

200500677A・B

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 17 年度総括・分担研究報告書
及び

平成 15～17 年度総括・総合研究報告書
(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 寺嶋 淳

国立感染症研究所 細菌第一部

目次

1. 平成 17 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	寺嶋 淳 国立感染症研究所

2. 平成 17 年度分担研究報告書

(I) 国立感染症研究所

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	13
主任研究者	寺嶋 淳 国立感染症研究所
分担研究者	渡辺 治雄 "
協力研究者	泉谷 秀昌 "
	伊豫田 淳 "
	三戸部治郎 "
	裴 迎新 " (黒竜江省疾病 コントロールセンター)

(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) を基礎とした施設間差について	25
分担研究者	長野 秀樹 北海道立衛生研究所
協力研究者	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 秋田県衛生科学研究所
	齋藤志保子 "
	今野 貴之 "
	藤井伸一郎 "
	松舘 宏樹 "
	佐藤 卓 岩手県環境保健研究センター
	蛇口 哲夫 "
	谷津 壽郎 "
	田村 広子 "
	三品 道子 "
	菅原 直子 "
	佐藤 由美 "
	畠山 敬 宮城県保健環境センター
	山口 友美 "
	沼田 昇 仙台市衛生研究所
	村田 敏夫 "

最上久美子	〃
大谷 勝実	山形県衛生研究所
水田 克己	〃
熊谷奈々子	〃
須釜久美子	〃
平澤 恭子	福島県衛生研究所
長沢 正秋	〃
渡部 啓司	〃
佐々木寿子	新潟県保健環境科学研究所
木村 浩一	北海道立衛生研究所
伊東 拓也	〃
合田 悟	〃

b) 秋田県で分離された志賀毒素産生性大腸菌 0121 の OI-122 保有状況、
薬剤感受性と分子疫学的性状 …………… 32

協力研究者	八柳 潤	秋田県衛生科学研究所
	齊藤志保子	〃
	今野 貴之	〃

c) 保育所において二つの異なる P F G E パターンが分離された腸管出血性大腸菌
O26:H11 による集団感染事例（岩手県） …………… 36

協力研究者	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	松館 宏樹	〃
	佐藤 卓	〃
	蛇口 哲夫	〃

d) 宮城県下で発生した大腸菌感染事例
ーパルスフィールドゲル電気泳動法による解析とその概略ー …………… 38

協力研究者	谷津 壽郎	宮城県保健環境センター
	田村 広子	〃
	三品 道子	〃
	菅原 直子	〃
	佐藤 由美	〃
	畠山 敬	〃
	秋山 和夫	〃

e) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）の院内感染が疑われた事例の
PFGE 解析 …………… 46

協力研究者	村田 敏夫	山形県衛生研究所
	最上久美子	〃
	大谷 勝実	〃
	水田 克己	〃

f) マンニト非分解性黄色ブドウ球菌による食中毒事例の

パルスフィールドゲル電気泳動法による解析 48

協力研究者	熊谷奈々子	福島県衛生研究所
	須釜久美子	〃
	平澤 恭子	〃
	長沢 正秋	〃
	渡部 啓司	〃

g) 北海道日高支庁で発生した集団 0157 症 50

協力研究者	木村 浩一	北海道立衛生研究所
	伊東 拓也	〃
	合田 悟	〃
分担研究者	長野 秀樹	〃

(Ⅲ) 関東・甲・信・静岡ブロック

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 52

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	矢萩かをる	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
	野田 裕之	山梨県衛生公害研究所
	小山 敏枝	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
	小西 典子	東京都健康安全研究センター
	尾畑 浩魅	〃

b) 腸管出血性大腸菌 0157 集団事例および散発事例への PFGE 解析の応用例 67

1. 栃木県で分離された 0157 散発事例由来株の PFGE パターン
栃木県保健環境センター
2. 群馬県で分離された 0157 散発事例由来株の PFGE パターン
群馬県衛生環境研究所
3. 埼玉県で分離された集団事例および散発事例由来 0157 株の PFGE パターン
埼玉県衛生研究所
4. 千葉県で分離された散発および集団事例由来 0157 株の PFGE パターン
千葉県衛生研究所
5. 神奈川県で分離された散発事例由来 EHEC 0157 株の PFGE パターン
神奈川県衛生研究所

