

20020603

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 (課題番号 H12- 新興-3)

平成 14 年度総括研究報告書  
及び  
平成 12-14 年度総合研究報告書  
(厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業)

主任研究者 渡辺治雄  
国立感染症研究所 細菌第一部

## 目 次

### 1. 平成 14 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 細菌第一部

### 2. 平成 14 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 ……… 14  
分担研究者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌第一部  
協力研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

#### (Ⅱ) 北海道・東北・新潟ブロック

- 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 ……… 37
- |       |       |               |
|-------|-------|---------------|
| 分担研究者 | 矢野昭起  | 北海道立衛生研究所     |
| 研究協力者 | 長野秀樹  | 〃             |
|       | 熊田洋行  | 〃             |
|       | 若森吉広  | 〃             |
|       | 大友良光  | 青森県環境保健センター   |
|       | 八柳 潤  | 秋田県衛生科学研究所    |
|       | 齊藤志保子 | 〃             |
|       | 佐藤 卓  | 岩手県環境保健研究センター |
|       | 大谷勝美  | 山形県衛生研究所      |
|       | 齋藤紀行  | 宮城県保健環境センター   |
|       | 齋藤卓哉  | 仙台市衛生研究所      |
|       | 牛水真紀子 | 〃             |
|       | 須釜久美子 | 福島県衛生研究所      |
|       | 長沢正昭  | 〃             |
|       | 佐々木寿子 | 新潟県保健環境科学研究所  |
|       | 不二崎順二 | 〃             |

#### (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 ……… 93
- |       |      |             |
|-------|------|-------------|
| 分担研究者 | 甲斐明美 | 東京都立衛生研究所   |
| 協力研究者 | 増子京子 | 茨城県衛生研究所    |
|       | 長 則夫 | 栃木県保健環境センター |
|       | 黒澤 肇 | 群馬県衛生環境研究所  |

|       |              |
|-------|--------------|
| 倉園 貴至 | 埼玉県衛生研究所     |
| 小岩井健司 | 千葉県衛生研究所     |
| 鈴木理恵子 | 神奈川県衛生研究所    |
| 武藤哲典  | 横浜市衛生研究所     |
| 金子通治  | 山梨県衛生公害研究所   |
| 関 英子  | 長野県衛生公害研究所   |
| 有田世乃  | 静岡県環境衛生科学研究所 |

(IV) 東海・北陸ブロック

東海・北 陸地方 4 地方衛生研究所による腸管出血性大腸菌 026 を用いた  
パルスネットのための予備試験 ..... 139

|       |      |             |
|-------|------|-------------|
| 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    |
|       | 板垣道代 | 岐阜県保健環境研究所  |
|       | 倉本早苗 | 石川県保健環境センター |

(V) 近畿ブロック

①近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動から型別法の施設間変動について  
-14 年度報告- ..... 152

|       |      |               |
|-------|------|---------------|
| 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  |
|       | 藤原恵子 | 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 | 兵庫県立健康環境科学研究所 |
|       | 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    |
|       | 中山章文 | 奈良県保健環境研究センター |
|       | 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   |

②パルスフィールド電気泳動法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)を用いた  
腸管出血性大腸菌における diffuse outbreak の監視に関する研究 ..... 163

|       |           |              |
|-------|-----------|--------------|
| 協力研究者 | 石川和彦、林 賢一 | 滋賀県立衛生環境センター |
|-------|-----------|--------------|

③ウェルシュ菌食中毒事例のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析 ..... 169

|       |                |             |
|-------|----------------|-------------|
| 協力研究者 | 中村寛海、小笠原準、長谷 篤 | 大阪市立環境科学研究所 |
|-------|----------------|-------------|

④病院内保育園における腸管出血性大腸菌 026:H11 感染症原因菌株の疫学的解析に関する研究

|       |                 |           |
|-------|-----------------|-----------|
| 協力研究者 | 山内昌弘、横田正春、大中隆史  | ..... 175 |
|       | 石津真理子、中村 武、田中智之 | 堺市衛生研究所   |

⑤腸管出血性大腸菌 0157 集団感染事例における PFGE の活用について ..... 183

協力研究者 川西伸也、高 美恵子、  
藤本寿郎、山根竹二郎 姫路市環境衛生研究所

⑥腸管出血性大腸菌 026 集団発生事例の疫学マーカー解析 ..... 186

協力研究者 瀬戸和子、田口真澄、河原隆二  
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

①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 ..... 190

分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所  
研究協力者 榊美代子 広島県保健環境センター  
橋渡佳子 広島市衛生研究所  
安岡富久 高知県衛生研究所

②平成 14 年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例由来株 0157:H7、026:H11/ーの  
PFGE による解析とパルスネットの活用について ..... 201

研究協力者 橋渡佳子 広島市衛生研究所

③氷菓における *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例 ..... 209

研究協力者 安岡富久 高知県衛生研究所

(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 0157 事例における PFGE の方法及び画像解析について ..... 213

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 宮崎県衛生環境研究所

|       |              |      |               |
|-------|--------------|------|---------------|
| 尾崎延芳  | 福岡市保健環境研究所   | 内尾俊博 | 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  | 山口仁孝 | 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   | 成松浩志 | 大分県衛生環境研究センター |
| 吉國謙一郎 | 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   |      |               |

## 目 次

### 1. 平成 12-14 年度総合研究報告書

- 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 …………… 243  
主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

### 2. 平成 12-14 年度分担研究-総合研究報告書

- (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 …………… 253  
分担研究者 寺嶋淳 国立感染症研究所 細菌第一部

#### (II) 北海道・東北・新潟ブロック

- 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 …………… 275  
分担研究者 矢野昭起 北海道立衛生研究所

#### (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 …………… 282  
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

- 腸管出血性大腸菌 026 のパルスネットへの応用のための基礎的研究…………… 308  
分担研究者 田中大祐 富山県衛生研究所

#### (V) 近畿ブロック

- 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 …………… 323  
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 …………… 330  
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  
一腸管出血性大腸菌 0157 事例における PFGE の方法及び画像解析について …………… 335  
分担研究者 堀川和美 福岡県保健環境研究所

## 平成14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

PFGE 解析の標準化のための試行を精力的に行った。全国を6ブロック（北海道、関東、中部、近畿、四国、九州）に分けて、各ブロックの代表者を中心に精度管理が進められた。感染研で先に作製した標準的プロトコールの一部改良等が行われ、かなりの精度において安定した結果が得られるようになってきた。統一的プロトコールと定期的な精度管理のための Ring trial を継続すれば、決められた株の PFGE パターンに対する相似度をかなりの確率にもって高めていくことが可能であることが判明した。実際の現場においては、2002 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。特に、2002 年は、[韓国産牡蠣] が赤痢菌の汚染を受け、広域に多数の赤痢患者が発生した事件が起こり、国際的な貿易問題にも発展した。その時、韓国産の牡蠣が原因となっている科学的証拠として使われたのは PFGE 解析結果であり、韓国側も汚染の原因を認め、改善を図った。PFGE 解析の有用性が示された実例でもあった。

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

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みえるが実は同じ原因で起こっている集団事例であるケース) の発生により被害が拡大した場合には、犠牲者の数が多大になる。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迅速なる究明およびその除去が不可欠となる。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解析結果の2面からの判断

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 を迅速に検知し、その拡大を未然に防ぐ対応を図ることが必要である。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、それを充実させることを目的とする。このネットワークが確立することにより、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、腸管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。

