

200/0693

平成 13 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 13 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 …………… 1  
主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部

### 2. 平成 13 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 …………… 16  
分担研究者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌部  
協力研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌部
- (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 …………… 33  
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  
対馬典子 青森県環境保健センター  
微生物部細菌担当 秋田県衛生科学研究所  
細菌担当 岩手県環境保健研究センター  
廣瀬昌子 福島県衛生研究所  
早坂晃一 山形県衛生研究所
- b) 北海道における STEC の PFGE 解析と家族内感染、集団感染の解析 …………… 36  
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  
ーパルスネットの有効活用事例ー …………… 44  
研究協力者 齋藤紀行 宮城県保健環境センター
- 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 …………… 51  
研究協力者 対馬典子 青森県環境保健センター
- 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  
ー秋田県において平成 13 年に発生した EHEC 感染事例由来 O157:H7(VT-2、VT-1&2)、  
O26(VT-1)、O91(VT-1)の PFGE パターンの比較についてー …………… 52  
研究協力者 微生物部細菌担当 秋田県衛生科学研究所

- 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 …… 60  
研究協力者 細菌担当 岩手県環境保健研究センター
- g) 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 …… 65  
研究協力者 廣瀬昌子 福島県衛生研究所
- 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 …… 69  
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 …… 73  
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026の  
解析ソフト「ゲルコンパII」を用いた分子疫学的解析…………… 112  
分担研究者 田中大祐 富山県衛生研究所  
協力研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所
- (Ⅴ) 近畿ブロック  
a) パルスフィールドゲル電気泳動型別法の施設間における変動について  
—平成13年度報告— …… 123  
分担研究者 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所  
協力研究者 石川和彦 滋賀県立衛生環境センター  
田口 寛 京都府保健環境研究所  
竹上修平 京都市衛生公害研究所  
中村寛海 大阪市立環境科学研究所  
横田正春 堺市衛生研究所  
辻 英高 兵庫県立衛生研究所  
黒川 学 神戸市環境保健研究所  
川西伸也 姫路市環境衛生研究所  
井上凡己 奈良県衛生研究所  
金澤祐子 和歌山市衛生研究所  
田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所
- b) 大阪市内で分離されたウェルシュ菌の  
パルスフィールド電気泳動法による解析……………136  
研究協力者 中村寛海 小笠原準 長谷 篤 大阪府立公衆衛生研究所

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| c) 京都府における腸管出血性大腸菌の分子生物学的疫学解析 ..... | 141 |
| 研究協力者 田口 寛 浅井紀夫 藤原恵子 隆井 佐太郎         |     |
| 京都府保健環境研究所                          |     |

|  |     |
|--|-----|
| d) コレラ菌 ( <i>Vibrio cholerae</i> O1) のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析 ..... | 147 |
| 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 ..... | 155 |
| 分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所   |     |
| 協力研究者 谷尾進司 鳥取県衛生研究所  |     |
| 保科 健 島根県衛生環境科学研究所  |     |
| 榊美代子 広島県保健環境センター   |     |
| 河本秀一 広島市衛生研究所  |     |
| 安岡富久 高知県衛生研究所  |     |
| 芝 美和 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 II               |     |
| 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 ..... | 173 |
| 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                         |     |
| 尾崎延芳 福岡市保健環境研究所                                |     |
| 藤田景清 北九州市環境科学研究所                               |     |
| 森屋一雄 佐賀県衛生薬業センター                               |     |
| 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                                |     |
| 徳永晴樹 熊本県保健環境科学研究所                              |     |
| 松岡由美子 熊本市環境総合研究所                               |     |
| 阿部義昭 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                                |     |
| 村上光一 福岡県保健環境研究所                                |     |

## 平成13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第一部長

2001年度のEHEC O157感染者の数は3,000人を越え、年々増加傾向にある。また一方で、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、毎年かなり見られる様になってきている。2001年も、サイコロステーキ事件、牛タタキ事件、キムチ事件の様なdiffuse outbreaksが発生し、疫学調査とPFGEを用いた分子疫学的手法が汚染源の解明に威力を発揮した。PFGEの標準化およびその精度管理に関しては、全国を6ブロックに分けて、各ブロックの代表者を中心にして進められた。その中でいくつかの問題点が浮き彫りにされてきている。方法を統一しても、使用している電気泳動器具やアガロース、制限酵素等の試薬の製造所、ロット等の統一が図られていないためか、同じ施設で同じ実験者が行った結果に関しては再現性のある結果が得られているが、施設が異なると地研間の泳動パターンのばらつきが大きいことが明らかになってきている。目的の一つである、インターネットを介して各地研が行ったPFGEの泳動パターンを感染研に送付し、そのパターンの解析を感染研で行うという中央集積方式に近づけるためには、まだまだ乗り越えなければならない精度管理上の問題点があることが明らかになった。現在、同時並行的に、各地研から送付された菌株を感染研で解析し、菌株を送ってきた地研だけにそのPFGE結果を還元しているが、WISHネットを用い、全国に還元するシステムの構築を行っている。特にdiffuse outbreakの様な場合には、全国の地研、保健所等の衛生行政機関でデータを共有し、その拡大を迅速に感知し、被害を最小限に食い止める必要がある。現在のところ、個人の識別ができない程度の必要最小限の患者情報及びその菌株情報をWISHネット上に公開するために、厚生労働省食品保健部から協力依頼通知が各都道府県衛生主管部宛に出されたところである。広域協力ネットワークの第一歩が踏み出された。

