

部治郎 田村和満 渡辺治雄:2004年に広域において見出された同一 PFGE タイプを示す腸管出血性大腸菌 O157 および O26 について。病原微生物検出情報、26, 140, 2005

16) 門間千枝 小西典子 尾畑浩魅 下島優香子 柴田幹良 藤川 浩 矢野一好 甲斐明美 諸角 聖:死亡者が確認された高齢者福祉施設における腸管出血性大腸菌 O157 感染症集団事例—東京都。病原微生物検出情報、26, 144-5, 2005

17) 愛媛県立衛生環境研究所、松山市保健所、八幡浜中央保健所:2004年に発生した集団感染2事例を含む腸管出血性大腸菌 O26 の発生状況—愛媛県。病原微生物検出情報、26, 140-1, 2005

18) 愛媛県立衛生環境研究所、松山市保健所、愛媛県保健福祉部健康増進課、愛媛県保健福祉部薬務衛生課:2004年10~11月に県内で発生した同一 PFGE 型 O157 感染症の多発—愛媛県。病原微生物検出情報、26, 146-7, 2005

19) 小西典子, 尾畑浩魅, 八木原怜子, 下島優香子, 柴田幹良, 畠山 薫, 鈴木 浩, 池内容子, 秋場哲哉, 門間千枝, 矢野一好, 甲斐明美, 諸角 聖。東京湾の海水, 海泥および貝からの病原ビブリオ検出と分離菌株の諸性状、日食微誌、22、印刷中、2005

20) 久高 潤, 堀川和美, 瓜生佳世, 松雪星子, 緒方喜久代, 河野喜美子, 山口仁孝, 山崎省吾, 渡辺治雄, 岩永正昭, 食中毒及び感染性胃腸炎の病原体と臨床症状, 感染症学雑誌, 11, 864-870, 2005

21) 財津裕一、堀川和美、野田多美枝、田代律子, 関節腔内注射による黄色ブドウ球菌集団感染事例, Modern Physician, 2006, 26(3),

441-445.

2. 学会発表

- 1) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄:2004年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第78回日本細菌学会総会、2005年4月、東京
- 2) 大倉正稔、大澤 朗、荒川英二、寺嶋 淳、渡辺治雄:ゲノムサブトラクション法による新興型腸炎ビブリオに特異的遺伝子の検索。第78回日本細菌学会総会、2005年4月、東京
- 3) 小椋義俊、黒川 颯、大岡唯祐、大西 真、中山啓介、森本拓也、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也:Whole Genome PCR Scanning とマイクロアレイを用いた EHEC ゲノムの比較解析。第78回日本細菌学会総会、2005年4月、東京
- 4) 松本昌門、栄 賢司、鈴木康元、宮崎 豊、長野秀樹、八柳 潤、黒澤 肇、小林一寛、堀川和美、久高 潤、寺嶋 淳、渡辺治雄:我が国のパルスネット構築のための8地方衛生研究所による基礎的研究。第79回日本感染症学会総会、2005年4月、名古屋
- 5) D. Jennings, K. Hise, R. Colindres, D. Boxrud, P. Calimlim, D. Tamashiro, P. Effler, J. Terajima, H. Watanabe, B. Swamainathan: PulseNet International's Role in a Shigella sonnei Outbreak Associated with Air Travel from Hawaii in August of 2004, 7th International Meeting on Microbial Epidemiologic Markers, May, 2005, Victoria, B. C., Canada

- 6) J. Kincaid, M. Joyner, K. Hise, P. Gerner-Smidt, B. Swaminathan, J. Terajima, H. Watanabe: The Role of PulseNet International in an Outbreak of Ground Beef Associated E. coli O157:H7: February 2004, 7th International Meeting on Microbial Epidemiologic Markers, May, 2005, Victoria, B.C., Canada
- 7) K. L. F. Cooper, C. K. Y. Luey, M. Bird, J. Terajima, G. B. Nair, K. M. Kam, E. Arakawa, A. Safa, D. Cheung, C. Law, H. Watanabe, K. Kubota, B. Swaminathan, E. Ribot: Development and Validation of a PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping *Vibrio cholerae*, 7th International Meeting on Microbial Epidemiologic Markers, May, 2005, Victoria, B.C., Canada
- 8) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄: 2004年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第9回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2005年6月、盛岡
- 9) Atushi Iguchi, Sunao Iyoda, Jun Terajima, Haruo Watanabe & Ro Osawa: Genetic basis for the genomic plasticity of *Escherichia coli* O157:H7. 40th US-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, Nov. 2005, Boston, USA
- 10) 大塚佳代子, 倉園貴至, 柳川敬子, 工藤由起子, 高鳥浩介: 食品および人における *Salmonella* Senftenberg と Weltevreden の分布と細菌学的解析, 第26日本食品微生物学会総会 (2005, 11, 金沢).
- 11) 横山栄二, 内村眞佐子: Variable numbers of tandem repeat typing による腸管出血性大腸菌 O157 の型別, 第26日本食品微生物学会総会 (2005, 11, 金沢).
- 12) 依田清江, 横山栄二, 内村眞佐子: 制限酵素 double-digestion 法を用いたパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法による *Campylobacter jejuni* 集団食中毒の疫学的解析, 第79日本感染症学会総会 (2005, 3, 名古屋)
- 13) 川森文彦, 原田哲也, 廣井みどり, 柏木美智子, 大畑克彦, 杉山寛治, 増田高志: Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別による腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析, 地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会 第18日総会・研究会 (2006, 2, 長野)

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

主任研究者 寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
分担研究者 渡辺治雄	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
協力研究者 裴 迎新	国立感染症研究所 細菌第一部 (黒竜江省疾病コントロールセンター)

研究要旨 2005 年に分離された腸管出血性大腸菌(EHEC)について、標準株 *Salmonella* Braenderup H9812 株をマーカーとして用いたデータベースの構築を継続した。分離株のサブタイプ名については、FingerPrintingII による系統樹作成に基づいて新タイプ名の付与を行った。EHEC O157 では、1807 株に対して 2005 年に分離された新しいサブタイプとして 780 種類、2004 年に分離されたことのあるサブタイプが 72 種類見いだされた。一方、広域共通パターンを示す EHEC 株については、*Xba*I 消化でのパターンが同一と考えられる O157 では、3ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが 34 種類存在し、そのうち 6 箇所以上の都道府県で分離されたパターンは 7 種類存在していた。PFGE 以外のサブタイピング法として、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法により一部の広域共通パターンを示す O157 について解析を行い、PFGE による解析結果との比較を行った。その結果、MLVA により、2 種類の制限酵素を用いた PFGE よりも詳細な分離株の識別が可能であることが示唆された。今後、分離株の疫学情報と MLVA 解析結果の関連性について詳細な検討が必要と考えられた。PFGE 解析結果の公開方法として、WISH よりもアクセスが容易である感染研サーバーを利用した公開システムを開発し試験運用を開始した。

A. 研究目的	伝子解析技術を応用した新しい方法として MLVA
平成 16 年度に設定した新プロトコールによるデータベースの構築を継続するとともに、広域発生病事例由来株の解析からその拡大防止対策に貢献することを目的とした。また、PFGE とは異なる、遺	を用いた分離株の解析を試み、その識別能力の比較を従来の PFGE によるサブタイピング法と行った。解析結果を公開する手段として、感染研のサーバーを利用したシステムによる結果の公開を

