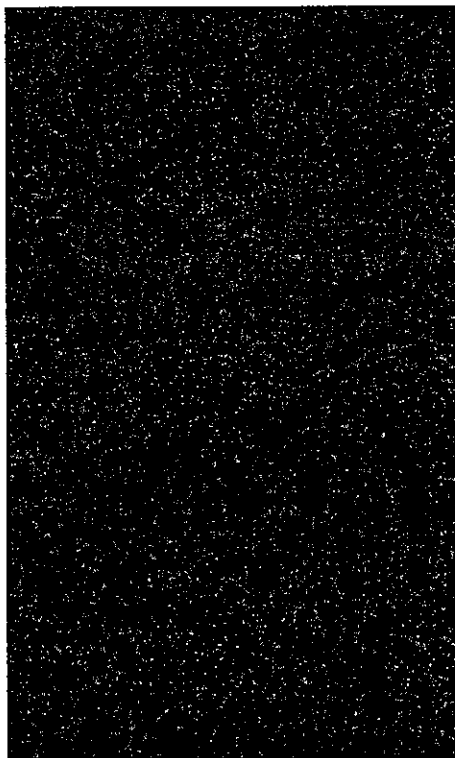


表1 保育園集団発生事例及びその前後のO26感染事例

事例番号	発生年月	形態	年齢	性	H型	STX型	薬剤耐性パターン	備考
1	H13.2~3	集団	0~3	F, M	11	1	AM, K, S, TE	再検査検出
	H13.4	2児	3	F, M	11	1	AM, K, S, TE	
2	H12.9	家族	1	F	11	1	AM	
			5	F	11	1	AM	
3	H12.9	散発?	1	F	11	1	AM	2と同地域
4	H12.9	散発	11	M	11	1	AM, K, S, TE	
5	H13.6	散発	17	F	11	1	AM, S, TE	
6	H13.7	散発	1	F	11	1	AM	
7	H13.7	散発	1	M	11	1		6と同地域
8	H13.8	散発	1	F	11	1	AM, K, S	
9	H13.8	散発	9	M	11	1	AM	

*Xba*I

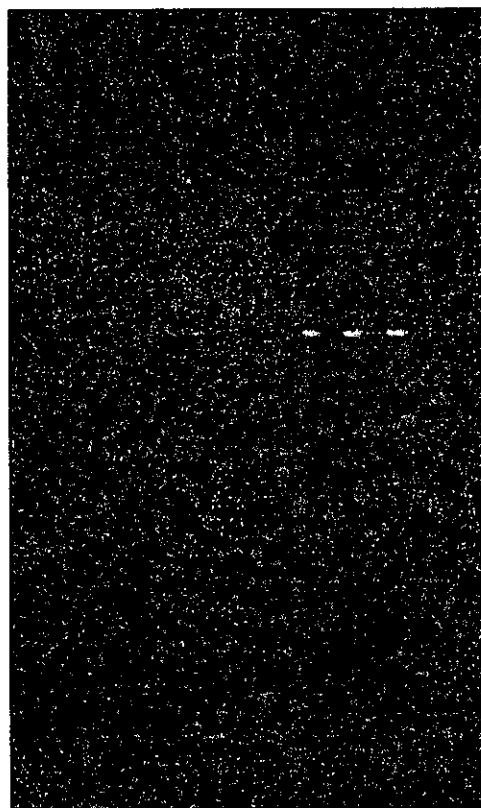
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



M : Lambda ladder
1~6 : 3月感染者由来株
7~8 : 4月分離由来株
5と7 : 同一者
6と8 : 同一者

*Bln*I

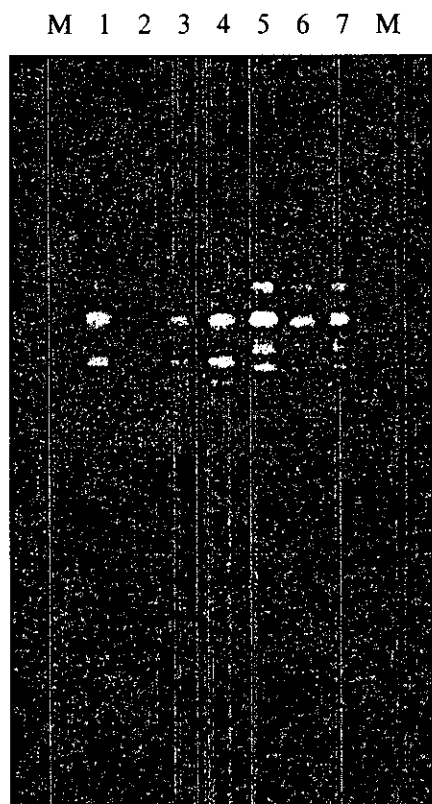
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M



