

第2回会議（平成17年12月）において、精度管理の際の同様なバンド本数の相違が北海道、近畿、及び中国・四国ブロック代表者からも報告があった。さらに各ブロック代表者より「同一0157であっても継代培養によってPFGEバンド3本程度の相違が現れることがある」との指摘があった。すなわち菌株によっては遺伝子レベルで不安定な0157が存在していることが考えられる。この点に関してさらに検討を加える必要があるが、集団発生及びdiffuse outbreakからの検体のPFGEではこのような現象が発生する可能性があることも考慮する必要があるものと思われる。

#### E. 結論

パルスネットジャパン構築のための準備活動として東海・北陸地方8地方衛生研究所（地研）と豊田市衛生検査所（豊田市）による腸管出血性大腸菌0157を用いた精度管理を実施した。

PFGE実施条件はサルモネラマーカ使用とPFGE泳動条件は統一し、その他は感染研の実施条件または各施設の独自法で平成15年度及び16年度の何れかまたは両年に使用したPFGE型の異なる2検体（検体番号3, 4）について行なった。その結果、9施設全ての泳動図は解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。施設間の同一性の比較を行なったところ、2検体で検体ごとに同一のクラスターを形成した。その同一性は検体3, 4でそれぞれ78.6%、87.8%であった。また、検体3の同一性は平成15年度の89.2%よりは低かったものの平成16年度の76.4%よりは高い値となった。一方、検体4では平成16年度の82.4%より高い値であった。このことから、サルモネラマーカ使用とPFGE泳動条件は統一が東海・北陸地方各施設のPFGE泳動図の同一性を76%以上に保つことに重要であると思われる。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

誌上発表

Matsumoto M, Suzuki Y, Nagano H, Yatsuyanagi J, Kurosawa H, Kobayashi K, Yamaoka K, Horikawa K,

Kudaka J, Terajima J, Watanabe H and Miyazaki Y. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis Performed at Selected Prefectural Institutes of Public Health for Use in PulseNet Japan.

Jpn J Infect Dis. 2005; 58: 180-183.

Matsumoto M, Sakae K, Hashikawa S, Torii K, Hasegawa T, Endo M, Okuno R, Murayama S, Hirasawa K, Suzuki R, Isobe J, Tanaka D, Katsukawa C, Tamaru A, Tomita M, Ogata K, Yasuoka T, Ikebe T, Watanabe H and The Working Group for Group A Streptococci in Japan and Ohta M. Close correlation of Streptococcal DNase B (sdaB) alleles with emm genotypes in *Streptococcus pyogenes*. Microbiol Immunol. 2005; 49, 925-929.

Hiramatsu R, Matsumoto M, Sakae K, Miyazaki Y. Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. To Survive in a Desiccation Model System and in Dry Foods.

Appl Environ Microbiol. 2005 71:6657-63.

学会発表

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

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

第79回日本感染症学会総会

名古屋市 2005.4.14.

表 1 感染研の PFGE 実施条件

感染研New Protocol in 2004 (STEC, <i>Shigella</i> )	
Cell suspension buffer	DW(精製水) OD610nm = 0.5 - 0.6
Plug agrose	Cell suspension buffer 200 $\mu$ l と1% SeaKem Gold Agarose in DW 200 $\mu$ lを混和。
Lysis buffer	1mg/ml Proteinase K, 1% N-Laurylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) (2h-overnight, 50°C)
Washes	4 mM Pefabloc SC in TE (20min, 50°C, 2回)→TEで洗浄(20 min 1回, on ice) →Enzyme buffer (20min, on ice)
Restriction digestion	20-30U/sample ( <i>Xba</i> I) at 37°C for 2h-overnight.
Electrophoresis condition	6V/cm, 2.2-54.2s, 19h, 12-15°C, 1% Seakem Gold Agarose 0.5 $\times$ TBE
Marker	<i>Salmonella</i> Braenderup H 9812 PulseNet Standard Strain (Digested by <i>Xba</i> I)

