

けるコロニーの着色の度合いで判定した。 β -グルクロニダーゼ産生能は「mEC with MUG」を用いて調べた。血清学的試験は凝集反応を用いて、エンテロヘモリジンは洗浄羊血球を用いた血液寒天培地にてそれぞれ調べた。Stx 型別は PCR および RPLA 法にて決定した。Stx 以外の病原因子としては、PCR を用いて検索した。ターゲット遺伝子は、クロモソーム支配としては、インチミンをコードする *eaeA* および分泌タンパク群である Esp の分泌に関与する Pas 蛋白をコードする *pas* の 2 種とし、プラスミド支配では、ラージプラスミドに存在するエンテロヘモリジンをコードする EHEC-*hlyA*、カタラーゼペルオキシダーゼをコードする *katP*、ヒトの第 V 血液凝固因子を分解するセリンプロテアーゼをコードする *espP*、および II 型タンパク分泌経路をコードすると思われる *etp* 遺伝子群の 4 種類とした。

ゲノム DNA の解析には、*XbaI* を用いた PFGE を実施した。得られたバンドパターンはゲルコンバーII を用いて解析した。また、PFGE に関しては、1996 年から 1998 年までに分離された典型的な O157 菌株もパターンの比較のため、試験に供した。

C. 研究結果

1. 感染事例について

北海道・東北・新潟ブロックの各地方衛生研究所から寄せられた事例報告では、疫学情報が得られ、かつ何らかの関連性が認められた事例については、その PFGE パターンは一致しているか、違ったとしても 3 本以内のバンドの違いであった。一方、散発事例においては個々の事例同士でその PFGE パターンは区別することが可能であった。しかしながら、同一県内での検討において、3 ヶ月間に分離された散発事例由来株が同じ PFGE パターンを示し、この菌株が県内に侵淫していることが示された例もあった (1)。

いくつかの地研は、PFGE と病原因子の保有パターン (*stx*、*eaeA*、*astA*) を組み合わせて解析しており、これによって PFGE 単独で解析したときよりも効率よく outbreak を検討することが可能であることを示した。まれに、菌株によっては PFGE の結果がスメアとなりそのパターンを比較できないことがある。このようなときには、特に他の病原因子を検討することが効力を発揮する (1)。

パルスネットが有効に機能するためには、それぞれの PFGE 画像は解析に耐える程度の鮮明さが要求される。いくつかの地研では、PFGE 画像において高分子量の位置に制限酵素の未消化によると思われるバンドが確認された。これらの地研では、酵素量を多くするなどの改良を行い、幾分その画像は改善された。しかし、バンドの鮮明さにおいて問題があるように思われ、今後さらに検討を要する (1)。

各地研の成績から、平成 13 年には 4 件の EHEC による集団感染事例が発生しており、PFGE を用いた解析で、散発事例由来株と集団感染事例由来株とが識別可能であることが示された。また、いくつかの散発事例でその PFGE パターンが一致し、diffuse outbreak を疑う事例が確認されたが、解析の時期が遅く疫学調査に反映させることができなかった (2)。また、同年度には、EHEC O157 についてはサイコロステーキや和風キムチを感染源とする diffuse outbreak の発生がみられた。その際、感染研から当該菌株の PFGE パターンが適宜全地研に配布され、地方流行株との速やかな比較が可能であった。

2. 感染事例のクラスター解析

平成 13 年度に各地研で得られた PFGE の写真データについてゲルコンバーII を用いたクラスター解析を行った。その結果得られたデンドログラムによると、各地研からの分離株は適宜に分散せず、クラスターを形成する傾向が見

られた。

3. 第1回精度管理調査

アンケート調査からは、何らかの形でキットを使用している施設は3施設であったが、このうち2施設についてはキットの使用は部分的で、自家製の試薬と併用していた。他の大部分の施設については自家調整の試薬を用いており国立感染症研究所で作成したマニュアルに準じた反応条件を採用していた。泳動条件については独自の条件を検討しており、このことが施設間における泳動像の不均一性に反映されていた(3)。

施設間における菌株毎のデンドログラムを比較すると、toleranceを1.2%にとると、similarityが80%を超えたのは菌株10(80.92%)の1例のみで、70%を超えたのは5菌株、他の4菌株は50%代であった。一方、toleranceを3%にとると、菌株8(79.54%)を除いたすべての菌株において80%以上のsimilarityを示した(3)。

4. 第2回精度管理調査

2回目の精度管理は1回目と同じ菌株を用い、12月に実施した。1回目のアンケート調査の結果をもとに試行マニュアルを作成し、基本的にそれに基づいてPFGEを実施した。今回の泳動像を比べると、前回みられた泳動条件の違いによる極端なパターンの違いは認められなかった。またバンドの濃度についても均一であったが、部分的に未消化バンドが散見された(3)。

菌株毎の施設間におけるsimilarityを解析したところ、1.2%のトレランスでは8割の菌株で70%代であった。トレランスを3%にとると、ほとんどの菌株で90%代のsimilarityを示した。1回目の精度管理と2回目の精度管理の菌株毎のsimilarityを比較すると、2回目の方が改善されていることが示された。また、同一施設

において1回目と2回目のPFGEパターンを比較すると、全10株で100%一致した施設はなかったが、おおむね90%以上のsimilarityを示した。

5. β -グルクロニダーゼ産生性 O157 菌株の性状

1996年に千歳市で発生したO157感染事例における原因菌が β -グルクロニダーゼ産生性(GUD⁺)のO157であることが判明し、以来、北海道では1998年までに22株の非典型的なO157菌が分離されている。本菌の生化学性状の特徴として、GUD⁺以外にはラムノースを発酵することがあげられるが、一夜でソルビトールを分解することはなかった。また、これらの株はエンテロヘモリジンを産生した。PCRで検出した病原因子については、*stx*は*stx1&2*、*eae*型は γ 1、*pas*遺伝子を保有し、プラスミド上にはEHEC-*hly*と*etpD*が認められたが、*katP*、*espP*は認められなかった。これらのGUD⁺株は特徴的なPFGEパターンを示し、典型的なO157株とは区別された。さらに、1996年から1998年までに北海道で分離されたO157菌株のPFGEパターンについてのデンドログラムから、GUD⁺株が一つのグループを形成していることが判明した。

D. 考察

パルスネットの構築にあたり、北海道・東北・新潟ブロックにおけるEHEC O157の感染状況並びにPFGEを用いたDNA解析により菌株の分布状況を調べた。各地方衛生研究所で分離された菌株についてPFGEを用いて解析したところ、関連事例由来株はほぼ同一のバンドパターンを示し、それ以外の散发事例については異なったパターンを示すものが多かった。このことから、PFGEが高い分解能をもち、そのパターンから菌の異同を判断することが妥当であることが示された。また、一部のデータか

ら、PFGE といくつかの病原因子 (*stx*, *astA*, *eaeA* など) の保有状況を組み合わせることで、その精度が向上することが示唆された。このように、感染源の究明や菌の分子疫学的データの集積には PFGE は有効な方法であることが示された。

一部の地研では、PFGE 画像において高分子領域に未消化のバンドが認められた。制限酵素処理が不十分だとこのような未消化バンドがみられ、さらには部分消化による偽バンドが出現し、後のソフトウェア解析に支障をきたす原因となる。これらの地研では制限酵素処理前の洗浄操作の回数を増やす、酵素量を増量するなどして改善を図った。しかしながらこの時点では、一部の菌株で完全に未消化バンドを消失させることはできなかった。これらの点についても今後の検討課題として残った。