## C. 研究結果と考察

### 1. 感染研における研究

#### 1. EHEC 及び赤痢菌のデータベース利用による解析

平成 14 年に感染研に送付された EHEC の総数は 2334 株でそのうち EHEC O157 は 1806 株であった。diffuse outbreak の発生は、4 月下旬から 5 月にかけて近畿地方 6 府県の焼肉チェーン店において起こった。それと同一と思われる遺伝子型をもつ O157 が平成 13 年 12 月末から 14 年 1 月初めに散発的に分離されていたが、その時点では事例数が少なく疫学的な調査結果も不明で、両者を関連付けるまでには至らなかった。結果的には、EHECO157 の遺伝子型に多様性が存在するなかで、複数の地域から同一遺伝子型の菌株が分離された場合には関連性を疑うべきとする今までの経験を強く支持する結果となった。データベース構築にあたり菌株に付随する疫学的情報が極めて重要であることを示唆する事例であった。

平成 13 年に EHECO157 全体の約 2 割を占めていた同一遺伝子型の株が平成 14 年の 5 月以降も検出され、全国 23 自治体から 90 株が送付された（約 5%）。平成 13 年にはこの遺伝子型に極めて類似した 2 種類の遺伝子型を示す株も分離されたが、平成 14 年にもこれらの類似 2 遺伝子型が分離されていた。さらに平成 14 年にはこれらのうちの一つの型を示す株により宇都宮の老人ホームでの集団発生があり、8 名の死者がでた。この事例では食品の「香味あえ」から分離された O157 が患者等から分離された株の遺伝子型と同一であった。この遺伝子型を示す株は全国 14 自治体から 71 株が分離されていた。共通の汚染原因の存在が示唆されるが、残念なことに現在までには同定されていない。今後も続

くかもしれないので、監視体制の強化と共に、発生した場合に重点的に疫学調査を行うことが必要である。

2001 年末から 2002 年始めにかけて発生した *Shigella sonnei* による diffuse outbreak は、韓国産の輸入カキを原因食品とし同一遺伝子型の *S. sonnei* による事件であった。PFGE 解析結果が、韓国側に汚染結果を認めさせる証拠となった。各菌における PFGE のデータベース化と、それに基づく解析結果の解釈が国際間の実際の事例にも貢献した良い事例となった。

標準株を用いての各ブロック間の PFGE 制度管理試行では、目視によると同一遺伝子型と思われるものでも解析ソフトを用いると、100%近似度のクラスター形成には至らず約 90-95%程度の近似度に留まる結果となった。現時点での解析感度の限界なのかもしれない。改良現在 DNA サイズマーカーであるラムダラダーを使用しているが、CDC プロトコールで採用しているように、よりバンドの鮮明な像を形成する標準株を選定して使用することも検討すべきだと考えられた。また、画像送信時のファイル形式等についても統一的方法の検討が必要と考えられた。

#### 2. 「PulseNet Japan」による結果の配信

解析結果をほぼ 1 ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。このシステムの問題点として、下記の諸点についての改善が将来的には必要であると考えられたが、現実的には同時に記した対応策も可能であろう。

A) 同一施設内における実験結果であっても解析ソフトを利用した結果（デンドログラム）では、実際には 100%一致している泳動像でも近似度 100%にならない場合があり、解析ソフト利用における限界であると考えられた。したがって、デンドログラムの図による公開では、泳動像の目視による評価とデンドログラムによる結果の食い違いが生ずる恐れがある。広域流行と考えられる株の画像情報等については、Internet 経由の配信を行い、画像解析による誤差等から生ずる判断の揺るぎを最小限にとどめる工夫を行うべきであろう。

b) PFGE 解析結果とともに公開している疫学情報等の安全性を高めるために、関係機関内の閉鎖ネットワークである WISH を利用しているが、コンピューター端末の数が少な

いなど情報を入手する際の利用し易さにやや問題があると考えられた。情報へのアクセスの容易さもネットワークの利用度を向上させる重要な要素であるから、Internet 利用による情報の公開の可能性についても検討すべきであると考えられる。現在用いている情報内には個人のプライバシーに抵触する情報は無いことを考えると、ID やパスワードの設定によって安全性を確保し感染研のホームページ上に公開するののも一つの手段かもしれない。

### 3. 世界も結ぶ「パルスネット」の構築

現在、パルスネットを世界的に結ぶ案が CDC を中心に出されている。2002 年 12 月にハワイで第 1 回目の会議が開かれ、アジア 10 カ国の代表（日本も含む）、米国、EU、カナダ、オーストラリア等が集まり、前向きの方角で取り組むことで合意した。今後、PFGE の方法の統一（同一プロトコールの使用）、優先的にとりくむ菌株の選定等の話し合いの元に、ネットワーク化を進める方向で行うこととなった。

## 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

本年度は北海道・東北・新潟ブロックにおいて PFGE に関する精度管理を 2 回行った。供試菌株は腸管出血性大腸菌 O157 が 7 株と同 O26 株が 3 株である。同一施設内における時間変動を知る目的で 1 回目と 2 回目は同じ菌株を使用した。1 回目には、PFGE と同時に方法に関するアンケート調査も実施し、統一したマニュアルを作成するための資料とした。方法については、多数の施設が基本的に国立感染症研究所での方法を採用しており、キットを使用している施設は少数であった。PFGE の解析結果では、泳動条件の相違などによって施設間の similarity はそれほど高くはなかった。このことを踏まえ、2 回目は統一したマニュアルを作成しこれに沿って PFGE を実施したところ、施設間較差は改善され、大体 70%以上の similarity が得られるようになった。一方、北海道において、22 株の特異な表現形質を示す腸管出血性大腸菌 O157:H7 が分離された。これらの株は一夜ではソルビトールを分解しないが、β-グルクロニダーゼを産生した。また、本菌は典型的な O157 株と同様に *stx1&2* の他に *eaeA*、*EHEC-hlyA*、*pas*、*etpD* の遺伝子セットを保有していた。しかし、通常の O157 が保有

している *katP* および *espP* についてはこれらを検出することができなかった。一方、PFGE を用いた DNA 解析では、これらの 22 株は互いに非常によく似たパターンを示し、これらの株は独立したクローンに属することが示された。このように、PFGE を実施することによって、特異な性質を持つ菌株の腸管出血性大腸菌 O157 菌全体における位置づけが可能であることが示された。

### (II) 関東・甲・信・静岡ブロック

食中毒や感染症の集団発生や Diffuse Outbreak を迅速に発見し、その拡大を防止することを目的として、PFGE 法による菌株の解析成績に基づく菌学的情報システム（パルスネット）の構築を目指し、関東甲信静岡ブロックの 11 地方衛生研究所（地研）で共同研究を行った。更に各研究所の解析結果を、解析ソフトを用いて解析するための技術的整備を図った。

腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌株を各研究所でほぼ同一の条件下で PFGE 解析を行い、その成績を都立衛生研究所に電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた。その結果、PFGE 画像上の 100kb 以上のバンドを対象に作成した系統樹では、一部の成績を除くと、80%以上の近似性で異なる 3 菌株を区別することが出来た。PFGE 技術は、いずれの研究所もかなり進歩し、パルスネット構築のための環境整備が図られてきた。

PFGE を行う時には、①マーカーの入れ方、②マーカーの分離能、③画像写真の大きさの統一等が重要であることが明らかとなった。今後、①100kb 以上のサイズのバンドを対象とした解析法、②最近開発された薄いコーム (0.7mm) を使う方法については更に検討が必要である。

