

図 7 H施設のPFGE画像(H17)

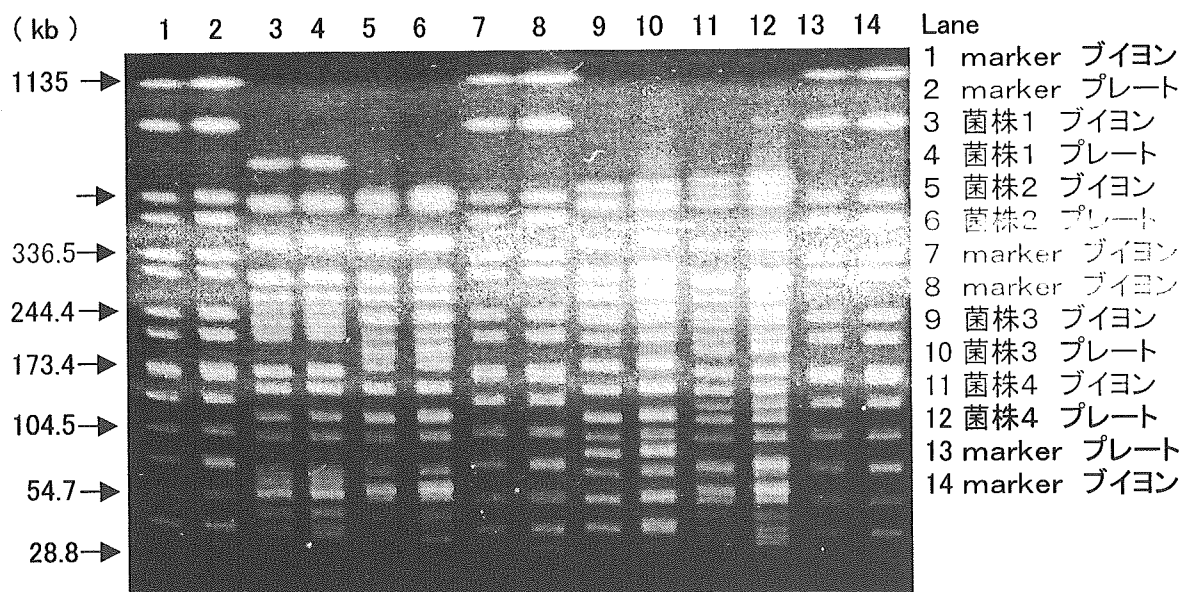


図 8 I施設のPFGE画像(H17)

Dice (Opt:120%) (Tot:1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) (0.0%-100.0%)
 FP1

FP1

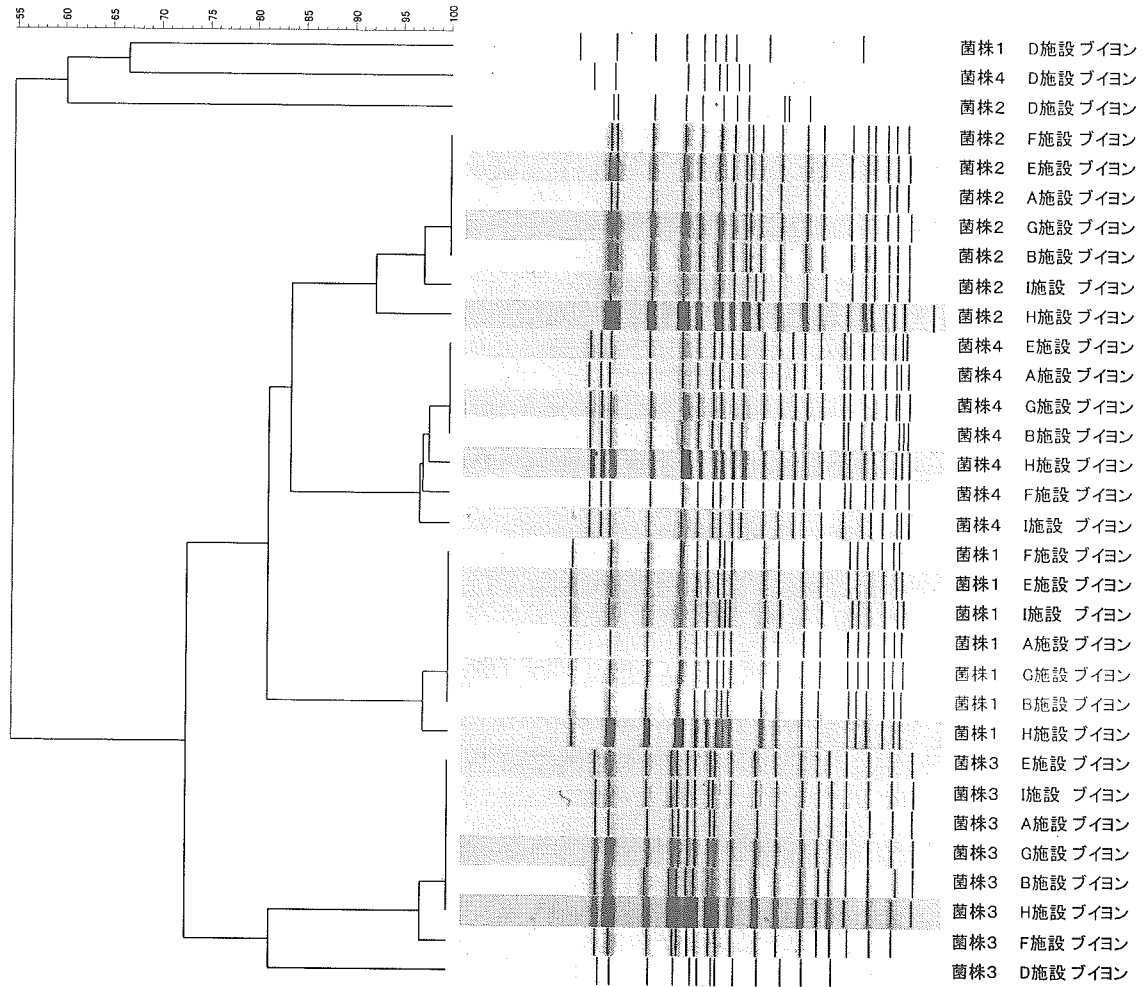


図9 各施設間の O157 (ブイオン) デンドログラム (H17)

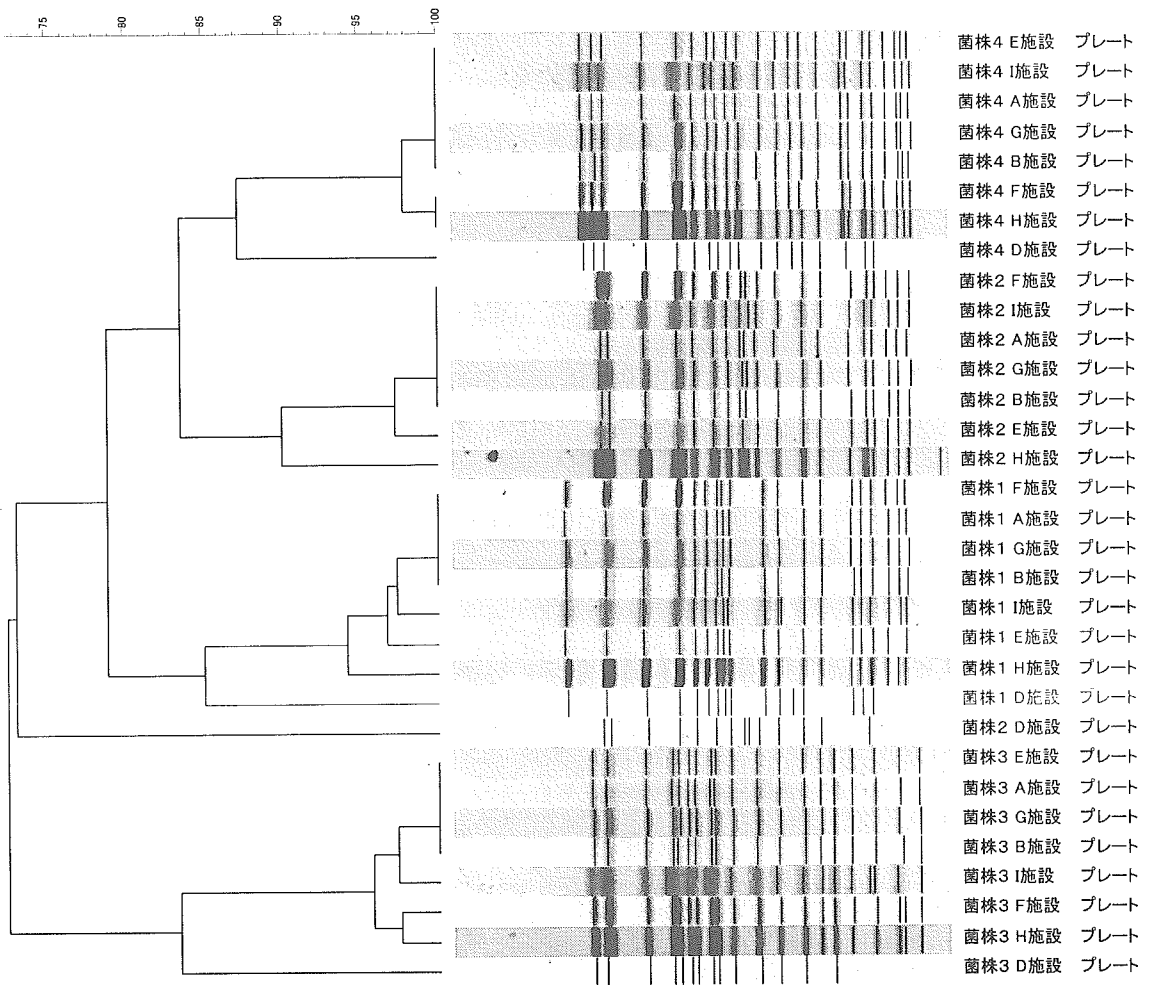


図 10 各施設間の O157 (プレート) デンドログラム (H17)

