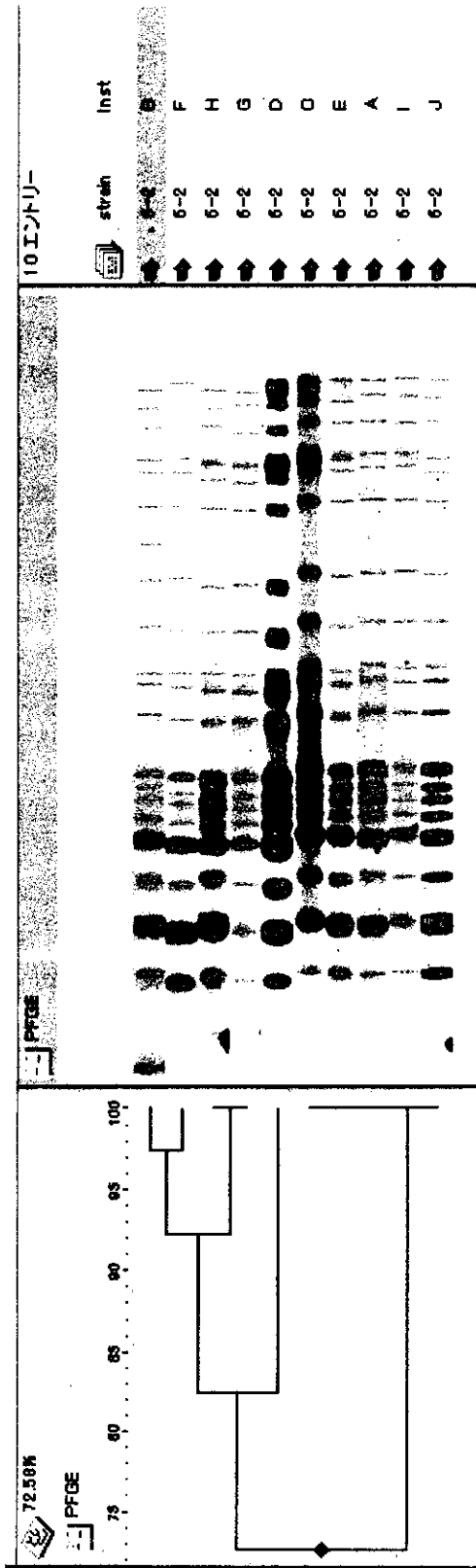


図9-6 施設間での比較

菌株6、torelance; 1.2%



菌株6、torelance; 3%

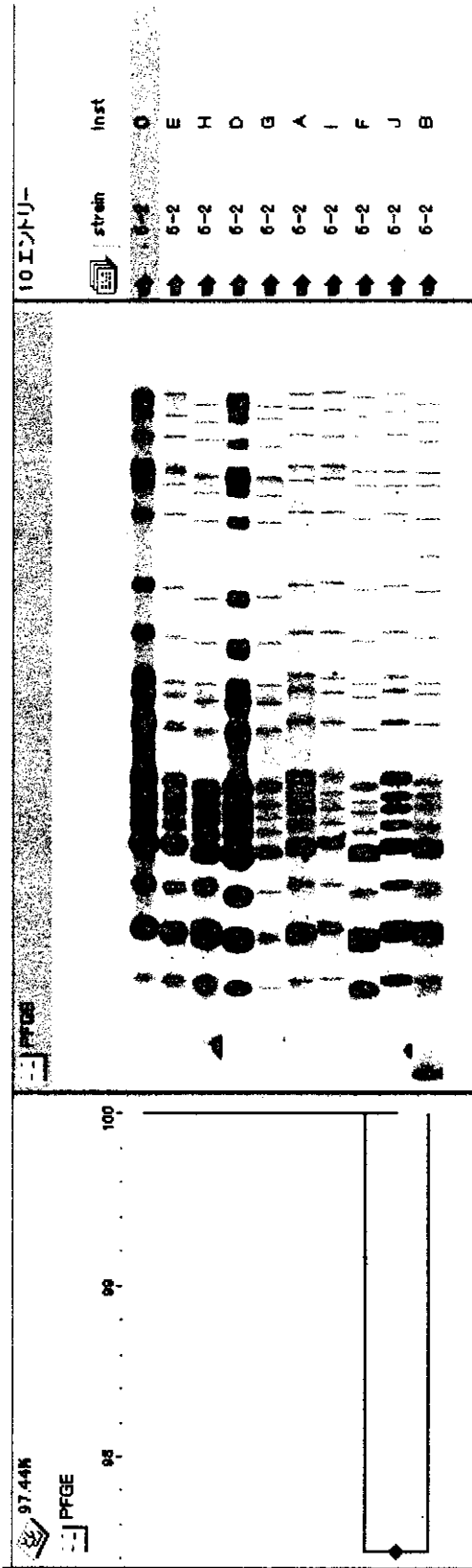
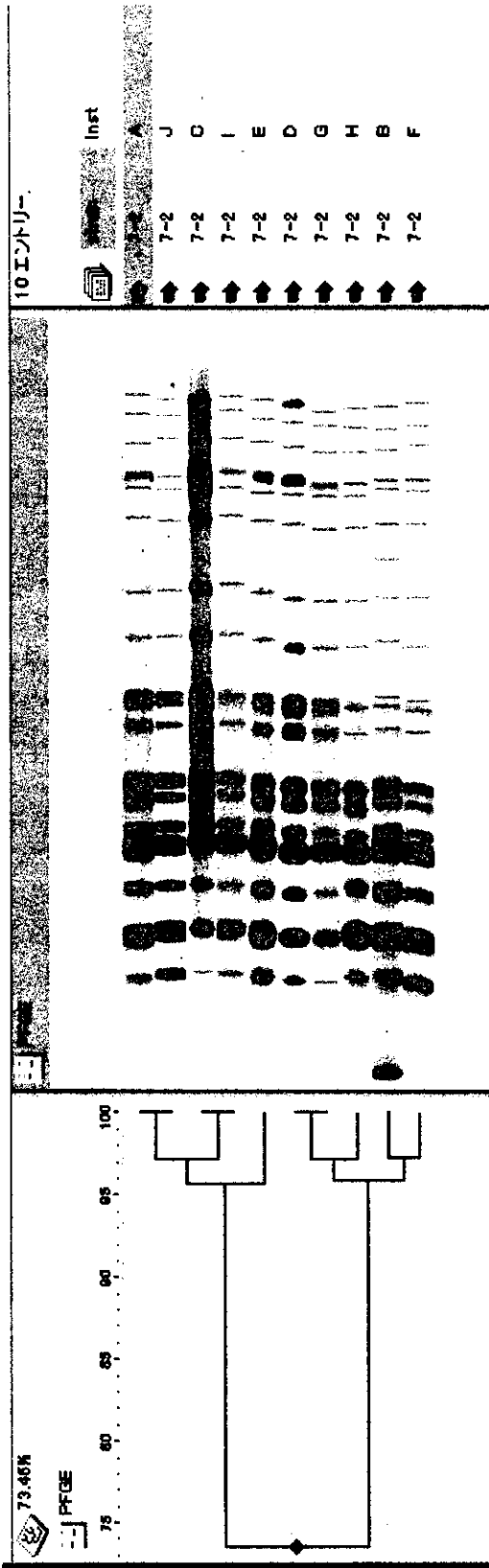