### (III) 東海・北陸ブロック

平成 15 年度から実施される O157 パルスネット（通称パルスネットジャパン）の予備試験として愛知県で検出された 4 株の異なったパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）型の O26（ただし 2 株は同一株）について愛知県、岐阜県、石川県及び富山県の各地方衛生研究所（地研）で PFGE を実施し、その画像をメールで愛知衛研に電送した。愛知衛研では得られた画像について目視及び解析ソフトを用いて解析を行なった。その結果、目視及び解析ソフトを用いた解析が



ら、得られた PFGE の画質は検体の PFGE 型が同一か否かの判別には充分であることが明らかとなった。一方、目視による各検体間のバンド本数の違い及び解析ソフトによる各検体間の相同性は各地研で異なっており、詳細な解析にはより質の高い PFGE 画像が必要であると思われた。さらに、解析ソフトを用いて同一検体の PFGE 画像を各地研で比較したところ、最も相同性が高い検体で 78%、最も低い相同性では僅か 16%であった。この原因を検討するために各地研の溶菌過程、制限酵素処理の比較検討を行なったが、PFGE の画質に直接影響を及ぼすような条件の相違は認められなかった。そこで PFGE 機種の違い、前述の過程の前及び後過程であるブロック作成の際の菌液濃度及びゲルへ挿入するブロックの厚さについて検討を加えた。その結果、PFGE 機種の統一、適切な菌液濃度（1 ブロック当たり約  $5.0 \times 10^7$ ）及びブロックの厚さ（約 0.7 mm）によって PFGE 画像の質が改善されることが明らかとなった。これらの結果から、来年度から稼動するパルスネットの実施には PFGE 実施条件の統一が必須であることが明らかとなった。さらに、O26 は O157 と同様の条件を用いて PFGE が実施可能であり、O157 と同等の遺伝子レベルでの多様性を有していることからパルスネットは O26 にも応用可能であることが示唆され、O26 による diffuse outbreak に対してもその早期発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

#### (IV) 近畿ブロック

昨年度は各施設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、本年度は可能な限り統一した条件で PFGE 型別を行った結果、各施設の画像の質をコントラストの高い鮮明なものに統一する必要があることがわかった。また、ファイル形式も解析に適したものを指定することが必要であった。

今回の 10 施設の中にはマーカーを 533.5kb までしか認識できなかった施設があったが、それ以上の大きなバンドが存在する菌株の解析にはマーカーをもっと上部まで分離する必要があり、そのためにはマーカーの泳動方法の検討と同時にパルスタイムの変更も必要ではないかと考えられた。また今回は 48.5kb 以下の小さなバンドが認識されない施設が多かったため解析に使用しなかったが、今後は解析に使用するかどうかを検討する必

要がある。

さらに FingerprintingII の使用方法の統一も必要であり、解析結果については型分類の基準を近似度何%にするのかも検討する必要があると考えられた。

#### (V) 中国・四国ブロック

平成 12 年度の本研究では同一の赤痢菌株を用いて 6 施設で PFGE を実施し、その画像を目視で比較・検討したところ、一部の施設の画像は不明瞭で他施設の画像と比較することができなかった。また、平成 13 年度の研究では、各施設で実施した腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE 画像のうち、特定の PFGE 型（感染研の型別で II a II a I type577）とされる菌株の画像について解析ソフト（GelComar II）で解析したところ、各施設の PFGE パターンは、そのおのおのが各施設別の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と均一化の必要性が示唆された。

平成 12 年度、平成 13 年度の本研究において、我々が行った PFGE の方法は感染研によって作成されたマニュアルに準拠したものである。このマニュアルでは試薬の調整方法、制限酵素処理法などが詳細に記述されているが、PFGE の一番重要となると思われる試料プラグに包埋する菌量については十分に述べられていない。今回、我々が行った方法は九州ブロックが感染研のテキストをもとに作成したマニュアルに準拠したもので、菌株の培養は液体培地で行うなど、菌量を極力一定にすることとした。また、試料プラグの作製には従来の 1.4mm 厚の試料プラグをウェルに挿入する方法に変えて、明瞭なバンドが得られるとされる 0.7mm 厚の試料プラグを使用した。その結果、4 施設が作成した画像は以前の画像より良好でバンドパターンも判読しやすくなった（特に分子量の大きい部分で）。しかし、今回の画像解析の結果でも、1 施設のデンドログラムは同一の菌株にもかかわらず他施設とは異なるクラスターを形成する現象が見られた。また、同一菌株のバンドパターンが一致しない PFGE 画像も認められた。さらに、解析者の判読の違いにより類以度に差異が見られた。これらは技術的な問題に起因するものと推察されるが、今後、細菌学の問題要因も含め、更なる PFGE 解析手法の標準化と技術的問題点を解決するための研究が必要と思われた。

## (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、九州地区では、12 地方衛生研究所の参加で、平成 12 年度は、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、PFGE 条件や方法に関する多くの問題点を提起した。また、13 年度は、これらの問題点を改善するため、PFGE の方法を詳細に検討し、方法を統一した上で、EHEC O157 標準菌株 5 株及び各機関の分離株 5 株の PFGE 画像を比較検討し、12 年度に比べ、マニュアルを統一した成果及び精度管理の成果が現れたことを確認した。しかし、泳動、画像送信及び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。今年度は、各機関での PFGE の問題点が、プラグ作成時にあるのか、泳動時にあるのかを明確にする目的で、1 機関で作成した同一プラグを郵送し各機関で泳動し泳動像を比較する実験、また各機関で作製したプラグを郵送し単一機関で泳動し泳動像を比較する実験を実施した。さらに PFGE 方法の検討の一環として、迅速法をマニュアル化し、それにより各機関で実施した PFGE 画像を、通常法と比較した。その結果、同一プラグの相互交互泳動により、各機関での PFGE の問題点は、プラグの作成時にあるのではなく泳動にあることが分かった。また、各地研で作成・泳動した標準株の PFGE 像の類似度を比較した結果、過去 2 年間より良好な結果が得られた。さらに O157 の PFGE プラグ作成迅速法は各機関共に従来法と遜色ない泳動像が得られ、今後ルーチンワークに使用可能であることが分かった。

## D. 結論

データベースとの照合により広域流行株の探知が可能であることが確認された。異なる複数機関で行われたデータの入力を可能にするためには、データの精度の安定化が不可欠であり、そのためには継続的な精度管理が最も重要なポイントである。その意味でも PFGE の技術的な標準化を今後も維持してゆくべきであると考えられる。また、解析ソフトの日本語完成版である FingerprintingII を効率良く利用するためにも統一的なプロト

コールの作成など今後ネットワーク内の連携を強める努力が求められる。さらに、広く情報の共有化を行うためにも、より容易なアクセスが可能である Internet の利用を考慮すべきであろう。

## E. 発表業績

### 誌上発表

1. Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. 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.
2. Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of lysogeny of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages on pulsed-field gel electrophoresis fragment pattern of *Escherichia coli* K-12. *Current Microbiology*, 46(3):224-7, 2003.
3. Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., and Hayashi, T. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99(26): 17043\_17048, 2002.
4. Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of repeated subculturing and prolonged room temperature storage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 40(8): 3079-3081, 2002.
5. Yamaguchi T., Yokota Y., Terajima J., Hayashi T., Aepfelbacher M., Ohara M., Komatsuzawa H., Watanabe H., Sugai M. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 1511-6, 2002.
6. Nagano, H., Okui, T., Fujiwara, O., Uchiyama, Y., Tamate, N., Kumada, H., Morimoto, Y., Yano, S. Clonal structure of shiga toxin (Stx)-producing and  $\beta$ -D-glucuronidase-positive *Escherichia coli*