表 2 東海・北陸9施設の PFGE 実施条件

	地研の数(n=9)
泳動条件	感染研:8 感染研類似:1
DNA調製、及び制限酵素処理	感染研:3 感染研類似:3 キット:3

表3 検体3, 4の東海・北陸地方施設間相同性(%)の年度別比較

	15年度	16年度	17年度
#3	89.2	76.4	78.6
#4	実施せず	82.4	87.8

図1 検体3, 4の系統樹解析

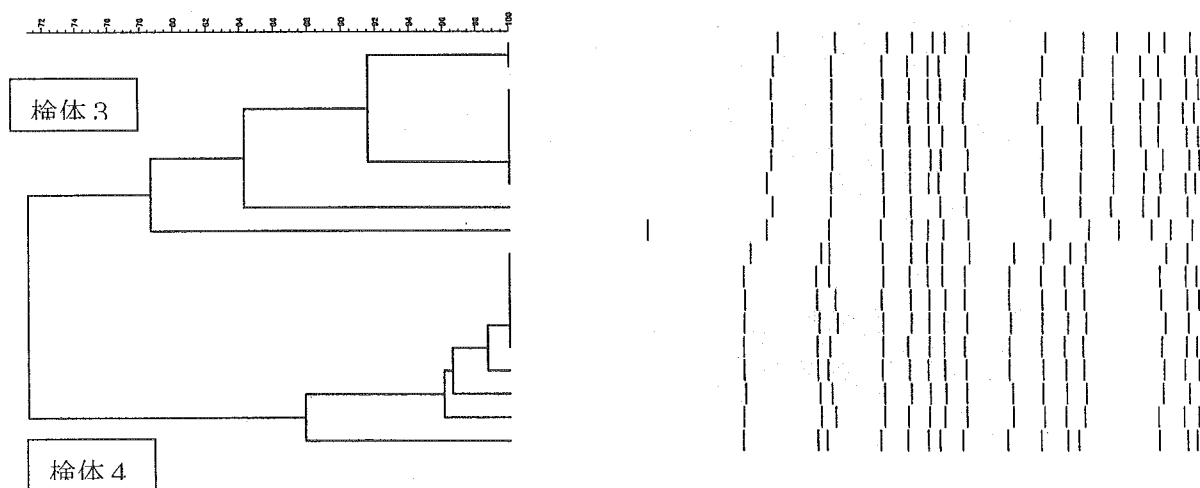


図2 9施設の泳動図

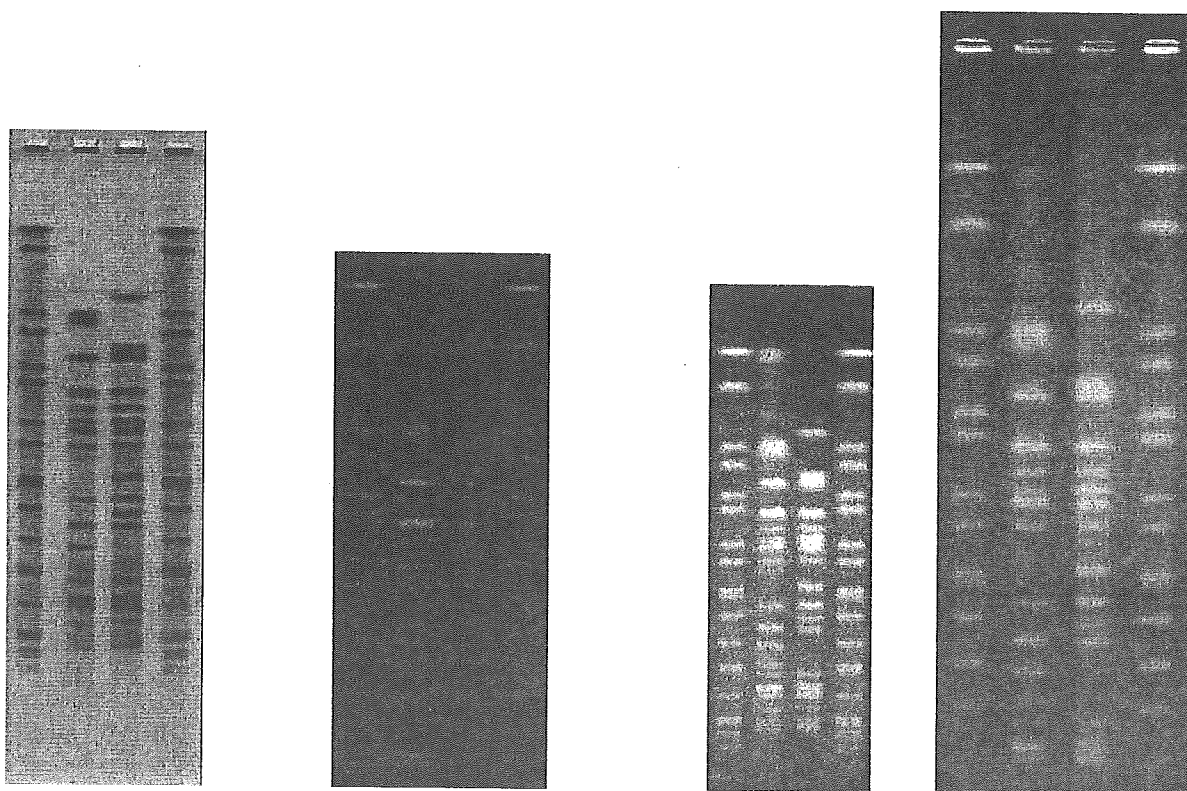
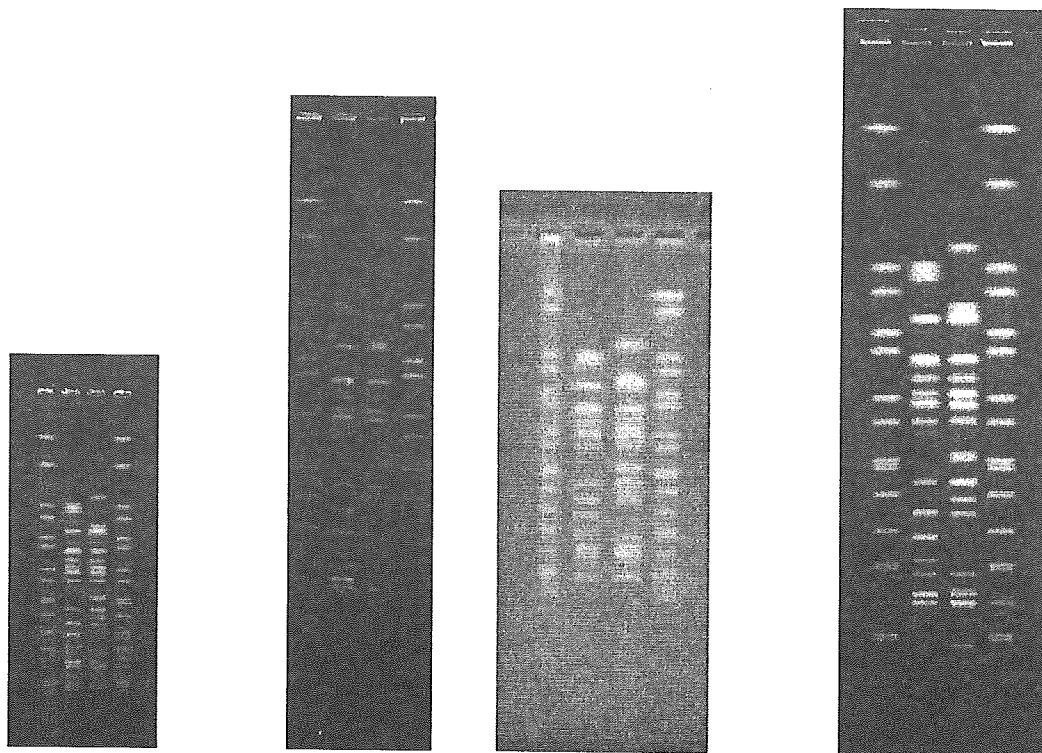
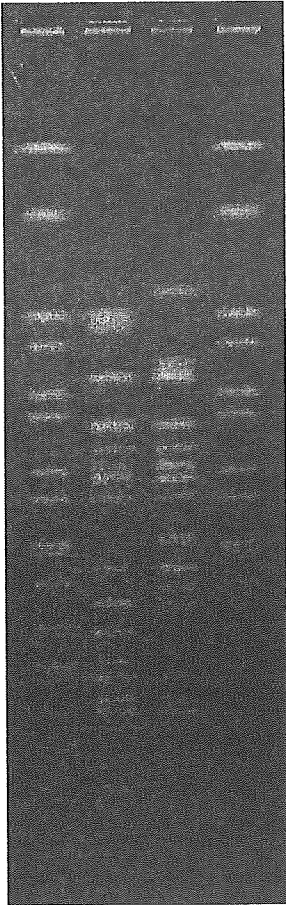


図2 9施設の泳動図



分担研究・*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への2000年以降に検出された *S. Typhimurium* の追加

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所  
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  
白木 豊 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  
田中大祐 富山県衛生研究所

研究要旨

2000年以降愛知県（7株）、岐阜県、石川県、及び富山県（それぞれ2株）で検出された13株の *S. Typhimurium* のパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）データについて平成15年度に作成した80年代から90年代に愛知県で検出された *S. Typhimurium* 143株のPFGEデータベースへの追加を行なった。合計156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、156株は17のクラスター（n=125）と31の1菌株1PFGE型（n=31）に分類された。

