

40株を用いた。

2. PFGE法：ゲルブロックの作成については、和田らの方法<sup>1)</sup>にて行い、DNAの切断には *Xba*I を用いた。電気泳動の条件は、4 - 8秒/12時間及び8 - 50秒/10時間、6V/cm、120°、11°Cにより、CHEF DR III system (BIO RAD社製)にて実施した。

3. ペロ毒素（以下VT）型別：PCR法とVTEC-RPLAキット（デンカ生研）にて行った。

4. 薬剤感受性試験：ABPC、SM、TC、CPFX、KM、CTX、CP、ST、NOR、GM、NA、FOMの12薬剤について、センチディスク（BBL）を用い、KB法にて実施した。

5. 生化学的性状：バイオテスト1号（アスカ純薬）にて行った。

## C. 研究結果

### 集団発生の概要

8月23日、某病院より市内に居住する保育園児B（2才女児、8月16日に下痢症状を呈した）からEHEC 026分離の発生届けが出された。当市では状況調査及びその家族への二次感染防止の指導を徹底し、併せて感染者調査のため保育園の園児（3クラスの園児86名、学童保育20名）、職員（保育士16名）等を対象に24日から合計153検体の検便を実施し

た。

また、保育園での給食は、併設の某病院の給食施設にて調理されていたため、最初の届出園児Bの発症日が8月16日であることを考慮して、8月12日～16日までの保存食46検体、給食施設のふきとり42検体、放流水2検体および調理従事者検便35検体の合計125検体をさらに検査した（環境調査）。

陽性園児のうち消化器症状を示した有症者13名中9名は、いずれも1～2歳児クラスであった（図1）。健康調査の結果、初発患児と考えられた園児Aと同じクラスのBを含む7名（うち6名は菌陽性）が8月14日にビニール製の幼児用プールで一緒に水浴しており、プール中には汚物が浮遊していたことが判明した。しかし、全園児への感染経路については不明であった。

感染者調査（8月24日～9月9日）では、園児106名中23名（22%）から026:H11（VT1産生）が分離された。陽性者の内訳は、1,2歳児クラスに多く、22名中14名（64%）で、0歳児クラス24名中3名（13%）、3歳児以上のクラス40名中5名（13%）、学童保育20名中1名（0.5%）であった。陽性児童の健康調査では、23名中13名は下痢、腹痛、軟便等の消化器症状を示して

いたことが判明した。有症者の内訳においても1,2歳児クラスが9名と多く、0歳児クラス3名、3歳児以上のクラス1名、学童保育0名であった。保育士及び陽性者の保護者らの検査結果はすべて陰性であった。なお、有症者及び保菌者はFOM投与を受け、菌は陰性化した。以後再排菌は無く、9月末までに陽性者は見られなくなった。

環境調査の一環として実施した放流水の検査では、消毒前の放流水1検体のみが026:H11(VT1産生)陽性であった。

#### 分離菌株の解析結果

集団発生において分離された24株は、12薬剤すべてに感受性を示した。バイオテスト1号による生化学的性状はコード2261517であり、VT1のみを産生する型であった。さらに、PFGE法においても、これら24株はすべて同一のパターンを示した(図2)。

当市において、平成9年度以後にヒトおよび河川水等から分離されたEHEC 026:H11の保存菌株と今回の集団発生分離株との比較では、薬剤感受性、生化学的性状及びVT産生性には差は見られなかった。一方、PFGE法による比較では、今回の集団発生由来株のパターンは、先の保存菌株のものとは異なるものであった(図

3,4)。

#### D. 考察

EHEC 026:H11の全国分離状況については1996年以降増加が続き、0157に次いで検出頻度が高く、2001年には保育所での集団発生事例3件が報告されている<sup>2,3)</sup>。EHEC 026:H11による感染症は、今回の事例のようにVT1単独産生菌によるものが多く、臨床症状も比較的軽いとされている<sup>4-6)</sup>。今回の事例においても、臨床症状の軽い傾向が見られた。そのため保護者らが気づかず、感染が広がり、集団発生に至ったと考えられる。

今回の保育園でのEHEC 026:H11感染症の発生において、園児及び環境調査として検査を実施した放流水から分離されたEHEC 026:H11は細菌学的解析から同一由来の菌株であると考えられ、これらの菌による集団発生事例と判断された。

感染経路については、初発患児と同クラスの7名が、発生届けの出される約1週間前に幼児用プールで共に水浴していた。それゆえ、これらの園児から同じクラスの他の園児および他クラスの園児にも感染が広がったものと疑われたが、その感染経路は特定されなかった。今回の事例からも、EHEC感染症の発生予防のためには保育所等の職員は、園児の手

洗いとその糞便の取り扱いに注意を払うことが重要と考えられる。園児らに下痢症状が認められた時には、手洗いの徹底と、医師への相談、夏期であれば幼児用プールの使用を控えるなど早期の適切な処置を施すことが必要である。特に、幼児は少量の菌でも感染を受け易いと考えられるため、感染者調査を早期に実施し、有症者と無症状保菌者を把握する事がその拡大を防ぐために重要である。

今回のように複数の患者が発生した場合、分離菌株の PFGE 法を含む細菌学的解析結果は、感染症の集団発生を判断するための有用な情報である。特に、PFGE 法による遺伝子学的解析法は分離菌株間の類似度の詳細な検討の大きなツールである。

#### E. 結論

保育園において EHEC 026:H11 による感染症の発生があり、園児、保育園職員らの検便及び食品等の検査の結果、園児 23 名と下水放流水 1 件から EHEC 026:H11 を分離した。これら分離菌株の疫学的解析の結果、同一の菌株による集団感染事例と考えられた。感染症の集団発生を疑う事例においては、分離菌株の PFGE 法による比較・解析が特に有用であると考えられた。

#### 参考文献

1. 和田昭仁、寺嶋淳、渡辺治雄：パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) による分子疫学的同定法、日本細菌学雑誌、52:763-775, 1997.
2. 病原微生物情報, vol.23, No.6, P.290-291, 2002
3. 病原微生物情報, vol.23, No.6, P.293-294, 2002
4. 尾崎延芳、中村恵子、馬場純一：保育園における腸管出血性大腸菌 (O26:H11) の集団感染事例、福岡市保健環境研究所報、vol.27, 2002
5. 病原微生物情報, vol.23, No.1, P.15-16, 2002
6. 病原微生物情報, vol.23, No.12, P.320-321, 2002

#### F. 健康危機情報

2002 年 8 月中旬、堺市内の保育園において EHEC 026:H11 による集団感染事例が発生した。発生予防のためには、特に園児の手洗いと糞便の取り扱いに注意を払うことが必要である。下痢症状を示す園児などが認められた場合、手洗いの徹底と、医師への相談、夏期であれば幼児用プールの使用などを控えるなど早期の適切な処置を施すことが必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

大中隆史、横田正春、石津真理子、山内昌弘、中村武、田中智之、山北太郎、木口雅行、岡澤昭子：生レバーが原因食品と考えられる腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例一堺市、病原微生物情報、22:291-292(2001).