平成 13 年度には、北海道・東北・新潟ブロック内の一部の地域で diffuse outbreak を疑う事例が発生した。しかし、菌株の収集に時間がかかり、その結果、解析の時期が遅延し、解析の結果から PFGE パターンが酷似し、diffuse outbreak の可能性が示されたときには当該事例の調査等がすべて終了した後で、その結果を行政サイドに反映させることはできなかった。このことは、菌株の収集と PFGE による菌株の比較には迅速性が要求され、さらにその結果が担当部局に即座に活用されるシステムづくりが必要であることを示唆している。また一方で、同年度には EHEC O157 についてはサイコロステーキや和風キムチを感染源とする diffuse outbreak の発生がみられ、西日本ではソネ赤痢菌による diffuse outbreak が認められた。これらの PFGE 画像が国立感染症研究所から本ネットワークを通じて全地研に配布され、東北地方で分離されたソネ赤痢菌との迅速な比較が可能であった。これらは感染源対策において本ネットワークが有用であることを示している。

各地研で得られた PFGE の写真データについてゲルコンパーII を用いたクラスター解析を行ったところ、各地研からの分離株同士がクラスターを形成する傾向が見られた。この結果は各地研で個別に泳動された PFGE の画像データを直接比較することの困難さを表しており、方法の標準化等の精度管理の必要性が示された。

パルスネットの構築あたり、各地方衛生研究所において PFGE を実施し、その結果を施設間で比較するためには均質な PFGE パターンが得られ、なおかつそのパターンを同じレベルで解析する必要がある。また、上述したように、地研が独自に実施した PFGE 像を比較することは現時点では問題があることが示された。これらの問題を解決すべく平成 14 年度は PFGE に関する 2 回の精度管理を行った。さらに方法の標準化には PFGE の統一したマニュアルが必要であり、その作成に当たりアンケート調査も同時に実施した。

アンケート調査の結果からは、大多数の施設が自家製の試薬を採用しており、キットを使用している施設は少数であることがわかった。PFGE パターンに影響を与えると思われるプラグモールドの使用に関しては、2 種類のプラグモールドに分かれた。どのプラグモールドを用いるかによってバンドの太さに違いが生じ、それによってバンドパターンの解像度に影響があらわれる。近接したバンドが 2 本のバンドと認識されるか、一本の太いバンドと認識されるかはバンドパターンの解析を行うに当たって重要な要素となる。従って、今後、どのプラグモールドを採用するかを統一するか、あるいは泳動用のゲルにロードするゲルブロックの厚さを統一する必要がある。

1 回目の精度管理では、情報の統一性が不足しており泳動条件も統一されていなかったため、極端な泳動パターンの違いが認められた施設もあり、解析を行う際にその違いを吸収する

ことができなかつた。サンプルバンドやマーカ
ーバンドの濃度にも差があり、施設間における
較差は若干高めであつた。2 回目の精度管理で
は試行マニュアルを作成し泳動条件などの基
本的な方法の統一化が図られた。その結果、泳
動パターンの一均化が認められ、施設間較差も
縮まり従つて施設間における similarity も高ま
つた。このことは、統一化されたマニュアルが
あり、しっかりとした PFGE 技術が備わってい
れば、ネットワークの構築は可能であることを
示している。

北海道で分離された腸管出血性大腸菌
O157:H7 GUD⁺株の菌学性状を解析するにあ
たり、PFGE が有効なツールであることが示さ
れた。すなわち、これらの GUD⁺株は特徴的な
PFGE パターンを示し、他の典型的な O157 菌
株とは区別された。また、これらの菌株につい
て PFGE によるデンドログラムを作成すると、
GUD⁺株は明らかに一つのグループを形成して
いることが分かつた。このことから、GUD⁺株
は独立したクローンを形成していることが判
明した。このように、O157 グループ全体にお
けるサブクローンの位置づけを考える場合、
PFGE は非常に有力なツールになることが示さ
れた。

E. 結論

EHEC O157 感染症は全国的に毎年多数発
生しており、分離菌株数においても散発事例数
においてもここ数年減少していない。多数の菌
株を用いた PFGE 解析から、O157 ゲノムが多
様性を有していることから明らかとなり、本
法が疫学マーカーのひとつとして利用可能で
あることが示された。従つて、PFGE データは
疫学情報をサポートし、diffuse outbreak の早期
探知に有用な方法論であることが証明された。
しかし、PFGE 情報を迅速に行政に還元するた
めには、菌株の早期収集が必要であり、そのた
めの体制づくりが緊要であるなど、制度面での

システム作りなどの問題点も浮き彫りにされ
た。

PFGE の方法に関する標準化及び画像デー
タの均質性の確保等の目的のため、精度管理を
実施したが、同時に行つたアンケート調査の結
果から、キットを使用している施設よりも自家
製の試薬を調整している衛研が多いことが分
かつた。また、方法を統一する前では施設間較
差が認められ、同一菌株を比較したときの
similarity はそれほど高くはなかつた。しかし、
1 回目のアンケート調査をもとに試行マニ
ュアルを作成し 2 回目の精度管理調査を実施し
たところ、その泳動パターンが改善され、施設
間較差が縮まり similarity も高くなつた。また、
同一施設における 1 回目と 2 回目との比較で
は、100% の similarity が得られた施設は少な
かつたものの、おおむね 90% 以上の similarity を
示していた。

北海道で分離された GUD⁺ O157 菌株の菌学
特性 2 2 菌株における PFGE 解析において、こ
れらの GUD⁺株は独立したクローンであるこ
とが示された。

このように、PFGE の疫学調査における有用
性と利便性が示されたが、全国的なレベルでの
比較が可能となるパルスネットは今後さらに
重要性が増すものと思われる。

参考文献

- (1) 平成 12 年度厚生科学研究費補助金 振
興・再興感染症研究事業 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礎とした分
散型システムの有効性に関する研究
- (2) 平成 13 年度厚生科学研究費補助金 振
興・再興感染症研究事業 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礎とした分
散型システムの有効性に関する研究
- (3) 平成 14 年度厚生科学研究費補助金 振

興・再興感染症研究事業 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礎とした分散型システムの有効性に関する研究

F. 研究発表

1. Nagano,H., Okui,T., Fujiwara,O., Uchiyama,Y., Tamate,N., Kumada,H., Morimoto,Y., Yano,S. Clonal structure of shiga toxin (Stx)-producing and β -D-glucuronidase-positive *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan. J. Med. Microbiol. 2002. 51:405-416.