### 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）  
田中大祐（富山県衛生研究所）  
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）

### A.研究目的

近年、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ピブリオ、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（diffuse outbreak；一見散発事例の多発に見えるが実は同原因で起き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、厚生労働省の対応部局と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精度および信頼性を高めるための、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）とその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。

## 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、6つに分けたブロックでブロックごとに各種の菌につ

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。具体的作業について；

1) データベースの作成：過去の腸管出血性大腸菌（O157,O26,O111 等について）の PFGE データのデータベース化を行う。

2) WISH を用いての情報公開：送付された菌株について感染研において同一条件で行った PFGE 結果、及びそれに付随した患者情報（個人を識別できない程度の情報のみ）の公開に向けての準備、その試行

3) 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。各ブロック毎に施行する。

4) ブロックの代表地研に PFGE 解析ソフトを配布する。それを用いて、その地域、あるいはブロック内で発生した事例について PFGE データの解析（デンドログラムの作製等）を行い、疫学解析に利用できることを確認する。

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 解析結果との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。

## C.研究結果と考察

### 1. 感染研における研究

#### a) 菌株の識別法の解析

収集した腸管出血性大腸菌 O157,O26,O111 を種々の方法を用いて解析した結果、パルスフィールド電気泳動 (PFGE)法およびファージ型を用いることにより菌株間の差異をより詳細に識別できることを明らかにした。PFGE による解析は現在までに約 10,000 株以上を行い、5000 以上のパターンに分離可能であること、つまり菌株の塩基配列の多様性があることを明らかにした。このことが、もし PFGE 型の同じ菌株が散在的に発見された場合には、それらの事例間の何らかの関連性を考えるべきであること、つまり diffuse outbreak を考慮すべき理論的根拠を提示した。

#### b)O157 感染による“牛タタキ”事件；

2001 年春に、関東一円を中心に、EHEC O157 の患者数が増加し、分離菌の DNA 型が一致した。喫食調査の結果、スーパーにおいて“牛タタキ”を試食したこととの関連性が明らかになった。その牛からも患者と DNA 型が一致する菌が分離できた。牛タタキが回収され、それ以上の拡大が阻止された。

#### c) 牡蠣を原因とする赤痢事件；

2001 年秋頃から山口県に始まり、ほぼ全国的に赤痢患者が異常に増加し、その DNA 型が同一であった。喫食調査の結果、牡蠣が疑われると同時に韓国産の

牡蠣から患者と同一の DNA 型の菌が分離された。厚労省から韓国に申し入れが行われた。国際的事例であった。

#### d) 豊橋における S.Enteritidis (SE) 事例；

2001 年秋、豊橋において SE の異常発生が見られ、ファージ型(PT)1,4,47 の混合であった。PT1 型菌患者と月見まんじゅう喫食の相関が導き出されると同時に、保存されていた月見まんじゅうからも同一の菌が分離された。PFGE でも同じ結果であった。より簡便なファージ型解析が有用であった事例であった。

#### e) Enter-Net への参加

世界的規模で人・物の運搬・流通がグローバル化してきている現代においては、ひとつの国で発生した食中毒事件が国を越えて集団事例をおこすことが稀ではなくなっている。国際的ネットワーク (Enter-Net) により、疫学的手法あるいは菌学的解析手法を、国際間においてハーモナイゼーションを行うことを目的として EU,USA,Canada が中心になり組織している。1998 年から我が国も参加して、情報交換を行っている。

f) 感染研で構築したデータベースの一部について、厚生労働行政総合情報システム (WISH) 上の個別システムに「PulseNet Japan」として試験運用を行い、そのシステム内の端末における確認を行った。PulseNet Japan での公開にあたりこのシステムの運用規定を作成し、これに参加する機関からの分離株の解析結果公開に関する疑問点・要望等について検討した。14年4月24日付けで厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長名により各都道府県等衛生主管部長宛に、情報公開に関しての依頼文書が発行された (関連文書を添付)。

g) 平成 13 年度の EHEC O157:H7 の分離株数は平年より多くかつその約 20%が同一遺伝子型と考えられる EHEC O157:H7 によるものであった。共通原因が示唆されたが、解明されていない。同様の diffuse outbreak が今後も発生する可能性があり、原因究明のための更なる努力が要求される。

## 2. 各ブロックにおける研究成果

### (I) 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北地方で、平成 13 年に発生した腸管出血性大腸菌感染症の集団発生事例及び散発事例由来株についてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いた DNA 解析を実施した。それぞれの地研での成績から、PFGE によって、散発事例由来株と集団感染事例由来株とが区別しうることが示された。また、ソネ赤痢菌については、西日本で流行した菌株の PFGE 画像が現在構築中のパルスネットを通じて各地研に配布されたことによって、西日本流行株と地方で分離された菌株との迅速な比較が可能となり、本ネットワークの有用性が示された。一方、O157 菌については、各地研で実施した PFGE の画像について DNA 解析用ソフトであるゲルコンパーII を用いたクラスター解析を行い、北海道・東北地方における O157 菌の遺伝子型について調べた。その結果、各地研での PFGE パターンは、そのおのおのがクラスターを形成する傾向を示し、手技や泳動条件の標準化等の必要性が示唆された。