6. 腸管出血性大腸菌 O26 による感染症事例 2005 年
神奈川県衛生研究所
7. 横浜市で分離された EHEC 0157 集団および散発事例由来株の PFGE パターン
横浜市衛生研究所
8. 山梨県で分離された EHEC 0157:H7 (VT1+VT2) 株の PFGE パターン
山梨県衛生公害研究所
9. 長野県で分離された散発事例および集団事例由来 0157 の PFGE パターン
長野県環境保全研究所
10. 静岡県分離株 (0157:H7) の PFGE 画像
静岡県環境衛生科学研究所
11. 東京都内および神奈川県内の系列店 B で発生した EHEC 食中毒事例
東京都健康安全研究センター
12. 東京都内 S 苑で発生した腸管出血性大腸菌 0157 事例
東京都健康安全研究センター

c) サルモネラ食中毒事例への PFGE 解析の応用例 83

1. *Salmonella* Montevideo による集団食中毒
千葉県衛生研究所
2. 2005 年 7 月に発生したサルモネラ血清型 Enteritidis 食中毒事例 (1)
東京都健康安全研究センター
3. 2005 年 7 月に発生したサルモネラ血清型 Enteritidis 食中毒事例 (2)
東京都健康安全研究センター

(IV) 東海・北陸ブロック

- a) 平成 17 年度東海・北陸地方 8 地方衛生研究所と豊田市衛生検査所による
腸管出血性大腸菌 O157 を用いたパルスネット構築のための精度管理 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	〃
	倉本 早苗	石川県保健環境センター
	白木 豊	岐阜県保健環境研究所
	田中 保知	岐阜市衛生試験所
	田中 大祐	富山県衛生研究所
	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
	藪谷 充孝	名古屋市衛生研究所
	奥村貴代子	豊田市衛生試験所

- b) *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 96

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	〃
	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

(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 102

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センター
	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
	榮井 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	〃

b) 兵庫県で分離された食中毒由来腸炎ビブリオ O3:K6 の菌型解析 113

協力研究者	西海 弘城	兵庫県立健康環境科学研究センター
	辻 英高	〃
	福永 真治	〃

c) 保育園におけるエルシニア・エンテロコリチカ血清型 O8 による集団食中毒事例 (奈良県) 116

協力研究者	榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	中山 章文	〃
	橋田みさを	〃
	山本 安純	〃

d) 2005 年に大阪府で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事件の PFGE 解析 120

協力研究者	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	山崎 渉	〃
	塚本 定三	〃
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 …………… 125

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	榑 美代子	広島県保健環境センター
	妹尾 正登	”
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	最首 信和	鳥取県衛生環境研究所
	富田 正章	山口県環境保健研究センター
	吉田 紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
	絹田 美苗	高知県衛生研究所
	谷脇 妙	”
	森 敏彦	徳島県保健環境センター
	笹川知位子	”
	古田 喜美	広島市衛生研究所

b) *Legionella pneumophila* SG1 の遺伝子解析について …………… 141

研究協力者	榑 美代子	広島県保健環境センター
	妹尾 正登	”

c) *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 …………… 145

研究協力者	吉田 紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	田中 博	”

d) 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 — …………… 148

研究協力者	古田 喜美	広島市衛生研究所
	下村 佳	”
	石村 勝之	”
	笠間 良雄	”
	松本 勝	”
	荻野 武雄	”

(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Ⅲ
— 研修と精度管理 — …………… 168

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
	川内 良介	福岡市保健環境研究所
	徳崎 里美	北九州市環境科学研究所

	眞子 純孝	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
	植木 信介	長崎市保健環境試験所
	八尋 俊輔	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
	上野 伸広	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
b)	<i>Campylobacter jejuni</i> 分子疫学解析の検討	186
	研究協力者	山口 仁孝 長崎県衛生公害研究所
		上野 伸広 鹿児島県環境保健センター
		八尋 俊輔 熊本県保健環境科学研究所
	分担研究者	堀川 和美 福岡県保健環境研究所
c)	レジオネラ属菌の PFGE の精度管理、及び九州各機関で 検出されたレジオネラ属菌の PFGE による比較解析	196
	研究協力者	河野喜美子 宮崎県衛生環境研究所
		岡田 美香 "
		村上 光一 福岡県保健環境研究所
		野田多美枝 "
		徳崎 里美 北九州市環境科学研究所
		眞子 純孝 佐賀県衛生薬業センター
		植木 信介 長崎市保健環境試験所
		緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター
		八尋 俊輔 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
		上野 伸広 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
d)	A 群溶血レンサ球菌の細菌学的特徴および遺伝子解析の検討	210
	研究協力者	緒方喜久代 大分県衛生環境研究センター
		久高 潤 沖縄県衛生環境研究所
		岸川 恭子 佐賀県衛生薬業センター
		尾崎 延芳 福岡市保健環境研究所
		瓜生 佳世 "
		丸住美都里 熊本市環境総合研究所
		松岡由美子 "