- O157:H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan. *J. Med. Microbiol.* 2002. 51:405-416.
7. Osawa,R., Iguchi,A., Arakawa,E., And Watanabe,H. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. *J. Clinical. Microbiol.* 40 : 2708-2709. 2002
8. Watanabe,H., Terajima, J., Izumiya,H., and Iyoda,S. Molecular typing methods for STEC; *Methods in Molecular Medicine. Vol.73: E. coli* Shiga toxin methods and protocols. Edited by; D. Philpott and F. Ebel. Humana Press Inc., Totowa, NJ. P.55-65. 2002
9. Nakaya,H., Yasuhara,A., Yoshimura, K., Oshihoi,Y., Izumiya,H., Watanabe,H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone -resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg. Infect. Dis.* 9:255-257. 2003.
10. 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 60, 1070-1076, 2002
11. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄. Pulse Net Japan の構築について 月刊 HACCP 2001 12. 64 - 68
12. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄. パルスフィールドゲル電気泳動法による食中毒菌の分子疫学的解析. *食肉の科学*, 43, 9-17, 2002.
13. 小林一寛、勢戸和子、八柳潤、斎藤志保子、寺尾通徳、金子通治、芹川俊彦、倉本早苗、藤沢倫彦、鈴木理恵子、山崎貢、林賢一、松根渉、安岡富久、堀川和美、村上光一、河野喜美子、山田亨、伊藤健一郎、下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察、*感染症学雑誌*, 2002, 76(11), 911-920.
14. 堀川和美、八柳潤、内村真佐子、斎藤眞、小林一寛、田中博、森良一、牛挽肉、ポテトサラダおよ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、イムクロマト系簡易キットの有用性の検討、*日本食品微生物学会雑誌*, 2002, 19(4), 187-194.
- 渡辺治雄. 細菌性腸管感染症. *化学療法の領域*. 18 : 34-41. 2002.
15. 松本慶蔵, 渡辺治雄, 中山 昇. 感染症成立の新しい考え方. (対談). *化学療法の領域*. 18 : 19-25. 2002.
16. 渡辺治雄. 食物, 水系感染症. *Medical Technology*. 30:301-302. 2002.
17. 野本明男, 渡辺治雄, 岩本愛吉. 微生物ゲノムと病原性. *現代医療*. 34 : 984-999. 2002.
18. 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 : 1011-1017. 2002.
19. 渡辺治雄. 下痢原性大腸菌群. *小児科学*, 第2班. 監修 ; 白木和夫等. 医学書院. 2002年.
20. 田中博, 谷尾進司, 保科健, 富田正章, 中島洋, 榊美代子, 河本秀一, 清水俊夫, 砂原千寿子, 安岡富久, 井上博雄, 渡辺治雄. 中・四国地区における腸管出血性大腸菌感染症の疫学的解析と分離菌株の細菌学的検討. *感染症学雑誌*. 76 : 439-449. 2002
21. 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌. パルスネットの構築 ; 細菌の DNA 解析に基づいた分子疫学的ネットワークシステム. *食品衛生研究* 52 : 7-13. 2002
22. 松井珠乃, 鈴木理和, 柴田和顕, 木島秀雄, 瀬尾幸嗣, 塚田真樹, 松崎利奈子, 泉谷秀昌, 渡辺治雄, 大山卓昭, 岡部信彦, 高橋央. 市内一円で発生した *Salmonella* Enteritidis 食中毒の集団発生事例——豊橋, 2001年. *食品衛生研究* : 52 : 29-32. 2002.
23. 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 田村和満. 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制 : パルスネットの構築. *感染症学雑誌*. 76 : 842-848. 2002
24. 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向. *Medical Tribune*. p.44-45. 2002.

# 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制； パルスネットの構築

国立感染症研究所細菌第一部

渡辺 治雄 寺嶋 淳 泉谷 秀昌  
伊豫田 淳 田村 和満

---

Key words : pulsed-field gel electrophoresis, PFGE, enterohemorrhagic *E. coli*,  
genomic diversity, diffuse outbreak, food-borne disease

---

## 要 旨

食品等の流通の広域化に伴って、食に由来する感染症（食中毒）が地域および時間を超えて発生するケースが見られるようになってきている（diffuse outbreak）。共通の汚染原因がある場合に、それを迅速に把握できないと被害が拡大する恐れがある。菌株の遺伝学的多様性を利用して、菌株間の関連性を解析し、その結果を疫学的調査に利用することにより、汚染源の究明に貢献させるシステムの構築（パルスネット）が図られている。

〔感染症誌 76：842～848, 2002〕

### I. 広域集団発生を迅速に検知する必要性

世界的なグローバリゼーション化のため、人や物が大量かつ短時間の間に広域に移動するようになってきている。感染力の強い病原体に罹患したヒトが広域に移動すれば、多くのヒトに感染を広げる可能性が高い。また経口感染症に関与する病原体に汚染された食品や食材が広域に配送され、それにより食中毒が発生した場合には、広範囲な地域において多数の犠牲者が出ることになる。離れた地域で、または時間的な差をもって此処の事件が起こるような場合には、各々が共通の原因によって生じている集団事件、いわゆる“diffuse outbreak”（散在的集団発生）、であるということの認知までに多くの時間を要し、被害を拡大させてしまう可能性が高い。このような状況に於いては、感染症や食中毒の拡大を未然に防ぎ被害を最小限に食い止めるために、感染源の迅速なる把握およびそれに対する適切なる対策が要求される。そのためには原因となる病原体の検出・同定および各

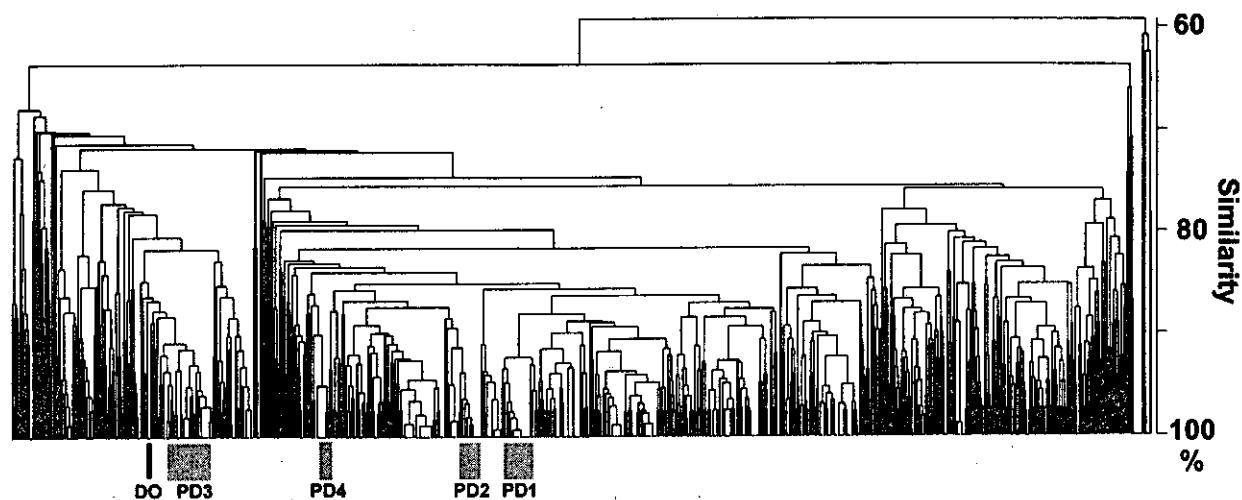
地で分離された病原体間の関連性等に関する科学的データを集約し、その結果に基づいて疫学的解析を行うことが不可欠である。