図9-7 施設間での比較

菌株7、tolerance; 1.2%



菌株7、tolerance; 3%

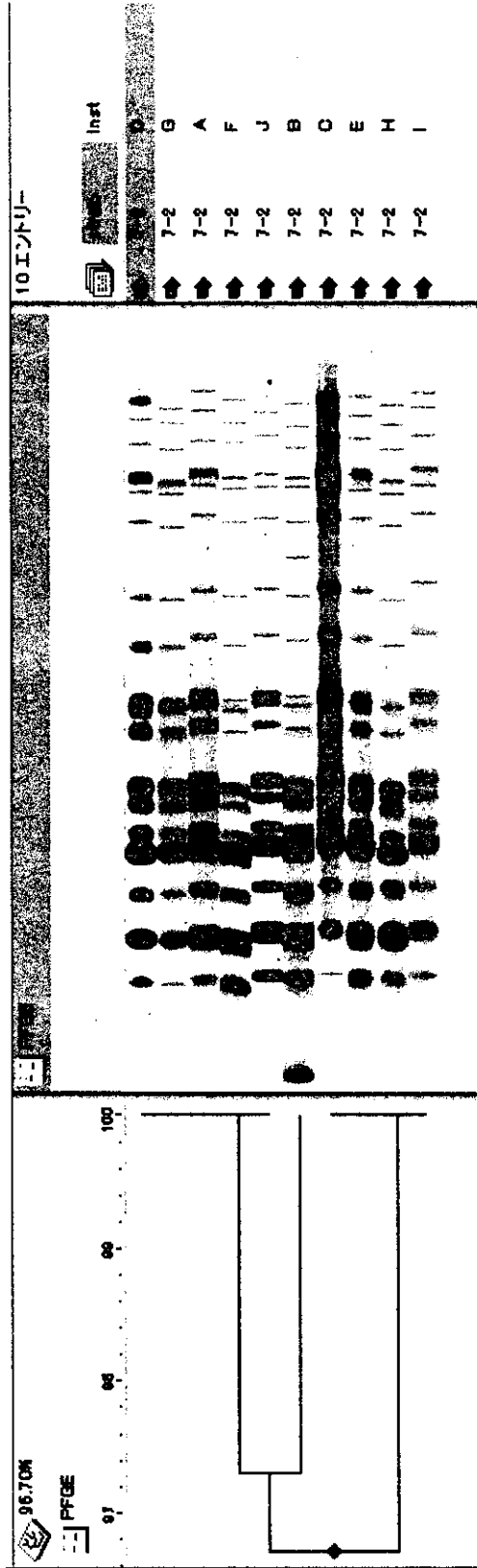
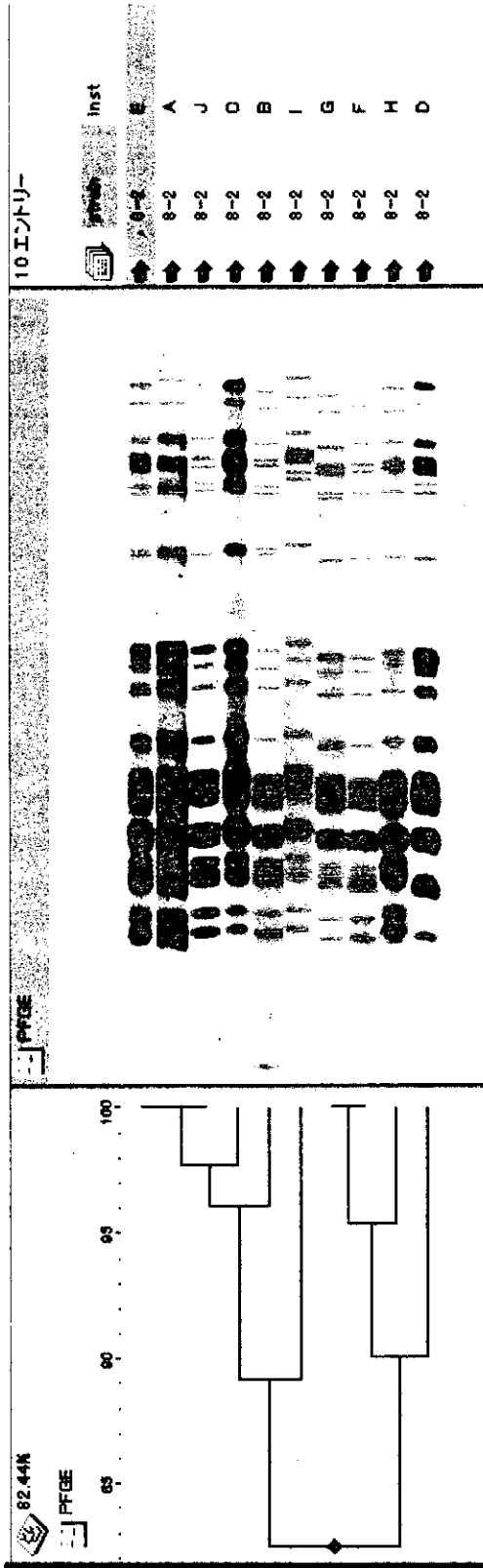


図9-8 施設間での比較

菌株8、tolerance; 1.2%



菌株8、tolerance; 3%

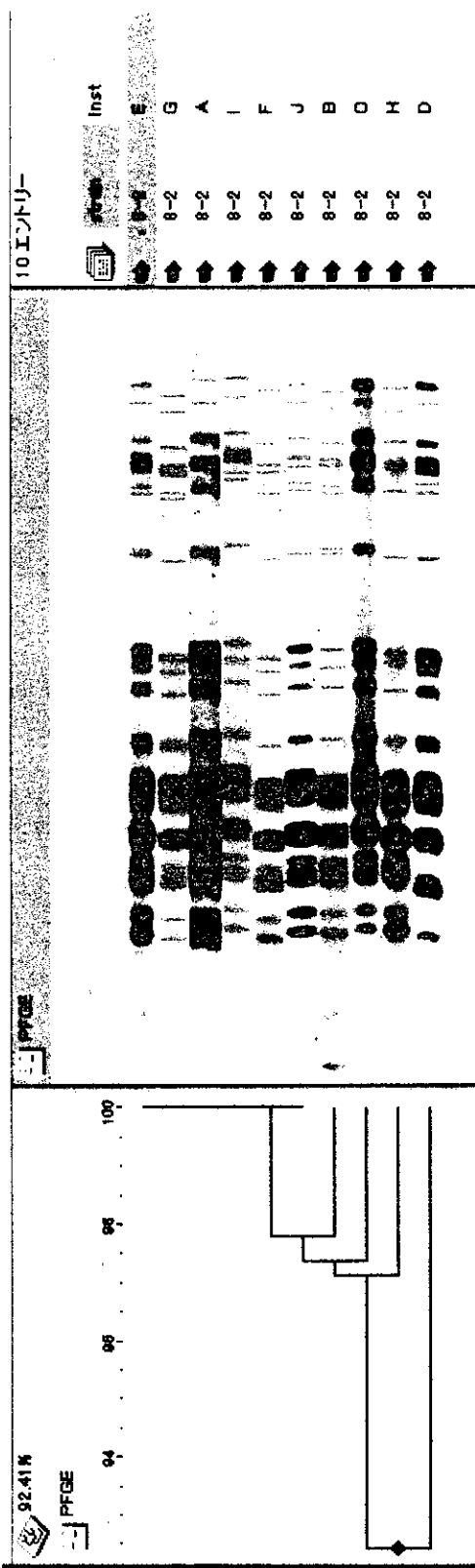
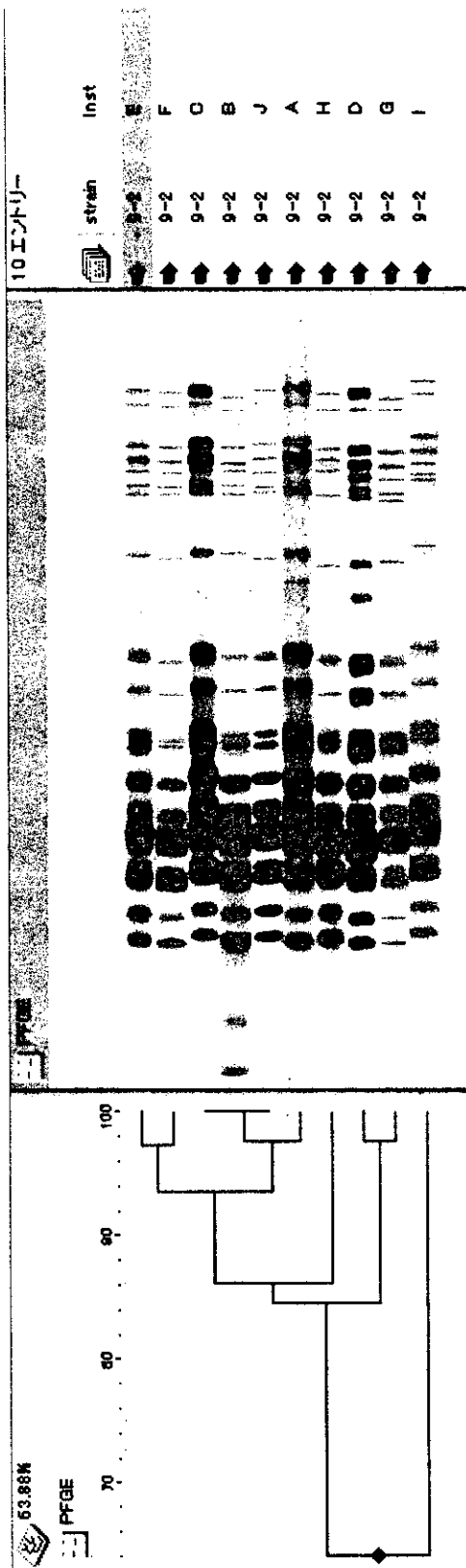