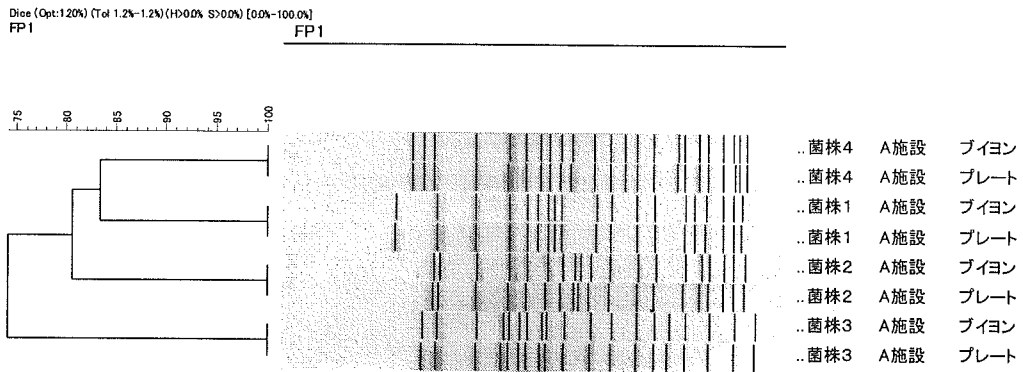


図 11 A 施設のデンドログラム (H17)

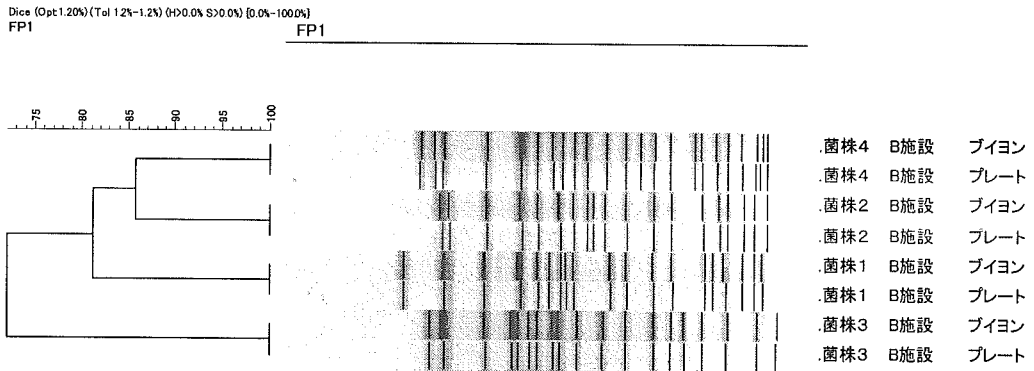


図 12 B 施設のデンドログラム (H17)

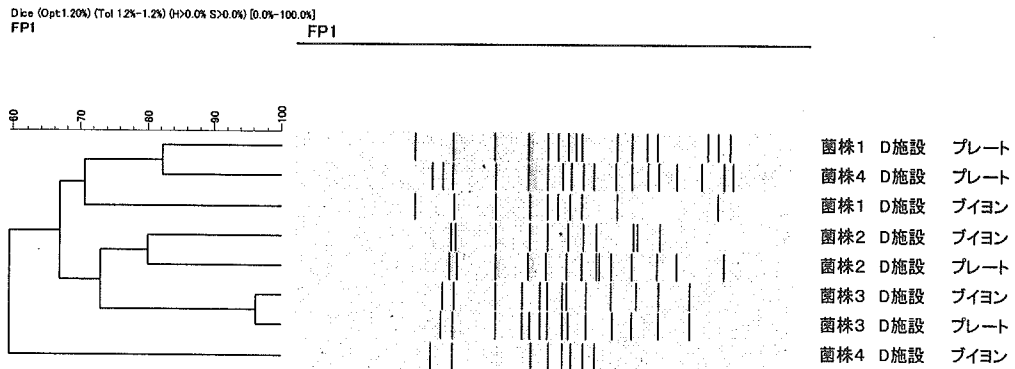


図 13 D 施設のデンドログラム (H17)

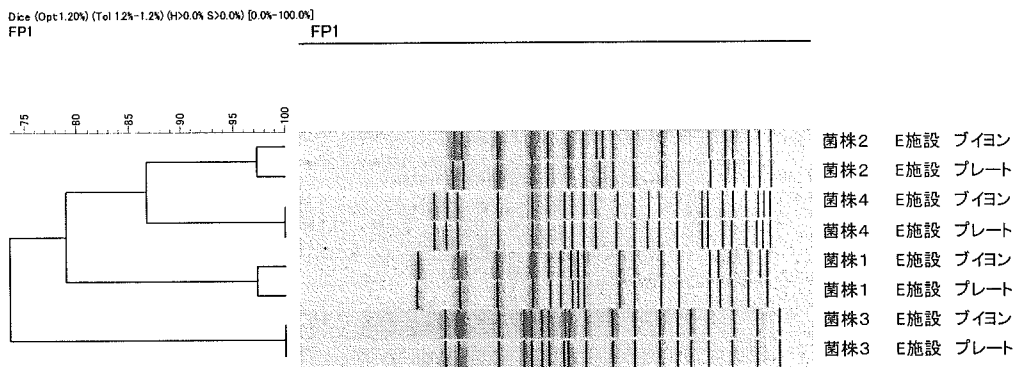


図 14 E 施設のデンドログラム (H17)

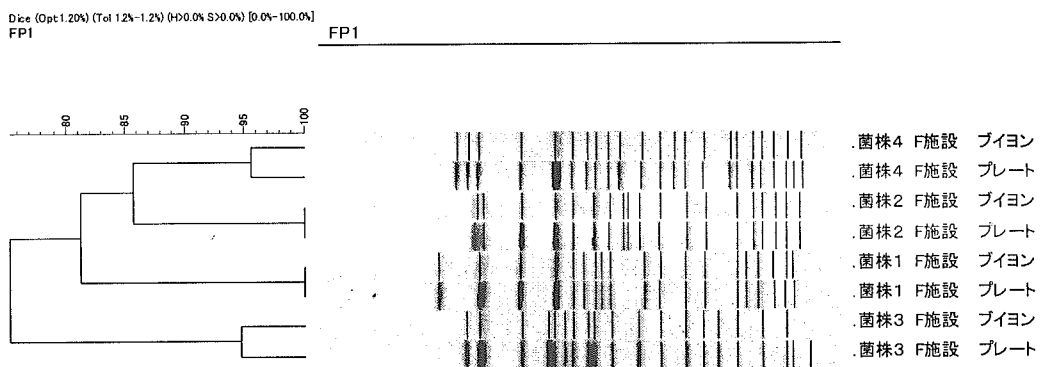


図 15 F 施設のデンドログラム (H17)

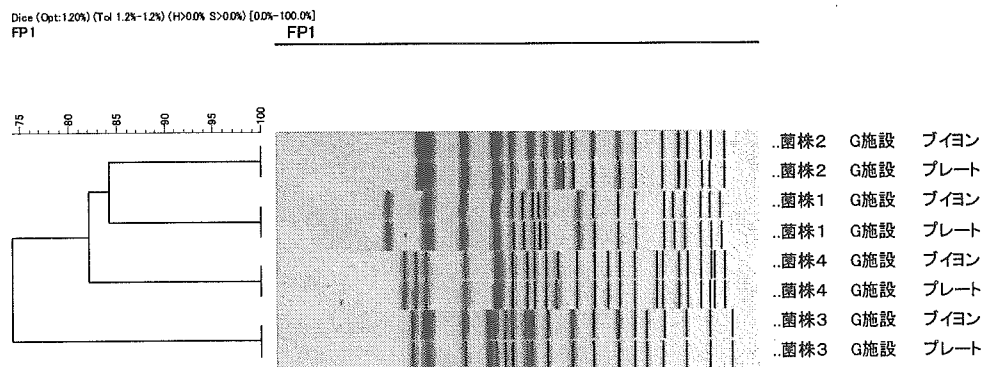


図 16 G 施設のデンドログラム (H17)

