

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化
に関する研究 (課題番号: H15-新興-1)

平成 15 年度総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業)

主任研究者 渡 辺 治 雄

国立感染症研究所 細菌第一部

目 次

1. 平成 15 年度総括研究報告書

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究	1
主任研究者 渡辺治雄	国立感染症研究所

2. 平成 15 年度分担研究報告書

(I)

a) 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究	10
分担研究者 寺嶋 淳	国立感染症研究所
協力研究者 泉谷秀昌	"
伊豫田淳	"
三戸部治郎	"
b) 志賀毒素産生性大腸菌の新規血清型 O177 : H-による感染事例	22
協力研究者 伊豫田淳	国立感染症研究所
田村和満	"
寺嶋 淳	"
勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
小林一寛	"

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

a) 北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) の施設間差	28
分担研究者 長野秀樹	北海道立衛生研究所
協力研究者 武士甲一、若森末広	"
広地 敬	札幌市衛生研究所
大野譲治	青森県環境保健センター
八柳潤、齋藤志保子	秋田県衛生科学研究所
藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
畠山敬、山口友美	宮城県保健環境センター
牛水真紀子	仙台市衛生研究所
大谷勝実	山形県衛生研究所
須釜久美子	福島県衛生研究所
佐々木寿子	新潟県保健環境科学研究所
b) 牛乳房炎由来ブドウ球菌の PFGE 解析	44
協力研究者 武士甲一	北海道立衛生研究所
木村浩一	"
若森吉広	"
駒込理佳	"
分担研究者 長野秀樹	"

c) 飼育牛が感染源と考えられた腸管出血性大腸菌散発感染事例の解析、および牛と 散発患者由来 EHEC O157:H7 の PFGE パターン.....	46
協力研究者 八柳 潤 秋田県衛生科学研究所	
齋藤志保子 "	
斎藤淳子 "	
d) 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究.....	51
協力研究者 畠山 敬 宮城県保健環境センター	
e) 山形県におけるサルモネラ患者発生状況と分離菌の遺伝子解析.....	53
協力研究者 池田辰也 山形県衛生研究所	
最上久美子 "	
大谷勝実 "	
村山尚子 "	
f) <i>Salmonella</i> Enteritidis の食中毒事例.....	56
福島県衛生研究所	
g) 食中毒事例から分離された <i>Salmonella</i> Enteritidis と、当該散発患者の頸部膿瘍穿刺 液から半年後に分離された <i>S. Enteritidis</i> との関連調査事例.....	57
福島県衛生研究所	

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究.....	58
分担研究者 甲斐明美 東京都健康安全研究センター	
研究協力者 高木 英 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	
依田清江 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	
笠原ひとみ 長野県衛生公害研究所	
川森 文彦 静岡県環境衛生科学研究所	

(Ⅳ) 東海・北陸ブロック

a) 東海・北陸地方 8 地方衛生研究所による腸管出血性大腸菌雄 0157 を用いたパルスネット 構築のための精度管理.....	80
分担研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所	
研究協力者 倉本早苗 石川県保健環境センター	
板垣道代 岐阜県保健環境研究所	
深尾敏夫 岐阜市衛生試験所	
田中大祐 富山県衛生研究所	

研究協力者 酒井高子 豊田市衛生試験所
 石畝 史 福井県衛生研究所
 岩出義人 三重県科学技術振興センター

b) 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium のパルスフィールドゲル電気泳動画像データベース構築
 とそのデータベースを用いた分子疫学的解析…………… 88

分担研究者 松本昌門 愛知県衛生研究所
 研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所

(V) 近畿ブロック

a) 近畿ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 型別法の施設間変動に
 ついて —感染研新プロトコールの試用—…………… 95

分担研究者 勢戸和子 大阪府立公衆衛生研究所
 協力研究者 石川和彦 滋賀県立衛生環境センター
 藤原恵子 京都府保健環境研究所
 竹上修平 京都市衛生公害研究所
 小笠原準 大阪市立環境科学研究所
 横田正春 堺市衛生研究所
 西海弘城 兵庫県立健康環境科学研究所
 黒川 学 神戸市環境保健研究所
 川西伸也 姫路市環境衛生研究所
 中山章文 奈良県保健環境研究センター
 金澤祐子 和歌山市衛生研究所
 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所
 小林一寛 大阪府立公衆衛生研究所

b) 市販のスモークサーモンから分離された *Listeria monocytogenes* のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析…………… 105

協力研究者 中村寛海 大阪市立環境科学研究所
 小笠原準 “
 長谷 篤 “

c) 卵サラダを原因とした *S. Enteritidis* による集団食中毒事例…………… 111

協力研究者 西海弘城 兵庫県立健康環境科学研究所
 辻 英高 “
 押部智宏 “
 池野まり子 “

d) 2003年8月に大阪府で発生した腸管出血性大腸菌 O157 事例のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析..... 115

協力研究者 田口真澄 大阪府立公衆衛生研究所
 小林一寛 //

分担研究者 勢戸和子 //

(VI) 中国・四国ブロック

a) 食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究..... 119

分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所
 研究協力者 安岡富久 谷脇 妙 高知県衛生研究所
 谷 好史 徳島県保健環境センター
 吉田紀美 愛媛県立衛生環境研究所
 中嶋 洋 岡山県環境保健センター
 角森よしえ 島根県保健環境科学研究所
 富田正章 山口県環境保健研究センター
 榊美代子 妹尾正登 広島県保健環境センター
 河本秀一 橋渡佳子 広島市衛生研究所

b) *Salmonella* Enteritidis での制限酵素別 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 像の違いとファージタイプとの関連性について..... 137