図9-9 施設間での比較

菌株9、torelance; 1.2%



菌株9、torelance; 3%

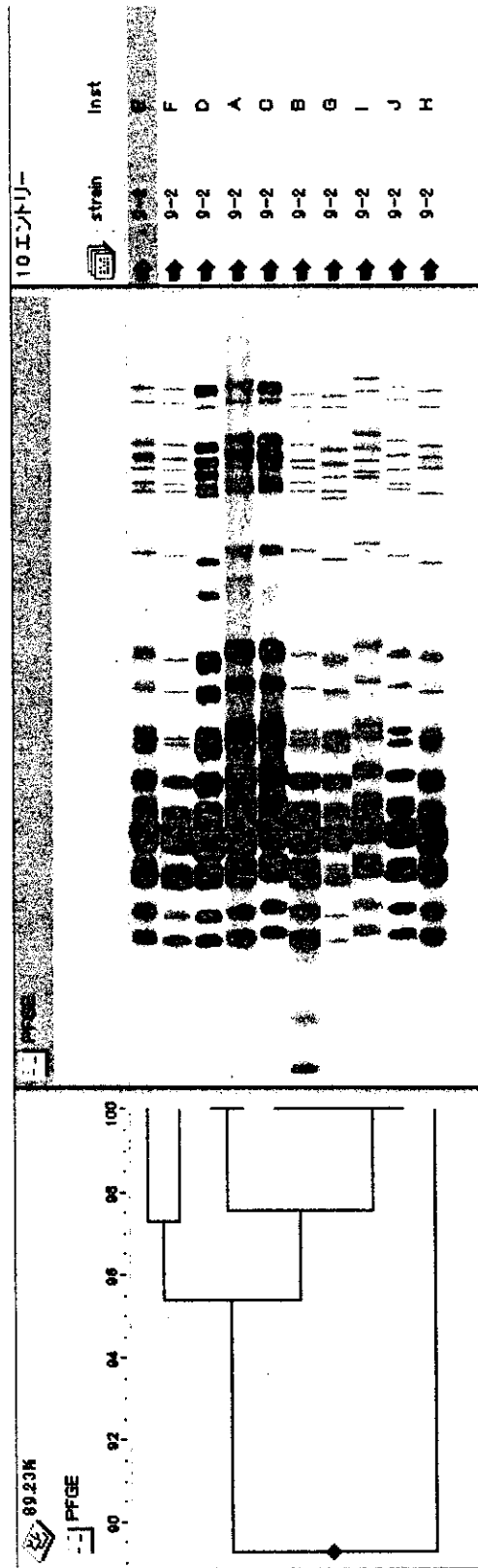
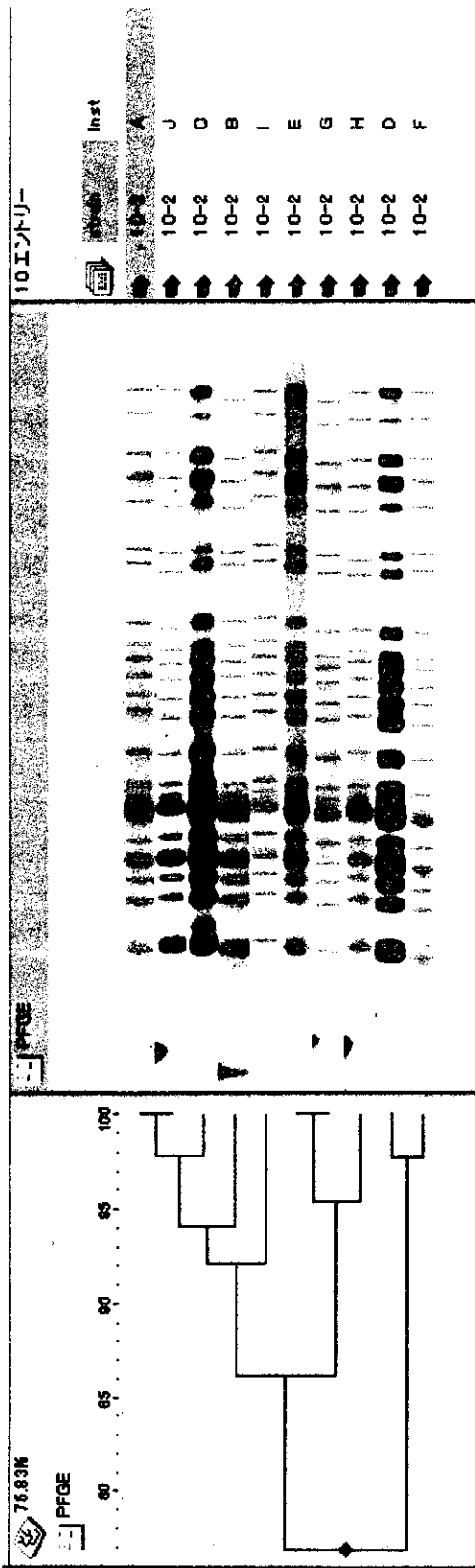


図9-10 施設間での比較

菌株10、torelance; 1.2%



菌株10、torelance; 3%

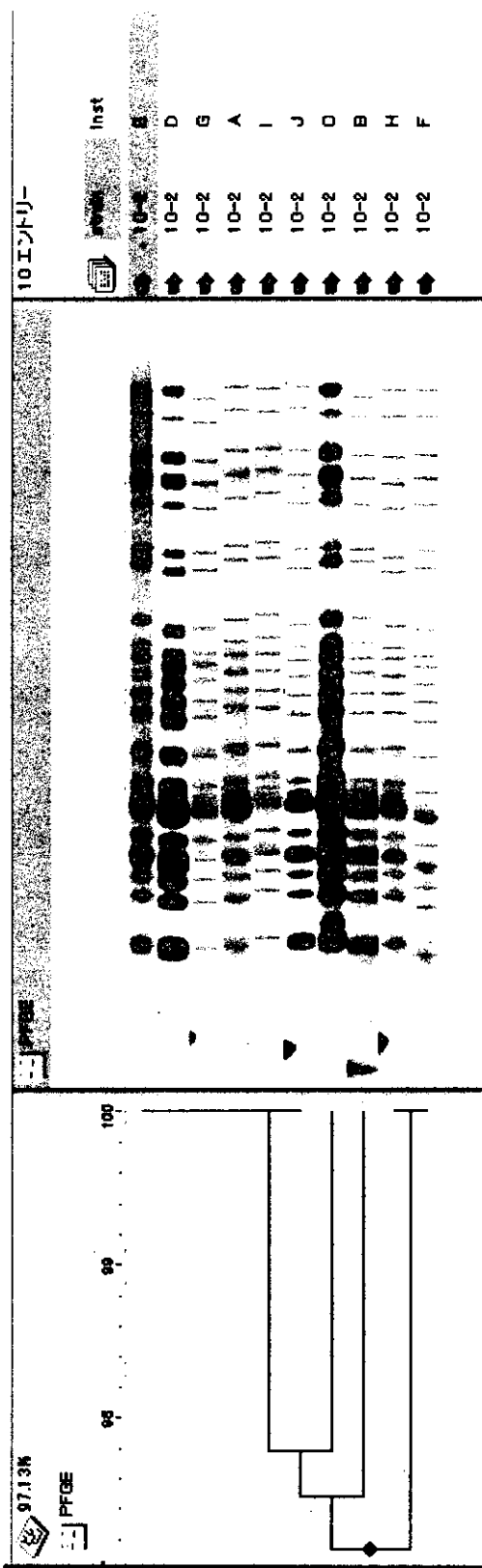
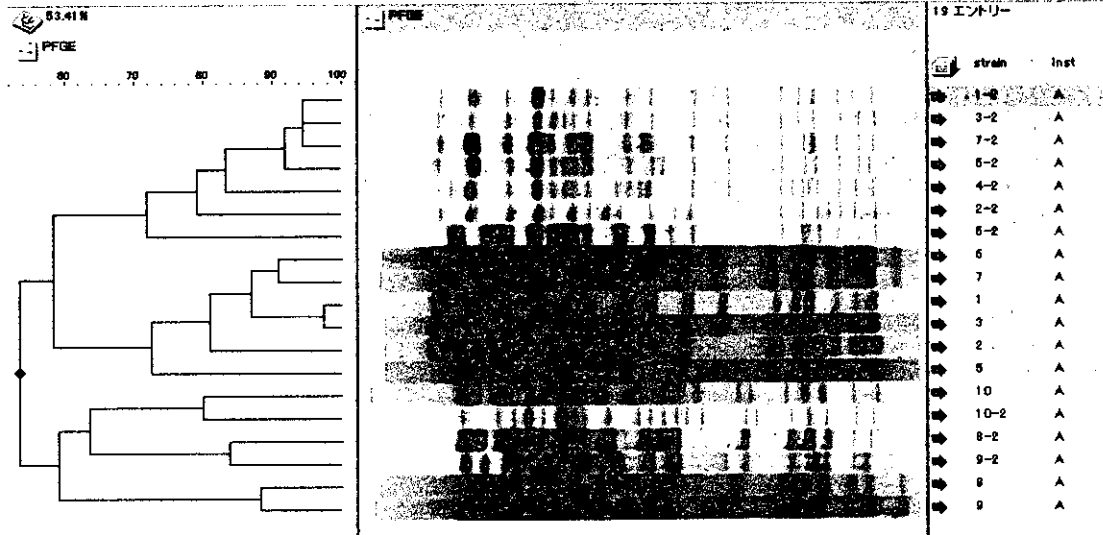


表3 施設間におけるsimilarity

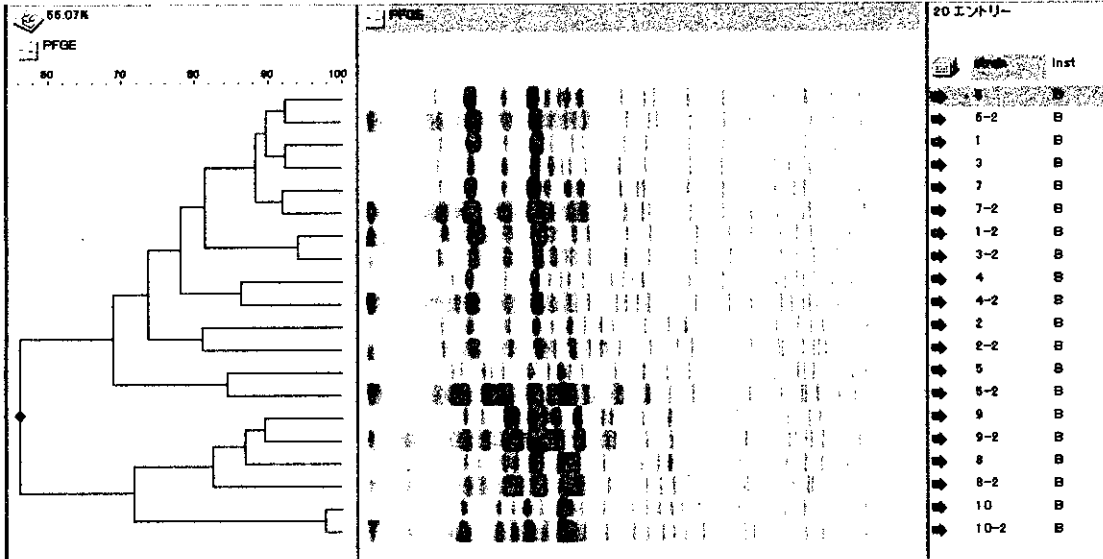
	1回目		2回目	
	1.20%	3%	1.20%	3%
菌株1	57.21	87.65	75.19	94.77
菌株2	67.53	92.63	78.53	89.84
菌株3	58.95	89.74	66.6	94.44
菌株4	73.67	92.2	77.36	93.03
菌株5	71.22	86.65	77.39	95.15
菌株6	72.61	84.61	72.58	97.44
菌株7	72.79	87.77	73.46	96.7
菌株8	75.77	79.54	82.44	92.41
菌株9	58.39	83.87	63.88	89.23
菌株10	80.92	88.19	76.83	97.13

