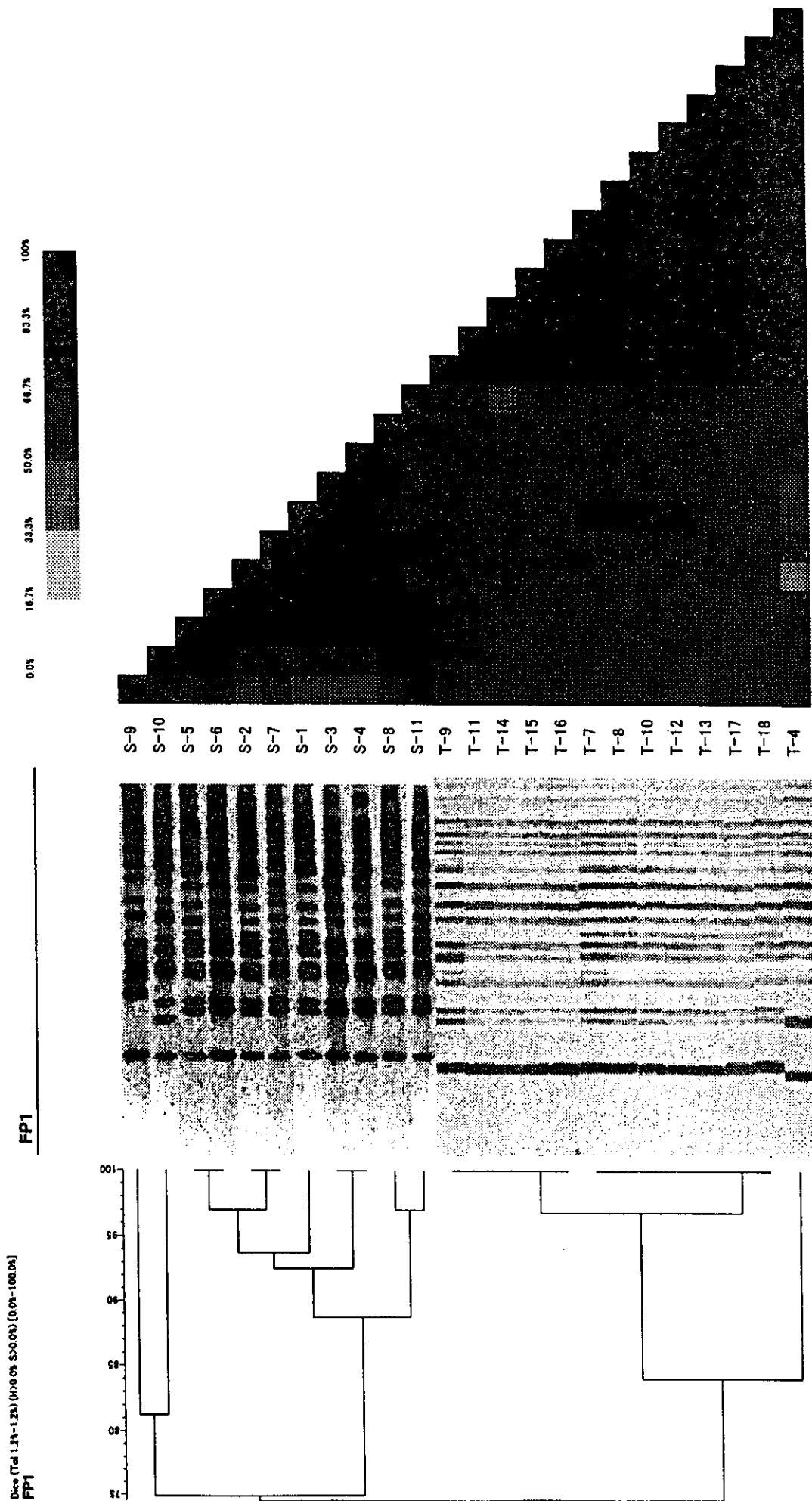


図 6 *V.cholerae* O1 El Tor Inaba の解析



PFGE 解析が有効に活用された事例（H12～14 年度）

1. 東京都立衛生研究所

- 1) G 焼肉・チェーン店が原因と推定された事例（H12 年度）
- 2) K 焼肉店が原因と推定された腸管出血性大腸菌 O157 事例（H12 年度）
- 3) 牛タタキによる広域的散発事例（H13 年度）
- 4) 焼肉店による腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例（H13 年度）
- 5) 和風キムチを原因とする Diffuse outbreak（H13 年度）
- 6) 保育園で発生した O157 事例（H14 年度）
- 7) 焼肉店 O で発生した O157 事例（H14 年度）
- 8) 焼肉店 J で発生した O157 事例（H14 年度）

2. 茨城県衛生研究所

- 1) 腸管出血性大腸菌 O157 感染症患者の発生（H12 年度）
- 2) いくらによる O157 感染（H12 年度）
- 3) A 群レンサ球菌による食中毒事例（H12 年度）
- 4) *Salminella* Oranienburg によるイカ乾製品汚染（H12 年度）
- 5) 入浴施設を原因とした *Legionella* による集団発生（H12 年度）
- 6) 当研究所で経験した食中毒および散発事例について（H13 年度）
- 7) 当研究所で経験した散発事例について（H14 年度）

3. 群馬県衛生研究所

- 1) O157 散発事例由来株の疫学マーカー解析（H12 年度）
- 2) 腸管出血性大腸菌 O157 散発事例（H13 年度）
- 3) 腸管出血性大腸菌 O26 散発事例（H14 年度）
- 4) 腸管出血性大腸菌 O157 散発事例（H14 年度）
- 5) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症散発事例（H14 年度）