山内昌弘、石津真理子、横田正春、大中隆史、田中智之：保育園における腸管出血性大腸菌 O26:H11 の集団発生事例一堺市、病原微生物検出情報、23:321-322(2002).

### 2. 学会発表

横田正春、山内昌弘、石津真理子、中村武、吉田永祥、菌輝久、

大中隆史、田中智之：河川水及びハエ類からの腸管出血性大腸菌の分離状況、第5回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、(2001年、6月、福岡)

山内昌弘、石津真理子、横田正春、菌輝久、大中隆史、田中智之：河川水中の腸管出血性大腸菌の分離状況及び菌学的性状、衛生微生物技術協議会 第22回研究会(2001年、5月、徳島)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

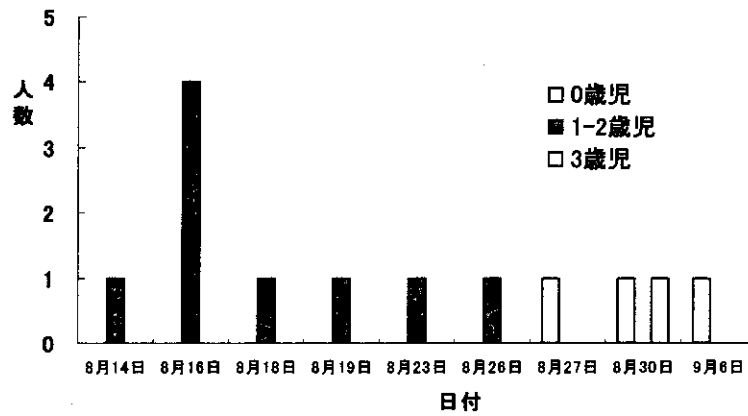


図1. 有症園児の日別発生状況

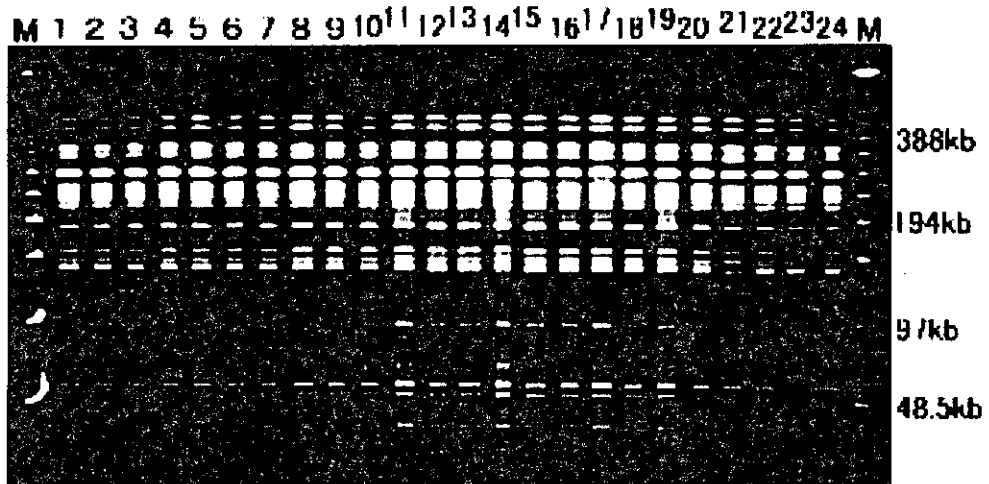


図2 病院内保育所での集団発生事例の EHEC O26:H11 (VT1 産生) 分離株の PFGE (*Xba*I 処理) パターン  
 M: Lambda ladder, 1-23: 園児からの分離株, 24: 放流水からの分離株

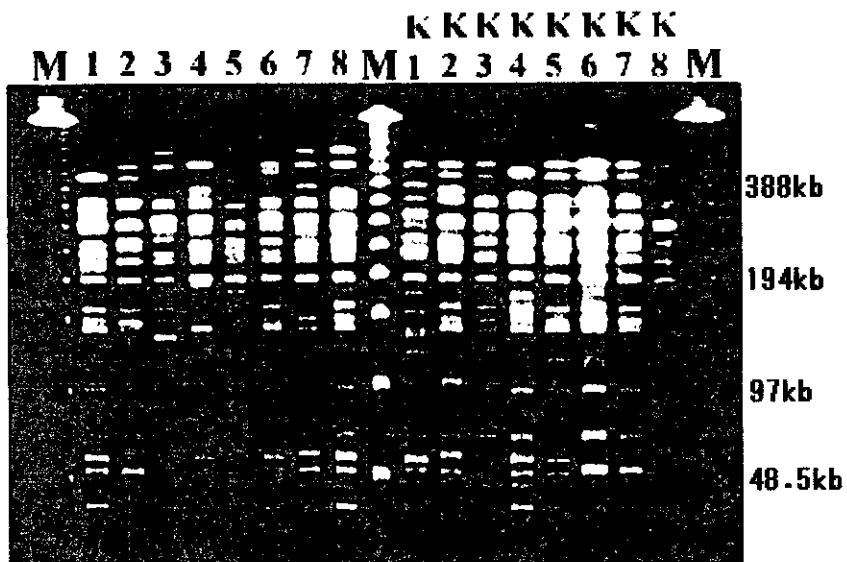


図3 堺市内における平成9年度以後の EHEC 026:H11 分離菌株の PFGE (*Xba*I 処理) パターン  
M: Lambda ladder, 1-8: ヒト由来株, K1-K8: 河川水からの分離株