2000年以降検出された13株のうち9株は何れかのクラスターに属した。その9株のうち愛知県で検出された5株は2株以上の菌株が含まれる主要なクラスター（C1, C3, C6）に属していた。一方、岐阜県で検出された2株に関してはこれら2つで独立したひとつのクラスター（C16）を構成していた。富山県で検出された1株は2000年以降に愛知県で検出された1株と共にひとつのクラスター（C17）を構成していた。一方、石川県で検出された2株は何れも1菌株1PFGE型であった。さらに愛知県及び富山県でそれぞれ検出された1株も1菌株1PFGE型に属していた。

以上の結果から、愛知県で2000年以降検出された *S. Typhimurium* 7株中5株が80年代から90年代に検出された *S. Typhimurium* が含まれるクラスターに属したことから、愛知県においては80年代以降比較的長期間に渡って類似したPFGE型の *S. Typhimurium* がヒトから検出されていることが推察された。一方、岐阜県、石川県、富山県で検出された *S. Typhimurium* に関しては、富山県で検出された1株が愛知県で検出された菌株と同じクラスターに属したが、残りの5株は愛知県とは異なるクラスターもしくは1菌株1PFGE型であった。このことは限られた数ではあるが、他県で検出された *S. Typhimurium* はPFGE型が愛知県とは異なっている可能性が示唆された。

## A. 研究目的

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。

平成15年度研究班活動の一環として愛知県で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。その結果、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。クラスターに含まれる菌株数は10のクラスターが22から3株であったが、残りの10のクラスターは含まれる株数が2株のみであった。前期のみに検出されたクラスターは7つで含まれる菌株数は19であったが、これら過半数以上(13株、68.4%)が薬剤感受性株、また4剤以上の薬剤に耐性を示す多剤耐性菌は全く認められなかった。後期のみ認められたクラスターは9つで、これらクラスターに含まれる菌株数は40であった。このうち25株(62.1%)が耐性を示し、このうち16株(64%)は4剤以上に耐性を示す多剤耐性菌であった。残りの4クラスターは前期及び後期共に認められた。そして、これらクラスターに含まれる菌株は前期(16株中8株が耐性菌(50%))に比べ後期(23株中18株(78.3%))の方が耐性菌の割合が高かった。全体で7株検出された *S. Typhimurium* DT104はクラスターには6株認められ、このうちの5株はクラスター3(C3)に属しており前期、後期共検出された。1菌株1 PFGE型に型別分類されたのは45株であった。前期26株中18(69.2%)株が耐性を示したが、このうちの12株(66.7%)は1-3剤耐性であった。一方、

後期に検出された19株は全て耐性を示し、このうち11株(57.9%)は4剤以上の抗生剤に耐性を示した。また、*S. Typhimurium* DT104が前期に1株認められた。後期に多数検出された4, 5, 及び6剤耐性菌はそれぞれ全体の菌株数の1/2から1/3を占める1つのクラスターとその他のクラスター及び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。また、後期に検出された9クラスターのうち、6つは後期のみから検出されていたが、残りの3つのクラスターは前期、後期何れからも検出された。これらの結果から、後期に多数出現した4剤-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。

平成17年度研究班活動では80年代から90年代に検出された143株のPFGEデータベースに2000年以降に愛知県、岐阜県、石川県、及び富山県で検出された13株の *S. Typhimurium* データを追加した。そして、これら *S. Typhimurium* が90年代以前に検出された *S. Typhimurium* と同じクラスターに含まれるか否か、岐阜県、石川県、富山県で検出された *S. Typhimurium* が愛知県で検出された *S. Typhimurium* と同じクラスターに含まれるか否か等について検討した。

## B. 研究方法

菌株：合計13株の *S. Typhimurium* を用いた。その内訳は愛知県内で2000年から2003年に保健所において健康保菌者から検出された7株と2001年から2005年の間に岐阜県、石川県、富山県で検出された(各県2株づつ)6株である。PFGE：*S. Typhimurium* の一夜培養液100 $\mu$ lを遠心後、滅菌蒸留水にて洗浄し、菌液を等量の1.6%軟寒天と混和した。その100 $\mu$ Lをインサートプラグ内に注入し、氷中で30分放置した。固化したゲルをプロテナーゼKで処理した後、制限酵素 *Bln* I で処理を行ない、CHEF DR III (バイオラド社)によって電気泳動を行なった。泳動条件は、電圧6V/cm、泳動時間21時間、パルスタイム2.2秒から63.8秒である。マーカーは *Salmonella* Braenderup H9812の制限酵素 *Xba* I 消化DNAを用いた。型別分類は、解析ソフト「フィンガープリントII」を用いて、お互いのバンドの相違に基づく相同性(%)から系統樹

を作成した。そして、お互いの菌株間の相同性が75%以上を示し、かつ2株以上の菌株が含まれるものを同一クラスターし、含まれる菌株数が多いものから順にCの後に1から算用数字を付けた（例えばC1, C2, C3----）。

## C. 研究成果

### [I] PFGE 解析

2000年代に検出された13株及び90年代以前に検出された143株の計156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、156株は17のクラスター（n=125）と31の1菌株1PFGE型（n=31）に分類された（図1）。

#### 1. クラスター

表1には検出されたクラスターに含まれる菌株数、その菌株の分離年を示した。クラスターに含まれる菌株数が最も多かったのはC1で46株、次いでC2で27株、以下C3（10株）、C4（8株）、C5、C6（5株）、C7（4株）、残りの10クラスター（C8-17）は含まれる株数が2株のみであった。前期（80年代）のみに検出されたクラスターは3つ（C8, 11, 15）で、これらクラスターに含まれる菌株数は6であった。一方、後期（90年代）のみに認められたクラスターは4つ（C5, 9, 12, 13）であった。これらクラスターに含まれる菌株数は11であった。2000年以降のみに検出されたクラスターは2つ（C16, 17）でこれらクラスターに含まれる菌株は4つであり、そのうち3つは岐阜県及び富山県で検出された。前期、後期及び2000年以降共に認められたクラスターは2つ（C1, C3）であった。これらクラスターに含まれる菌株数は56であった。前期及び後期のみに認められたクラスターは5つ（C2, 4, 7, 10, 14）であり、43株が含まれた。後期及び2000年以降のみに認められたクラスターは1つ（C6）のみで株数は4つであった。