### II. 病原体の遺伝学的多様性の解析とその利用；パルスネット

各事例の原因となっている病原体間の関連性を明らかにするために、病原体の染色体の構成成分である DNA 配列の多様性を利用した分子生物学的手法が有用であり、近年多くの病原体解析に用いられるようになってきている。種々の病原体のゲノムの全塩基配列が解読されその情報が集積されるにつれ、例えばある菌種の同じ血清型に属する菌株間においてすらゲノム上の DNA 配列に差異を見いだすことが出来ることが判明してきている。“strain to strain difference（菌株間の差）”を検知できる技術を用いれば、菌株間のお互いの関連性をより詳細に解析できるわけである。理論的には菌株間の差を検出するにはゲノムの全塩基配列を決めればよいわけであるが、多数の菌を短時間

Fig. 1 The dendrogram of PFGE profiles of EHEC O157 isolates<sup>8)</sup>.

Similarity of PFGE profiles after *Xba*I-digestion was analyzed by dendrogram using the computer software GelCompar II (Applied Maths). High genomic diversity was found among isolates of EHEC O157. Isolates from DO, a diffuse outbreak and PD, possible diffuse outbreaks, which have been recognized, are located in each cluster indicated.



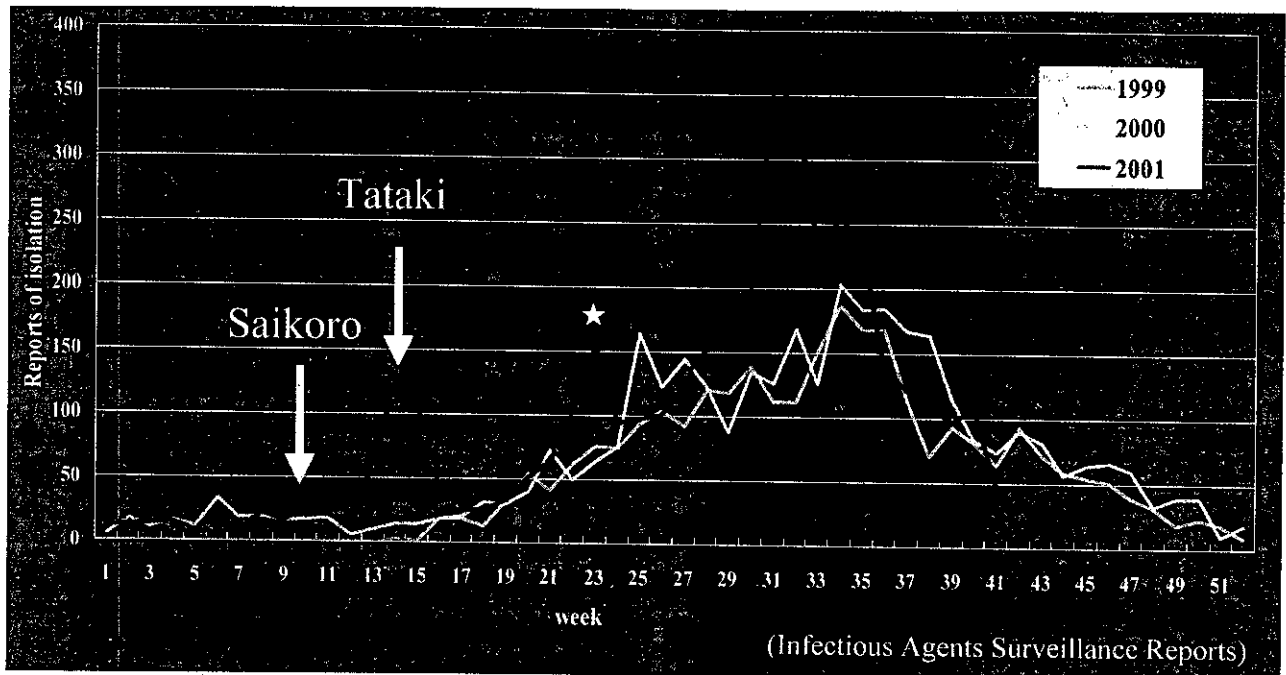
に解析する必要がある場合にその方法を用いることは、経済的にもまた要する時間的にも現時点においては現実的ではない。そこで、より簡便にDNA間の差異を検出する技術が開発されてきている。主に使用されている方法としては、パルスフィールド電気泳動〔pulsed-field gel electrophoresis〕(PFGE)<sup>1)2)</sup>、random amplification of polymorphic DNA (RAPD)<sup>2)3)</sup>、あるいは amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法<sup>4)</sup>などがある。前者は微生物の染色体を制限酵素により特異的に切断した後、特殊な電気泳動装置を用いて大きさの異なるそれぞれのDNA断片を分離し、その泳動パターンを比較することにより、各分離菌の染色体DNAの構成の差を比較する手法である。後者2つは、分離菌の染色体DNAを鋳型としてランダムな塩基配列を持つDNAプライマーを用いてPCR (polymerase chain reaction) を行い、増幅された複数のDNA断片のパターンを比較する手法である。数ある方法の中で、現時点においてはPFGE法が菌株間のDNA構成の差を検出するのに感度的にもまた再現性においても最も優れた方法であると認識されている<sup>5)</sup>。パルスフィールドゲル電気泳動法を用いての菌株解析ネット

ワーク (パルスネット；PulseNet) は、このPFGE法を用いて、各地で分離される菌株の関連性をいち早く解析し、それを疫学分析に利用させるシステムである。

### Ⅲ. EHEC O157 による事件の疫学調査における PFGE 解析の有用性

PFGEによる遺伝型別が、病原菌の疫学マーカーの一つとしてさまざまな菌種において使われてきているが、特にEHEC (enterohemorrhagic *Escherichia coli*；腸管出血性大腸菌) O157に関しては疫学的解析における有効性が確立していると言える<sup>6)7)</sup>。我々は、今までに臨床検体から分離された7,000株以上のEHEC O157菌体についてPFGE解析を行い、3,000種類以上の異なるパターンに分けることができることを明らかにしてきている<sup>8)</sup>。つまり疫学的に関連性のない株はほとんどがお互いに異なるパターンを示していることになる (Fig. 1)。EHECの染色体ゲノムはその構成において不安定であり、菌が分裂し継代を重ねるに従いゲノム構成に変化が生じやすい。その大きな原因の一つとしては、EHEC O157は多くの(少なくとも10以上)バクテリオファージDNAおよび多数のpathogenicity Island (病原因子群島)と

Fig. 2. Incidence of EHEC O157 isolates in 1999~2001.  
The number of EHEC O157 isolates is shown weekly. Two outbreaks in 2001, due to the contaminated "Saikoro Steak" and beef "Tataki", are shown in arrow.