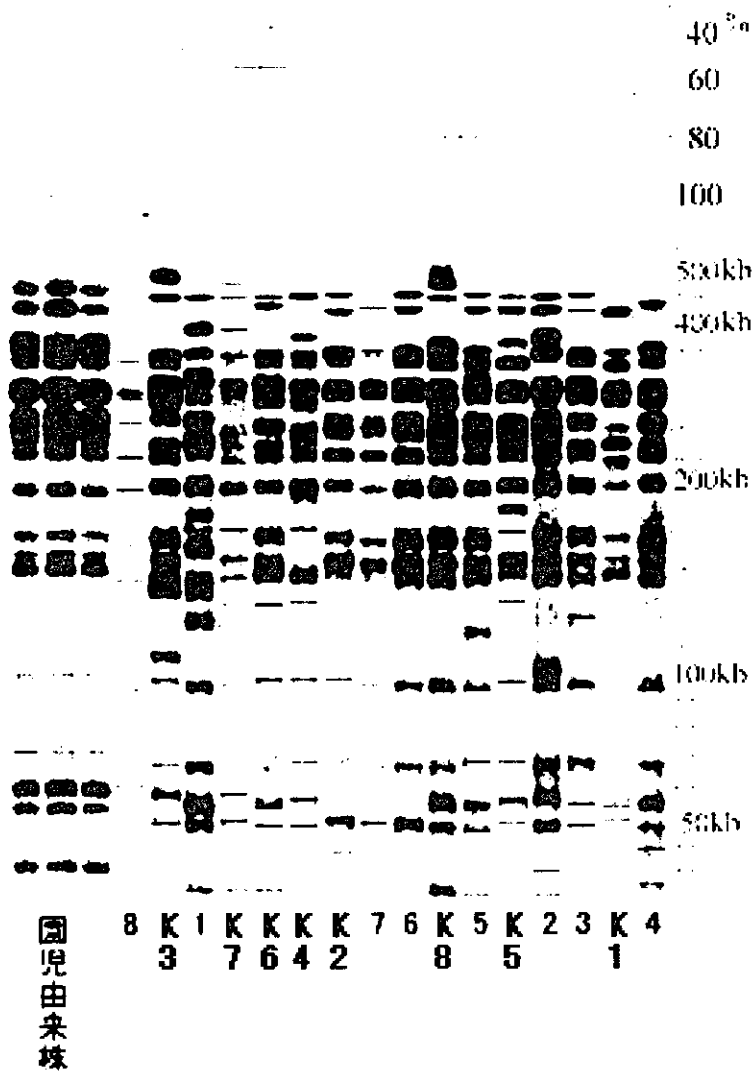


図4 園児由来株と平成9年度以後の分離菌株（ヒト及び河川由来）のPFGEパターンの解析結果  
1-8: ヒト由来株, K1-K8: 河川水からの分離株

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
平成 14 年度分担研究報告書

腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例における PFGE の活用について

協力研究者	川西伸也	姫路市環境衛生研究所	技師
	高 美恵子	姫路市環境衛生研究所	技術主任
	藤本寿郎	姫路市環境衛生研究所	主任試験検査員
	山根竹二郎	姫路市環境衛生研究所	主任試験検査員

研究要旨

2002 年 8 月に姫路市内の老人保健施設において発生した、腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例について、その感染源および感染経路解明を目的として、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法を利用し、分離菌株の分子疫学的解析を実施した。

初発患者 2 名および当所で分離した O157 陽性者 11 名の分離株は、いずれも血清型 O157:H7、ペロ毒素型 VT1+2 で、同一の PFGE パターンを示したことから、本事例は同一菌株による集団感染事例であることが明らかとなった。

その後の保健所の調査により、施設給食を感染源とした集団食中毒、あるいは集団生活における共通汚染源による二次感染の可能性が考えられたが、関連性は見出せず、原因の特定には至らなかった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌は、少量の菌でも感染を起こし、食品媒介感染以外にもヒト-ヒト伝播による二次汚染が起きやすいことから、小学校や保育園等の集団施設での集団感染の報告が多い。

本研究は、老人保健施設において発生した O157 集団感染事例における分離菌株について、PFGE 法を活用することにより、感染源および感染経路を解明することへの有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試菌株

初発患者 2 名、施設の入所者および通所者 8 名、施設職員 1 名および施設調理員 2 名、計 13 名の糞便由来分離株を用いた。

2. 血清型およびペロ毒素型別

病原大腸菌免疫血清および VTEC-RPLA（デンカ生研）を用いて判定した。

3. PFGE 法

ジーンパス グループ 6 試薬キットおよびジーンパス ゲルキット（BIO-RAD）を用い、取扱説明書に従い検査を実施した。ただし、制限酵素 *Xba* I 量は、加藤の報告（加藤一夫：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、平成 12 年度総括・分担研究報告書：42-48



(2001)) に従い、取扱説明書の2倍量(100 U/plug)とした。

電気泳動は、CHEF-DR III System (BIO-RAD) を使用し、6 V/cm、120°、4 to 8 sec 9 hr、8 to 50 sec 13 hr の条件で行った。

## C. 研究結果

### 1. 事例の概要

医療機関より、市内の老人保健施設の入所者2名から腸管出血性大腸菌 O157:H7 (ベロ毒素型 VT1+2) を検出したとの報告を受け、保健所が調査を行ったところ、入所者58名、通所者8名および職員18名の計84名が下痢、発熱および腹痛等の症状を呈していたことが判明し、当研究所は、施設関係者の糞便および給食保存食等の検査を実施した。

### 2. 結果

施設入所者7名、通所者1名、職員1名および調理員2名の計11名の糞便より、O157:H7 (ベロ毒素型 VT1+2) を分離した。そこで、初発患者2名を含めた O157 陽性者13名の分離株について、制限酵素 *Xba* I 処理により PFGE を行ったところ、すべての PFGE パターンは一致した。(図参照、残り1名(職員)も同一のパターンを示した。)

なお、O157 陽性者13名のうちの8名は、下痢、軟血便および発熱等を伴う有症者であったが、残り5名は無症状であった。給食保存食等から菌は検出されなかった。

## D. 考察

調理員から菌が検出されたこと、分離株の PFGE パターンがすべて同一であること、また保健所の調査等から、施設給食を原因

とした集団食中毒の可能性が考えられたが、患者の発症までの潜伏期間が4~11日とばらつきがみられたことや、給食保存食から菌が検出されなかったことなどから、集団生活における共通汚染源による二次感染の可能性も示唆された。

しかしながら、同施設では症状を訴えることが困難な入所者が多いために調査が難航し、原因の特定には至らなかった。

## E. 結論

本事例において原因は特定できなかったが、患者はすべて同一菌株により感染したことが明らかとなった。

PFGE を利用することは、食中毒および感染症事例等における患者間の関連性に関する情報の取得や感染源および感染経路を解明することにおいて、極めて有用な手段であると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

姫路市環境衛生研究所、姫路市保健所衛生課・予防課：老人保健施設における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例、病原微生物検出情報、23:319-320 (2002)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