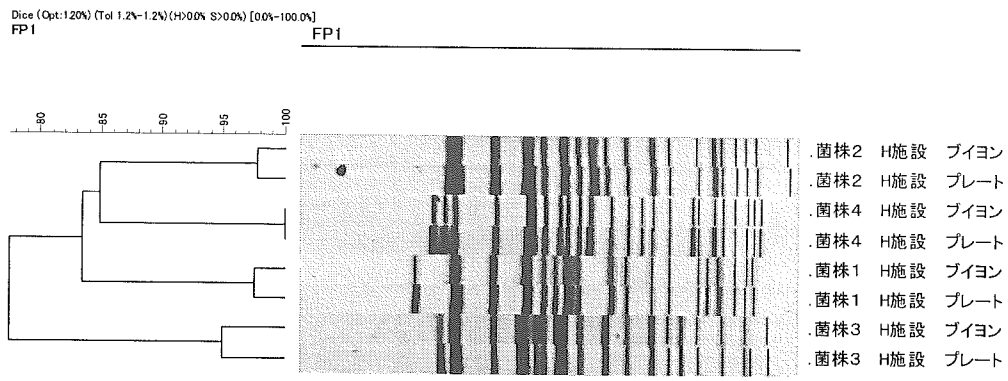


図 17 H 施設のデンドログラム (H17)

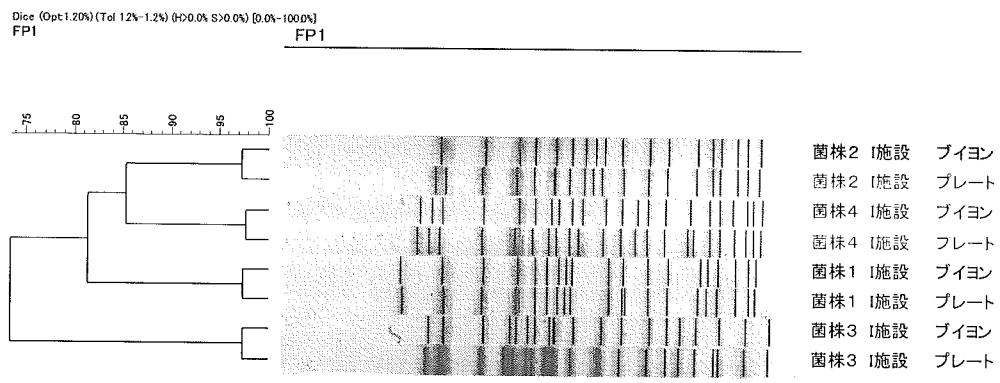


図 18 I 施設のデンドログラム (H17)

Dice (Opt:120%) (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FP1

FP1

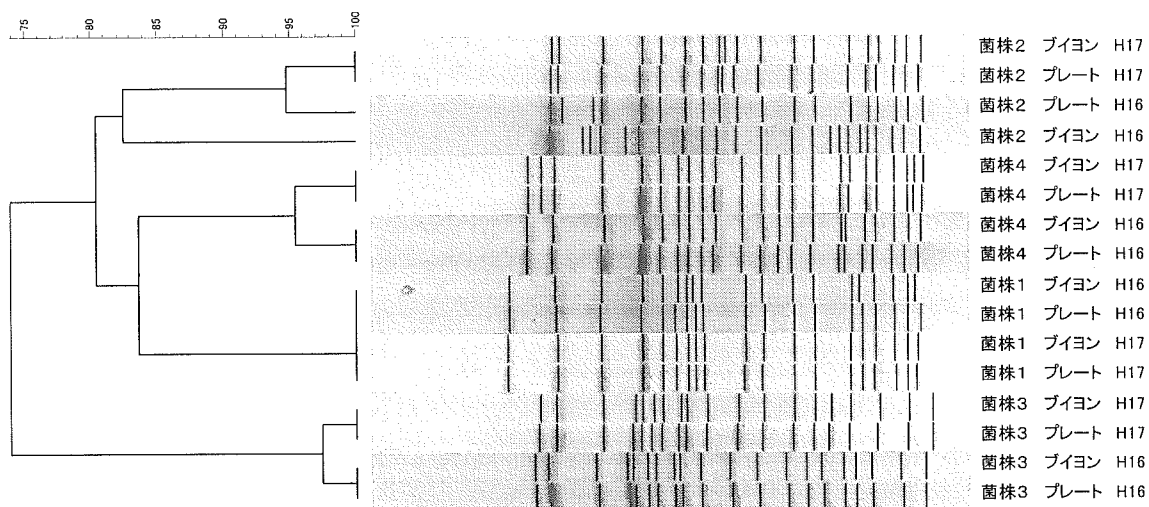


図 19 A 施設の年度別デンドログラム (H16、H17)

Dice (Opt:120%) (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FP1

FP1

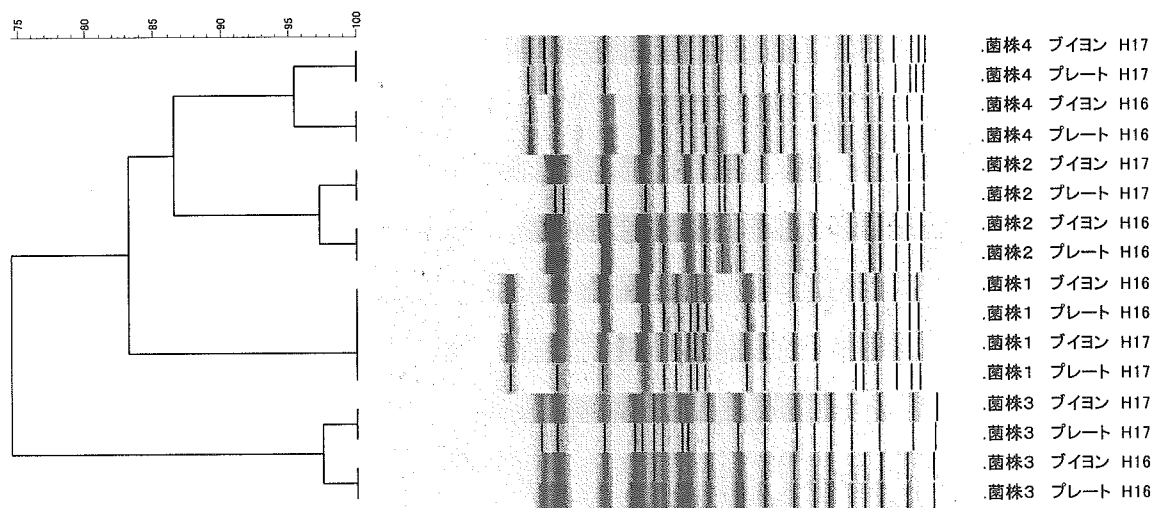


図 20 B 施設の年度別デンドログラム (H16、H17) B 施設 (H16、H17)

Dice (Opt:120%) (Tol 1.2%-1.2%) (>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 FPI

FPI

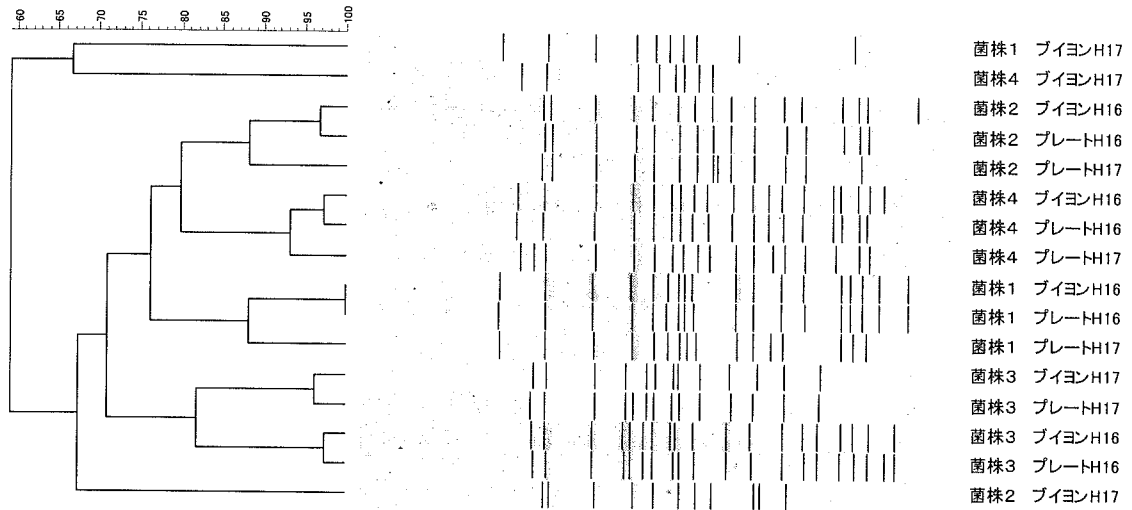


図 21 D 施設の年度別デンドログラム (H16、H17)