目次

1. 平成 15～17 年度総合研究報告書

- 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 …………… 217
主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所

2. 平成 15～17 年度分担研究総合報告書

(I) 国立感染症研究所

- 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 …………… 226
主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所
分担研究者 渡辺 治雄 ”

(II) 北海道・東北・新潟ブロック

- －北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスネット構築に向けた基盤研究－ …… 233
分担研究者 長野 秀樹 北海道立衛生研究所

(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 …………… 240
分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター

(IV) 東海・北陸ブロック

- a) 東海・北陸地方 8 地方衛生研究所と豊田市衛生検査所による
腸管出血性大腸菌 O157 を用いたパルスネット構築のための精度管理 …………… 265
b) *Salmonella* Typhimurium と *Shigella sonnei* (ソルネ菌) のパルスフィールド
ゲル電気泳動画像データ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 …………… 282
分担研究者 松本 昌門 愛知県衛生研究所

(V) 近畿ブロック

- 近畿ブロックにおける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 …………… 296
分担研究者 勢戸 和子 大阪府立公衆衛生研究所

(VI) 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 …………… 310
分担研究者 田中 博 愛媛県立衛生環境研究所

(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 …………… 316

b) 食中毒及び感染症胃腸炎の病原体と臨床症状	332
分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所	
3. 研究成果の刊行	339

平成 15～17 年度総合研究報告書

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 寺嶋 淳 国立感染症研究所細菌第一部第一室長

食品由来感染症の原因菌に対して標準化 PFGE 解析とその精度管理を行い、解析結果のデータベース化により関係機関での情報共有が可能となるネットワークの構築を進めた。全国 6 ブロック（北海道、関東、中部、近畿、四国、九州）の各代表者を中心として、標準化プロトコールによる PFGE 解析を各種の菌について行った。継続的な精度管理を行うことにより、各機関において精度の高い安定した結果が得られるようになってきた。それぞれの機関で互換性のあるデータを集約することで、信頼度の高いデータベース構築につながるものと期待される。参加各機関において解析結果の互換性を確保するために行われている精度管理の結果から、各機関の PFGE 解析技術が向上しているものの、一部では解析技術改善の必要性が見いだされていることは、継続した精度管理が必要であることを強く示唆している。データベース化した細菌学的疫学指標を充実させるために PFGE 解析を補完する方法の検証が必要であるとともに、情報共有にむけたシステムをさらに充実させることが必要である。

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）
渡辺治雄（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（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

食品由来感染症においても、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオ、赤痢等を起因菌として大規模に発生する事例の報告が続いている。被害の拡大を未然に防ぐためには、探知される事例の疫学的解析と関連性が疑われる起因菌の菌学的解析という 2 面からの解析に基づいて、迅速かつ総合的判断を下すことが重要である。現在、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）が、菌の解析システムとして汎用され成果を挙げている。特に、食品由来感染症の対策においては、

PulseNet と呼ばれる PFGE 解析情報のネットワークが世界的な規模で標準化されつつある。わが国においても、国際的ネットワークでのデータの互換性を確保するために、標準プロトコールを採用して精度管理を行うとともに、データベースを構築して分離株の異同を DNA レベルで識別できるシステムを稼働させ、広域腸管感染症事例に対応することが重要である。一方、PFGE 以外の技術に基づく解析方法も開発され、その評価が進みつつある。本研究では、標準プロトコールでの精度管理を継続し、データベース構築に基づく迅速かつ有益な情報共有システムを機能させることを目的とする。

B. 研究方法

本研究班においては、3 年間で以下の点について継続的な研究を行う。

- 1) 標準化プロトコールに基づいて我が国の解析技術の均一化、およびその精度管理を行う。そのために、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。また、解析結果の互換性について検証を行う。
- 2) 新しく作成した解析ソフト (Fingerprinting II) を使用して PFGE 画像を処理することにより、各種の菌についてデータベースの構築を継続する。各地域の分離株がデータベース上で新規のものであるか否かを判定し、事例間の関連性の有無についての判断に役立つ情報提供が可能となるシステムの構築を行う。
- 3) PFGE 解析に基づく世界的ネットワーク