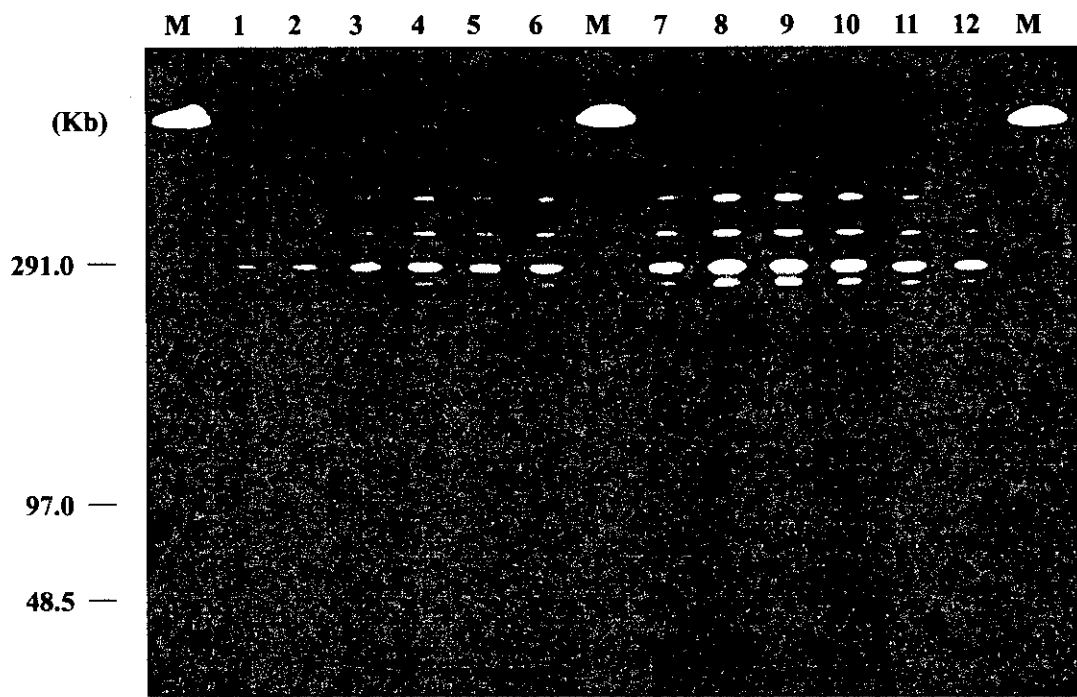


図. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 (VT 1+2) の PFGE パターン

- M : Lambda ladder
- レーン 1, 2 : 初発患者由来株
- レーン 3~7, 11, 12 : 入所者分離株
- レーン 8, 9 : 調理員分離株
- レーン 10 : 通所者分離株

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 14 年度分担研究報告書

腸管出血性大腸菌 O26 集団発生事例の疫学マーカー解析

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

研究要旨

大阪府下で 2000 年と 2001 年に発生した腸管出血性大腸菌（EHEC）O26 集団事例由来株について、従来から行われている生化学的性状試験や薬剤感受性試験に加え、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法による遺伝子解析を実施した。分離株の PFGE 型は、事例内では一致したが事例間では異なり、PFGE 法は EHEC O26 の菌株間の相違を検討するのに有用であったが、1 名の感染者から PFGE 型の異なる菌株が分離される場合があるため、複数株について実施することが望ましく、他の疫学情報と合わせて総合的に判断することが重要である。

A. 研究目的

大阪府における EHEC 感染症のほとんどは血清型 O157 によるものであるが、O26 も毎年分離されており（表 1）、2000 年と 2001 年には保育園で集団発生がみられた。O157 については、菌株間の関連性を調べるために PFGE 法などの疫学マーカー解析が有用であるとの報告は多数見られるが、O26 についても同様の方法を応用し、各事例について検討した。

B. 研究方法

被検菌の血清型別と生化学的性状の確認は常法にしたがって行い、毒素型別は PCR 法と VTEC-RPLA キット（デンカ生研）で実施した。薬剤感受性試験は ABPC、SM、TC、KM、

CP、ST、TMP、GM、NA、FOM、CF、CTX、CPFx、OFx、NOR、EM の 16 薬剤についてセンシディスク（BBL）を用いて KB 法で行った。さらに局所付着に関与する遺伝子 *eaeA* の有無を PCR 法で確認した。

PFGE 法は和田ら（和田昭仁、他：細菌学誌 1997;52:763-775）の方法に準じてゲルブロックを作成し、制限酵素 *XbaI* で DNA を切断した。電気泳動装置は Gene Navigator System（ファルマシア）を使用し、泳動バッファーは 0.5xTBE を 5℃で循環させた。泳動条件は、事例 1 では 1.2%アガロースでパルスタイム 5~35 秒を 24 時間、事例 2 では 1%アガロースでパルスタイム 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 13 時間の計 22 時間 1 分で行った。

## C. 研究結果

### 【事例 1】

2000 年 6 月～7 月に発生した事例で、園児 15 名、保母 1 名、園児の家族 4 名の計 20 名から菌が分離され、初発園児は 1 株、他の 19 名は 1 名につき 3 株（同一検体由来）の計 58 株について、疫学マーカー解析を実施した。

分離株はいずれも血清型 O26:H11 で、志賀毒素 1 を産生し *eaeA* を保有していたが、PFGE 型は 8 つの異なる泳動パターンを示した。すなわち、17 名から分離された 40 株は全く同じ泳動パターンでこれを A1 型とし、A1 型に 1 本多い A2 型、A4 型、A5 型、A1 型から 1 本少ない A6 型、A1 型と 4 本異なる（A2 型に 1 本多く 2 本少ない）A3 型、A1 型と 2 本異なる（A6 型に 1 本多い）A7 型、A1 型と 4 本異なる A8 型の 8 タイプである（図 1）。薬剤感受性は A8 型を示した 1 株で SM・TC・KM・EM 耐性であったほかは全株 KM・EM 耐性であった。

A1 型が検出された 17 名のうち 11 名は A1 型のみが検出されていたが、6 名は A1 型とともに他の型が検出されていた（表 2）。また、A1 型が検出されなかった 3 名は、A2 型または A7 型が検出されており、全員から DNA 断片の相違が 2 本以内の同型と考えられる菌株が分離されていた。

### 【事例 2】

2001 年 6 月～7 月に発生した事例で、園児 21 名、保母 2 名、園児の家族 7 名の計 30 名から菌が分離された。このうち園児 4 名と家族 2 名は、服薬中または服薬後の検便でも検

出されたことから、のべ 36 検体由来の 36 株について検討した。

分離株の血清型はいずれも O26:H11 で、志賀毒素 1 を産生し、グルコースからのガス産生が陰性であった。また、全株 *eaeA* を保有し、薬剤感受性は TC・EM 耐性を示した。PFGE 型は 36 株で全く同一の泳動パターンを示したが、事例 1 や同時期に分離された他事例分離株とは異なっていた（図 2）。

## D. 考察

事例 1 は、初発園児の届出から約 10 日後に全園児の検便を実施して 13 名の感染が判明したが、その 2 週間後に陰性化を確認するために行った検便でも園児 1 名から菌が分離され、これらの株や保母および家族から分離された株の関連性を明らかにするため、疫学マーカー解析を実施した。その結果、PFGE 型は 8 型に分かれたものの、全員から DNA 断片の相違が 2 本以内の株が分離されており、同一菌による集団発生であることが判明した。PFGE が A8 型を示した 1 株は、100kb 以下のパターンで A1 型と 4 本の相違があり、薬剤感受性も異なっていたことから、由来の異なる菌株である可能性が考えられたが、この株が検出された患者（5 才児）からは A1 型も 2 株分離されており、2 種の菌の重複感染が示唆された。