研究協力者 谷脇妙 安岡富久 高知県衛生研究所

c) 同一遺伝子型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来菌株の疫学マーカーによる相同性の検討..... 144

共同研究者 河本秀一, 橋渡佳子 広島市衛生研究所
 榊美代子, 妹尾正登 広島県保健環境センター

(VII) 九州ブロック

a) 九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み

— 研修と精度管理 —..... 154

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
 藤田 景清 北九州市環境科学研究所
 隈元 星子 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
 荒平 雄二 熊本県保健環境科学研究所
 丸住美都里 熊本市環境総合研究所
 緒方喜代子 大分県衛生環境研究センター

中山浩一郎	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

b) 症状からみた食中毒原因物質の特徴..... 164

研究協力者	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	藤田景清	北九州市環境科学研究所
	隈元星子	佐賀県衛生薬業センター
	丸住美都里	熊本市環境総合研究所
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター

c) 九州地区で報告された劇症型溶血レンサ球菌感染症からの分離菌株の細菌学的特徴... 170

緒方喜久代, 内山静夫	大分県衛生環境研究センター
池辺忠義, 渡辺治雄	国立感染症研究所

d) レジオネラ属菌における遺伝子解析の検討..... 173

研究協力者	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	東 美香	〃
	中山浩一郎	鹿児島県環境保健センター
	丸住美都理	熊本市環境総合研究所

平成15年度総括研究報告書

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部長

1) PFGE のネットワーク化及びデータベース化にとって最も重要な点は、技術の均一化、およびその精度管理である。全国に75ある地方衛生研究所(地研)の技術的レベルが必ずしも一定レベルでないので、6つに分けたブロックごとに各種の菌についてPFGE解析を行い、その有効性の検討および精度の向上を図ること、さらに新しく作成したソフトをつかって処理されたPFGE画像を解析し系統樹解析を行うことに重点を置いて研究を行った。また、現在、汎太平洋地域15ヶ国を「細菌のDNA解析ネットワーク(現在のところは、現在使われている技術の中では信頼性が高いパルスフィールド電気泳動解析をその対象にしている)」で結ぶパルスネット・アジア構想が開始された。相互間のデータの比較を可能にさせるため、共通のプロトコール及びマーカーとなる標準株を使用する事が各国間で合意された。我が国の国内もその基準プロトコールに合わせるための作業を開始した。基準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株、および基準となるPFGE解析プロトコールを各地研に配布し、それに基づいて各ブロックで精度管理を行った。

a) 新しいプロトコールにより、従来プロトコール以上の精度の高い解析結果が得られた。

b) 各PFGEパターンに対する新しい命名法を採用した。それにより、今後増加することが予想されるPFGEパターンに対しても対応していく事が可能と考えられた。

c) 現在は情報の還元にはWISH-NETを使用しているが、情報の共有化の一環としてより容易にアクセス可能なInternetの利用を検討することが必要であると考えられた。

2) 腸管出血性大腸菌感染症患者は2003年度も依然として3000人前後を記録し、減少していない。分離される大腸菌の血清型も0157, 026, 0111が優性を占める事には変化はないが、既存の型に属さないものも出てきている。デンマークの血清学研究所との共同研究で0177:HによるHUS発症例が新しく見いだされた。Stxファージの伝播が広範囲になってきている。

分担研究者：

長野秀樹(北海道立衛生研究所)

甲斐明美(東京都健康安全研究センター)

松本昌門(愛知県衛生研究所)

勢戸和子(大阪府公衆衛生研究所)

田中博(愛媛県立衛生研究所)

堀川和美(福岡県保健環境研究所)

寺嶋淳(国感染症研究所)

研究協力者：伊豫田淳、泉谷秀昌(感染研)、

および各地方衛生研究所関係者(各分担報告書を参照)

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、赤痢等の腸管感染症(食中毒を含む)

の大規模化あるいは、散在的集団発生(diffuse outbreak; 一見散発事例の多発に

みえるが実は同じ原因で起こっている集団事

例であるケース)により被害が拡大するようなケースが見られるようになってきている。被害の拡大を未然に防ぐためには、感染および汚染原因の迅速なる究明およびその除去が不可欠となる。そのためには、1)患者情報、食品等の汚染情報をもとにした食中毒・感染症の疫学的解析と、2)その情報を科学的に裏付けするための菌学的解析結果の2面からの総合判断が重要となる。菌側からの解析システムとして、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)が行われており、感染症の集団発生およびdiffuse outbreakを迅速に検知し、その拡大を未然に防ぐことに貢献してきている。最近では、国内発生ばかりでなく、外国由来の汚染食品の輸入による広域腸管感染症事件も発生してきている(韓国産の牡蠣が赤痢菌に汚染させ、広域食中毒事件が起こった事は記憶に新しい)。それらに迅速に対応するためには、国際的なネットワークの構築が重要である。そのためには、国際的に使用できるプロトコールの作成、その技術の精度管理、及びデータベースの作成が不可欠である。本研究ではそのために基礎を構築する。

B. 研究方法

1) 国際的なプロトコールの作成: CDCが使用している方法を用い、ことし汎太平洋15ヶ国の研究者間で合意した。そのプロトコールを用いての研修会が、2004年3月に香港で行われた。我が国の技術の均一化、およびその精度管理を行うため、全国に75ある地方衛生研究所(地研)を6ブロックにわけ、ブロックごとに各種の菌についてPFGE解析を行い、その有効性、および精度管理を行う。新しく作成した解析ソフトをつかってPFGE画像を処理することにより、お互いの菌の同一性を識別し、離れた場所あるいは離れた時間にお