であるパルスネットへの積極的参加を行う。また、我が国の PFGE 解析技術の検証を行うためにも、各国のデータとの比較を目的としてデータの提示を行う。

C. 研究結果と考察

1. 感染研における研究

1) 新プロトコールによる PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイピング

新プロトコールにおいて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。平成 16 年度以降の EHEC 0157 については、平成 16 年に分離・送付された 1987 株が 957 種類のサブタイプに分かれ、平成 17 年に分離・送付された 1807 株が、平成 17 年に分離された新しいサブタイプとして 780 種類、平成 16 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。また、後述するように、散发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。EHECのその他の血清型である026, 0111についても同じような傾向が見られたが、0157株で観察された程の頻度では、同一クラスター内に存在する散発事例由来株が見つからなかった。したがって、クラスターを形成する株は集団発生由来株であり、ほとんどの株は異なるサブタイプであることが示唆された。なお、Fingerprinting IIによるデンドログラム作成では、CDCが推奨しているトレランス値1.2%を使用した²が、*Xba*I-100%マッチであるパターンにおいても目視では相違が見出される場合があり、同一クラスター内でもサブタイプ名の異なるパターンが検出された。実際、同じ菌株を*Bln*I消化でのPFGE解析を行うと、異なるバンドが検出できるので、*Xba*I消化でのPFGE解析結果で観察された微妙な違いが菌株のclonalityによるものであることが確認できた。したがって、デンドログラムに基づいたサブタイピングにおいても、目視による確認を行いながらサブタイプ名を確定する必要が示唆された。

2) EHECにおける広域共通パターンについて

平成16年に分離されたEHEC 0157については、1987株が957種類のサブタイプに分かれた。そのうち28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、No. 5, 52, 112, 191, 292, 465, 589の7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分離さ

れており、*Xba*Iの結果だけではなく*Bln*I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。平成17年に分離された1807株のEHEC 0157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。なお、共通パターンを示す株については、MLVAの結果からより詳細な解析が必要である可能性も示唆された。MLVAにおいては、供試株として平成16年に分離された各地の散発事例由来EHEC 0157、16株を用いた。これらの保存株は*Xba*I及び*Bln*IによるPFGE解析で6種類のサブタイプに分類されたが、MLVAにより14種類のサブタイプに分けることができた。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。

3) 解析結果の配信

平成17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、0157が1807株、026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。

2. 各ブロックにおける研究成果

1) 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロック内においては、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) の精度を維持向上するために様々な手法を用いて施設間差を検証した。平成 15 年度の調査結果から、PFGE 技術の向上が認められた。前年度の調査では、その similarity が統一マニュアル採用後においても最高で 82.4% であったが、当該年度では最低でも 84.3% であった。また、機器による泳動距離の違いや分離パターンの違いが画像解析の精度に与える影響を吟味する目的で、北海道立衛生研究

所で作製したプラグを各施設で泳動した後、その画像を解析した。これらの結果から、泳動距離を統一することが解析精度の向上に繋がることが示唆された。さらに、菌の濃度を均一にすることによってバンドの輝度が統一し、解析精度が上がることを示された。従って、サンプルプラグを作るとき菌濃度と適度な泳動距離が重要な因子であることが判明した。

平成 16 年度の調査では、ソフトを用いた画像解析の手法に主眼をおいて施設間差について検討した。異なったデンドログラムを生む 3 種類の画像をベースにしたが、そのデンドログラムの形状についてはどの施設においても相違は認められず、菌株同士の定性的な相互関係についての情報は得られることが分かった。一方、その相互関係を定量的に評価しようとした時には、施設毎に若干の相違が認められた。その原因の一つとして、施設毎に解析に用いたバンドの数を数えると、菌株によって差がないものと数本の違いが見られた菌株もあった。ソフト上でバンドを認識するときには、自動認識も行うが、満足のいく結果が得られず、最終的には用手法にてバンドを認識させる。このときに、明るくややブロードのバンドを 1 本とするが 2 本のバンドの重なりとして認識するかによって総体的なバンドの数が違ってくる。その解析に用いるバンドの数の違いが最終的には similarity の施設間差の原因の一つとして考えられた。従って、similarity の施設間差を最小にするためには、認識するバンドの数を統一する、すなわち、輝度の明るいバンドの取り方を一定にする必要がある。そのた