Dice (Opt:120%) (Tol 1.2%-1.2%) (>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 FPI

FPI

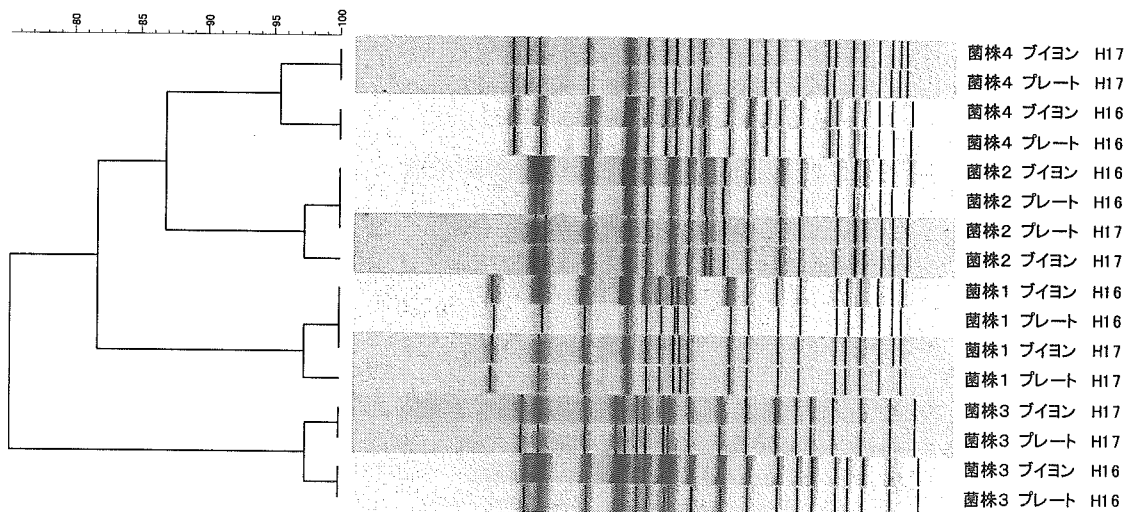


図 22 E 施設の年度別デンドログラム (H16、H17)

Dice (Opt:1.20%) (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FP1

FP1

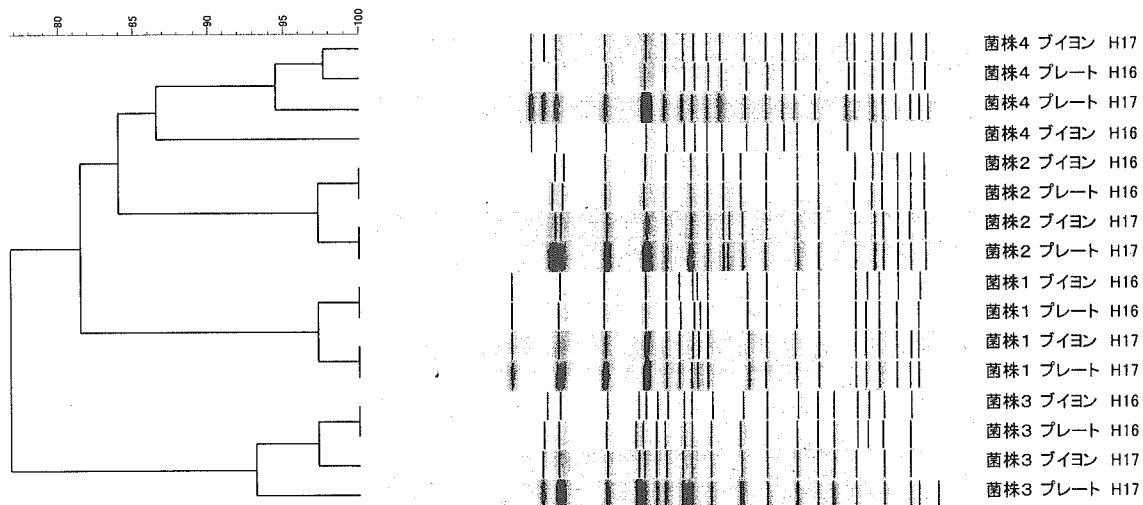


図 23 F 施設の年度別デンドログラム (H16、H17)

Dice (Opt:1.20%) (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FP1

FP1

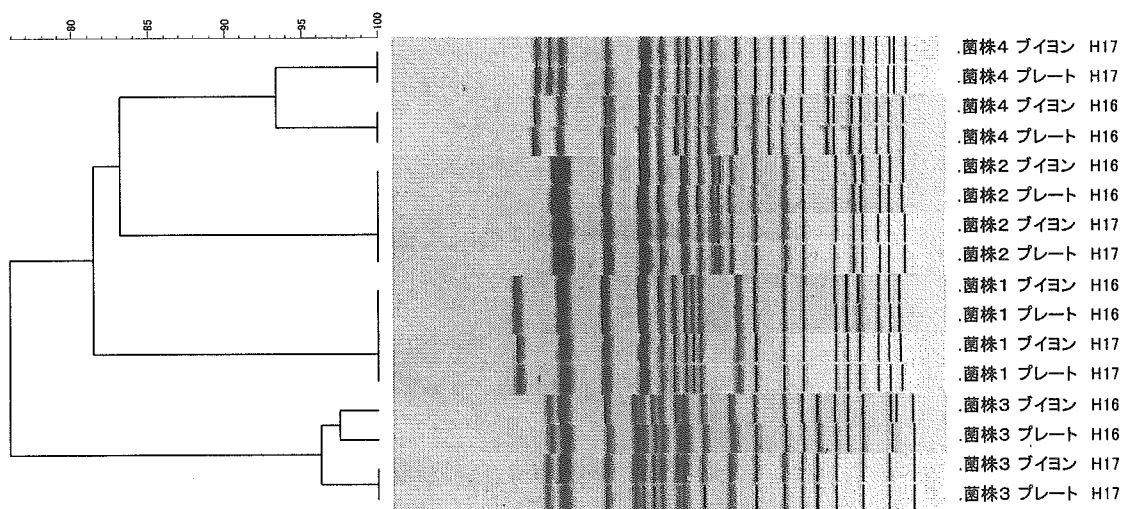


図 24 G 施設の年度別デンドログラム (H16、H17)

Dice (Opt:120%) (Tol:1.2%-1.2%) (H:0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FP1

FP1

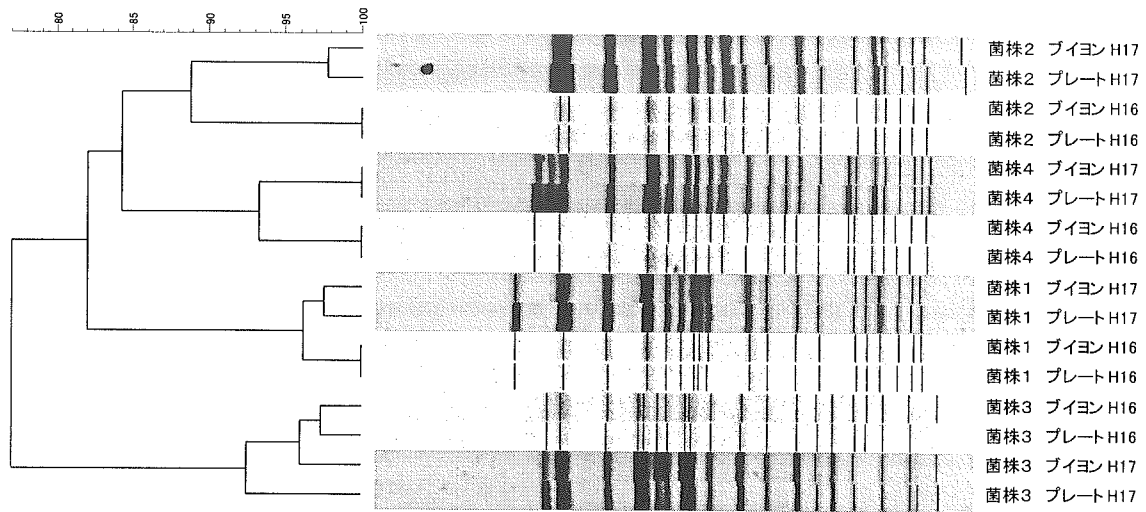


図 25 H 施設の年度別デンドログラム (H16、H17)