G. 研究協力者

1. 北海道立衛生研究所：長野 秀樹、森本 洋、熊田 洋行、若森 吉広。
2. 札幌市衛生研究所：川合 常明、広地 敬、坂本 裕美子。
3. 青森県環境保健センター：対馬 典子、大友良光
4. 秋田県衛生科学研究所：齊藤 志保子、八柳 潤、伊藤 功
5. 岩手県環境保健研究センター：熊谷 学、齋藤 幸一、佐藤 卓
6. 福島県衛生研究所：力田 正二、広瀬 昌子、須釜 久美子、長沢 正昭
7. 宮城県保健環境センター：白石 廣行、齋藤 紀行、畠山 敬、山口 友美、佐々木 美江、野池 道子
8. 仙台市衛生研究所：齋藤 卓哉、牛水 真紀子、熊谷 正憲
9. 山形県衛生研究所：大谷 勝実、土屋 裕美子、須藤 正英、村山 尚子
10. 新潟県保健環境科学研究所：佐々木 寿子、不二崎 順二

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12年度～平成14年度総合研究報告書（分担報告）

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, 宮島 勲	長野県衛生公害研究所
	有田 世乃, 川森 文彦	静岡県環境衛生科学研究所
	小西 典子, 尾畑 浩魅	東京都立衛生研究所

研究要旨: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。

その結果, 関東甲信静に分散する11地方衛生研究所は, PFGE法による解析技術も進歩し, 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経験した。また, パルスネット構築のための環境整備が図られたことが明らかとなった。

さらに, 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定の成績が得られた。このように, ハード面でもパルスネットに結合するための環境が, 確実に整いつつあることが示唆された。解析ソフトを運用するために検討を要する技術的な問題点も一部残されているが, 更なる試行によって解決できる見通しがついた。

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成績

を菌学的情報システム(パルスネット)に結合するための環境整備を図る。すなわち, 関東甲信静地域に分散する11地方衛生研究所において, 腸管出血性大腸菌O157等

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、1) PFGE 解析を行い、PFGE 技術の確認と有用性を検討する。さらに、2) 分散型システム確立のための基礎的研究として、①PFGE 法の標準化、②PFGE 解析写真の電送方法の検討を行い、3) 各研究所で解析した PFGE 画像を対象として解析ソフトを用いた解析法を検討し、分散型システムを試行させる。

B. 研究方法

1. PFGE 法の標準化

11 研究所で、共通の腸管出血性大腸菌 O157 菌株を用いて検討を行った。

1) 供試菌株

PFGE パターンが異なる腸管出血性大腸菌 O157 : H7 (H12 年度は 7 株, H14 年度は 3 株) を、都立衛生研究所で用意し、各研究所に供試した。

2) PFGE 法

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 (米国 Bio Rad 社) :

CHEF-Mapper 2 所

CHEF-DR II 2 所

CHEF-DR III 6 所

GenePath 1 所

アガロース濃度 : 1 %

バッファー : 0.5 x TBE

電圧 : 200V (6 V/cm)

スイッチタイム :

① 4~8 秒(リニア), 9 時間

② 8~50 秒(リニア), 13 時間

温度 : 12°C

2. PFGE 解析成績の電送

各研究所で解析した PFGE 解析画像を写真撮影すると共に、tif(または jpeg)ファイルとして、電子メールで東京都立衛生研究所に送付し、実際に撮影した写真と比較検討した。

3. PFGE 画像解析ソフトを用いた解析

画像解析ソフトとしては、平成13年度には、Gel Compare II (Applied Maths 社, 英語版), 平成14年度には、Fingerprinting II (BIO-RAD 社, Gel Compare II の和訳版)を用いた。

C. 研究結果

1. PFGE 法の標準化

11 研究所は、いずれも O157 菌株の PFGE 法による解析を実施できる能力を持っている事を確認した。

平成 12 年度 : 腸管出血性大腸菌 O157 の 7 菌株について、11 研究所で PFGE 法で解析し、その写真を都立衛生研究所に電送して比較した結果、全研究所でほぼ一定の成績が得られたが、問題点も認められた。

すなわち、

①プロテナーゼ K の不活化が不十分、または制限酵素処理が不十分 : 2 所

② DNA アプライ量が多い : 6 所

③ サイズマーカー量が不適 : 5 所

④ 写真撮影が不適 : 2 所

その後、① 泳動温度の統一 (12°C), ② マーカーの位置の統一 (ゲルの両端と真中に入れる), ③ DNA アプライ量, ④ 染色法, ⑤ 写真の撮り方等について検討した。

平成 14 年度 : 腸管出血性大腸菌 O157 の 3 菌株について、11 研究所で PFGE 解析した。その成績は、平成 12 年度に比べ、全

研究所とも技術が向上し、目視上では一定のきれいな泳動写真が得られるようになった。

2. PFGE 解析写真の電送

各研究所で解析した PFGE 解析画像を、電子メールで添付ファイルとして送付し、実際に撮影した写真と比較検討した結果、電送した写真は、十分に比較検討が可能であった。

3. 解析ソフトを用いた解析の検討と分散型システムの試行

1) 都立衛生研究所で分離された菌株を用いた試行

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った。すなわち、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 研究所で PFGE 解析した成績を用いた解析ソフトの試行

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結果、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。

4. PFGE 画像の交換が Diffuse Outbreak 解明のために有効に利用できた例

1) 牛タタキを原因とした O157:H7 による Diffuse Outbreak

2001 年 3 月中旬から 4 月初旬にかけて、千葉県東葛地域を中心に、関東 1 都 5 県と山形県において腸管出血性大腸菌 O157:H7 による、患者・感染者約 260 名に及ぶ大規模な広域集団感染事例が発生した。本事例発生時には、関係研究所間で、PFGE 画像の電送による交換をいち早く行い、事件の解決に大きく貢献できた。詳細は、平成 13 年度報告書に示した。

2) 和風キムチを原因とする Diffuse Outbreak

2001 年 8 月東京都内八王子市を中心に多摩地域で発生した O157:H7 による広域集団感染事例では、原因食品が埼玉県の某業者が製造した和風キムチであったが、この食品を原因として、同時期に埼玉県でも集団食中毒が発生しており、分離菌株の PFGE 画像の交換が、事件の解明に大きく貢献できた。詳細は、平成 13 年度報告書に示した。

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り，検討の余地が残されていることが示唆された。

5. PFGE解析が有効に活用された事例

11研究所でPFGE解析を行い，疫学解析として非常に有効に活用できた事例は，平成12年～14年の3年間に58事例（一覧表参照）あった。各事例の概要は，各年度報告書に記載した。

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早期に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結果，都立衛生研究所に電送された画像写真は，一定の精度を持っていることを確認した。さらに，その画像写真を用いて解析ソフトによる解析を行った結果，一部に技術的問題点も認められた。特にPFGE画像を解析ソフトを用いて解析する場合，鮮明でシャープなバンドが解析に必要である。そのための解決策として，最近開発された薄いコーム(0.7mm)を使って泳動することの検討が示唆された。また，小さいサイズのバンドは，解析ソフトで読み取るのが非常に困難な場合が多いので，100kb以上のバンドを対象とする方法も検討する必要があるだろう。

E. 結論

関東甲信静に分散する11地方衛生研究所は，PFGE法による解析技術も進歩し，パルスネット構築のための環境整備が図られた。

また，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経験し，パルスネット構築のための環境整備が図られたことが明らかとなった。

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定の成績が得られた。このように、ハード面でもパルスネットに結合するための環境が、確実に整いつつあることが示唆された。

今後、パルスネットを構築し、解析ソフトを運用するために、検討を要する技術的な問題点も一部残されているが、更なる試行によって解決できる見通しがついた。

F. 研究発表

原著論文	: 7 件
その他の論文数	: 17 件
口頭発表	: 71 件

詳細は、別添のとおり。

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1. 2002年9～10月に東京都内で分離された腸管出血性大腸菌O157
菌株の疫学的性状解析成績

