

図 4-A 画像

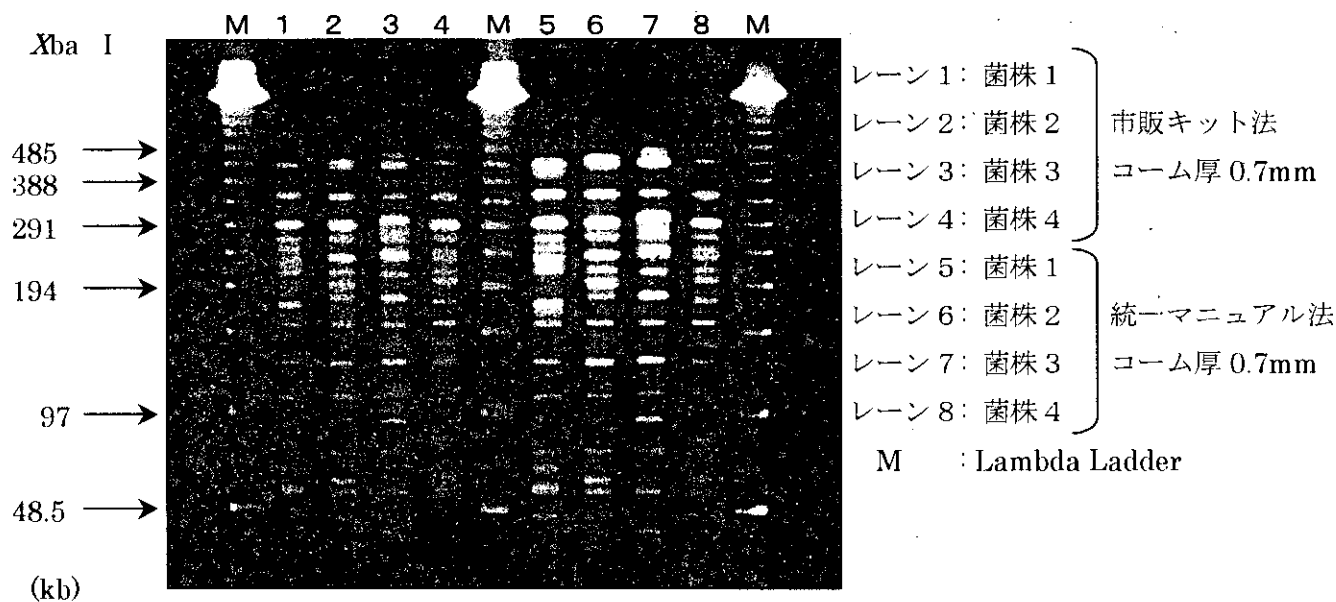
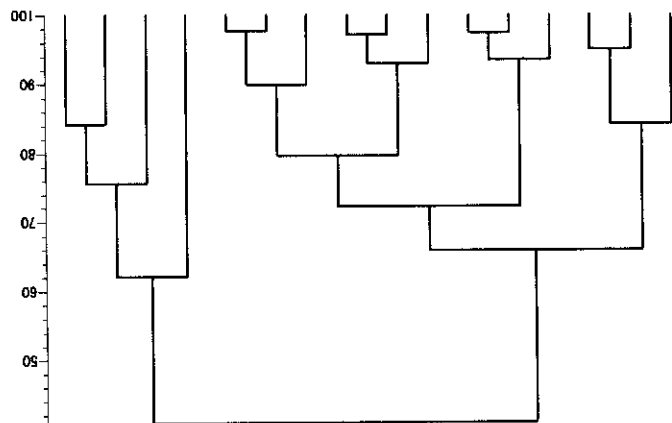


図 4-B 画像

図 4 C 施設の PFGE 画像

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
fp 1

fp 1



| | | | |
|-----|-----|-----|----------|
| 菌株2 | C施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株4 | C施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株1 | C施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株3 | C施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株4 | E施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株4 | K施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株4 | H施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株2 | H施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株2 | K施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株2 | E施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株1 | E施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株1 | K施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株1 | H施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株3 | E施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株3 | K施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |
| 菌株3 | H施設 | A画像 | 統一マニユアル法 |