4. 栃木県保健環境センター

- 1) 栃木県内の小学校における腸管出血性大腸菌（O157）による集団感染事例（H14 年度）
- 2) 宇都宮病院事件関連県内散発事例 PFGE（H14 年度）

5. 埼玉県衛生研究所

- 1) かぶの浅漬けに関連した老人保健施設における集団発生事例 (H12 年度)
- 2) 家庭保育室における集団感染事例
- 3) ファミリーレストランの「一口ステーキ」に関連した集団発生事例 (H12 年度)
- 4) イカ菓子による Diffuse outbreak 事例 (H12 年度)
- 5) 老人保健施設における集団発生事例 1 (H13 年度)
- 6) 老人保健施設における集団発生事例 2 (H13 年度)
- 7) 「和風キムチ」による腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例 (H13 年度)
- 8) 当研究所で経験した散発事例について (H14 年度)

6. 千葉県衛生研究所

- 1) 千葉県内で発生したボツリヌス食中毒事例について (H12 年度)
- 2) 牛タタキを原因とする O157 : H7 による広域集団感染事例 (H13 年度)
- 3) 埼玉県で分離されたキムチ分離株と同一の泳動パターン (グループ) と考えられた O157 : H7 の解析 (H13 年度)
- 4) 大学における腸管出血性大腸菌 O157 の集団発生事例 (H14 年度)

7. 神奈川県衛生研究所

- 1) レストランチェーン店における腸管出血性大腸菌 O157 感染事例 (H12 年度)
- 2) 毒素原生大腸菌 O169 : NM による食中毒の一事例について (H13 年度)
- 3) T 焼肉チェーン店を原因とする腸管出血性大腸菌 O157 感染事例 (H13 年度)
- 4) O 保健所管内で多発した腸管出血性大腸菌 (O157) 患者について (H14 年度)
- 5) 県内で同時期に発生した腸管出血性大腸菌 (O157) 患者について (H14 年度)

8. 横浜市衛生研究所

- 1) レストランハンバーグを原因とした腸管出血性大腸菌 O157 の食中毒について (H12 年度)
- 2) 焼肉店を原因とした腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例 (H14 年度)
- 3) 仕出し弁当を原因とした腸管出血性大腸菌による食中毒事例 (H13 年度)

9. 山梨県衛生公害研究所

- 1) 老人ホーム給食による食中毒 (H12 年度)
- 2) 生かきが原因食品と推定された赤痢菌による食中毒事例 (H13 年度)
- 3) 毒素原生大腸菌 O159 : HUT による食中毒事例について (H14 年度)
- 4) 厚焼きたまごを原因とした S. Enteritidis の食中毒事例 (H14 年度)

10. 長野県衛生公害研究所

- 1) 病院給食を原因とする *Salmonella Enteritidis* 食中毒 (H12 年度)
- 2) 小規模水道を原因とする長剣出血性大腸菌 O157 集団感染 (H12 年度)
- 3) *Salmonella Enteritidis* 食中毒① (H12 年度)
- 4) *Salmonella Enteritidis* 食中毒② (H12 年度)
- 5) 焼肉 K 店における腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例 (H13 年度)
- 6) 馬さしから検出された腸管出血性大腸菌 O157 : H7 関連事例 (H14 年度)

11. 静岡県環境衛生科学研究所

- 1) *Campylobacter* 食中毒事例 (H12 年度)
- 2) ホテルで発生した黄色ブドウ球菌食中毒事例 (H13 年度)
- 3) 東部地区を中心に発生した赤痢菌感染事例 (H13 年度)
- 4) PFGE を分離株の解析に利用した食中毒事例 : *S. aureus* (H14 年度)
- 5) PFGE を分離株の解析に利用した食中毒事例 : *S. Enteritidis* (H14 年度)
- 6) PFGE を分離株の解析に利用した食中毒事例 : *S. Saintpaul* (H14 年度)

1. 原著

No.	著者	表題	雑誌名	巻号	年
1	金子通治 他	山梨県における腸チフス、パラチフスの発生状況と細菌・疫学的特徴	山梨県衛生公害研究所年報	44	2000
2	杉山寛治 他	生活環境水のレジオネラ汚染及びレジオネラ症患者調査一循環ろ過式浴槽水を感染源とするレジオネラ症集団感染事例と検査一	平成12年度静岡県環境衛生科学研究所報告	43	2000
3	小西典子 他	有機・水耕野菜の食中毒菌汚染実態と分離菌株の疫学的解析	日本食品微生物学会雑誌	18	2001
4	柴田幹良 他	同時期に発生したコアグラールゼIV型黄色ブドウ球菌食中毒2事例について	東京都衛生研究所研究年報	52	2001
5	大沼正行 他	山梨県における細菌性赤痢の分離状況と細菌学的検討	山梨県衛生公害研究所年報	45	2001
6	三輪憲永 他	昼食弁当中の「いり卵」を原因食品とする卵黄反応陰性黄色ブドウ球菌による食中毒	International Journal of Food Microbiology	64.3	2001
7	尾関由姫恵	市販和風キムチに起因する腸管出血性大腸菌O157:H7 Diffuse Outbreak事例	感染症学雑誌	77.7	2003

2. 病原微生物検出情報(国立感染症研究所)