### (II) 関東・甲・信・静岡ブロック

腸管出血性大腸菌 O157 等による感染症・食中毒事例をいち早く探知し、感染源や原因食品を解明することによって、その蔓延を防止する。その手段として、菌学的情報システム (パルスネット) を

構築するために、関東甲信静岡ブロックの 11 地方衛生研究所で共同研究を行った。各研究所は、実際に発生した集団および散発事例の分離株について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析を実施し、非常に有効であった事例を数多く確認した。さらに、PFGE 画像の電送を相互に行った。PFGE 画像の目視による比較においても、事件発生直後の早い情報は感染源解明のために非常に有効であった。このような手段が非常に有効に発揮され、原因食品の解明にまで繋がった Diffuse Outbreak 事例として、「牛タタキ」を原因とした腸管出血性大腸菌 O157 事例(2001 年 3 月)、「和風キムチ」を原因とした腸管出血性大腸菌 O157 による事例(2001 年 8 月)が特記される。このように、パルスネット構築のための環境整備がかなり図られてきた。しかし、PFGE 解析手法の統一化等に一部の問題点も認められた。また、画像解析のためのプログラムソフトを用いて一部試行したが、技術的な問題点の解決には、更に研究が必要であった。

### (III) 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 105 株の O26 についてその PFGE 画像を解析ソフト「ゲルコンパーII」を用いて解析を行なった。その結果、東海・北陸地方で検出された 105 株の O26 は 71 の異なった PFGE 型に型別分類された。このうちの 52 の型 (73.2%) は 1 PFGE 型 1 株であった。さらに、東海・北陸地方の 8 地研のうち 6 地研で全 PFGE 型の約 6 割若しくはそれ以上が 1 PFGE 型 1 株の PFGE 型であり、検出年および地研ごとに特定の PFGE 型が認められた。一方、1 PFGE 型に 2 から 6 株の O26 が認められた型は 19 (26.8%)



であり、それぞれ1から3の地研から検出されていた。これらの PFGE 型のうち、5の型では検出年が同一であった。少数ではあるが同一の PFGE 型を有する O26 が同時期に異なった東海・北陸地方の県に存在し、集団事例および散発事例の原因となっていたことを示していた。他の14の型に属する O26 ではその検出年は連続した2年から最長5年の間隔があり異なっていた。

これらの結果から、東海・北陸地方で検出された O26 は分子レベルで多様性を有していることが明らかとなった。さらに、その多様性は毎年、異なった県で出現する多数の異なった PFGE 型の O26 と異なった年に異なった県に繰り返し出現する少数の同一の PFGE 型の O26 から構成されていると推測された。この分子レベルでの多様性は O26 による集団事例等の際には PFGE による解析が感染源および感染経路の究明といった疫学解析の有用な手段となることを示している。21株の薬剤耐性 O26 は19の異なった PFGE 型に分類された。また、このうち9の型には薬剤感受性 O26 も含まれていた。これらの結果から、薬剤耐性と PFGE 型との明確な関連は認められなかった。

#### (IV) 近畿ブロック

パルスネット構築に向けた基礎的研究のため、近畿支部11カ所の衛生研究所において同一菌株と同一ゲルブロックを用いて PFGE 型別を行い本法の安定性をみた。近畿支部11カ所の衛生研究所では PFGE 解析画像の電送が可能であり、PFGE のネットワークに参加する基盤は整っていた。画像解析ソフトによる解析の結果、各施

設間の方法の違いに由来すると考えられる差が認められたため、PFGE 条件の統一と精度管理の必要性が認識された。異なる施設間の PFGE 解析画像の比較を行うには、電気泳動像が各施設で均一であることが重要である。今回数カ所の施設で制限酵素未消化バンドがみられ、その原因として被検菌株の菌量が多すぎる、Protenase K 処理後の洗浄が不十分で制限酵素が不活化され DNA が切断されない、エチジウムブロマイド染色後の脱色が不十分であった等の技術的な問題が考えられた。また、同一施設において検体 No.3 と4の PFGE パターンがデンドログラム上で100%一致しなかった理由として、ゲルブロック作成から制限酵素処理までの方法の違いが考えられ、今後各施設間で差が出ない方法を検討する必要がある。電気泳動条件の異同をみるために行った検体 No.4 の解析では、異なる機種を使用しても100%一致した施設があったことから、異なる機種間の成績の比較が可能であることが示された。これに対し同一機種であっても電気泳動中の Buffer 温度の違いや、マーカー(入ラダー)の濃度の差によって成績が一致しないことが考えられ、PFGE 条件の統一と精度管理の必要性が認識された。

#### (V) 中国・四国ブロック

細菌性食中毒・感染症等の疫学調査におけるパルスフィールド電気泳動 (PFGE) の有効性と PFGE により解析された菌学的情報システム (パルスネット) 構築のための基礎的資料を得る目的で、中・四国地区の6地方衛生研究所 (地研) が次の項目について共同研究を実施した。1) 2県にまたがって発生したサルモネラの集団食中毒事例で、PFGE に