図 5 T 解析者が作成した各施設のデンドログラム

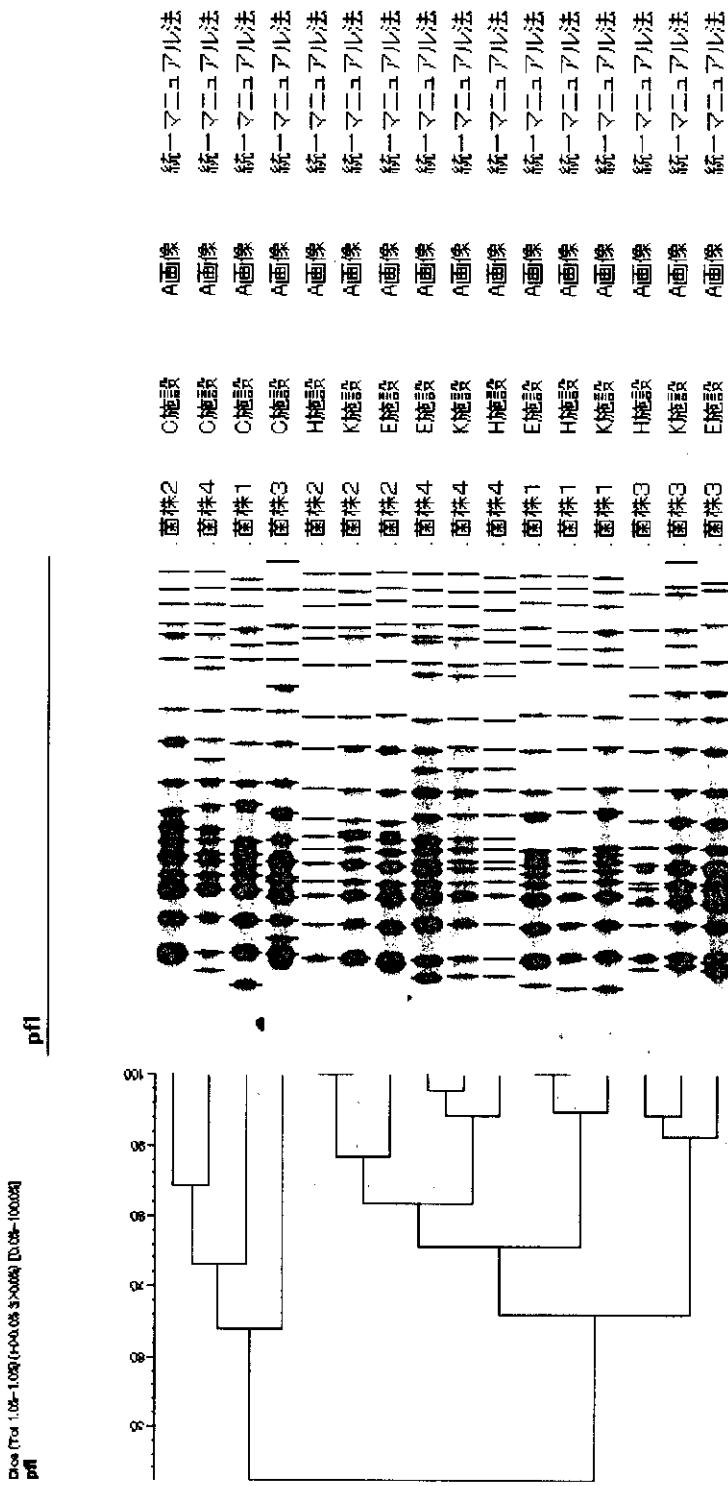


図6 S解析者が作成した各施設のデンドログラム

Dist (Tal) (28-1.0X) (H-00K S 00K) [0.0X-100.0K]
fp1

fp1

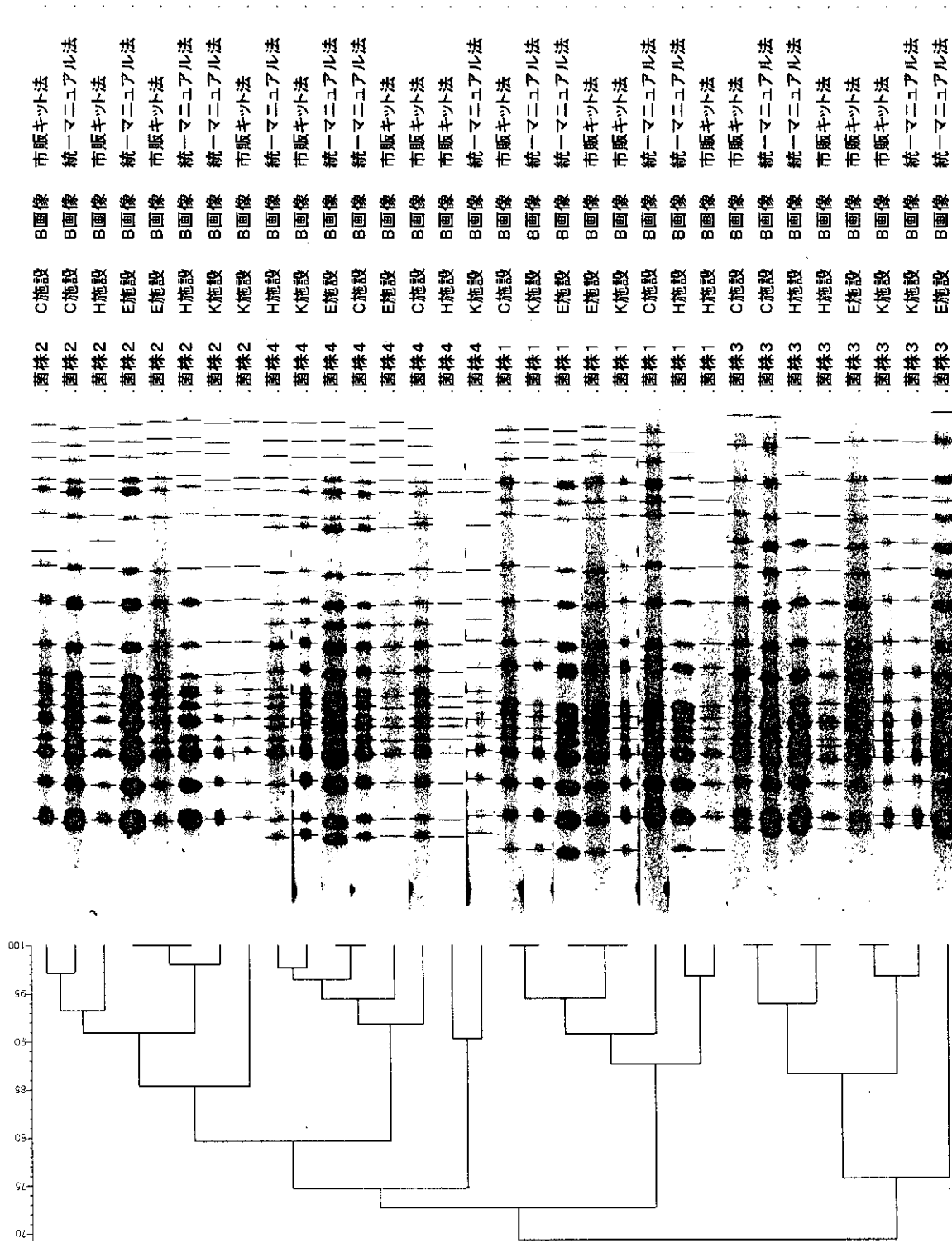


図7 T解析者が作成した統一マニユアル法と市販キット法のデンドログラム

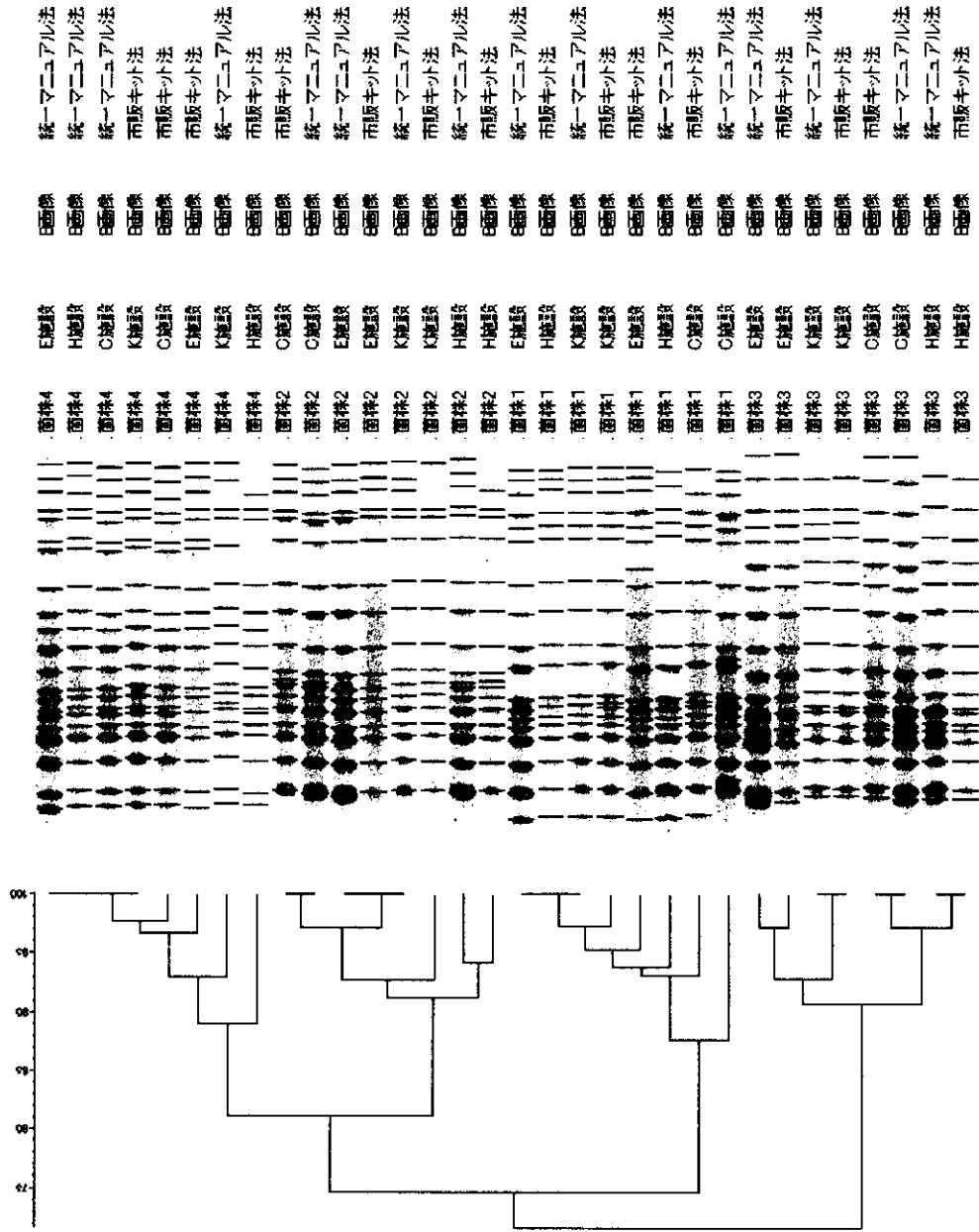


図8 S解析者が作成した統一マニュアル法と市販キット法のデンドログラム

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 O157:H7, O26:H11/- の PFGE による解析とパルスネットの活用について

