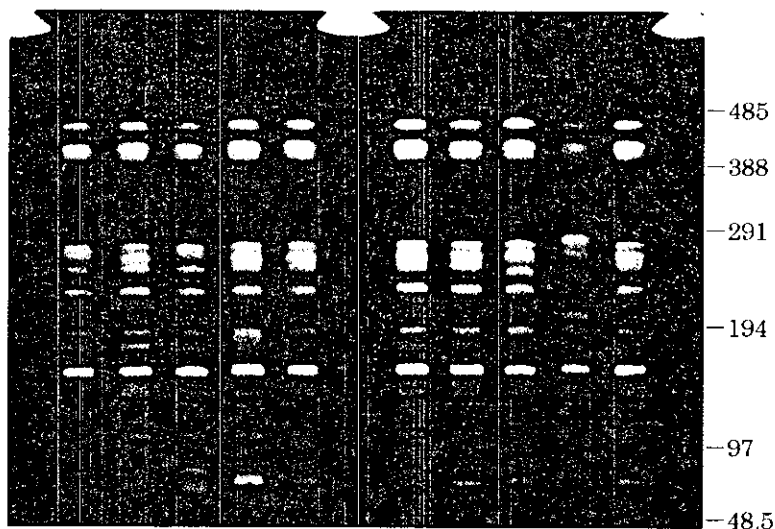
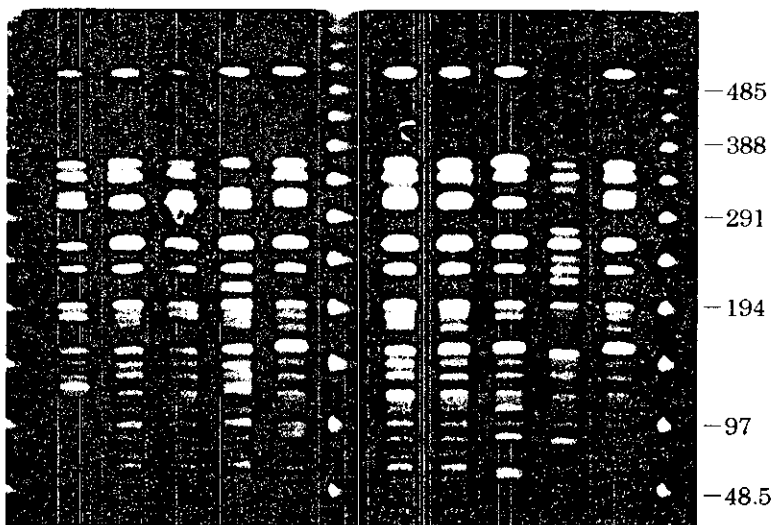


M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M *Xba* I



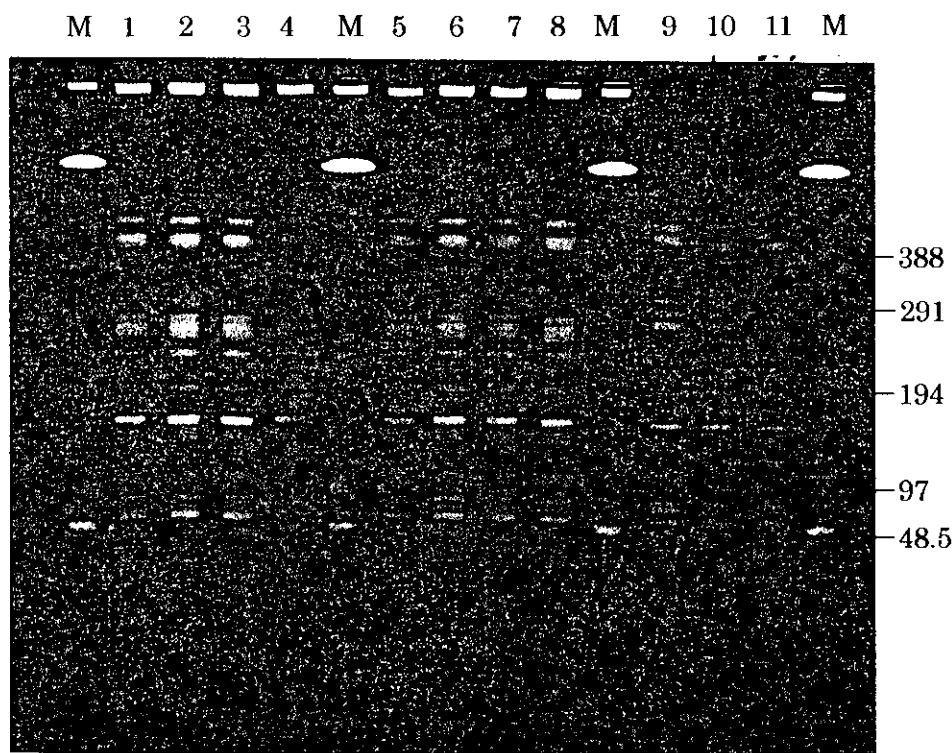
M 1 2 3 4 5 M 6 7 8 9 10 M *Bln* I



- レーン 1 : EHSS179 海外渡航者由来株 タイ
- レーン 2 : EHSS181 海外渡航者由来株 タイ
- レーン 3 : EHSS163 国内集団事例 愛媛 すし
- レーン 4 : EHSS197 国内集団事例 静岡
- レーン 5 : EHSS205 国内集団事例 福岡
- レーン 6 : EHSS243 海外渡航者由来株 タイ
- レーン 7 : EHSS101 海外渡航者由来株 中国
- レーン 8 : EHSS105 海外渡航者由来株 タジキスタン
- レーン 9 : EHSS114 海外渡航者由来株 インド ネパール
- レーン 10 : EHSS156 かき摂取患者由来株