いて分離された菌が同一汚染原因由来のものかどうかを判定する方法を開発する。

2) 我が国で分離された腸管出血性大腸菌の血清型、毒素型、付着遺伝子型等の性状を解析し、菌の変遷を調査する。新型の出現に迅速に対応できるように菌の性状のデータベースを作成する。

C. 研究結果と考察

1. 感染研における研究

a) PFGEによる解析とPulseNet Japanの構築

国内分離株を主体とするデータベースを海外由来株のものと比較することが今後増加すると予想されるため、CDCを中心とする世界共通のプロトコールに基づいたデータベースの構築が必要となる。したがって、新プロトコールによる精度管理を行うために、2000年に提示したPFGE統一プロトコールを今年度からCDCのプロトコールに基づいて変更を行った。さらに、データベース構築に必要な標準株である*Salmonella* Braenderup H9812株を各地研ブロックに配布するとともに、新プロトコールによるPFGE解析結果から、解析ソフトによる系統樹作成、データベースの構築を行い、これらの結果に基づいた遺伝子型別名の付与を検討した。一方、平成15年の腸管出血性大腸菌(EHEC) 0157:H7の分離株のなかで広域にわたって分離されている遺伝子型を示す株を明らかにすることができた。

CDCの標準PFGEプロトコールに基づいて、検査に必要な時間及び解析結果(画像)の解像度を保持しつつ、現在年間約2000株の解析を行うことが可能であるような実験条件の設定を試みた。従来からの大きな変更点は厚さ0.7mmのプラグを作成して使用する点とマーカーとして市販品ではなくて、CDCから分与さ

れた *S. Braenderup* H9812 株を使用することであるが、実験操作はそれほど変更する必要がなかった。また、結果が得られるまでの時間は二十数時間であり CDC のプロトコールと比較しても遜色なかった。泳動条件が STEC、赤痢菌と non-typhoid *Salmonella* については異なっているため、デンドログラム解析用の標準画像としての *S. Braenderup* H9812 株は、2 種類用意し、各地研ブロックへの配信を行った。泳動用のアガロースは泳動時間が比較的短くて済む 1% SeaKem Gold agarose を用い、プラグ作成もこれで行った。ただし SeaKem Gold agarose はゲル強度が高いため、プラグの切断等ではやや操作しにくい点があるため、Megabase agarose 等で代用することもできると考えられる。

従来の命名法では増加する一方の新しい PFGE パターンに対応することが限界に達していることと、PFGE プロトコールを CDC のものと互換性のあるプロトコールに変更したことにより、PFGE パターン名についても CDC の方法に準じた命名法の導入を検討した（詳細は分担者報告書を参照）。

平成 15 年に感染研に送付された EHEC の総数は 1764 株でそのうち EHEC 0157 は 1355 株であった。平成 14 年においても、複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果（PFGE の画像）の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。従来の方法を用いているが、解析結果はほぼ 1 ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。情報へのアクセスをより容易にすることで解析結果もより広範に利用されることを考える

と、引き続き Internet 利用による情報の公開の可能性についても検討すべきであると考えられる。

b) STEC の血清型の検討

志賀毒素産生性大腸菌（STEC）の血清型の解析結果から、市販の抗血清セットでは同定出来ない新規血清型（0177:H-）の STEC による HUS 発症を伴う重篤な感染事例が起きていることが判明した。これまでのところ、計 4 株の STEC が 0177:H- に型別されることが判明すると共に、これらの株はいずれも、多くの 0157 株と同様にソルビトール非または遅発酵性を示し、*stx2*、*eaeA*、*ehxA* の各病原性遺伝子を保有していることが判明した。PFGE による解析から、これらの分離株は単一のクローンではないことが判明した。

2003 年に国内で単離された STEC の血清型で多い三大血清群 0157、026、0111 は過去 6 年にわたって（1997 年以降）同じ傾向が見られる。それに続く、0121、0103、091 の血清群も毎年上記以外の血清群の中で比較的多くの分離例が報告されている。単離数の少ない血清群のうち、散發事例の HUS 患者から単離された 2 株は、市販の抗血清セットに凝集しなかったため、0174-0181 の抗血清によって型別を試みたところ、いずれも 0177 に型別されることが判明した。さらに、2003 年より以前に国内で単離され、OUT:H-とされていた STEC OUT:H-の 36 株についてさらに解析を行ったところ、このうち、2002 年に単離された 2 株が 0177 に型別されることが判明した。4 株中 3 株は重篤な臨床症状を示す患者由来であったが、一株は無症状保菌者由来であることが判明した。

上記 0177:H-の 4 株全てが、多くの 0157 株と同様に、ソルビトール非または遅発酵性を

示したが、一方で 0157 株とは異なり、β-グルクロニダーゼ陽性を示すことが判明した。PCR による病原性遺伝子の解析から、ベロ毒素遺伝子、接着因子、およびエンテロヘモリジンそれぞれコードする *stx2*, *eaeA*, および *ehxA* を保有することが判明した。これら 4 株は疫学的な関連性は薄いものの、単一のクローンに由来する可能性が考えられた。そこで PFGE を用いて解析を行ったところ、XbaI による切断パターンは異なることが判明した。

2. 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロック内の衛生研究所においてパルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) に関する施設間差について検討した。供試菌株は腸管出血性大腸菌 0157 菌 4 株を用いた。そのうちの 2 株については、菌株を配布すると同時に、北海道立衛生研究所で調製したサンプルプラグを配布した。これらを同時に泳動する事によって、サンプル調製の部分と泳動用機種などの泳動条件とでは、泳動パターンに影響を与える要素としてどちらが重要であるかを検討することができる。その泳動像を比較すると双方ともに高い類似度が得られ、全体的なレベルアップが図られていることが示された。また、解析レベルでの施設間差を検討する目的で、同一の画像を 2 施設で解析し比較検討した。両方で解析した結果得られた類似度に大きな違いは認められなかった。