試みた。

B. 研究方法

平成 17 年度に感染研に送付された株に対して、新プロトコールによる PFGE 解析を行った。Fingerprinting II (BIO-RAD 社)による画像解析は、*S. Braenderup* H9812 株のパターンをマーカーとして用い、昨年度と同じ方法によりデータベース化した。PFGE 解析結果については、E-mailにより菌株送付機関に返信するとともに、WISH 上の個別システム「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。一方、感染研のサーバーを利用した解析結果の公開については、まずは全国 6 ブロックの地研の分担研究者を対象として ID とパスワードを配布し、地研を対象とする限定公開方法の試験運用を行った。MLVA に関しては、米国 CDC が中心となって進められている MLVA の標準化に関する validation project に参加し、CDC から分与された蛍光プライマーによる本法の基礎的評価を行った。EHEC O157 の MLVA による解析は既報があり、今回の validation project においてもそのうちから 9 種類の primer を選定し使用した。9 種類の primer は 3 種の蛍光色素(青、緑、黄色)で標識したものであり、これらは全て米国 CDC から分与された。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社)で行った。また、fragment size marker としては、GeneFlow 625 ROX labeled (CHIMERx 社、米国)を使用し、Fragment Analysis には ABI-3130xl Genetic Analyzer 及び解析ソフトとして GeneMapper (Applied Biosystems 社)を用いた。供試菌としては、腸管出血性大腸菌 O157 のうち、散発事例由来株でありながら 2 種類の制限酵素(*Xba*I 及び *Bln*I)を用いた PFGE による型別

で、同一あるいは極めて類似した解析結果を示す株を用いた。

C. 研究結果と考察

1. PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイプピング

平成 16 年度に設定した新プロトコールに基づいて国内で分離された EHEC について PFGE 解析を行った。EHEC O157 については、2005 年に分離・送付された 1807 株が、2005 年に分離された新しいサブタイプとして 780 種類、2004 年に分離されたことのあるサブタイプが 72 種類見いだされ、集団発生由来株等がクラスターを形成した(図 1)。EHEC O26 についても同様に、集団発生由来株がクラスターを形成した(図 2)。また、後述するように、散発事例由来株においても *Xba*I 消化による PFGE 解析結果では同一クラスターに属すると考えられる分離株も検出され、関連性を疑うような株の探知にも有用である可能性が示された。ただし、散発事例由来株については、PFGE パターンの一致のみから同一感染源であるとは断定するべきではなく、MLVA の結果からもわかるように、より詳細な菌株の解析が必要であると考えられる。いずれの方法においても、分離株についての患者情報等の疫学情報と菌株の解析結果を十分に関連付けて調査を行うことが、信頼できる感染源の特定に結びつくものと考えられる。

2. EHEC における広域共通パターンについて

2005 年に分離された 1807 株の EHEC O157 は、852 種類のサブタイプに分かれた。そのうち 34 種類については、*Xba*I 消化の結果では同一クラスターを形成し少なくとも 3 つの異なる都道府県から分離されている広域共通パターンであることが示唆された。このうち、2004 年に出ているパターンで

ある、Type No.(TN) 52, 112, 413 の 3 種類のパターンについては、5 箇所以上の異なる都道府県において 2005 年に引き続いて分離されていた(図 3)。同様に、2005 年に初めて分離されたパターンである、TN a230, a264, a27, a491 のパターンを示す株においても 5 箇所以上の異なる都道府県において分離されていた(図 4)。これらの 7 種類のパターンを示す株は、XbaI の結果だけではなく BlnI または SpeI の結果においても同一パターンを示していることから、極めて clonality の高い株であることが示唆された。特に、a264 のパターンを示す株では、複数の地域における散発事例由来株の他に、保育園における集団発生株も含まれていた。しかしながら、両者の関連性を示唆するような疫学的情報は得られていない。一方、2004 年に引き続いて分離されている TN 112 のパターンを示す株があったものの、後述する MLVA の結果にもあるように、相互の関連性についてはさらに詳細な解析が必要であると考えられた。

3. MLVA による解析

供試株として 2004 年の 5 月から 10 月に各地の散発事例に由来する 16 株の EHEC O157 を用いた(表 1)。これらの保存株は XbaI 及び BlnI による PFGE 解析で 6 種類のサブタイプに分類されたが(図 5, 6 および表 2)、MLVA により 14 種類のサブタイプに分けることができた(表 3)。16 株のうち、A タイプに分類された 2 株の関連性については不明であったが、D タイプに分類された 2 株については同一事例由来株であった。D タイプの 2 株と同じ事例由来と考えられる 1 株も含めて残りの 12 株については全て異なる MLVA タイプとなった。したがって、広域において共通の PFGE パターンを示す株においても、MLVA による解析で株間の相違を識別できる可能性が示唆された。しかしながら、

同一事例由来株においても相違が生じていることから、どの程度の変異までを関連性を有する株とするかという基準について詳細な検討が必要であると考えられた。一方で、上記の同一事例由来株の MLVA による違いは、single locus に限られており、すでに報告されている集団発生由来株における解析において tandem repeat 数が 1 ないし 2 個の違いで収まっている Single Locus Variant が発生していることを考えると、感染源が同一である可能性が極めて高い variant とみなすことができる。PFGE においても観察される集団発生由来株内での variation の範囲を MLVA で確認してゆくことが必要だと考えられた。

4. 解析結果の公開方法

2005 年分離株として感染研に送付されている EHEC 株は 2005 年 2 月現在 2389 株であり、O157 が 1807 株、O26 が 383 株、残りは他の血清型等であった。平成 17 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 経由で電送あるいは PulseNet Japan の掲示板において公開し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。デンドログラムによるサブタイピングでは、2004 年分離株に対して番号のみのタイプを付与し、2005 年分離株に対しては番号に“a”を付加したサブタイプ名を付与した。また、PulseNet Japan で閲覧できるデンドログラムでは、分離株全てを含むデンドログラムではなく各々のサブタイプの代表株についてのみ作成した。したがって、一部には、異なるサブタイプである株が同一クラスターに属する場合が出ている。感染研のサーバーを用いた、地研を対象とする限定公開では、全国 6

ブロックの地研の分担研究者を対象として ID とパスワードを配布し試験運用を行った。今後各地研等の担当者に対して ID とパスワードを配布し運用を開始する予定である。

D. 結論

デンドログラムを利用したサブタイピング法により広域共通パターンが容易に検出される一方で、PFGE による菌株の識別能では限界があることを示唆する結果が MLVA により得られた。今後、種々の分離株を用いて疫学的に応用する際の詳細な条件検討が必要だと考えられた。感染研のサーバーを利用した限定公開の問題点等について今後検討を行う必要性が示唆された。

E. 研究発表

1) 誌上発表

1. Okura M, Osawa R, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction.

J Clin Microbiol. ;43, 3533-6, 2005

2. Iyoda S, and Watanabe H. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 187(12): 4086-4094, 2005.

3. Toma C, Higa N, Iyoda S, Rivas M, and Iwanaga M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. Res. Microbiol. 157(2):153-61, 2006

3. Hirose K, Terajima J, Izumiya H, Tamura K, Arakawa E, Takai N, Watanabe H. Antimicrobial

susceptibility of *Shigella sonnei* isolates in Japan and molecular analysis of *S. sonnei* isolates with reduced susceptibility to fluoroquinolones. Antimicrob. Agents. Chemother. 49(3):1203-5, 2005

4. Izumiya H, Mori K, Higashide M, Tamura K, Takai N, Hirose K, Terajima J, Watanabe H. Identification of CTX-M-14 [beta]-lactamase in a *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolate from Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jun;49(6):2568-70.