事例 2 では、無症状園児の家族からも菌が分離されていたが、検討した疫学マーカーは完全に一致していたことから、同一菌による二次感染であると考えられた。また、服薬中あるいは服薬後の検便で分離された株も同一の PFGE 型を示しており、再排菌であること

が示唆された。

F.健康危険情報

なし

E.結論

EHEC O26 の疫学マーカー解析、特に PFGE 法による遺伝子解析は菌株間の関連性を見るには有用であるが、1名の感染者から PFGE 型の異なる菌株が分離される場合があるため、複数株について実施し、他の疫学情報と合わせて検討することが必要である。

G.研究発表

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 大阪府における EHEC 発生状況

血清型	毒素型	事例数(%)							合計
		1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	
O157:H7,NM	1+2,1,2	67 (98.5)	123 (94.6)	123 (91.1)	90 (94.7)	97 (91.5)	105 (89.7)	70 (89.7)	675 (92.6)
O26:H11,NM	1,1+2	1 (1.5)	6 (4.6)	8 (5.9)	5 (5.3)	9 (8.5)	8 (6.8)	5 (6.4)	42 (5.8)
その他	1+2,1,2		1 (0.8)	4 (3.0)	2 (2.1)		4 (3.4)	3 (3.9)	14 (1.9)
合計		68 (100)	130 (100)	135 (100)	95 (100)	106 (100)	117 (100)	78 (100)	729 (100)

図1 事例1分離株の PFGE パターン

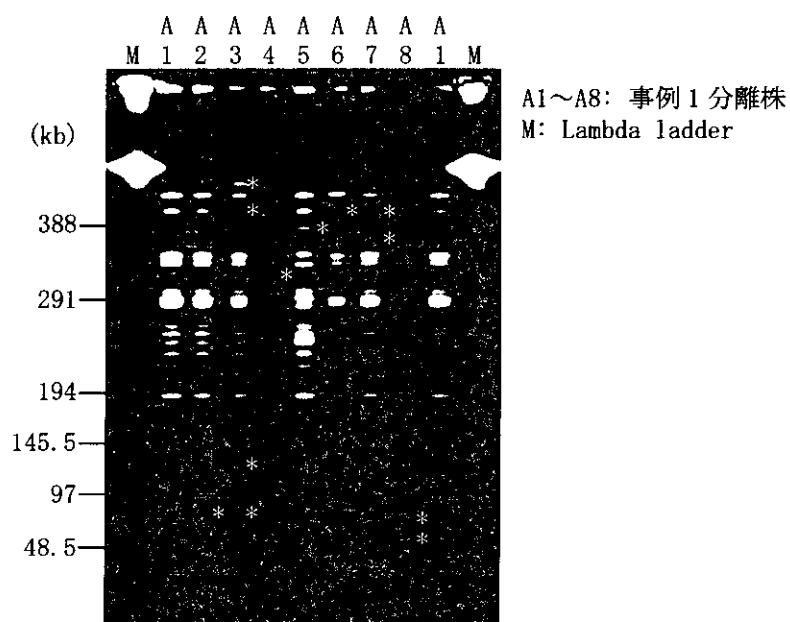
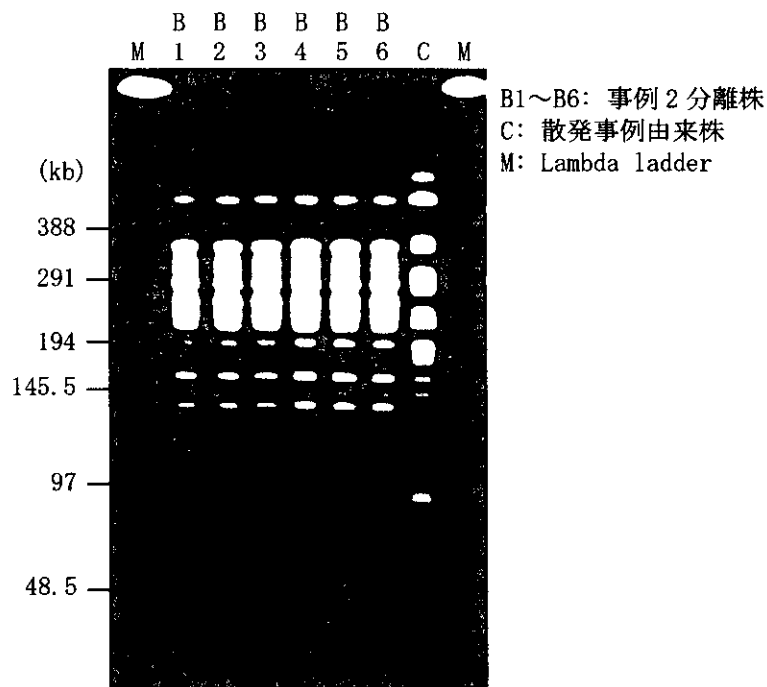


表2 事例1分離株のPFGE型

	検出人数	PFGE型	菌株数
PFGE型 1種類検出	11	A1	31
	1	A2	3
	1	A7	3
PFGE型 2種類検出	1	A1	2
		A2	1
	2	A1	2
		A4	4
	1	A1	2
PFGE型 3種類検出	1	A7	1
		A1	2
		A8	1
PFGE型 3種類検出	1	A2	2
		A3	1
PFGE型 3種類検出	1	A1	1
		A5	1
		A6	1
合計	20		58

図2 事例2分離株の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）

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（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	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

### 研究要旨

中・四国地区の 4 各地方衛生研究所(地研)が 4 種類の腸管出血性大腸菌 O157 を供試菌株として、従来の PEGE マニュアルをもとに九州ブロックが作成した統一マニュアルに準拠した方法と市販の PFGE 用サンプル調整キットを用いた方法により PFGE を実施した。

統一マニュアルで作成した画像は各施設とも概ね良好な画像であった。一方、市販キットを用いた方法では、一部の施設にバンドパターンを判読できない画像が認められた。さらに、画像をもとに画像解析ソフトでクラスター解析を行い施設間の差異を確認したところ、一部に技術的問題に起因すると推察される差異が認められた。今後、これらの問題点の改善と PFGE 解析手法の標準化が必要と思われた。

#### A. 研究目的

平成 12 年度から中・四国地区の各地方衛生研究所がパルスネット構築の基礎的資料を得るため、PFGE 解析の有効性と技術的問題点について共同研究を行ってきた。その結果、PFGE 解析は細菌性食中毒や感染症の疫学調査に有効な手段となることが明らかとなった反面、パルスネットを構築し、円滑に運用するには PFGE 技術の問題点を改善し、標準化する必要性が示唆された。