図10-1 施設内比較(1回目と2回目の比較)

Lab. A



Lab. B



Lab. C

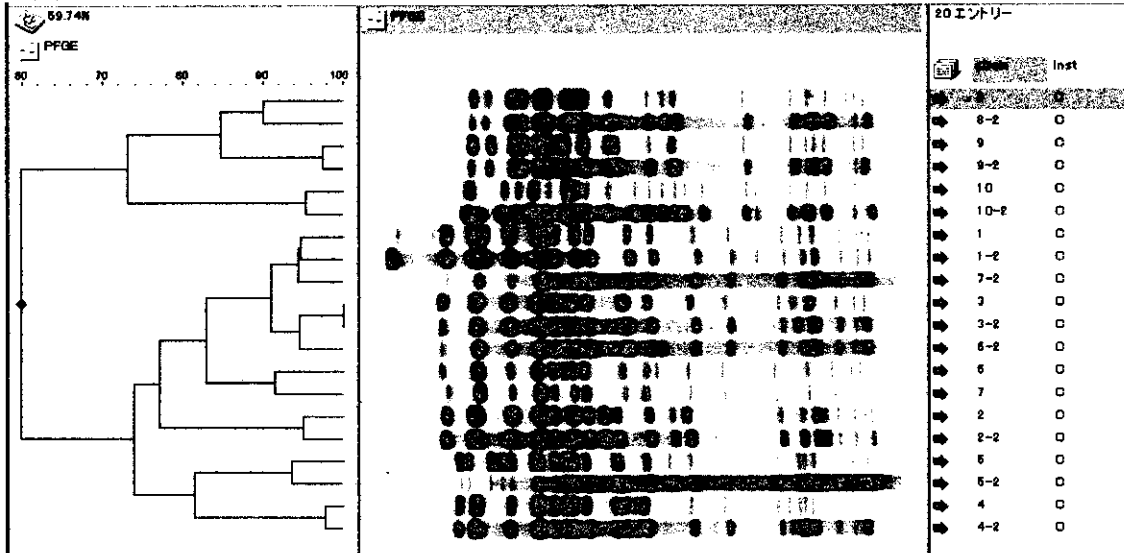
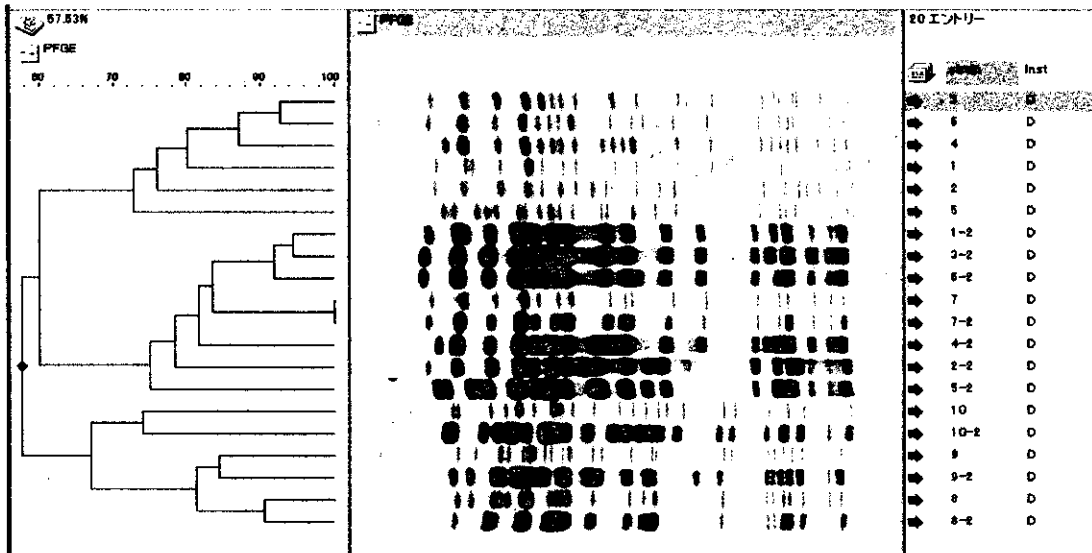
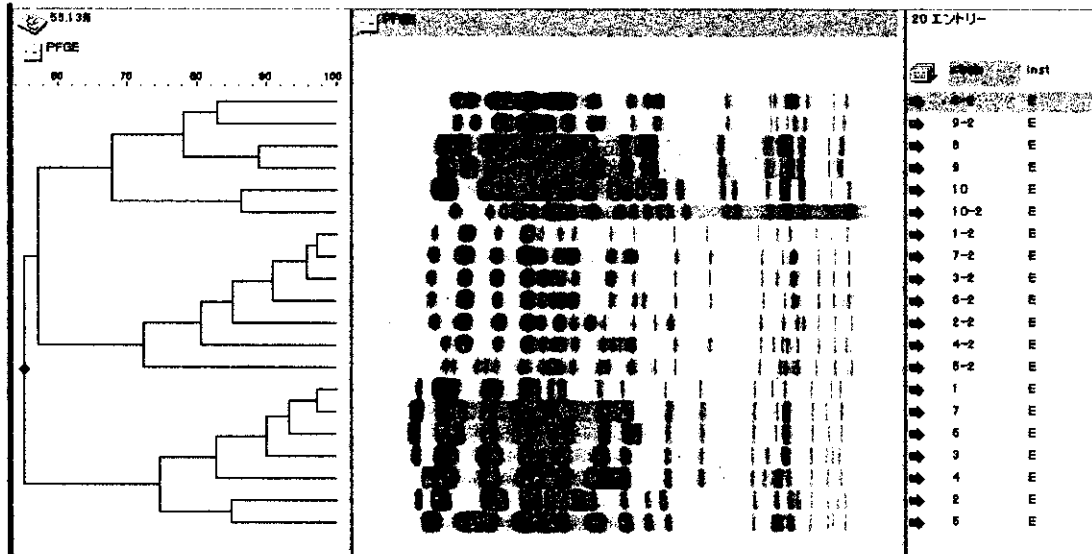


図10-2 施設内比較(1回目と2回目の比較)

Lab. D



Lab. E



Lab. F

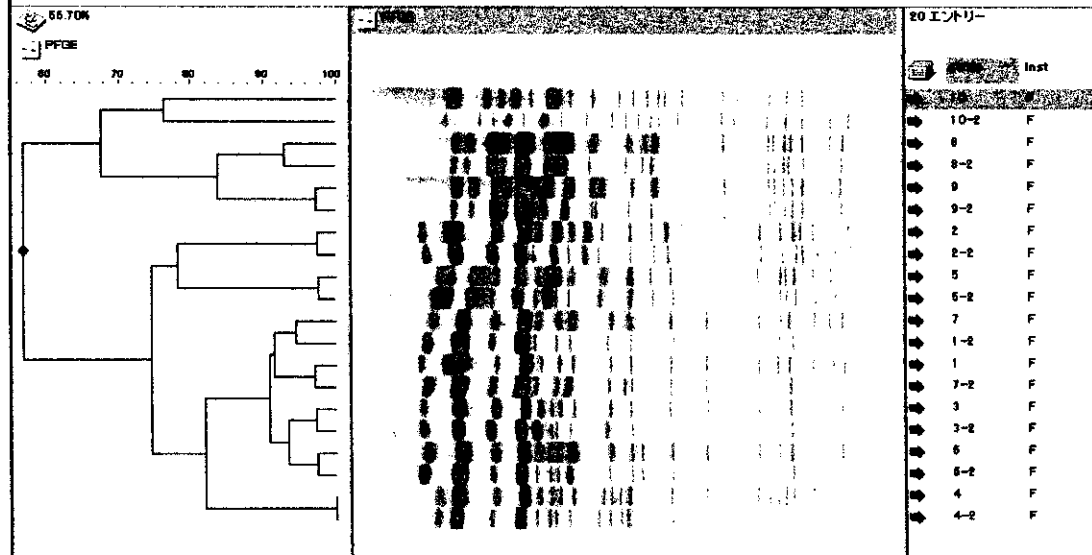
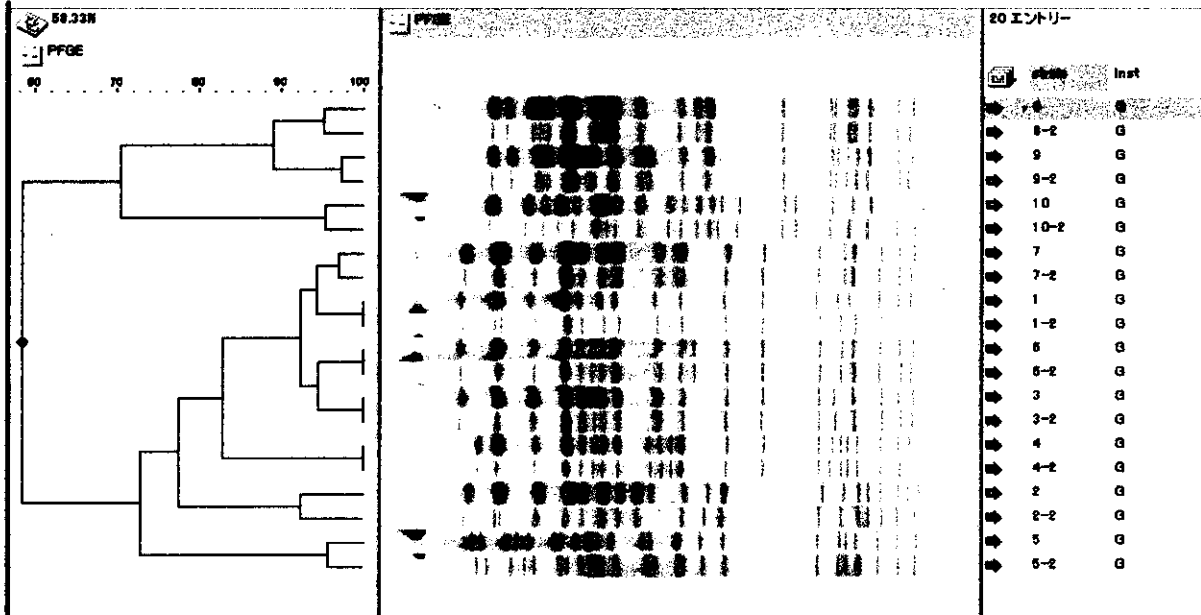