5. 高原賢守、伊豫田淳、浅田順子、水本洋、上松あゆ美、羽田敦子、渡辺治雄、田村和満、秦大資。「腸管出血性大腸菌 O177:HNM による溶血性尿毒症症候群の 1 例」日本小児科学雑誌 109(1): 54-57, 2005.

6. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄:2004 年に広域において見出された同一 PFGE タイプを示す腸管出血性大腸菌 O157 および O26 について。病原微生物検出情報、26, 140, 2005

2) 学会発表

1) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄:2004 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京

2) 大倉正稔、大澤 朗、荒川英二、寺嶋 淳、渡辺治雄:ゲノムサブトラクション法による新興型腸炎ビブリオに特異的遺伝子の検索。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京

3) 小椋義俊、黒川 顕、大岡唯祐、大西 真、中山啓介、森本拓也、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也:Whole Genome PCR Scanning とマイクロアレイを用いた EHEC ゲノムの比較解析。第 78 回日

本細菌学会総会、2005年4月、東京

4) 松本昌門、栄 賢司、鈴木康元、宮崎 豊、長野秀樹、八柳 潤、黒澤 肇、小林一寛、堀川和美、久高 潤、寺嶋 淳、渡辺治雄: 我が国のパルスネット構築のための8地方衛生研究所による基礎的研究。第79回日本感染症学会総会、2005年4月、名古屋

5) D. Jennings, K. Hise, R. Colindres, D. Boxrud, P. Calimlim, D. Tamashiro, P. Effler, J. Terajima, H. Watanabe, B. Swaminathan: PulseNet International's Role in a Shigella sonnei Outbreak Associated with Air Travel from Hawaii in August of 2004, 7th International Meeting on Microbial Epidemiologic Markers, May, 2005, Victoria, B.C., Canada

6) J. Kincaid, M. Joyner, K. Hise, P. Gerner-Smidt, B. Swaminathan, J. Terajima, H. Watanabe: The Role of PulseNet International in an Outbreak of Ground Beef Associated E. coli O157:H7: February 2004, 7th International Meeting on Microbial Epidemiologic Markers, May, 2005, Victoria, B.C., Canada

7) K. L. F. Cooper, C. K. Y. Luey, M. Bird, J. Terajima, G. B. Nair, K. M. Kam, E. Arakawa, A. Safa, D. Cheung, C. Law, H. Watanabe, K. Kubota, B. Swaminathan, E. Ribot: Development and Validation of a PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping Vibrio cholerae, 7th International Meeting on Microbial Epidemiologic Markers, May, 2005, Victoria, B.C., Canada

8) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄: 2004年におけるO157:H7を中心としたEHECの動向について。第9回腸管出

血性大腸菌感染症シンポジウム、2005年6月、盛岡

9) Atushi Iguchi, Sunao Iyoda, Jun Terajima, Haruo Watanabe & Ro Osawa: Genetic basis for the genomic plasticity of Escherichia coli O157:H7. 40th US-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, Nov. 2005, Boston, USA

図1

Dendrogram of EHEC 0157 isolates in Japan (1856 entries)
(2005/1/1-12/30) Tol:1.2%



大分県
集団施設
6月

埼玉県
保育園
8月

島根県
保育園
7月

香川県
集団施設
10月~11月

図 2

Dendrogram of EHEC O26 isolates in Japan (385 entries)
(2005/1/1-12/30) Tol:1.2%

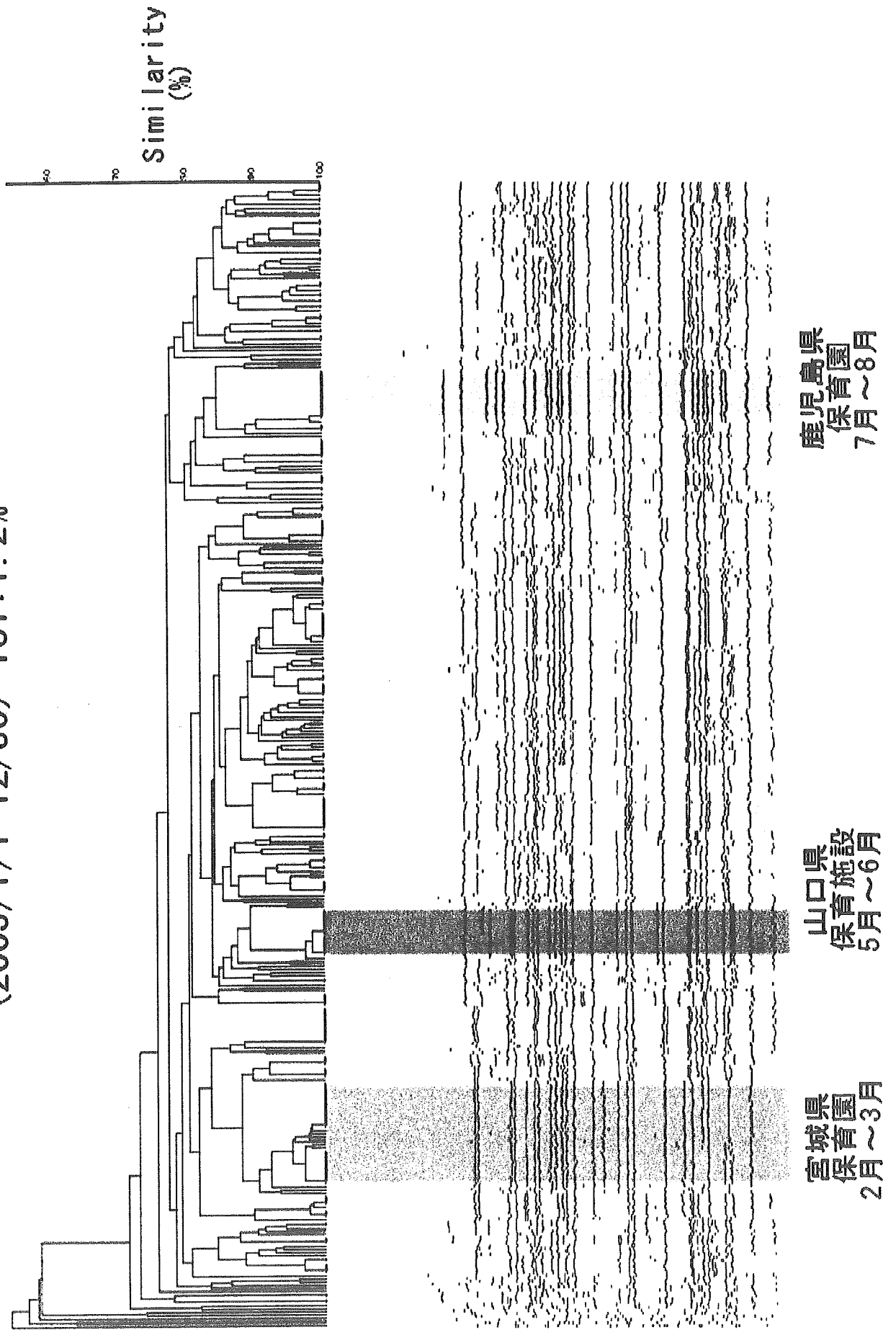


図3 2005年PFGEパターンの一貫している事例の分布図 (1)

