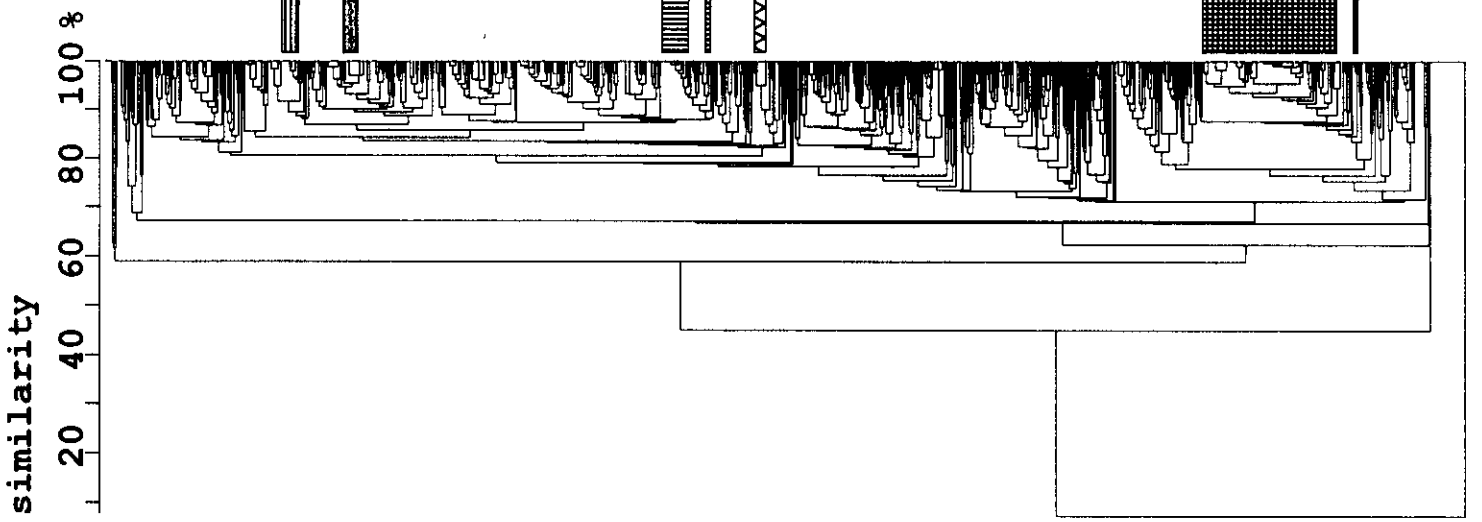
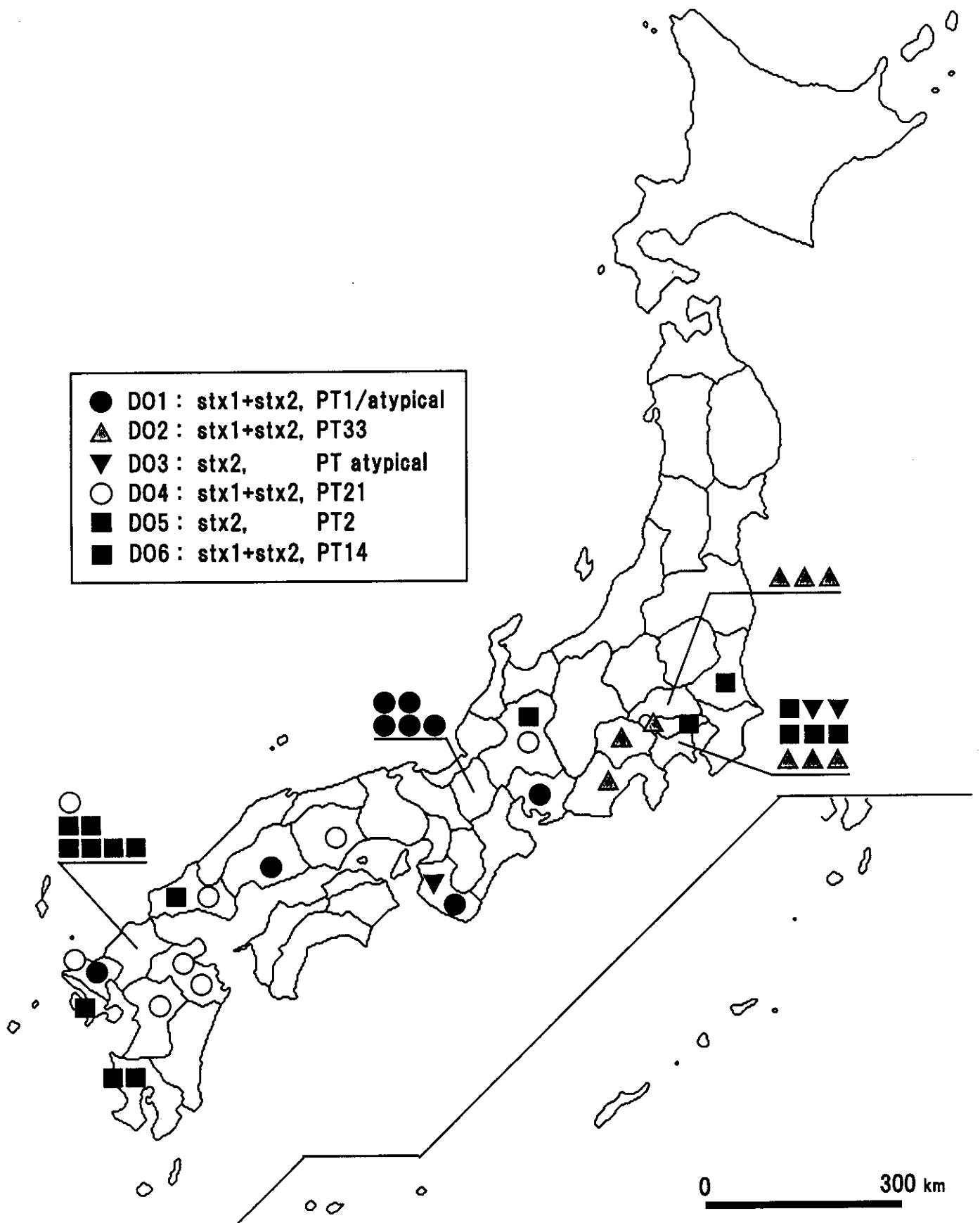