図10-3 施設内比較(1回目と2回目の比較)

Lab. G



Lab. H

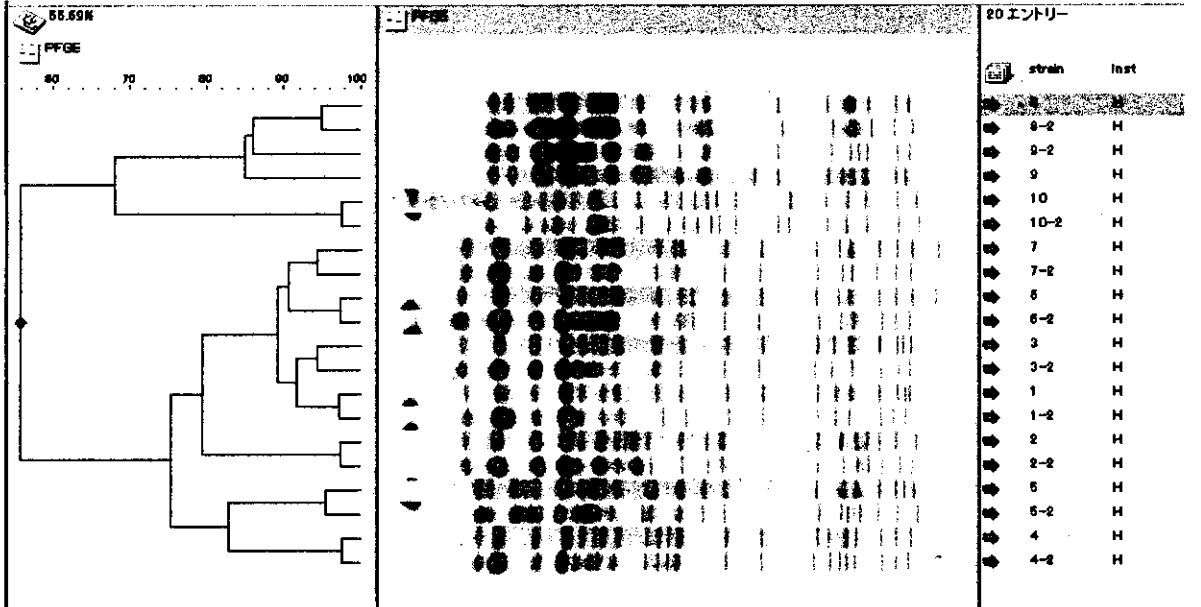
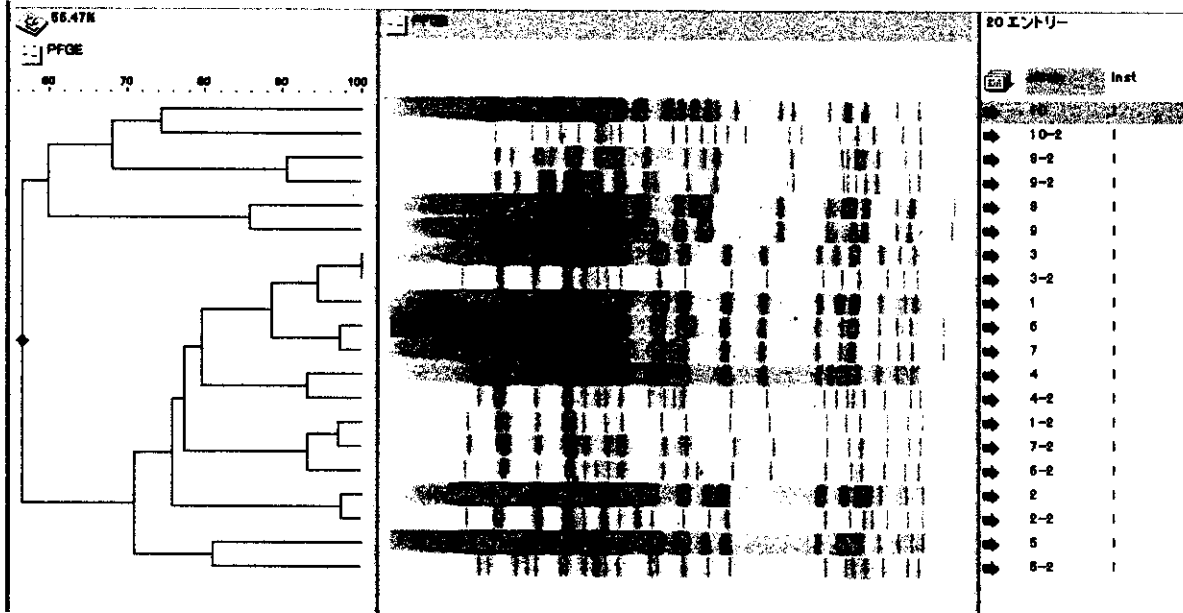


図10-4 施設内比較(1回目と2回目の比較)

Lab. I



Lab. J

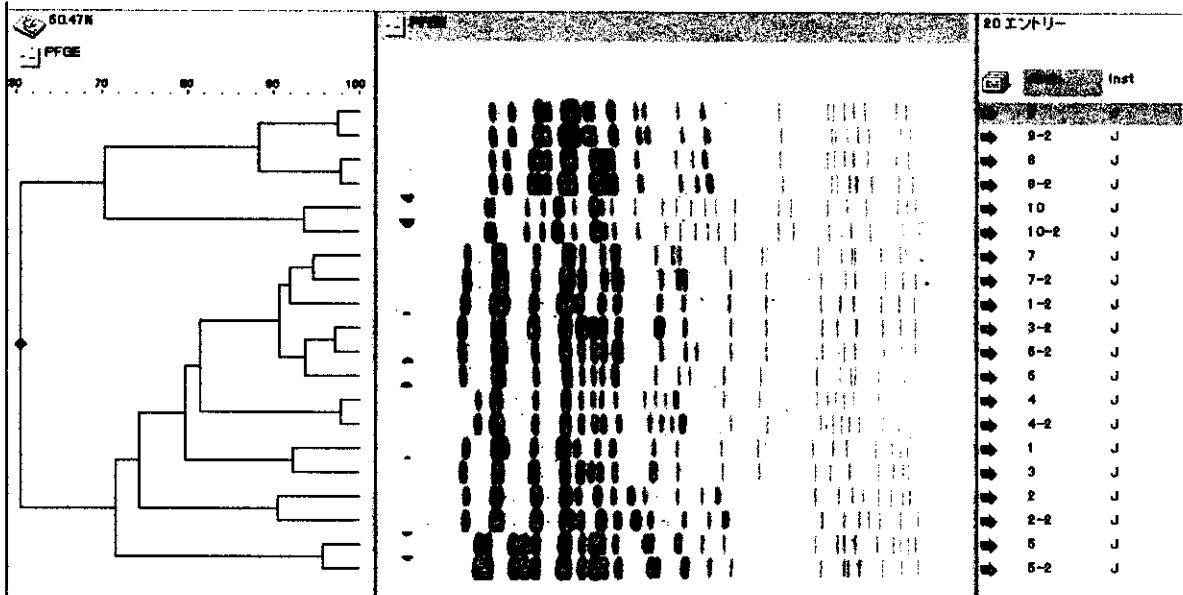


図 1 1 デンドログラム (2回目、torelance ; 1.2%)