Dice (Opt:120%) (Tol:1.2%-1.2%) (H:0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FP1

FP1

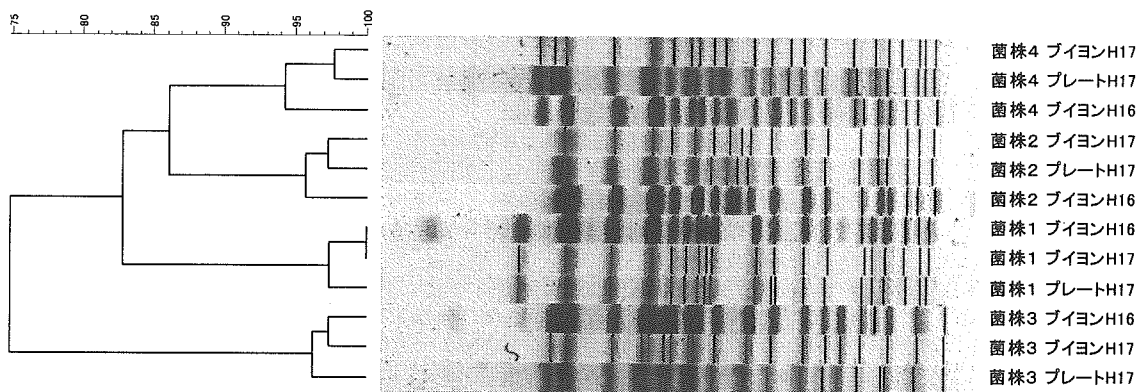


図 26 I 施設の年度別デンドログラム

Legionella pneumophila SG1 の遺伝子解析について

研究協力者 榎 美代子 妹尾正登 広島県保健環境センター

研究要旨

レジオネラの検出について、これまでは分離検出ができなかった微量の菌が、検出可能な菌量まで、アメーバ内で増殖できるかどうか、さらに元の菌とアメーバ内で増殖した菌との遺伝子変化の有無をパルスフィールドゲル電気泳動法で検討した。アメーバは *A. castellanii* を用い、レジオネラは環境由来 *L. pneumophila* SG1 の5株を供試した。その結果、接種した菌量が1mlあたり、1以上100未満では、24、48、72時間後には、それぞれ約 10^3 、 10^5 、 10^7 CFUに急激に増加し、24時間後には検出可能な菌数になった。現行の検査法では検出できない1mlあたり1未満の菌を接種した場合も48時間後の培養液で、4株は 10^2 ~ 10^3 CFUに増殖し、72時間後には、 10^3 ~ 10^5 CFUになり全株検出が可能となった。また、菌の遺伝子変化の有無については、目視および解析ソフトともパターンが一致し、画像からは遺伝子変化は認められなかった。アメーバ内での増殖を利用した方法は、微量の菌の分離を可能とし、レジオネラの遺伝子解析に有用と考えられた。

A. 研究目的

レジオネラの分離培養には約一週間を要し、培養不能生存菌 (VBNC) については、現行の試験法では菌を分離できず、原因不明となっているケースが多い。また、レジオネラ症の確定診断には、尿中抗原やEIAによる検出が多く、培養法による菌の検出は少ない。事例発生時に感染源等の疫学解析をおこなうためには、菌を分離する必要がある。レジオネラを高感度で迅速に検出するために、実験室内で微量のレジオネラをアメーバ内で増殖させ、増殖の前後で菌に遺伝子解析上変化がないか確認することを目的とした。

B. 研究方法

1. アメーバを用いたレジオネラの検出

1) 供試アメーバ

Acanthamoeba castellanii ATCC30234を購入し、組織培養に準じて、712 PYG 培地で

25℃1週間培養した。その後、*Acanthamoeba* buffer(AC buffer)による洗浄と712 PYG 培地へ再浮遊し一夜培養後、再度 AC buffer で洗浄して、 10^6 cells/ml 濃度のアメーバ浮遊液を調整した。

2) 供試菌株

循環式浴槽の温泉水から分離した *L. pneumophila* SG1の5株を供試した。菌はBCYE 寒天培地で3代継代し、菌体を滅菌蒸留水で MacFarland 0.5(約 10^8 CFU/ml)に調整後、AC buffer で希釈して試料とした。

3) 検出方法

菌のアメーバへの接種は遠心管にアメーバ浮遊液5mlを入れ、遠心上清を捨て、試料5mlを加えて混ぜ、遠心管を傾け30℃2時間放置後、37℃で培養した。培養液を24時間毎に採取し、AC buffer で段階希釈後、各希釈の0.1mlをBCYE 寒天培地に2枚ずつ塗抹培養し、1週間後に集落数を計数した。並行して、

試料0.1ml を BCYE 寒天培地10枚に塗り、37℃1週間培養後、集落を計数し、接種菌量を算出した。

2. 菌の遺伝子解析

1) 供試菌株は元株1と増殖後の株6が対応。他の4株についても以下同様。

2) PFGE 法

国立感染症研究所のプロトコール、九州ブロック統一マニュアルに準じて実施した。分子量マーカーはラムダラダーと *Salmonella* Braenderup H9812を用いた。アガロースブロック用菌液は MacFarland4.5程度とし、泳動条件は6.0V/cm, パルスタイム5~50秒, 19時間泳動, 泳動温度14℃で行った。

3) 画像解析

Fingerprinting II Ver.3(Bio Rad)を使用し、類似係数 Dice, デンドログラムタイプ UPGMA, トレランス1.0%, 最適化0または1.0%で行った。

C. 結果および考察

1. アメーバを用いたレジオネラの検出

まず微量なレジオネラを接種して、どのような増殖の挙動をとるのか、検討した。今回、5菌株について、最初の接種菌量を段階的に変えて、時間経過による培養液の菌増殖の変化を図1に示した。菌数の単位はいずれも1mlあたりの生菌数(CFU)で示す。(A)は10以上100未満の菌をアメーバに接種した。24, 48, 72時間後には、それぞれ約 10^3 , 10^5 , 10^7 に急激に増加していった。(B)は1以上10未満の菌について同様に行った。菌量が(A)より1オーダー低いにもかかわらず、(A)とほぼ同じ増殖経過であった。(C)は現行の検査法では検出できない1未満の菌を接種した。最初に接種した試料の0.1mlずつをBCYE寒天培地10枚へ塗抹培養し、すべて不検出であ

った。24時間後の培養液からも同様に検出されなかった。48時間後の培養液では、菌株No.3は不検出であったが他の4株は $10^2 \sim 10^3$ に増殖し、検出可能となった。また、72時間後には、確実に全株検出が可能となった。これらの結果から、接種した試料中にレジオネラが存在していれば、アメーバ内で菌が増殖し、検出が可能となることが強く示唆された。

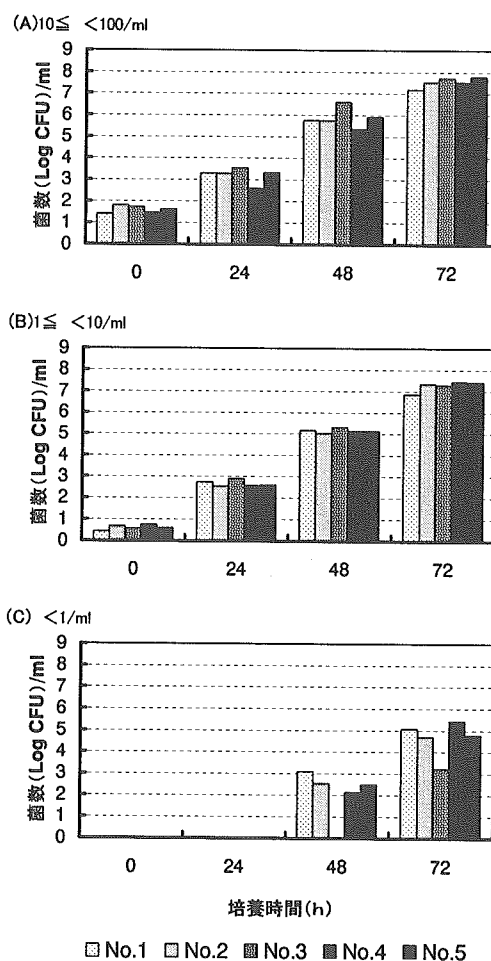


図1 アメーバを用いたレジオネラの増殖

2. 菌の遺伝子解析

PFGE の画像(図2)に示すとおり、目視で、元株1-5それぞれは増殖後の株6-10と一致し、PFGEのパターンに変化が認められなかった。アメーバ内増殖の前後で菌の遺伝子変化はPFGE上認められず、PFGEでの遺伝子解析に問題なく使えることがわかった。