#### 2. 1菌株1PFGE型

前期、後期、2000年以降併せて31株が1菌株1PFGE型に型別分類された（表2）。このうち前期は17株（54.8%）、後期10株（32.3%）、

2000年以降4株（12.9%）であった。

### 3. 2000年以降検出された*S. Typhimurium*（13株）のクラスター及び1菌株1PFGE型

愛知県で検出された7株は6株が4つのクラスターに属していた。C3には3株が含まれ、C1、6、17にそれぞれ1株が含まれていた。残りの1株は1菌株1PFGE型属していた。岐阜県で検出された2株は何れもC16に属していた。富山県で検出された2株はひとつがクラスター（C17）、もうひとつは1菌株1PFGE型に属していた。石川県の2株は何れも1菌株1PFGE型であった。

## D. 考察

2000年以降検出された13株の*S. Typhimurium*について平成15年度に作成した愛知県で80年代から90年代に検出された*S. Typhimurium*のPFGEデータへの追加を行なった。その結果、9株は何れかのクラスターに属した。9株のうち愛知県で検出された5株は2株以上の菌株が含まれる主要なクラスター（C1, C3, C6）に属していた。一方、岐阜県で検出された2株に関してはこれら2つで独立したひとつのクラスター（C16）を構成していた。富山県で検出された1株は2000年以降に愛知県で検出された1株と共にひとつのクラスター（C17）を構成していた。一方、石川県で検出された2株は何れも1菌株1PFGE型であった。さらに愛知県及び富山県でそれぞれ検出された1株も1菌株1PFGE型に属していた。

以上の結果から、愛知県で2000年以降検出された*S. Typhimurium* 7株中5株が80年代から90年代に検出された*S. Typhimurium*が含まれるクラスターに属したことから、愛知県においては80年代以降比較的長期間に渡って類似したPFGE型の*S. Typhimurium*がヒトから検出されていることが推察された。岐阜県、石川県、富山県で検出された*S. Typhimurium*に関しては、富山県で検出された1株が愛知県で検出された菌株と同じクラスターに属したが、残りの5株は愛知県とは異なるクラスターもしくは1菌株1PFGE型であった。このことは限られた数ではあるが、他県で検出された*S. Typhimurium*はPFGE型が愛知県とは異なっている可能性が示唆さ



れた。

#### E. 結論

愛知県、岐阜県、石川県、及び富山県で2000年以降検出された13株の*S. Typhimurium*について80年代から90年代に検出された*S. Typhimurium* 143株のPFGEデータへの追加を行なった。その結果、愛知県で2000年以降検出された*S. Typhimurium* 7株中5株が主要な3つのクラスターに属したことから、愛知県においては80年代以降比較的長期間に渡って類似したPFGE型の*S. Typhimurium* がヒトから検出されていることが推察された。岐阜県、石川県、富山県で検出された*S. Typhimurium* に関しては、富山県で検出された1株が愛知県で検出された菌株と同じクラスターに属したが、残りの5株は愛知県とは異なるクラスターもしくは1菌株1PFGE型であった。このことは限られた数ではあるが、

他県で検出された*S. Typhimurium* はPFGE型が愛知県とは異なっている可能性が示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。

##### 3. その他

なし

表1 各クラスターに含まれる菌株数とその菌株の分離年

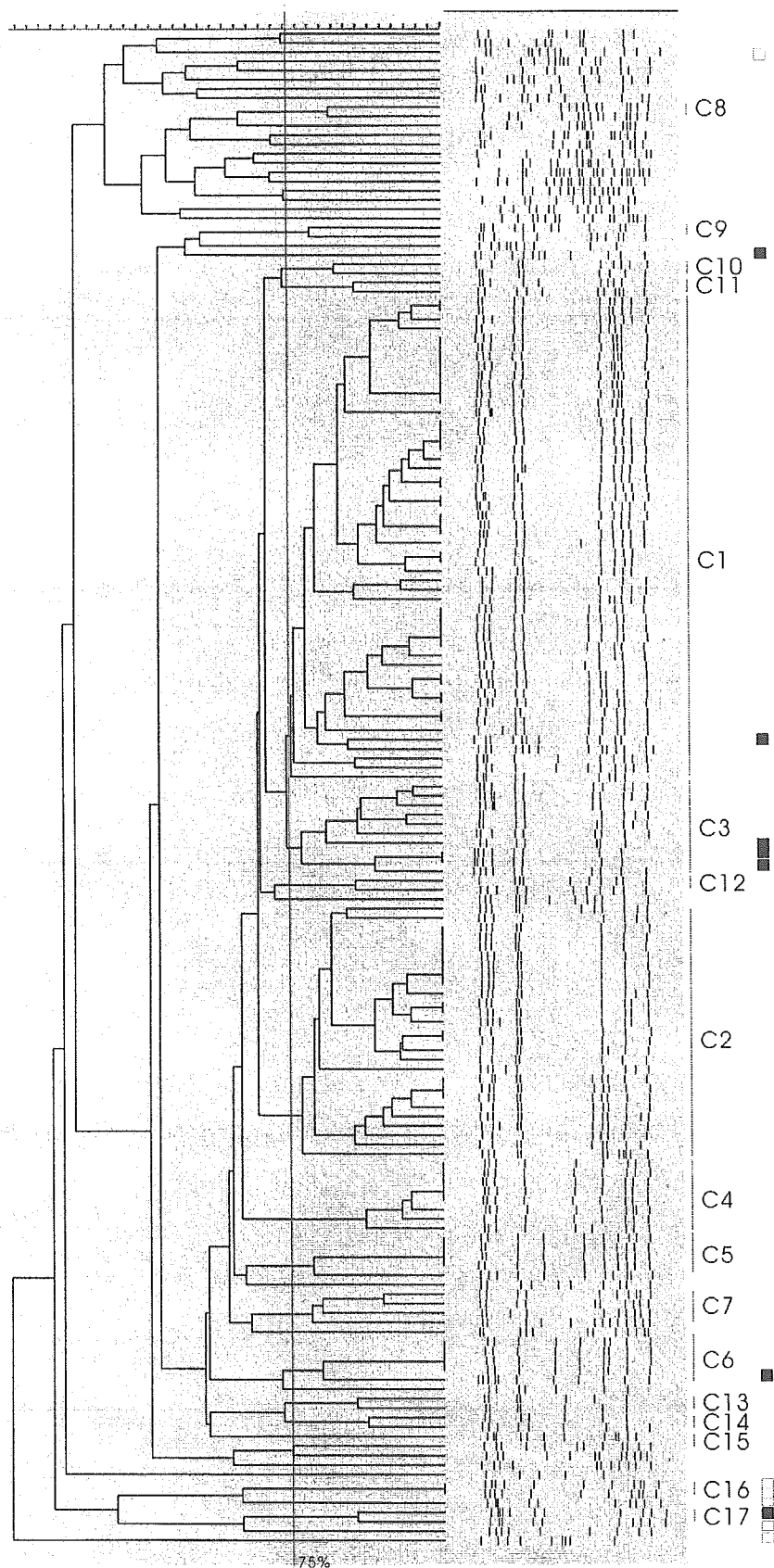
クラスター	前期 (80年代)	後期 (90年代)	2000年以降	合計
C1	20	25	1	46
C2	8	19	0	27
C3	2	5	3	10
C4	3	5	0	8
C5	0	5	0	5
C6	0	4	1	5
C7	1	3	0	4
C8	2	0	0	2
C9	0	2	0	2
C10	1	1	0	2
C11	2	0	0	2
C12	0	2	0	2
C13	0	2	0	2
C14	1	1	0	2
C15	2	0	0	2
C16	0	0	2	2
C17	0	0	2	2