サンプルプラグの調製、酵素処理は米国疾病管理センター (CDC) のよる方法に準拠した感染研から提示された方法に従った。最終的に得られた PFGE 画像は、実際にパルスネットを運営するときの条件を考慮し、なるべく電子化したものを北海道立衛生研究所に送付した。送付はメールの添付ファイル形式を採用した。

ファイル形式については、解析ソフトが tiff ファイルしか読み込めないため、その形式で電送することとした。しかし、tiff への変換が困難な施設については可能なファイル形式で電送し、北海道立衛生研究所で tiff に変換した上で解析に供した。PFGE パターンの解析は、Fingerprint II (日本語バージョン、Bio-Rad 社) を用いて、トレランス 1.2% の条件で行った。今回の調査では、2 施設での解析結果を比較する目的で、北海道立衛生研究所に集められた PFGE 画像をもう一方の施設へ電送し、同じ条件で解析した。

今年度の調査の結果から、泳動手技の格段の向上がみられた。今年度ではすべての菌株で 80% 以上の類似性を示した。大腸菌、特に EHEC の PFGE については完成度が高いと思われる。しかしながら一方では、今回の泳動距離の違いに起因すると思われる泳動パターンの違い (類似度の低下) も看過できない。PFGE では機種の違いによってもパターンが異なることが指摘されており、泳動時間の設定については、その施設によって自由度があっても良いのかも知れない。

PFGE パターンの解析において、どれだけ正確にバンドを認識できるかがその成否を左右する。従って、バンドの輝度が極端に濃い場合や、薄い場合にはバンド位置の正確性が保持されない可能性がある。濃すぎるバンドはバンドの正確な位置からずれる可能性があり、薄い場合にはその認識すらできない。このことから、最初の菌濃度が重要な要素になるが、再現性を持たせるためには、培地上のコロニーを掻き取るよりも液体培地による一夜培養の方が均一な濃度の菌液を得ることができるように思われた。

3. 関東・甲・信・静岡ブロック

関東甲信静に分散する 11 地方衛生研究所において、腸管出血性大腸菌 O157 を中心に細菌学的疫学指標としての PFGE 法による解析技術の向上、均一化、特に解析ソフトで解析できる PFGE 解析結果を得るための検討を行った。すなわち、“New protocol” に示された DNA ブロックの形状(0.7mm の薄型ブロック)では、従来に比べシャープで鮮明な PFGE 像が得られ、その後の解析ソフトを利用したデンドログラム作成に非常に有利であった。また、新しい DNA 抽出方法は、操作が簡素化されており経費と時間の節約が図られた。

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、その成績を東京都健康安全研究センターに電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた結果、S. Braenderup を基準にして解析した場合には、Lambda ladder DNA を基準にして解析した場合より遙かに優れたデンドログラムを得ることが出来た。

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、検討を行った。各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として、腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT1+VT2 産生株:3 株 および VT2 産生株:2 株) 5 株を供試した。感染研 New protocol に準拠した。

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経験した。それに伴い PFGE 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。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。

次に、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、その成績を東京都健康安全研究センター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デンドログラムでは、一部の成績を除くと、それぞれのクラスターの近似性は 80%以上であったが、パルスネットを構築するためには、まだ PFGE 解析技術上の問題点が存在した。

一方、DNA ブロックプラグ作製に 0.7mm のプラグキャストを使った薄型ブロックを使用することで、PFGE 解析の DNA バンドがシャープで鮮明になった。また、解析ソフトを使った解析において、これまで Lambda ladder DNA を基準にして解析してきたが、その一番基礎になる Lambda ladder DNA の PFGE 解析像のバンドが拡散しているなどの問題があった。しかし、今回 S. Braenderup を基準にして解析した場合、ほぼ全ての研究所で基準となる DNA バンドが非常に鮮明になり、安定性もよく、以後の解析が容易になることが明らかとなった。今後更に、マーカーの入れ方(ゲルの両端と真中のウエルに入れる)の統一を図る等の標準化を進めることにより、データベース構築が大幅に前進することが示唆された。

4. 東海・北陸ブロック

サルモネラは我が国で年間の食中毒発生件数及び患者数でも常に上位にランクされている代表的な食中毒菌のひとつである。その中でも S. Typhimurium は S. Enteritidis と共に患者及び保菌者から最も高率に検出される菌型のひとつである。1990 年代に英国及び米国より胃腸炎患者からアンピシリン(略号 A)、クロラムフェニコール(C)、ストレプトマイシン(S)、スルフォンアミド(Su)、テトラサ

イクリン (T) の 5 剤の抗生剤に耐性を示し、しかもそのファージ型が DT(definitive type)104 である *S. Typhimurium* が高率に分離されるようになった。本研究では、愛知県で 1980 年から 1999 年の間に検出された 143 株の *S. Typhimurium* について薬剤感受性試験及びファージ型別分類を実施し、*S. Typhimurium* DT104 を含む多剤耐性菌の本県における浸潤状況を調べた。その結果、90 年代に分離された *S. Typhimurium* の多剤耐性化と *Typhimurium* DT104 の存在が明らかとなった。そこで、薬剤耐性 94 株を含む 143 株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施し、その画像データベースの構築、及びそのデータベースを用いた解析を行ない、多剤耐性 *S. Typhimurium* の分子疫学的解析を行なった。