M : Lambda ladder
1~6 : 3月感染者由来株
7~8 : 4月分離由来株
5と7 : 同一者
6と8 : 同一者

図1 事例1のPFGEパターン

*Xba*I



M : Lambda ladder

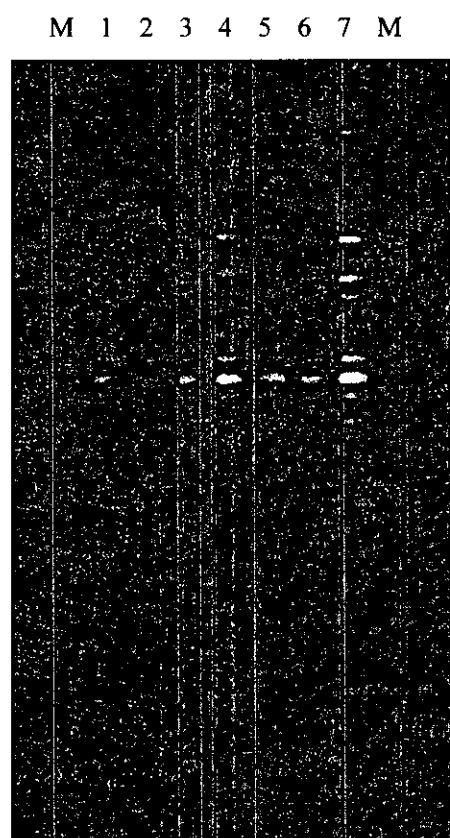
1~3 : 事例1由来株

4 : 事例4由来株

5 : 事例3由来株

6~7 : 事例2由来株

*Bln*I



M : Lambda ladder

1~3 : 事例1由来株

4 : 事例4由来株

5 : 事例3由来株

6~7 : 事例2由来株

図2 事例1と前年発生事例のPFGEパターン

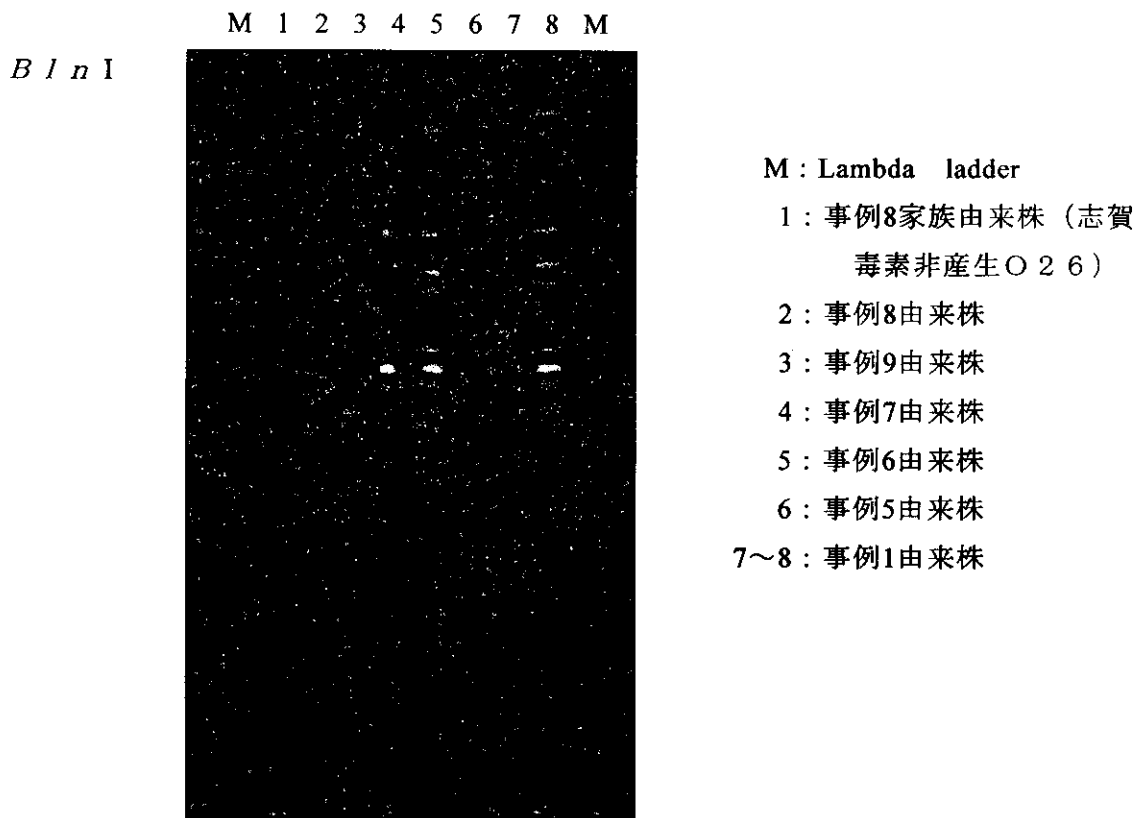
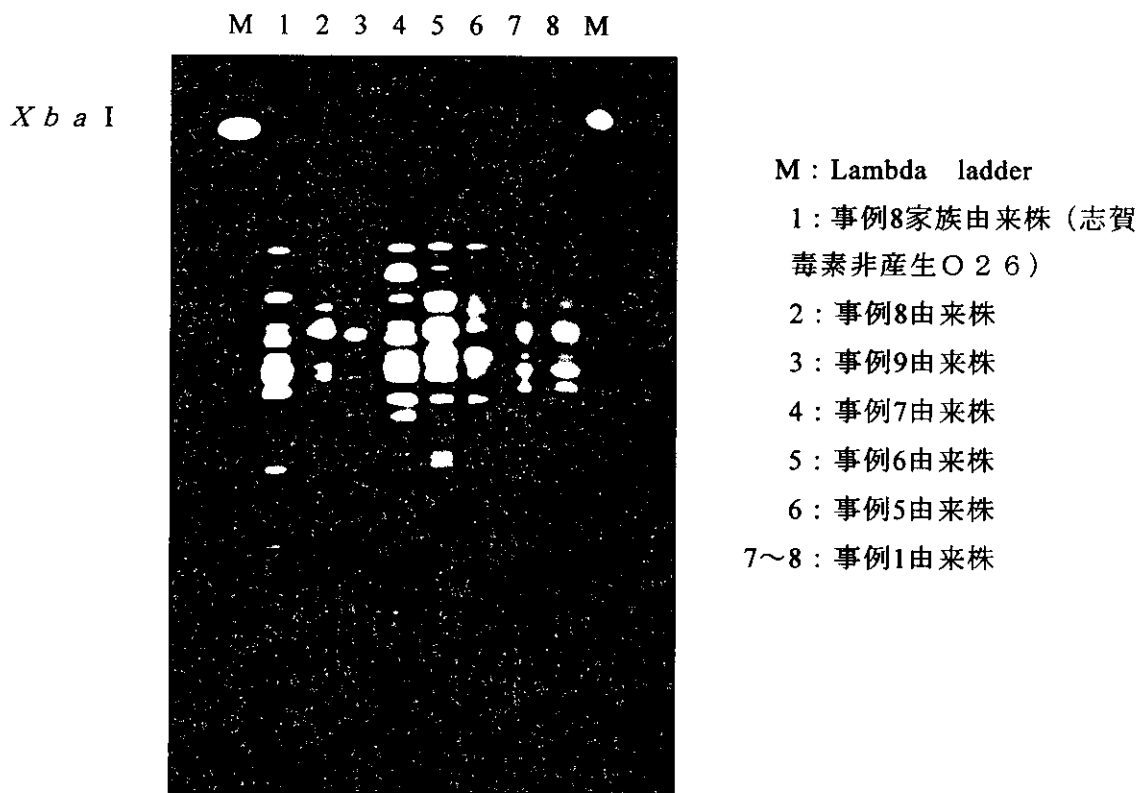


図3 事例1と以降に発生した事例のPFGEパターン

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

コレラ菌(*Vibrio cholerae* O1)のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

協力研究者	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所	微生物課主任研究員
	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所	微生物課主任研究員
	河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所	微生物課研究員
分担研究者	小林一寛	大阪府立公衆衛生研究所	微生物課長

研究要旨

わが国でのコレラ患者発生の多くは海外旅行者による輸入事例であるが、一部には国内発生と推定される事例もみられている。そこで菌株間の関連性を明らかにするために、1992年4月から2001年8月までに国内で分離され分離された *Vibrio cholerae* O1 菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いた解析を実施した。PFGE 解析ソフトを用いてデンドログラムを作成した結果、相互に関連性をうかがわせるグループが認められ、疫学調査では関連性が認められない事例があり、とくに海外旅行が原因と推定される患者のより詳細な疫学調査によって関連性を考察する必要があるものと考えられた。

A.研究目的

わが国でのコレラは過去 10 年間では毎年 51 人から 372 人の患者発生があり、その多くは発生地域への海外旅行や汚染地域から輸入された食品を介しての感染といった海外との関連が推定される事例であるが、一部にはそのいずれもが否定された国内発生と推定される事例もみられている。そこで、分離された時期や地域が異なった *Vibrio cholerae* O1 菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いた遺伝学的解析を実施し、さらにコレラ毒素産生性試験、生物型別、薬剤感受性試験、Vibriostatic agent O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine)感受性試験などの生