表2 1菌株1 PFGE型に含まれる菌株数とその菌株の分離年

	前期 (80年代)	後期 (90年代)	2000年以降	合計
	17	10	4	31

図1 *S. Typhimurium* の PFGE 系統樹及びバンド模式図

C:クラスター、■:愛知県検出株、□:岐阜県、石川県、富山県検出株。



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 17 年度分担研究報告書

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

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	滋賀県立衛生科学センター
	藤原恵子	京都府保健環境研究所
	平野 隆	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
	柴井 毅	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
	山崎 渉	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

食品由来感染症が近畿ブロック内で広域に発生した場合に、PFGE 型別法を共通の疫学指標として使用するため、11 衛生研究所の施設間差および 2 名の解析者による変動を検討した。精度管理株として腸管出血性大腸菌（EHEC）O157:H7 5 株を配布し、各施設で実施した PFGE 画像について解析を行った結果、菌株ごとに近似度 94%以上のクラスターを形成し、いずれの解析者においても良好な結果が得られた。しかし、画像のコントラストには施設間差があり、画像解析ソフトの自動バンド認識を目視で補正する必要があった。

また、各施設で 2005 年 5 月～8 月に分離された EHEC O157 の PFGE を実施し、画像を集めて解析したところ、供試した 84 株のうち 12 株が同一パターンを示した。このパターンと 1～2 本異なる 11 株を合わせた 23 株は、近似度 94.8%のクラスターになり、関連性が示唆された。このように、各自治体では散发発生であっても広域流行が疑われる場合もあり、施設間で比較解析の可能な解像度の高い PFGE 画像を得るために、技術の維持と機器類の保守管理が必要である。

## A.研究目的

食品流通や外食産業の現状を見ると、食品由来感染症は広域で発生するリスクがある。また、各府県が互いに通勤圏内であるという近畿ブロックの特性を考えると、各自治体では散発事例であっても、同一感染源が疑われる場合もあり、発生動向調査を通じた連携とともに、細菌学的疫学解析の必要性は高い。

腸管出血性大腸菌（EHEC）を始めとする腸管起病性細菌について、パルスフィールド電気泳動（PFGE）法による遺伝子解析の有用性は確立されているが、近畿ブロックの11衛生研究所において共通の疫学指標として使用するため、同一の菌株を用いた精度管理を行い、施設間差および解析者による変動を検討した。また、2005年夏季に分離されたEHEC O157について、各施設で実施したPFGE画像を集めて解析し、流行菌型のさかのぼり調査を行った。

## B.研究方法

### 1.供試菌株

施設間変動の検討には、2005年に大阪府で分離されたEHEC O157:H7 5株（No.1～5）を用い、*Xba*I切断されることを確認の上、11施設に配布した（表1）。

流行菌型のさかのぼり調査には、各自治体で5～8月に分離されたEHEC O157を任意に選んで供試した。菌株情報として、毒素型、発症日または検体採取日を添付した。

### 2.PFGE法

平成15年度に示された感染研新プロトコールに準じ、Proteinase K処理を50℃一夜、制限酵素*Xba*I処理を37℃2時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strainの*Xba*I切断を使用した。

プラグ作成および電気泳動にはSeaKem Gold Agarose（タカラ）の使用を指定したが、制限酵素や泳動用バッファーなど他の試薬は、各施設で日常使用している製品を用いた。

泳動時間は19時間を目安として、各施設の泳動装置でゲル下端から1～1.5cm程度の泳動距離になるようにした。

また、泳動像はサイズマーカーのband 9とband 10が明瞭に2本に分かれ、band 16が認識できることを条件とした。

### 3.PFGE画像の解析

PFGE画像を電子メールで施設Xに集約し、施設間変動の検討では、施設X（A解析者）および施設Y（B解析者）の2箇所、FingerprintingIIバージョン3（Bio-Rad）を用いて解析した。流行菌型のさかのぼり調査は、施設X（A解析者）のみで解析した。

いずれも、バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ5%、シオルダー感度0で行い、目視で補正した後、20.5kb～1135kb間のバンドについて類似係数Dice、デンドログラムタイプUPGMA、トレランス設定は最適化0%、トレランス1.2%でデンドログラムを作成した。

## C. 研究結果

### 1. 施設間変動について

各施設の電気泳動条件をみると、泳動温度は全施設で 14℃であったが、泳動時間は 17～20 時間と 3 時間の開きがあり、19 時間が最も多く 6 施設であった (表 2)。バッファメーカーによる違いは認められなかった。

電送された PFGE 画像は、いずれの施設も目視でサイズマーカーの band 9、band 10、band 16 が認識できたが、画像全体が白っぽくコントラストの弱い画像も見られた。また、サイズの小さいバンドは明瞭に分離されているものの、大きいバンドが太すぎる画像も見られた (図 1)。したがって、自動バンド認識後に目視補正が必要であったが、画像解析から得られたデンドログラムは、解析者にかかわらず菌株ごとに高い近似度でクラスターを形成し、良好な結果を示した (図 2、図 3)。

A 解析者では、菌株 No.1 で 10 画像が 100% 一致し、11 画像の近似度は 97.8% であった。また、菌株 No.2 はバンド数 20 本の 7 画像と 21 本の 4 画像が各々 100% 一致し、11 画像の近似度は 97.6% であった。菌株 3、4、5 は各々バンド数が 3 本異なり、いくつかのクラスターに分かれたが、100% 一致する画像も 2～5 画像見られ、11 画像の近似度はそれぞれ 95.0%、94.4%、94.1% であった (図 2、表 3)。

B 解析者では、菌株 No.3 で 10 画像が 100% 一致と判定され、11 画像の近似度は 97.5% であった。また、菌株 No.1 は、バンド数 22

本と 23 本の 5 画像ずつが 100% 一致し、11 画像の近似度は 96.7% であった。菌株 No.2、No.4、No.5 はいずれもバンド数が 2 本異なっていたが、4～5 画像ずつが 100% 一致し、11 画像の近似度は 96% 以上を示した (図 3、表 3)。