めには、解析用ソフトを使用するに当たっての研修会等が必要であろう。

平成17年度の調査結果からは、Dice法、Peason法との比較において、当所予想された有意差は認められなかったが、Dice法で100%のsimilarityを示した施設の同じバンドデータを用いたにもかかわらず、Peason法では100%にはならなかった。通常用いられているDice法ではパラメーターが統一されているが、Peason法ではその統一性がなく、そのことが影響しているのかもしれない。また、解析ソフトを所有していない施設については、当所で解析したデータ（同一人が解析を担当）を上梓しているが、これらの両アルゴリズムの数値がほぼ一致していた。このことは、解析結果の数値の違いがPFGEの条件の違いよりもむしろ、解析者の要因により大きな影響を受けるのではいかということを示唆するものである。従って、平成16年度での結果からも示されたように、バンドパターンの認識に対する何らかの統一的判断基準が必要である。

2) 関東・甲・信・静岡ブロック

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。DNAブロックプラグ作製法の改良、すなわち、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。

分子量マーカーとして*S. Braenderup*を用

い、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たことにより、解析のためのデータの質が非常に向上した。その結果、PFGE画像上の78.2kb以上のDNAバンドを対象に作成したデンドログラムでは、どの施設でPFGEを行った場合も、92%以上の類似性が得られ、パルスネットを構築するための基盤ができた事が確認された。しかし、この類似性については、供試する菌株のDNAバンドの数や分離性等によって左右されることも考慮する必要がある。

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。さらに、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。

PFGEパターン系統解析ソフトウェアとして、Fingerprinting II Ver.3(Bio Rad)を用いて、Dice法で解析しているが、Peason法の方が使い易いのではないかという結果が得られたが、本法についてはさらに検討する必要がある。

サルモネラ血清型Enteritidisの解析にPFGE解析を応用することについては、さらに検討する必要性が示唆された。

3) 東海・北陸ブロック

「パルスネットジャッパン」構築のための準備活動として平成15年度から17年度の3年間に東海・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。

平成15年度は8施設が参加した。第1回精度管理では、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）実施条件のうち泳動条件、及び入マーカーの使用を統一し、他の条件は全て各施設の方法で実施した。しかし、PFGE型の異なる4検体について解析可能であった7地研について地研間の相同性の比較を行なったが、4検体全てにおいて、同一PFGE型にもかかわらず全ての地研の泳動図が単一のクラスターに属することはなく、地研間の相同性も100（2地研間のみ）～40%と低かった。第2回精度管理では、1）PFGE泳動条件の統一。2）プラグ菌量の統一。3）薄いプラグを作成できるキットの使用。4）シャープなバンドが安定して得られるサルモネラを *Xba*I で処理したマーカー（サルモネラマーカー）を使用した。その結果、8施設全ての泳動図を解析することが可能となり、しかも用いた3検体中2検体で8施設全ての泳動図が単一のクラスターを形成した。しかも各クラスターの相同性は87.7、89.2%と第1回に比べ非常に高かった。残りの1検体に関しては8地研のうち7地研の泳動図が同一クラスターを形成し、その相同性も88.4%と高かった。

平成16年度第1回精度管理では、平成15年度と同一の4検体について、9施設が感染

研もしくはそれに類似した条件でPFGEを実施した。得られた泳動図について施設間の相同性を検討したところ、4検体全てで同一検体が同一クラスターを形成した。なお、同一検体ごとに各施設間で得られた相同性は60.1%から82.4%であった。第2回の精度管理では、PFGE担当者が愛知県衛生研究所（愛知衛研）に集まり同一検体を愛知衛研が作成した同一ゲルを用いて電気泳動を行なう実習を実施した。得られた泳動図の解析を行なった結果、8地研全体の相同性は77.6%と各施設で行なった場合に比べ約18%高かった。また各担当者が1カ所に集まって手技の確認、質疑応答を行なうことができた。