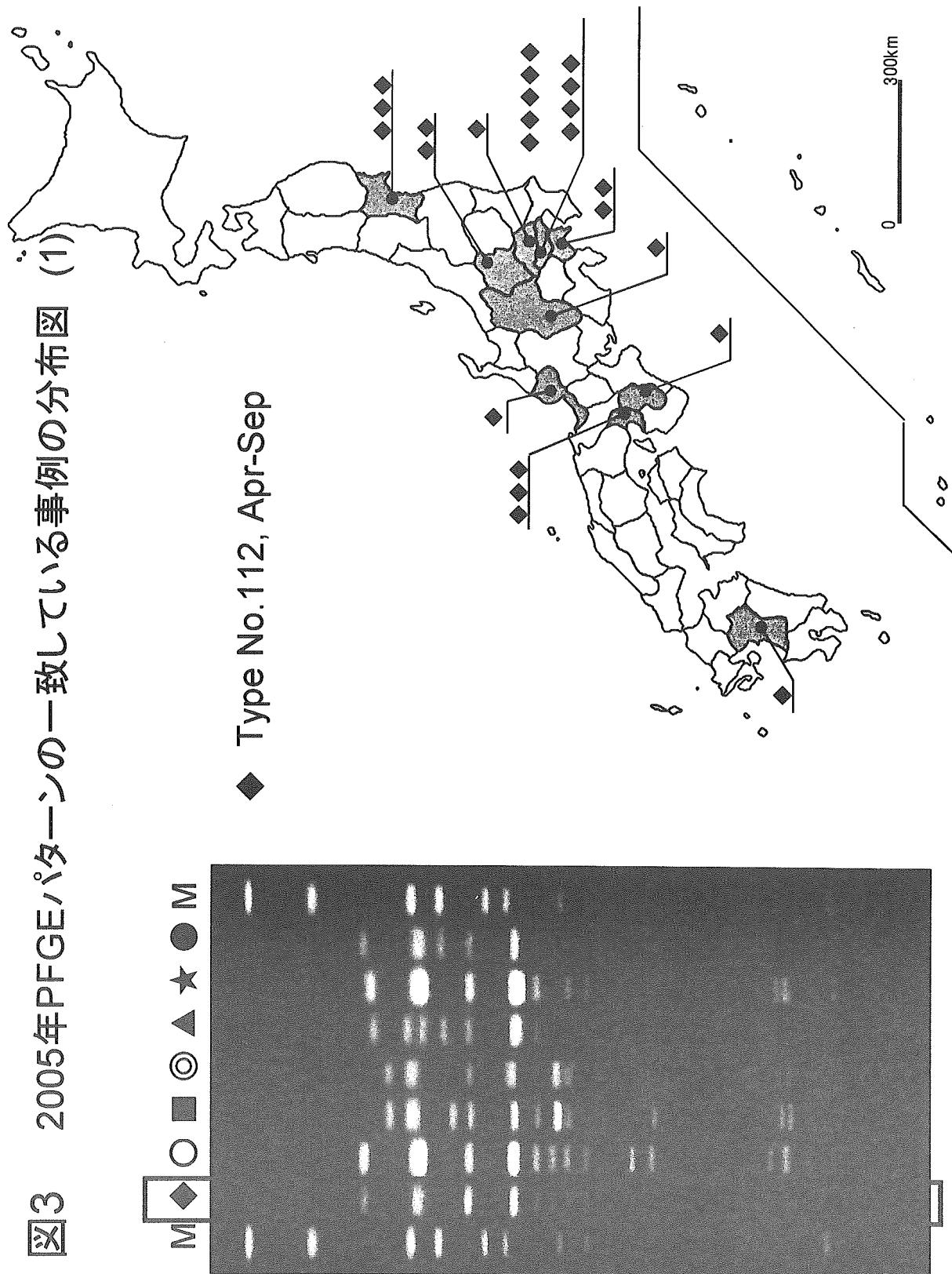


図4 2005年PFGEパターン的一致している事例の分布図 (2)