### 2. 流行菌型のさかのぼり調査

各自治体で分離された EHEC O157 について、10 施設から 2～15 株の PFGE 画像が電送された。合計 84 株 (Stx 1、Stx 2 産生株 61 株、Stx 2 産生株 23 株) について、デンドログラムを作成した (図 4)。

100% 一致した画像は 13 組 43 株あり、これを Type 1～13 と命名した。Type 4 は最大のクラスターで、5～6 月に分離された奈良県の家族事例 2 事例 7 株と、京都府、兵庫県、大阪市、奈良県の散発事例各 1 株、姫路市の家族事例 (図 4★) のうちの 1 株の計 12 株が同一パターンを示していた。姫路市家族事例の残りの 1 株は、Type 4 と 1 本異なっており、近似度は 94.8% であった。この近似度 94.8% のクラスターは 23 株からなり、Type 4 と 1 本異なる Type 3、Type 5、Type 6、および 2 本異なる Type 7 が含まれていた。

この他に家族事例であることが判明したものは 3 事例あり、大阪府の 1 事例由来 2 株は 100% 一致 (Type 12) したが、兵庫県の 2 事例 (各 2 株) は近似度 95.2% と 89.1% (図 4☆) で、それぞれ 2 本および 3 本の相異があった。

## D. 考察

EHEC O157 は本研究で毎年精度管理を実施しており、各施設でも PFGE 実施の機会が多いことから、技術的な施設間差はある程度解消され、どの施設でも画像解析に適した泳動像が得られた。しかし、画像のコントラストは均質ではなく、精度管理株、各施設分離株ともに画像解析ソフトを用いたバンド検索を目視で修正する必要があった。

精度管理株の検討では、施設 11 の菌株 No.5 の 340~390Kb 付近に見られたように、一部の画像では未消化バンドが薄く残っていたが（図 1）、両解析者ともに目視補正の際に削除しており、画像解析に影響は見られなかった。一方で、解析者によって認識バンド数の異なる画像が見られ、全 55 画像のうち 22 画像は同数であったが、27 画像は A 解析者で多く認識されていた。これは、太いバンドを A 解析者では 2 本、B 解析者は 1 本と判断していたためで、特に菌株 No.2 は 2 画像で A 解析者が 2 本多く認識していた（図 2、図 3）。

しかしながら、得られたデンドログラムは、両解析者とも菌株ごとに近似度の高いクラスターとなり、同一人が解析する場合には、目視補正における解析者の主観は結果に影響を与えないと考えられた。

各解析者において、同一株の画像による認識バンド数のばらつきは、A 解析者で 1~3 本、B 解析者で 1~2 本で、いずれもばらつきが小さい株では高い近似度が得られていた（表 3）。菌株 No.1 は、施設 10 で 390Kb 付近のバンドが欠失していたが（図 1）、これは供試菌株の前培養の段階で欠失株が選

択されたと考えられる。他の画像については、解析者間の差と同様に太いバンドの認識数が異なっていた。

菌株によっては、複数のバンドが隣接するパターンになり、正確なバンド認識には高い解像度が要求される。画像のコントラストやバンドの明瞭さに見られる施設間差は、電気泳動装置の冷却能力やトランスイルミネーターの紫外線強度、写真撮影条件に起因している可能性があり、これらの点について改善していくことが今後の課題である。

流行菌型のさかのぼり調査は、分離された EHEC O157 の全株について検討したわけではないが、100%一致した 13 組の画像のうち、7 組は異なる自治体の分離株であり、近畿ブロックには潜在的に広域発生事例のあることを伺わせる結果であった。特に、Type 4 は 5 月~6 月に 5 つの自治体で発生した 7 事例由来 12 株でパターンが一致しており、同一感染源である可能性が高いと考えられた。また、Type 3 から Type 7 を含む近似度 94.8% のクラスターには、Type 4 と 1~2 本異なる株が加わるが、大阪府で 2005 年に発生した EHEC O157 の家族事例 27 事例中 10 事例で 1~3 本異なる株が分離されており、精度管理株で得られた最低の近似度が 94.1% であったことを考え合わせると、関連性を疑わせる結果であった。この菌型は、さかのぼり調査に参加した 10 施設中 7 施設の管轄区域で、5 月下旬から 8 月上旬にかけて検出されており、広域で長期間にわたる「流行菌型」であったと推察された。

近畿ブロック 2 府 4 県は、住民が生活圏を共有しており、焼肉店やレストランの系列店舗における EHEC 事例や、仕出し弁当による食中毒など、毎年のように複数の自治体にまたがる集団事例が発生している。このような広域事例では、聞き取り調査に加えて、分離菌の精査と比較に基づいた科学的な裏付けが必要であり、共通の疫学指標として PFGE 型別法は有用性が高い。実際の事例では、PFGE 画像の目視による比較が行われることから、施設間で比較解析の可能な高い解像度の PFGE 画像を安定して得られるよう、技術の維持と機器類の保守管理が必要である。

#### E. 結論

PFGE 型別法の実施に際して、近畿ブロック 11 衛生研究所では技術的な施設間差はなく、共通の疫学指標として有用である。食品由来感染症の広域流行に備え、安定して解像度の高い PFGE 画像を得られるように、各施設で技術の維持を図るとともに機器類の保守管理も重要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sakai, T., Nakayama, A., Hashida, M., Yamamoto, Y., Takebe, H. and Imai, S.: Outbreak of Food Poisoning by *Yersinia enterocolitica* Serotype O8 in Nara Prefecture: the First Case Report in Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58:257-258 (2005)

##### 2. 学会発表

田口真澄、勢戸和子、山崎 渉、塚本定三：複数の遺伝子型の腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例，第 45 回感染性腸炎研究会（2006 年 3 月、東京）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表 1 施設間変動の検討に用いた菌株

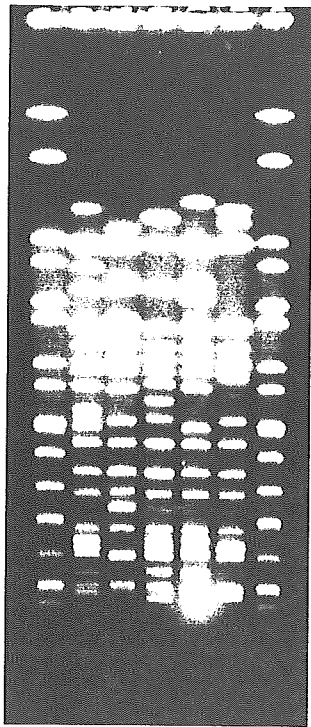
菌株No.	菌種	分離年月	感染研Type No.
1	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2006年6月	a88
2	EHEC O157:H7 (VT2)	2006年7月	a140
3	EHEC O157:H7 (VT2)	2006年7月	a222
4	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2006年7月	a248
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2006年8月	a254