よる疫学的解析を行い PFGE が感染源の究明に有効な方法であることを示唆した。また、2 施設の P E G E 画像を電送し、画像解析プログラムソフトで解析することは、迅速な疫学調査や拡大防止対策に寄与するものと考えた。2) カキが原因とされる赤痢患者の発生に際して、カキ喫食感染者から分離された赤痢菌の PFGE 解析を実施することにより、本事例が散発的集団発生 (diffuse outbreak) であることがわかった。3) 各施設の PFGE 解析の信頼性を知るため、各施設が作製した O157 : H7 の PFGE 画像を比較するとともに、特定の PFGE 型を有する菌株の画像を画像解析プログラムソフトで解析した結果、PFGE 技術の統一化、精度管理の必要性などが考えられた。

#### (VI) 九州ブロック

パルスネット構築に向けた基礎的検討を行うため、平成 12 年度本研究で九州地区 12 地方衛生研究所の参加による腸管出血性大腸菌 (E H E C) O157 事例におけるパルスフィールド電気泳動法 (P F G E) の各機関間での比較解析を実施した。その結果 PFGE の実施方法や条件に関する多くの問題点がクローズアップされた。今年度はこれらの問題点を改善するため、統一した方法で PFGE を実施した。PFGE の統一マニュアルは、感染症研究所・細菌部の研修で用いられた方法に準拠し、初心者向けに一部改変し細部にわたって詳述した。統一した方法により昨年度と同一の E H E C O157 感染症研究所標準株 5 株を配布し、各施設間での PFGE 画像の共有化における可能性について検討した。また、各機関で平成 13 年 7 月から 10 月に分離された O157 株を材料として、PFGE 泳動画像データを 1 機関に集め、解析ソフト

GelComper II により解析を行った。その結果、相互比較の第一段階である DNA マーカーは、昨年に比べ良好な結果が得られ、画像解析の初期設定は可能となった。また各地研における PFGE 泳動画像は、昨年度に比べシャープなバンドが得られた。しかし、ネットワークを介して泳動画像を相互比較するには、主として次の事項についての検討が必要であることが分かった。すなわち、PFGE 画像の相互共有化および比較解析のためには、PFGE のゲル作成・装填、写真撮影法、解析ソフト GelComper II での解析技術の向上及び均一化、泳動画像のデジタル画像保存方法並びに画像の転送・ダウンロード等に関する問題点の明確化及び解決が必須である。

#### D. 結論

同一施設における PFGE 解析結果を関係機関内に電送し情報を共有化することの有効性が確かめられた。今後、それを押し進めていくためには PFGE の技術的な標準化をさらに向上させていくことが極めて重要な条件あり、そのためには実験条件の詳細なプロトコルの作成等具体的な実験手技の標準化が必須である。解析ソフトである GelComparII については、ソフトの日本語化がほぼ完了して折り、その試行が行われている。改良を重ねることにより、より使いやすいものに仕上げていく必要がある。現在全国 6 ブロックにそれぞれ 2 ヶ所ずつ計 12 地研に配布してある解析ソフトを最大限に活用しつつ、PFGE の解析の精度が確立できた地研からデータ入力を施行していくことが予定される。(図：情報ネット化の試行案)

## E.発表業績

### 誌上発表

1) Hirose,k., Tamura,K., Sagara,H., and Watanabe,H. Antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A isolated from clinical patients in Japan. *Antimicrob.Agents.Chemother.* 45:956-958. 2001

2) Watanabe,H.,J. Terajima, H. Izumiya ,S. Iyoda , R. Osawa and K. Tamura. Molecular epidemiological investigation and genotypic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* . Verocytotoxic *Escherichia coli*. *Epidemiology(Concerted Action CT98-3935)*. Vol.5. p.38-43. 2001.

3) Izumiya,H., Terajima,j., Matsushita,S., Tamura,k., and Watanabe,H. Characterization of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. *J. Clinic. Microbiol.* 39: 2700-2703. 2001

4) Matsune,W., Ishikawa,k., Hayashi,K., Tsuji,M., Izumiya,H., and Watanabe,H. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis resistance to ampicillin and streptomycin from three outbreaks of food poisoning in Shiga prefecture. *Jpn.J.Infect.Dis.* 54:111-113.2001.

5) J. Terajima, H. Izumiya, S. Iyoda, K.Tamura, H. Watanabe. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. *Jpn. J. Infect.* 55: 19-22. 2002.

6) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄: パルスネット - 疫学調査と DNA 解析 - 日本臨床 2002 (印刷中)

7) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄: Pulse

Net Japan の構築について. 月刊 HACCP. 12: 64 - 68. 2001.

8) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 三戸部治郎. 細菌のゲノム配列の多様性を利用した分子疫学的解析—パルスネットの構築. *現代医療.* 34 : 29-35. 2002.

9) Kazumi Horikawa, Koichi Murakami and Fujiko Kawano : Isolation and characterization of methicillin *Staphylococcus aureus* strains from nurses and their gowns, *Microbiological Research,* 155: 345-349. 2001.