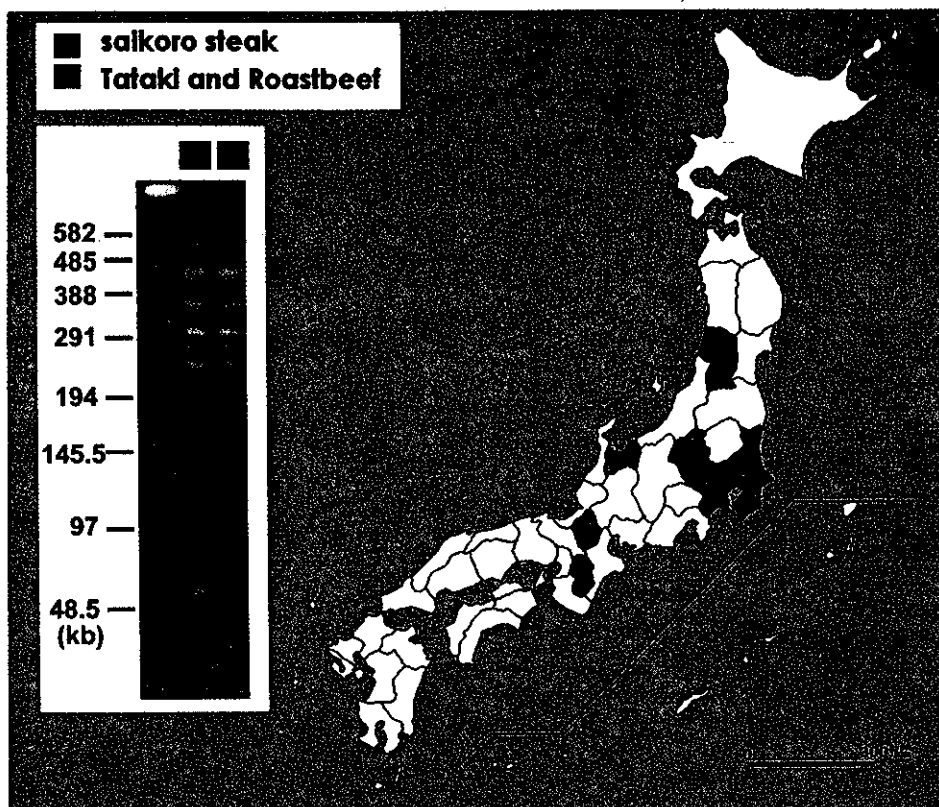
いう外来性の遺伝子群を保持していることが関与している。いくつかの EHEC O157 について全ゲノムの構成を比較してみると、PFGE パターンの差異にバクテリオファージのゲノムの内部構造及びその挿入部位における変化が反映していることが明らかになってきている<sup>9)</sup>。このゲノム構造の不安定性が、却って疫学的解析に利用できる利点になっている；同じ PFGE パターンの菌が複数の食中毒患者から分離された場合には、ある状態の菌が特定の食材を汚染してからあまり分裂を繰り返さないうちに感染が起こったこと、つまり同じ汚染食材を複数の患者が喫食した可能性が高いことを示すことになる。一方、ゲノム構成が非常に安定な菌の場合には、どの事例から分離される菌も PFGE パターンが高い類似性を示すため、疫学的解析にはあまり意味を与えないことになる。

PFGE 解析結果が有用であったいくつかの EHEC O157 の集団事例を示す。(1) 1997 年 3 月に関東南部および東海地域において発生した EHEC O157 による事例では、患者宅の残食にあったカイワレ大根から分離された株の PFGE パターンがこれらの地域における患者から分離された株の PFGE パターンと一致し、カイワレ大根

が感染源として特定された。(2) 1998 年 5 月に富山県および首都圏を中心として 7 都府県で計 49 名の患者が発生した EHEC O157 の事例では、北海道産のイクラから分離された菌の PFGE パターンがイクラ喫食者の患者から分離された株のものと一致した。その結果を受けて、行政的処置が取られ製造元に残存していた約 200 トンのイクラが廃棄処分されたため、その後の患者の発生が阻止された<sup>10)</sup>。(3) 2001 年 2~3 月にかけて、滋賀、富山、奈良の 3 県でチェーンレストランのサイコロステーキ [ビーフ角切りステーキ] を原因食とした EHEC O157 による事例が発生した<sup>11)</sup>。(4) また、同年 3~4 月にかけては、首都圏を中心とした 1 都 6 県において、EHEC O157 で汚染された牛肉のタタキおよびローストビーフを喫食後、患者 204 名が発生した<sup>12)</sup>。(3) (4) の事例では、食品と原材料の冷凍輸入牛肉から EHEC O157 が分離され、それぞれの事例内の患者分離株の PFGE パターンと一致した (Fig. 2 and 3)。以上の 4 事例は、患者と食品から EHEC O157 が分離された珍しい事例であるが、患者の発生が複数の地域に及んでいること及び発生に時期的な差があることから通常の検査のみではお互いの関連性の認

Fig. 3 Location of two "diffuse outbreaks" and *Xba*I-digested PFGE profiles of each isolate.

Outbreaks caused by contaminated "Saikoro Steak" and "beef Tataki" were spread to the prefectures shown by red and blue, respectively.



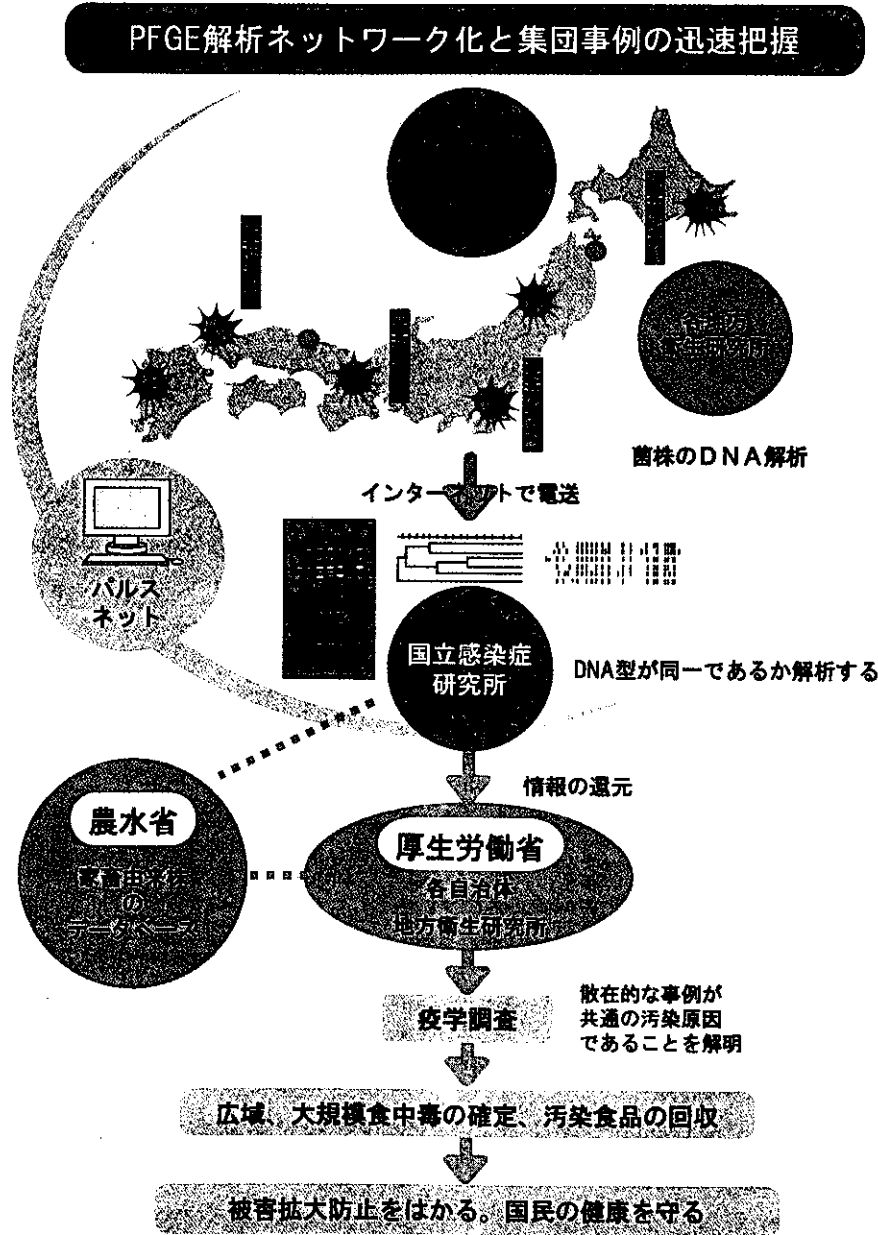
知は困難である。それらは、一見散発的に発生していると思われるが実際は共通原因によって起こった集団発生、いわゆる diffuse outbreak と言える。PFGE ネットワークの最大の利点は、このような diffuse outbreak の早期発見、及びそれにより被害の拡大防止を実現できることにある。