M : lambda ladder

図 6. EH施設における *S. sonnei* の PFGE パターン



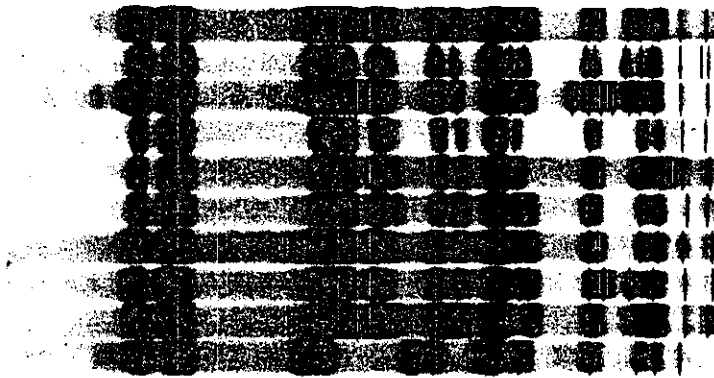
レーン 1 : ESH01007	2001.12 分離	生カキ摂取患者	タイプ A
レーン 2 : ESH01008	2001.12 分離	生カキ摂取患者	タイプ A
レーン 3 : ESH01009	2001.12 分離	生カキ摂取患者	タイプ A
レーン 4 : ESH01012	2001.12 分離	生カキ摂取患者	タイプ A
レーン 5 : ESH01013	2001.12 分離	生カキ摂取患者	神奈川県から分与
レーン 6 : ESH01014	2001.12 分離	生カキ摂取患者	福岡市から分与
レーン 7 : ESH01015	2001.12 分離	生カキ摂取患者	福岡市から分与
レーン 8 : ESH01016	2001.12 分離	生カキ摂取患者	三重県から分与
レーン 9 : ESH99006	1999 分離	散発患者	
レーン 10 : ESH 1 0	2000 分離	愛媛県集団事例 (すし) 関連株	
レーン 11 : ESH01003	2001 分離	散発患者	
M : lambda ladder			

図 7. E施設における *S. sonnei* の PFGE パターン (*xba*I)

Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

FP1

FP1



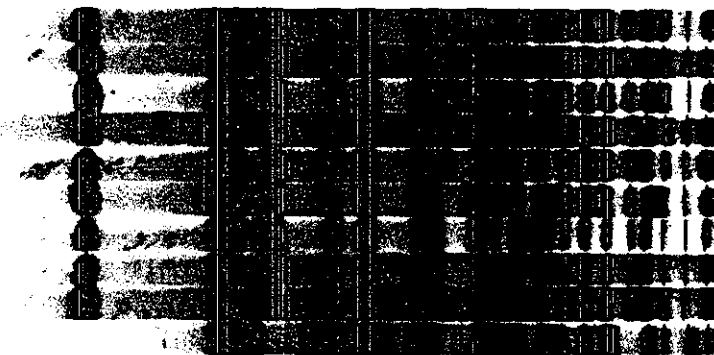
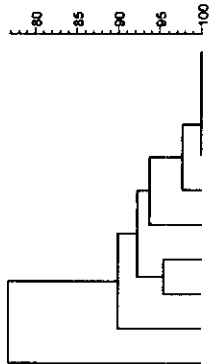
- EHSS101 patient(china)
- EHSS156 patient(kaki)
- EHSS105 patient(tazikisutan)
- EHSS179 patient(thai)
- EHSS163 patient(susi)
- EHSS181 patient(thai)
- EHSS243 patient(thai)
- EHSS205 patient(fukuoka)
- EHSS197 patient(shizuoka)
- EHSS114 patient(india)

図8 EH施設における *S. sonnei* のデンドログラム (Xba I)

Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

FP1

FP1



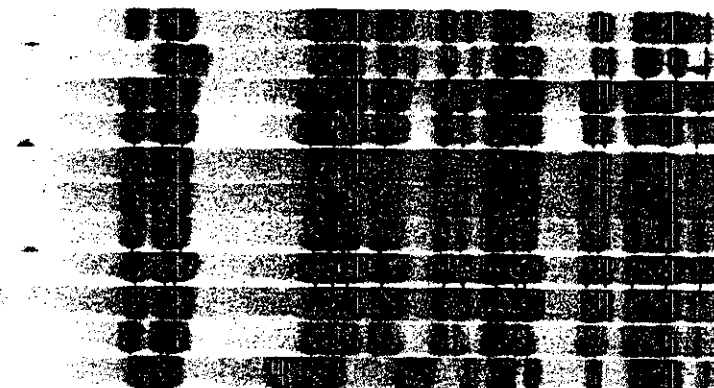
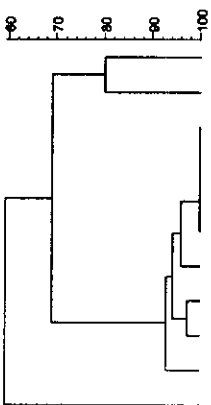
- EHSS205 patient(fukuoka)
- EHSS101 patient(china)
- EHSS156 patient(kaki)
- EHSS243 patient(thai)
- EHSS181 patient(thai)
- EHSS105 patient(tazikisutan)
- EHSS179 patient(thai)
- EHSS163 patient(susi)
- EHSS197 patient(shizuoka)
- EHSS114 patient(india)

図9 EH施設における *S. sonnei* のデンドログラム (Bln I)

Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

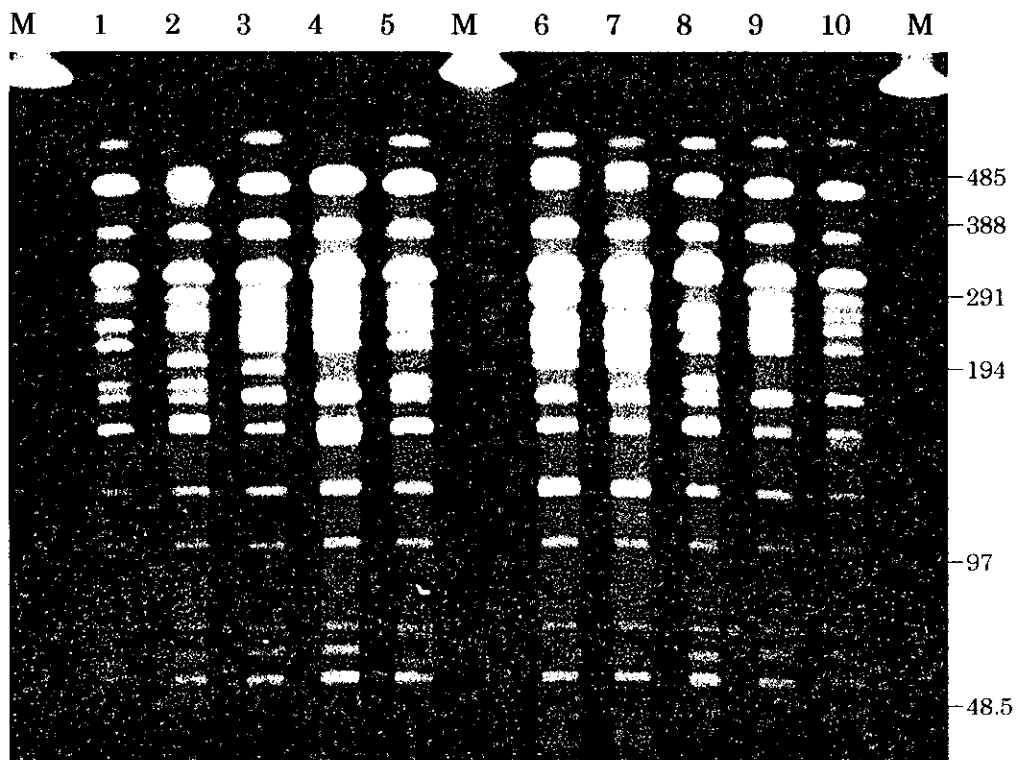
FP1

FP1



- ESH10 patient(susi)
- ESH11 patient
- ESH01008 patient(kaki)
- ESH01007 patient(kaki)
- ESH01015 patient(kaki)
- ESH01014 patient(kaki)
- ESH01013 patient(kaki)
- ESH01009 patient(kaki)
- ESH01016 patient(kaki)
- ESH01012 patient(kaki)
- ESH9 patient

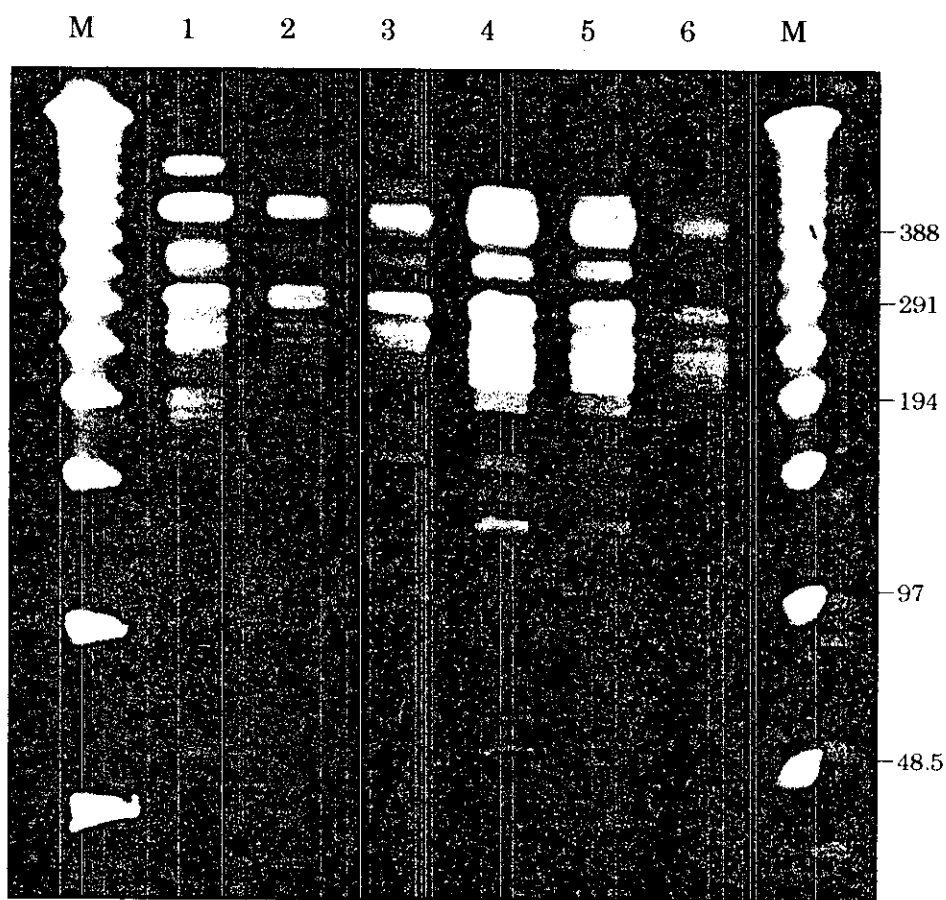
図10 E施設における *S. sonnei* のデンドログラム



レーン 1 : EH56	II b II b I
レーン 2 : EH60	II a ND ND
レーン 3 : EH72	II a II a I same as EH1
レーン 4 : EH80	II a ND I same as EH2
レーン 5 : EH82	II b II b I
レーン 6 : EH92	ND II a ND
レーン 7 : EH107	ND ND ND
レーン 8 : EH112	II a II b ND
レーン 9 : EH1	II a II a I same as 577
レーン 10 : EH2	II a ND I

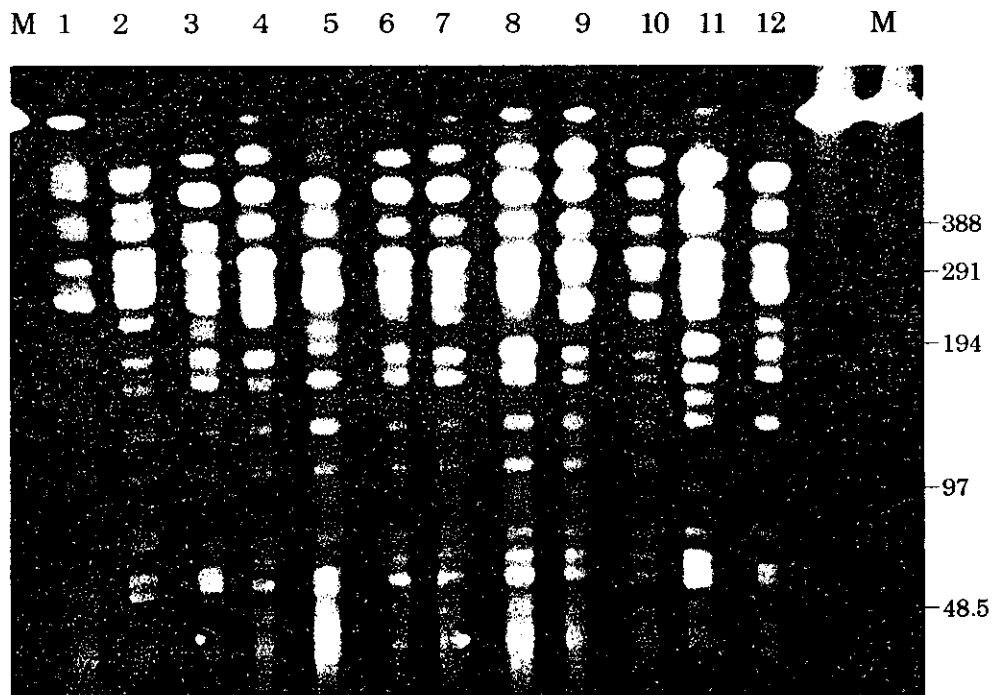
M : lambda ladder

図 11. EH施設におけるO157:H7のPFGEパターン (Xba I)