10) 堀川和美, 八柳潤, 内村真佐子, 斎藤眞, 小林一寛, 田中寛, 森良一: 牛挽肉、ポテトサラダ及び野菜のドレッシング和えからの腸管出血性大腸菌 O157 の検出における培養法, 免疫磁気ビーズ法, イムノクロマト系簡易キットの有用性の検討, 日本食品微生物学雑誌, 19 巻、掲載予定. 2002.

### 2. 学会発表

1) 堀川和美, 村上光一, 牛から検出される腸管出血性大腸菌の特性, 第 5 回腸管出血性大腸菌シンポジウム, 福岡市, 2001. 6. 15.

2) 堀川和美, 村上光一, 人及び牛から分離された大腸菌の血清型と病原因子について, 第 54 回日本細菌学会九州支部総会, 北九州市, 2001. 9. 7.

食監発第0424005号  
平成14年4月24日

各 都道府県  
政令市  
特別区 衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長

### 腸管出血性大腸菌等の解析結果のWISH上での公開について

食中毒調査等により分離された腸管出血性大腸菌O157及びサルモネラ（以下、「腸管出血性大腸菌等」という。）の菌株につきましては、従来より、菌株を国立感染症研究所（以下、「感染研」という。）細菌第一部あて送付いただくようお願いをしているところです（平成9年4月25日衛食第134号及び平成9年6月3日衛食第165号、衛乳第168号）。

現在、感染研においては、各地方衛生研究所（以下、「地研」という。）から送付された菌株をパルスフィールド電気泳動（以下、「PFGE」という。）で解析し、その結果をデータベース化する「Pulse Net Japan 全国ネットワーク」の構築作業を行っております。本ネットワークにより、全国の地研及び感染研間でのPFGE解析結果の迅速な情報交換を行い、散発事例などの食中毒の拡大防止に資することを目的として、当該ネットワーク上の解析情報及び疫学情報を、厚生労働行政情報処理システム（以下、「WISHシステム」）上で公開することとしています。

WISHシステムは、都道府県等の自治体のみがアクセスを行うことができること、また、WISHシステム上で公開する疫学情報については、集団発生の探知に必要な最小限の情報（年齢、性別、発症（菌分離）年月日、菌分離地研名、主な症状）のみであるため、個人情報の保全には特段問題がないものと思われることから、都道府県等の各自治体におかれましては、WISHシステム上での情報公開を前提として送付する菌株に上記情報を添付するよう、ご理解とご協力方よろしく申し上げます。

20010693

以降 P.9-P.15は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
下記資料を御覧ください。

「資料」

**細菌のゲノム配列の多様性を利用した分子疫学的解析—パルスネット  
の構築.**

渡邊治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 三戸部治郎  
現代医療. Vol. 34 No. 5, pp.29-35, 2002.

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

協力研究者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌部

研究要旨 平成 12 年度に提示した標準化 PFGE 条件に基づいて行った PFGE 解析結果の収集を継続した。感染研に送付された腸管出血性大腸菌 (EHEC) および赤痢菌の分離株について PFGE 解析を行い、解析ソフトによる系統樹作成、データベースの構築を行った。感染研で構築したデータベースの一部について、厚生労働行政総合情報システム (WISH) 上の個別システムに「PulseNet Japan」として試験運用を行い、そのシステム内の端末における確認を行った。PulseNet Japan での公開にあたりこのシステムの運用規定を作成し、これに参加する機関からの分離株の解析結果公開に関する疑問点・要望等について検討した。平成 13 年度の EHEC O157:H7 の分離株数は平年より多くかつその約 20%が同一遺伝子型と考えられる EHEC O157:H7 によるものであった。また、平成 13 年末には赤痢菌に汚染された輸入牡蠣による事例が多発し、その原因菌である赤痢菌の遺伝子型が同一であることが示された。

A. 研究目的

画像診断を基盤としたシステムの有効性を維持することを目的として、PFGE 解析条件の標準化を継続した。また、データベースの拡充を目的として、前年度に提示した PFGE 条件に基づいて行った PFGE 解析結果の収集を継続しデータベースへの入力を行った。

B. 研究方法

2001 年に発生した事例由来株のうちで感染研に送付された株について平成 12 年度に設定した PFGE 条件を用いて解析を行った。感染研で得られた結果 (PFGE の画像) の一部について、本研究班班員に Internet 経由で電送し各

地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。感染研での解析結果を公開し閲覧するための準備として、厚生労働行政総合情報システム (WISH) 上の個別システムに「PulseNet Japan」として試験運用を行い、そのシステム内の端末における確認を行った。

C. 研究結果と考察

1. PFGE の標準化およびデータベースの作成

平成 12 年度の分担研究報告書に示されている PFGE の泳動条件で解析を行った。平成 13 年に感染研に送付された EHEC の総数は 3452 株で平成 13 年に分離された EHEC O157 は 2438 株あった。さらに EHEC O157 2438 株中

PFGE 解析結果で同一パターンと考えられる分離株が 534 株 (21.9%) 検出され、これらの株が分離された地域は北海道と東北地方の一部を除くほとんどの都府県が含まれていた (図 1)。このパターンを示す分離株のうち、埼玉県と東京都では 8 月下旬に diffuse outbreak が発生し、同一 PFGE パターンを示す株が患者および患者宅の残食である「和風キムチ」から分離された。キムチの汚染原因は解明されなかったものの、キムチの流通が時期的にも地域的にも限定的であった以上、その他の事例の原因食材として、全国的に流通する食材が汚染原因であると考えられた。一方、平成 12 年末から発生した輸入牡蛎関連の赤痢の事例では、321 株の赤痢菌について PFGE の解析を行い、輸入牡蛎から分離された赤痢菌の示す PFGE パターンと一致する分離株が日本各地の 41 自治体で分離されていることが明らかになった (図 2, 3, 4)。