No.	菌株No	検体搬入日	血清型 O	血清型 H	VT1	VT2	薬剤耐性パターン	PFGEパターン (目視)
1	1790	9/6	157	7	-	+	SM.TC	T-44
2	1795	9/11	157	7	-	+	-	T-44b
3	1787	9/2	157	7	-	+	-	T-11b
4	1789	9/6	157	7	-	+	-	T-11f
5	1796	9/11	157	7	-	+	-	T-5c
6	1794	9/11	157	7	-	+	-	T-5
7	1798	9/13	157	7	+	-	-	T-8
8	1799	9/18	157	7	+	-	-	T-8
9	1791	9/4	157	7	-	+	-	T-5b
10	1797	9/13	157	7	-	+	-	T-48b
11	1788	9/3	157	7	+	+	-	T-1f
12	1792	9/10	157	7	+	+	-	T-1f
13	1793	9/10	157	7	+	+	SM.TMP	T-4
14	1815	10/8	157	7	+	+	TC	T-5d
15	1816	10/16	157	7	-	+	-	T-5e
16	1813	10/10	157	7	+	+	-	T-45
17	1818	10/18	157	7	+	+	-	T-45
18	1793	9/10	157	7	+	+	SM.TMP	T-4
19	1806	10/2	157	7	+	+	TMP	T-4
20	1803	10/1	157	7	+	+	-	T-48b
21	1812	10/7	157	7	+	+	-	T-10c
22	1817	10/17	157	7	+	+	-	T-39d
23	1814	9/26	157	7	-	+	-	T-11g
24	1809	9/19	157	7	+	+	-	T-45
25	1823	10/29	157	7	+	+	-	T-39j
26	1810	10/6	157	7	-	+	-	T-11i
27	1808	10/4	157	7	-	+	-	T-5
28	1820	10/25	157	7	-	+	-	T-5
29	1825	11/12	157	7	-	+	-	T-5
30	1826	11/12	157	7	+	+	-	T-39o
31	1805	10/2	157	7	+	+	TMP	T-4
32	1811	10/6	157	7	+	+	ABPC,SM	T-4b
33	1802	9/30	157	7	+	+	SM,TC,CP	T-39d
34	1807	10/4	157	7	+	+	SM,TC,CP	T-39d
35	1804	10/2	157	7	+	+	-	T-39d
36	1824	10/31	157	7	+	+	-	T-39d
37	1801	9/24	157	7	+	+	-	T-39
38	1819	10/21	157	7	+	+	-	T-11h
39	1822	10/21	157	7	+	+	-	T-11h
40	1800	9/20	157	7	+	+	-	T-11h

図1. 2002年9～10月に東京都内で分離された腸管出血性大腸菌O157
 菌株のPFGE画像の解析ソフトによる系統樹

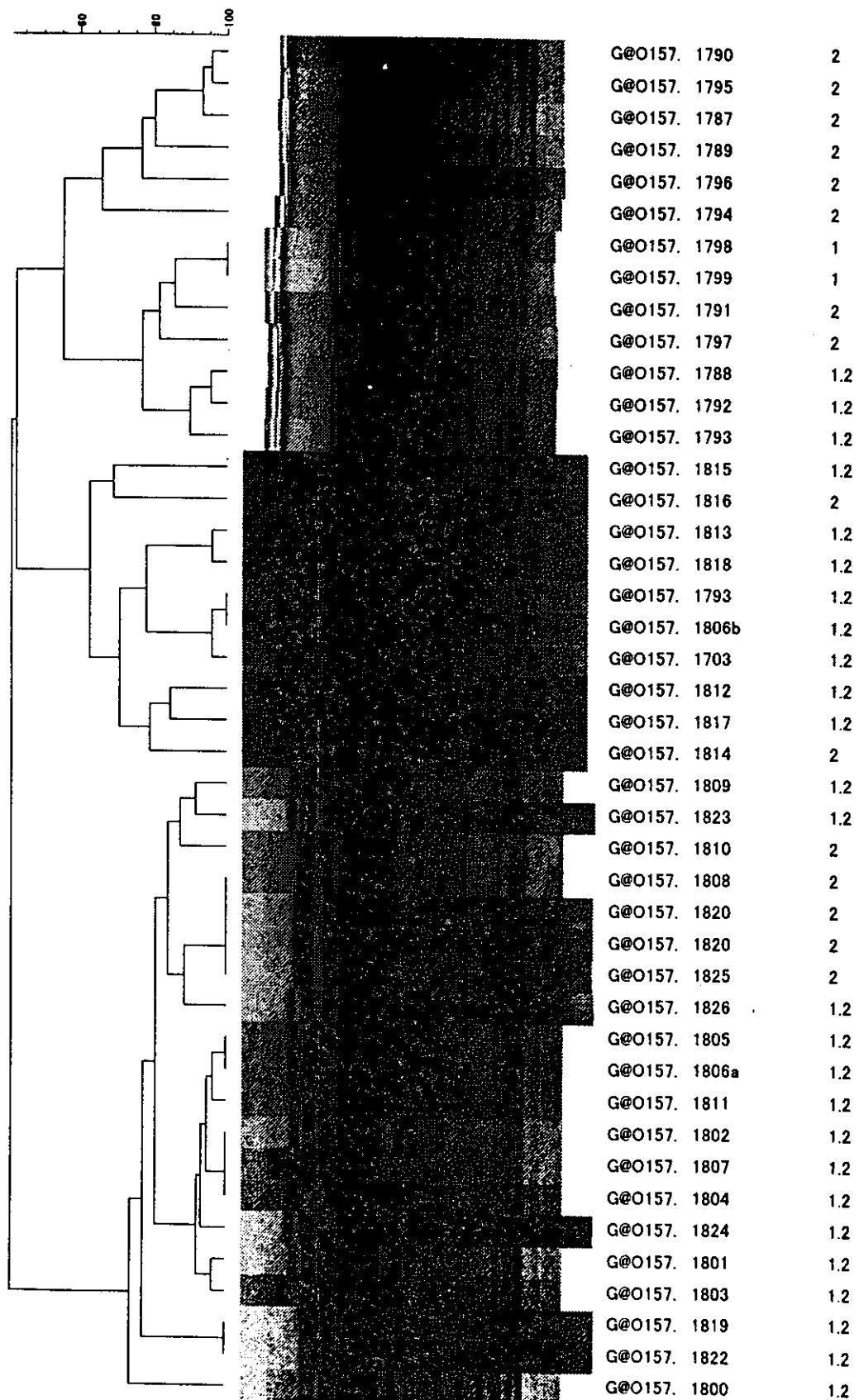
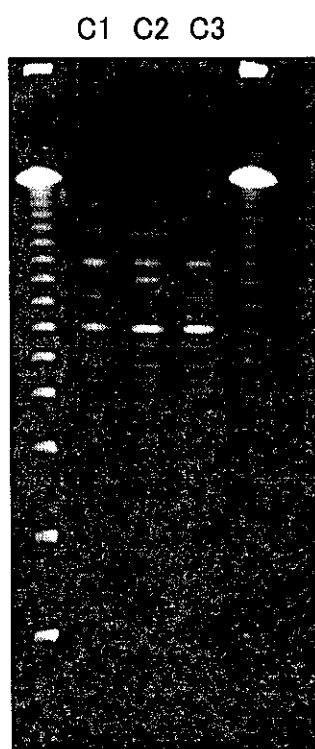
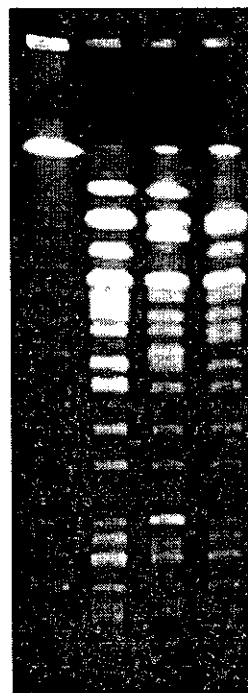