研究協力者 広島市衛生研究所 橋渡佳子

平成 14 年に広島市で分離した腸管出血性大腸菌 O157:H7 および O26:H11/- 感染症 11 事例由来 14 株について、PFGE 泳動像を遺伝子解析用ソフト Gel Compar II で解析するとともに、パルスネットシステム上で本市分離株 9 株と全国の地方衛生研究所の分離株とを比較解析した。

O157:H7 を原因とする 5 事例の内、2 事例が相似値 90%、3 事例が相似値 70% であった。O26:H11/- を原因とする 6 事例も 2 事例が相似値 90%、4 事例が 76%～85% の相似値であったが、家族内 2 事例の事例内分離株間は 100% の相似値を示した。11 事例とも全て泳動パターンは異なり、関連性を認めなかった。

パルスネット上での本市分離の 8 事例 9 株と全国の地方衛生研究所の分離株との比較解析では、同じ泳動パターンを示した分離株はなかったが、O26:H- の 3 事例で本市近隣の広島県 H 市患者由来株が約 80% の相似値、広島県 K 市患者由来株が、90% と 95% 以上の相似値でクラスターを形成し、遺伝子学的な近縁性を示唆していた。

パルスネットシステムは、分散的集団感染症(diffuse outbreak)の発見だけでなく、個々の地研分離株を全国各地の分離株と比較解析することにより、その遺伝子学的特徴の把握を可能とする非常に有用な手段であった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)が分離された場合、国立感染研に PFGE 型別を依頼し、全国から送付された分離菌株とともに解析することにより分散的集団感染症(diffuse outbreak)の発見に効果をあげてきたが、各地研への情報還元は依頼菌株のみであり、十分とはいえなかった。

平成 14 年度からパルスネットシステム(PulseNet Japan)の運用が開始され、各地研への詳細な情報還元が可能となり、分離菌株の全国的かつ地域的な泳動パターンの相同性を解析できるようになった。

そこで、平成 14 年に本市で分離した O157:H7 及び O26:H11/- 株の PFGE による泳動パターンを遺伝子解析用ソフト Gel Compar II で相同性を解析するとともにパルスネット上での当所分離株と他地研での分離株との関連性を解析することによりパルスネット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

平成 14 年に広島市で分離された散发事例由来の O157:H7(STX2) 5 株、O26:H11(STX1) 2 株、O26:H-(STX1)7 株の計 14 株を供試した。

2 PFGE

プラグの調製、溶菌等の処理はジーンパス試薬キット 6 (Bio-Rad) を使用した。

被検菌を TSB 培地(Difco)で 37°C、18 時間培養した菌液 100 μl を遠心し、その沈渣を低融点アガロースに包埋後、溶菌等の処理を行った。制限酵素は Xba I (Roche) を用いて抽出 DNA を切断した。

泳動装置は GenePath System(Bio-Rad) を使用し、ゲルには 1% PFGE アガロース、泳動バッファーには ×0.5TBE を使用した。

泳動は国立感染研の条件に準じて行った。電圧 6V/cm、パルスタイム 4 秒から 8 秒、9 時間と電圧 6V/cm パルスタイム 8 秒から 50 秒、13 時間を組み合わせ、バッファー温度 12°C で泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下で写真撮影した。泳動像の解析には遺伝子解析用ソフト

ト Gel Compar II (Applied Maths)を用いた。

C. 研究結果

1 広島市での EHEC 感染症発生状況(表 1)

平成 14 年における本市での EHEC 感染症は 13 事例発生した。家族内散発事例 3 事例, 単独散発事例 10 事例で患者数 16 名, 保菌者 1 名であった。

血清型別では, O26:H11/-(STX1)が 6 事例患者数 9 名および O157:H7(STX2)が 5 事例患者数 5 名, O111:H-(STX1, 2)が 2 事例患者数 2 名, 保菌者 1 名で, 本市も全国的な傾向と同様に O26:H11/-による事例数の割合が高かった。

保健所の調査によると, いずれの事例も感染原因は不明であり, また, 事例間の関連性も認められなかった。

2 広島市で分離された EHEC O157:H7 および O26:H11/-の Gel Compar II による解析

(1) O157:H7 の解析(図 1)

5 事例 5 分離株の Gel Compar II による解析結果では相似値 71%で 2 つのクラスターに分かれた。

2 月発生の事例 1 分離株(20265)と 8 月発生の事例 7 分離株(22188)は 相似値 90%のクラスターを形成し, 2 菌株間で 4 本のバンドの違いが認められた。

他事例の株間の相似値は 75%であり, 5 事例分離株の泳動像は全て異なっていた。

(2) O26:H11/-の解析(図 2)

6 事例 9 株の解析結果ではまとまったクラスターを形成しなかった。家族内散発 2 事例での分離株は, 事例 6 の 2 株(21695, 21698)および事例 12 の 3 株(30001, 30002, 30003)とも事例内の株間で同一パターンを示し, 相似値 100%であった。

9 月発生の事例 9 の O26:H11 株(22190)と 11 月発生の家族内事例 12 の分離株は相似値 90%のクラスターを形成し, 事例間でバンド 4 本の付加または消失があった。

他の 4 事例は 76~85%の相似値であり, 6 事例の分離株の泳動像は全て異なっていた。

3 パルスネット (PulseNet Japan) 上での広島市分離株と他地研分離株の比較解析

平成 14 年分離株のうち O157:H7 は 3 事例 3

株(事例 1, 12, 13) および O26:H11/-は 5 事例 6 株(事例 2, 5, 6, 8, 9)がパルスネット上に掲載されていた。

これらの各事例の分離株について, クラスターを形成した他地研の分離株と目視により泳動パターンを比較解析した。

(1) O157:H7 の他地研分離株との関連性(図 3)

O157 による感染事例の 3 事例 3 株は, 他地研からの分離株(2002/7/31 受付分 420 株および 2002/9/11-11/30 分離株 187 株)と同じパターンを示す株を認められなかった。事例 1 分離株(20265)は 3 地研 4 株とともに相似値 90%のクラスターを形成し, また, 事例 13 分離株(22192)も同様に 5 地研 5 株と相似値 90%のクラスターを形成していた。各クラスターの目視によるパターンの比較では, バンドの本数および移動度に違いが見られ, 類似性は高くなかった。

事例 12 分離株(22191)は 80%以上の相似値ではクラスターを形成していなかった。

(2) O26:H11/-の他地研分離株との関連性

(図 4-1, 4-2)