PFGE の泳動条件の標準化という意味では昨年度と同様、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。これは、EHEC およびその他の菌種についての条件いずれでもそれぞれ妥当な標準化がなされたためと考えられる。EHEC の解析条件に関して、現在は年間約 2, 3 千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る。将来的には少なくとも泳動条件に関しては、菌株を選別して株数を減らすことができれば統一的な条件に向けて変更する可能性も有りうる。

今年度 (平成 13 年度) は、広域の流行と考えられる事例が多く、各地の地方衛生研究所との PFGE データのやり取りが度々あったがこれらの画像の交換は Internet 経由での電送により行われた。これらのデータの一部には、目視での判読には問題がないものの、データベース入力には不適と考えられる画像もあった。昨年と同様、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と考えられるので PFGE の標準化と同時に十分な精度管理に向けて精度管理用の試供株を配布する予定である。今後、地研における分離株の解析と同時にこれら試供株を対照として使用することで各解析施設での精度管理に利用していく方針である。

## 2. 解析結果還元システムの構築

感染研で構築したデータベースの一部について、WISH 上の個別システムに「PulseNet Japan」で試験運用を行い、そのシステム内の端末における確認を行った (別紙 1 - 6)。感染研細菌部内に設置した端末から WISH 上の「PulseNet Japan」にアクセスしデータをアップロードすることで上記ホームページでの閲覧が可能であった (別紙を参照)。PFGE による解析結果は、解析ソフト (GelComparII, Applied Maths 社) を用いて dendrogram として作成してあるので画像として閲覧することが可能である。また、実際の PFGE の画像も広域での発生例等では有力な情報となりうるので、トピックスとして PFGE 画像そのものの閲覧もできるようにした。WISH のシステムは関連機関のみのネットワークであるため security の面で勝っているものの個人のパス

コンに比べると端末の普及台数が少ないという欠点があるので、緊急性を要するような情報の配布には Internet 経由のメールによる画像の配信も行った。感染研からの画像の配信にメールが利用できることからすると関連機関の担当者のメールリストも PulseNet Japan の補完的なシステムとして運用できる可能性が考えられた。患者情報等の菌株に関する疫学情報も正確かつ迅速に知りうるシステムの構築が重要ではあるが、プライバシーの保護という観点から個人に関する情報を含まないようにしながらも疫学情報に関して公開すべき項目について研究班内で検討中である。公開する結果が画像であるため、EHEC の発生数が多い時期の画像は解析結果の HP 上の更新間隔を短くして解析株数が増えすぎないように工夫をしないと閲覧する側の端末でデータの読み取りに時間がかかりすぎることも考えられた。

#### D. 結論

同一施設における PFGE 解析結果を本システムを構成する関係機関内に電送し情報を共有化することの有効性が確かめられた。今後、個々の機関における解析結果を効率的に運用する上で PFGE の技術的な標準化をさらに進めてゆくことが極めて重要な条件であり、実験

条件の詳細なプロトコールの作成等具体的な実験手技の標準化が必要であると考えられた。そのためには、詳細な統一プロトコールを作成しそれに基づいて技術研修等を含めて解析技術の統一化を計って行くべきであると考えられた。解析ソフトである GelComparII については、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。現在全国 6 ブロックにそれぞれ 2 ケ所ずつ計 12 地研に配布してある解析ソフトを最大限に活用しつつ、PFGE 解析精度の確立された地研からのデータ入力を試行すべきであろう。

#### 参考文献

1. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. Jpn. J. Infect. 2002. (in press) J. Terajima, H. Izumiya, S. Iyoda, K. Tamura, H. Watanabe.
2. パルスネット - 疫学調査と DNA 解析 - 日本臨床 2002 (印刷中) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄
3. Pulse Net Japan の構築について 月刊 HACCP 2001 12. 64 - 68 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄



図1

**PFGE profile of *S. sonnei*  
isolated in Nov.-Dec., 2001,**

**Japan**

582 —

485 —

388 —

291 —

194 —

145.5 —

97 —

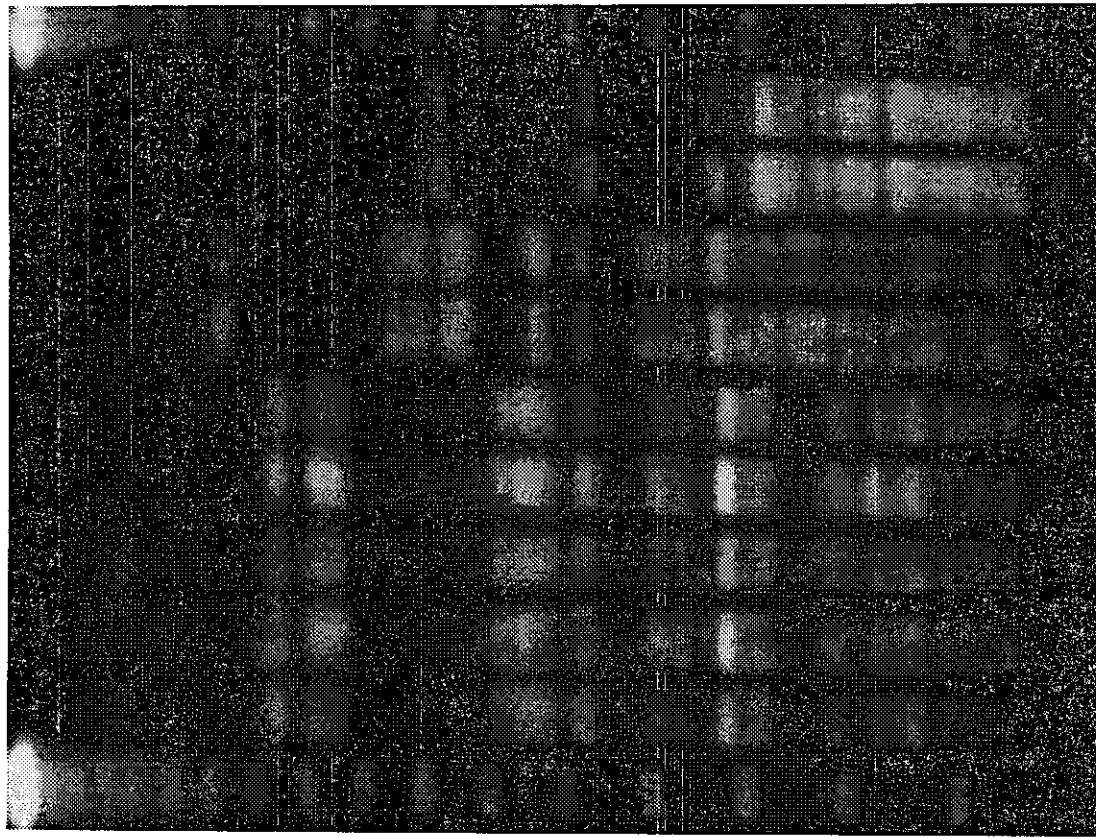
48.5 —

(kb)