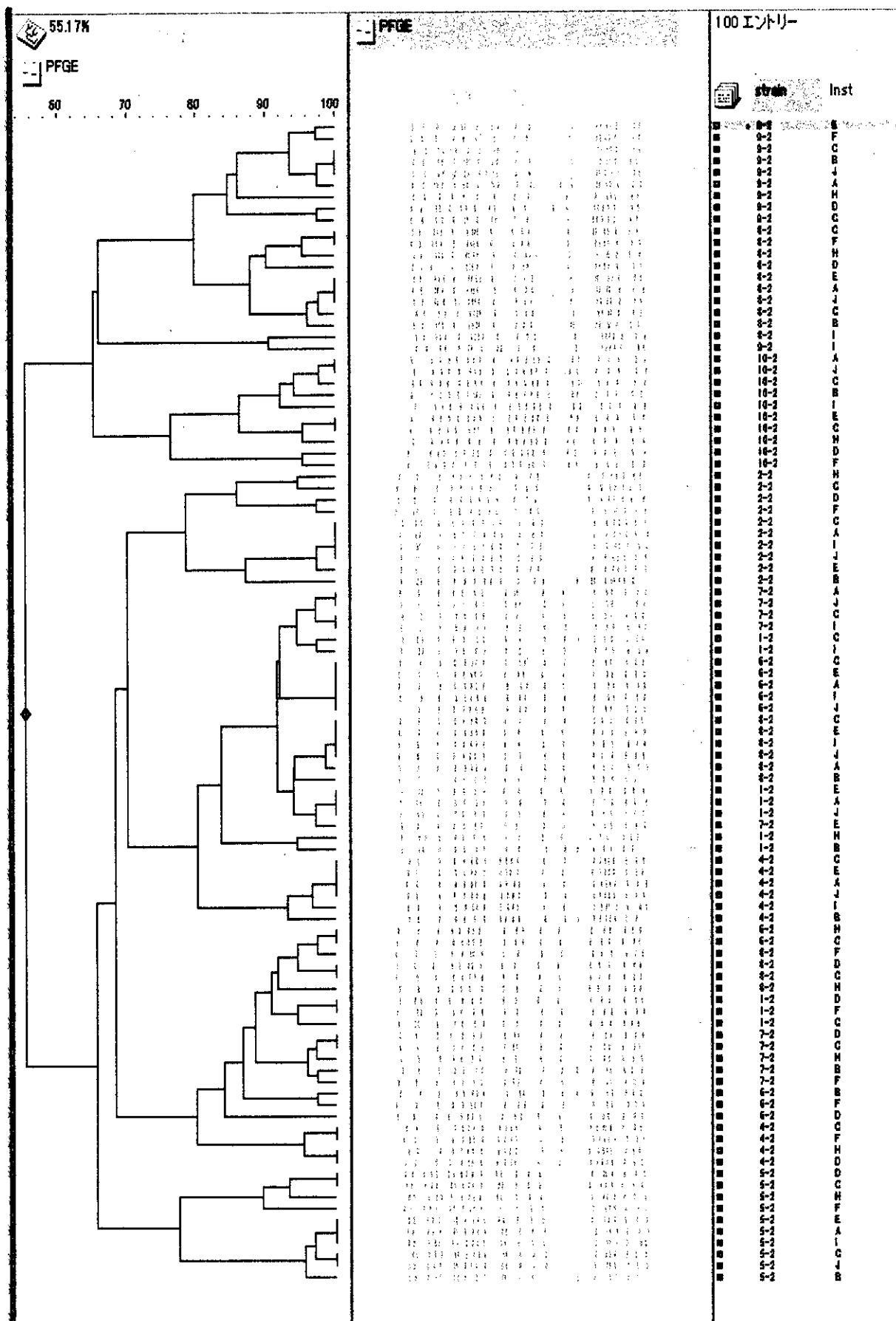


図12 デンドログラム (2回目、tolerance ; 3%)

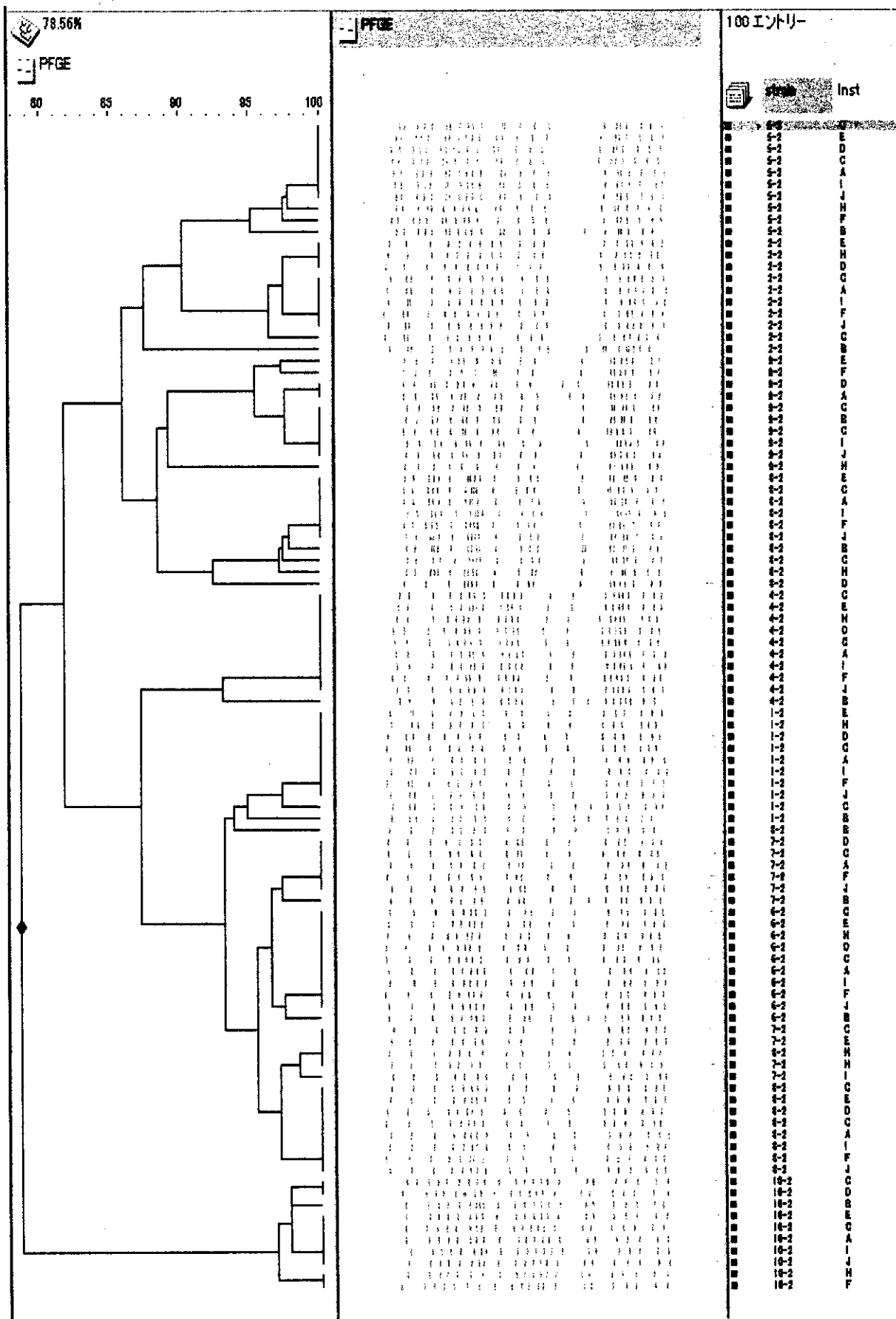


表4 北海道で分離された非典型的 *E. coli* O157:H7 菌株の疫学および病原因子

Subject no.	Strain no.	Age (years)	Sex	Specimen Collection date	City of isolation	Clinical symptom	Serotype	Phenotype			Chromosomal genes*					Plasmid genes†		
								SF	GUD	Haemolysis	stx ₁	stx ₂	eae	pas	EHEC-hly	etpD	KatP	espP
1	EC96012	61	M	Aug. 1996	Chitose	LF	O157:H7	-†	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
2	EC96020	58	M	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
3	EC96021	53	F	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
4	EC96022	59	M	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
5	EC96023	50	M	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
6	EC96024	47	F	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
7	EC96025	80	F	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
8	EC96026	63	F	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
9	EC96027	84	F	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
10	EC96029	64	M	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
11	EC96028	27	M	Aug. 1996	Chitose	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
12	EC96032	2	F	Aug. 1996	Akkeshi	D	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
13	EC96038	26	F	Aug. 1996	Akkeshi	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
14	EC96073	49	F	Sept. 1996	Engaru	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
15	EC96110	6	F	Oct. 1996	Kushiro	D	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
16	EC96111	6	F	Oct. 1996	Kushiro	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
17	EC96112	6	F	Oct. 1996	Kushiro	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
18	EC96113	4	M	Oct. 1996	Kushiro	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
19	EC97144	22	F	July 1997	Asahikawa	D	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
20	EC97119	2	F	Aug. 1997	Ebetsu	D	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
21	EC97120	8	M	Aug. 1997	Ebetsu	No	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
22	EC98206	74	F	Oct. 1998	Kushiro	D	O157:H7	-	+	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	-/-	-/-
23	EC96031	23	F	Aug. 1996	Sapporo	BD	O157:H7	-	-	EHEC-Hly	+	+	+	+	+	+	+25.4, 9.0	+8.4
24	EC96017	8	M	Aug. 1996	Obihiro	BD	O157:H7	-	-	EHEC-Hly	-	+	+	+	+	+	+25.4, 9.0	+8.4

SF, fermentation of sorbitol; GUD, β-glucuronidase activity; F, female; M, male; LF, loose faeces; N, no symptom; D, diarrhoea; BD, bloody diarrhoea.

*These genes were examined by PCR.

†Detection of the gene by PCR/size (in kb) of the genome DNA fragments hybridizing to the respective probe. +, positive result by PCR; -, no signal obtained.

‡Results obtained after overnight culture of bacteria on SMAC agar plates.