No.	著者	表題	巻号	年
1	上原怜子 他	かぶの浅漬けに関連した老人保健施設における腸管出血性大腸菌O157感染症の集団発生	21.12	2000
2	川森文彦 他	病院給食が原因となったSalmonella Nagoyalによる集団食中毒事例	21.11	2000
3	神奈川県衛生研究所細菌病理部	病院及び併設の介護老人保健施設における腸管出血性大腸菌O157:H7感染症の集団発生	21.10	2000
4	増子京子 他	入浴施設を原因としたLegionellaによる集団発生事例	21.9	2000
5	内村真佐子 他	千葉県における無症状病原体保有者を主とした腸管出血性大腸菌O26による集団発生事例	21.1	2000
6	斎藤章暢 他	「和風キムチ」を原因食品とする腸管出血性大腸菌O157集団感染事例	22.11	2001
7	岸本剛 他	特別養護老人ホームで発生した腸管出血性大腸菌O157感染症集団発生事例	22.10	2001
8	野田裕之 他	北マリアナ諸島旅行後に発症した腸管出血性大腸菌O157集団感染事例	22.7	2001
9	山本準子 他	「牛の丸焼き」を原因食品とする腸管出血性大腸菌O157による集団発生	22.6	2001
10	増田高志 他	小学校で発生した細菌性赤痢集団感染事例	22.4	2001
11	関映子 他	Salmonella Enteritidis フォージ型18による食中毒	22.2	2001
12	神奈川県衛生研究所細菌病理部	レストランチェーン店における腸管出血性大腸菌O157感染事例	22.2	2001
13	内村真佐子 他	同時期に近隣の乳幼児施設で発生した2事例の集団赤痢	23.9	2002
14	依田清江 他	サルモネラ複合感染による集団食中毒事例 ー千葉県4種類の血清型検出例についてー	23.7	2002
15	田崎達明 他	和風キムチによるEHEC食中毒事例	23.6	2002
16	増田高志 他	細菌性赤痢患者多発動向	23.5	2002
17	武藤哲典 他	仕出し弁当を原因とした毒素原生大腸菌による食中毒事例	23.4	2002

3. 口頭発表: 学会

No.	発表者	表題	学会名	年
1	依田清江 他	パラチフスの流行・集団発生事例の分子疫学的解析	第73回日本細菌学会	2000
2	小岩井健司 他	千葉県で発生した劇症型A群レンサ球菌感染症由来株の分子疫学的解析	第49回日本感染症学会 東日本地方会総会	2000
3	金子通治 他	山梨県で分離された集団食中毒・散発下痢症由来のサルモネラ・エンテリティディスの細菌学的特徴	第83回日本細菌学会 関東支部総会	2000
4	増田高志 他	ペロ毒素産生性大腸菌 [O103:H2] による家族内感染事例とその疫学的検討	第36回静岡県公衆衛生学会	2000
5	増田高志 他	ペロ毒素産生性大腸菌 [O103:H3] による家族内感染事例とその疫学的検討	平成12年度日本獣医公衆衛生学会 全国食品衛生監視協議会関東ブロック大会	2000
6	川村朝子 他	静岡県で分離された <i>Salmonella</i> Oranienburg の解析	第36回静岡県公衆衛生研究会	2000
7	杉山寛治 他	海水・海泥からの熱熱性溶血毒産生腸炎ビブリオの検出	第36回静岡県公衆衛生研究会	2000
8	三輪憲永 他	屋敷弁当中の「いり卵」を原因食品とする卵黄反応陰性黄色ブドウ球菌による食中毒	平成12年度日本獣医公衆衛生研究会	2000
9	川村朝子 他	食中毒由来の <i>Salmonella</i> Enteritidis の解析	平成12年度日本獣医公衆衛生研究会	2000
10	門間千枝 他	パルスフィールドゲル電気泳動法によるA型ボツリヌス食中毒の疫学解析	第73回日本細菌学会総会	2000
11	門間千枝 他	A型ボツリヌス食中毒のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析	第21回日本食品微生物学会総会	2000
12	横山敬子 他	カンピロバクター食中毒のパルスフィールドゲル電気泳動法による疫学解析	第21回日本食品微生物学会総会	2000
13	Akemi Kai et al	Emergence of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> as the Foodborne Outbreaks in Japan	International Conference on Emerging Infectious Diseases	2000
14	Hiroimi Obata et al	Epidemic of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 gastroenteritis and isolation of the organisms from foods and environments	36th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel	2000
15	長則夫 他	食中毒より分離されたG ₁ 遺伝子を持つ <i>Staphylococcus aureus</i>	第81回食品衛生学会	2001
16	横山栄二 他	食品からTDH陽性株が分離された腸炎ビブリオ食中毒について	平成12年度日本獣医公衆衛生学会	2001
17	横山栄二 他	イエネズミから分離された <i>Salmonella</i> Typhimurium の性状解析	平成13年度関東地区日本獣医公衆衛生学会	2001