今回の研究では、4 地研が統一化されたマニュアルに基づき、腸管出血性大腸菌 O157 の 4 株について PFGE を行い、その画像を画像解析ソフトで解析することにより PFGE 解析の技術的問題点を指摘・改善していくことを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 参加施設

愛媛県立衛生環境研究所 高知県衛生研究所  
広島県保健環境センター 広島市衛生研究所

##### 2. 供試菌株

供試菌株として国立感染症研究所(感染研)から分与を受けた腸管出血性大腸菌 O157 の 4 株を使用した。

・菌株番号 1 (感染研番号 021533 II a II a I)

・菌株番号 2 (感染研番号 020095 III a ND III)

・菌株番号 3 (感染研番号 020021 VII ND III)

・菌株番号 4 (感染研番号 020049 Va ND ND)

### 3. PFGE

供試菌株の菌量調整、菌体処理、制限酵素 *Xba* I による処理、泳動条件等の一連の PFGE 実施法については、平成 13 年度の本研究報告書で堀川によって記載された九州ブロック統一マニュアル法(以下統一マニュアル法と略記)に準拠して実施した。なお、今回の統一マニュアル法では PFGE サンプルプラグ作製用サンプルプラグキャストを用いて、クロモゾーマルグレードアガーローズで 0.7mm 厚の試料プラグを作製し、コーム・アタッチ法により泳動用アガーローズにアプライした。また、市販の PFGE 用 DNA サンプル調整キット (BIO-RAD 製ジーンパス試料キット 6) を用いて PFGE 用試料を作製し、統一マニュアル法と比較した。市販キットでの試料作製法 (以下市販キット法と略記) は添付の取扱説明書のとおり行った。なお、市販キット法ではコーム厚 0.7mm の試料プラグと従来からの Plug mold による 1.4mm 厚の試料プラグを作製し、試験に供した。

#### 4. 画像解析

各施設で写真撮影された PFGE 画像を磁気ディスクに取り込み、電子メールの添付ファイルまたは郵送で E 施設と H 施設に集め、各 1 名の解析者 (T 解析者と S 解析者) が同一画像を画像解析ソフト (Fingerprinting II) を用いてクラスター解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 各施設の PFGE 画像の比較

今回、各施設 (E 施設、K 施設、H 施設、C 施設) が統一マニュアル法で作製した PFGE 画像 (図 1、図 2、図 3、図 4) は概ね良好で、4 施設の画像を比較することができた。しかし、コーム厚 1.4mm の試料プラグを用いた市販キット法の画像では 2 施設 (E 施設、C 施設) の画像は不明瞭であったため (K

施設、H 施設の画像では判読可能) 施設間で画像を比較することができなかった。一方、統一マニュアル法で作製した各施設の PFGE 画像をもとに 2 名の解析者が画像解析ソフトでデンドログラム (図 5、図 6) を作成し、施設間の差異を確認した結果、同一菌株でも解析者により、その類以度に差異 (約 10% 前後) が認められたものの 3 施設の画像では同一菌株が同じクラスターを形成した。しかし、C 施設の 4 株は独自のクラスターを作った。

#### 2. 統一マニュアル法と市販キット法の PFGE 画像の比較

各施設が作成した統一マニュアル法と市販キット法の PFGE 画像を目視で比較したところ、統一マニュアル法の画像の方が明瞭であったが、コーム厚 0.7mm の市販キット法の PFGE 画像も各施設とも概ね判読可能であった。これらの画像 (B 画像) をデンドログラム (図 7、図 8) で比較したところ、同一菌株は概ね同じクラスターを形成する傾向を示したが、その類以度は 75~100% であり、解析者による差異も認められた。

### D. 考察

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。

#### E. 結論

従来からの PFGE マニュアルに改良を加え、PFGE 実施したところ、従来の画像に比べ明瞭な画像を得ることができた。そのため画像解析の結果も概ね良好であったが、技術的問題点も認められた。今後、これらの問題点の改善と更なる PFGE 解析手法の標準化が必要と考える。