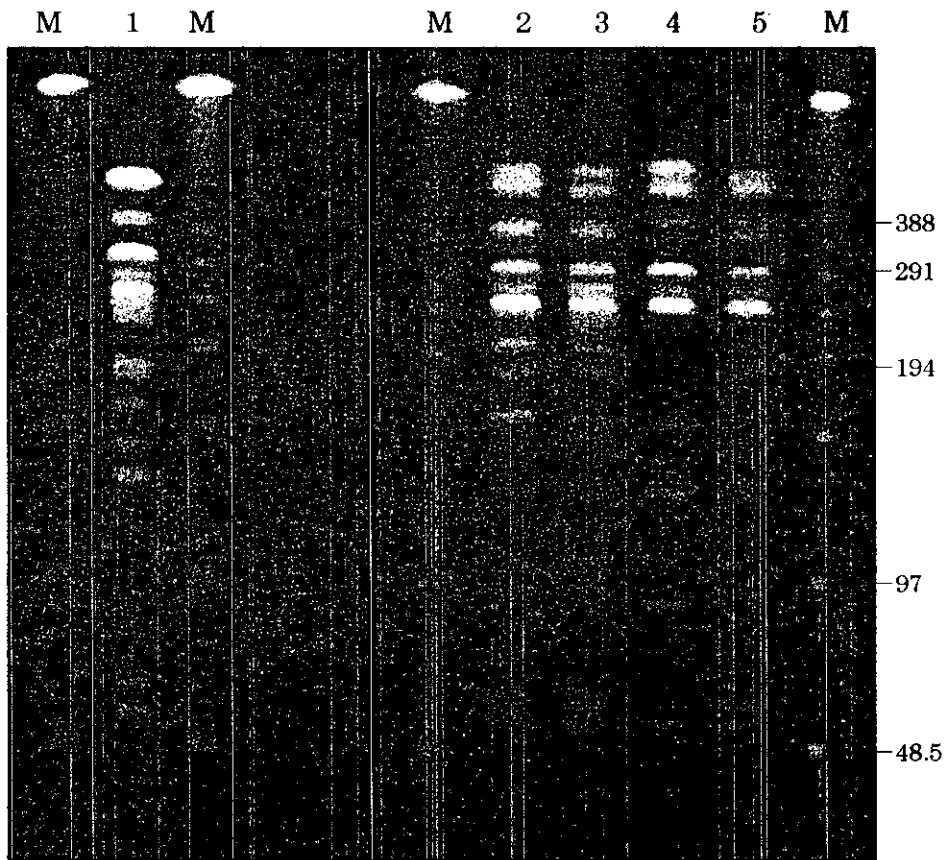
レーン1 : A1 II f II c I  
 レーン2 : A2 II a ND I  
 レーン3 : A3 II a<sup>+</sup> II a ND  
 レーン4 : A4 未完施  
 レーン5 : A5 未完施  
 レーン6 : A6 未完施  
 M : lambda ladder

図12 A施設におけるO157:H7のPFGEパターン(Xba I)



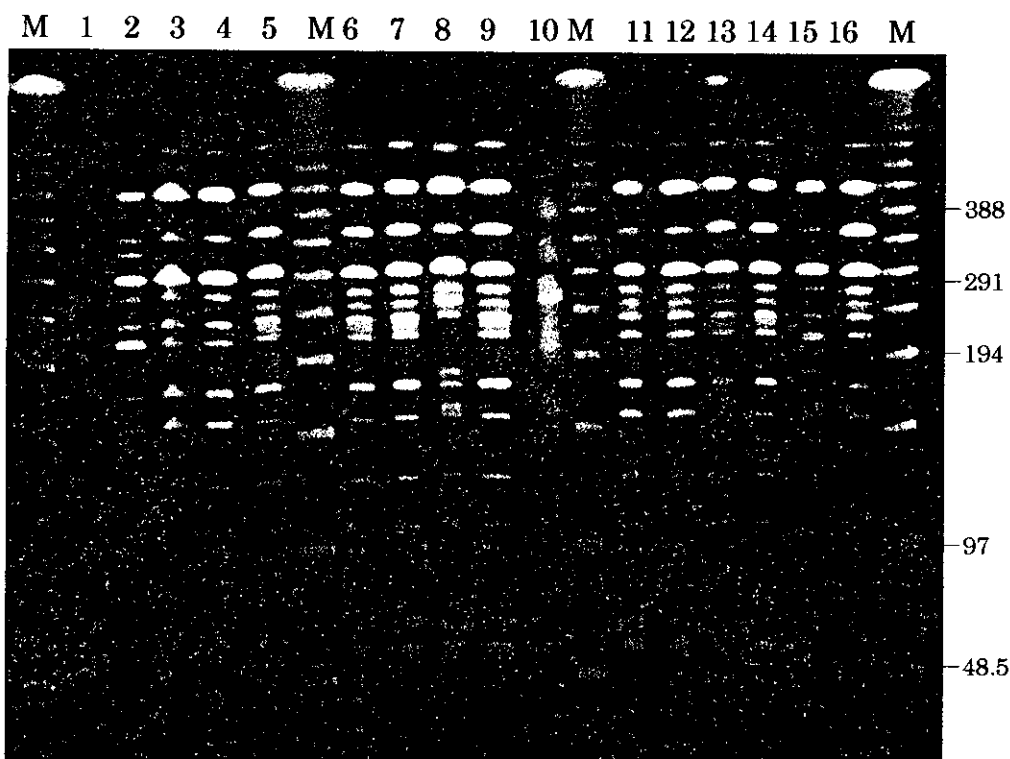
レーン 1 : B 1	IIIk	ND	ND	
レーン 2 : B 2	ND	ND	ND	
レーン 3 : B 3	ND	II b	I	
レーン 4 : B 5	II a	II a	I	same as 577
レーン 5 : B 8	IIIk	III a	ND	
レーン 6 : B 9	II a	II a	ND	differ from B12
レーン 7 : B 10	II a	II a	I	differ from 577
レーン 8 : B 11	II a	II b	ND	
レーン 9 : B 12	II a	II a	ND	
レーン 10 : B 13	II a	II a	ND	differ from B12
レーン 11 : B 14	III f	IV	IV	
レーン 12 : B 15	III c	ND	ND	
M : lambda ladder				