No.	発表者	表題	学会名	年
18	内村眞佐子 他	千葉県東葛飾地域を中心に発生した腸管出血性大腸菌O157:H7による広域集団感染事例	第22会日本食品微生物学会	2001
19	川森文彦 他	腸管出血性大腸菌O26感染症発生状況および分離株の解析	第37回静岡県公衆衛生研究会	2001
20	河村眞保 他	2000年分離赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性	第41回感染性腸炎研究会総会	2001
21	門間千枝 他	α 毒素非産生ウエルシュ菌による集団下痢症について	第74回日本細菌学会総会	2001
22	門間千枝 他	レシチナーゼ非産生ウエルシュ菌による集団下痢症	第22会日本食品微生物学会学術総会	2001
23	横山敬子 他	Guillain-barre症候群患者が確認された <i>Campylobacter jejuni</i> 集団食中毒事例	第75回日本感染症学会総会	2001
24	小西典子 他	東京都内で発生した <i>Salmonella</i> 血清型Virchow集団下痢症の疫学的・細菌学的検討	第75回日本感染症学会総会	2001
25	長則夫 他	Food Poisoning due to <i>Staphylococcal</i> Enterotoxins G and I	第10回国際ブドウ球菌学会	2002
26	首藤敦子 他	栃木県において分離された <i>Salmonella</i> Saintpaul の遺伝子学的解析	第40回栃木県公衆衛生学会	2002
27	尾関由姫恵 他	埼玉県内の腸管出血性大腸菌検出状況 (2001)	第76回日本感染症学会総会	2002
28	野田裕之 他	散发下痢症患者由来 <i>Salmonella</i> serovar Enteritidis の分離頻度と諸性状	第76回日本感染症学会総会	2002
29	大沼正行 他	山梨県における腸管出血性大腸菌の分離状況を分離株の細菌学的特等	第6回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム	2002
30	大沼正行 他	山梨県における <i>Salmonella</i> Oranienburg の分離状況と分離株の性状	第23回日本食品微生物学会	2002
31	村松芳貴 他	鶏卵を原因と推定したサルモネラ食中毒について	第38回静岡県公衆衛生研究会	2002
32	Akemi Kai et al	Trend in Foodborne Diseases in Japan	The Ninth International Symposium on Toxic Micro-organisms, Tokyo	2002
33	有田世乃 他	静岡県における細菌性赤痢の現状	第39回静岡県公衆衛生研究会	2003
34	三輪憲永 他	市販魚介類における腸炎ビブリオおよび耐熱性溶血毒素産生菌の汚染状況	第39回静岡県公衆衛生研究会	2003
35	森田亜妃子 他	鶏卵取り扱い施設および養鶏場におけるサルモネラ清浄化対策の検討	第39回静岡県公衆衛生研究会	2003

No.	発表者	表題	学会名	年
36	久川千恵子 他	鶏卵を使用したデザートが原因と推定されたサルモネラ食中毒事件について	第39回静岡県公衆衛生研究会	2003
37	長岡宏美 他	<i>Salmonella Saintpaul</i> による食中毒事例の疫学的検討	第39回静岡県公衆衛生研究会	2003
38	甲斐明美 他	<i>Providencia alcalifaciens</i> によると推定された集団下痢症事例について	第77回日本感染症学会総会	2003
39	河村真保 他	わが国において分離された赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性(2001年)	第77回日本感染症学会総会	2003

4. 口頭発表表：地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会

No.	発表者	表 題	年
1	杉山寛治 他	海水・海泥からの耐熱性溶血毒素産生腸炎ビブリオの検出	平成11年
2	川村朝子 他	VTEC(O103:H2)による家族内感染例	平成11年
3	浅川洋美 他	同一施設利用者のO40群S.Johannesburg食中毒とEHEC O157の検出事例	平成11年
4	岸田一則 他	千葉県下で発生した結核の集団発生を疑わせる事例より分離された結核菌のRFLP分析について	平成11年
5	増子京子 他	茨城県におけるS.Oranienburg分離株の正常について	平成11年
6	松本裕子 他	横浜市で分離されたSalmonella汚染イカ菓子による食中毒由来株と散发下痢症河川水由来株の比較	平成11年
7	野田裕之 他	「いか菓子製品」のS.Oranienburg, S.chesterの汚染菌量の検討	平成11年
8	石川哲也 他	群馬県内の宿泊施設で発生したSalmonella Enteritidisの集団発生	平成11年
9	岡本その子 他	液卵から分離されたサルモネラの疫学的解析について	平成11年
10	沼田和也 他	横須賀市における腸炎ビブリオの食中毒事例について	平成12年
11	増子京子 他	茨城県における入浴施設を原因としたLegionellaによる集団発生病例	平成12年
12	小岩井健司 他	千葉県で発生した劇症型A群レンサ球菌感染症について	平成12年
13	首藤敦子 他	食中毒より分離されたG,I毒素遺伝子を持つStaphylococcus aureus	平成12年
14	横山敬子 他	都内におけるカンピロバクター食中毒発生状況とGuilan-Barre症候群患者が確認された一事例について	平成12年
15	鈴木正弘 他	輸入生ハムより検出されたListeria monocytogenes	平成12年
16	川森文彦 他	病院給食が原因となったSalmonella Nagoyalによる集団食中毒の細菌学的検討	平成12年

No.	発表者	表 題	年
17	野田裕之 他	過去5年間(1995-1999)のサルモネラによる散発下痢症の発生状況とその血清型	平成12年
18	倉園貴至 他	埼玉県内の腸管出血性大腸菌検出状況(2000)	平成12年
19	田崎達明 他	都内における散発型集団発生事例について	平成13年
20	畠山薫 他	O157分離株の疫学マーカーによる解析と散発型集団発生事例の検査成績	平成13年
21	斉藤章暢 他	埼玉県における集団発生事例について	平成13年
22	関映子 他	リスデリアの分子生物学的型別方法を用いた疫学解析	平成13年
23	野田裕之 他	山梨県の <i>Salmonella</i> Enteritidis による散発下痢症の発生状況と分離株の諸性状	平成13年
24	大沼正行 他	山梨県において過去15年間(1985-1999)に分離された <i>Salmonella</i> Oranienburg の検出状況と諸性状	平成13年
25	粕尾しず子 他	長野市におけるO26集団感染事例について	平成14年
26	中田友里 他	病院および老人保健施設で発生したO157による集団下痢症事例	平成14年
27	甲斐明美 他	<i>Providencia alcalifaciens</i> によると推定された集団下痢症事例	平成14年
28	杉山寛治 他	レジオネラ感染症について	平成14年
29	武藤哲典 他	焼肉店を原因とした腸管出血性大腸菌O157食中毒事例	平成14年
30	黒澤肇 他	群馬県で分離されたサルモネラの疫学的検討	平成14年
31	関映子 他	飲料水が原因と推測された毒素原生大腸菌による食中毒事例	平成14年
32	嶋田直美 他	埼玉県における患者由来レジオネラ属菌のPFGE解析について	平成14年