#### F. 研究発表

なし

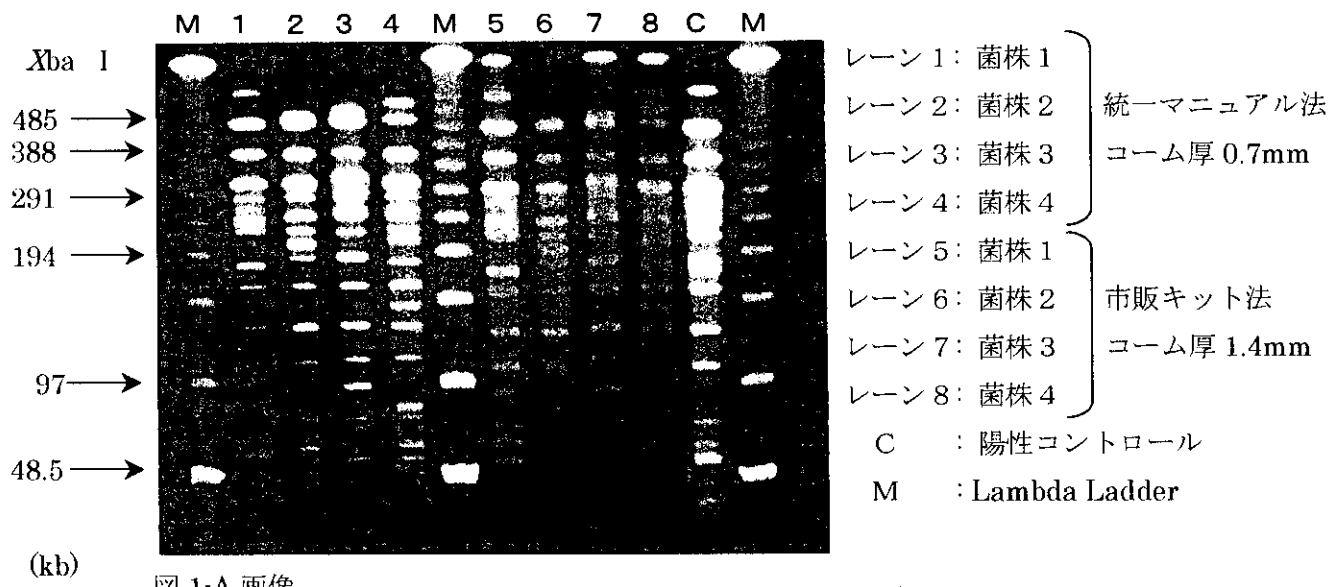


図 1-A 画像

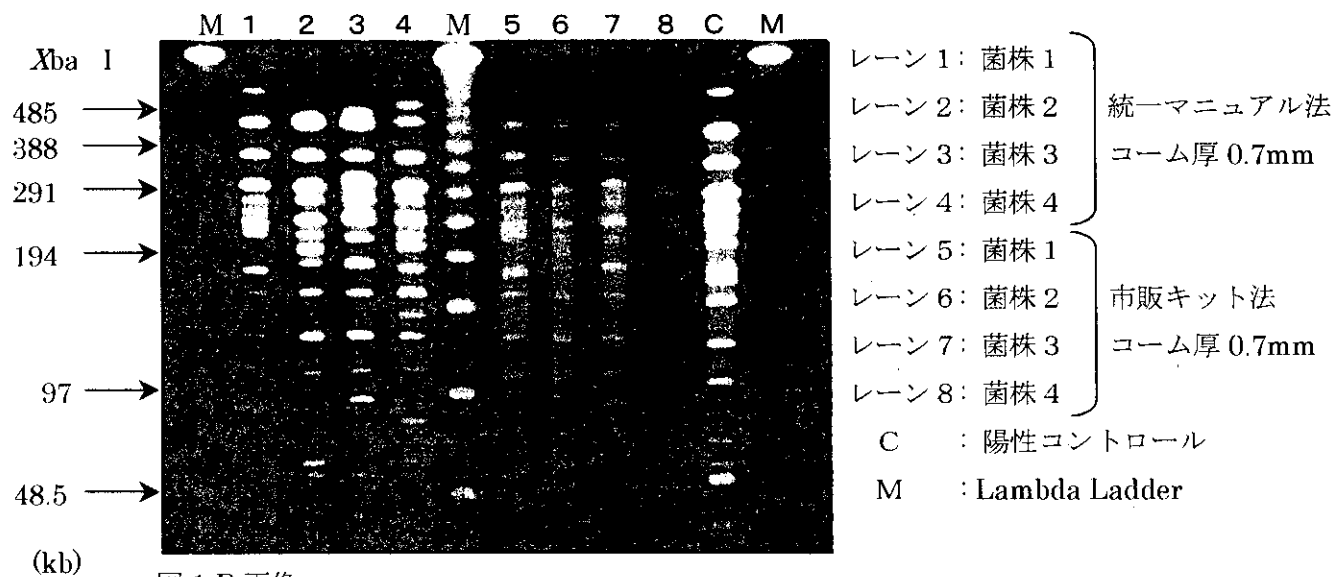


図 1-B 画像

図 1 E 施設の PFGE 画像

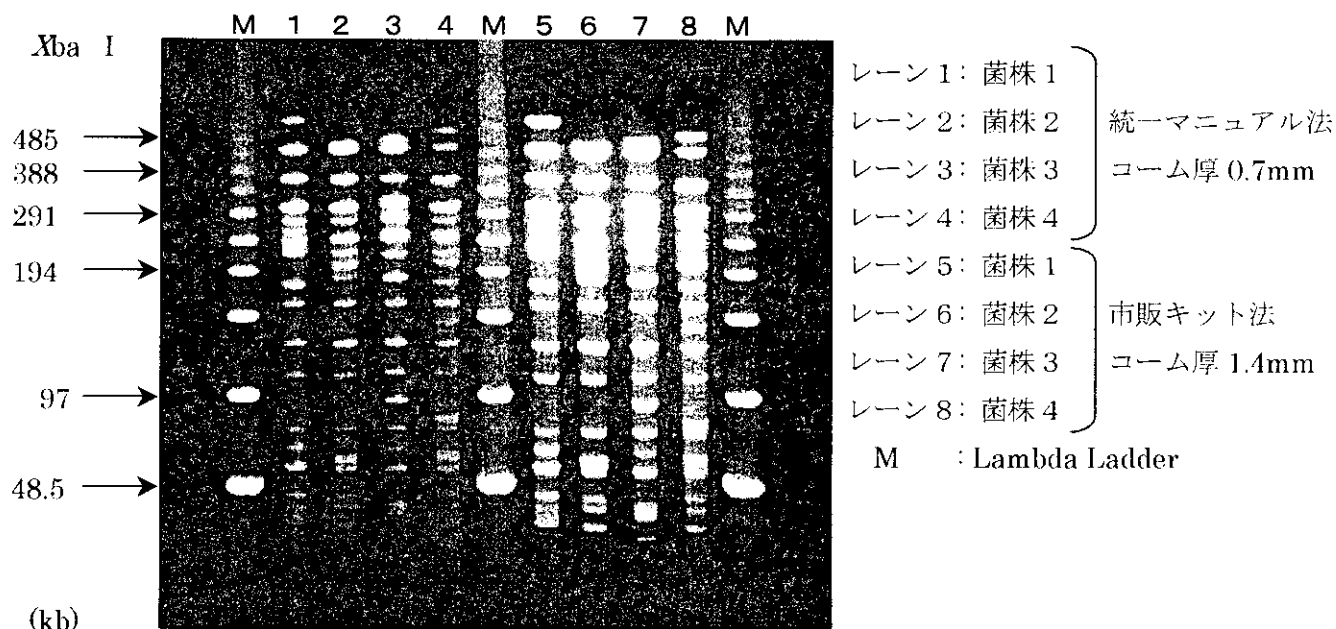


図 2-A 画像