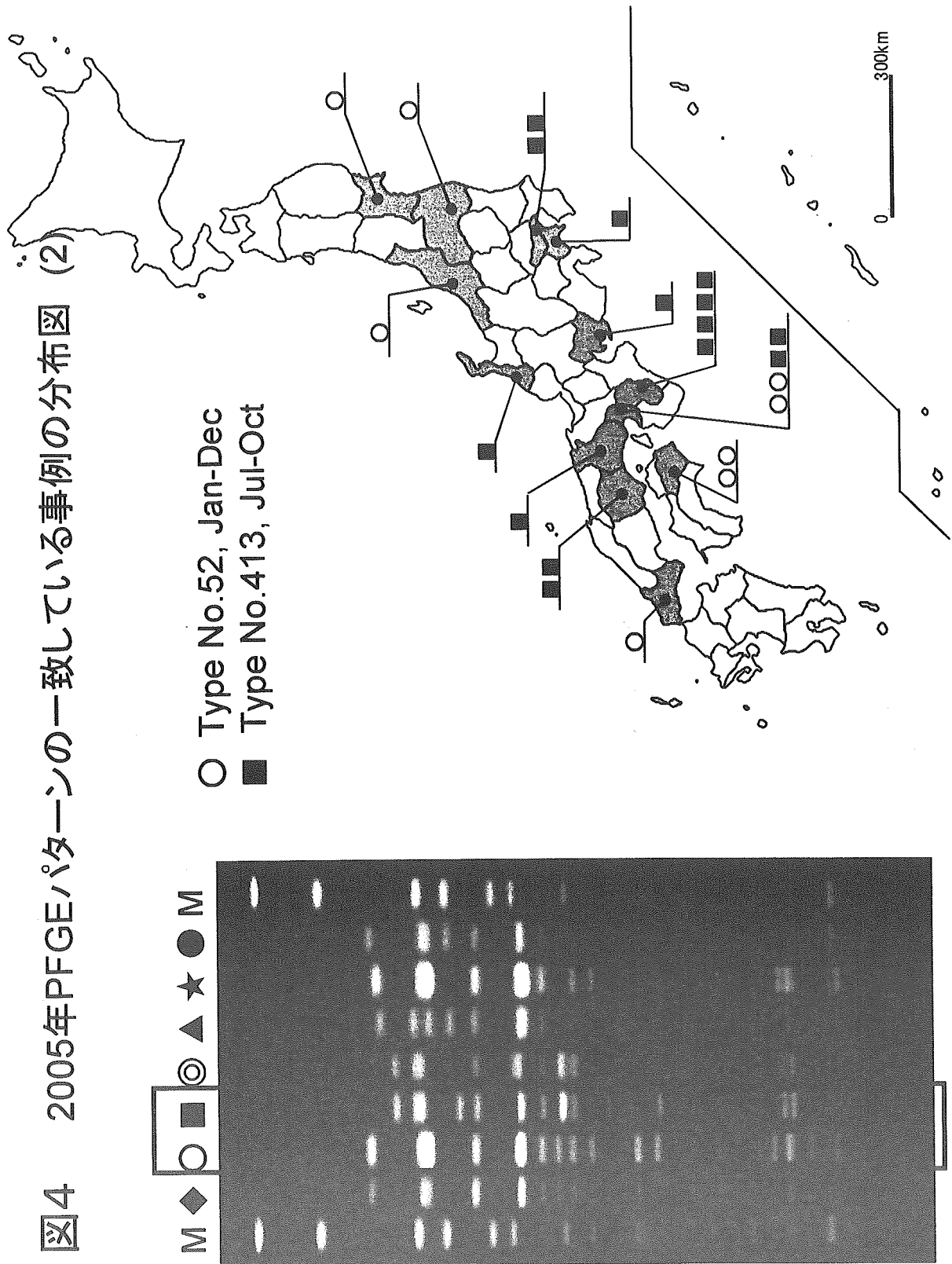


図5 2005年PFGEパターン的一致している事例の分布図 (3)

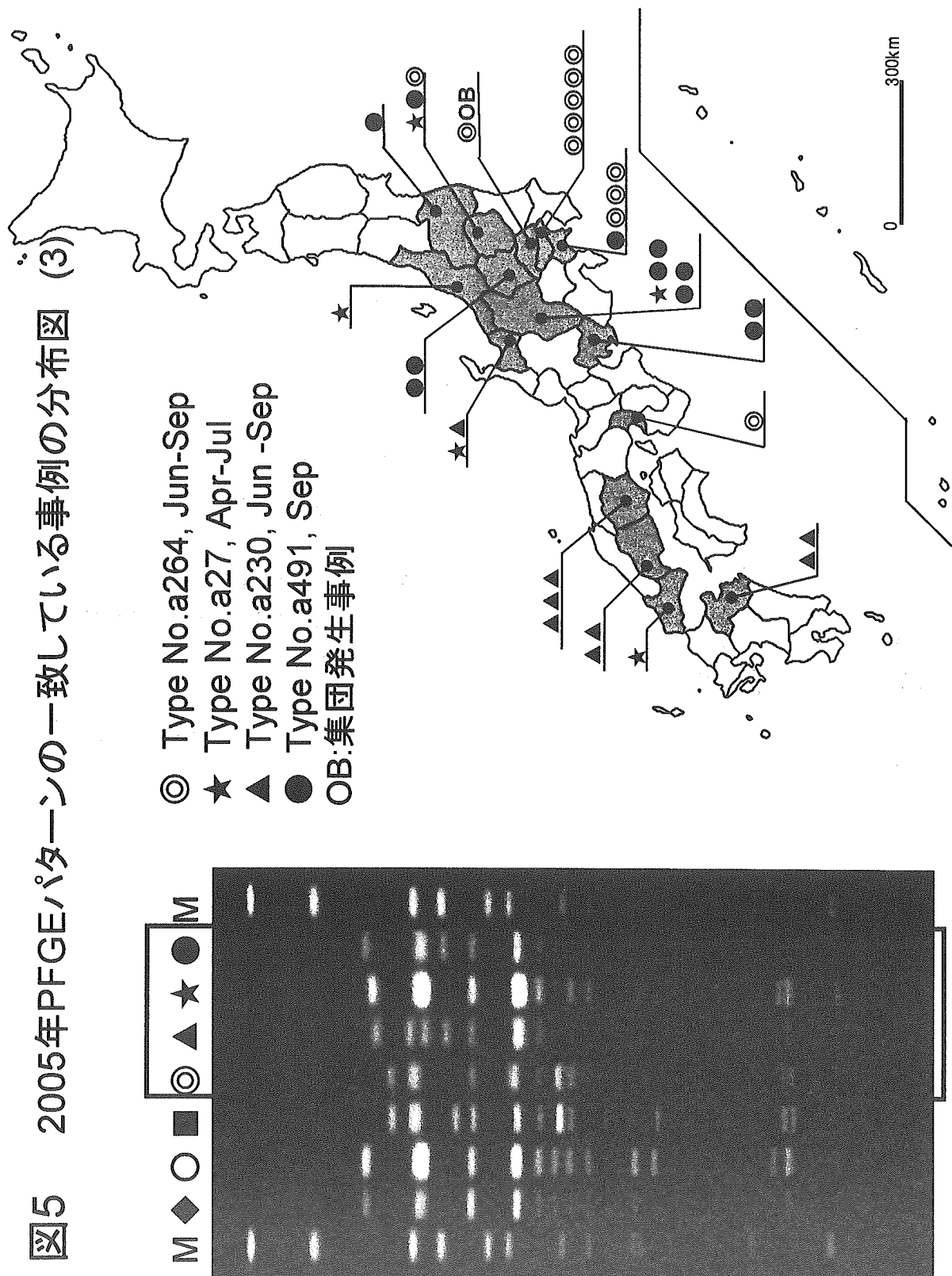


表 1

number	separation date	separation area	Source
581	2004-5-24	Kanagawa	human
670	2004-6-8	Osaka	human
675	2004-5-22	Hokkaido	human
933	2004-6-9	Saitama	human
1481	2004-8-13	Akita	human
1482	2004-8-21	Akita	human
1483	2004-7-31	Wakayama	human
1710	2004-8-12	Fukuoka	human
1746	2004-9-1	Osaka	human
2127	2004-9-9	Gunma	human
2332	2004-9-18	Osaka	human
2335	2004-9-29	Miyagi	human
2583	2004-10-8	Kohchi	human
2726	2004-8-13	Miyagi	calf
2762	2004-10-10	Hyogo	human
2781	2004-10-14	Yamaguchi	human

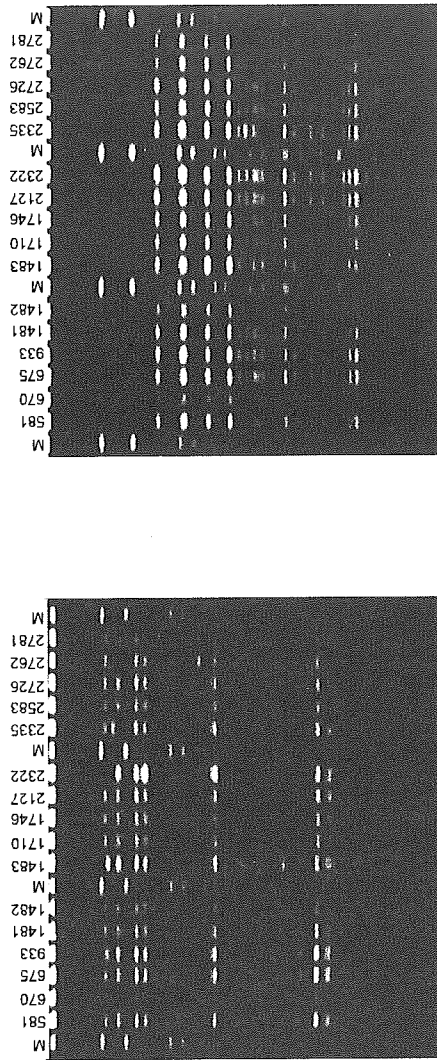


图 6. Photos of PFGE restricted with Xba I and Bln I.