O26 による感染事例の 5 事例 6 株も O157 と同様に他地研分離株(2002/11/30 までの分離株 309 株)に同じパターンを示す株を認められなかった。

事例 6 の家族内散発事例 2 株(21695, 21698)は約 87%の相似値で 2 つのクラスターに分かれていた。21695 株は 450Kb 付近に 1 本のバンドが加わり, 一方, 21698 株はそのバンドが消失し, 50kb 以下に 2 本のバンドが加わっていた。

そのクラスターに 4 地研 5 株が含まれていたが, バンド本数と移動度の違いからパターンの類似性は高くなかった。

事例 8 分離株(22189)は約 86%の相似値で 3 地研 6 株が含まれ, 内 3 株が本市西部近隣の広島県 H 市の家族内散発事例であった。本市分離株と 1 本のバンド数差および 10 本程度に移動度の違いがみられた。

事例 9 分離株(22190)と本市東部近隣の広島県 K 市患者由来株の 2 株は 95%以上の相似値を示すクラスターを形成していた。本市分離株とは 1 本のバンド数差であったが, 見かけ上バンド 17 本程度に移動度の違いがあった。

同様に事例 2 分離株(21693)は広島県 K 市の家族内散発事例由来株 2 株と 90%以上の相似値でクラスターを形成していた。本市分離株とは

2～3本のバンド数差とバンド14本程度に移動度の違いがあった。

事例5分離株(21697)は85%以上の相似値ではクラスターを形成していなかった。

D. 考察

平成14年に本市で発生した11散発事例14株のGel Compar II解析結果では、O157:H7事例5株の泳動像は全て異なっており、その相似値も2事例が90%、他の事例が75%と高くなく、感染源を同一とする事例は無いものと思われた。

O26:H11/一事例の解析結果では、家族内事例2事例が疫学調査により、2事例とも1人の患者からの2次感染により他の家族へ感染したものと考えられたが、各家族分離株の泳動像は相似値100%で一致し、それを裏付ける結果であった。

O26:H11/一事例もO157:H7事例と同様に、6事例分離株間の泳動像は異なっており、相同性も2事例間で90%、他の事例間で76～85%と高くなく、感染源を同一とする事例はないものと思われた。

パルスネットに掲載された本市分離のO157:H7事例3株は、他地研分離の420株(2002/7/31受付分)および187株(2002/9/11～11/30分離株)と95%以上の相似値を持つものはなく、全国的にも散発性の事例であることを確認した。また、事例12分離株は相同性80%以下となっており、従来報告されていないPFGEパターンの株であることが推察された。

O26:H11/一散発事例6株についても、他地研分離の309株と同一パターンの株はなかったが、相同性の高い株は認められた。

本市で相似値100%であった事例6の家族内事例2株は1バンドの消失および2バンドの付加により約87%の相似値で2つのクラスターに分かれていた。国立感染研への菌株送付時で

の菌変異によるものか今後の検討を必要とするが、試験検査法の標準化とともに搬送等における菌株取り扱いの標準化も必要と思われる。

相似値は異なるが、5事例中3事例(事例8,9,2)分離株のクラスターに本市近隣の広島県H市またはK市患者由来の分離株があった。本市分離株との関連性は不明であるが、遺伝子学的な近縁性を示唆していた。近隣地域の食品流通圏は一体であることから、近隣地研単位でのPFGE泳動像や疫学調査結果等の迅速な情報交換が、地域的なdiffuse outbreakの発見につながると考えられる。

E. 結論

遺伝子解析用ソフトGel Compar IIを用いた本市分離株のPFGE泳動パターン解析は、目視による定性的解析を数量化することにより、客観性を付加することを可能にした。

パルスネットシステム(PulseNet Japan)は、diffuse outbreakの発見のみならず、本市分離株を全国地研分離株と比較することにより、主流分離株に近縁であるか、または、他地研分離株にみられない株であるか等の遺伝子学的な特徴を把握して全国的な位置付けを行うことを可能とするとともに近縁株との地域的な特性の把握を可能とする非常に有用な手段であった。

F. 研究発表

本研究の内容は未発表

表1 広島市での EHEC発生状況(平成14年)

| 事例 No | 届出 No | 区分 | 感染研 No | 発症 日 | 血清型 | 毒素 型 | 感染研型 | 感染研コメント | 年齢 | 性別 | 職業 | 症状 |
|----------|----------|------|-----------|---------|--------|---------|-----------|--|----|----|-----------------|-----------------|
| 1 | 1 | 散発 | 020265 | 2/10 | O157H7 | 2 | Vb.IV.ND | | 2 | f | 保育園児 | 発熱、下痢、腹痛、血便、HUS |
| 2 | 2 | 散発 | 021693 | 5/14 | O26H- | 1 | | | 4 | m | 幼稚園児 | 下痢、発熱、血便 |
| 3 | 3 | 散発 | | 5/26 | O111H- | 1.2 | | | 5 | m | 幼稚園児 | 下痢、嘔吐 |
| 4 | 4 | 散(家) | | 6/18 | O111H- | 1.2 | | | 11 | m | 小学生 | 腹痛、下痢、嘔吐 |
| 4 | 5 | 散(家) | | | O111H- | 1.2 | | | 65 | m | 農業.No4 の祖父 | 無 |
| 5 | 6 | 散発 | 021697 | 7/9 | O26H- | 1 | | differ from 1693,1695 | 1 | f | | 腹痛、下痢 |
| 6 | 7 | 散(家) | 021695 | 7/13 | O26H- | 1 | | differ from 1693 | 1 | m | | 発熱、下痢 |
| 6 | 8 | 散(家) | 021698 | 7/13 | O26H- | 1 | | same as 1695 | 23 | f | 主婦.No7 の母 | 軟便 |
| 7 | 9 | 散発 | 022188 | 8/27 | O157H7 | 2 | Vb.V".ND | | 12 | f | 小学生 | 発熱、腹痛、下痢、血便 |
| 8 | 10 | 散発 | 022189 | 9/5 | O26H11 | 1 | | differ from 1693,1695, 1697 | 1 | f | | 下痢、血便 |
| 9 | 11 | 散発 | 022190 | 9/10 | O26H11 | 1 | | differ from 1693,1695, 1697,2189 | 55 | f | 病院勤務 | 腹痛、嘔吐、下痢、血便 |
| 10 | 12 | 散発 | 022191 | 10/16 | O157H7 | 2 | ND.ND.ND | | 23 | m | 会社員 | 下痢、血便、腹痛 |
| 11 | 13 | 散発 | 022192 | 10/12 | O157H7 | 2 | ND.ND.III | | 15 | f | 中学生 | 下痢 |
| 12 | 14 | 散(家) | 030001 | 11/27 | O26 | 1 | | | 3 | m | 保育園児 | 腹痛、血便 |
| 12 | 15 | 散(家) | 030002 | 11/18 | O26 | 1 | | | 5 | m | 保育園児、 No14の兄 | 下痢 |
| 12 | 16 | 散(家) | 030004 | 11/25 | O26 | 1 | | | 1 | m | No14の弟 | 下痢 |
| 13 | 17 | 散発 | 030005 | 12/6 | O157H7 | 2 | | | 28 | f | 不明 | 腹痛、嘔吐、下痢、腹痛 |