M1M21 2 3 4 5M1M26 7 8 9

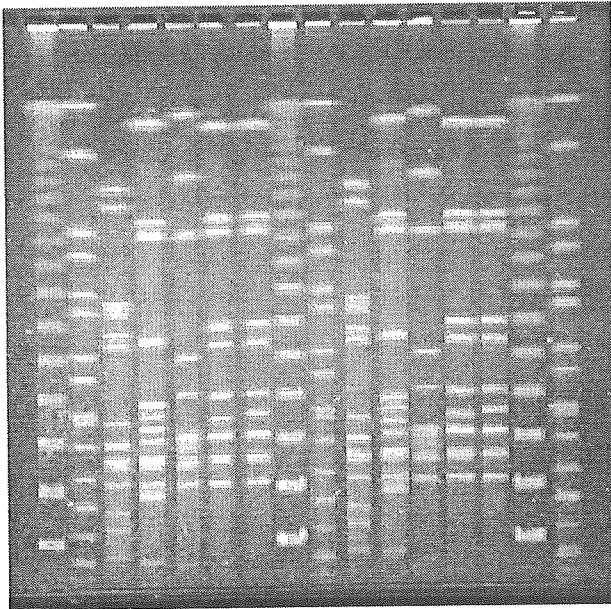


図2 *L. pneumophila* SG1 の PFGE パターン(Sfi I)

M1:マーカー;Lambda ladder

M2:マーカー;*S. Braenderup* H9812

1-5:分離株(元株) 6-10:アメーバ内増殖株

画像解析ソフトを用いて、菌の増殖前後でデンドログラム解析を行うと5株ともそれぞれ100%で一致した(図3)。2種類のマーカーについてどちらを標準化のスタンダードとして使用したら良いかについても検討した。その結果、同時期に作製したプラグを使用して泳動したゲル3枚から25菌株を選び類似性をみると、*S. Braenderup* をスタンダードとしたほうが類似性が高かった(図4)。

D. 結論

レジオネラの検出について、これまでは分離検出ができなかった微量の菌が、検出可能な菌量まで、増殖できるかどうか、さらに増殖した菌が PFGE パターンに変化がないか検討した。アメーバに接種した菌量が1ml あたり、1以上100CFU 未満では、急激に増加し、24時間後には検出可能な菌数になった。現行の検査法では検出できない1CFU 未満の菌を接種した場合、24時間後の培養液からは検出されなかったが、48時間後の培養液では、4株は $10^2 \sim 10^3$ CFU に増殖し、検出可能となった。また、72時間後には、全株検出が可能となった。アメーバ内での増殖を利用した方法は、微量の菌の分離を可能とし、接種した菌と増殖後の菌で PFGE パターンが一致していることから、今後のレジオネラの高感度検出および疫学解析に有用と考えられた。

E. 研究発表

Seno M., Sakaki M., Ogawa H., Matsuda H., Takeda Y. Effective proliferation of low level *Legionella pneumophila* serogroup 1 cells using coculture procedure with *Acanthamoeba castellanii*. J. Microbiol. Methods (in press).

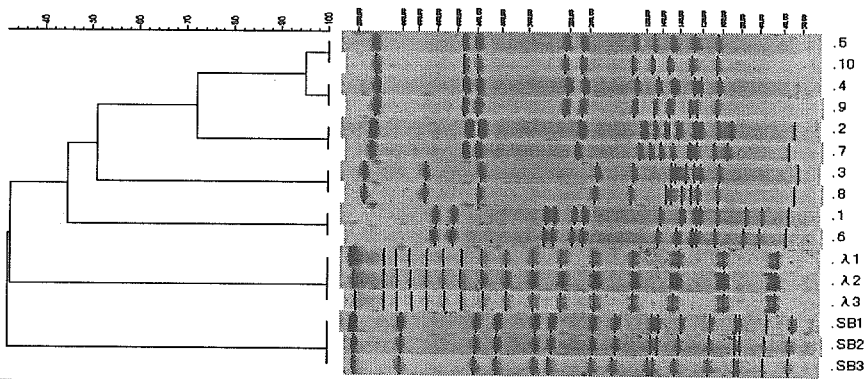
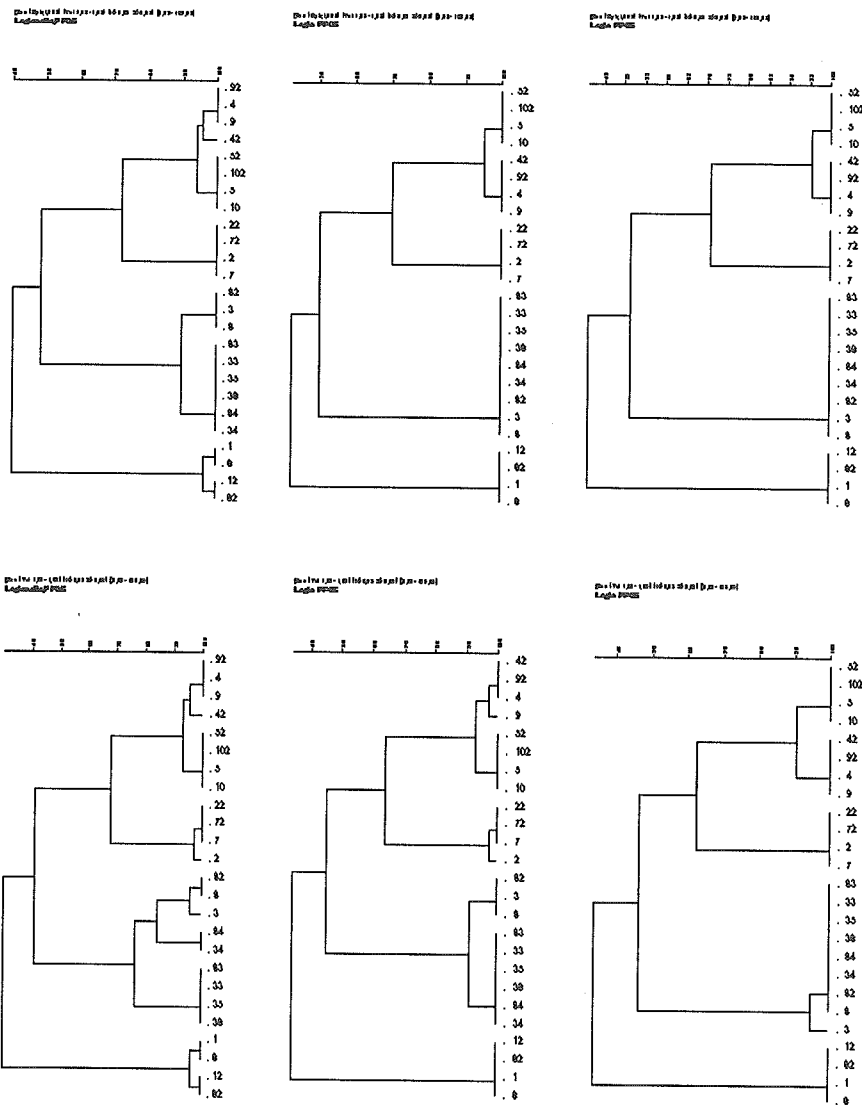


図3 *L. pneumophila* SG1 のデンドログラム(λ,SB:マーカー, 最適化 1.0%)



① λ (48.5-485) ② λ (48.5-727.5) ③ SB(33.3-1135)

図 4 スタンダードの違いによるデンドログラムの比較 (n:25,右の数字は最初の数が菌株 No.に相当,10 は 2 桁) (最適化:上段 1.0%, 下段 0%)

Salmonella Virchow のパルスフィールドゲル電気泳動法によるデータベース化の検討

研究協力者 愛媛県立衛生環境研究所 吉田紀美 田中 博

研究要旨

2004年7月から8月にかけて愛媛県内の散発下痢症患者および集団食中毒患者から *Salmonella Virchow* (*S. Virchow*) が相次いで分離された。これらの菌株をパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) で遺伝子解析した結果、ほぼ同一の PFGE パターンを示した。*S. Virchow* に関しては比較的分離数が少なく、全国的な侵淫状況が明らかではない。今回、同一遺伝子型と見られる株が県内で散発的に発生したことから、全国的な *S. Virchow* の分離状況について調査を進め、収集した菌株について PFGE 型のデータベース化について検討を行ったので報告する。

A. 研究目的

S. Virchow は他のサルモネラと同様、散発下痢症及び食中毒事例から分離されているが、比較的分離頻度が低い血清型である。2004年に愛媛県内の散発下痢症患者および食中毒患者から *S. Virchow* が分離され、それらの PFGE 型がほぼ一致した。今回、全国で分離された *S. Virchow* を収集し、それらの菌株の示す PFGE パターンをデータベース化し、遺伝子型の多様性を明らかにすることを目的とした。