表 2 各施設の電気泳動条件と撮影装置

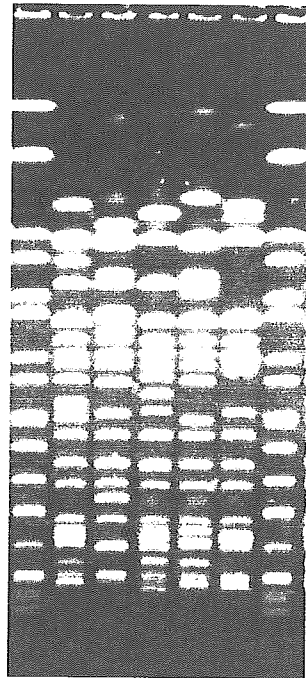
施設	Buffer	温度 (°C)	時間 (hr)	撮影装置(メーカー)
滋賀県立衛生科学センター	ニッポンジーン	14	20	インスタントカメラ (Polaroid)
京都府保健環境研究所	タカラ	14	17	CCDカメラ (ATTO)
京都市衛生公害研究所	タカラ	14	17	インスタントカメラ (Polaroid)
兵庫県立健康環境科学研究所	自家調整	14	19	インスタントカメラ (Mamiya)
神戸市環境保健研究所	タカラ	14	19.5	インスタントカメラ (フナコシ)
姫路市環境衛生研究所	ニッポンジーン	14	19	CCDカメラ (BIO-RAD)
大阪府立公衆衛生研究所	ニッポンジーン	14	20	CCDカメラ (ATTO)
大阪市立環境科学研究所	自家調整	14	19	インスタントカメラ (フナコシ)
堺市衛生研究所	Bio-Rad	14	19	インスタントカメラ (Polaroid)
奈良県保健環境研究センター	invitrogen	14	19	CCDカメラ (ATTO)
和歌山市衛生研究所	Bio-Rad	14	19	インスタントカメラ (Polaroid)

表 3 解析者による近似度の差異

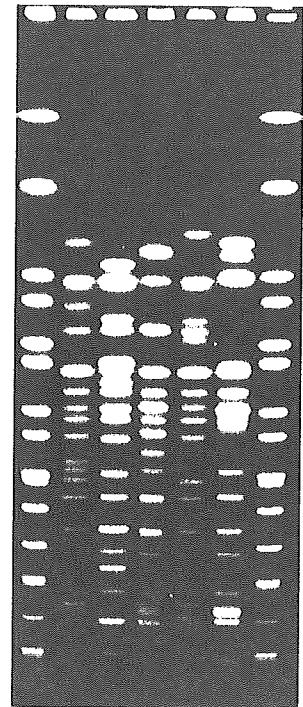
菌株No.	A解析者		B解析者	
	近似度(%)	認識バンド数(本)	近似度(%)	認識バンド数(本)
1	97.8	22, 23	96.7	22, 23
2	97.6	20, 21	96.1	18, 19, 20
3	95.0	19, 20, 21, 22	97.5	20, 21
4	94.4	19, 20, 21, 22	96.3	19, 20, 21
5	94.1	16, 17, 18, 19	96.3	16, 17, 18



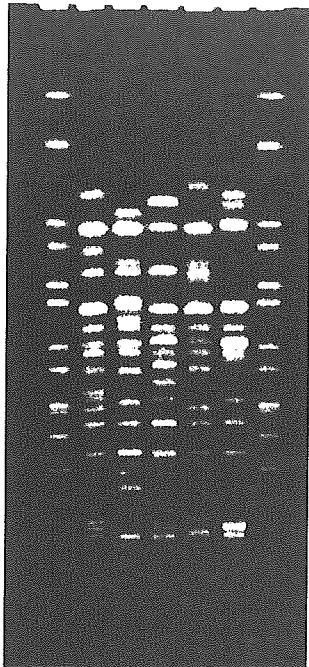
施設 1



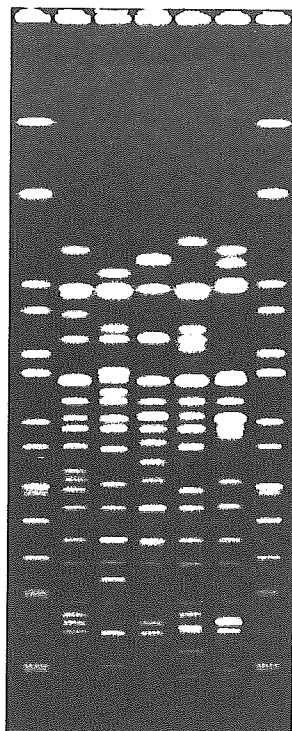
施設 2



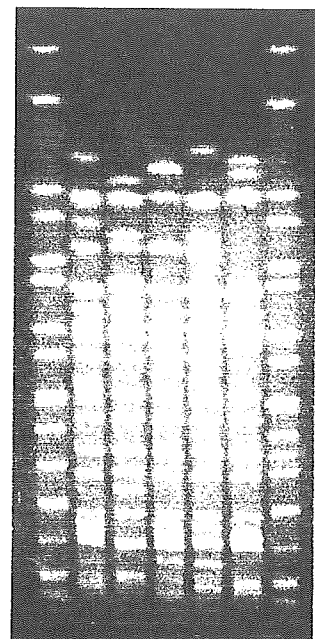
施設 3



施設 4

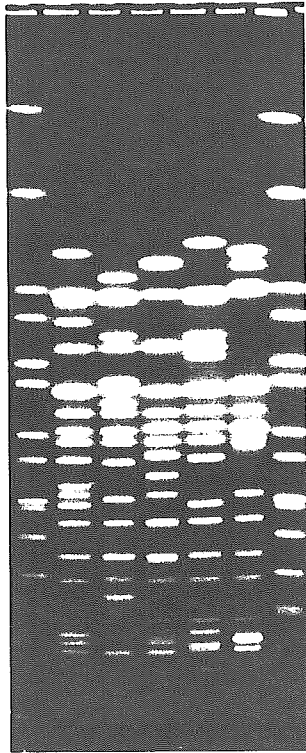


施設 5

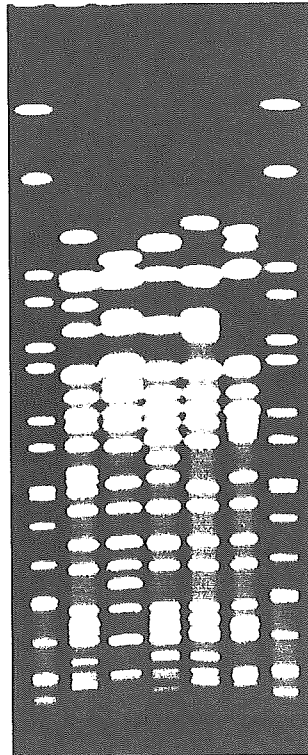


施設 6

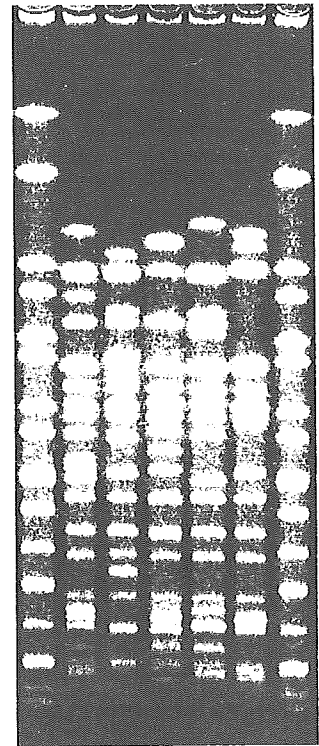
図 1 各施設における EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像