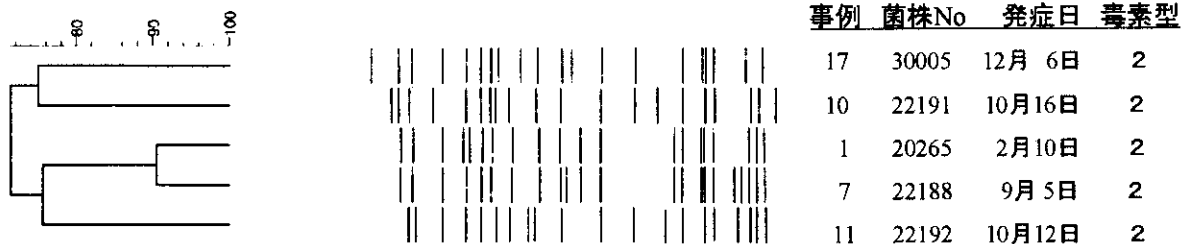


図1 広島市で分離したO157:H7のデンドログラム(平成14年)

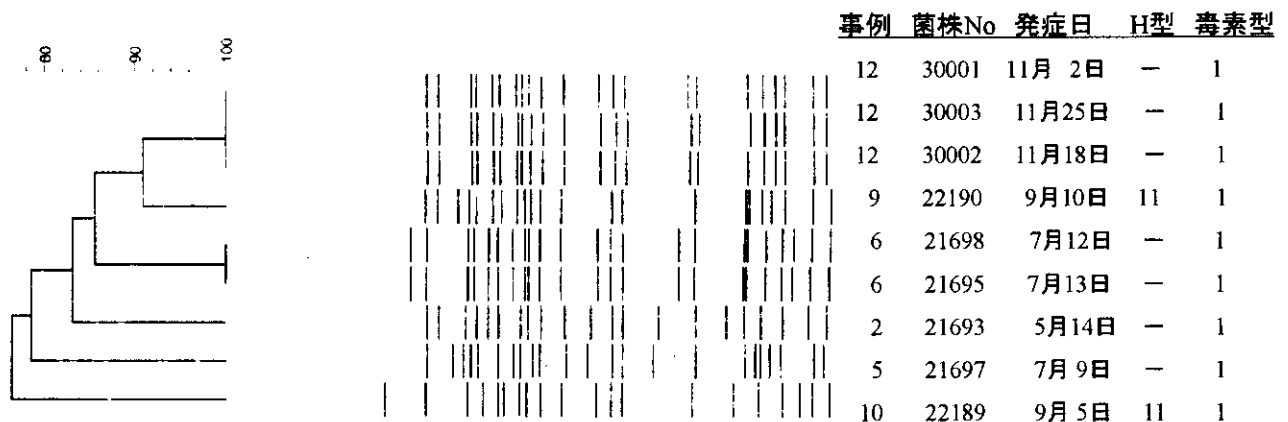
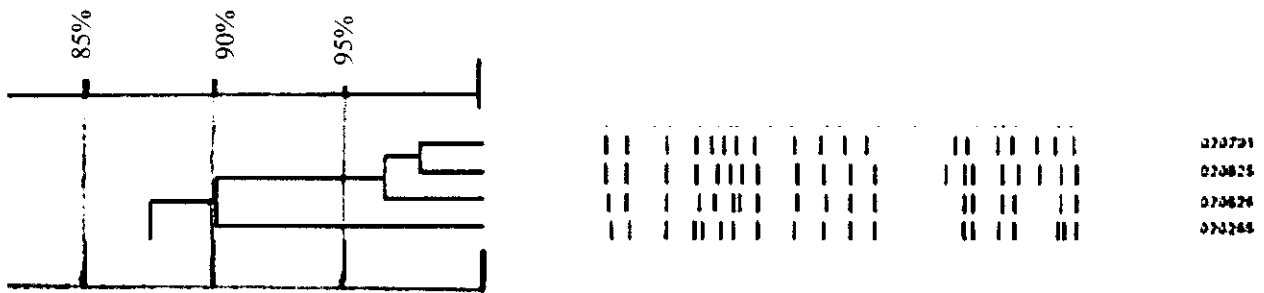


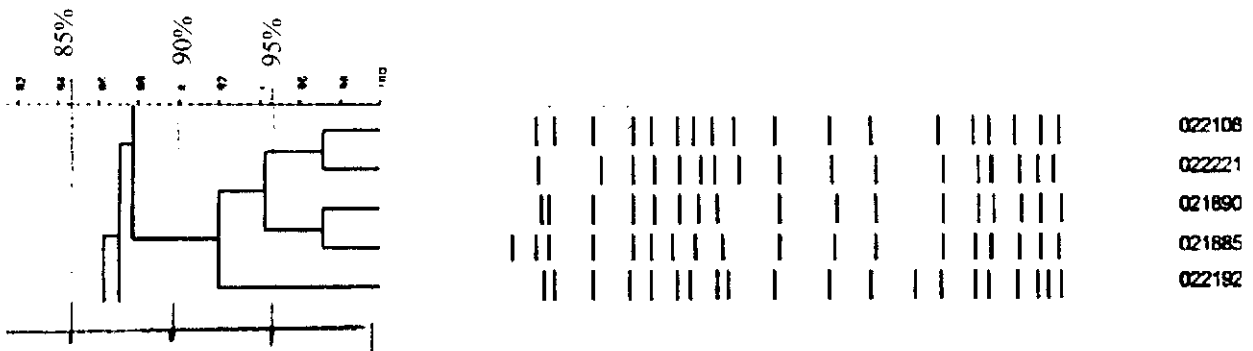
図2 広島市で分離したO26:H11/-のデンドログラム(平成14年)

① 事例1 (20265株)のPulseNetクラスター



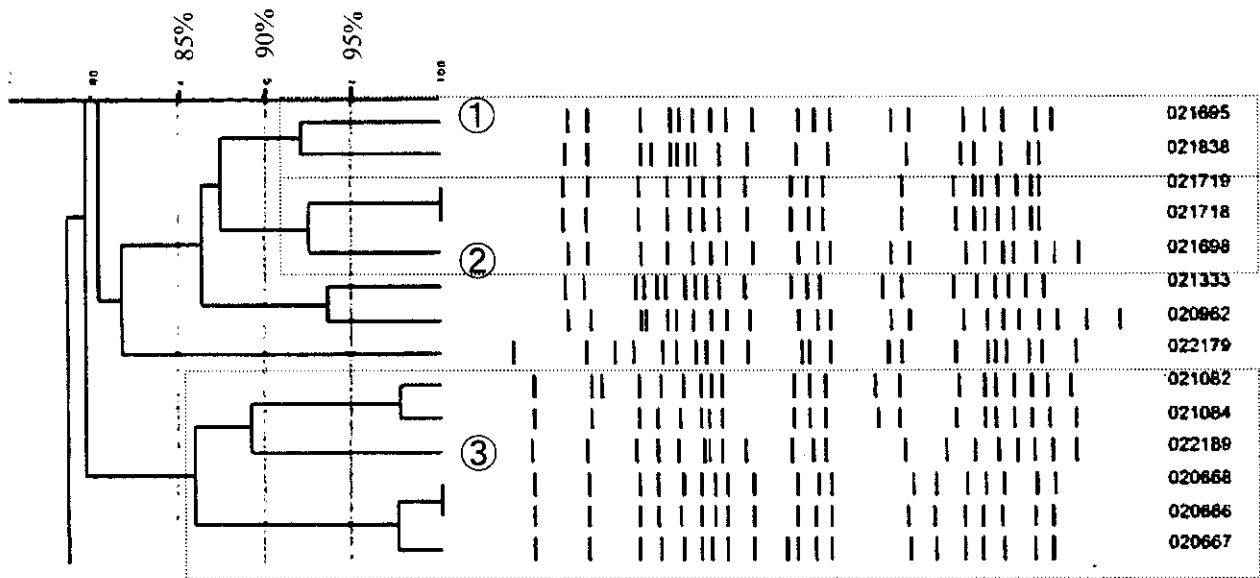
| クラスター | No | 発症/ 分離 | 区分 | 分離地研 名 | 感染研型 | STX型 |
|----------|-------|-----------|----|-----------|-------------|------|
| ① 事例1 | 20771 | 6/17 | 散発 | 大阪市 | Vb', V, III | 2 |
| | 20825 | 6/23 | " | 岐阜市 | ND, V, III | 2 |
| | 20826 | 7/1 | " | 岐阜市 | ND, V, III | 2 |
| | 20265 | 2/10 | " | 広島市 | Vb', IV, ND | 2 |