方衛生研究所で分離された 86 株を用いた。内訳を表に示す。

2 方法

PFGE は平成 15 年から実施している感染研ニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素は *Xba I* を用い、泳動条件は 6.0V/cm, パルスタイム 2.2-63.8 秒, 泳動時間 19 時間で行なった。泳動像は DNA 解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD) で解析した。

B. 研究方法

1 供試菌株

1991年から2005年までに全国11ヶ所の地

C. 研究結果と考察

全 86 株の *S. Virchow* について、PFGE 解析を行い、デンドログラムを図に示した。切断パ

表 供試菌株

県市名	株 数															計
	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
山形県						2			7		1		3	1		14
千葉県										1	3	3	1	2		10
静岡県	3		1	3						1			1			9
滋賀県										2		1		2		5
島根県		1	1	1		1		1						1		6
広島県											2					2
広島市										2	8		1	1		12
徳島県					1	1		1					1	1		5
愛媛県														10	1	11
高知県							4	2						5		11
宮崎県														1		1
計	3	1	2	4	1	4	4	4	7	6	14	4	7	24	1	86

ターンによる類似度が90%以上の分離株をグループ化すると、AからMまでの13のクラスターに分けられた。またどのクラスターにも属さない21のパターンが存在し、計34のパターンが確認された。そのなかで2004年愛媛県において分離された一連の菌株はクラスターBを形成し、その他の株との間に同一性はみられなかった。このことから、今回供試した *S. Virchow* については、多くの遺伝子多型がみられるなかで、愛媛県の実験株は同一遺伝子型であることが確認された。

また、今回2004年の分離株は9県から24株収集されたが、そのうち21株は大きく3つのクラスターに分類できた。すなわち、愛媛県の10株がクラスターB、高知県広島市の6株がクラスターD、さらに滋賀県他3県の5株がクラスターEに分けられた。BとDの類似度が89%と高いのに比べてEは比較的類似度が低く、遺伝子型が異なることが推察された。

今回 *S. Virchow* の PFGE によるデータベース化の検討にあたって、経年的広域的な分離株を収集し、各 PFGE パターンを調査した結果、菌株によって遺伝子型の多様性を確認することができた。このことから、制限酵素 *Xba* I による切断パターンにより、分離株の同一性が識別できることが確認された。

本研究にご協力いただきました山形県、千葉県、静岡県、滋賀県、島根県、広島県、広島市、徳島県、高知県および宮崎県の各地方衛生研究所細菌検査担当の方々に深謝いたします。

D. 研究発表

吉田紀美ほか：2004年愛媛県内で分離された *Salmonella Virchow* のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた疫学的解析，愛媛衛研年報，7，1～4（2004）

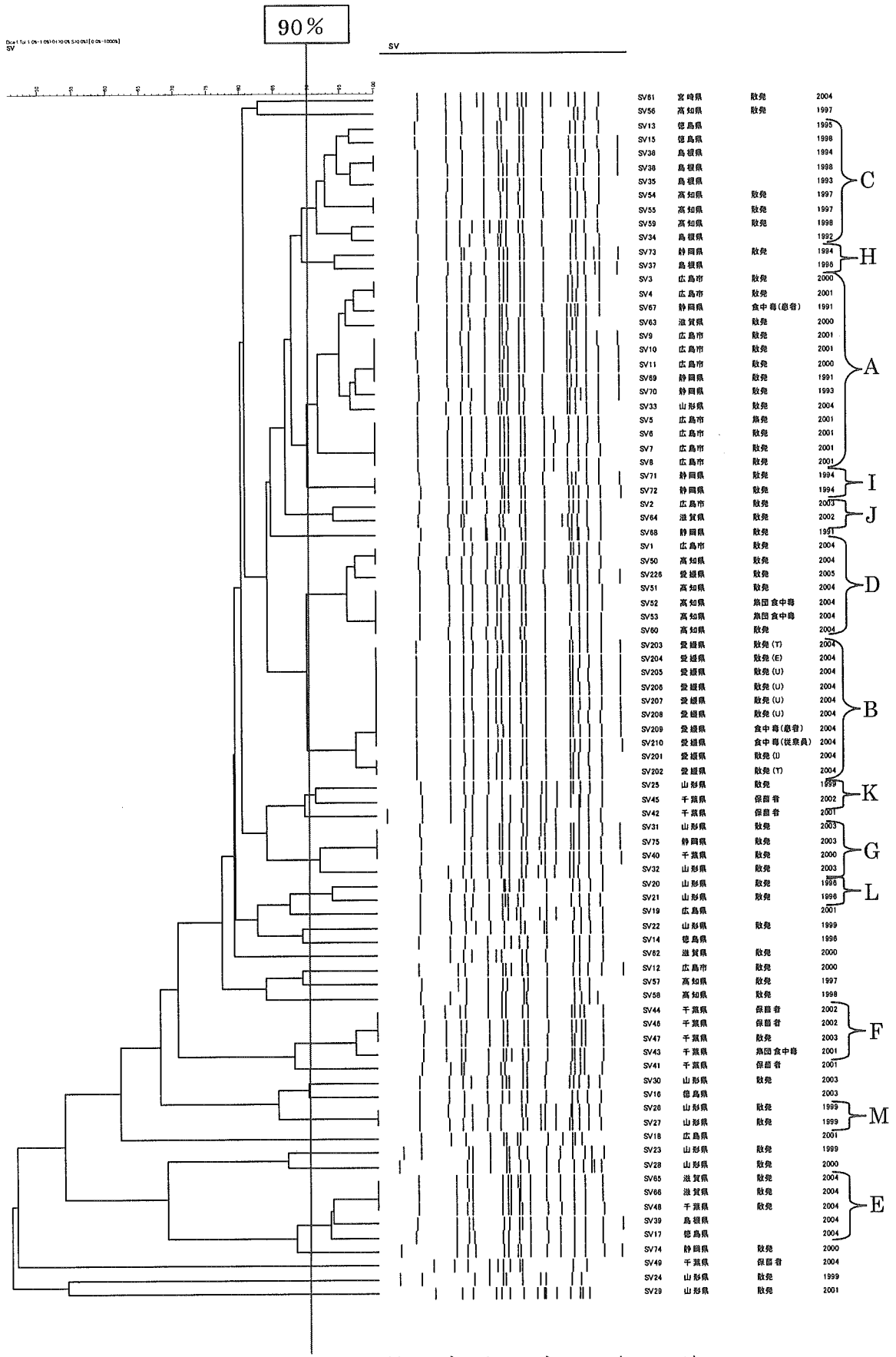


図 S. Virchow86 株のデンドログラム (*Xba* I)

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
協力研究報告書

腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の分子疫学的解析法の検討
—MLVA 法と PFGE 法の比較—

研究協力者 広島市衛生研究所生物科学部

古田喜美 下村 佳 石村勝之 笠間良雄 松本 勝 荻野武雄

研究要旨

腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例の精度の高い分子疫学的解析法の確立を目的に、Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA)解析の有用性をパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)と比較するとともに、解析に有用なプライマーの検討を行った。6種類のパルスネットパターンに分類される2004年以前の分離株80株、2005年分離株16株、堺株の計97株のSTEC O157:H7を対象に、PFGEは *Xba* I, *Bln* Iで、MLVAは Lindstedtらの7組およびKeysらの5組の計12組のプライマーで縦列反復塩基配列(VNTR)の有無とその繰り返し回数を解析した。その結果、同じパルスネットパターンに分類される株の多くは、MLVAでも区別できなかったが、VNTRの繰り返し回数が異なる株が数株認められた。2005年分離株は、疫学的に関連する株はPFGEとMLVAとも同じパターンを示したが、PFGEで同じクラスタに分類された株の多くがMLVAでは互いに区別された。解析に有用なプライマーペアはVhec1, Vhec3, Vhec4, Vhec7, K11, TR3, TR7で、特にVhec1は16種類に分類可能であった。

A. 研究目的

広域散在型食中毒事例(diffuse outbreak)等への迅速対応を目的として、各地方衛生研究所(地研)の分離菌株を国立感染症研究所(感染研)に収集してパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析するシステム(パルスネット)の構築が進み、効果をあげている。しかし、パルスネットにおけるPFGE解析は、全国の多くの分離株の分類を行うため、*Xba* Iの1種類の制限酵素の切断パターンの比較により分類が行われるが、同じ遺伝子型に分類される株が、他の制限酵素による解析では、泳動パターンに違いが認められることがあるなど、より詳細な疫学解析を行うためには、本法のみの解析では不十分な場合があることが指摘されている。従って、パルスネットにおける同じ遺伝子型のSTEC分離