図 13. B施設におけるO157:H7のPFGEパターン (Xba I)



レーン1 : C1 ND V III  
 レーン2 : C2 Deg Deg Deg  
 レーン3 : C3 IIIk ND ND  
 レーン4 : C4 ND ND ND  
 レーン5 : C5 IIIk ND III  
 M : lambda ladder

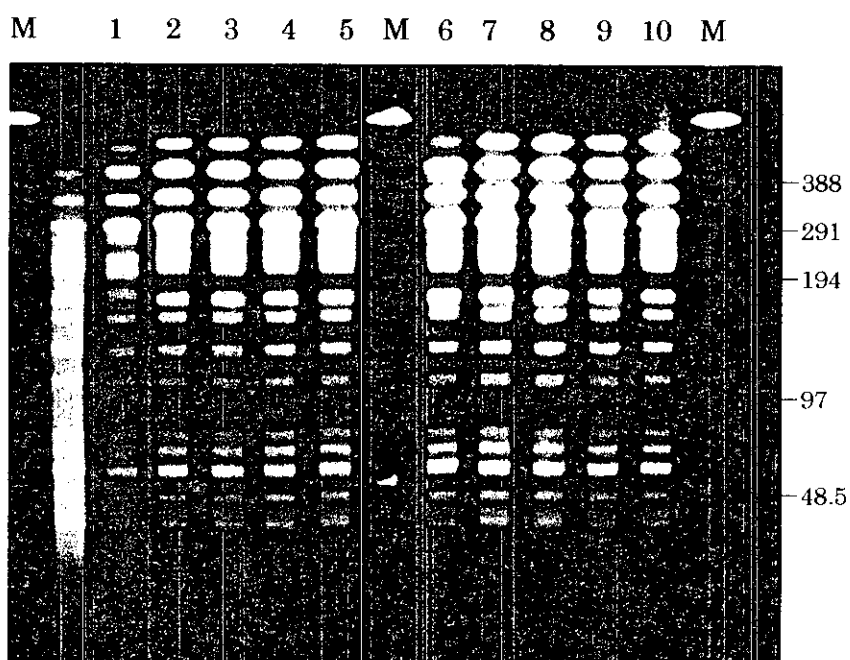
図 14. C施設におけるO157:H7のPFGEパターン (*Xba*I)



レーン 1 : D11 II a ND I  
 レーン 2 : D14 II f ND I  
 レーン 3 : D18 II a II a I  
 レーン 4 : D19 II a II a I  
 レーン 5 : D20 II a II a I  
 レーン 6 : D22 II a II a I same as 577  
 レーン 7 : D23 II a II a I same as 577  
 レーン 8 : D24 II a ND I  
 レーン 9 : D25 II a II a I same as 577  
 レーン 10 : D26 II a II a I same as 577  
 レーン 11 : D27 II a II a I  
 レーン 12 : D28 II a II a I same as 577  
 レーン 13 : D29 II a II a I same as 577  
 レーン 14 : D30 II a II a I same as 577  
 レーン 15 : D37 II g ND I  
 レーン 16 : D38 II a II a I same as 577  
 M : lambda ladder

図 15 D施設におけるO157:H7のPFGEパターン (*Xba* I)





レーン 1 : EEH01021	IIg	ND	I	
レーン 2 : EEH01022	IIa	IIa	I	
レーン 3 : EEH01031	IIa	IIa	I	same as 577
レーン 4 : EEH01033	IIa	IIa	I	same as 577
レーン 5 : EEH01035	IIa	IIa	I	same as 577
レーン 6 : EEH01036	IIa	IIa	I	
レーン 7 : EEH01037	IIa	IIa	I	same as 577
レーン 8 : EEH01038	IIa	IIa	I	same as 577
レーン 9 : EEH01039	IIa	IIa	I	same as 577
レーン 9 : EEH01041	IIa	IIa	I	same as 577
M : lambda ladder				

図 16 E施設におけるO157:H7のPFGEパターン (Xba I)



図17 3施設（EH施設、D施設、E施設）で解析したO157:H7 type577のデンドログラム

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

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ー

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所

尾崎 延芳	福岡県保健環境研究所	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		

研究要旨 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(EHEC)O157 事例におけるパルスフィールド電気泳動法(PFGE)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EHECO157 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。

A. 研究目的

パルスフィールド電気泳動法(PFGE)による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な方法であり、現在、地方衛生研究所(地研)と感染症研究所(感染研)間の全国的PFGEネットワーク(パルスネット)構築の準備が急がれている。そのため、九州地区では

昨年度、パルスネット構築にむけた基礎的研究として、PFGEに関する検査法及び解析について検討した。その結果、機器、PFGE 条件、方法に関する多くの問題点がクローズアップされた。そのため各機関で実施されたPFGE画像を比較・解析するには、必要最低限の機器の整備、PFGE実施方法の詳細なマニユア

ル化、一定レベルの手技の担保等が必要であることが分かった。そこで本年度はPFGEの詳細な統一マニュアルを作成し、その有用性と問題点を確認する作業を遂行した。さらに各機関で得られたPFGE画像をインターネットで転送し、DNA解析ソフトGelComper IIを用い解析を行い、パルスネット構築における問題点を改善していくことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. PFGE実施方法

昨年度参加機関のPFGE方法および使用材料を集約した。その結果、各機関により方法および使用材料が異なることが分かった。DNA解析に適したPFGE泳動像を得るため、参加各機関で方法を討議の上、詳細な統一マニュアルを作成し、これに従ってPFGEを実施することとした。