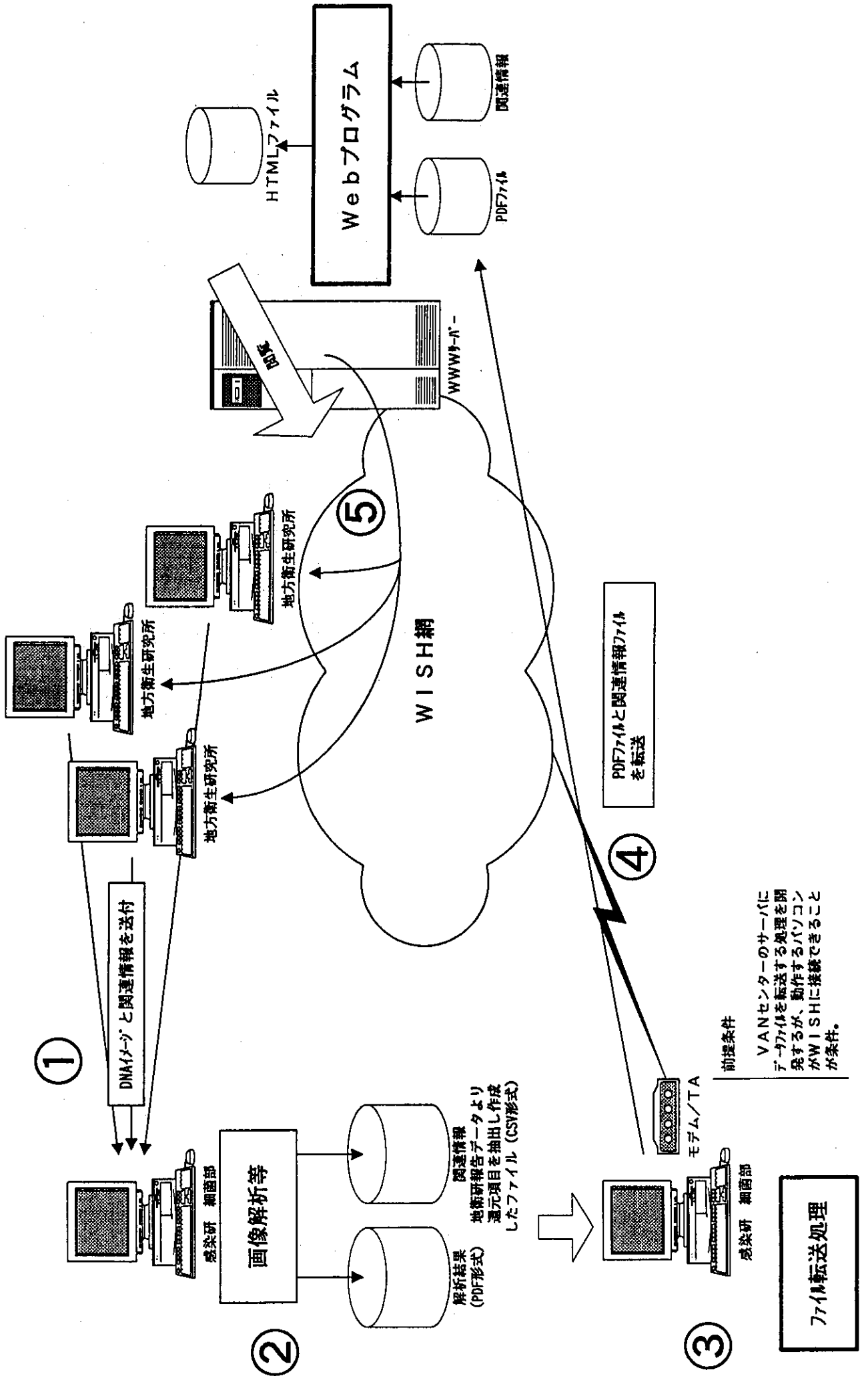


图 1



# パルスネット還元処理システムイメージ図

別紙 -- 1



# パルスネット還元処理システム業務の流れ