平成17年度精度管理は平成15年度及び16年度の何れかまたは両年に使用した2検体（検体番号3、4）について、9施設が泳動条件とサルモネラマーカーの使用は統一して、その他のPFGE実施条件は各施設によって感染研もしくはそれに類似した条件で実施した。得られた泳動図について解析ソフトを用いて検討したところ、2検体とも同一検体が同一クラスターを形成した。検体3の施設間の相同性は、平成15年度は78.6%であり、平成16年度の89.2%よりは低かったものの平成17年度の76.4%よりは高い値となった。検体4に関しては平成17年度は87.8%と非常に高率で、平成16年度の82.4%より高い値となった。

以上の結果からサルモネラマーカーとPFGE泳動条件の統一が東海・北陸地方各施設が実施したPFGE泳動図の相同性を通年で76%以上の高率に保つことに重要であると思われた。

4) 近畿ブロック

別々の施設で実施したPFGE画像を比較して、菌株の異同を判断するためには、方法の

統一と標準化が必要である。平成 15 年度に NIID より「新プロトコール」が提案され、マーカーの画像が鮮明になり、被検菌株はサイズの小さいバンドが明瞭に分離されるようになったことから、近畿ブロック 11 地研の技術的な施設間差は解消された。今後は電送画像による菌株の比較解析が可能であり、PFGE 法の所要時間が短縮されたことから、行政的貢献が期待される。

しかしながら、菌株によってはバンドが隣接するパターンを示すことがあり、正確なバンド認識には解像度の高い画像が必要である。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の解消には、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、写真撮影条件に関する改善が課題である。また、新プロトコールではプラグの取り扱いが容易になったとはいえ、PFGE の実施にはある程度の熟練が必要であり、各施設で技術が継承されるように努めるべきである。

食品流通や外食産業の現状から、食品由来感染症は広域で発生するリスクが高い。特に近畿ブロックは、住民が通勤通学などの生活圏を共有しており、各自治体では散発事例でも、感染源が共通する場合が多いと考えられる。このような事例を迅速に探知し、感染拡大を防止するためには、発生動向調査を通じた連携とともに、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。引き続き、各施設で良好な PFGE 画像が得られるよう、ソフト面とハード面の維持管理が重要である。

5) 中国四国ブロック

パルスネットを構築し、diffuse outbreak の早期発見に成果を上げるには各施設が統一したプロトコールの導入と、その検査技術の維持が必要であり、精度管理は不可欠である。中・四国地区の 10 地研では平成 15 年度から、米国 CDC のプロトコールをもとに感染研が新に作成した PFGE のプロトコール(感染研ニュープロトコール)に準拠して PFGE を実施している。従来、わが国では、平成 9 年 5 月に国立感染症研究所で行なわれた技術研修会で示された PFGE 方法(腸管出血性大腸菌 0157 の検出・解析等の技術研修会マニュアル)が用いられていたが、今回の精度管理では、感染研ニュープロトコールで行なった結果、従来の方法に比べ、①DNA ブロックプラグ作製に 0.7mm のプラグキャストを使用することで、DNA バンドがシャープで鮮明になった。②DNA マーカーとして S. Braenderup を基準にすることにより各施設のマーカーが的確に認識できるようになった。③画像解析ソフトの導入によりクラスター解析ができ、客観的判定が可能となるなど幾つかの長所が認められた。しかし、現行の新しいプロトコールでも菌量の違いによる画像に差異、写真撮影時のコントラストによる画像への影響などいくつかの技術的問題点も認められた。また、一定の PFGE 解析技術を取得し、維持するための組織的管理体制も必要であることが示唆された。

一方、精度管理以外に各地研では 9 課題の PFGE 解析に関連した基礎的研究が実施された。これらの研究結果から PFGE 解析は 0157 感染症以外にも多くの細菌性感染症の疫学

調査に不可欠な検査手法であることが再認識された。また、PFGE 解析を基本に他の疫学マーカーを用いた手法を併用することにより、さらに詳細な疫学調査が迅速に行なえるものと考えられた。

6) 九州ブロック

九州ブロックでは平成 12-14 年度「PFGE の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究」において以下の件論を得ている。

1. PFGE 用プラグ作成について；統一マニュアルに従ってプラグ作成を行うことにより、良好なプラグが作成可能である。
2. 泳動；①シングルピークで確認できるマーカーの安定供給、②PFGE 機器の管理と保守点検、③バッファー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、⑤画像取込の改善
3. 迅速法によるプラグ作製法はルーチンワークに使用可能である。