**A B C D : patients**

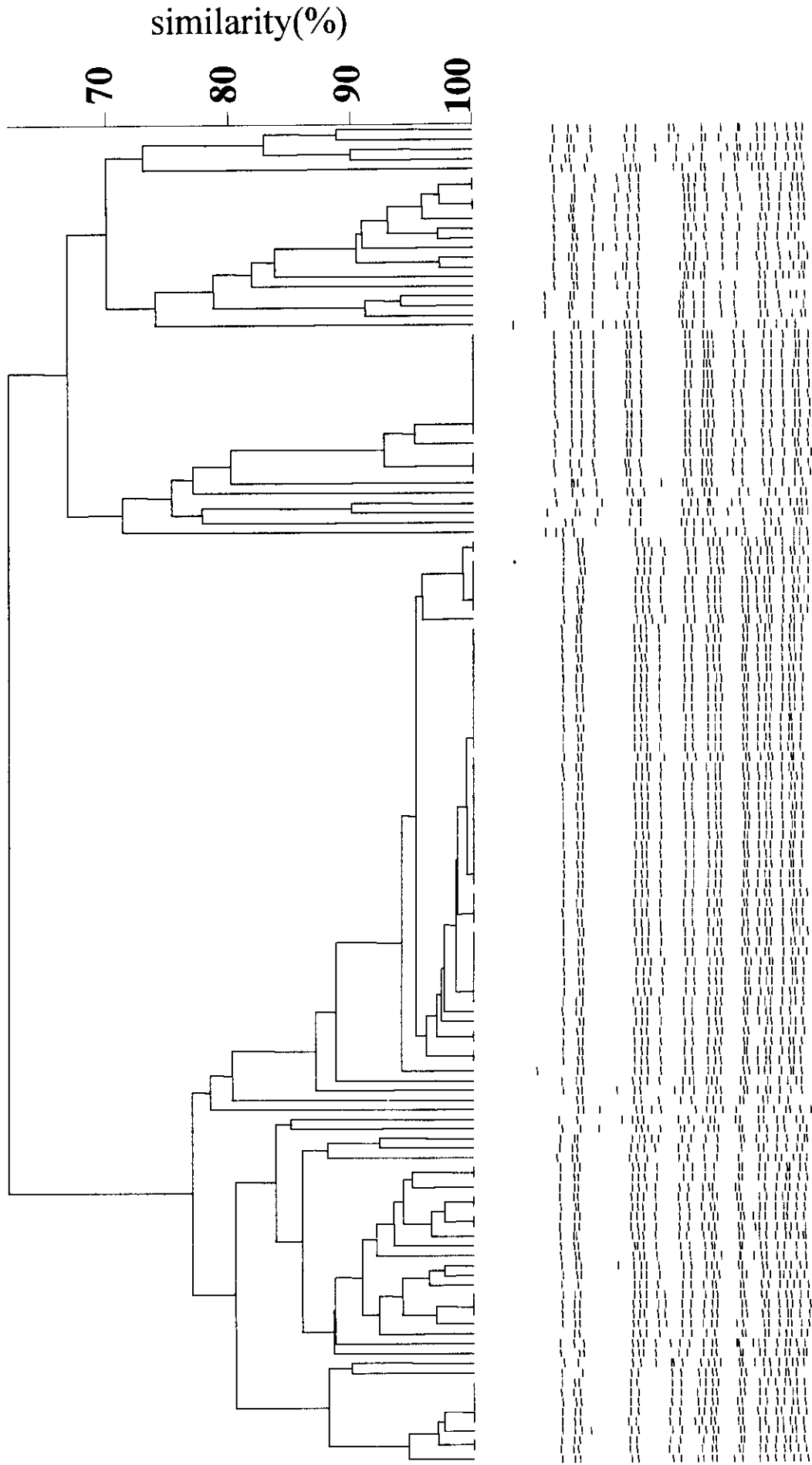
**E : Oyster**

**Mr A B C D E C E C E Mr**

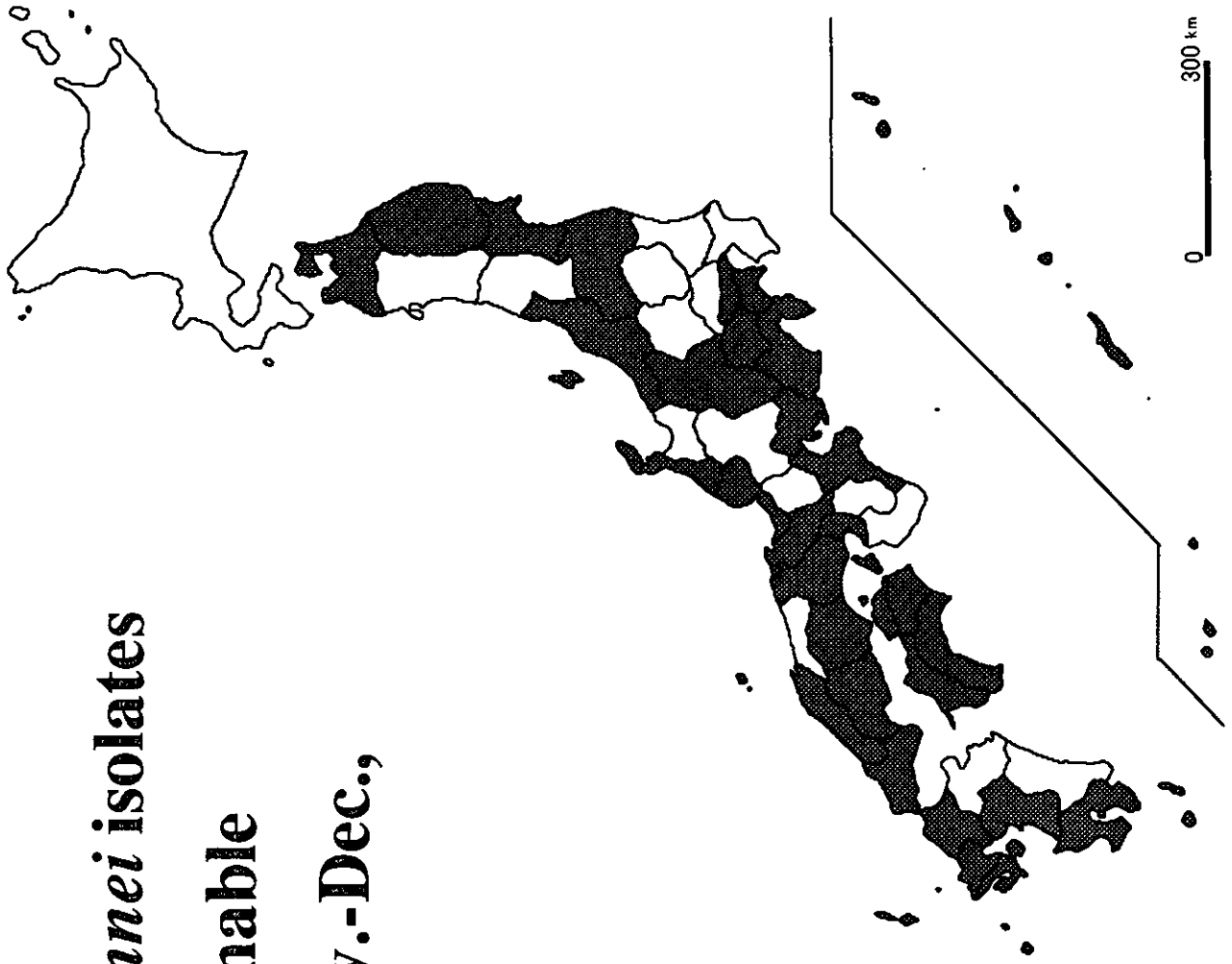


**XbaI BlnI SpeI**

图2 Dendrogram of *Shigella sonnei* isolates in 98, 99, and 2001



**图3**  
**Distribution of *S. sonnei* isolates**  
**having in distinguishable**  
**PFGE profile in Nov.-Dec.,**  
**2001, Japan**



**図4**  
**Distribution of EHEC O157:H7 isolates**  
**having indistinguishable PFGE profile**  
**in May-Oct., 2001**