#### IV. パルスネットの構築

まずは、国立感染症研究所、全国の地方衛生研究所（一部政令指定都市の保健所を含む）、及び厚生労働省を対象としてのネットワークの構築を図る。その前段階として、PFGE 解析結果の信頼性を高めるためには、分離された株の PFGE 解析を行う地方衛生研究所間およびそのデータを集約する国立感染症研究所との間での解析結果のデータの互換性を確立すること、つまり解析法の精度管理を十分に行うことが重要である。従来の型別方法である、血清型、ファージ型別等においては同一規格の血清あるいはファージを用いてそれぞれの

型別の精度管理が行われてきており、その結果は国際的な標準に照らして比較することが可能である。一方、PFGE に代表されるような遺伝型別法においては、現在のところ国際的な標準化は無論のこと、国内においても解析結果に対しての互換性が図られていない。そのため国立感染症研究所と地方衛生研究所の間で平成 12 年度からの厚生科学研究費の補助の元、精度管理の研究が行われてきたところである。その結果、標準株との比較により対象株の PFGE 泳動のバンドパターン系の系統樹を書くことにより、お互いの菌株の関連性を明らかにする作業が行われた。PFGE 解析のプロトコルの統一、できる限り解析機器、試薬等の規格化を行うことにより、異なる施設間のデータの再現性の確保、およびその解析結果の比較が可能であることが判明した。BSE 等の問題が勃発している現在、国は「食の安全性を確保する」という国家的命題を掲げている。EHEC O157 等の

Fig. 4 Scheme of the PFGE network and early detection of diffuse outbreaks. Local Health Institutes send the data of PFGE patterns of the pathogens to the National Institute of Infectious Diseases (NIID) by Internet. NIID analyzes the accumulated data and the analyzed information backs to the local Health Institutes and Ministry of Health, Labour and Welfare. Appropriate action will be taken to end the outbreak.



大規模食中毒への迅速対応も重要課題であり、当パルスネットの構築の事業化を目論んで、平成15年度からの予算を計上しているところである。

その折りには、以下のようなパルスネットの構築を進めていく予定である (Fig. 4). 地方衛生研究所等における分離株の PFGE 解析結果をイン

ターネット経由で国立感染症研究所細菌第一部に電送する。そこで系統樹等の作成による画像解析を通し各地で分離されている菌株間の遺伝学的関連性を明らかにする。その結果と疫学情報とを総合的に解析し、各事例間の関連性を解明する (この作業は国立感染症研究所感染症情報センター、



厚生労働省、および各都道府県の疫学担当との連携になる)。さらに、これらの解析結果を WISH (厚生労働行政総合情報システム) 上の WWW サーバーに転送し、情報の開示を行う。地方衛生研究所および保健所等は WISH を介してその情報を閲覧することができる。システムを構築するにあたって、最初から一度に全国の地方衛生研究所を対象にするのは技術的にも困難があるので、まずは全国を6ブロックに分けた地区のそれぞれの代表地方衛生研究所に参加をお願いし、漸次拡大してゆく方針である。PFGE パターンは画像としてデータベース化されるが、WISH 上で公開するのは実際のパターンではなくてそれに基づいて作成された、菌株間の相関性を示す系統樹である。分離菌株の解析情報のみの閲覧ではなくて分離地や時期などの疫学的な情報もリンクされる。日本全国の分離株の情報を知ること、それぞれの都道府県内で分離された菌株の位置づけ(広域の流行株か否かまたはお互いに関連性のない散发株か等に関するもの)が早い段階で判断できるようになることが期待される。遺伝型が同一と考えられる菌株が複数の地域から分離されているような状況(diffuse outbreak)が把握できれば、疫学的な調査結果と組み合わせて迅速な感染源の解明、および感染の拡大防止に貢献できるだろう。また、将来的には農林水産省等との連携を計れるようになれば、汚染原因の元まで辿れる可能性がある。国民の健康を守るために、省を越えての連携が重要になる。

#### V. 国際的な連携

米国では CDC (Centers for disease control and prevention) を中心として、米国内のいくつかの州立公衆衛生研究所、FDA (Food and Drug Administration) および USDA (United States Department of Agriculture) の研究室間で、パルスネットの構築が行われてきている。年1回の連絡会議を開催し、試行錯誤の結果、diffuse outbreak の迅速なる発見においてかなりの成果を上げるところまで来ている。かなりの額の予算が国から提供されており、そのことが当事業を成功させる鍵にもなっている。またカナダ、EU においてもパルスネット

構築の準備が進められている。APEC を中心としたネットワーク化に向けての試みを行うため、昨年、関連諸国が集まり会議がもたれたが、まだ進展していない状況である。食材の国際的流通が益々盛んになる今後、国を越えての食を介する感染症の拡大が懸念される。それらに機能的に対処するためには、国際的なネットワークが功を奏することになる。国際的なネットワークの構築に向けての努力が今後さらに展開されていくであろう。その折りには我が国のアジア地区における貢献が期待されるであろう。

#### 文 献

- 1) Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Ito K, Tamura K : Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 infection by two different genotypes-strains in Japan, 1996. *Lancet* 1996 ; 348 : 831-2.
- 2) Watanabe H, Terajima J, Izumiya H, Wada A, Tamura K : Molecular analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its application to epidemiological investigation. *Pediatr Internat* 1999 ; 41 : 202-8.
- 3) 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.
- 4) Iyoda S, Wada A, Weller J, Flood SJ, Schreiber E, Tucker B, *et al.* : Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 isolates. *Microbiol Immunol* 1999 ; 43 : 803-6.
- 5) Tenover CF, Arbeit DR, Goering VR, Mickelsen AP, Murray EB, Persing HD, *et al.* : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2233-9.
- 6) Barrett TJ, Lior H, Green JH, Khakhria T, Wells JG, Bell BP, *et al.* : Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157 : H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 3013-7.
- 7) Izumiya H, Terajima J, Wada A, Inagaki Y, Itoh KI, Tamura K, *et al.* : Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 isolates in

- Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1997 ; 35 : 1675—80.
- 8) Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Tamura, K, Watanabe H : High genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak ; Jpn J Infect Dis 2002 ; 55 : 19—22.
- 9) Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K, Nakayama K, Murata T, Tamura K, *et al.* : Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning ; (submitted)
- 10) Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Tamura K, Watanabe H : Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157 : H7 outbreak caused by contaminated Ikura-Sushi ingestion. Jap J Infect Dis 1999 ; 52 : 52—3.
- 11) 国立感染症研究所編：特集「腸管出血性大腸菌感染症」2001年4月現在. 病原微生物検出情報 (IASR) 2001 ; 22 : 1—2.