分担研究・腸管出血性大腸菌 O26 のパルスネットへの応用のための基礎的研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所

分担研究者 田中大祐 富山県衛生研究所

研究要旨

Diffuse outbreak（散在的集団発生）を早期に検出するパルスネットが O157 のみならず O26 にも応用可能か否かを検討するために以下の研究を行なった。

東海・北陸地方で平成 8 年から 12 年に検出された 196 株の O26 を用いた PFGE 解析結果から、O157 の PFGE 泳動条件は、十分な解析力を有して O26 を型別分類することが可能であり、O26 の PFGE 泳動条件としても応用可能であることが明らかとなった。

解析ソフトを用いた結果から、105 株（196 株の代表株）の O26 は 71 の異なった PFGE 型に型別分類された。このうちの 52 の型（73.2%）は 1 PFGE 型 1 株のみであった。一方、1 PFGE 型に 2 つから 6 つの O26 が認められた型は 19（26.8%）であった。これらの結果から、O26 は遺伝子レベルで多様性を有しており、PFGE は O26 の分子疫学的解析の有用な手段であることが示唆された。また、複数の O26 が認められた 19 の PFGE 型のうち 3 つは同一年に複数県の散発もしくは集団事例から検出されていたことから diffuse outbreak の可能性も示唆された。

パルスネットの予備試験として愛知県で検出された 4 株の O26（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解析ソフトを用いて解析を行なった。その結果、同一検体についてその相同性を地研ごとに比較したところ、その相同性は最も高い検体で 78%、最も低い検体では僅か 16%であり、現行では異なった地研が行なった PFGE 画像を比較することを基本とするパルスネットの実施が容易でないことが示された。そこで PFGE 画質に影響を与える要因について検討をおこなったところ、PFGE 機種 of 統一、ブロック作成の際の適切な菌液濃度（1 ブロック当たり約 5.0×10^7 ）、及び約 0.7 mm のブロックのゲルへの挿入によって PFGE 画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、O26 は O157 と同様遺伝子レベルで多様性を有しており、適切な PFGE 実施条件の統一を行なえば、O157 と同一の PFGE 実施条件を用いてパルスネットに応用可能であると思われる。よって本システムは O26 によ

る diffuse outbreak に対しても早期の発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

研究協力者 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

A. 研究目的

我が国の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症患者は平成 8 年に O157 による大阪府堺市で発生した大規模集団事例以後年間約 4 000 人の患者発生が認められ我が国の主要な細菌性腸管感染症となった。我が国の EHEC 感染症を起こす血清型は O157 が大半を占めていたが、その割合は年々漸減しており最近では約 7 割となった。一方、O157 以外で最も検出率が高い血清型は O26 であり、全体の約 2 割を占め、散発事例のみならず保育園等での集団事例も散見されるようになった。これらのことから、今後は O157 のみならず O26 についても充分注意を払いその動向を監視する必要があるものと思われる。

我々は、O157 の diffuse outbreak (散在的集団発生) を早期に検出するパルスネットを構築するための研究班活動のひとつとして、本システムが O157 のみならず O26 にも応用可能か否かを検討するために以下の研究を行なった。はじめに、我が国で O157 のパルスフィールドゲル電気泳動

(PFGE) 解析に用いられている PFGE 実施条件が O26 に応用可能か否かを検討した。次に、O26 の PFGE 画像について解析ソフトを用いて解析を行ない、O26 が PFGE による分子疫学的解析に応用できるほど充分の遺伝子レベルでの多様性を有しているか否かを検討した。最後に、パルスネット実施の予備試験として、4 株の O26 を東海・北陸地方の 4 地研に配布し各地研において PFGE を実施し、その画像を愛知県衛生研究所 (愛知衛研) に電送した。当所で解析ソフトを用いて PFGE 画像の解析を行ない、異なった地研が行なった PFGE 画像の比較を可能にするための検討を行なった。

B. 研究方法

菌株：東海・北陸地方の 8 地研で平成 8 年から 12 年にかけて検出された散発及び集団発生の 136 事例に由来する 196 株の O26 を O157 の PFGE 実施条件が O26 に応用可能か否かの検討に用いた。解析ソフトを用いた解析には分離県、分離年及び由来 (散発、集団) を考慮して選んだ散発、及び集団食中毒 98 事例に由来する 105 株を用いた。パルスネット予備試験に用いた 4 株の O26 は愛知県で平成 8 年度から 12 年度の間に検出された PFGE 型の異なった 4 株 (うち 2 株は同一株) を用いた。

PFGE：菌液調製、溶菌、制限酵素処理、電気泳動等の PFGE 実施条件は、国立感染症研究所の方法に従って行なった。その方法を簡単に述べると、寒天平板培地で一夜培養した O26 の 1 コロニーを滅菌精製水 200 μ l に懸濁し、その菌液を等量の 2% 軟寒天と混和した。その 100 μ l をインサートプラグ内に注入し氷中で 30 分放置した。固化したゲルをリゾチーム溶液（組成：0.5M EDTA pH8.0+lysozyme(1mg/ml)、1 ml/サンプル）で 37 $^{\circ}$ C、一夜処理し、さらにプロテナーゼ K 溶液（組成：0.5M EDTA pH8.0 + proteinase K(1mg/ml)、1 ml/サンプル）で 50 $^{\circ}$ C、一夜処理した。その後、制限酵素 *Xba* I で 37 $^{\circ}$ C、一夜処理を行ない（30U/サンプル）、CHEF DR-III（バイオラド社）または Gene Navigator（ファルマシア社）によって電気泳動を行なった。