図 2 11研究協力機関で解析したO157共通株(3株)の
PFGE画像

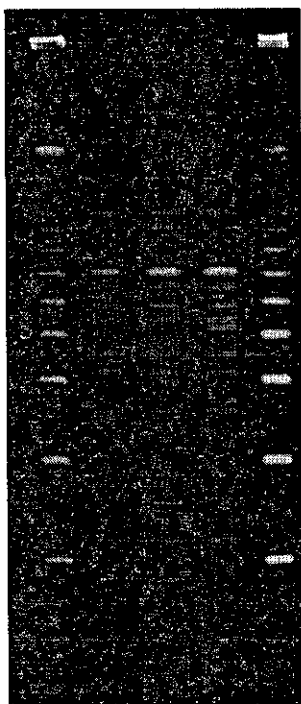
1



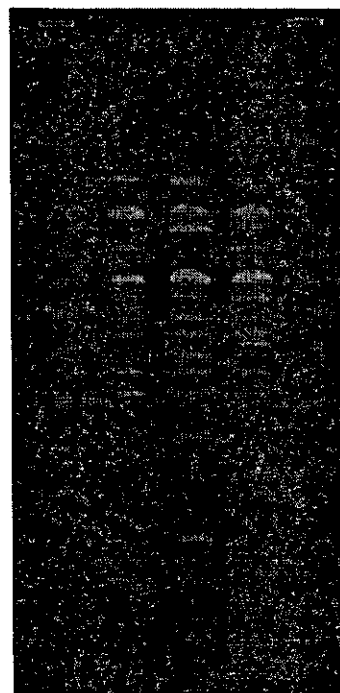
2



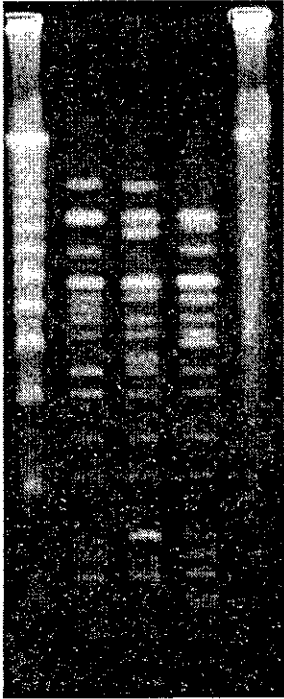
3



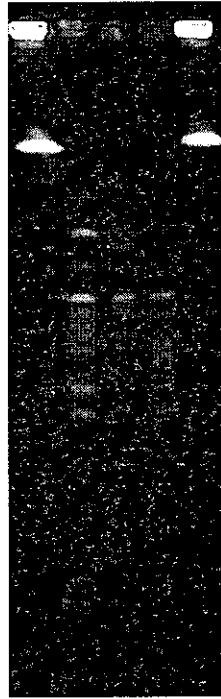
4



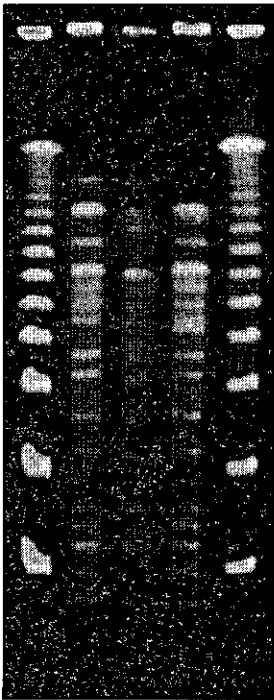
5



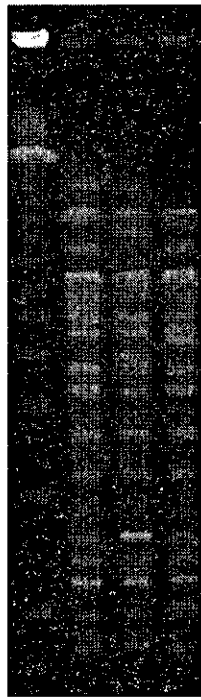
6



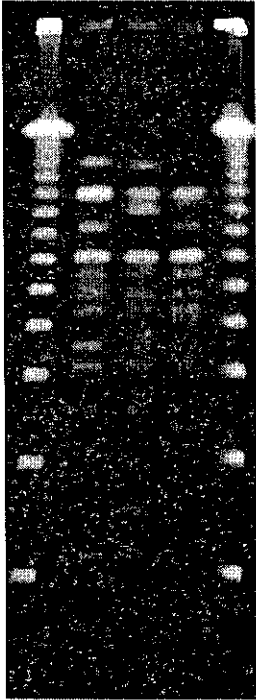
7



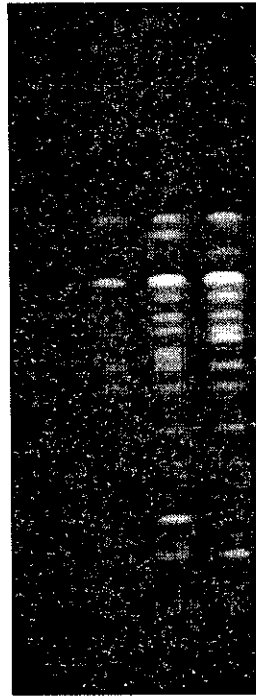
8



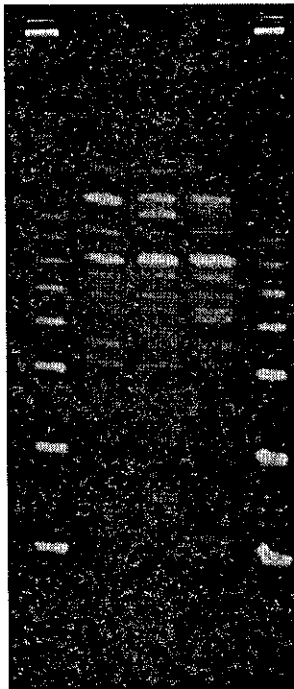
9



10



11



泳動条件

4s—8s 9hr
 8s—50s 13hr
 6V/cm
 泳動温度 12°C

使用機種

- 1: CHEF-DR III
- 2: CHEF-DR III
- 3: CHEF-DR III
- 4: CHEF-DR II
- 5: CHEF-DR III
- 6: CHEF-Mapper
- 7: CHEF-DR II
- 8: Gene Path
- 9: CHEF-DR III
- 10: CHEF-DR III
- 11: CHEF-Mapper

図 3a O157 共通株の解析(全バンドを対象)