分離年によって 1980 年から 89 年までを前期、1990 年から 99 年までを後期とした。薬剤耐性菌の割合は前期が 53%であったのに対して後期は 76%と大きく増加し、90 年代には 80 年代と比べ耐性菌が増加していることが明らかとなった。また、前期には 3 剤までの薬剤に対する耐性菌の割合が耐性菌全体の 69%を占めていたのに対し、後期になるとその割合は 37%とほぼ半減し、4 剤以上の薬剤に対する耐性菌の割合が 63%を占めていた。これらの結果から、90 年代における耐性菌の増加の原因は主として *S. Typhimurium* の 4 剤以上の抗生剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加によるものと考えられた。

143 株の *S. Typhimurium* の PFGE 画像を解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて解析を行ない、型別分類を行なった結果、143 株は 20 のクラスター (n=98) と 45 の 1 菌株 1 PFGE 型 (n=45) に分類された。また、*S. Typhimurium* DT104 が愛知県でも 88 年以降 7

株検出された。薬剤耐性菌を含む 143 株について PFGE を実施し、その画像データをデータベース化し、解析を行なったところ、後期に増加した 4 - 6 剤耐性菌は複数のクラスター、及び 1 菌株 1 PFGE 型菌から構成されていることが明らかとなった。この結果は、後期の多剤耐性 *S. Typhimurium* の増加が複数のクラスター、及び 1 菌株 1 PFGE 型菌への耐性遺伝子群の水平伝播がひとつの原因となった可能性を示唆している。

5. 近畿ブロック

パルスネット構築の問題点のひとつであった小さいサイズのバンド認識の有無を解決するため、従来法に替えて国立感染症研究所から提示のあった新プロトコール(感染研が CDC 法と比較可能な電気泳動像が得られるよう従来法を改良した新プロトコール)を試用し、同一菌株で PFGE 型別を実施して近畿支部 11 衛生研究所間の変動をみた。電気泳動用アガロースおよび泳動条件の変更により、小さいサイズのバンドが明瞭になり各施設におけるバンド認識の差異がある程度解消されたが、まだばらつきが大きく近似度の低い画像も見られた。これは、画像のコントラストに施設間差があることに起因すると考えられ、今後各施設で均質な画像を得るため、技術の向上とともに写真撮影あるいは画像取り込み条件の改善を計る必要がある。

過去 3 年間の研究結果より、ラムダラダーは前処理のわずかな加熱時間の差が結果に影響し、バンドの太さや濃淡の差が問題となっていた。今回標準株の XbaI 処理をマーカーとして使用したが、ラムダラダーよりも広い範囲に分散してバンドが見られ、各バンドが被検株と同等の太さでシングルピークとして認識されることから、毎回制限酵素処理を実施

する手間がかかるもののマーカーとして適切であると考えられた。

EHEC 0157 のデンドログラムは両解析者ともに全株で高い近似度を示し、100%一致した画像も見られるなど良好な結果であった。プロトコールが異なるため単純には比較できないが、新プロトコールによりサイズの小さいバンドが明瞭になり、近似度が上昇したものと推察された。S. Enteritidis については、全画像が 100%一致したのも見られたが、ものによっては近似度 80%台であるものもあった。以前から目視では同一型と判断されるのにデンドログラムでは近似度が低くなる例が知られており、このような株では目視による補正が必要であると考えられる。

デンドログラム作成に当たって、各施設で画像のコントラストが異なることから最小ピークの高さを画像ごとに変更した。今回解析者による結果の相違も調べたが、最小ピークの高さには同じ値を使用したため、同等の結果が得られた。バンド認識に解析者の主観を入れないためには、どの画像もデフォルト値で解析できることが望ましく、そのためには各施設の画像のコントラストの統一が必要である。また、菌種にかかわらず、近似度 90%以上を示した株でも 100%一致した画像とそれ以外を比較すると小さいサイズのバンド認識の有無にばらつきが見られ、これも各画像のコントラストの差に起因すると考えられた。今後各施設で均質な画像を得るため、技術の向上はもちろんのこと、トランスイルミネーターの紫外線波長や強度の統一、写真撮影あるいは画像取り込み条件の改善を計る必要がある。

本研究で用いたプロトコールは従来法に比べ鮮明な電気泳動像が得られるが、それ以外にリゾチーム処理が省略され、所要時間が短

くなったことも利点である。一方、ディスプレイプラグモールドに替えて使用したサンプルプラグキャスターは高価で多検体処理に難点があり、消毒洗浄を繰り返すことにより電気泳動像に悪影響が出る可能性について今後考慮しなければならない。

6. 中国・四国ブロック

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究の一環として、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) の標準化と PFGE により解析された画像を基盤とした分散型情報システム (パスネット) 構築のため、検査施設間における PFGE 技術の精度管理を行った。精度管理には中・四国地区の地方衛生研究所 (地研) 8 施設が参加し、*Salmonella* Enteritidis (サルモネラ) 4 株と腸管出血性大腸菌 0157 (0157) 4 株を供試菌株として、新しいプロトコールによる PFGE を実施した。さらに、異なった 2 つの集菌方法による PFGE 画像の影響についても比較・検討を加えた。

精度管理の結果、ほとんどの施設で概ね良好な画像が得られた。また、画像をもとに画像解析ソフトで解析を行い施設間の差異を確認したところ、サルモネラおよび 0157 とタイプのことなる 4 株はそれぞれ異なるクラスターを形成 (近以性 90%以上) したが、同一菌株の一部に集菌方法などの技術的問題または菌株の変異に起因すると推察される差異が認められた。今後、これらの技術的問題点の改善が必要と思われた。今回、8 施設 (A~H 施設) が統一方法で作製したサルモネラおよび 0157 の PFGE 画像は、1 施設 (H 施設) の画像を除き概ね良好で、画像を比較することができた。H 施設の画像はサルモネラ、0157 と不明瞭であったが、これは技術的な問題