② 事例13 (22192株)のPulseNetクラスター



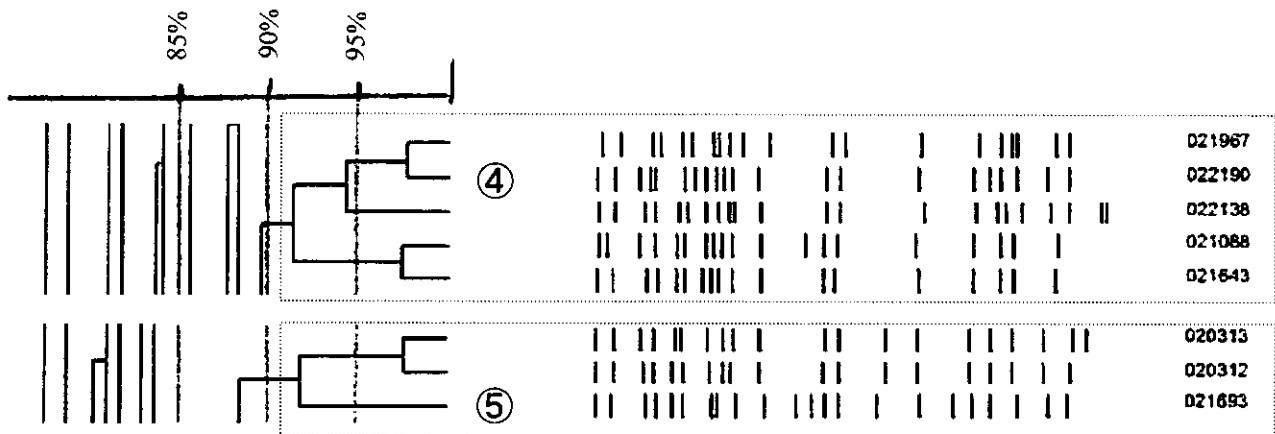
| クラスター | No | 発症/ 分離 | 区分 | 分離地研 名 | 感染研型 | STX型 |
|-----------|-------|-----------|----|-----------|---------------|------|
| ② 事例13 | 22108 | 9/19 | 散発 | 大阪市 | IIIb, ND, III | 2 |
| | 22221 | 9/5 | " | 鹿児島県 | ND, ND, ND | 1, 2 |
| | 21890 | 9/17 | " | 新潟県 | IIIa, ND, III | 2 |
| | 21885 | 9/18 | " | 石川県 | IIIb, ND, ND | 2 |
| | 22192 | 10/12 | " | 広島市 | ND, ND, III | 2 |

図 3 広島市で分離したO157:H7のPulseNetクラスター



| クラスター | No | 発症/ 分離 | 区分 | 分離地 研名 | H型 | ST X型 | 備考 |
|----------|-------|-----------|------|-----------|-----|----------|---------------|
| ① 事例6 | 21695 | 7/13 | 散(家) | 広島市 | H- | 1 | AN区 |
| | 21838 | 5/19 | 散発 | 堺市 | | 1 | |
| ② 事例6 | 21719 | 8/21 | 散発 | 岡山市 | | 1 | |
| | 21718 | 8/21 | " | 岡山市 | | 1 | |
| | 21698 | 7/13 | 散(家) | 広島市 | H- | 1 | Same as 21695 |
| ③ 事例8 | 21082 | 7/30 | 散発 | 長野県 | | 1 | |
| | 21084 | | " | 長野県 | | 1 | |
| | 22189 | 9/5 | " | 広島市 | H11 | 1 | AS区 |
| | 20668 | 5/29 | 散(家) | 広島県 | H11 | 1 | H市 |
| | 20666 | 5/17 | " | 広島県 | " | 1 | " |
| | 20667 | 5/27 | " | 広島県 | " | 1 | " |

図4-1 広島市で分離したO26:H11/-のPulsNetクラスター



| クラスター | No | 発症/分離 | 区分 | 分離地 研名 | H型 | STX 型 | 備考 |
|----------|-------|-------|------|-----------|-----|----------|---------------|
| ④ 事例9 | 21967 | 8/19 | 散发 | 広島県 | H11 | 1 | K市 |
| | 22190 | 9/10 | 〃 | 広島市 | H11 | 1 | AN区 |
| | 22138 | 8/20 | 〃 | 大分県 | | 2 | |
| | 21088 | 7/27 | 〃 | 長野県 | | 1 | |
| | 21643 | 8/14 | 〃 | 岐阜県 | | 1 | |
| ⑤ 事例2 | 20313 | 4/27 | 散(家) | 広島県 | H11 | 1 | Same as 20312 |
| | 20312 | 4/17 | 〃 | 広島県 | 〃 | 1 | K市 |
| | 21693 | 5/14 | 散发 | 広島市 | 〃 | 1 | E区 |

図4-2 広島市で分離したO26:H11/−のPulseNetクラスター

氷菓における *Salmonella* Enteritidis 食中毒事例

研究協力者 高知県衛生研究所 安岡 富久

研究要旨

平成 13 年 10 月に高知県及び愛媛県で発生した氷菓を原因とする食中毒において、患者及び原因食品から検出された *Salmonella* Enteritidis (SE) と原料卵を納入した液卵工場から同年検出された SE について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 及びフェージ型別を行った。その結果、PFGE パターンは液卵工場由来株 1 株を除いて一致したが、フェージ型別は PFGE パターンが一致した株についても 3 種類の型に分かれた。

A. 研究目的

平成 13 年 10 月 14 日、高知県内の幼稚園において SE による食中毒が発生した。保健所による喫食調査により、幼稚園で 13 日に行われたバザーにおいて販売された氷菓が原因食品と疑われ、その氷菓の製造所から収去された製品から SE が検出された。また、その後の調査により、高知県 228 名、愛媛県 105 名、計 333 名という大規模な食中毒事件であることが判明した。

この事件について、患者及び原因食品から分離された菌株と、同年に県内液卵工場より分離した SE について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) をもちいた解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

サルモネラの同定、型別については常法により行った。

患者由来株 7 株、原因食品由来株 3 株について、制限酵素 Bln I を用い PFGE を行った。また、氷菓の原料卵を納入した液卵工場は以前より所管する保健所が調査しており、この工場から分離した SE 6 株についても同様に PFGE を行い、これらの結果について画像解析プログラムソフト (Fingerprinting II、Bio-Rad) を用いて解析した。