### 2. 供試菌株

#### 1) 精度管理用標準菌株

PFGEの標準菌株として、感染研から分与された腸管出血性大腸菌(EHEC)O157 5株(表1)を使用した。

#### 2) PFGE用分離菌株

2001年に分離されたEHECO157株を各機関約5株選び、PFGEに供試した。菌株は予め感染研に送付しPFGEが実施されそのパターンが判明しているO157菌株のうち、特に2001年夏に全国各地で分離された型である[IIa:IIa:I]、或いは[IIa:ND:I]のPFGE型を対象としたが、ない場合は他の菌株でも良いこととした。参加12機関(1-12)で用いた菌株は合計60株で、各機関の菌株数内訳は表2に示すとおりである。

これらの60株のうち、50株は感染研でのPFGEが判明しており、[IIa:IIa:I]型、[IIa:ND:I]型、その他の型及び感染研で実施されていない株に分けると、それぞれ、38株、5株、11株、6株であった。これらの菌株の由来、臨床症状等は、表3~5に示す通りであった。

### 3. 画像解析法

各機関で得られたPFGE泳動像は、ポラロイド写真等でアナログ保存をし、ついでCCDカメラ、画像解析装置、スキャナー等で泳動像を直接または写真から画像を取り込みTIFF形式で保存した。アナログおよびデジタル画像を一機関に集積後、GelComper II (BIO-RAD)を用い解析した。また、デジタル画像はディスクでの送付以外にインターネットを用いたメールでの添付ファイルでの転送を行った。

## C. 研究結果

### 1. PFGE統一マニュアルの作成

方法は基本的に平成9年に国立感染症研究所で実施された「腸管出血性大腸菌O157の検出・解析等の技術研修会」で示された方法に準拠し、初心者でも対応できるよう詳細に解説し一部改変した。表6a~eには各ステップ毎に統一または改変した方法とその理由を示した。統一マニュアルは、表7に示した。

#### 1) 菌の培養

昨年度、各機関では、菌の培養のため、TSB、Lブロス、BHI ブイオン、普通ブイオン、GNB ブロス、普通寒天、TSAなど各種の培地を用い、方法も静置、振盪、また培養時間も4-5時間から一夜と様々な方法で実施していた。昨年度の画像データから、一般に菌が濃すぎる傾向があること、各機関間で濃度にばらつきがあること、そしてDNA量の差は泳動時の移動度の差につながることを確認されたため、菌量を一定にした。TSBに接種し約18時間、静置培養を行うこととした。さらに培養菌液500 $\mu$ lを滅菌生理食塩水又は滅菌PBSで2回洗浄し、500 $\mu$ lの滅菌超純水に浮遊させ菌量が一定になるようにした(表6a)。

#### 2) アガロースブロックの作成

ゲル濃度が0.5%では柔らかく取り扱いにくいいため、アガロース濃度は0.6%を採用した。また、菌液及びアガロース液の量が正確でないと、混ぜた時、アガロース濃度が一定しないため、菌液とアガロース量を正確に測ること特にデイスピペットの場合注意が必要であることを強調した。本濃度では、アガロースブロックは取り扱いは用意であるが、濃度を高くしたことによ

り、これ以後の反応試薬等の浸透が悪くなることが考えられるので、反応や洗浄等を充分にする必要があることを明記した。また、菌液をアガロースと混合する前に、混合準備のためと菌を不活化する目的で、菌液を 63℃の恒温槽で 10 分程度浮かすこととした(表 6a)。

### 3) Lysozyme 処理

Lysozyme 処理は、昨年度の調査では、1時間から一夜までの種々の処理時間で実施されていたが、感染研で推奨している3時間の処理に統一した。ただし検査の都合などで、1 時間から一夜になる場合はそれでも良いこととした。

### 4) Proteinase K 処理

Proteinase K 1mg/ml を 1%N-lauroylsarcosine 加 0.5M EDTA に溶解し、反応温度 50℃、作用時間一夜、反応回数 1 回で実施した(表 6c)。

### 5) Proteinase K の失活

Proteinase K 失活試薬として、Pefabloc SC を使用していた機関と PMSF を使用していた機関がほぼ半々であった。これらの試薬はどちらを使用しても問題ないと思われたが、PMSF より毒性の低い Pefabloc を使用することとし、感染研で示された 50℃30 分の処理を3回行うこととした。処理後の洗浄は、感染研法では、氷上で 30 分、1 回、TE buffer での洗浄を行うこととしているが、ブロックのアガロース濃度を濃くしたので洗浄回数を3回に増やした(1回目は加えてすぐに除去、2、回目は氷上 30 分以上、表 6c)。

### 6) 制限酵素処理

#### ① *Xba* I 溶解緩衝液による馴化

感染研では、氷上 30 分の *Xba* I 溶解緩衝液による馴化を勧めているので、本マニュアルでも氷上 30 分以上の馴化を行うこととした(表 6d)。

#### ② 制限酵素 *Xba* I の濃度及び反応時間

*Xba* I の濃度は、感染研が示した 30units/sample 濃度のほか、20units/sample、25units/sample、40unit/sample 濃度を用いていた機関があった。今回、30units/sample 濃度に統一した。処理時間はすべての機関とも一夜で行っていたのでこれを採用した。

### 7) パルスフィールドゲル電気泳動

#### ① アガロース

昨年度の調査において 12 機関中 11 機関で、Pulsed Field Certified Agarose(BIO-RAD)が使用され、すべての地研で 1%のアガロース濃度が使用されていたことより、これらの製品・濃度を採用した(表 6d)。

#### ② PFGE装置

12 地研中、9 地研がCHEF-DRIII(BIO-RAD)、2 地研が Gene Path(BIO-RAD)、他の 1 地研が Mapper(BIO-RAD)を所有しており、これらをそれぞれ使用した。Gene Path については、泳動条件を簡単に変更できない問題があり、パルスネットが開始される場合は条件等の変更を前もってメーカーと相談しておく必要がある。

#### ③ サイズマーカー

サイズマーカーとして Lambda ラダーを使用するが、特にメーカーを指定しなかった。マーカーは冷蔵庫の保存液から取り出した時、良く TE で洗浄後使用することとした。また一般的によく使われている BIO-RAD 製のものを使用した場合、時々非常にバンドが薄く、解析に支障を来すことがある。メーカーから加熱処理後使用する方法が示されたので、薄いバンドしか出ないロットの場合、正確に 45℃で 3-5 分の処理を行うこととしたが、加熱時間についてはロットごとに非常に微妙な設定が必要と思われたので各機関で前もって最適な時間を決めておくこととした(表 6d)。