泳動条件は、Gene Navigator の場合は電圧 200V、泳動時間 22 時間 1 分、パルスタイム 4 秒から 8 秒 6 時間、8 秒から 4 秒 1 分、4 秒から 8 秒 6 時間、8 秒から 50 秒 10 時間であり、CHEF DR-III（バイオラド社）の場合は 6 V/cm、パルスタイム 4 秒から 8 秒 9 時間、8 秒から 50 秒 13 時間である。目視による型別分類は、お互いのバンドの相違が 3 本までは同じ PFGE 型とし、4 本以上異なる場合は異なった PFGE 型とした。また解析ソフト「ゲルコンパ II」による解析では相同性 85%以上を同じ PFGE 型の

グループと見なした。なおこれら泳動条件の検討及び「ゲルコンパ II」を用いた解析は富山県衛生研究所（富山衛研）及び愛知衛研にて実施した。

パルスネット予備試験：実際に O26 に関するパルスネット構築が可能であるか否かを検討するため、富山衛研、愛知衛研に加え、岐阜県保健環研究所、石川県保健環境センターに PFGE 型の異なる 4 株を送付し、これら 4 地研において PFGE を実施した。なお PFGE 泳動条件は 4 地研とも感染研 O157 の条件を用いた。3 地研にて得られた PFGE 画像は jpeg ファイル形式でメールにて電送され、その解析を愛知衛研にて行なった。目視による解析は PFGE 型の異同の判別、及び検体間のバンド本数の違いを判別し、解析ソフト「ゲルコンパ II」の日本語版である「フィンガープリント II」を用いた解析は、各地研毎に検体間の相同性を調べ各地研間で比較した。また、検体ごとに系統樹を作成し、同じ検体が地研によってどの程度相同性に違いがあるかを検討した。

PFGE 機種、ブロックの菌液濃度、及びブロックの厚さが PFGE 画質に及ぼす影響の検討：愛知衛研において PFGE 機種による違いが PFGE 画像に及ぼす影響を調べるために 4 検体について Gene Navigator 及び DR III を用いて PFGE を実施した。また、ブロック作成の際の菌液濃度及びゲルへの挿入の際のブロックの厚さが及ぼす影響を調べるために 2 種類の異なった菌液濃度のブロック（約 5.0 \times

10⁷ CFU、約 1×10⁸ CFU) 及び異なった厚さのブロック (約 0.7 mm と約 2.0 mm) をゲルに挿入して PFGE を行なった。そして得られた画像について目視にてバンドのシャープさについて比較検討を行なった。

C. 研究結果

[I] O157 の PFGE 実施条件の O26 への応用の可能性の検討

O157 と同一の泳動条件によって O26 の PFGE を行なった結果、その泳動図は O157 の場合と同様、48.5 kb から 533.5 kb の領域に約 20 本の鮮明なバンドが認められ、目視による型別分類に応用できるバンドの本数とバンドの分離が認められた。表 1 には東海・北陸地方の 8 地研で検出された O26 を各地研ごとに型別分類を行なった結果を示した。各地研で検出された 5 株から 45 株の O26 は 3 から 18 の異なった PFGE 型に分類することが可能であった。地研別では、福井県で分離された 11 株が 9 の PFGE 型に分類され、菌株に対して最も多くの PFGE 型に型別分類された。これに対し富山県での分離株は、45 株が 14 の PFGE 型に分類されたのみで最も少ない型別分類結果であった。また集団事例 (32 事例) からの分離株はそれぞれの事例での複数の分離株全てが同一の PFGE 型に分類されていた。

[II] 解析ソフト「ゲルコンパ II」を用いた O26 の遺伝子レベルでの多様性の有無の検討

105 株の O26 について「ゲルコンパ II」を用いて解析を行なった結果、105 株の O26 は 71 の異なった PFGE 型 (1 型から 71 型) に型別分類され、遺伝子レベルでの多様性が示唆された。71 の PFGE 型のうち、52 (73.2%) は 1 PFGE 型 1 株であった。表 2 には各地研で検出された 1 PFGE 型 1 株の PFGE 型数を示した。東海・北陸地方の半数以上の 5 地研では全 PFGE 型に対する 1 PFGE 型 1 株の検出される割合が 57.1% から 58.8% であり、約 6 割が 1 PFGE 型 1 株の PFGE 型で占められていた。

一方、71 の PFGE 型のうち、19 の型 (26.8%) は 1 PFGE 型に複数 (2 株から 6 株) の O26 が含まれていた。表 3 には複数の O26 が認められた PFGE 型とその検出された地研を示した。これら 19 の型のうち、12 の型 (63.2%) では 1 PFGE 型 2 株、3 つの型 (15.8%) では 1 PFGE 型 3 株、2 つの型 (10.5%) では 1 PFGE 型 5 株、そして 1 つの型 (5.3%) ではそれぞれ 1 PFGE 型 4 株及び 6 株であった。また、O26 による diffuse outbreak 発生の有無を検討するために複数の菌株が認められた PFGE 型についてその分離県と分離年を調べた。その結果、19 のうち 11 の型 (57.9%) が東海地方の地研でのみ検出されていた。一方、北陸地方の地研でのみ検出された型も 2 つ (10.5%) あった。また、検出された地研が東海、北陸の両者にまたがっていた PFGE 型が 6 つ認められた (31.6%)。その内訳は 7 型 (愛