そこで、本研究では、平成 12-14 年度の結論を踏まえた精度管理の継続と新たな取り組みを加えて研究の推進を行なった。

平成 12-14 年度での問題点については次のように解決できた。まず、1 と 3 については、PFGE の方法が、従来の方法を米国 CDC 法に変更されたことにより、安定的な PFGE 操作ができるようになった。即ち、プラグおよび泳動用アガロースゲルに SeaKem Gold を用いることによって、操作性およびバンドの明瞭化に大きく貢献した。これに加え、プラグ作製の 0.7 mm サンプルプラグキャスターを用いることにより、PFGE 中の酵素処理や洗浄効

果が高まるとともにシャープなバンドが得られるようになった。また、プラグのゲル装填法からコーム貼り付け法に変更になったことにより、操作が簡便になるとともにバンドがシャープになった。しかし、 λ -ladder を用いた場合、PFGE 泳動用寒天を流し込んだ際に λ -ladder に熱が加わり、バンドに影響を及ぼす場合が多い。このことから *S. Braenderup* H9812 株をサイズマーカーとして使用する方が、画像比較において有利であると考えられる。本研究でレジオネラの精度管理において λ -ladder をサイズマーカーとして使用したが、やはり適切なバンドが得られにくい結果となった。自作のマーカーの場合、マーカーと制限酵素が異なる場合に多少の不便があるが、予め作製しておくなどの対応方法があると考えられる。この場合、保存性の確認も今後必要である。

2 の①については、 λ -ladder が相互に画像を交換するサイズマーカーとしては不向きであることを提言してきた。平成 15 年からサイズマーカーを λ -ladder から *S. Braenderup* H9812 株に変更することによって、安定的なサイズマーカーが得られるとともに、画像の比較が容易になった。2 の②および③は、平成 17 年度の研究において、各機関が随時調整することによって改善された。さらに 2 の④については、PFGE 画像取込に関する機器がかなり整備されてきており、相互画像の交換に良好な結果を与えている。

九州ブロックでは、0157 以外の菌種についての PFGE の検討並びにそのマニュアル化を試みた。研究をとおして多くの菌種についてカバーし、広域連携を深めることができた。

一方、本ブロック内においても毎年かなりの移動や配置換えがあり、年によっては担当者が半数以上入れ替わることもある。このような状況に対応するためには、恒常的な精度管理が不可欠であると言える。しかも、精度管理を行なうことにより、他機関の状況も把握でき、互いに技術並びに情報交換が可能となる。

D. 結論

- 1) 標準化プロトコールに基づく PFGE 解析が国内のみならず国際的なデータ互換性を保持し、広域に及ぶ事例の迅速探知、拡大阻止に有力な方法であることが示された。
- 2) 精度の高いデータベース構築には、継続的な PFGE 解析の精度管理と技術継承が重要である。
- 3) 次世代の解析技術の開発や解析情報共有のための手段として Internet 利用の情報還元システムにも取り組んでいくことが重要である。

E. 3年間の発表業績

巻末を参照のこと。

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」

分担研究総合報告書

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 感染研に送付された腸管出血性大腸菌(EHEC)等の分離株を用いて標準化プロトコールによる PFGE を行い、画像解析ソフト(FingerprintingII)による解析及びデータベースの構築を行った。同一施設における解析結果の蓄積においては上記の条件で支障なくデータベースが構築可能であり、平成 17 年度まで解析を継続中である。また、標準化プロトコールで得られたデータは米国と日本にまたがり発生した事例において互換的であったことから、標準化プロトコールに基づく互換性のあるデータベースの構築がなされていることが示唆された。感染研で構築したデータベースの一部について、これらの結果を PDF の書類として、厚生労働行政総合情報システム(WISH)上の個別システム「PulseNet Japan」でほぼ 1ヶ月おきにデータを更新しながら公開するシステムを構築した。データベース構築の過程において、平成 14 年度までに EHEC や赤痢菌による diffuse outbreak の探知に PFGE 解析が有効であることが示された。O157 の広域共通パターンを示す株が多数見いだされる一方で、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法では、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

既存のプロトコールの機動性を確保しつつ、PulseNet の標準化プロトコールによるデータの互換性を確立した新プロトコールを作成することを第一の目標として。さらに、新プロトコールでは、

分子量マーカーとして基準株 *S. Braenderup* H9812 株のパターンを用い、データベースの構築を継続することで、新たに発生する事例由来株の動向を明らかにし、広域発生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