#### ④ 泳動条件

昨年どおり、200v(又は 6.0v/cm)、4-8 秒 9 時間、8-50 秒13時間 の泳動条件とし、泳動槽の温度は 14℃とした。

### 8) ゲルの染色および撮影

#### ① エチジウムブロミド溶液の濃度、染色時間及び脱色時間

染色は、エチジウムブロミド(0.3 μg/ml)で 30 分行い、脱色は蒸留水で 2 時間(こまめに水を変える)実施することとした(表 6e)。

## ② 写真撮影

写真撮影のためのフィルムは、フジFP3000B、ポラロイド 667、ポラロイド 665、ポラパン 3200B など)が用いられていたが特に指定はしなかった。

## ③ 画像の取り込み及び保存

画像の保存形式は、TIFF 形式とした。

## 2. 画像解析結果

### (1) 画像の保存形式について

#### 1) デジタル画像

GelComper II で解析する場合、PFGE 後の泳動像は、グレースケール 8 ビット(1画素が 256 階調) TIFF 形式の画像が必要である。このとき画像データ容量を抑えるために圧縮を行った場合、解析はできなかった。JPEG および BMP(ビットマップ)形式で保存された画像は TIFF 形式 8 ビット、グレースケールにコンバートすると使用可能であった。

しかし、本研究では画像の保存形式はファイル形式の指定のみであったため、フルカラー画像として取り込まれている場合がほとんどであった。フルカラー画像は、データサイズが大きく転送に時間がかかった。画像を受けとるコンピュータが Macintosh の場合、不具合が多かった。さらにコンピュータの OS およびインターネットに用いられるソフトウェアの種類やバージョンによって画像ダウンロードの可否が左右されることが分かった。

#### 2) アナログ画像

画像を解析用に加工する際、バンドの確認作業が必要であった。この作業には感度の良い写真として保存されている必要がある。1機関では写真撮影装置が無く、感熱記録紙での保存であったため、バンドの確認作業が困難であった。しかし、デジタル画像の転送で実施されるパルスネットでは、アナログ画像は転送できないので何らかの解決方法が必要である。

#### (2) PFGE マーカーの認識

12 機関の PFGE で用いられた Lambda ラダーマーカーをレファレンスマーカーと比較した。Dice (Tol 1.2%-1.2 %) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%] で解析

した場合、レファレンスマーカーと 100%一致していた。昨年度マーカーそのものが 100%一致しない要因について、阻害する要因として次の3点が挙げられた。

- 1) マーカーのバンドが薄い。
- 2) マーカーのバンドが濃すぎる。
- 3) 同一ゲル内のマーカーDNA 量の濃度差がある。

これら問題点は、当年度では改善された。特にマーカーレーン数をできるだけ多く入れることによって、使用可能なマーカーが選択できた。しかし、マーカーのバンドが薄いことを加熱により改善する方法は、ロット毎の予備実験が必要である。図1に示す中央のマーカーはシングルピークとしては取り込めなかった。

#### (3) 標準株による精度管理

表 1 に示す 5 株について 12 機関で精度管理を実施した。配布した5株の泳動像および解析画像を図1に示した。12 機関の泳動像を図 2-13 に示した。各標準株別にそれぞれ解析した。解析条件は、Dice (Tol 3.0%-3.0 %) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]で実施した。その結果、感染研標準株 960002 株[ I a : I : I ]は、100-85.22%の類似度であった(図 14)。コームから 2 番目のバンド(約 436.5kb 付近)は、3 番目のバンドと重なりシヨルダーとして確認されるバンドであるが、分離が困難である。感染研 960212 株[ II a : II b : I ]は 100-93.65%(図 15)、感染研 981553 株[ II b : II b : I ]は 100-86.79%(図 16)、感染研 970153 株[ III a : ND : ND ]は 100-94.15%(図 17)、感染研 960132 株[ III b : ND : III ]は 100-93.05%(図 18)の類似度であった。5 株ともに 48.5kb 以下のバンドは、不鮮明である場合が多かった。当年度は Band-Tolerance 値を 3.0 にして比較した。同一機関で PFGE を行う場合には Band-Tolerance 値を 1.2 で実施した方がよいと考えられるが、異なる機種・施設間で実施する場合には Band-Tolerance 値を 3.0 程度に設定する必要があると考えられた。また、精度管理に使用した5株は、194-291kb間のバンド数が多く、現在の PFGE 泳動条件では分離しづらいため、近似度に影響が出やすいと考えられる。PFGE 泳動条件については、総合的な検討が必要であると考えられ

る。

昨年度の問題点の改善度について下記に示す。

#### 1) 被検菌株の DNA 濃度の調節

マニュアルを作成し、ほぼ改善された。

#### 2) 泳動における DNA 断片の移動度の違い

各機関同一条件で泳動しているにもかかわらず、Lambda ラダーを含めた DNA 断片の移動度が大きく異なっていた。原因として緩衝液温度の制御能、PFGE 解析環境、PFGE 機種、機器の整備等複数の要因が考えられる。再度各機関での精度管理を行いながら詳細な調整が必要と考えられる。

#### 3) 染色及び脱色

マニュアルを作成することにより一部施設を除き改善された。改善されていない施設は「染色及び脱色」の行程ではなく、写真撮影の段階で原因があると考えられた。

#### (4)九州地区の O157 菌株の比較

12 機関で集められた O157 菌株 60 株を用いて解析した(表 2)。感染研に送付され PFGE 型が[II a: II a: I、#577]と診断された菌株を交えて解析を行った。解析条件は Dice (Tol 3.0%-3.0 %) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]で実施した(図 19)。その結果、PFGE 型が[II a: II a: I、#577]株は、泳動された地研別にはほぼ 100-95%の類似度であった。また、全体での比較では、精度管理株で一致率の高かった機関間では#577 株の一致率も高かった。しかし、#577 株に見られる 194-291kb間のバンドは、現在の PFGE 泳動条件では分離しづらい。分離能がよければ6本として認識できるが、ほとんどの場合は5本として認識される。これらのことは近似度に影響をあたえる要因であった。

#### D. 考察

現在、すべての EHEC に関して感染研において PFGE 型別が実施されている。また、各機関ごとにも EHEC を含めた菌株の相同性を検討している。機関ごとに解析を進め相互のデータを交換するにあたっての予備調査を昨年からは開始した。平成 12 年度