によるものではなく泳動装置の不良によるものであった。一方、画像を CCD カメラで撮影した B 施設の画像は他施設の画像と比べ若干粗く（小さな粗い粒子が浮き出た状態）感じられた。さらに、菌株の変異によるものと推察されるバンドの欠損も認められた。米国では CDC が中心になり、パルスネットを構築し、diffuse outbreak の発見に成果を上げている。将来、地球規模でのネットワークを構築するには、統一したプロトコールで実施する必要がある、感染研は CDC の方法に準じた感染研ニュープロトコールを作成した。今回、中・四国地区の 10 地研で、この新しいプロトコールにもとづいた PFGE の方法を習得することとした。習得後、8 施設で精度管理を行った結果、7 施設ではほぼ明瞭な画像を得ることができたため中・四国地区の大部分の地研は新しいプロトコールによる PFGE の方法が取得されたと考えられる。新しいプロトコールの方法と従来法の主な相違点はアガロースブロックの作製過程にあり、前者は Seakem Gold Agarose を菌体と混和後 Sample Plug Caster (0.7mm) へ流し込み、後者は低融点アガロースを菌体と混和後 plug mold (1.4mm) へ流し込みブロックを作製する。そのため、今回の精度管理で得られた画像ではブロックの厚さが薄いため、昨年度までの研究で実施した精度管理の画像よりもシャープなバンドが得られた。このことは画像解析時に有利になると思われた。一方、集菌方法の違いによる画像の比較では、プレートからの集菌方法がブイヨンからの集菌方法に比べ濃度が濃くなる傾向が見られた。従って、画像のバンドも大きくなり、解析時のバンド認識が難しくなった。逆にブイヨンからの集菌方法では分子量の小さい領域のバンドが薄くなる傾向が見られ、新しいプロトコールの方法でも集菌方

法は解析画像に影響する要因となった。今後、これら技術的問題点の改善が必要と思われた。

7. 九州ブロック

九州地区 12 地方衛生研究所の参加により九州地区における食品由来感染症の拡大防止・防止に組むため、平成 15 年度は新規パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) の習得並びに精度管理を行なった。平成 14 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が、当年度は、メールの添付ファイルの画像がそのまま使用できたのは 4 地研のみであった。また添付画像を開くことが出来なかった地研は 2 件であった。添付画像がそのまま使用できない原因は、イメージモードがグレースケールではなく RGB あるいはインデックスカラーである場合とファイルが圧縮されている場合あるいはその両方による場合であった。画像のサイズについては特に指定していなかったため、地研により画像サイズが 0.3~1.2 MB とまちまちであった。画像サイズの大きい解像度の高い画像の方が良好な解析が得られるため、画像サイズについても指定が必要と考えられた。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。

感染症研究所から配布された S. Braenderup H9812 株は本条件で泳動すると、19 本のバンドに分かれる。19 本目のバンドは CDC でサイズが提示されていないので、Gold standard

から除いた。また、14本目のバンドは自動バンド検索では識別できなかったため、Gold standard から除いた。最終的にGold standard のバンド数は16本とした。一方で各地研から送信されてきた画像からマーカ―を自動バンドし、明らかなゲル中の汚れやノイズを削除した。各地研及び感染研のスタンダードを比較した。スタンダードの類似性は全体で67%、第2のクラスターで86%であった。このような状況で0157標準株を比較することができなかった。

平成12-14年度にパルスネット構築にむけた基礎的研究を実施した。その結果、①シングルピークで確認できるマーカ―の安定供給、②PFGE機器の管理と保守点検、③バッファ―量と温度による移動度のチェック、④バンド認識の基準策定の4点が特に必要であることが分かった。平成15年度は市販されているマーカ―(スーラダー)を用いず*S. Braenderup* H9812株を用いマーカ―を自作する新規PFGE法による精度管理を実施した。今回の精度管理ではマーカ―として使用する18本のピーク中2本は必ずしも認識できなかった。マーカ―のピークを的確に認識すること自体が精度管理であり、今後は認識できなかった要因について解明し、相互画像の比較が可能な土壌を構築する必要がある。また、マーカ―として使用するバンド数は今後精査する必要がある。さらに解像度が低いとバンド認識に影響が見られるので、画像取込時の設定についても明確にすべきである。

前事業から今回の事業に移行した際、研究協力者が半数近く交代した。また、PFGEは熟練が必要な技術であり、如何に初心者でも安定した結果を得るかが重要な点であると考えられる。次年度は今回の結果を踏まえ、新規PFGEマニュアルの見直しから始める予定であ

る。一方、PFGEの方法や泳動条件が変わることに拠ることは、全体統一が直ちにとれないことを実感した。相互のデータを比較する基本となる検査法については特に検査法の全体統一が必要である。

D. 結論

1) 患者から分離される腸管出血性大腸菌は、平成15年度だけで0157, 0111, 026以外に26種類の型が分離された。臨床的にEHEC感染が疑われるときには0157, 0111, 026以外の血清型にも注意を払う必要がある。

2) 世界的に共通のプロトコールに基づくPFGE解析を一層普及させ、データの相互比較を可能にさせる必要がある。多国間に及ぶ広域流行解析には不可欠である

3) パルスネットの構築は事業化すべきである。しかし、地研の職員は2-3年で人事異動をさせられており、技術が定着しない現状がある。国家レベルで考える問題である。

E. 特許等

特になし。

F. 健康危害情報

依然として腸管出血性大腸菌感染症は重要な問題であり、広域散発事例(diffuse outbreak)がかなり見られる。その発生を迅速に検知し、被害の拡大を未然に防ぐ努力が求められている。また、食品を介する感染症は国を越えて伝播するので、その監視および対策において国際的ネットワークの構築が必要である。

研究課題名:「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者 寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者 泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者 伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者 三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 国内分離株を主体とするデータベースを海外由来株のものと比較することが今後増加すると予想されるため、CDCを中心とする世界共通のプロトコールに基づいたデータベースの構築が必要となる。したがって、新プロトコールによる精度管理を行うために、2000年に提示した PFGE 統一プロトコールを CDC のプロトコールに基づいて変更を行った。さらに、データベース構築に必要な標準株である *Salmonella* Braenderup H9812 株を各地研ブロックに配布するとともに、新プロトコールによる PFGE 解析結果から、解析ソフトによる系統樹作成、データベースの構築を行い、これらの結果に基づいた遺伝子型別名の付与を検討した。一方、平成 15 年の腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 の分離株のなかで広域にわたって分離されている遺伝子型を示す株を明らかにすることができた。

A. 研究目的

PulseNet を通じて今や世界共通のプロトコールとして確立しつつある CDC のプロトコールとほぼ互換的である新しい PFGE プロトコールの検討を行った。検査時間の短縮と結果の鮮明度の上昇を目的として改良を加えた。また、増大する一方である遺伝子型の種類に対応可能であるサブタイプの命名法の検討も行った。

B. 研究方法

感染研に送付された株については平成 12 年度に設定した PFGE 条件を用いて解析を行うとともに、一部の株については新プロトコールによる解析を行い両者の比較を行った。PFGE の解析結果は、GelComparII (Applied Math 社)の日本語版

(Fingerprinting II, Bio-Rad 社)を用いて画像解析を行った。Fingerprinting II によるデンドログラム作成には、新たな標準マーカーである *S.* Braenderup H9812 株のパターンを用い、EHEC のデータベースを構築した。従来の菌株の遺伝子型別名に対して、デンドログラムに基づいたサブタイプ名を付与するための方法を検討した。感染研で得られた結果 (PFGE の画像)の一部については、本研究班構成機関に Internet 経由で電送し各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。また、従来の PFGE 条件による解析結果をほぼ 1 ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。広域食中毒事例などへの迅

速な対応が必要であると考えられる場合には、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の画像配信を行った。

C. 研究結果と考察

1. 新プロトコルの検討

CDC の標準 PFGE プロトコルに基づいて、検査に必要な時間及び解析結果(画像)の解像度を保持しつつ、現在年間約 2000 株の解析を行うことが可能であるような実験条件の設定を試みた(表 1)。従来からの大きな変更点は厚さ 0.7 mm のプラグを作成して使用する点とマーカーとして市販品ではなく、CDC から分与された *S. Braenderup* H9812 株を使用することであるが、実験操作はそれほど変更する必要がなかった。また、結果が得られるまでの時間は二十数時間であり CDC のプロトコルと比較しても遜色なかった。泳動条件が STEC、赤痢菌と non-typhoid *Salmonella* については異なっているため、デンドログラム解析用の標準画像としての *S. Braenderup* H9812 株は、2 種類用意し、各地研ブロックへの配信を行った(図 1)。泳動用のアガロースは泳動時間が比較的短くて済む 1% SeaKem Gold agarose を用い、プラグ作成もこれで行った。ただし SeaKem Gold agarose はゲル強度が高いため、プラグの切断等ではやや操作しにくい点があるため、Megabase agarose 等で代用することもできると考えられる。処理可能な検体数を増やすためには泳動時のコムのレーン数が多いことが必要であり、この点については従来と同じ 20-well のコムを使用した。ただし、PFGE の画像に基づくデータベース構築であるため、それぞれのゲルによる誤差を最小限に留めることを目的としてスタンダード株は 1 枚のゲル上に 6-7 レーンおきに 4 レーン分配置した。2003 年分離の STEC O157, O26, O111 株を使用した解

析結果では従来のゲルに比べてより鮮明な泳動像が得られた(図 2)。

2. デンドログラムに基づく新命名法の検討

従来の命名法では増加する一方の新しい PFGE パターンに対応することが限界に達していることと、PFGE プロトコルを CDC のものと互換性のあるプロトコルに変更したことにより、PFGE パターン名についても CDC の方法に準じた命名法の導入を検討した。図 3 に示される程度の解像度である PFGE ゲルについてデンドログラムを作成し、それぞれのパターンについて単純な番号を付与し、パターン No 1 から No 7 までのタイプ名をつけた。2つの異なるゲル上の同一パターンについては、図 4 に示されるように 100% マッチのクラスターを形成した (No. 994, 994b, a994_3)。さらに、異なるゲルの 12 株の示すパターン(図 5)を加えた場合、図 4 で形成されたクラスターはさらに細分化された(図 6)が、同一パターンの株が作っていたクラスターはそのまま保持された。この新しいデンドログラムに基づいて新しいパターンである No. 8 から No. 19 のタイプ名を付与した。それぞれのパターンの近似度を決定するトレランスは、プログラムで自動に設定される最適化トレランス値を用いた。今回のデンドログラムではトレランスは 0.5 % に設定された。新しい株のパターンが加わった場合でも順次最適化トレランス値に基づいてデンドログラムが形成されることが予想されたが、付与されるパターン名が番号であるため、パターン名による関連性を予想することが、従来の命名法によるパターン名とは異なり困難であると考えられた。したがって、従来のパターン名との比較において、過去に重要な位置づけがなされた株のパターンとの比較が容易になるよう、新命名法によるこれらの株のパターンを提示することも必要