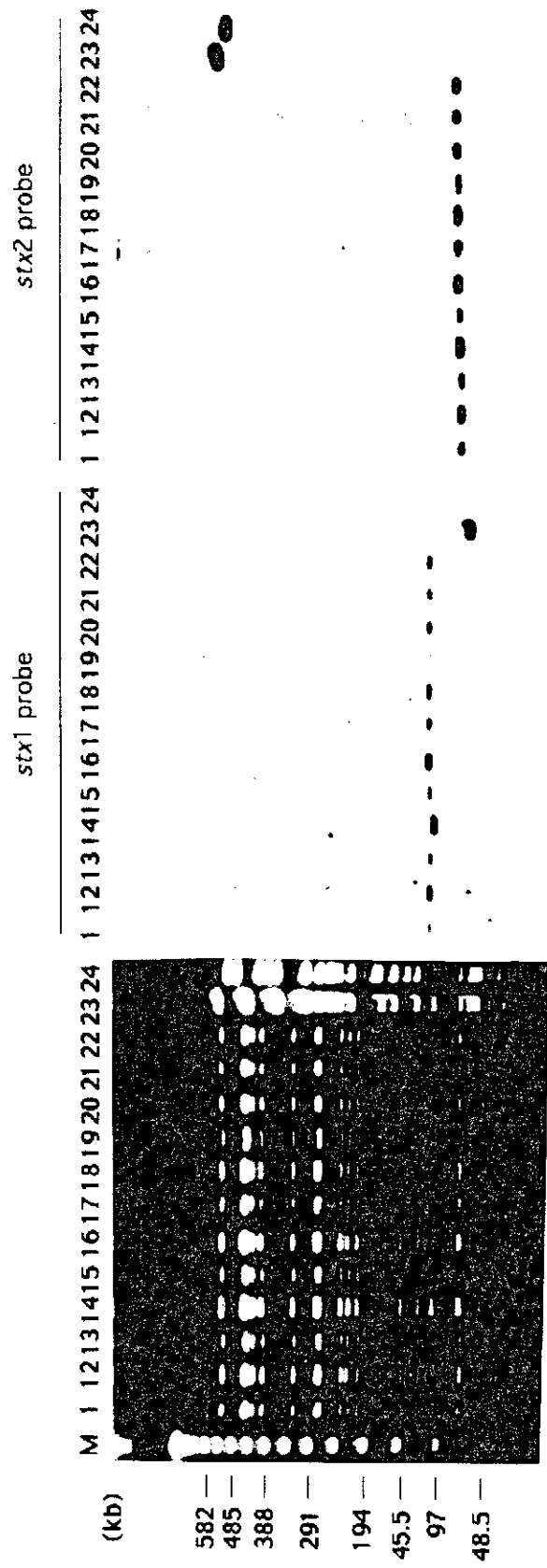
表5 PCR プライマーと反応条件

Primer designation	Nucleotide sequence (5' - 3')	Target	PCR conditions*			PCR product size (bp)
			Denature	Annealing	Extension†	
LP30	CAG TTAATG TGG TGG CGAAGG	<i>stx1</i>	94° C, 90 s	64° C, 90 s	72° C, 90 s	348
LP31	CAC CAG ACAATG TAA CCG CTG					
LP43	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G	<i>stx2</i>	94° C, 90 s	64° C, 90 s	72° C, 90 s	584
LP44	GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C					
PT-2	GCG AAA ACT GTG GAA TTG GG	<i>uidA</i>	94° C, 90 s	64° C, 90 s	72° C, 90 s	252
PT-3	TGATGC TCC ATA ACT TCCTG					
SK1	CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC	<i>eae</i> (SK1/SK2)	94° C, 30 s	62° C, 60 s	72° C, 90 s	881
SK2	CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G					
LP2	CCC GAA TTC TTA TTT TAC ACA AGT GGC	<i>eae</i> α (SK1/LP2)	94° C, 30 s	62° C, 60 s	72° C, 90 s	2,807
LP3	CCC GAA TTC TTA TTC TAC ACA AAC CGC	<i>eae</i> γ (SK1/LP3)	94° C, 30 s	62° C, 60 s	72° C, 90 s	2,792
LP4	CCC GTG ATA CCA GTA CCA ATT ACG GTC	<i>eae</i> β (SK1/LP4)	94° C, 30 s	62° C, 60 s	72° C, 90 s	2,287
LP5	AGC TCA CTC GTA GAT GAC GGCAAG CG	<i>eae</i> ε (SK1/LP5)	94° C, 30 s	62° C, 60 s	72° C, 90 s	2,608
wkat-B	CIT CCT GTT CTG ATT CIT CTG G	<i>katP</i>	94° C, 30 s	56° C, 60 s	72° C, 150 s	2,125
wkat-F	AAC TTA TTT CTC GCA TCA TCC					
hlyA1	GGT GCA GCA GAA AAA GTT GTA G	<i>hlyA</i>	94° C, 30 s	57° C, 60 s	72° C, 90 s	1,551
hlyA4	TCT CGC CTG ATA GTG TTT GGTA					
D1	CGT CAG GAG GAT GTT CAG	<i>etpD</i>	94° C, 30 s	52° C, 60 s	72° C, 70 s	1,062
D13R	CGA CTG CAC CTG TTC CTG AITA					
esp-A	AAA CAG CAG GCA CIT GAA CG	<i>espP</i>	94° C, 30 s	56° C, 60 s	72° C, 150 s	1,830
esp-B	GGA GTC GTC AGT CAG TAG AT					
ANK49	GCA GGA TCC ATG TTA TCC TCA TAT AAA ATA AAC	<i>pas</i>	94° C, 30 s	56° C, 60 s	72° C, 150 s	1,239
ANK50	CCA GGT ACC TTA ATA CGA CAG TGG AAT AIG					

* For 30 cycles.

† After 30 cycles, final extension step was done for 5 min.

図13 GUD⁺株のPFGEパターン



レーン1-22; GUD⁺株、レーン23, 24; 典型的なO157株

図14 O157のGUD+株およびGUD-株におけるデンドログラム

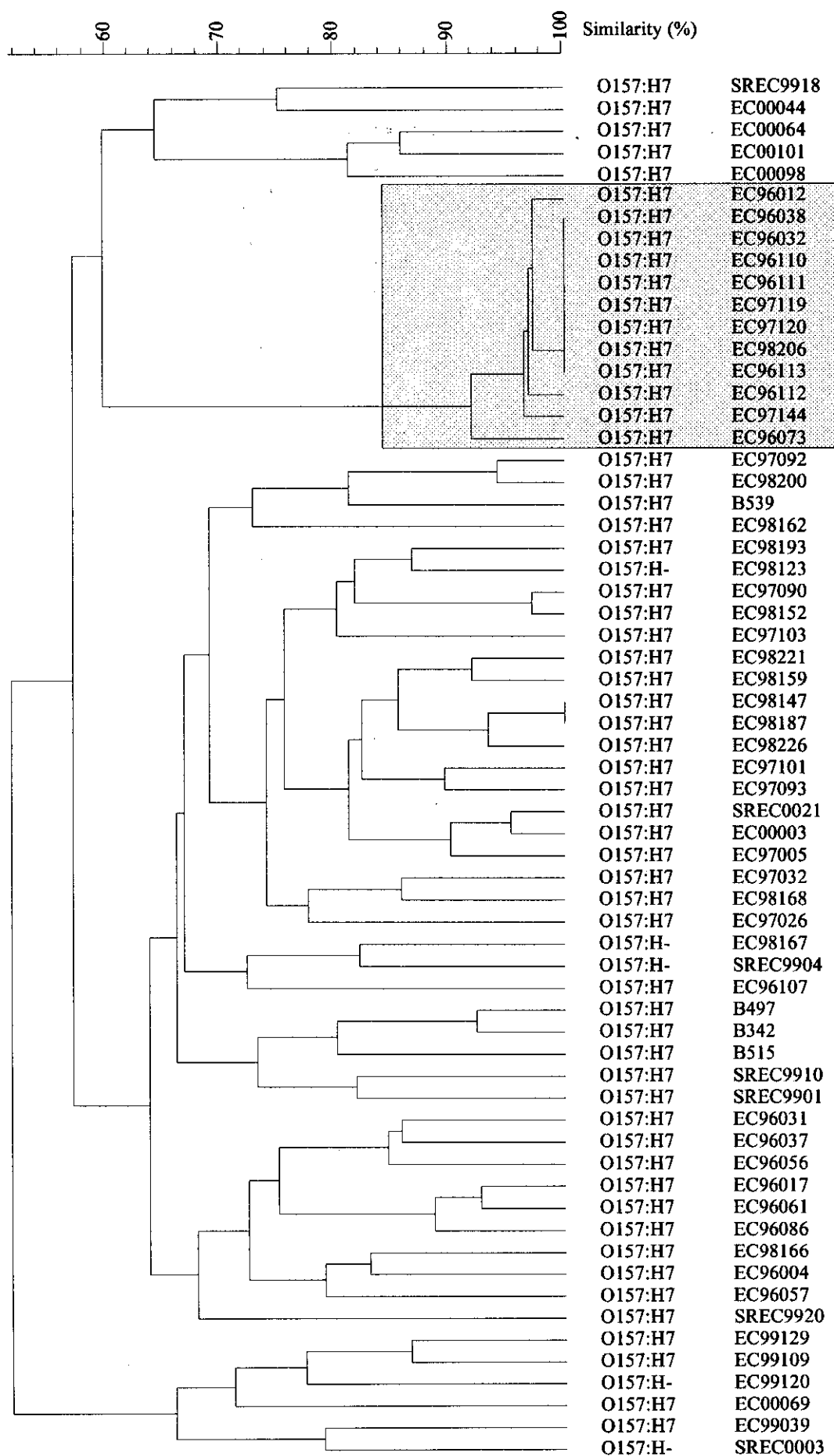
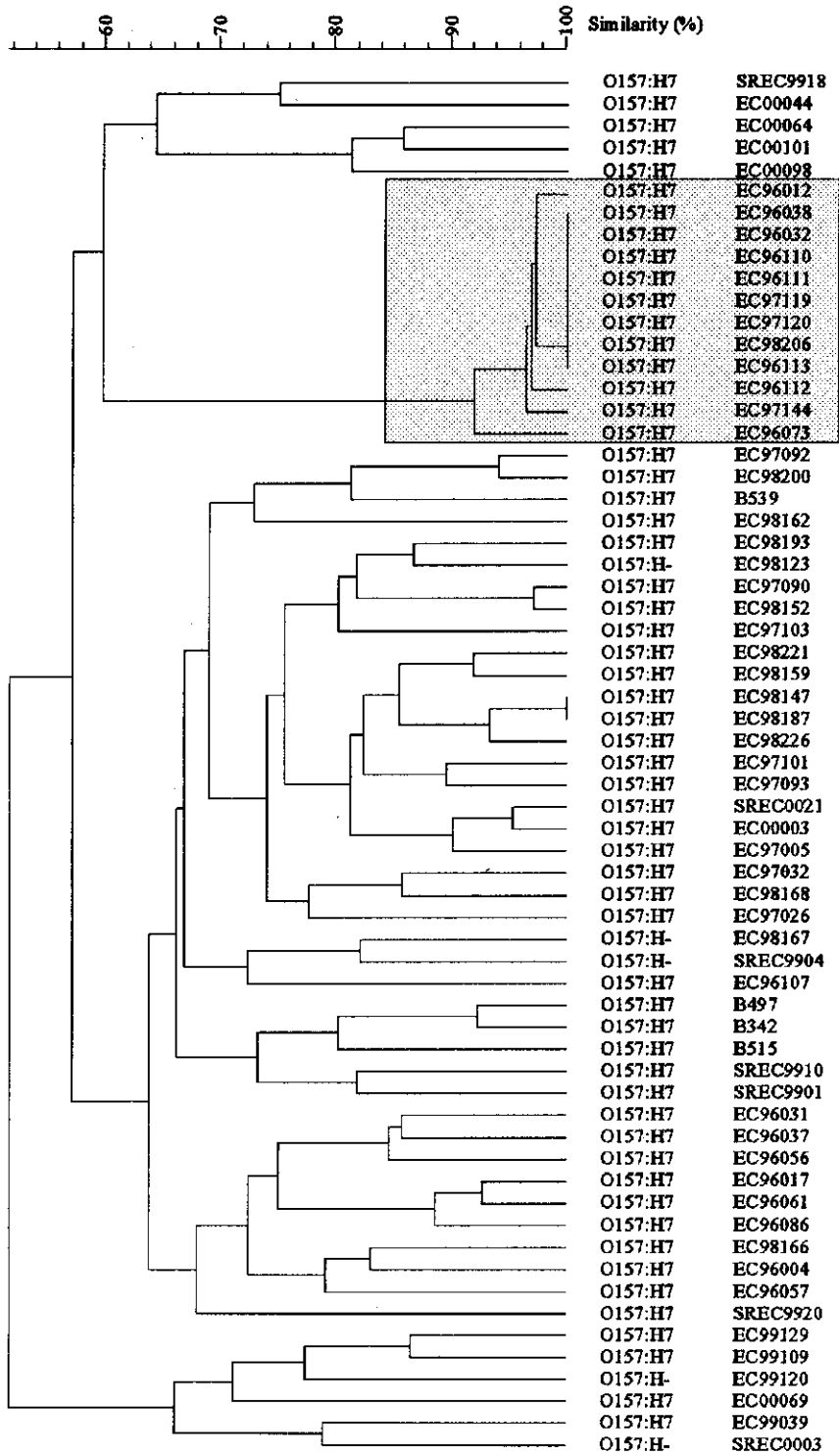


図 14 O157 の GUD⁺株および GUD 株におけるデンドログラム



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成14年度 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

分担研究者	甲斐 明美	東京都立衛生研究所
研究協力者	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 映子	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

研究要旨：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。

A. 研究目的

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ために、PFGE法により解析され

た菌株の成績に基づいた菌学的情報システム（パルスネット）を早期に構築する必要がある。各研究所の解析成績をパルスネットに結合し、解析ソフトを

用いて解析するための技術的整備を図る。

本研究では、関東甲信静地域に分散する11地方衛生研究所（地研）においてPFGE解析を行い、主に以下の点について検討した。

① 東京都内で分離された腸管出血性大腸菌O157を対象にPFGE解析を行い、その結果を解析ソフトを用いて解析を試みることによって、解析技術の習得を図る。

② 腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を用いて、各地方衛生研究所間でパルスネットシステムを試行する。

③ Diffuse outbreakが疑われる事例に遭遇した時には、直ちにPFGE解析を行い、その画像を電送、解析ソフトによる解析を試みる。

④ 各地研で経験した腸管出血性大腸菌O157およびその他の病原菌による集団および散発の感染症・食中毒事例の分離株を対象にPFGE解析を行い、PFGE技術の確認と有用性を検討する。

B. 研究方法

1. PFGE解析用共通菌株

各地研でPFGE解析するための共通菌株として、腸管出血性大腸菌O157:H7(VT1+VT2産生)の3株(C1, C2, C3)を供試した。

2. PFGE法による解析

PFGE用DNAブロックの作製は、寺島らの方法に準拠した。作製したDNAブロックは、制限酵素*Xba*Iで処理後、PFGE解析を行った。電気泳動条件は以下のとおりである。

PFGE 装置：

CHEF-Mapper 2所

CHEF-DR II 2所

CHEF-DR III 6所

GenePath 1所

電圧：6.0 V/cm

4 to 8 秒 (リニア) 9時間

8 to 50 秒 (リニア) 13時間

温度：12℃

3. PFGE解析成績の電送

各地研で解析したPFGE画像を、tif(または jpeg)ファイルとして、電子メールで送付した。

4. 画像解析

配布された画像解析ソフト

Fingerprinting II (BIO-RAD 社)を用いて解析を試みた。

C. 研究結果

1. 解析ソフトの試行

東京都内で分離された腸管出血性大腸菌O157の40菌株を対象にPFGE解析を行い、そのパターンを目視により型別を行うと共に、解析ソフトを用いて系統樹を作成した。表1に目視によるPFGEパターンを、図1に解析ソフトによる系統樹を示した。両者を比較すると、完全ではないが、ほぼ一致した解析成績が得られた。

2. 11研究所におけるPFGE解析の標準化と解析ソフトの試行

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株3株を用いて、11所の地研でPFGE解析後、その画像を都立衛生研究所に電送した(図2)。それらの画像を対象に解析ソフトを用いて系統樹を作成した。

PFGE画像の全バンドを対象に作成した系統樹では、異なる3菌株を明確に区

別することが出来なかった(図3a, 図3b)。

しかし、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、異なる3菌株はそれぞれ異なるクラスターを形成し、それぞれのクラスターの近似性は80%以上であった(図4a, 図4b)。系統樹に一致しない画像では以下のような問題点が認められた。

①分子量マーカーのバンドが鮮明に分離されていない。

②分子量マーカーのバンドが太い。

③全体的にDNA量が多過ぎ、バンドが太い。

3. 首都圏におけるコレラ患者多発時のPFGE解析

2002年7～8月、首都圏(東京, 千葉, 埼玉, 横浜)において、コレラ菌(*Vibrio cholerae* O1), Inaba型が15名から分離され、Diffuse outbreakが疑われた。分離されたコレラ菌について、それぞれ2研究所でPFGE解析を行い、その画像を電送した。その画像を図5に、解析ソフトによる系統図を図6に示した。

画像S(図5)では、解析した11菌株の内、2株(S-9, S-10)を除く9株は、非常に一致するパターンであり、系統樹でも88%以上の近似性を示した。

画像T(図5)では、解析した13菌株の内、1株(T-4)を除く12株は、非常に一致するパターンであり、系統樹でも97%以上の近似性を示した。

次に、画像Sと画像Tを解析ソフトで解析してみると、その系統樹上の近似性は75%であった。すなわち、目視では一致していると考えられるにもかかわらず、近似性は低い成績であった。

4. PFGE解析が有効に活用された事例

11研究所で合計20事例についてPFGE解析を行い、疫学解析として非常に有効に活用できた。各事例の概要は後述の通りである。

D. 考察

各研究所は、いずれも実際に発生した集団および散発の感染症・食中毒事例について、独自にPFGE法による解析を実施し、非常に有効であった事例を多数確認した。それに伴い、解析技術も進歩し、パルスネット構築のための環境整備が図られてきたことが明らかとなった。

また、PFGE画像を電送することにより、研究所間での菌株の比較がある程度可能となった。この方法は簡単であり、感染源調査の方向性を決定する上で非常に有用であることが確認された。

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、異なる3菌株はそれぞれ異なるクラスターを形成し、それぞれのクラスターの近似性は80%以上であった。PFGE技術は、いずれの研究所もかなり進歩しているが、パルスネットを構築するための現時点での問題点、すなわちPFGEを行う時の注意点は、以下の5点に整理される。

①マーカーの入れ方の統一が必要であり、ゲルの両端と真中のウエルに入れるのが良い。

②マーカーが鮮明に分離されているこ