さらに、患者由来株 5 株、原因食品由来株 3 株、液卵工場由来株 6 株について国立感染症研究所に依頼し、フェージ型別を行った。

C. 研究結果

PFGE を行った株及びそのパターンについては図 1 に示した。液卵工場か

ら分離された1株を除き、パターンはすべて一致した。パターンが異なる株も1バンドの違いであった。また、デンドログラム上で類似度を比較したところ、94%以上の類似度であった(図2)。

ファージ型別については表1に示した。患者由来株及び氷菓由来株2株(いちご味、ソーダ味)については47型であったが、氷菓由来株(ミルク味)は36型と異なっていた。また液卵工場由来株においては、平成13年5月に分離した3株は14b型、11月及び12月に分離した2株は47型であった。パターンが異なっていた1株はRDNC型であった。

D. 考察

患者由来株、氷菓由来株及び液卵工場由来株についてPFGEを行ったところ、液卵工場由来の1株を除いてすべてパターンは一致し、類似度も94%以上であった。しかし、ファージ型別では患者由来株、氷菓由来株(いちご味、ソーダ味)、及び液卵工場由来株2株は47型と一致したが、氷菓由来株(ミルク味)は36型、液卵工場由来株3株は14b型と異なっていた。これにより、SE食中毒の汚染源追究において、PFGEパターンの一致のみでは不十分であることが示唆された。

この液卵工場については、隣接の農場と四国内のGPセンターから卵を搬入しており、SE汚染源の確定には至っていない。現在、県内採卵農場におけるSE汚染実態について調査中である。

E. 結論

SEにおいて、PFGEパターンが一致してもファージ型別が異なる株が存在することが確認された。

F. 研究発表

松本紀子、安岡富久、谷脇妙、高橋富世、絹田美苗、田中博、氷菓における*Salmonella* Enteritidis 食中毒事例、第23回食品微生物学会学術総会、東京都、2002.9.24~25

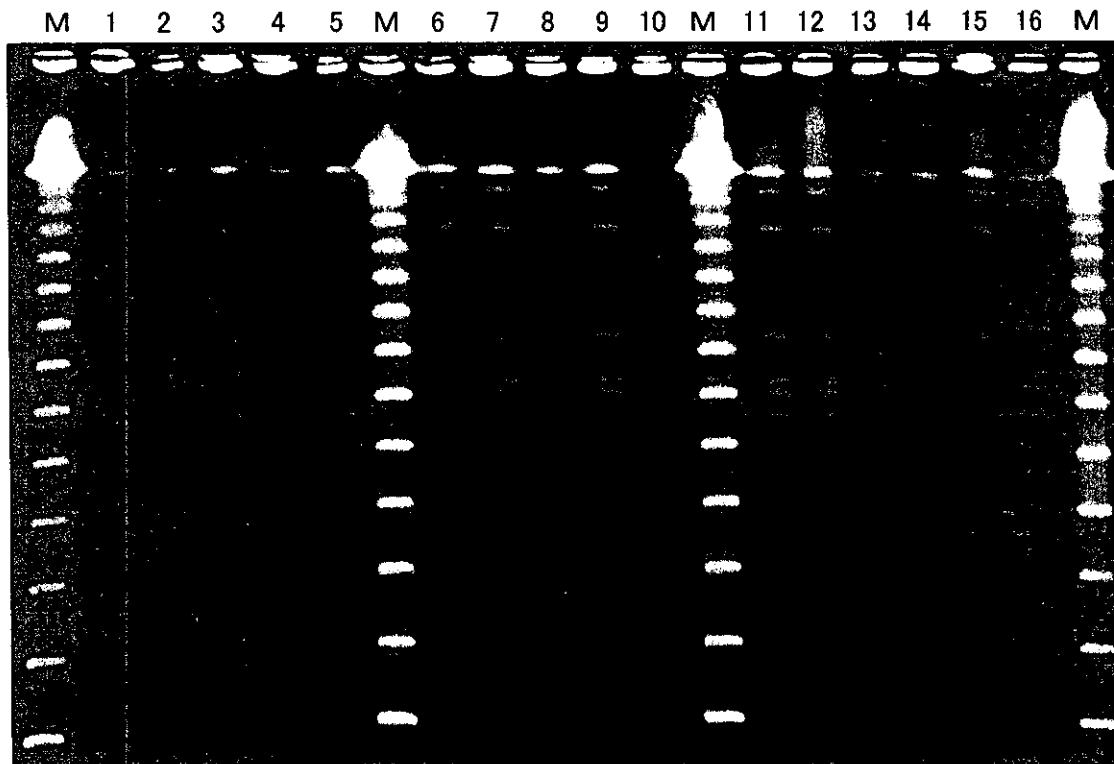


図1 氷菓におけるSE食中毒関連株および高知県内液卵工場由来SE株のPFGEパターン

M: マーカー

1~7: 患者

8: 氷菓(いちご)

9: 氷菓(ソーダ)

10: 氷菓(ミルク)

11~13: 液卵工場由来株 卵殻分離液 平成13年5月

14: 液卵工場由来株 液卵 平成13年11月

15: 液卵工場由来株 卵殻分離液 平成13年11月

16: 液卵工場由来株 卵殻分離液 平成13年12月

Dise (Tot 1.2%-1.2%) (F: 0.0% S: 0.0%) [0.0%-100.0%]
SE

SE

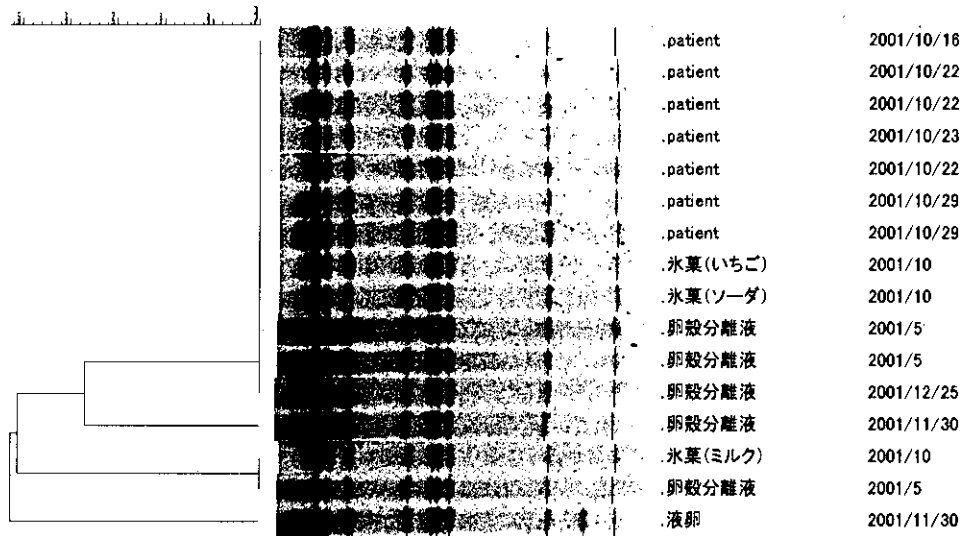


図2 食中毒関連株及び液卵工場由来株のデンドログラム

表1 検出された SE のフェージ型別

| 検体名 | 株数 | フェージ型 |
|-----------------|----|-------|
| 患者 | 5 | 47 |
| 氷菓(いちご、ソーダ) | 各1 | 47 |
| 氷菓(ミルク) | 1 | 36 |
| 液卵工場(H13.5) | 3 | 14b |
| 液卵工場(H13.11,12) | 各1 | 47 |
| 液卵工場(H13.11) | 1 | RDNC |