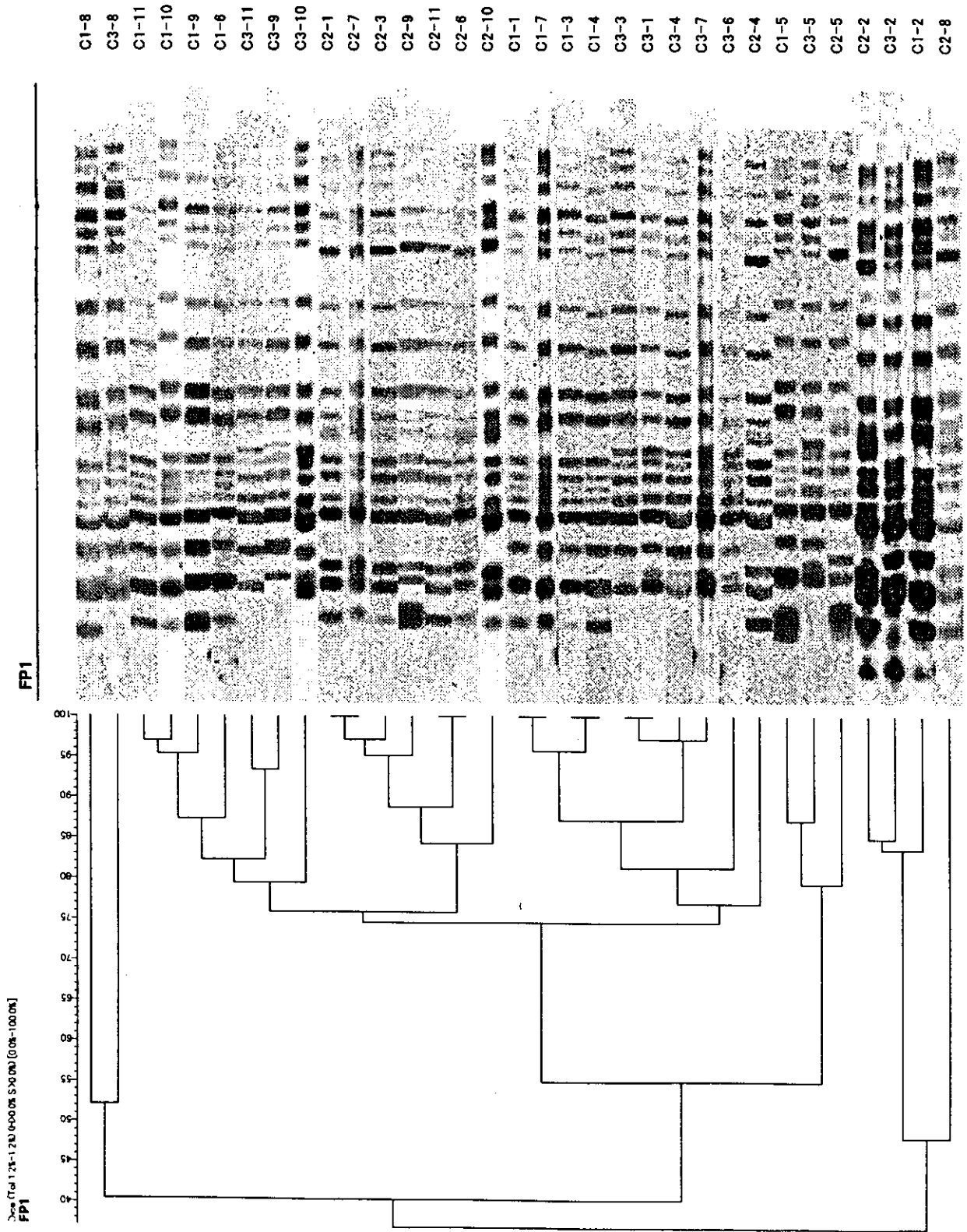


図 3b O157 共通株の解析(全バンドを対象)

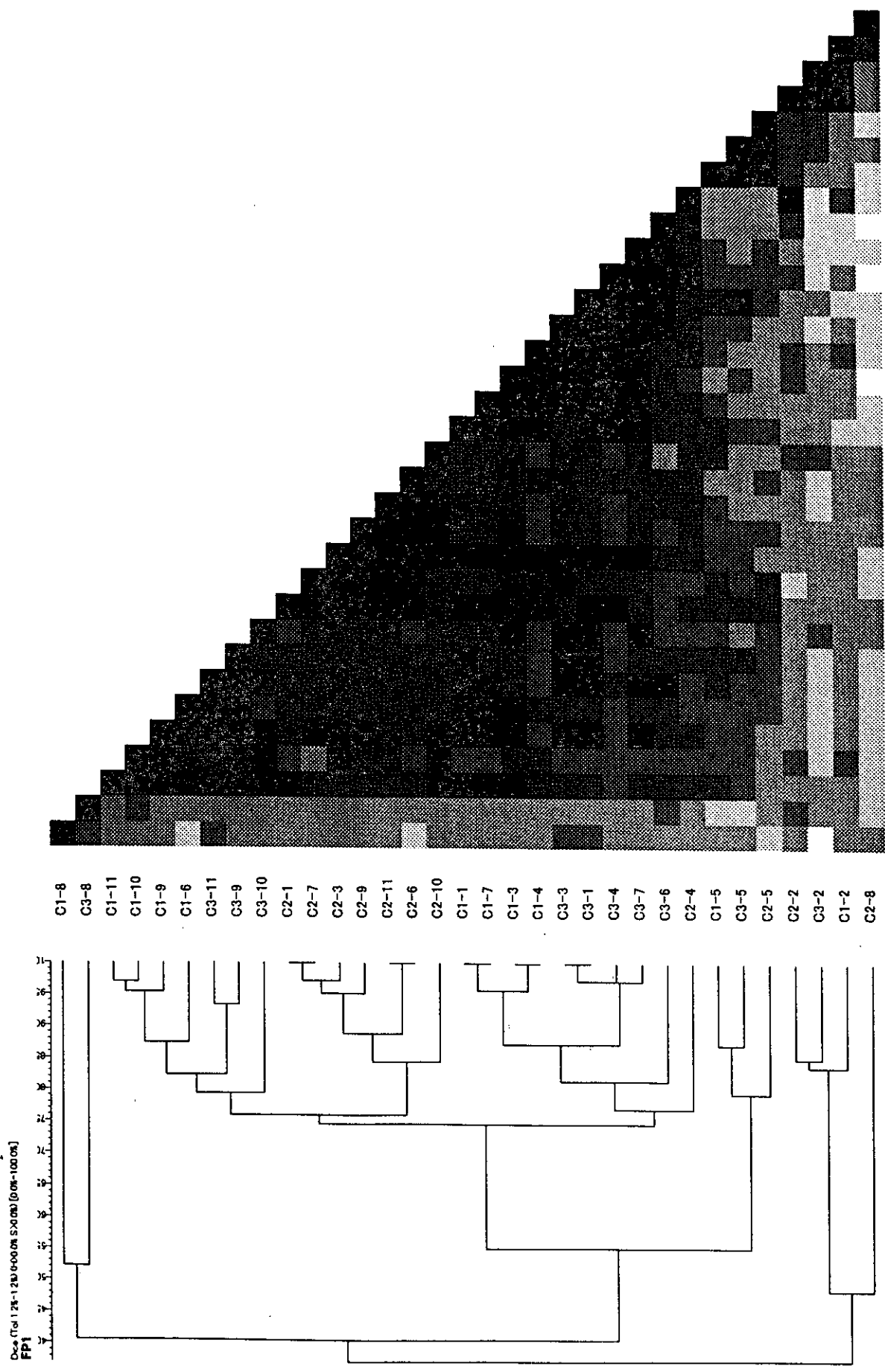


図 4a O157 共通株の解析(100Kb 以上のバンドを対象)