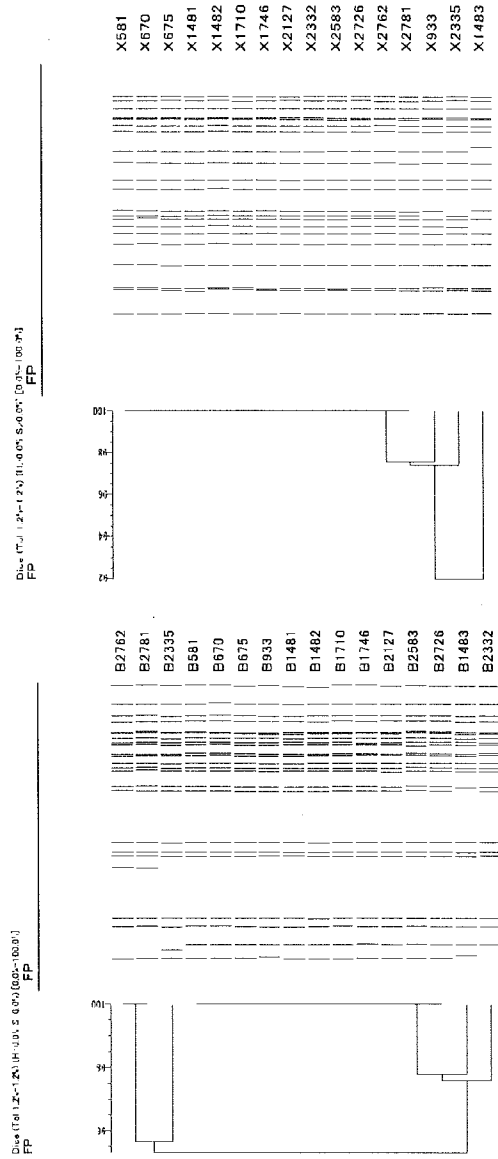


图 7. Dendrograms of PFGE restricted with Xba I and Bln I

strain	Xba I type	Bln I type	Combined type
581	X3	B1	1
670	X3	B1	1
675	X3	B1	1
933	X3	B2	2
1481	X3	B1	1
1482	X3	B1	1
1483	X4	B4	3
1710	X3	B1	1
1746	X3	B1	1
2127	X3	B1	1
2332	X5	B1	4
2335	X2	B3	5
2583	X3	B1	1
2726	X3	B1	1
2762	X1	B1	6
2781	X1	B1	6

表 2 PFGE types of the isolates.

strain	primer									MLVA type
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
581	5	10	11	11	7	10	6	6	26	A
670	5	10	10	11	7	10	6	6	25	B
675	5	10	11	11	7	10	6	6	26	A
933	5	10	9	10	7	10	7	6	24	C
1481	5	10	9	11	8	10	6	6	26	D
1482	5	10	9	11	8	10	6	6	26	D
1483	5	10	9	11	6	10	6	6	27	E
1710	5	10	7	11	7	10	6	6	31	F
1746	5	10	9	12	7	10	6	6	24	G
2127	5	9	10	11	6	10	6	6	27	H
2332	5	10	10	11	7	10	7	6	32	I
2335	5	10	9	10	7	10	7	6	25	J
2583	5	10	10	12	7	10	6	6	25	K
2726	5	10	9	11	8	10	6	6	29	L
2762	5	10	9	13	7	10	6	6	26	M
2781	5	10	9	13	7	10	6	6	27	N

表 3 MLVA types of the isolates. The numbers under each primer reflect the number of times that the repeat was found in that isolate.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成17年度分担研究報告書

「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」
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) を基礎とした施設間差について

	分担研究者	長野秀樹	北海道立衛生研究所
研究協力者	広地敬		札幌市衛生研究所
	和栗敦		青森県環境保健センター
	八柳潤、齋藤志保子、今野貴之		秋田県衛生科学研究所
	藤井伸一郎、松館宏樹、		
	佐藤卓、蛇口哲夫		岩手県環境保健研究センター
	谷津壽郎、田村広子、三品道子、		
	菅原直子、佐藤由美、		
	富山敬、山口友美		宮城県保健環境センター
	沼田昇		仙台市衛生研究所
	村田敏夫、最上久美子、		
	大谷勝実、水田克己		山形県衛生研究所
	熊谷奈々子、須釜久美子、		
	平澤恭子、長沢正秋、渡部啓司		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
	木村浩一、伊東拓也、合田悟		北海道立衛生研究所

研究要旨：今回の精度管理（施設間差の検討）では、2群の試料を時間間隔をあけて別々にパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）による解析を実施した場合、2群の解析結果を正確に比較出来るかどうか検討することを目的とした。11月に4株、12月に4株の大腸菌O157:H7を各地方衛生研究所に送付し、それぞれ送付後直ちにPFGE解析を行った上、2回の解析結果を同一データベースに登録して解析することとした。解析にあたっては、アルゴリズムによる差を見るため、通常行われているDice法以外に、Peason法による解析も併用した。アルゴリズムの差が明確に示されるよう、送付した2群には、それぞれ1株のみ共通の菌株を入れた。同一施設内であっても、PFGEを行う時期により室温などの変動要因が加わる上、泳動パターンをデータベースに登録する際のバンド位置の微妙な読み取り誤差が当然発生し、解析結果がこれらの影響を受けることは避けられない。PFGE解析のアルゴリズムにはいくつかの種類が存在するが、昨年度の発表で、Peason法が誤差影響を比較的受け難いとの報告があったので、通常行われているDice法との比較を行ったものである。

- A. 目的
- | | |
|---|---|
| 細菌性食中毒や感染症においては、一見すると散発性に思われる事例がPFGE解析や疫学 | データの照合によって広域性の集団感染事例であったというケースがある。この場合には、PFGEの正確な解析が必要であり、個々の衛生 |
|---|---|

研究所におけるPFGEに関するスキルアップが必須条件である。そのために、北海道・東北・新潟ブロックでは、PFGEに関する精度管理を実施しており、技術面での維持向上に努めてきた。今年度においても、アプローチの方法を検討しつつ、施設間差を検討した。

B. 研究方法

菌株：北海道立衛生研究所に保存されている大腸菌O157:H7株から、PFGE上で比較的太いバンドが多く見られる7株を選定した。この中から6株を3株ずつ分けて、1回目および2回目用試料とした。残り1株は、1回目と2回目試料の両方に入れた。1回目試料は菌株No.1~4、2回目試料は菌株No.5~8と番号を付けた(表1)。1回目試料は11月、2回目試料は12月に各地方衛生研究所(地研)に送付した。1回目と2回目試料に同じ菌株が入っていることは通知しなかった。

PFGE解析：2回に分けて送付した試料は、それぞれ各地研において到着後直ちにPFGE解析を行った。1回目の試料をデータベースに登録した後は、同じ試料を再度PFGEしないよう求めた。また、1回目と2回目の試料を同時にPFGEしないよう求めた。各地研で2回目試料のPFGE解析結果を1回目試料と同じデータベース上に登録した後、両方のデータをDice法およびPeason法で解析した。Peason法については、パラメーターの設定値についての資料が無く、各地研でデフォルトのまま解析した。使用している解析ソフトがDice法あるいはPeason法をサポートしていない場合には、サポートしている方法でのみの解析を行った。解析ソフトを保有していない施設については、PFGEの泳動像写真を北海道立衛生研究所にて解析した。

C. 結果

送付した菌株のうち、No.3は、2種類のPFGEパターンが出現したため、解析結果から

除外した。No.3株を除外した各施設での解析結果を図1、2に示した。また、同一株であるNo.2とNo.7について各アルゴリズムで計算された類似度を表3に示した。なお、解析ソフト保有の関係から、施設H、I、Jの解析は同一施設で行った。また、施設Eについては、アルゴリズムが不明なため、表には数値を記載しなかった。

同一株であるNo.2とNo.7についての類似度(表2)であるが、本来であれば100%と計算される筈である。しかし、当所を含む8地研では、いずれのアルゴリズムでもNo.2とNo.7を同じPFGEパターンとは認識出来なかった。残り2施設(AおよびC)では、Dice法で類似度100%と計算された。このうち1施設(C)では、Peason法による解析がされていないのでアルゴリズム間での比較は出来なかったが、残り1施設(A)では、Dice法でのみ100%と計算され、Peason法では94.5%の類似度であった。表2の数値を用い、Dice法およびPeason法の両方の類似度が計算されている8施設間で、両アルゴリズム間の差を検定したが、比率検定、順位検定のいずれでも有意差は認められなかった。

また、系統樹の枝分かれ、すなわち各菌株のグルーピングについて見ると、Peason法による系統樹(図2)では、各施設とも同じ枝分かれを示していたが、Dice法による系統樹(図1)では、2施設(BおよびC)でPeason法とは異なる枝分かれを示す結果となった。

D. 考察

Dice法、Peason法それぞれのアルゴリズムによる解析には、当初予想していた有意差を認めることは出来なかったが、同じ菌株を正確に認識出来たのはDice法のみであった。施設Aの結果に示された通り、同じバンドデータを用いているにもかかわらず、Peason法では、同じ菌株を識別することが出来なかった。逆に、各菌株間の関係を示す系統樹では、Peason法で

全施設が同じパターンを示し、Dice法では異なるパターンとなる例が認められた。現在、Dice法においては各パラメーターを統一して解析しているが、Peason法についてはデフォルトのまま使用しており、パラメーターの調整によってPeason法でも異なる結果が得られる可能性はある。また、施設H、I、Jについては、両アルゴリズムともほぼ同じ値を示しているが、この3施設については、PFGEを各施設ごとに行った後、解析をすべて同じ施設で同一人物が行った。したがって、解析結果の数値の差は、PFGEの条件より解析者の要因がより大きなウエイトを示すのではないかとと思われる。同じ菌株であるNo.2とNo.7の解析結果のバンド位置を詳細に分析すると、特に太いバンドについて、1回目と2回目の試料で、同一施設でも1本のバンドと判定している場合と、2本のバンドの重なりと判定している場合があった。これは、解析担当者が時期によって異なったり、同一人でもいくつかのPFGEを解析を行っている間に、バンドの判断基準が微妙に変化するなどの要因が考えられる。また、施設が異なれば、それぞれの担当者によってバンドに対する判断基準も様々である可能性があり、特に太いバンドパターンが出現する菌株に対応するために、何らかの統一的判断基準を整える必要があると思われる。

施設HでのNo.2とNo.7の解析画像（図1、2）を見ると、バンドの数は同じであるものの、バンド位置に大きな違いが示されていた。そこで、PFGE像そのものでNo.2とNo.7を比較すると、図3のように、マーカーのバンド位置を揃えた場合、全く同一パターンを示していた。写真から直接読み取れるバンドの数と解析画像のバンド数も一致していたが、バンドの相対位置に大きな差異が認められた。これは、解析ソフトがマーカーのバンドに合わせ、試料の泳動バンド位置を正規化した結果であり、本来であれば、この正規化によって、異なる施設間、あるいは異なる解析者間でのPFGEパターン

比較の精度を保証しているのである。しかし、施設Hの結果からは、正規化によって逆の結果が得られたことを示している。このような現象が発生する原因は不明であり、他の施設でも同様の問題が生じていないか、今後検討を続けたい。

E. 結論

通常使用しているアルゴリズムであるDice法とPeason法との比較では、同じ菌株を用いた検討において100%の類似度を示したのはDice法のみであった。この類似度については両者間で統計学的優位さは認められなかった。菌株のグルーピングについては、Peason法では全施設が同じパターンを示したが、Dice法では異なるパターンを示した例が認められた。これは用いているパラメーターの統一性の問題かもしれない。また、PFGE解析の結果に影響する因子としてバンド認識に対する判断基準の相違が考えられることから、何らかの統一的判断基準を設定する必要がある。ソフト上の問題として、PFGE画像では同じパターンを示しているように見える菌株を正規化することにより逆に異なるパターンとして認識される例があった。この問題については、今後も検討を要する。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

Masakado Matsumoto, Yasumoto Suzuki, Hideki Nagano, Jun Yatsuyanagi, Hajime Kurokawa, Kazuhiro Kobayashi, Koji Yamaoka, Kazumi Horikawa, Jun Kudaka, Jun Terajima, Haruo Watanabe and Yutaka Miyazaki. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis analysis performed at selected prefectural institute of public health for use in PulseNet Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 58: 180-183 2005.

表1 精度管理に使用した菌株

送付No.	菌性状	菌株
送付1回目		
1	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	a
2	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	b*
3 ⁺	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	c
4	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	d
送付2回目		
5	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	e
6	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	f
7	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	b*
8	0157;H7 VT1(+) VT2(+)	g

表2 精度管理に使用した菌株

*, No.2とNo.7は同じ菌株

+, PFGEパターンが2種類出現し除外

表2 同一株であるNo.2とNo.7の計算上の類似度 (%)

施設	解析アルゴリズム	
	Dice法	Peason法
A	100.0	94.5
B	97.2	94.7
C	100.0	—
D	94.1	96.8
E*	—	—
F	97.6	96.2
G	97.3	93.9
H	94.7	95.1
I	94.7	95.2
J	94.7	95.2

*, 施設Eは、解析アルゴリズムが不明なため除外

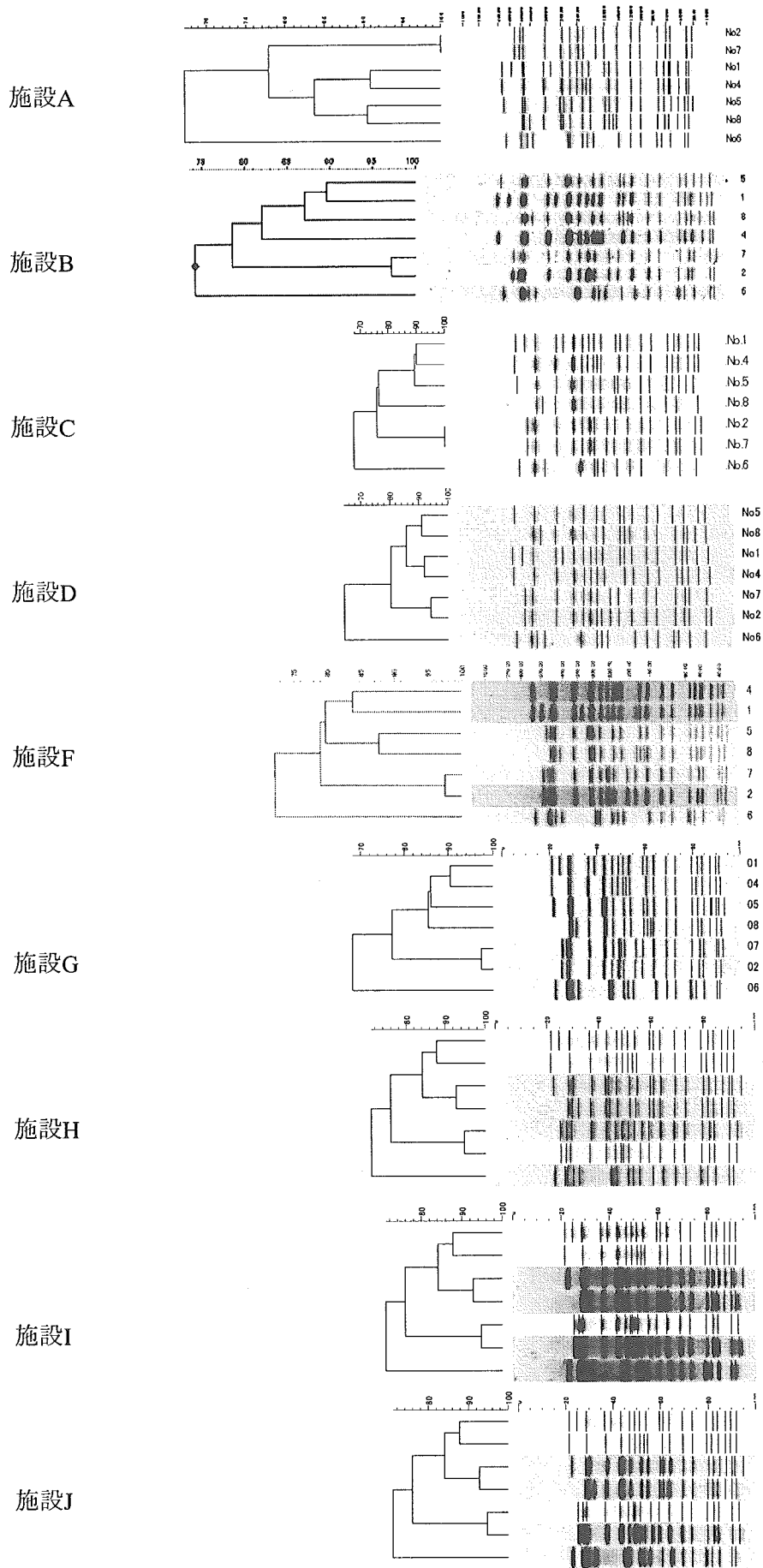


図1 Dice法による解析結果

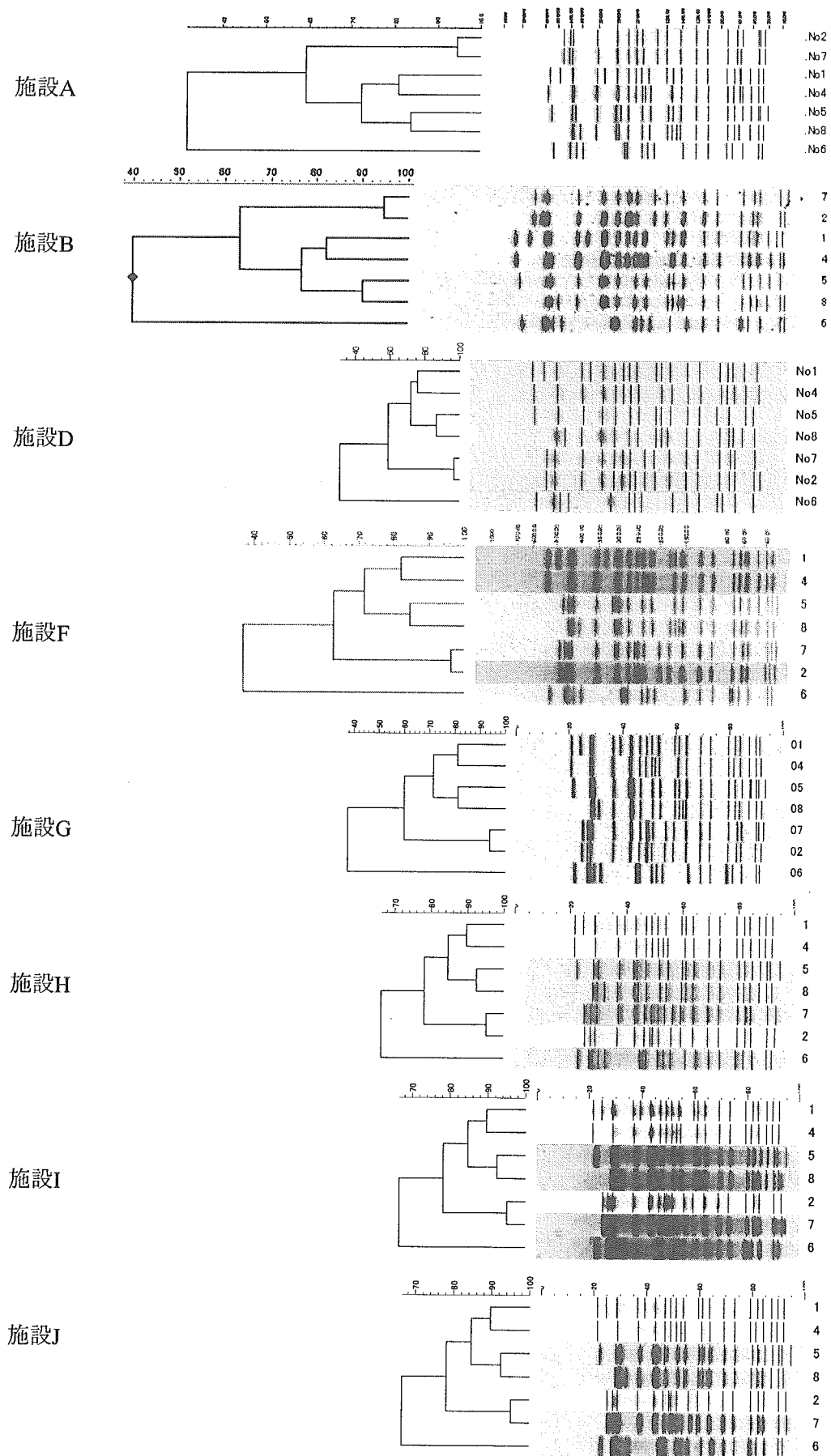


図2 Peason法による解析結果