PulseNet Japan : Surveillance System for the Early Detection of Diffuse  
Outbreak Based on the Molecular Epidemiological Method

Haruo WATANABE, Jun TERAJIMA, Hidemasa IZUMIYA,  
Sunao IYODA & Kazumiti TAMURA

Department of Bacteriology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan

As the foods are stocked below freezing and widely distributed, a kind of food-borne outbreak which occurs in separate regions or in different time, so called “diffuse outbreak”, has been found at the present day. Unless the outbreak is early recognized, the number of victims would increase. Some methods have been developed to analyze the relatedness of bacteria isolated from the patients of enteric infections. PFGE, pulsed-field gel electrophoresis, is one of the methods and powerful to discriminate the difference in nucleotide sequences among bacterial genomes. Availability of PFGE analysis is appreciated to examine the linkage of each incident of food-borne infections in epidemiological investigation. A PFGE network, PulseNet Japan, is now under construction among National Institute of Infectious Diseases, local Health Institutes and Ministry of Health, Labour and Welfare.

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 細菌第一部

協力研究者 泉谷秀昌

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 本研究班で提示した標準化 PFGE 条件に基づいて行った PFGE 解析結果の収集を継続した。PFGE 解析結果から、解析ソフトによる系統樹作成、データベースの構築を行いこれらの結果を PDF の書類として、厚生労働行政総合情報システム(WISH)上の個別システム「PulseNet Japan」でほぼ1ヶ月おきにデータを更新しながら公開した。広域食中毒事例などへの迅速な対応を目的として、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の画像配信等に関する条件検討も行った。解析ソフト利用時の異なる研究機関におけるデータの互換性を確立するために、標準株の配布、PFGE 解析結果の電送受信を行い、解析結果の精度管理と電送条件の検討を行った。平成 14 年度の腸管出血性大腸菌(EHEC) O157:H7 の分離株のなかで平成 13 年度の広域流行株と同一遺伝子型を示す株による集団発生があり、平成 14 年度でも広域においてこれらの遺伝子型を示す株が分離されていたことが明らかになった。

#### A. 研究目的

EHEC 及び赤痢菌等のデータベースの拡充を目的として、標準化 PFGE 解析を行うとともに解析ソフト利用によるデータベースへの入力を行った。PFGE 解析の精度管理を行うことを目的として、本研究班構成機関への標準株の配布を行うとともに、それぞれの機関で行われた PFGE 解析結果を感染研へ電送する際の条件等について検討した。画像の電送時におけるファイル形式等についての統一した基準を設定することが正確なデータベース構築に必要だと考えられる。

#### B. 研究方法

感染研に送付された株については平成 12 年度に設定した PFGE 条件を用いて解析を行った。

PFGE の解析結果は、GelComparII (Applied Math 社)の日本語試行版(Fingerprinting II)を用いて画像解析を行った。Fingerprinting II による dendrogram 作成を行い、EHEC、赤痢菌等のデータベースを構築した。感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部については、本研究班構成機関に 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。また、解析結果をほぼ 1 ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。広域食中毒事例などへの迅速な対応が必要であると考えられる場合には、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の画像配信等に関する条件検討も行った。本研

究班構成機関に対して標準株を送付し、各機関で行った PFGE 画像を電送してもらい感染研においてデンドログラム作成を行った。

### C. 研究結果と考察

#### 1. EHEC 及び赤痢菌のデータベース利用による解析

PFGE は平成 12 年度の出発研究報告書に示されている泳動条件で解析を行った。平成 14 年に感染研に送付された EHEC の総数は 2334 株でそのうち EHEC O157 は 1806 株であった。平成 14 年においても下記のように diffuse outbreak が発生した。まず、4 月下旬から 5 月にかけて近畿地方 6 府県の焼肉チェーン店において diffuse outbreak が発生した(図 1)。感染研のデータベースにはこれらの発生以前に同一の遺伝子型であると思われる O157 が平成 13 年 12 月末から 14 年 1 月初めの散発事例から分離されていたことを示す情報が存在した。2 自治体からの送付株は同一遺伝子型であったが事例数が少なく疫学的な調査結果も不明で、両者の関連を即座に立証するには至らなかった。EHEC O157 の遺伝子型に多様性が存在することが明らかになっているなかで、複数の地域から同一遺伝子型の菌株が分離された場合に関連性を疑うべきとする今までの経験を強く支持する結果となった。データベース構築にあたり菌株に付随する疫学的情報が極めて重要であることを示唆する事例であった。

平成 13 年に EHEC O157 全体の約 2 割を占めていた同一遺伝子型の株が平成 14 年の 5 月以降も検出され、全国 23 自治体から 90 株が送付された(約 5%)。平成 13 年にはこの遺伝子型に極めて類似した 2 種類の遺伝子型を示す株も分離されたが、平成 14 年にもこれらの類似 2 遺伝子型が分離されていた。さらに平成 14 年にはこれらのうちのひ

つの型を示す株により老人ホームでの集団発生があり、8 名の死者がでた。この事例では食品の「香味あえ」から分離された O157 が患者等から分離された株の遺伝子型と同一であった。この遺伝子型を示す株は全国 14 自治体から 71 株が分離されていた(図 2A)。EHEC のその他の血清型で O26, O111 等による集団発生も例年のごとく報告され、O26 では複数の小学校において同一遺伝子型の分離株による大規模な集団発生があった(図 2B)。

2001 年末から 2002 年始めにかけて発生した *Shigella sonnei* による diffuse outbreak では、輸入カキを原因食品とし同一遺伝子型の *S. sonnei* が検出された。2002 年の 5 月以降に分離された *S. sonnei* の遺伝子型を調べる目的で、研究班 6 ブロックで分離された株の一部について韓国株との比較を行った。2001 年末に分離されカキとの関連がある株や東南アジアからの帰国者から分離された株、韓国での流行株等が近似度 95%以上のクラスターを形成したが、2002 年後半に分離された株では、カキ関連株と同一遺伝子型を示す株は見つからなかった(図 3)。したがって、少なくとも調べた株についてはカキ関連株とは異なる遺伝子型であり、2001 年末からの同一遺伝子型の *S. sonnei* が一時的に広域から分離されていたことを支持する結果と考えられた。

本研究班構成機関における標準株の PFGE 解析結果では、目視による同一遺伝子型が解析ソフトによる 100%近似度のクラスター形成には至らず約 90-95%程度の近似度に留まった。解析ソフトの標準化を行う基準には現在 DNA サイズマーカーであるラムダラダーを使用しているが、CDC プロトコールで採用しているように、よりバンドの鮮明な像を形成する標準株を選定して使用すること