株をさらに細かく分類し、より精度の高い疫学調査を可能とするためには、解析能の高い他の疫学マーカーの併用が必要である。近年、DNA多型解析法の1つとして細菌のDNAに存在する縦列反復塩基配列(Variable-Number Tandem-Repeats)を利用したMultiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA)が開発され、多種類の細菌のDNA多型解析で有用性を示す報告がなされている。2003年にLindstedtら¹⁾は、堺株を含めた73株のO157:H7株を用いたMLVA法の有用性を示し、2004年には改良したO157:H7のMLVA法を報告した²⁾。また2005年にKeysら³⁾は、LindstedtらとNoller⁴⁾らのプライマーに加え、独自に設計したプライマーと合わせて29種類のプライマーを用いてO157:H7のMLVA解析を行った。

昨年度の研究において、我々はパルスネットパターン ND,2a,ND を示す STEC O157:H7 を用い MLVA の基礎的研究を行った。そこで今回は、MLVA の解析性をより向上させるために、6 種類のパルスネットパターンおよび 2005 年散発事例の O157:H7 感染事例由来株全 97 株を用い、Lindstedt らの 7 種類のプライマーペアに加え、Keys らの 5 種類のプライマーペアを使用して MLVA 解析を行い、PFGE の結果と比較するとともに MLVA 解析に有効なプライマーセットの検討を行った。

B. 研究方法

1 供試菌株

供試菌株は、2004 年以前に広島市で分離され、感染研の PFGE 解析により 6 種類のパルスネットパターンに分類された分離株 80 株、2005 年の広島市および愛媛県の分離株 16 株、堺株の計 97 株を用いた(表 1)。

2 PFGE 解析

PFGE は感染研の示した PFGE New Protocol (以下、新 PFGE 法)に準じて実施した。即ち、トリプトソイブロス(TSB)で 37°C、1 夜静置培養した菌液 200 μ l を 12,000rpm、5 分間遠沈後、沈渣を滅菌蒸留水 200 μ l に懸濁し、等量の 1% Seakem® Gold agarose を加え、サンプルプラグキャスターを用いて厚み 0.7mm のプラグを調製した。1% N-lauroylsarcosine 加 1mg/ml proteinase K 処理は 50°C で 4~6 時間、4mM Pefabloc SC 加 TE での洗浄は 50°C で 30 分 2 回、TE 洗浄は氷上で 30 分 1 回とした。制限酵素処理は *Xba* I、*Bln* I とも 30units/sample を用い 37°C、18~20 時間反応した。泳動装置は GenePath system(Bio-Rad)を使用し、ゲルは 1% Seakem® Gold agarose、泳動バッファーは 0.5×TBE を用いた。電圧 6.0V/cm、パルスタイム 2.2-54.2s(linear ramp)、水温 12°C の条件で 19

時間泳動後、0.5 μ g/ml ethidium bromide で染色して写真撮影した。PFGE 画像は画像解析ソフト Fingerprinting II (Bio-Rad)を用いて解析した。PFGE による分類は原則として 85%以下の相似度を示した場合異なるクラスタとし、*Xba* I と *Bln* I でのクラスタを組合せて PFGE の遺伝子型とした。ただし、泳動ランが異なり(同一ゲルの泳動でない)、目視的に同じ遺伝子型と推定される場合は、Fingerprinting II の解析結果に関わらず同一遺伝子型とした。

3 MLVA 解析

MLVA 法の PCR 反応条件および泳動方法については、Lindstedt らの改良された方法²⁾に準じて行った。プライマーは、Lindstedt らが使用した 7 種類のプライマーペアに、Keys らが使用したプライマーのうちの PCR 増幅産物の繰返し回数のバリエーションが多い 5 種類のプライマーペアを加えた 12 種類のプライマーペアを使用した(表 2)。フォワードプライマーは 5' 側に HEX, TET, FAM のいずれかの蛍光色素を標識したものをを用いた。菌液を 10 分間煮沸溶菌させ、12,000rpm、5 分遠沈した上清をテンプレートとした。PCR 反応液の組成は、プライマー(100 pmol/ μ l)各 0.1 μ l、10×Ex Taq Buffer 1.2 μ l、滅菌精製水 8 μ l、dNTP(2.5mM)0.5 μ l、Ex Taq Polymerase(5U/ μ l)0.1 μ l、DNA テンプレート 2 μ l とした。PCR 反応は、プライマー-Vhec1・3・4・5 を混合した Mix1、Vhec1・2・6・7 を混合した Mix2、TR3・4・7 と K11・37 を混合した Mix3 の 1 検体につき 3 本の反応系で、表 3 に示す反応条件で行った。PCR 後 Mix1 および Mix2 の増幅産物各 1 μ l を滅菌精製水 18 μ l と混合し、その混合希釈液 1 μ l に、ホルムアミド 12 μ l およびサイズマーカー(CHIMERx : GeneFlo™ DNA Ladder TAMRA Label,50-625bp)1 μ l を加えたものと、Mix3 の増幅産物 1 μ l を滅菌精製水 19 μ l と混合し、その混合希釈液 1 μ l に、ホルムアミド 12 μ l およびサイズマ

一カー1 μ lを加えたものの1検体につき2本の電気泳動を行った。電気泳動は、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)で60°C, 40分間行い、GeneScan Analysis Software(Applied Biosystems)で解析を行った。増幅産物の繰返し回数算出は、各プライマーごとに、表4に示す計算式に基づいて行った。

C. 研究結果

1 PFGE 解析

PFGEによるデンドログラムの分類は、原則として85%以下の相似度を示した場合、異なる遺伝子型としてクラスタ分けを行った。パルスネットパターン別の*Xba*Iおよび*Bln*IによるPFGEの解析結果を図1~6に示した。

ND,2a,ND株では、*Xba*Iは全ての株が95.5%以上の相似度を示し、1種類に分類された(クラスタA)。*Bln*Iは、No.10,11,15が他の株と84.3%の相似度を示し、2種類に分類された(B,C)。遺伝子型は2種類に分類された(A-B, A-C)。

2a,ND,1株では、*Xba*Iは、クラスタはD~Fの3種類に分類された。No.38~47の相似度は、93.7%となり、Dに分類された。No.28は単独のクラスタを形成し、Eに分類された。No.29~37の相似度は、90.1%となりFに分類された。*Bln*Iは、クラスタはG~Iの3種類に分類された。No.28~30, 32~37の相似度は、91.2%となり、Gに分類された。No.31は単独のクラスタを形成し、Hに分類された。No.38~47の相似度は94.8%となり、Iに分類された。遺伝子型は4種類に分類された(D-I,E-G,F-G,F-H)。

2c,ND,1株では、全ての株が*Xba*Iで96.3%以上、*Bln*Iで97.4%以上の相似度を示し、1種類の遺伝子型に分類された(J-K)。

2a,2a,1株では、*Xba*Iは、No.55,56が他の株と80.9%の相似度を示し、2種類に分類された(L,M)。

しかし、これらの株の泳動像のバンド本数は、他の株と同じであることから、同一グループとした。*Bln*Iは、全ての株が93.4%以上の相似度を示し、1種類に分類された(N)。遺伝子型は1種類に分類された。(ML-N)。

2d,2b,ND株では、*Xba*IはNo.68と71を除く全ての株が94.8%以上の相似度を示し、2種類に分類された(O,P)。*Bln*Iは、全ての株が96.6%以上の相似度を示し、1種類に分類された(Q)。遺伝子型は2種類に分類された(O-Q,P-Q)。

3k,ND,3株では、*Xba*Iは全ての株が94.9%以上の相似度を示し、1種類に分類された(R)。また、*Bln*Iは、酵素量や、泳動条件を変えて実施しても、バンドが検出できず、解析を行うことができなかった。

2005年に広島市および愛媛県で分離されたO157:H7 散発事例株の*Xba*Iおよび*Bln*IによるPFGEの解析結果を、図7に示した。

散発事例株であるため、デンドログラムも、パルスネットパターン別のデンドログラムと比較して、全ての株の相似度が低い値を示した。*Xba*Iは、クラスタはS~Xの6種類に分類された。05002, 05003, 05010の相似度は97.0%となり、Sに分類された。05013, 05016, 05017の相似度は94.1%となり、Tに分類された。05005, 05020, 05021, ST4, ST8の相似度は85.0%となり、Uに分類された。05004, 05011, ST6の相似度は87.0%となり、Vに分類された。ST7およびST9は、それぞれ単独のクラスタに分類された(W,X)。*Bln*Iは、クラスタはY, Z, AA, BB, CCの5種類に分類された。05013, 05016, 05017の相似度は87.5%となり、Yに分類された。05005, 05020, 05021, ST4, ST8の相似度は87.9%となり、Zに分類された。05002, 05003, 05010の相似度は85.0%となり、AAに分類された。ST7およびST9は、それぞれ単独のクラスタに分類された(BB,CC)。05004, 05011, ST6は、酵素量や、