PFGE の解析及び各機関での PFGE 周辺状況を調査し、解析ソフト GelComper II を用いて各機関での画像解析を試みた。その結果、機器や PFGE 条件・方法の問題点がクローズアップされ、並びに GelComper II の適正な使用には、かなりトレーニングが必要であることも分かった。平成13年度は、これら問題点を解決するために必要な最低機器の提示、PFGE 実施方法の詳細なマニュアル化、統一菌株を使用した PFGE の精度管理を実施した。その結果、平成12年度と平成13年度の精度管理の結果を比べると明らかに統一マニュアルの作成及び精度管理の成果が現れていると考えられた。一方、現時点で九州地区参加機関でのパルスネット実行には、PFGE および画像データ転送・ダウンロードにおける改善並びに整備が必要であることが分かった。PFGE では、①泳動槽の電流の点検、②チラー槽の点検、③イルミネーター上部ガラスの清浄点検、④イルミネーターの照度の確認、⑤写真撮影装置の点検、⑥PFGE 泳動用ゲル作成と充填時の注意、⑦制限酵素処理における注意等が今後の課題である。また、画像データ転送・ダウンロードをスムーズに実行するためには、予めネットワーク機関間でのコンピュータハードおよびソフト両面の調整並びに画像作成におけるマニュアルが必要であることが分かった。本研究ではホスト(画像データをダウンロードする側)が Macintosh で各ブランチ(画像データを送付する側)が Windows であったため、支障が多かった。しかし、対応するソフトを準備すれば問題解決は可能であったが、実用的でないと考えられた。特に解析ソフト GelComper II は、Windows 対応版であり、Windows で統一した方が現実的である。また、画像データの保存方法は、解析ソフト GelComper II の使用どおり「グレースケール、8ビット、TIFF 形式、画像サイズ 300-800KB 程度」と明記する必要があることが判明した。

#### E. 結論

パルスネット構築のためには次の点について改善・整備の必要性があることが分かった。

## 1. 機器整備

パルスネット実行に当たって、写真にほぼ近い高画質の画像の転送が必要である。解析時において低分子のバンドや輝度の低いバンドを黙視で確認する作業がなされる。

- a. PFGE 泳動後の写真撮影装置
- b. 高速回線ネットワークコンピュータの整備

## 2. 技術面

PFGE はトレーニングが必要である。恒常的技術の継承が必要である。そのためには次の項目について実施することが必要である。

- a. PFGE に関するマニュアルの作成
- b. マニュアルに基づいた技術の習得
- c. 標準菌株による精度管理
- d. GelComper II の画像解析方法の習得
- e. 画像データ保存方法のマニュアル化
- f. PFGE 泳動条件の再検討

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kazumi Horikawa, Koichi Murakami and Fujiko

Kawano : Isolation and characterization of methicillin *Staphylococcus aureus* strains from nurses and their gowns, Microbiological Research, 2001, 155, 345-349.

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, 2002, 19 巻、掲載予定.

### 2. 学会発表

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.

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.



表1. EHEC0157の標準株

感染研番号	分離年	分離府県	市・町	備考	VT型	<100kb	100-200kb	>350kb
960002	1996	広島県	東城町	小学校集発	1+2	I a	I	I
960212	1996	大阪府	堺市	小学校集発	1+2	II a	II b	I
981553	1998	宮崎県	宮崎市	保育園集発	1+2	II b	II b	I
970753	1997	埼玉県	上尾市	散発	2	III a	ND	ND
960132	1994	神奈川県	記載なし	牛肉	2	III b	ND	III

表2 PFGEを実施したO157:H7菌株総数

県名	菌分離 年月日	総数
福岡県	2001/7/20~8/8	5
福岡市	2001/8/2~8/15	5
北九州市	2001/7/16~8/10	5
佐賀県	2001/7/15~8/5	5
長崎県	2001/7/10~8/18	5
長崎市	2001/5/11~9/20	5
熊本県	2001/7/17~8/7	5
熊本市	2001/7/14~8/2	6
大分県	2001/7/16~8/1	4
宮崎県	2001/8/2~8/7	5
鹿児島県	2001/8/11~8/15	5
沖縄県	2001/6/10~9/19	5
合計		60

表3 感染研でのPFGE結果がⅡa:Ⅱa:IのO157:H7(VT1&2産生)菌株数

県名	菌分離 年月日	総数	患者・保 菌者	株数	患者主臨床症状						参考
					腹痛	下痢	血便	嘔吐	発熱	HUS	
福岡県	2001/7/20~8/8	5	患者	3	3	3	3	0	1	0	
			保菌者	2	0	0	0	0	0	0	
北九州市	2001/7/16~8/10	5	患者	5	5	3	2	1	2	0	
佐賀県	2001/7/15~7/29	3	患者	2	2	2	0	0	1	0	
			保菌者	1	0	0	0	0	0	0	
長崎県	2001/7/10~7/28	3	患者	3	2	3	3	0	0	0	#577(3)
熊本県	2001/7/17~8/7	5	患者	5	5	5	5	1	3	0	#577(4)
熊本市	2001/7/14~8/2	5	患者	5	4	5	4	0	3	0	#577(4)
大分県	2001/7/16~8/1	4	患者	3	3	3	2	0	0	0	
			保菌者	1	0	0	0	0	0	0	
宮崎県	2001/8/6	1	患者	1	1	1	1	0	0	0	
鹿児島県	2001/8/11~8/15	5	患者	3	2	3	0	2	0	0	#577(5)
			保菌者	2	0	0	0	0	0	0	
沖縄県	2001/6/10, 8/10	2	患者	2	2	1	1	1	1	0	#583(1), #577(1)
合計		38		38	29	29	21	5	11	0	

表4 感染研でのPFGE結果が IIa:ND:IであったO157:H7(VT1&2産生)菌株数

県名	菌分離 年月日	総数	患者・保 菌者	株数	患者主臨床症状					
					腹痛	下痢	血便	嘔吐	発熱	HUS
佐賀県	2001/8/5	1	患者	1	1	1	0	0	1	0
熊本市	2001/8/2	1	患者	1	1	1	1	1	1	0
宮崎県	2001/8/2, 8/6	2	患者	1	1	1	1	0	1	0
			保菌者	1	0	0	0	0	0	0
沖縄県	2001/8/27	1	患者	1	1	1	1	0	0	0
合計		5		5	4	4	3	1	3	0