知、富山)、11型(三重、福井)、29型(愛知、福井)、23型(愛知、福井、富山)、28型(三重、愛知、富山)、及び26型(名古屋市、愛知、富山)であった。

これら複数の型が認められた19のPFGE型のうち、5つの型(26.3%)では同一年に複数の菌株が検出されていた。そのPFGE型と検出された年、地研、及び由来は、PFGE4型(平成9年、三重集団事例と愛知散発事例)、PFGE30型(平成10年、富山集団事例)、PFGE36型(平成10年、岐阜散発事例と三重集団事例)、PFGE65型(岐阜市散発事例)、PFGE28型(平成10年、三重散発事例と愛知散発事例と富山集団事例)であった。しかし、他の14のPFGE型(73.7%)では検出された年は各地研で異なっていた。このうち、8のPFGE型は連続した年にまたがって各地研から検出されていたが(例えば平成9年と10年)、他の6の型は2年、4年、及び5年の間隔の後に、同一PFGE型が同じ、若しくは異なった地研から検出されていた。

[III] O26 を用いたパルスネット予備試験

1. 各地研内での検体の相同性の比較

東海・北陸地方の4地研の検体について各地研ごとに相同性を求めた結果を表4に示した。ゲルのレーン番号は異なるが同一検体である検体1と3では何れの地研も非常に高い相同性が得られた。特に地研AとDでは

その相同性は100%であり、地研B、Cもそれぞれ86と94%であった。一方、検体1と2では地研AとBはほぼ同じ相同性(71%、69%)であったが、地研C、Dではそれぞれその値よりやや低い64%と逆に高い78%であった。検体1と4では地研C、Dはほぼ同じ値(57%、58%)で、地研A、Bではその値より10%以上低い41%と46%であった。検体1と2及び検体1と4の相同性は検体1と3に比べらつきが地研間で大きかったが、その系統樹は各地研で類似した形となった(系統樹は省略)。

2. 各検体の地研間での相同性の比較

図1には異なる地研の同一検体について相同性を系統樹で比較した結果を示した。検体1と3の場合には同一地研内で86%から100%の非常に高い相同性が得られた。一方、3検体(検体1と3、検体2、及び検体4)それぞれについて4地研で比較を行なったところ、地研B、Dで最も高い相同性が得られ、これら検体の相同性は検体1と3が76%、検体2が68%、検体4が64%であった。最も低い相同性が認められたのは地研AとBDの場合で、それぞれの検体の相同性は24%、16%、及び22%であった。

3. 東海・北陸地方の4地研が用いている溶菌過程、制限酵素処理、及びPFGE機種種の比較

同一検体であるにもかかわらず4地研間でその検体の相同性に大きな

違いが認められたことから4地研の溶菌過程、制限酵素処理、及び PFGE 機種種の比較を行なった(表5)。最も大きな相違点はLysozyme処理の項目で、3地研(A、B、C)はほぼ同じ実施条件を用いていたが、地研DはLysozyme処理を行なっておらず、Proteinase K処理の項目でもProteinase Kの濃度が他の3地研と比較すると半分の0.5 mg/ml、溶液のpHも9.5と他の地研(pH=8.0-8.5)に比べやや高かった。他に相違点が認められたのは制限酵素前処理の項目では地研A、CはPefablocを用い、地研B、DではPMSFを用いていた。また、その洗浄過程においても各地研で洗浄時間、回数に多少の相違が認められた。しかし各地研が行なったPFGEの画像から判断すると、何れの検体も充分量の染色体が抽出され、制限酵素処理も充分であることが推察された。またPFGE機種種に関して地研Cはファルマシア社のGene Navigatorを用いていたが、他の3地研はバイオラド社のDR-IIIであった。

4. PFGE 機種種、及びブロック作成時の菌液濃度とゲルへ挿入するブロックが厚さのPFGE画像に及ぼす影響

Gene NavigatorによるPFGEでは泳動が直線にならず蛇行する傾向にあることから、愛知衛研においてPFGE機種種の違いが検体間の相同性に及ぼす影響を検討した。表6にGene NavigatorとDR IIIで行なった

各検体間の相同性を示した。検体1と3ではDR IIIを用いた場合、その相同性がGene Navigatorの場合の94%から100%と改善され、検体1と2でもDR IIIではその相同性がGene Navigatorの場合の64%から84%へと20%増した。しかし検体1と4ではその相同性に大きな差は認められなかった。さらにDR IIIの結果を地研Cの結果として他の地研と系統樹を作成して検体間の相同性の比較を行なった(図2)。検体1と3の場合には、地研CとAの検体の相同性が37%から52%に改善されたものの、地研Cと地研B、Dの相同性は24%と改善は認められなかった。検体2では地研CとAの相同性が16%から18%に僅かに改善されたが、地研Cと地研B、Dの相同性は64%から40%へと逆に減少した。検体4では地研CとAの相同性が32%から44%に改善されたが、地研Cと地研B、Dの相同性は22%と変化は認められなかった。

4地研の溶菌過程及び制限酵素処理の比較結果から大きくPFGE画質に影響を与えるような相違が認められなかったことから、そ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挿入ブロックの厚さについて検討を加えた。すなわち、2種類の菌液濃度(約 5.0×10^7 CFU、約 1×10^8 CFU)で作成したブロック及び厚さ約0.7と約2.0 mmの2種類の異なる厚さのブロックをゲルに挿入してPFGEを行ない、得られたバンドを比較した(図3)。その結果、約5.0

×10⁷ CFU の菌液濃度のブロックを約 0.7 mm の厚さで挿入した場合、目視によって最もシャープなバンドが得られた。また約 10×10⁷ CFU の菌液濃度のブロックを約 0.7 mm の厚さで挿入した場合にはバンドがやや太くなる傾向が見られたがバンド本数の確認は可能であった。これに対して約 2.0 mm の厚さの場合には何れの菌液濃度のブロックを用いても複数のバンドが重なりあって目視でのバンド数の確認が困難であった。