物学的解析法も実施して各分離菌株間の関連性をみた。

B.研究方法

1.供試菌株：

1992年4月から2001年8月までに国内で分離され *V.cholerae* O1 と同定された国内発生事例由来8株（小川型4株、稲葉型4株）と海外旅行者由来39株（小川型38株、稲葉型1株）の合計47株を実験に供した。これとは別に参照株として1978年に東京都内で集団発生したエルトール型の1株と、*V.cholerae* O1 569B 古典型1株も使用した。菌株の由来国は患者がコレラ菌に感染したと推定される国名

とし、その内訳はインドネシア 16、タイ 10、インド 4、フィリピン及び中国各 3、エジプト・ギリシャ及びマダガスカル各 1、不明 1 であった。

2. PFGE 型別：

ゲルブロックの作成と DNA の切断は和田らの方法（細菌学誌 1992；66：1067-1074）を一部改変して実施した。すなわち、菌液の調整は L プロスで 37℃ 一夜振盪培養した菌 100 μ l を滅菌生理食塩液にて洗浄し、滅菌水 300 μ l に再浮遊させることで行い、DNA 切断の制限酵素には *Not* I および *Sfi* I（ロッシュ）を用いた。電気泳動装置は Gene Navigator System (Pharmacia) を使用し、泳動バッファーは 0.5xTBE で、1%アガロースを用い、200V、パルスタイム 4~8 秒が 4.5 時間、8~4 秒が 1 分、4~8 秒が 4.5 時間、8~50 秒が 11~13 時間（*Not* I では 11 時間、*Sfi* I では 13 時間）の 4 段階のプログラムを組み合わせ、循環させる泳動バッファーの温度は 7℃、泳動時間 20 時間 1 分（*Not* I）又は 22 時間 1 分（*Sfi* I）により行った。泳動像の解析には遺伝子解析用ソフト Gel Compar II (Applied Maths) を用い、Dice の計算式で各菌株間の近似度を計算し、UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmeric averages) 方式によるクラスター分析によってデンドログラムを作成させ近似度 90%以上と 95%以上の 2 通りのパターンによって型別した。

3. コレラ毒素産生性試験：

逆受身ラテックス凝集反応 (VET-RPLA、デнка生研) を用いて行った。判定は被検液の 4 倍希釈以上で凝集のみられたものを陽性とした。RPLA で陰性の株については小林らの

PCR 法（感染症学雑誌 1990；64：1323-1329）によってコレラ毒素遺伝子の有無を調べた。

4. 生物型別：

VP テストおよびニワトリ赤血球凝集性により鑑別を行った。VP テストおよびニワトリ赤血球凝集性のいずれもが陰性のものを古典型、いずれか 1 つまたは 2 つとも陽性のものをエルトール型とした。なお、ニワトリ赤血球凝集性の確認には 3%ニワトリ血球浮遊液を用いた。

5. 薬剤感受性試験、O/129 感受性試験：

薬剤感受性試験ではアンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (STX)、ナリジクス酸 (NA)、オフロキサシン (OFX) の 8 薬剤について調べた。このうち STX についてはセンチ・ディスク (BBL) を用いた Kirby-Bauer (KB) 法で、他の 7 薬剤については、1992 年から 2000 年までに分離された 43 株は寒天平板希釈法で、2001 年に分離された 4 株と参照株については KB 法で実施した。

また、O/129 感受性試験は 10 μ g および 150 μ g の含有濃度の異なる 2 種類のディスク (OXOID) を用いてディスク拡散法により行った。

C. 研究結果

コレラ毒素産生性試験では 49 株中 6 株が RPLA において陰性となったためこれらの 6 株について PCR 法によるコレラ毒素遺伝子の検出を行ったところ、そのうち 3 株 (G13, G17, G24) は遺伝子についても陰性であった。

生物型は参照株を除く 47 株のうち 2 株が VP テスト陽性でニワトリ赤血球凝集反応陰性となり、別の 2 株が VP テスト陰性でニワトリ赤血球凝集反応陽性となったが、残り 43 株はすべて両者とも陽性であり、47 株についてはすべてエルトール型と判定した。

薬剤感受性試験では 49 株中 28 株が SM のみに耐性で、5 株が SM および STX の 2 剤に耐性、4 株が SM、STX、NA の 3 剤に耐性であった。そして、残りの 12 株は使用した 8 薬剤すべてに感受性であった。また、O/129 感受性試験では 150 μ g に耐性の株が 9 株みられた。

PFGE ではタイ由来、毒素非産生の 1 株 (G13) が泳動パターンの確認ができなかった。泳動パターンの確認できた 48 株について作成したデンドログラムより近似度 90%以上と 95%以上によりそれぞれ型別を行うと、*Not I* 切断では近似度 90%以上で 7 つの PFGE 型に、95%以上では 15 の PFGE 型に分類され、*Sfi I* 切断では近似度 90%以上で 9 つの PFGE 型に、95%以上では 20 の PFGE 型に分類された。*Sfi I* 切断の結果では、疫学調査で同一感染源と考えられる菌株間で別の型と判定されるものがみられたため今後の検討は *Not I* 解析を用いて行った。その結果、近似度 90%以上の類似性をもつ菌株をグループごとに A1 型から A7 型とすると、48 株中 30 株 (62.5%) は A1 型であった (図 1、2)。また、近似度 95%以上のものは B1 型から B15 型にグループ分類され、最も多いものは B3 型 17 株 (35.4%) であった (図 1)。A1 型に分類された 30 株のうち 17 株は近似度 95%以上でみると B3 型に分類され、このうちインドネシア由来

の 7 株 (G30,G32,G33,G34,G35,G43,G44) はすべて 1995 年のバリ島旅行者由来株であった (表 1)。

インド由来の 4 株 (G10,G15,G22,G28) は近似度 100%で他の疫学マーカーについてもすべて一致した。これと同一の B13 型を示したのはマダガスカル由来の 1 株 (G18) のみで、インド由来株との相違点は薬剤耐性型が SM・STX であったことと、生化学的性状試験で、インドールが 2 日目で陽性になったことであった (表 2)。

1994 年のタイ由来の 3 株中 2 株 (図 1 中の G39 と G41) は同一グループの旅行者由来であり感染源が同じであると考えられたが、90%以上の近似度でみてもお互いに異なる PFGE 型 (A1 型と A2 型) であった。

B4 型の 11 株は近似度 96%以上の菌株であるが (図 1)、そのなかでも 1994 年と 1996 年のタイ由来の 1 株ずつ (G52,G38) と、1995 年の国内発生由来の 1 株 (G37)、1999 年のフィリピン由来の 1 株 (G12) の 4 株が近似度 100%の菌株であり、また 2001 年に分離された 4 株 (G5,G7,G8,G9) と、1997 年のインドネシア由来の 1 株 (G26)、1998 年のフィリピン由来の 1 株 (G23) の 6 株はそれぞれ近似度 100%の菌株であり、同一菌株によるものと判定された (表 3)。なお G8 と G9 は 8 月に大阪府下で発生した食中毒事例由来株、G5 は 6 月に大阪府下で発生した散発事例由来株であったが疫学調査では 2 事例間に関連は認められなかった。そして、1997 年の中国由来の 1 株 (G21) はこれらの 2 グループとは 96~97%の近似度を示した。

コレラ毒素遺伝子陰性の 3 株のうち 1 株は

泳動パターンが確認できないタイ由来株 (G13)であり、1株はエジプト・ギリシャ由来 (G17)で PFGE 型は A3 型・B7 型、もう1株はインドネシア由来 (G24)で A7 型・B15 型で、この菌株 (G24)は今回調べた他の *V.cholerae* O1 株とは著明に異なった PFGE 型であった。

D. 考察

A1 型はフィリピンや、タイ、インドネシア、わが国由来株に優勢にみられ、さらに、これらの株の中には近似度 95%以上でみても同一の PFGE 型 (B3 型)に分類されるものが多かったため、これらの 4 カ国の間に何らかの関連性が推定された。また地理的には離れた位置にあるインド由来の 4 株 (1996 年から 1999 年にかけて分離) とマダガスカル由来の 1 株 (2000 年に分離) がすべて A5 型・B13 型に型別されたことは、この両国由来株の間においても何らかの関連性があるものと思われた。

タイ由来株では同じ原因によって感染した可能性が高い同一旅行者由来の 2 株 (G39,G41)がそれぞれ異なる PFGE 型に分類されたことから、タイでは由来が異なるコレラ菌が存在していたものと考えられた。

2001 年に分離された 4 株 (G5,G7,G8,G9)はすべて同じ B4 型に分類され、他の性状についても血清型以外はすべて一致し、これらと同一の PFGE 型を示した他の 7 株

(G12,G21,G23,G26,G37,G38,G52)とも薬剤耐性型とニワトリ赤血球凝集性でしか違いがみられなかったことから、これらの 11 株の間にも関連性が示唆された。

日本国内でみられるコレラ患者の多くは海外旅行などで外国に滞在し、その滞在先でコレラ菌に感染し帰国した人々と考えられることから、複数の国へ旅行した患者の場合の感染国および感染源を特定することは困難な作業となる。そのような場合に、分離菌株間の各種の生物学的疫学マーカーの解析や疫学調査などに加えて、PFGE などの遺伝学的解析を行うことでより多くの情報が得られ、感染国あるいは感染源の特定に役立つものと考えられる。

E. 結論

Not I 解析において近似度 95%以上での PFGE 型は 15 の型に分類され、相互に関連性をうかがわせる 3 つの大きなグループを認めた (B3 : 17 株、B4 : 11 株、B13 : 5 株) が、疫学調査では関連性が認められない事例があり、とくに海外旅行が原因と推定される患者のより詳細な疫学調査によって関連性を考察する必要があるものと考えられた。

F. 研究発表

なし。

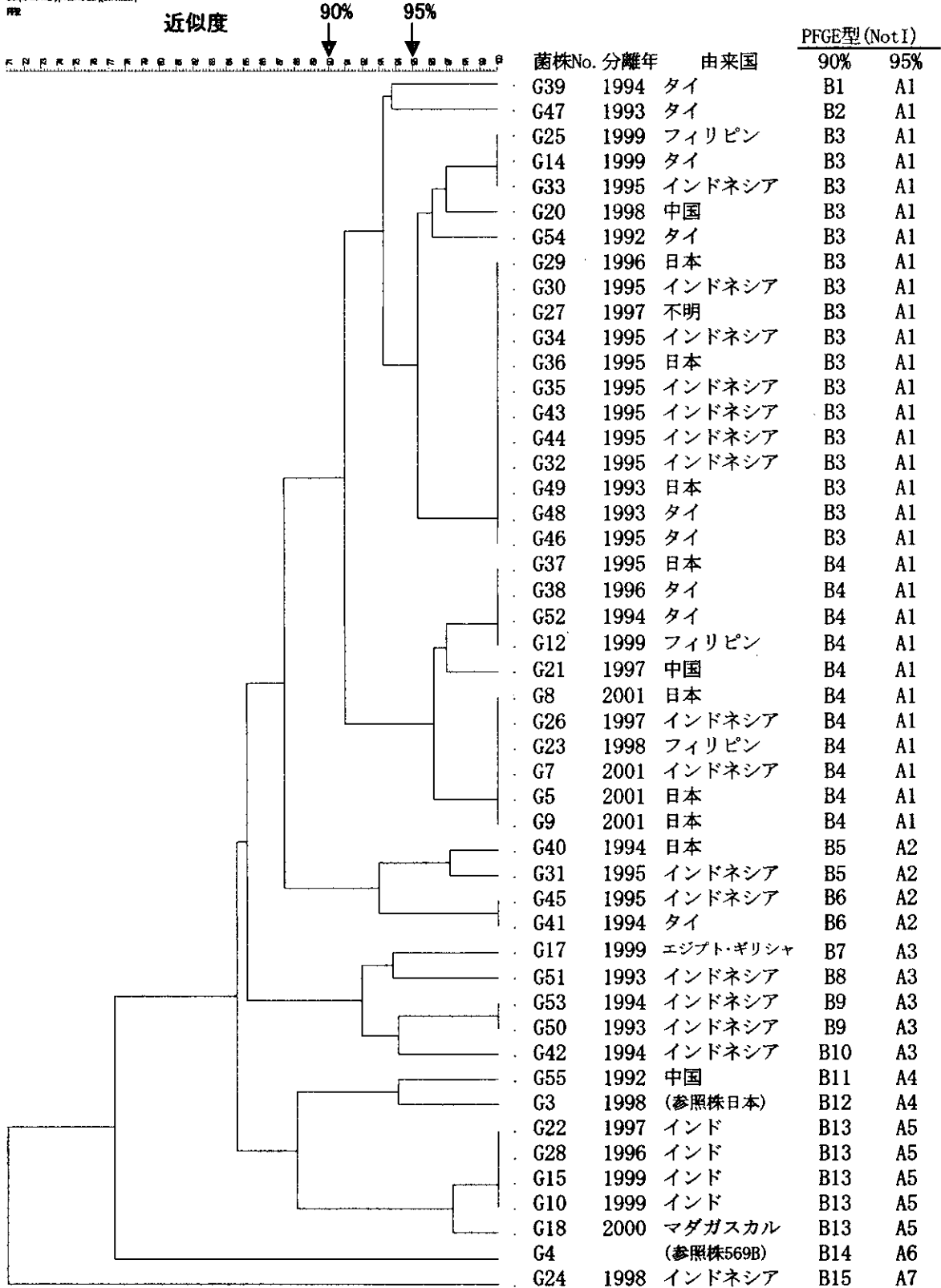


図1 NotI 切断でのデンドログラム

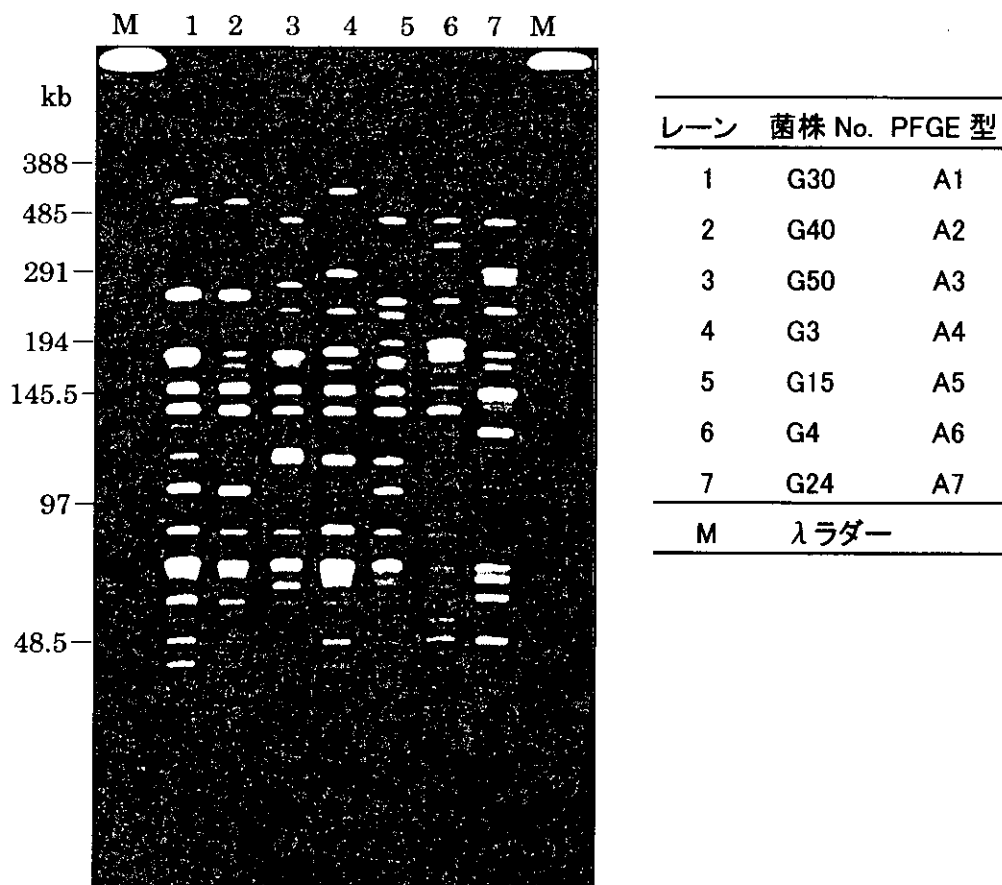


図2 *NotI* 切断の PFGE 型 (代表株)

表1 由来国別 PFGE(*Not I*)型

PFGE 型 90% 95%	国内	インドネ シア	タイ	インド	フィリ ピン	中国	エジプト ギリシャ	マダガ スカル	不明	1978年 東京	569B	合計
A1 B1 B2 B3 B4			1									1
			1									1
	3	7	4		1	1			1			17
	4	2	2		2	1						11
A2 B5 B6	1	1										2
		1	1									2
A3 B7 B8 B9 B10							1					1
		1										1
		2										2
		1										1
A4 B11 B12						1						1
										1		0
A5 B13				4				1				5
A6 B14											1	0
A7 B15		1										1
合計	8	16	9	4	3	3	1	1	1	1	1	48

表2 インド由来株とマダガスカル由来株の性状

		インド由来4株	マダガスカル由来1株
菌株 No.		G10,G15,G22,G28	G18
分離年		1996 から 1999	2000
PFGE 型	90%	A5	A5
	95%	B13	B13
コレラ毒素		+	+
VP		+	+
ニワトリ赤血球凝集性		+	+
O/129(150μg)		耐性	耐性
薬剤耐性型		SM,NA.STX	SM, STX
インドール		+	2日培養で+

表3 B4型の由来国と性状

分離年	菌株 No.	由来国	株数	血清型	コレラ毒素 産生性	VP	ニワトリ赤血球 凝集性	O/129 (10μg)	薬剤耐性型
2001	G5,G8,G9	国内	3*1	稲葉	+	+	+	感受性	感受性
2001	G7	インドネシア	1*1	小川	+	+	+	感受性	感受性
1994	G52	タイ	1*2	小川	+	+	+	感受性	SM
1995	G37	国内	1*2	小川	+	+	+	感受性	SM
1996	G38	タイ	1*2	小川	+	+	+	感受性	SM
1997	G26	インドネシア	1*1	小川	+	+	+	感受性	SM
1997	G21	中国	1	小川	+	+	-	感受性	SM
1998	G23	フィリピン	1*1	小川	+	+	+	感受性	SM
1999	G12	フィリピン	1*2	小川	+	+	+	感受性	SM

*1:それぞれ 100%一致

*2:それぞれ 100%一致

別紙5 研究成果に関する一覧表

学術雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
横田昇平 ほか	保育園で発生した腸 管出血性大腸菌 O26 の集団感染事例－京 都府	病原微生物検出情報	23	16-17	2002

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成13年度分担研究報告書

パルスフィールドゲル電気泳動法（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

分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者 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

研究要旨

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。

A. 研究目的

PFGE による遺伝子解析は細菌性食中毒・感染症の疫学調査に広く用いられている。そして、この PFGE によって解析された情報の全国的なネットワークであるパルスネットの構

築が考えられている。

本研究では、2001 年に中・四国地区で発生したサルモネラ食中毒事例、赤痢の散発的集団発生事例、O157 感染事例の3事例について、各施設が作製した PFGE 画像を画像解析プログ

ラムソフトにより、疫学的解析を行い、PFGE 解析の有効性と信頼性を検討することにより、パルスネット構築のための基礎的研究とした。

B. 研究方法

1. サルモネラ食中毒事例の PFGE 解析

2001年10月、A県で製造されたアイスクリームを原因とした *Salmonella* Enteritidis による集団食中毒が発生した。このアイスクリームは隣接するEH県でも販売されていたことから、両県の小児を中心に散在的集団発生が認められた。EH県で収去したアイスクリームと、そのアイスクリームを食べた小児の便からサルモネラが分離されたことから、EH県のEH施設でPFGEによる解析を実施した。

1) 供試菌株

供試菌株は図1に示した *Salmonella* Enteritidis 10株を用いた。EHSE131とEHSE127が今回の事例から分離された菌株で、ファージ型はともに47であった。他の8株は、EH施設が保存するEH県の食中毒事例から分離された食品および患者由来株である。一方、A県のA施設で行ったPFGEに供試した菌株を図2に示した。AS1は原因食品のアイスクリーム由来株、AH1～AH5の5株は喫食調査でアイスクリームを食べた患者から分離された菌株、AR1～AR5の5株は今回の食中毒と同時期

に医療機関で採取された便から分離された菌株である。また、ASE1はA県内の液卵製造施設の液卵から2001年5月に分離された菌株である。

2) PFGE 試験法

EH施設では制限酵素 *Xba* I (30U) と *Bln* I (30U) で、A施設では *Bln* I (30U) を用いて、供試菌株を酵素処理した。泳動条件は両施設とも電圧 6V/cm、パルスタイム 5-50sec、21時間とし、それ以外の試薬、検査手技等は、感染研によって示されたO157の解析法に準拠した。泳動後のPFGE画像を写真撮影し、その写真を愛媛県立衛生環境研究所において画像解析プログラムソフト (GelComper II) を用いて解析した。

2. 赤痢の散発的集団発生事例の PFGE 解析

2001年11月下旬から西日本を中心に、カキが感染源とみられるソネ菌による赤痢が発生した。患者は30都道府県、159名(12月27日現在)にもおよび、中・四国地区でも認められた。この事例に際し、EH施設では本事例由来株と保存株(主に海外渡航者由来株)を、E施設ではE県以外の地域から分離された菌株も収集し、PFGE解析によりPFGEパターンを比較した。

1) 供試菌株

EH施設で供試した *Shigella sonnei* 10株を図6に示した。今回の

事例に関連した菌株は EHSS156 で、カキを喫食した患者から分離された。海外渡航者由来株は6株で、渡航先は、タイ、中国、タジキスタン、インド、ネパールであった。他の3株は2000年に静岡県と福岡県の小児、愛媛県のすし店従業員から分離された菌株である。E施設で供試した菌株はE施設管内の生カキ摂取者から分離された4株、神奈川県、三重県、福岡県の生かき摂取者から分離された4株である。また、検査対照菌株として、今回の事例とは関連性がないと推察された散発性患者由来株2株と集団事例由来株1株を用いた。(図7)

2) PFGE 試験法

E H施設では制限酵素 *Xba* I (30U) と *Bln* I (30U) で、E施設では *Xba* I (30U) を用いて供試株を酵素処理した。泳動条件および泳動後の解析は前項で示したサルモネラの方法と同じである。

3. O157 感染事例の PFGE 解析

PFGE 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、感染研のPFGE型別でIIaIIaI type577とされた菌株の画像を画像解析プログラムソフトで解析し、特定の菌株に対する施設間の類似度を調べた。

1) 供試菌株

2001年に各施設が分離・収集し、感染研でPFGE型別が行われた腸管

出血性大腸菌O157:H7を対象とした。参加施設は6施設(EH、A、B、C、D、E施設)で、各施設が供試した菌株のPFGE型は図11.12.13.14.15.16に示したとおりである。IIaIIaI type577とされる菌株は18株であった。

2) PFGE 試験法

各施設とも *Xba* I (30U) を用いて供試菌株を酵素処理した。泳動条件は電圧6V/cm、パルスタイム4-8sec、9時間、8-50sec 13時間とした。泳動後の解析は前項で示した、サルモネラの方法と同じである。

C. 研究結果

1. サルモネラ食中毒事例の PFGE 解析

E H施設とA施設で実施したPFGEの画像を図1、図2に示した。また、画像解析プログラムソフトによるデンドログラムを図3、図4に示した。EH施設の保存菌株のPFGパターンが6種類以上に分類されたのに対して、アイスクリーム由来株およびアイスクリームを摂取して発症した患者から分離された菌株のPFGEパターンは完全に一致した。また、アイスクリームの喫食が確認されていないものの今回の食中毒とほぼ同時に医療機関で採取された便からの菌株も1株を除いて、ほぼ一致した。さらに、食中毒発生以前の2001年5月に液卵から分離された菌株は、アイスクリーム由来株、患者由来株のPFGEパタ

ーンと一致した。一方、EH施設のデンドログラムにおいて、サツマ汁由来株(EHSE61)と患者由来株(EHSE4)とは類似したパターンを示した(類似度95%)。これらの菌株は異なる食中毒事例からの分離株であった。図5にEH施設とA施設のPFGE画像を合せて解析したデンドログラムを示した。今回の食中毒で、同一と推察される12株は95%以上の類似度で一致し、他の菌株のパターンとは明らかに区別された。

2. 赤痢の散発的集団発生事例のPFGE解析

EH施設とE施設が実施したPFGEの画像を図6、図7に示した。また、画像解析ソフトによるデンドログラムを図8、図9、図10に示した。EH施設のPFGE画像およびデンドログラムの解析から今回の赤痢患者から分離された菌株(EHSS156)のPFGEパターンは、中国からの帰国者から分離された菌株のパターンと非常に類似していた。これは*Bln I*を用いたPFGEパターンでも同様であった。また、E施設のPFGE画像によるデンドログラム解析からE施設管内の生カキ摂取患者由来株の4株と、神奈川県、三重県、福岡市から収集した4株はいずれも類似していたが(類似度90%以上)対照菌株とした3株(ESH99006、ESH10、ESH01003)とは明らかに異なっていた。

3. O157感染事例のPFGE解析

6施設で実施したO157:H7のPFGE画像を図11-16に示した。A施設の画像はラインの流れが均一でなく、B施設の画像はラインがスメア一状となり各バンドが不明瞭で、ともに他の画像と比較することが困難であった。4施設の画像は概ね判読できたが、DNA断片の濃度が濃く、バンドの位置が明確に判定できない画像もあった。この4施設の画像から感染研のPFGE型別でIIaIIaI type577とされた菌株の画像を選び出し、デンドログラム上で類似度を比較したところ、約80~100%の類似度であった(図17)。

D. 考察

都道府県のような行政単位を越えて患者が散発的に発生するdiffuse outbreakの多くは、疫学調査を詳細に行うことができないため、感染源、感染経路を特定することは難しい。今回、中・四国地区で発生し、本研究の対象としたサルモネラ食中毒事例と赤痢の散発的集団発生事例ではPFGE解析を行う事により、同一の感染源であることが示唆され、喫食調査の結果を裏付けることができた。特に2県にまたがって発生したサルモネラ食中毒事例では、PFGEを解析し、その情報を2施設間で交換することにより、起因菌の特定、原因食品の特定、潜在的食中毒患者の検出、感染源の推察など発生の実態をより詳細に把握することができた。

一方、このようなPFGE解析の有効性をもとに、PFGE解析を基礎とし

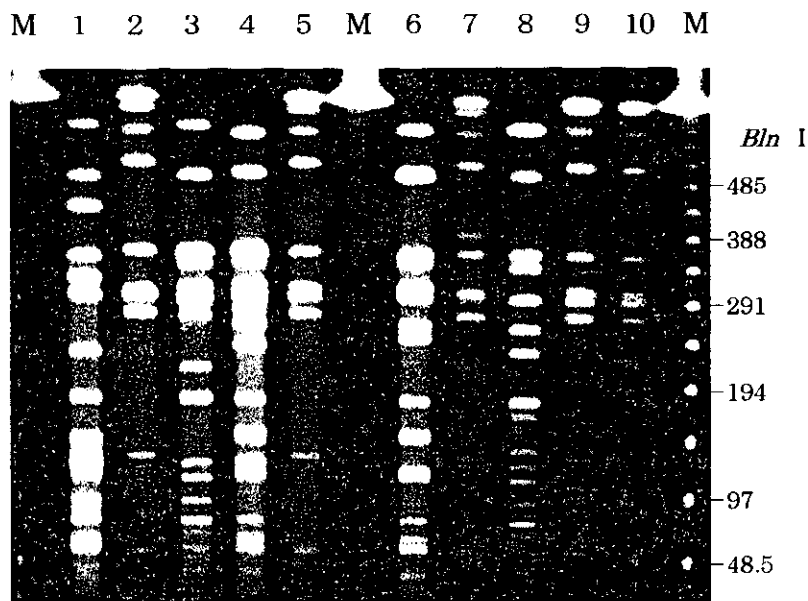
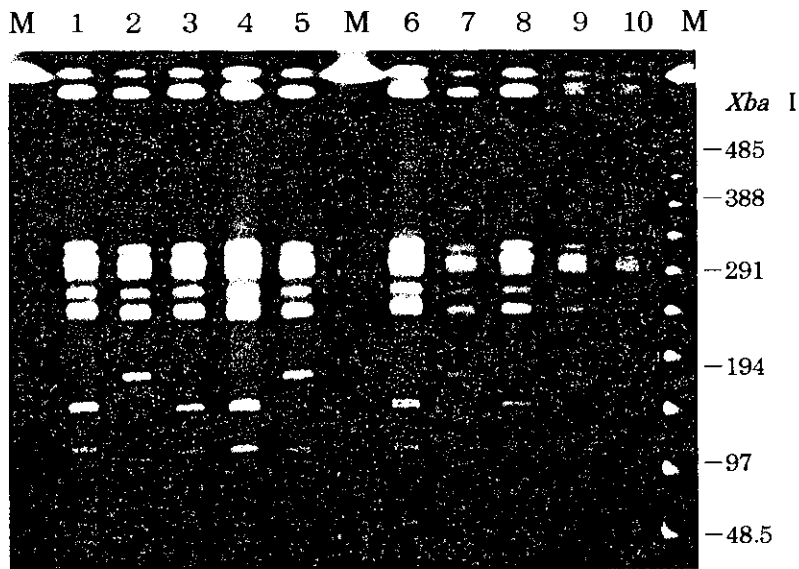
たパルスネットの構築が考えられている。しかし、今回の研究においても、各施設の PFGE 画像の一部には不明瞭なバンドやマーカの乱れなどが認められた。また、特定の PFGE 型とされた菌株画像の類似度も施設間で差異が生じた。この原因については、解析者のバンド判読のちがいによる差異などが考えられるが、施設の技術的信頼性を高めるには解析者のトレーニング等も含め PFGE 解析技術の標準化とそれに伴う精度管理の必要があると考える。

E. 結論

PFGE 画像を画像解析プログラムにより解析することは、食中毒・感染症の疫学調査において有効な手法となることが示唆された。一方、パルスネットを構築し、その信頼性を維持するには、PFGE 解析の標準化と精度管理が必要と思われる。

F. 研究発表

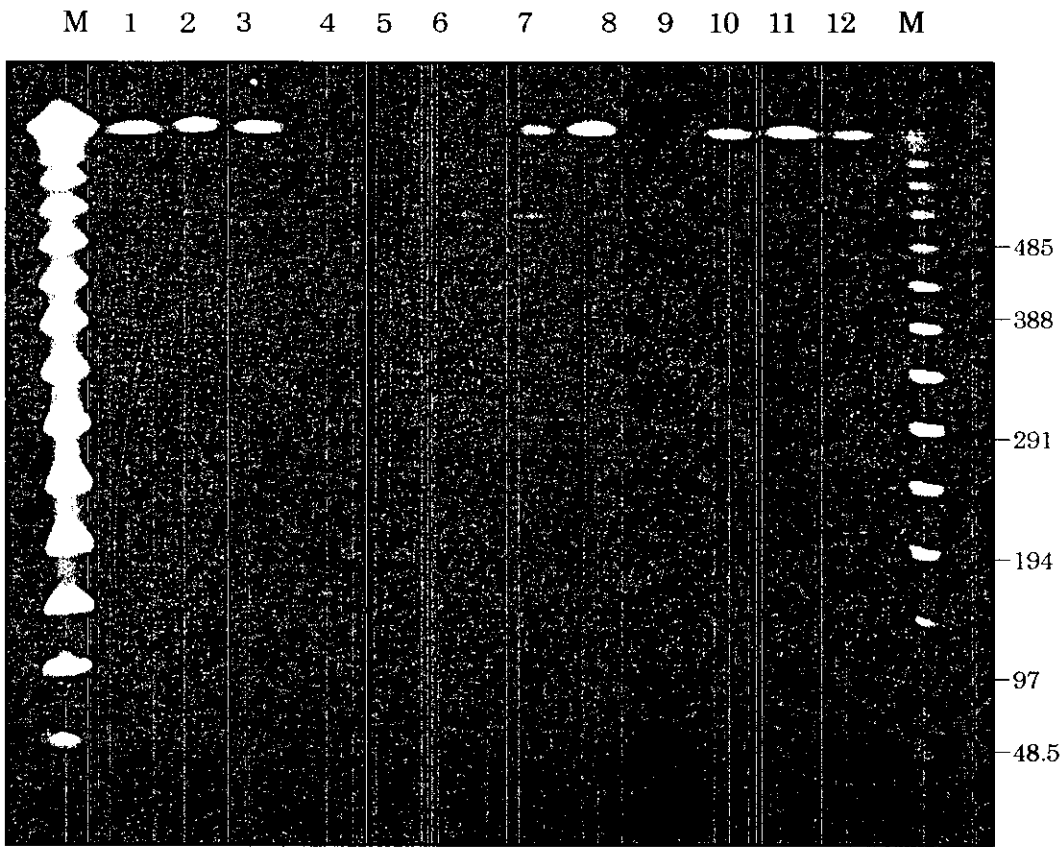
なし



レーン 1 : EHSE71	胡麻あえ由来株	ファージ型 1
レーン 2 : EHSE61	サツマ汁由来株	ファージ型 4
レーン 3 : EHSE 6	流しのふきとり	ファージ型 1
レーン 4 : EHSE41	まき寿司由来株	ファージ型 1
レーン 5 : EHSE 4	患者便由来株	ファージ型 4
レーン 6 : EHSE18	従事者由来株	ファージ型 1
レーン 7 : EHSE77	マヨネーズ由来株	ファージ型 4
レーン 8 : EHSE81	ケーキ由来株	ファージ型 1
レーン 9 : EHSE131	アイスクリーム由来株	ファージ型 47
レーン 10 : EHSE127	患者便由来株	ファージ型 47