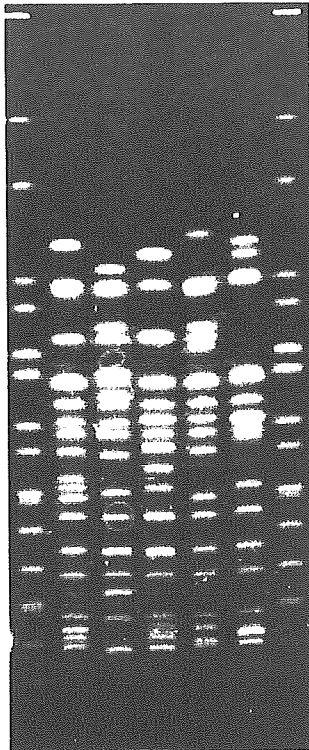
施設 7



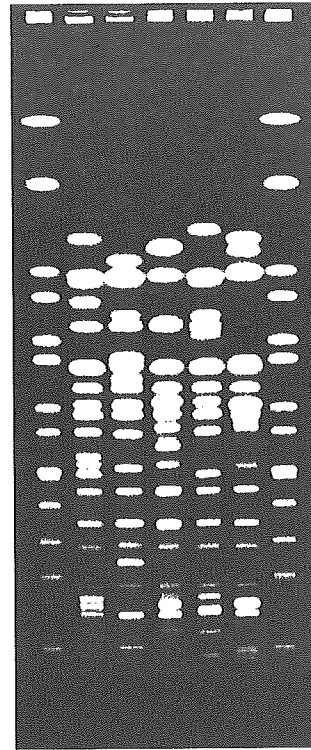
施設 8



施設 9



施設 10



施設 11

レーン左から

- 1 Marker
- 2 菌株 No.1
- 3 菌株 No.2
- 4 菌株 No.3
- 5 菌株 No.4
- 6 菌株 No.5
- 7 Marker

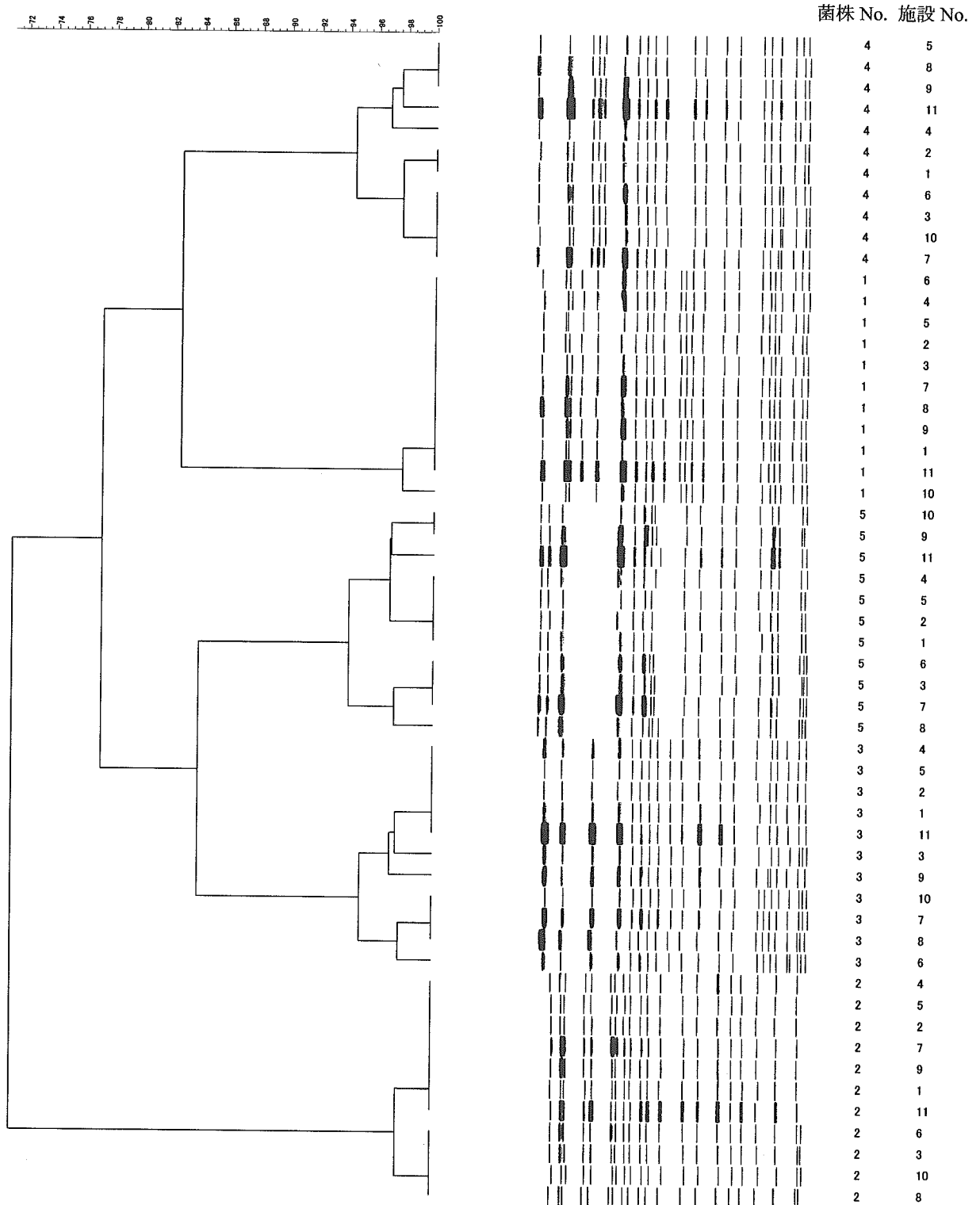


図2 A 解析者作成 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム