

た。また、PFGEとは異なる、遺伝子解析技術を応用した新しい方法として MLVA 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比較することで実用性についての検討を目的とした。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 15 年から 17 年に感染研に送付された株に対して、PFGE 解析を行った。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を行うために、まず、平成 15 年度に標準株である *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。平成 16 年度からは、新規に解析した分離株のパターンを含んだデンドログラムを作成し、新しいパターンに対しては、順じ新番号を付与することで新パターン名を付けるという新サブタイピングを行った。バンドパターンに一本でも差が観察されれば異なる番号を付与した。デンドログラムの作成では、クラスター解析を行う方法として UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages)法を用い、近似度の計算には Dice 係数を使用した。これらの解析結果に対してはデータベース化を行い、新規パターンを示す株が即時に探知できるシステムの構築を継続した。また、全国における分離株の動向を感染研と地研で共有するために、PFGE 解析結果、デンドログラム及び新サブタイプ名については、従来と同様ほぼ 1 ヶ月おきに 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。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 PFGE 画像配信を行った。情報還元システムとして、よりアクセスが容易な Internet 経由のシステムの可能性について感染研のサーバーの利用を平成 17 年度に検討した。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。一方、現在解析方法として使用している PFGE 法以外の新規解析方法の一つとして、MLVA 法の有用性について検討した。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。

## C. 研究結果と考察

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 O157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O26、O111についても同じような傾向が見られたが、O157株で観察された程度の頻度では、同一クラスター内に存在する散发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が推奨しているトランス値1.2%を使用した<sup>3</sup>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 O157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 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。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发事例由来EHEC O157、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。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。

### 3. 解析結果の公開方法

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、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

標準化 PFGE 解析に基づき構築しているデータベースが新規パターンの検出に有効であることが明らかとなった。また、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) 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  $\beta$ -catenin. *Microbial Pathogenesis* 35, 107–117, 2003
- 5) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. Evolving from PFGE network as PulseNet Japan to participation in PulseNet Asia Pacific. *PulseNet News Special Edition*, 2004
- 6) Shima, K., Terajima, J., Sato, T., Nishimura, K., Tamura, K., Watanabe, H., Takeda, Y., and Yamasaki, S. Development of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for the Epidemiological Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*; 42, 5205–5213, 2004
- 7) Kudaka, J., Asato, R., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Kuniyosi, H., Kinjo, Y., Terajima, J., Watanabe, H., Kobayashi, J., Swaminathan, B., Braden, CR., and Dunn, JR. *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Ground Beef from a U.S. Military Installation — Okinawa, Japan, February 2004. *MMWR*; 54, 40–42, 2005
- 8) Hirose, K., Terajima, J., Izumiya, H., Tamura, K., Arakawa, E., Takai, N., and 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, 1203–1205, 2005
- 9) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄。菌株レベルの同定：パルスフィールドゲル電気泳動法による菌株のサブタイピング。腸内細菌学雑誌、18, 117–122, 2004
- 10) 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
- 11) 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.
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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.
- 15) 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.

16) 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:2002 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

2) 泉谷秀昌、寺嶋 淳、田村和満、渡辺治雄: Salmonella Enteritidis に関するファージ型別および薬剤耐性の動向。第 74 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本

3) Terajima J., Izumiya H., Iyoda S., Mitobe J., Tamura K., and Watanabe H.: Molecular epidemiological investigation of EHEC isolates in Japan 2001-2002. (日本における腸管出血性大腸菌の分子疫学的調査 2001-2002 年) 5th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections', Jun., 2003, Edinburgh, Scotland

4) Terajima J., Iyoda S.: Molecular epidemiological investigation of EHEC isolates in Japan 2001-2002. (日本における腸管出血性大腸菌の分子疫学的調査 2001-2002 年), 7th annual Enter-net workshop, Jun., 2003, Edinburgh, Scotland

5) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄:2001-2002 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 7 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2003 年 6 月、奈良

6) 寺嶋 淳:赤痢菌の PFGE。第 24 回衛生微生物技術協議会、2003 年 7 月、福岡

7) 寺嶋 淳:腸管出血性大腸菌 O157 の近年の遺伝子型別の動向とその疫学調査への有用性。第 86 回日本細菌学会関東支部会、2003 年 10 月、横浜

8) 泉谷秀昌、寺嶋 淳、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄:O157 を中心とした、2003 年分離 EHEC の動向について。第 8 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2004 年 3 月、東京

9) 泉谷秀昌、寺嶋 淳、田村和満、渡辺治雄:2002 年における Salmonella enteritidis のファージ型別および薬剤耐性の傾向。第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪

10) 井口 純、大澤 朗、寺嶋 淳、渡辺治雄:腸管出血性大腸菌 O157 に溶原化する Stx2 ファージ DNA の入れ替わり現象。第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪

11) 大倉正稔、大澤 朗、井口 純、荒川英二、寺嶋 淳、渡辺治雄:新興型腸炎ビブリオ同定用 PCR 法の開発。第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪

12) 大岡唯祐、大西 真、寺嶋 淳、小椋義俊、中山啓介、渡辺治雄、林 哲也マルチプレックス PCR を用いた迅速な O157 菌株識別システムの開発。第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪

13) 小椋義俊、黒川 顕、大西 真、中山啓介、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 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪

14) 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田 淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄:2003 年における

- O157:H7 を中心とした EHEC の動向について。第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪
- 15) Ro Osawa, Masatoshi Okura, Eiji Arakawa, Jun Terajima and Haruo Watanabe: Identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* specific DNA sequence by genomic subtraction. 39th US-Japan Cholera and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting, Dec. 2004, Kyoto
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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

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15～17年度総合研究報告書（分担報告）

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ネット構築に向けた基盤研究—

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、大野譲治	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、	
	畠山敬、山口友美、	宮城県保健環境センター
	沼田昇、牛水真紀子	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、若森吉広、駒込理佳、	
	合田悟、伊東拓也	北海道立衛生研究所

研究要旨：パルスネットを構築するには、その基礎となる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ことが不可欠である。北海道・東北・新潟ブロック内においては、そのために様々な手法を用いて施設間差を検証した。PFGEの結果に影響を与える因子として、まず、サンプルプラグの調整の仕方と機器による泳動条件の違いの2つの因子について検討した。その結果、菌濃度の調整、適度な泳動距離の2つがPFGE画像の解像度に与える因子として重要であることが示された。次に解析ソフトの操作法、特にバンドの認識の違いによる施設間差について検討したところ、輝度が明るく、太いバンドを2本にとるか1本にとるかといったようなバンドの認識パターンが施設間差に影響を与えることが分かった。また、PFGEの結果に与える環境要因を検討するために日時をずらして菌株試料を送付し施設間差を調べた。さらに解析に用いるアルゴリズムについても

調べた。2回の配付試料のなかには同一菌株が1株含まれており、これらの類似度は100%になるはずであるが、100%を示したのは2施設のみであった。このことはPFGEの場合、完全なる再現性は難しいことを示している。アルゴリズムの違いによる統計的な優位性は認められなかった。また、このアルゴリズムの違いを検討する中で、解析結果の相違はPFGEの条件よりも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思わせる結果が得られた。一方では、PFGEの技術的な向上はなされており、バンドの認識も容易になりつつあることが示された。また、各自治体の事例研究を集積することにより、PFGEの技術向上を図り、行政における運用状況を把握した。

## A. 目的

腸管出血性大腸菌、サルモネラ菌や赤痢菌などによる食品由来細菌性感染症においては、分散型集団発生事例(diffuse outbreak)を起こしやすいことが知られている。この集団発生事例の拡大防止と早期探知を目的として、国立感染症研究所を中心としたパルスフィールドゲル電気泳動法(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)を基礎としたネットワーク(パルスネット)が構築されている。本ネットワークを効率的に機能させるには、地方衛生研究所におけるPFGEの技術レベルの維持向上が不可欠である。そのために北海道・東北・新潟ブロックにおいては、様々な手法を用いて施設間差を検証するとともに、事例研究も同時に行った。

## B. 方法

1. 対象施設：北海道・東北・新潟ブロック内において、PFGEの機器を整備し、定常的に実施し行政要求に添っている以

下の地方衛生研究所とした。

札幌市衛生研究所  
青森県環境保健センター  
秋田県衛生科学研究所  
岩手県環境保健研究センター  
宮城県保健環境センター  
仙台市衛生研究所  
山形県衛生研究所  
福島県衛生研究所  
新潟県保健環境科学研究所  
北海道立衛生研究所

## 2. 施設間差の検討

平成15年度には、腸管出血性大腸菌O157菌4株を各衛生研究所に送付すると共に、4菌株のうち2株については、北海道立衛生研究所にて調整したサンプルプラグを同時に送付した。これらの4菌株については各施設にてプラグを調整し、各施設で調整したプラグと北海道立衛生研究所で調整したプラグを同じゲルにてPFGEを実施した。その画像を北海道立衛生研究所にて収集し解析した。

平成16年には、北海道立衛生研究所



にて作製した PFGE 画像3枚を解析ソフトを所有し、解析を実施している施設に配付し、その解析の違いによる施設間差を検討した。従って、対象施設としては上記の施設から解析ソフトを所有していない、山形県衛生研究所、福島県衛生研究所、新潟県保健環境科学研究所の3施設を除く7施設とした。

平成17年度では、全10施設を対象とした。腸管出血性大腸菌 O157 菌7菌株を4菌株ずつ2回に分けて配付した。この7株のうち1株を1回目と2回目ともに配付し、時間差およびゲルの違いによる泳動パターンについて検討した。また、解析に用いるアルゴリズムについても、Dice 法と Peason 法の2種類について解析し、比較検討した。

### 3. 事例に関する研究

各自治体における、当該年あるいは複数年にわたる事例について北海道立衛生研究所にて収集した。

## C. 研究結果

### 1. 施設間差の検討

平成15年度の調査では、菌株を配付した4株についての比較において、そのバンドパターンの similarity は84.3%から 92.8%の範囲で、菌株による相違が確認された。北海道立衛生研究所で作製したサンプルプラグを配付した2菌株については、一方の菌株は菌濃度が薄かったため、その similarity は菌株を送付して得た similarity よりも低かった

(88.3% : 92.8%) が、もう一方の菌株では向上した (90.7% : 85.5%)。

平成16年度の調査では、3種類の画像を用いたソフトによる解析手法について検討した。それぞれの画像データのデンドログラムを比較すると、どの施設においてもその形状は変わらず、菌株同士の近縁関係に関する情報については違いは認められなかった。しかし、この相互関係を定量的にみたときはその similarity において若干のばらつきが認められた。その原因を探索する目的で、ソフトにおけるバンド認識について着目した。その結果、各菌株毎に、認識しているバンドの数が異なり、これが similarity のばらつきに影響しているように思われた。

平成17年度の調査では、2群の試料(4菌株)を別々に PFGE 解析した場合、2群の解析結果を正確に比較し得るか否かを検討した。また、解析に当たっては2種類のアルゴリズムを使用し、比較した。2群の試料中1菌株のみを同一菌株としたが、PFGE 解析で 100%の similarity を得られたのは Dice 法で1施設のみであった。Peason 法では 100%の similarity は得られなかった。この2試料(同一菌株)の両アルゴリズムでの similarity を比率検定、順位検定にて比較したが有意差は認められなかった。試料のグルーピングでは、Peason 法では各施設とも同じ枝分かれを示したが、Dice 法による系統樹では2施設で Peason 法とは異なる枝分かれを示す結果となった。

## 2. 事例に関する研究

平成15年度から平成17年度に集積された PFGE を用いた事例研究についてはその表題と発表者及び所属を表1に示した。また、各内容については当該年度の報告書に詳細に記載されている。

### D. 考察

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に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が示された。従って、サンプルプラグを作るときの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

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。

#### E. 結論

PFGE 技術のレベルアップが図られ、どの施設においても解析をするのに十分な解像度が得られた。また、PFGE の解像度において、泳動距離と菌濃度が重要な因子であることが示された。このことと連動して、解析ソフトを用いて解析する場合、認識するバンドの数が定量的に菌株の相互関係を把握する指標となる similarity (%) に影響することが分かった。このことを改善するためには、バンドの認識についての共通の基準が必要であろう。

#### F. 健康危機情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 若森吉広、長野秀樹、森本洋、熊田洋行、玉手直人、内山康裕、藤原修、武士甲一。北海道で分離されたサルモネラ属菌の血清型と薬剤耐性。北海道立衛生研究所報 53: 84-86. 2003.

2. 長野秀樹、熊田洋行、若森吉広、武士甲一、小川廣、和田聖一、館香奈子、加納郎、長澤基博、菅原洋子。保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O111 による集団感染事例—北海道。病原微生物検出情報。24: 66-67. 2003.
3. Nagano, H., Hirochi, T., Fujita, K., Wakamori, Y., Takeshi, K., Yano, S. Phenotypic and genotypic characterization of  $\beta$ -D-glucuronidase-positive Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from deer. J. Med. Microbiol. 53:1037-1043. 2004.
4. Matsumoto, M., Suzuki, Y., Nagano, H., Yatsuyanagi, J., Kurosawa, H., Kobayashi, K., Yamaoka, K., Horikawa K., Kudaka, J., Terajima, J., Watanabe, H., Miyazaki, Y. 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 事例報告

平成15年度		
衛生研究所	発表者	タイトル
北海道立衛生研究所	武士甲一、木村浩一、若森吉広、駒込理佳、長野秀樹	牛乳房炎由来ブドウ球菌の PFGE 解析
秋田県衛生科学研究所	八柳潤、齋藤志保子、齋藤淳子	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
宮城県保健環境センター	畠山敬	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
山形県衛生研究所	池田辰也、最上久美子、大谷勝実、村上尚子	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
福島県衛生研究所	須釜久美子	<i>Salmonella</i> Enteritidis の食中毒事例
福島県衛生研究所	須釜久美子	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
平成16年度		
北海道立衛生研究所	木村浩一、若森吉広、駒込理佳、長野秀樹	北海道における <i>Salmonella</i> Enteritidis のパルスフィールドゲル電気泳動像を基礎としたデータベース構築の試み
岩手県環境保健研究センター	藤井伸一郎、佐藤卓	腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (astA) 保有大腸菌 O166:HUT が原因と考えられた食中毒事例
新潟県保健環境科学研究所	佐々木寿子、加藤美和子、白幡祐子、寺澤宏司、不二崎順二	食品及び環境等からの TDH、TRH 産生腸炎ピブリオ分離株のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析
山形県衛生研究所	池田辰也、最上久美子、大谷勝実、工藤勝博	下痢症患者由来 <i>Salmonella</i> Enteritidis の疫学的解析

(表1の続き)

福島県衛生研究所	熊谷奈々子、須釜久美子、平澤恭子、長沢正秋、渡部啓治	腸管出血性大腸菌 O111 集団感染事例及び <i>Salmonella</i> Enteritidis 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
平成17年度		
秋田県衛生科学研究所	八柳潤、斎藤志保子、今野貴之	秋田県で分離された志賀毒素産生性大腸菌 O121 の O1-122 保有状況、薬剤感受性と分子疫学的性状
岩手県環境保健研究センター	藤井伸一郎、松舘宏樹、佐藤卓、蛇口哲夫	保健所における二つの異なる PFGE 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
宮城県保健環境センター	谷津壽郎、田村広子、三品道子、菅原直子、佐藤由美、畠山敬、秋山和夫	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
山形県衛生研究所	村田敏夫、最上久美子、大谷勝実、水田克己	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
福島県衛生研究所	熊谷奈々子、須釜久美子、平澤恭子、長沢正秋、渡部啓治	マンニット非分解性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
北海道立衛生研究所	木村浩一、伊東拓也、合田悟、長野秀樹	北海道日高支庁で発生した集団 O157 症

厚生労働科学研究 新興・再興感染症 研究事業  
平成15－17年度総合研究報告書（分担報告）

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, 矢萩かをる	茨城県衛生研究所
	長 則夫, 船渡川圭次	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, 野田裕之	山梨県衛生公害研究所
	笠原ひとみ, 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, 尾畑浩魅	東京都健康安全研究センター

研究要旨：関東甲信静に分散する11地方衛生研究所（地研）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”に従って薄型のDNAブロックを作製し、*S. Braenderup* を分子量マーカーとして、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行った結果、非常に鮮明な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。

3年間にわたり、毎年、腸管出血性大腸菌O157の共通菌株5～6株を、11地研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、78.2kb以上のDNAバンドを対象にしてデンドログラムを作成した場合、どの施設でPFGEを行った場合も同一株は92%以上の類似性が得られた。

また、腸管出血性大腸菌およびサルモネラのPFGE解析成績を疫学調査に応用した結果、有効な情報が得られ、多数の事例で実際に行政に有効に活用された。

A. 研究目的

PFGE法を用いた病原菌の遺伝子解析情報を共有するためのネットワーク構築を目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC)

O157を中心にPFGE解析、およびその成績のデータベース化を試みる。そのためには、その根幹の役割を担う各地方衛生研究所におけるPFGE解析技術水準を均一化

することが重要である。どの施設でも同じレベルのPFGE画像を得るためには、共通した方法でPFGE解析を実施する必要がある。本研究班では、米国CDC法に準じたPFGE法として「感染研New protocol」を使うこととした。

関東甲信静地域に分散する11地研において、New protocol によるPFGE解析を行い、画像を東京都健康安全センターに送付、解析ソフトを用いた解析を実施し、問題点を洗い出し、データベース化のための基盤作りを行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

#### 1) PFGE解析用共通菌株

各地研のPFGE解析を比較するための共通菌株として、毎年、腸管出血性大腸菌0157:H7 の5~6株を供試した。

#### 2) 散発または集団下痢症事例由来株

EHEC 株：各地研毎に、その年度に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例で分離されたEHEC 0157 または026 株を供試した。

*Salmonella* 株：各地研毎に、その年度に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例由来の*Salmonella* serovar Enteritidis(SE)株またはその他の血清型の分離株を供試した。

### 2. 感染研 New protocol によるPFGE解析

感染研 New protocol に準拠し、以下のとおり条件を統一して検討した。

#### 1) アガロースブロックの作製

PFGE用DNAブロックの作製は、0.7mmプラグキャストを使用し、SeaKem Gold

Agarose（最終濃度0.5%）で作製した。供試菌の調製および濃度は、各施設の方法で行った。

#### 2) DNA抽出法

DNA抽出時にLysozyme処理は行わず、溶菌は、1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0)で、50℃, 18~20時間、行った。

#### 3) PFGE法による解析

作製したDNAブロックは、EHECでは、制限酵素*Xba* I で、サルモネラでは制限酵素*Xba* I および*bln* I で処理(37℃, 4時間)した後、PFGE解析を行った。電気泳動用 agaroseには、SeaKem Gold Agaroseを使用した。電気泳動は、EHECでは、6V/cm, 2.2~54.2sec, 20時間、サルモネラでは6V/cm, 2.2~63.8sec, 20時間で行った。泳動温度は12℃とした。但し、泳動時間は、泳動した時のDNAバンドの最先端がゲルの下から1cm ~ 1.5cm になるように各施設で調整することとした。

DNAサイズマーカーとしては、*Salmonella* Braenderup H9812 株を使用し、泳動するゲルの両端と中央のレーンに入れた。

### 3. PFGE解析成績の電送

各地研で解析したPFGE画像を、tif(または jpeg)ファイルとして、電子メールで送付した。

### 4. 画像解析

画像解析ソフトFingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いて解析を試みた。

### 5. 腸管出血性大腸菌食集団事例および散発事例へのPFGE解析の応用

各地研で経験した腸管出血性大腸菌食  
集団事例および散発事例から分離された  
菌株についてPFGE解析を行い有用性を検  
討した。

#### 6. サルモネラ食中毒事例へのPFGE解析 の応用

各地研で経験したサルモネラによる感  
染症および食中毒事例から分離された菌  
株についてPFGE解析を行い有用性を検討  
した。

### C. 研究結果

#### 1. New protocol の検討

##### 1) ブロック作製用プラグの検討

従来の1.5mmプラグキャスターに代わ  
り、0.7mmのプラグキャスターを使った薄  
型ブロックを供試している施設は、2003  
年11月の時点で11所中4所のみであった。  
取り入れていない施設にも導入を図り  
、ブロック作製法の統一を行った。その  
結果、いずれの施設に置いても薄型ブロ  
ックを使ったPFGE解析では、厚型に比べ  
泳動バンドがシャープであった。特に、  
細部のバンドが厚型に比べて遙かに鮮明  
になり、以後の解析に有利であった（写  
真1）。

##### 2) DNA抽出法の検討

DNA抽出時にLysozyme処理を行わない  
非常に簡素化された感染研 New  
Protocol に従い作製したDNAブロックに  
おいても、その後のPFGE電気泳動像で、  
ほとんど遜色の無い成績を得られること  
を確認した。操作が簡単であることは、  
非常な利点であった。但し、反応時間は  
、overnightがよかった（写真2）。

##### 3) PFGE電気泳動に用いるAgarose の検 討

Agaroseについて検討した結果、SeaKem  
Gold Agarose では、PFC agarose より分  
離がやや良かった。しかし、価格が高い  
のが難点である（写真3、5）。

##### 4) 電気泳動条件の検討

SeaKem Gold Agarose は、旧条件  
(4-8sec, 9hr, 8-50sec, 13 hr)で泳動を  
行くと流れ過ぎ、新条件(2.2-54.2sec,  
21hr)が良かった（写真4）。その後の検  
討で泳動時間は19時間で十分であること  
が確認された。

##### 5) DNAサイズマーカーの検討

DNAサイズマーカーとして従来は  
Lambda ladder DNAを使用していたが、市  
販品はいずれも安定性が悪くシャープな  
泳導像が得られなかった。一方、米国CDC  
が“universal standard”として使用す  
ることに決めた*Salmonella* Braenderup  
H9812株は、バンドの数も多く、DNAバン  
ドがシャープで濃度も均一で安定してお  
り、Lambda ladderより遙かに使い易く、  
その後の解析に有利であった（写真5）  
。

##### 6) PFGE像の写真の取り込み方法

PFGE像の写真の取り込みを、①デジタ  
ルカメラと、②白黒CCDカメラで行った場  
合を比較した。

同じゲルを撮影しても、使用するカメ  
ラの種類によって写真の印象が大きく異  
なる事が確認された（写真6）。図1は  
、2種類の方法で写した写真を元に作成  
したデンドログラムであるが、12菌株中7  
株は100%一致、4株は95%以上、1株は92%  
の一致であった。デンドログラムを作成  
する時に、輝度が強すぎた場合バンドの



位置を選択するのが困難であった。

また、PFGEパターン系統解析ソフトウェアで解析する際に読み込ませる写真は、画像の大きさや解像度をある程度統一した方が、その後の解析がし易く、均一な結果が得られることを確認した。小さく撮った写真であれば標準化の時の歪みが大きくなる。また、解像度が低い写真では、バンドを選ぶ際、選ぶバンドの判定が難しくなるため、誤差が大きくなった。

## 2. 共通菌株を用いた各施設におけるPFGE解析とPFGE解析結果を用いたデンドログラム解析

3年間にわたり、毎年、腸管出血性大腸菌O157の共通菌株5～6株を用いて、11施設でPFGE解析を行った。その代表例を写真7-1, 7-2, 7-3に示した。

### 1) 平成15年度

DNAマーカーとしてLambda ladder DNAを基準にして解析した成績を図2に、*S. Braenderup*を基準にして解析した成績を図3に示した。*S. Braenderup*は、バンドの数も多く、DNAバンドがシャープで濃度も均一で安定しており、Lambda ladderより遙かに使い易く、その後の解析に有利であった。また、薄型ブロックを用いたPFGE解析像は、従来の厚型ブロックの場合に比べて遙かにDNAバンドが鮮明で、分離が良い結果であった。

### 2) 平成16年度

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株6株を、11施設で行ったPFGE像を用いて、*S. Braenderup*を基準にしてデンドログラム解析を行った成績を図4に示した。各施設が6菌株をそれぞれ2レーンで

PFGEを行なった。PFGEアガロースに出現した全DNAバンドを対象とした場合、小さいサイズのDNAバンドが不鮮明で読みとりにくい難点があったため、78.2kb以上のバンドを対象とした結果、6株とも95%以上の類似度が得られた。

### 3) 平成17年度

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株5株を、11施設で行ったPFGE像を用いて、*S. Braenderup*を基準にしてデンドログラム解析を行った成績を図5, 6に示した。各施設が5菌株をそれぞれ2レーンでPFGEを行なった。PFGEアガロースに出現した全DNAバンドを対象として解析した場合、小さいサイズのDNAバンドの分離、染色が不鮮明であったため、バンドを選択することが非常に困難であった施設もあった。このため、No.2の株が2つのクラスターに分かれる結果となった(図5)。しかし、78.2kb以上のバンドを対象とした結果、5株とも、11施設間で92%以上の類似度が得られた(図6)。

## 3. 腸管出血性大腸菌O157分離株のデンドログラム解析

各施設で、散発または集団下痢症事例由来のEHEC O157株のPFGE解析を行い、その写真を元に、デンドログラムを作成した。VT1+VT2産生株を図7に、VT2産生株を図8に示した。同一集団例由来株では、90%以上の類似度が得られているが、個々を解析するまでには至らなかった。

次に、東京都内で2005年8月～9月に分離された散発または集団下痢症事例由来のEHEC O157の141株についてPFGE解析を行い、その写真を基に、デンドログラムを作成した(図9)。同一集団例由来株

では、100%の類似度が得られた。しかし、異なる時期に解析した散発事例由来株では、写真を目視で判断した場合は一致と判定できても、デンドログラム解析では100%一致とならない菌株もあった。

4. 腸管出血性大腸菌のPFGE解析の応用  
各地研で経験した腸管出血性大腸菌による感染症および食中毒事例から分離された菌株について、PFGE解析によって、それぞれ患者由来株や原因食品由来株との比較が可能となり、実際に行政対応に使われる例が非常に増え、菌株から得られるPFGE解析成績が、食中毒事件解明のための科学的証拠と利用されることが日常的に行われるようになった（表1）。

#### 5. サルモネラのPFGE解析の応用

各地研でそれぞれ経験したサルモネラ血清型Enteritidisによる食中毒事例の解明に使われた事例も多い（表2）。それぞれ患者由来株や原因食品由来株と比較が出来、良好な成績が得られているが、EHEC O157に比較すると、PFGEパターンの多様性が少なく、さらに検討する必要性が示唆された。

#### D. 考察

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ェルに入れる）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。

## E. 結論

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。

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を各研究所でNew protocolに従い、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、同一菌株は、11施設どこでPFGE解析を行った場合でも92%の類似性が得られるに至った。

サルモネラの解析にPFGE解析を応用することを検討した結果、ある程度は有効であるが、EHEC O157 に比較するとPFGEパターンの多様性が少なく、さらに検討する必要性が示唆された。

## F. 研究発表

埼玉県衛生研究所：ユッケによるdiffuse outbreakの可能性が疑われたO157事例—埼玉県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）24(9)，214，2003.

千葉県衛生研究所：3種類の腸管出血性大腸菌O157が検出された大学内集団感染事例—千葉県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）25(6)，144，2004.

横浜市衛生研究所：横浜市内の幼稚園で発生した腸管出血性大腸菌O26による集団食中毒事例，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）25(6)，149，2004.

千葉県衛生研究所：保育園で発生した腸管出血性大腸菌O103：H2による集団感染事例—千葉県，病原微生物検出情報（

国立感染症研究所）25(6)，150，2004.

神奈川県衛生研究所：保育園で発生した腸管出血性大腸菌O157感染症の集団事例—神奈川県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）26(1)，18，2005.

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：死亡例が確認された高齢者施設の腸管出血性大腸菌O157集団感染—東京，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）26(6)，144，2005.

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）.

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）.

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）

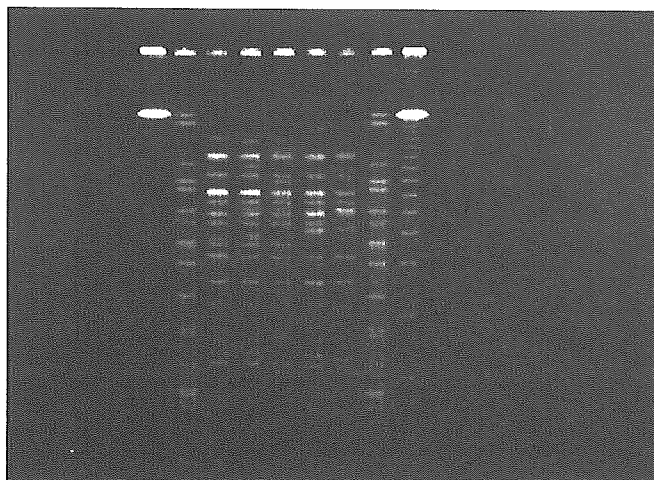
川森文彦，原田哲也，廣井みどり，柏木美智子，大畑克彦，杉山寛治，増田高志：Variable Numbers of Tandem Repeats (VNTR) 型別による腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析，地研全国協議会関東甲信静支部細菌部会 第18日総会・研究会（2006，2，長野）

## G. 知的所有権の取得状況

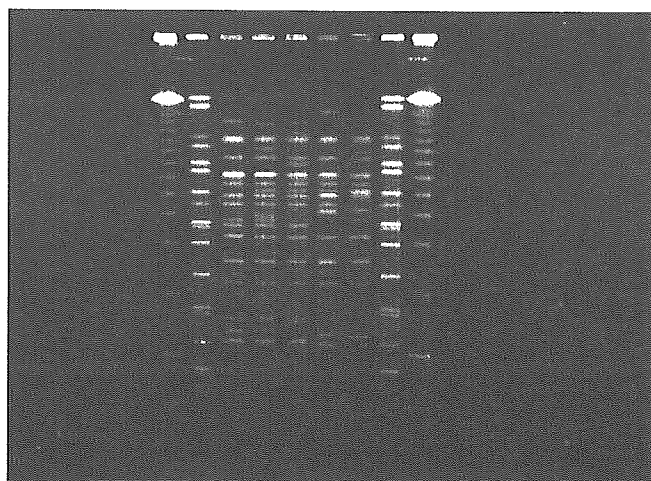
なし

# 写真1

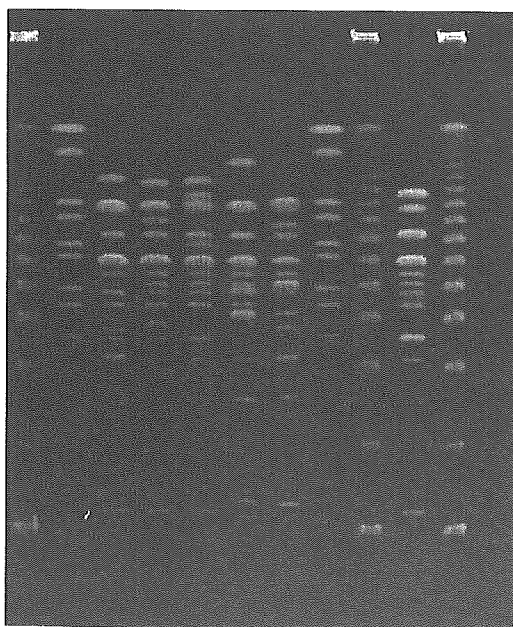
## ブロック作製用プラグの検討 (従来型プラグと0.7mmプラグの比較)



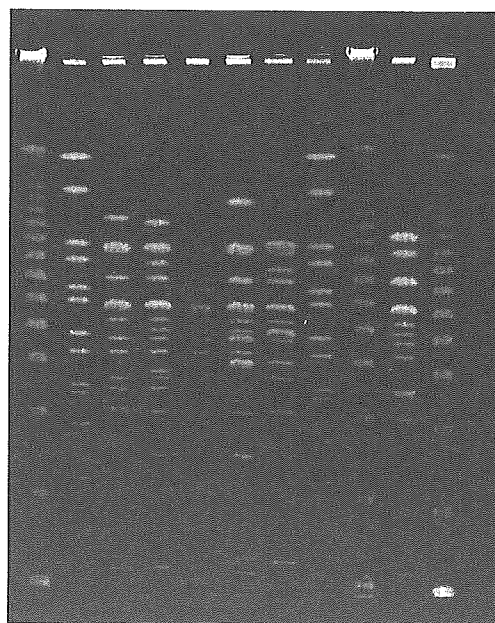
従来型プラグ  
泳動: Seakem Gold Agarose



0.7mmプラグ  
泳動: Seakem Gold Agarose



従来型プラグ  
泳動: PFC Agarose



0.7mmプラグ  
泳動: Seakem Gold Agarose

泳動条件: 6v/cm  
4-8sec 9時間, 8-50sec 13時間