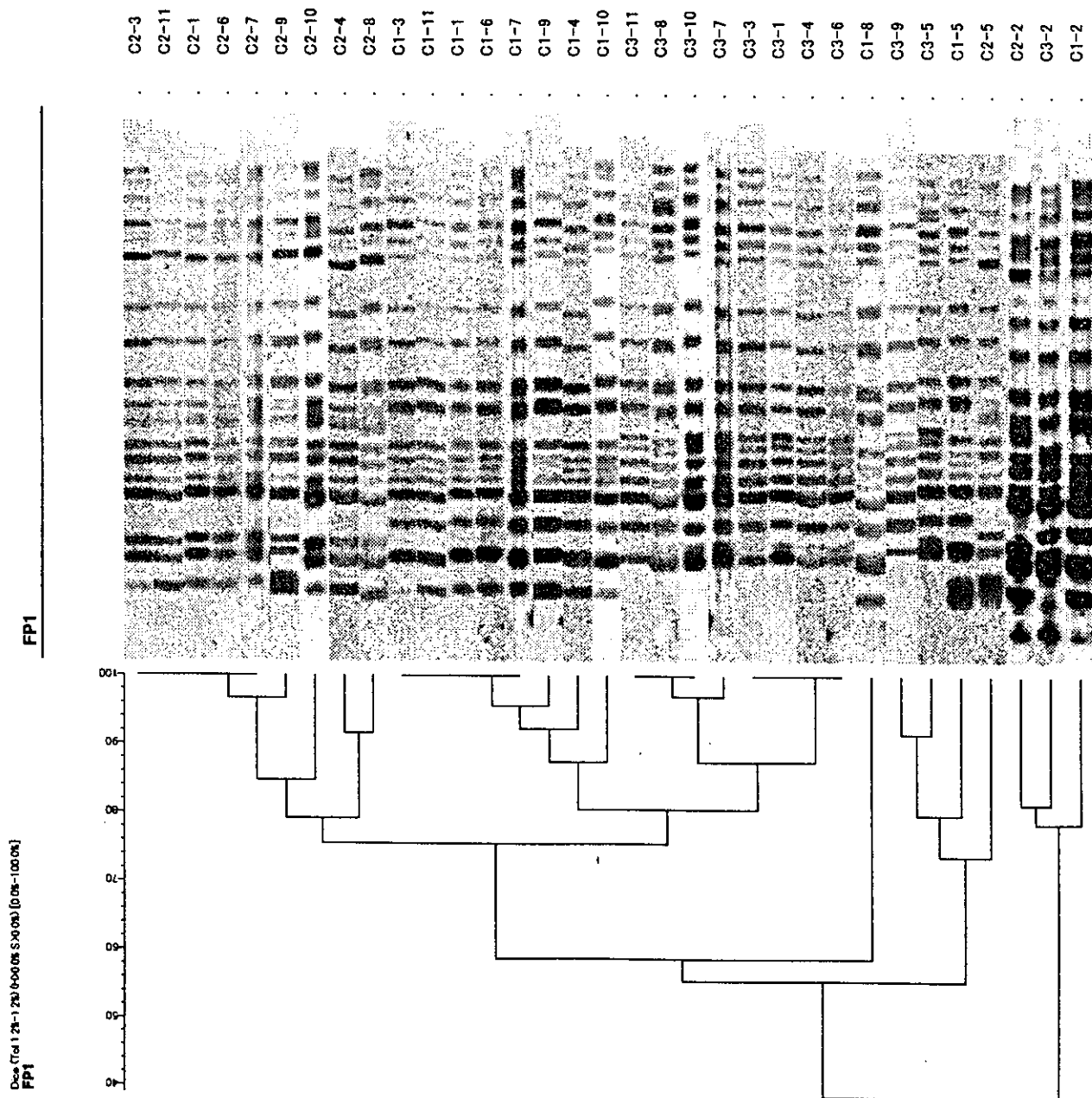
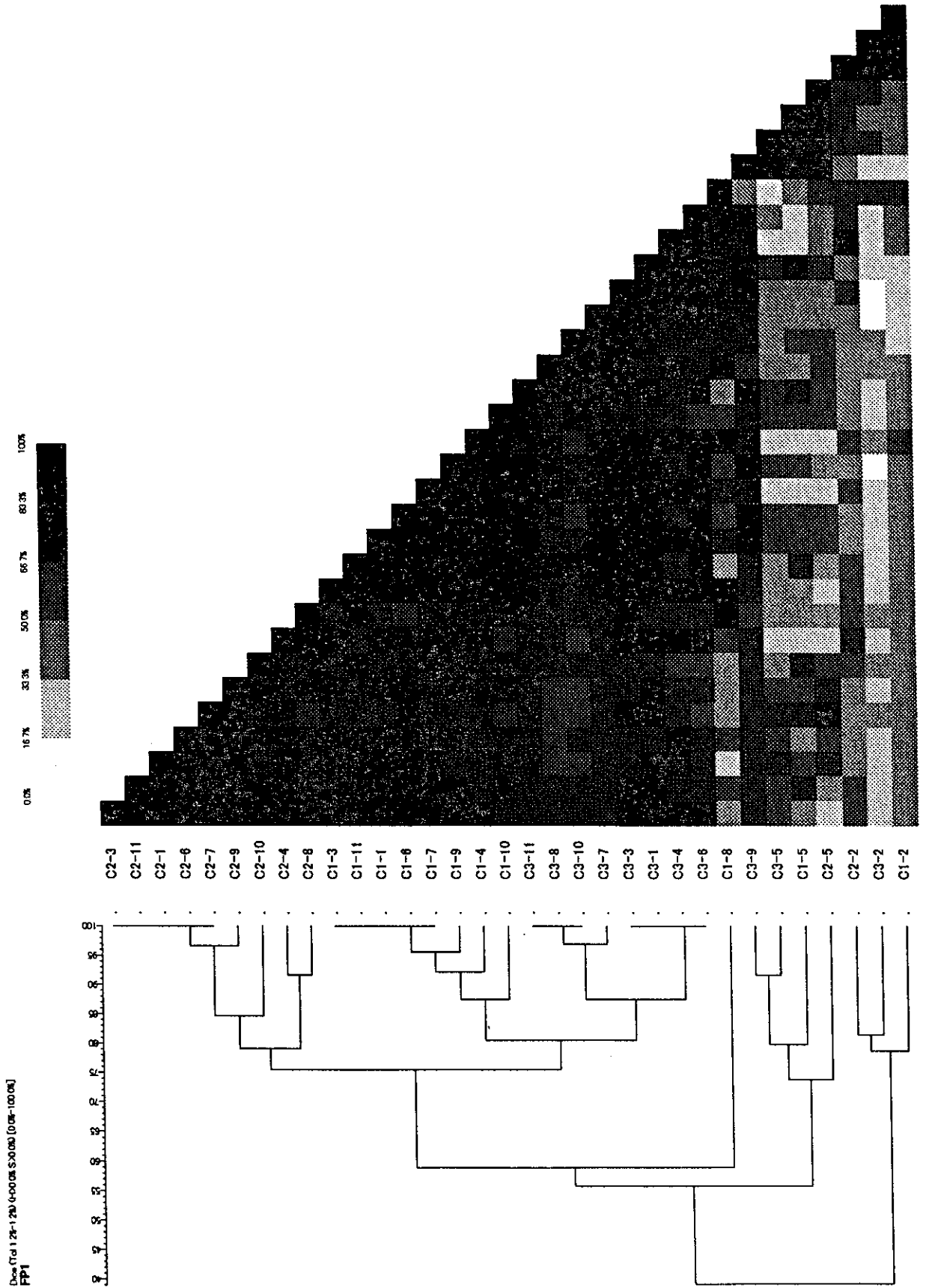
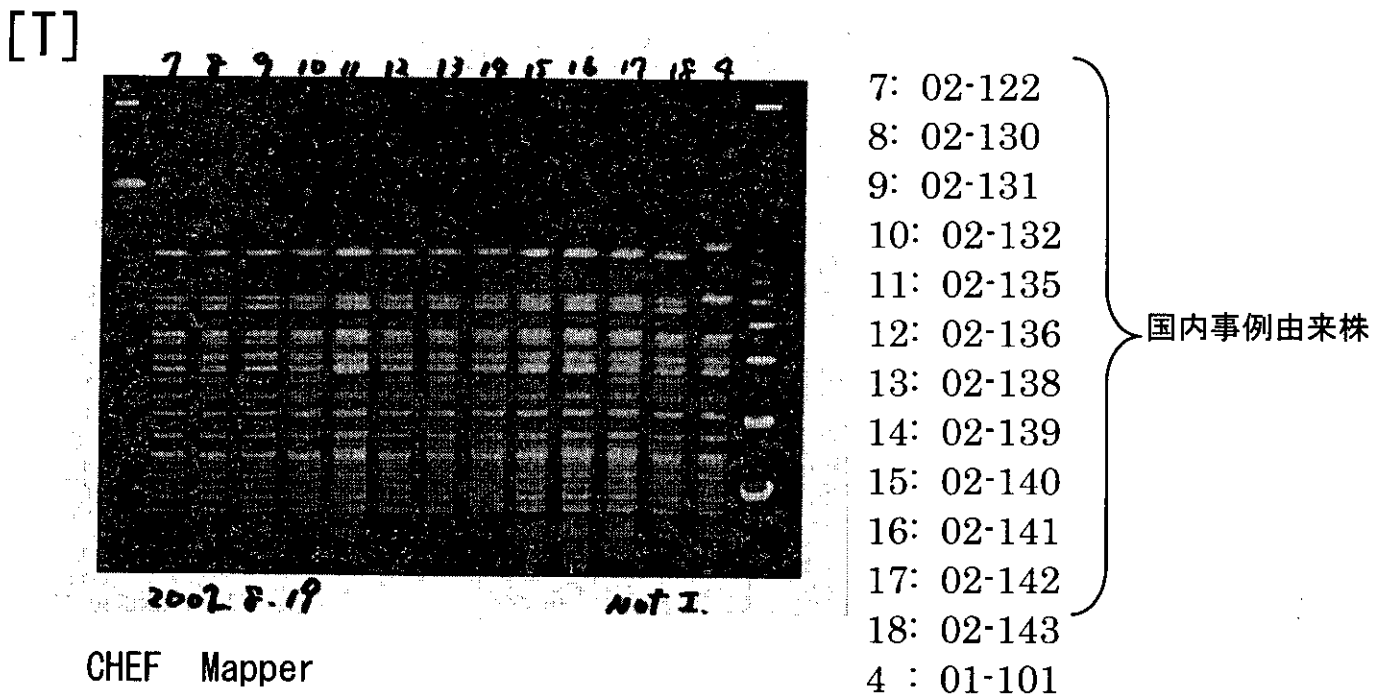
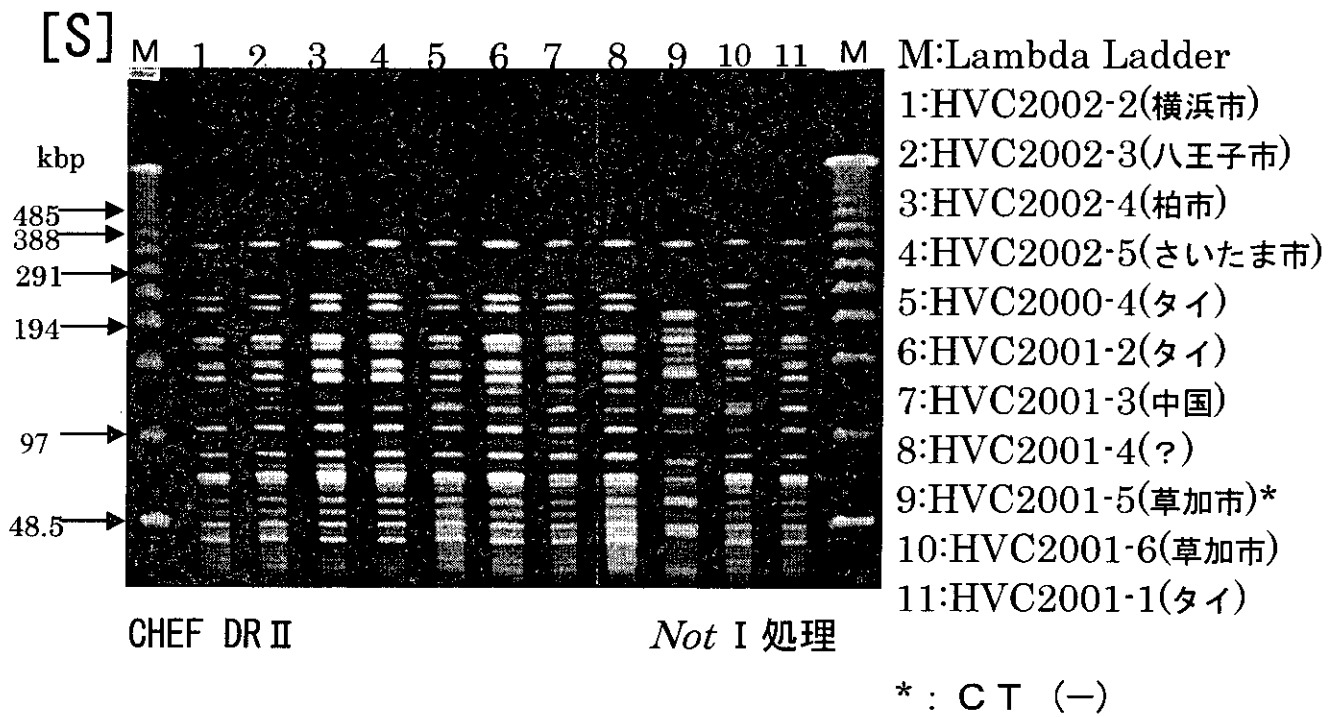


図 4b O157 共通株の解析(100Kb 以上のバンドを対象)





PFGE Program
 4s-8s 9hr
 8s-50s 11hr
 6V/cm

図 5 *V. cholerae* O1 El Tor Inaba のPFGEパターン