であると考えられた。

3. 「PulseNet Japan」による結果の配信

平成 15 年に感染研に送付された EHEC の総数は 1764 株でそのうち EHEC O157 は 1355 株であった。平成 14 年においても、複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした(図 7)。従来の方法を用いてはいるが、解析結果はほぼ 1 ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。

平成 13 年及び 14 年に送付された O157, 4205 株のうち、同一パターンを示す 831 株が集団発生、散発事例から分離されていたが、平成 15 年の分離株については 1116 株の O157 株のうち 63 株(5.6%)がやはり以前と同一パターンを示していた。これらの株については、集団事例と散発事例に由来する株が含まれていたが、原因が明らかになった事例は報告されなかった。

解析ソフトを利用した結果(デンドログラム)では、実際には 100%一致している泳動像でも近似度 100%にならない場合が考えられる。したがって、デンドログラムに基づいた新命名法では、泳動像の目視による評価とデンドログラムによる結果の両方を考慮したパターン名の付与を行うことが必要であると考えられた。一方、新命名法では、デンドログラムの結果に基づいて、パターンに対して番号が付与されるだけである。したがって、それぞれのパターン間での関連性について予想することが困難であると考えられるため、デンドログラムの結果自体を閲覧することが重要であろう。現

在、1 ヶ月程度で公開している解析結果の頻度をやや短くすることが今後の目標として考えられる。

情報へのアクセスをより容易にすることで解析結果もより広範に利用されることを考えると、引き続き Internet 利用による情報の公開の可能性についても検討すべきであると考えられる。

D. 結論

新しい PFGE プロトコルにより、従来のプロトコル以上に精度の高い解析結果が得られた。また、PFGE パターンに対する新しい命名法により、今後も増加することが予想される PFGE パターンに対しても逐次命名して行くことが可能であると考えられた。一方、分離株間のパターンの比較が容易になるよう、新命名法によるこれらの株のパターンを早期に提示することも重要であると考えられた。さらに、情報の共有化の一環として、より容易なアクセスが可能である Internet 利用による情報公開も引き続き検討すべきと考えられた。

参考文献

- 1) Terajima, J., Tamura, K., Hirose, K., Izumiya, H., Miyahara, M., Konuma, H., and Watanabe, H. A multi-prefectural outbreak of *Shigella sonnei* infections associated with eating oysters in Japan. *Microbiol. Immunol.* 48, 49-52, 2004
- 2) Izumiya, H., Nojiri, N., Hashiwata, Y., Tamura, K., Terajima, J., and Watanabe, H. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1650-1651, 2003
- 3) Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and

Watanabe, H. Genotypic Analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and Development of a Pandemic Group-Specific Multiplex PCR Assay. J. Clin. Microbiol. 41: 4676-4682, 2003

4) Shaikh, N., Terajima, J., and Watanabe, H. IpaC of *Shigella* binds to the C-terminal domain of b-catenin. Microbial Pathogenesis 35, 107–117, 2003

表1

	感染研New Protocol (revised) (STEC, Shigella, non-typhoidal Salmonella) (27h -)	CDC Protocol (STEC, Shigella, non-typhoidal Salmonella) 24 - 28 h
Cell suspension buffer	DW OD610 nm = 0.5 - 0.6	100 mM Tris:100 mM EDTA, pH8.0 OD610 nm = 1.3 - 1.4
Plug agarose	SeaKem Gold Agarose (1%) in DW Cell suspension 200 μ lと1%アガロース200 μ lを混合	1% SeaKem Gold:1% SDS agarose in TE Buffer (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH8.0) Cell suspension 400 μ l, 20 μ l of Proteinase K(20 mg/ml stock)と1%上記アガロース400 μ lを混合 (final Pro K; 0.5 mg/ml)
Lysis buffer	1mg/ml Proteinase K, 1% N-laurylsarcosine in 0.5M EDTA (2h - overnight, 50°C)	5 ml Cell Lysis Buffer (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH8.0 +1% Sarcosyl)と 25 μ l Proteinase K(20 mg/ml)を混合in 50 ml tube/2bugs, (final ProK: 0.1mg/ml) 54°C, 1.5-2 h with vigorous agitation (175-200rpm)
Washes	4mM Pefabloc SC in TE (20min, 50°C, Twice) TE (20min, on ice) Enzyme buffer (20min, on ice)	10-15 ml sterile water (10-15min, 50°C, twice) 10-15 ml TE (10-15min, 50°C, 4 times)
Restriction digestion	20~30U/sample (Xba 1 / Bln 1) at 37°C for 2h - Overnight	2.0-, 2.5-mm-wide plug; Pre-Restriction Incubation ; 200 μ l 1xH buffer, 37°C 5-10 min/ RT 10-15 min 200 μ l restriction enz. mixture; 50 U/sample, 37°C, 1.5- 2h
Electrophoresis conditions	6V/cm, 2.2 - 54.2 (63.8)s, 19h STEC, Shigella (non- typhoidal Salmonella), 12-15°C(ゲル下端から1-1.5cm 程度の泳動距離)。SeaKem Gold Agarose, 0.5 x TBE	6V/cm, 2.2 - 54.2 (63.8)s, 21h (non-typhoidal Salmonella), 14°C 1%
Marker	Salmonella Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain (Digested by Xba 1) 1, 8, 14, 20 (20-well gel)	Salmonella Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain (Digested by Xba 1) 1, 5, 10 (10-well gel) or 1, 5, 10, 15 (15-well gel)