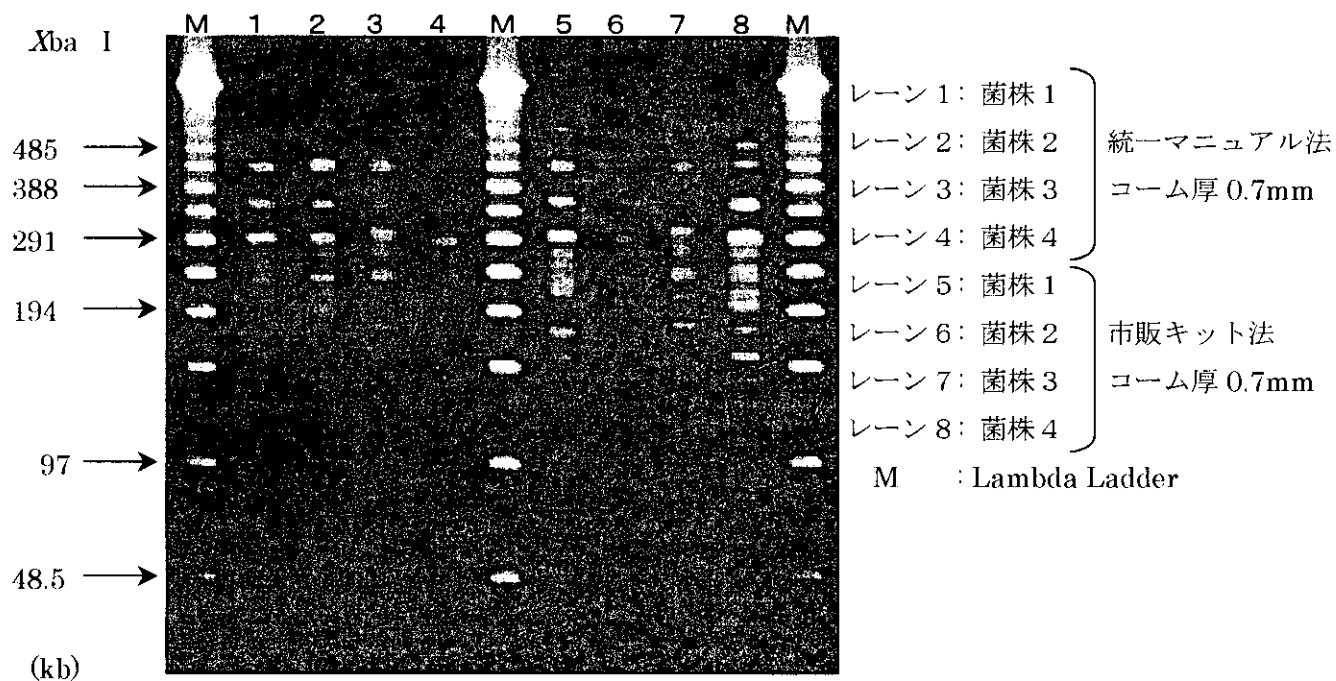


図 2-B 画像

図 2 K 施設の PFGE 画像

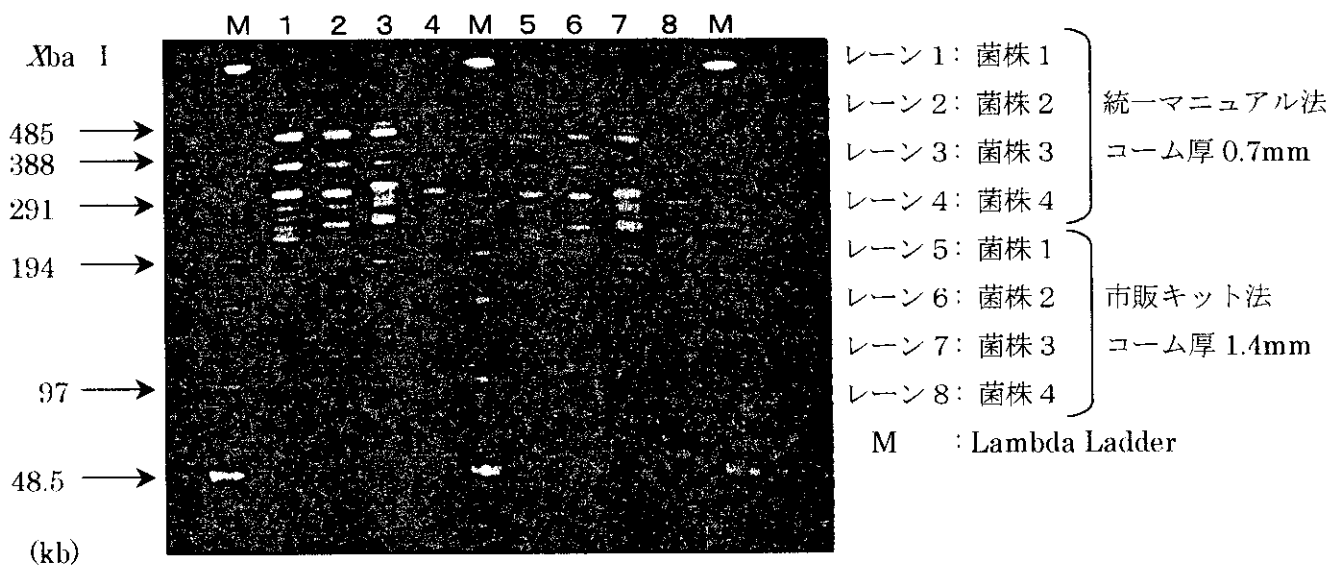


図 3-A 画像

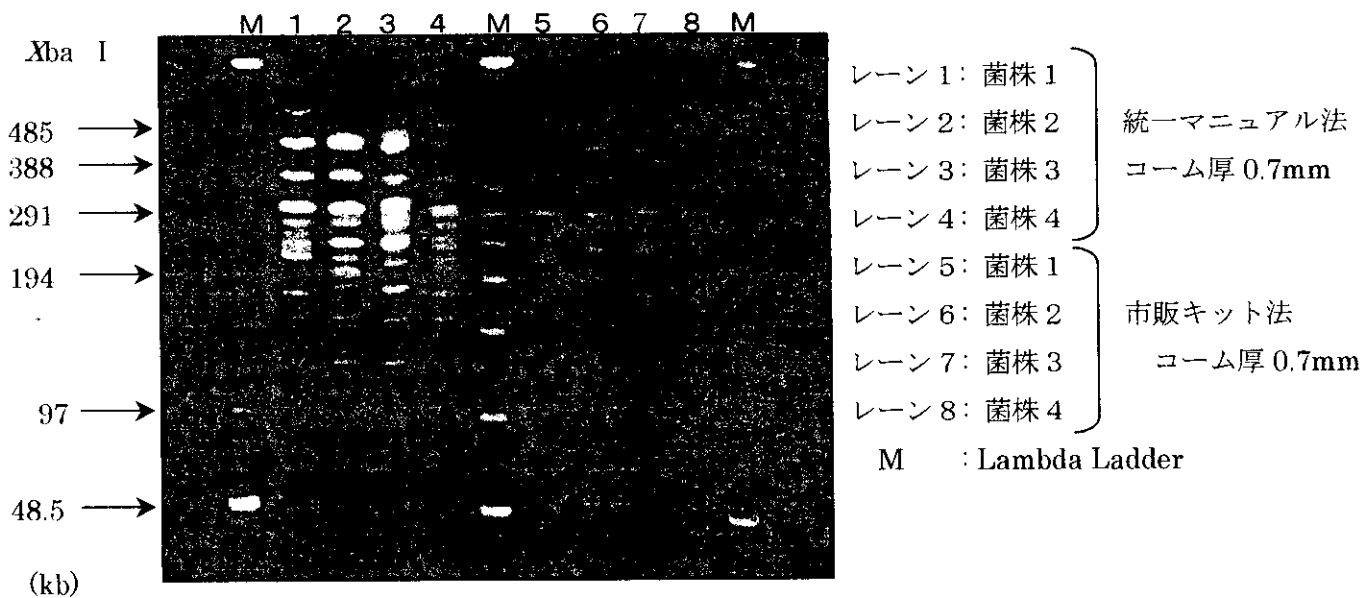


図 3-B 画像

図 3 H 施設の PFGE 画像