厚生労働科学研究費補助金(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Ⅲ
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 | | |

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、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。

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最も有用な手段であり、現在、地方衛生研究所(地研)と感染症研究所(感染研)の間の全国的な 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。そこで、九州地区では、平成12年度、13年度に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、12年度に、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ため、13年度は統一マニュアルを作成し、その上で各機関実施のPFGE画像の比較解析を行ったが、泳動、画像転送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わかった。そのため本年度の研究では、PFGEをプラグ作成と泳動に分けて検討することにより、問題点を洗い出し、改善していくことを目的とした。また、PFGEの方法として、通常法のほかに、迅速法も検討し、パルスネット構築への応用を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

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

1) 通常法

昨年度作成した統一マニュアル(図1)に従ってPFGEを実施した。

2) 迅速法

E. M. Ribotらの方法(J. Clinical Microbiol., 2001, Vol.39, 1889-1894)を一部改変した方法で実施した(図2)。

3. PFGE 像の取込方法

エチジウムブロミドでの染色・脱色後のPFGEゲルからの画像取込は、各機関によりそれぞれの方法で行った(表2)。ゲルから画像をCCDカメラで直接取り込む機関は、4機関であった。またその他の7機関では、一旦ゲルを写真撮影した後、写真をスキャナー(6機関)またはCCDカメラ(1機関)で画像に取り込んだ。

4. 画像解析法

各機関で得られた画像データは、ポラロイド写真及びTIFF形式で保存した(CCDカメラ、画像解析装置、スキャナーで泳動した写真を取り込み)画像を福岡県保健環境研究所に電子メールで送信し、DNA解析ソフトFingerprinting II

(BIO-RAD, 日本語版)で解析した。

5. 研究実施方法

1) 通常法と迅速法との比較

表1に示した5菌株について、通常法(統一マニュアル法、表2)と迅速法(表2)によりPFGEを実施し、泳動像を福岡県保健環境研究所へ集積し、比較・解析した。

2) 同一プラグを使用した各機関での泳動像の比較

福岡県保健環境研究所で作製した菌株No. 2のプラグを各機関へ送付し、各機関で泳動後、泳動像を福岡県保健環境研究所へ集積し、全機関の泳動像を比較することにより、泳動における問題点を検討した。

3) 各機関で作製したプラグの同時泳動後の泳動像の比較

各機関で作製した1菌株No. 2のプラグを福岡県保健環境研究所に送付し、全機関のプラグを同時に泳動し、泳動像を比較することにより、プラグ作製における問題点を検討した。

C. 研究結果

1) 画像処理について

各研究協力機関から福岡県保健環境研究所に電子メールで送信された画像を図3から6に示した。機関別に画像を示した。当年度は画像のファイル形式については全く問題がなかった。画像のサイズについては特に指定していなかったため、機関により画像サイズが0.3~1.2MBとまちまちであったが、解析時に問題となることはなかった。一方、ゲルを直接CCDカメラで取り込んだ画像は、ゲルを写真撮影しスキャナー等で取り込んだ場合に比べ、安定した良好な画像が得られていた。写真をスキャナー等で取り込んだ場合、プラグ作成も泳動も問題がないのに良好な写真が得られていないために解析に悪影響を及ぼしているケースが見られた。また、ゲルを感熱紙にプリントし、スキャナーで取り込んだ画像はバンドが鮮

明でなく解析に支障をきたした。

2) 通常法と迅速法との比較

O157 PFGE のプラグ作成方法について、制限酵素処理済みプラグ作成までに 4 日間を要する通常法と 2 日間で行う迅速法について、それぞれ表 1 に示す標準菌 5 株を用いて各機関で比較検討した。迅速法を試行実施した 11 機関中 10 機関で PFGE の泳動像を得ることができた。10 機関での従来法と迅速法で得られた標準菌株 5 株について各々比較した。解析に用いたトレランスは、最適化 1%、バンド比較トレランス 1.23%、フィンガープリント内のトレランス変化率 1% で実施した (図 7)。その結果、迅速法と従来法は 90% 以上の相同性であった (図 8~11)。100% の相同性が得られなかった原因は、プラグ作成方法の違いによるものではなく、以下に挙げる理由によるものであることが分かった。2 法別々に泳動し、マーカーによる影響や移動度の違いが生じてくる。また標準株として使用している 5 株中 no.1, 2, 3 は、泳動像とデンストメトリーカーブから分かるように (図 12~16)、現在の PFGE 泳動条件では分離が悪くシオルダーとなりバンド検索時にバンドと認識できたりできない場合があり、バンドの違いとして相同性を比較する場合に違いとなって現われてくる。また、5 株いずれも 25kb 以下のバンドは輝度が低い場合、バンド認識が不安定であった。さらに小さなサイズの DNA フラグメントはゲルから流れ出てしまっているケースもあり、バンド数が少なくなり「バンド数の違い」となって相同性に影響を及ぼしていた。

3) λ-ラダーによるゲル標準化における問題点

λ-ラダーでゲルの標準化を行う場合、λ-ラダーの影響を大きく受けることが分かった。表 2 に各機関の λ-ラダー熱処理状況を示した。熱処理条件が難しく、各機関共に苦慮していることが分かる。今回各機関から送られてきた λ-ラダーの泳動像を図 17 に示した。バンドが太くなりブロードになっているケースが多く、ピークが複数検出さ

れ、ピーク認識が困難なため、左右の移動度に影響を及ぼした。同一菌株について機関間の相同性を図 18~22 に示した。PFGE 泳動ゲルが異なるとマーカーやバッファー温度により複合的に移動度が異なっていることが分かる。このような微妙な移動度の違いは、解析ソフトによるゲル標準化が良好に行われず、バンドの移動度の違いとなって現われ、相同性の違いとなる。

4) 同一プラグを使用した各機関での泳動像の比較 (一泳動における問題点の検討一)

図 22 に各機関で作成・泳動した菌株 no.2 のデンドログラムを示した。また、図 23 に福岡県保健環境研究所で作成し、9 機関で泳動した画像のデンドログラムを示した。100% 一致率を見るものはいずれも同一ゲルで流したものであり、あるいは移動度が近似しているものであることが判明した。他の差違は 450kb 以上のスメアー状バンドの影響や 25kb 以下のバンド数の違い、シオルダー部分のバンド認識の違いに起因していた。

5) 各機関で作製したプラグの同時泳動後の泳動像の比較 (一プラグ作成における問題点の検討一)

図 24 及び 25 に各機関から福岡県保健環境研究所に送付されたプラグを同時に泳動した画像を示した。機関 2 及び 10 のプラグは、PFGE ゲルに装填時に壊れ、2 機関の泳動状況が悪かった。また機関 3 についてはスメアー状となったため、解析には加えなかった。同一ゲル上での比較であるため、解析のトレランスは、最適化 0%、バンド比較トレランス 1.23%、フィンガープリント内のトレランス変化率 0% で実施した (図 27)。すべてのバンドを自動で認識した結果、バンドが不明瞭であった機関 2 を除いた場合、一致率は 91.8% であった。また機関 6 については、535kb 付近のバンドが欠落し、430 及び 110kb 付近に他の機関と異なるバンドが 2 本検出された。機関 2 及び 6 を除いた場合、5 機関と 3 機関との 2 つのクラスターに分かれ、一致率は