M : lambda ladder

図 1. EH施設における *S. Enteritidis* の PFGE パターン



レーン 1 : AS 1	イチゴアイス由来株	2001年10月分離	
レーン 2 : AH 1	患者便由来株	アイスクリーム食中毒に関連	}
レーン 3 : AH 2	患者便由来株		
レーン 4 : AH 3	患者便由来株		
レーン 5 : AH 4	患者便由来株		
レーン 6 : AH 5	患者便由来株		
レーン 7 : AR 1	便由来株	アイスクリーム食中毒との関連 性は不明 食中毒とほぼ同時期に分離	}
レーン 8 : AR 2	便由来株		
レーン 9 : AR 3	便由来株		
レーン 10 : AR 4	便由来株		
レーン 11 : AR 5	便由来株		
レーン 12 : ASE1	A 県内の液卵製造施設の液卵からの菌株		2001年5月分離

M : lambda ladder

図2 A施設における *S. Enteritidis* の PFGE パターン (*Bln I*)



図3 EH施設における *S.Enteritidis* のデンドログラム

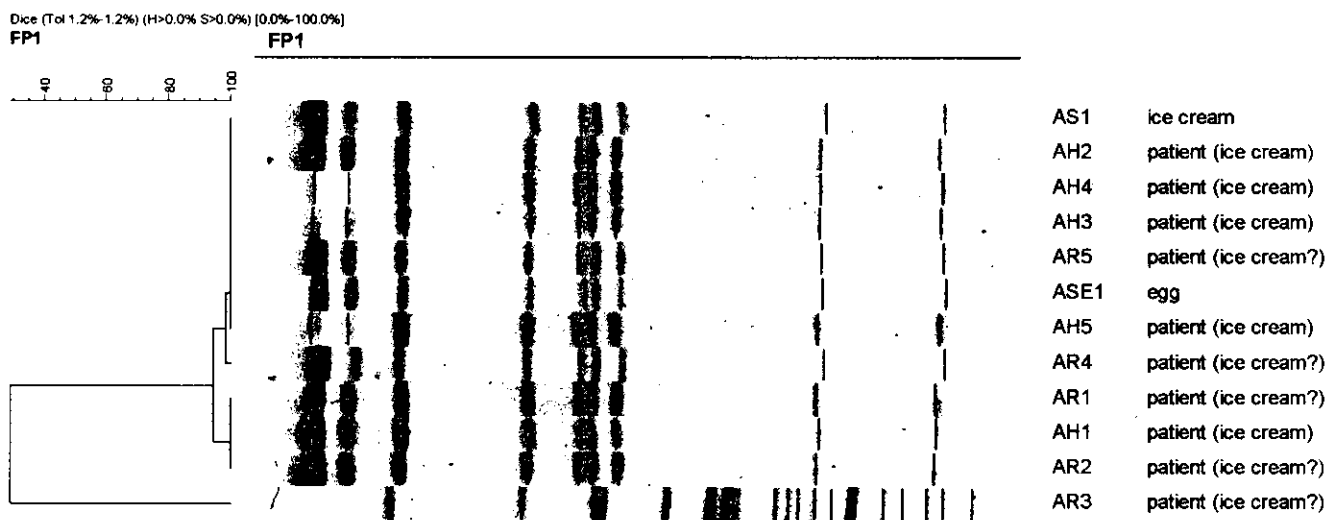


図4 A施設における *S.Enteritidis* のデンドログラム

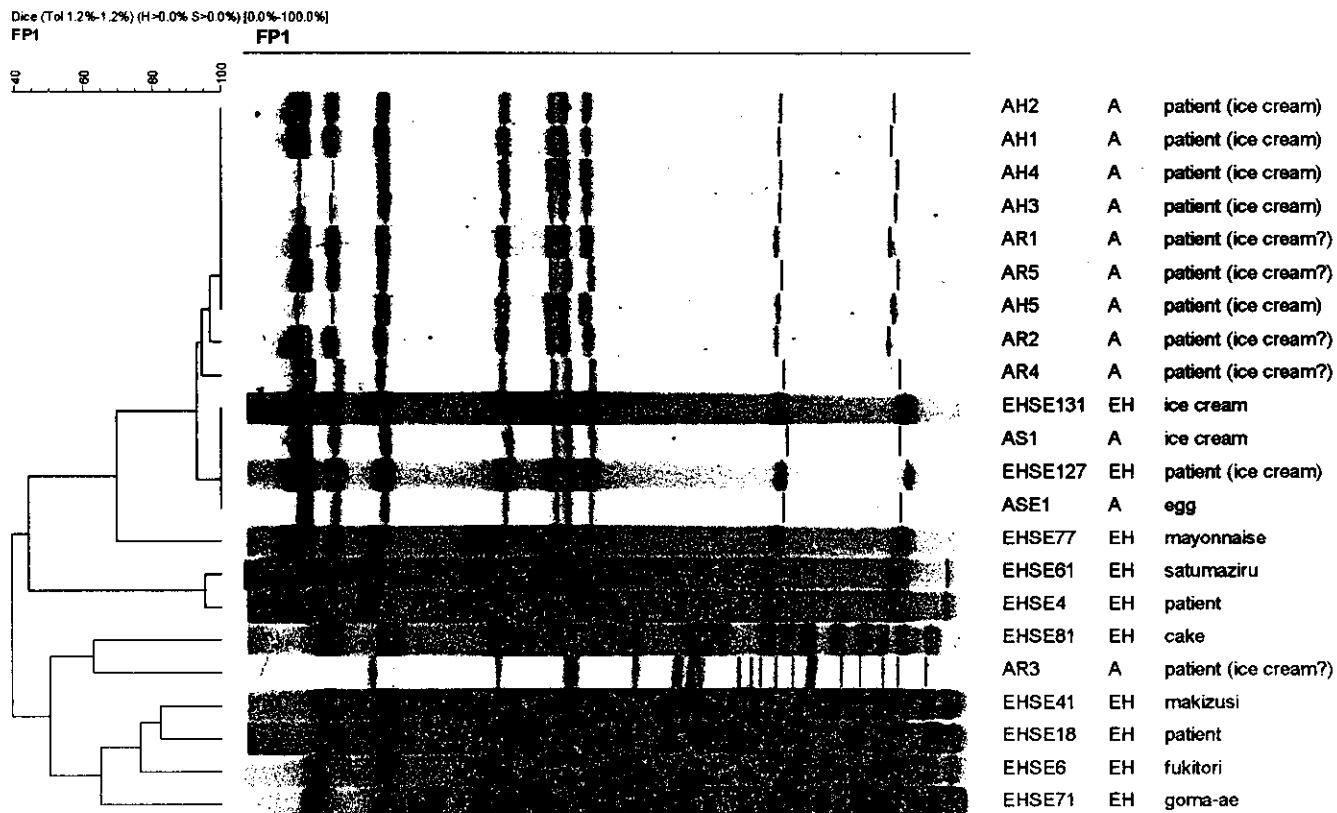


図5 EH施設とA施設で解析した *S.Enteritidis* のデンドログラム