D. 考察

制限酵素、パルスタイム等の全ての PFGE 泳動条件を O157 の条件を用いて行なった O26 の PFGE 解析で、O26 の画像は O157 と同様に低分子量領域から高分子量領域にかけて複数の鮮明なバンドの分離が得られた。また各地研で検出された O26 は、目視による解析から最も少ないものでも 45 株が 14 の PFGE 型、最も多いもので 11 株が 9 の PFGE 型に分類され、今回用いた PFGE の条件により、十分な解析力が得られるものと思われた。また疫学調査の結果から、集団発生と考えられた事例から分類された菌株の全てが事例ごとに単一の PFGE 型に型別分類された。以上の結果から、O157 の PFGE 泳動条件は O26 の PFGE にも応用可能であることが明らかとなった。さらに O26 集団事例等の疫学解析にも今回用いた PFGE 条件は応用可能であることが示唆された。

さらに 105 株の O26 の PFGE 画像

について解析ソフトを用いて解析を行ない、O26 の遺伝子レベルでの多様性の有無について検討した。その結果、105 株の O26 は 71 の異なった PFGE 型に型別分類された。このうち 7 割以上の 52 の型は 1 PFGE 型 1 株であり、各地研ごとに見ても 8 地研のうち 6 地研で約 6 割、若しくはそれ以上が 1 PFGE 型 1 株の PFGE 型で占められていた。これに対して、複数の O26 が認められた PFGE 型は全体の 3 割以下と少数であった。これらのことから、O26 は分子レベルで多様性を有することが示唆され、PFGE を用いた解析が集団発生時の感染源、感染経路等の疫学解析に非常に有用な手段であることが示唆された。さらに、3 つの PFGE 型はほぼ同時期に異なった複数の県の散発事例または集団事例から検出されていたことから、この型の O26 による diffuse outbreak が発生していた可能性も示唆された。

パルスネット稼働の予備試験として 4 地研で行なった同じ検体の PFGE 画像を比較したところ、最も高い値が得られた検体 1 と 3 で 78%、最も低い値は検体 2 の僅か 16% であり、パルスネットの基本である異なった地研が実施した PFGE 画像の比較が現行ではその実施が容易でないことが示された。各地研間で同一検体にもかかわらず高い相同性が得られなかった原因を検討したところ、地研 D が溶菌過程のひとつである Lysozyme 処理を行なっていなかったものの 4 地研間で PFGE 画質に直接関係して

いるような明らかな問題点は認められず、これらの過程が直接 PFGE 画質に影響を及ぼしている可能性は低いと推察された。そこで、PFGE 機種、前述した処理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挿入ブロックの厚さについて検討を加えた。その結果、PFGE 機種を統一することによって各地研で解析した同一検体の相同性がある程度向上すること。また、適切な菌液濃度（1ブロック当たり約 5.0×10^7 ）のブロックを約 0.7 mm の厚さでゲルへ挿入することによってよりシャープな判別しやすいバンドが得られることが明らかとなった。これらの結果から、パルスネット実施には同一 PFGE 機種、適切な菌液濃度でのブロックの作成、及び薄め（約 0.7 mm）のブロックのゲルへの挿入等の PFGE 実施条件の統一が不可欠であることが明らかとなった。

我々の O26 の PFGE に関する研究結果から O26 は O157 と同様遺伝子レベルで多様性を有しており、適切な PFGE 実施条件の統一によって O26 は O157 と同一の実施条件を用いてパルスネットに応用可能であると思われる。よって本システムは O26 による diffuse outbreak に対しても早期の発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

E. 結論

東海・北陸地方で平成 8 年から 12 年に検出された O26 を用いた PFGE

解析から、O157 の PFGE 泳動条件は、十分な解析力を有して O26 を型別分類することが可能であり、O26 の PFGE 泳動条件としても応用可能であることが明らかとなった。また解析ソフトを用いた結果から、105 株の O26 は 71 の異なった PFGE 型に分類された。このうちの 52 の型（73.2%）は 1 PFGE 型 1 株のみであった。一方、1 PFGE 型に 2 つから 6 つの O26 が認められた型は 19（26.8%）であった。これらの結果から、O26 は遺伝子レベルで多様性を有していることが明らかとなった。よって、PFGE は O157 と同様の解析力で O26 の遺伝子解析が可能であり、O26 による集団事例の際には感染源および感染経路の究明といった疫学解析の有用な手段となることが明らかとなった。また、複数の O26 が認められた 19 の PFGE 型のうち 3 つは同一年に複数の県から検出されていたことから、これら PFGE 型の O26 による diffuse outbreak の可能性も示唆された。

パルスネットの予備試験として愛知県で検出された 4 株の O26（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解析ソフトを用いて解析を行なった。その結果、同一検体の相同性を各地研で比較したところ、最も高い検体で 78%、最も低い検体では僅か 16%であり、現行では異なった地研が行なった PFGE 画像を比較する

ことを基本とするパルスネットの実施が容易でないことが示された。そこで PFGE 画質に影響を与える要因について検討をおこなったところ、PFGE 機種の統一、ブロック作成の際の適切な菌液濃度（1ブロック当たり約 5.0×10^7 CFU）、及び薄めのブロック（約 0.7 mm）のゲルへ挿入によって PFGE 画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、O26 は O157 と同様遺伝子レベルで多様性を有しており、適切な PFGE 実施条件の統一によって O157 と同一の条件を用いて O26 はパルスネットに応用可能であると思われる。よって本システムは O26 による diffuse outbreak に対しても早期の発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表

Tanaka *et al* : Molecular epidemiology of group A streptococci T serotype 1. *Jpn J Infect Dis* 55 : 89-90, 2002.

Matsumoto *et al* : Epidemiological investigation of a fatal case of cholera in Japan by phenotypic techniques and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 51 : 264-268, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし