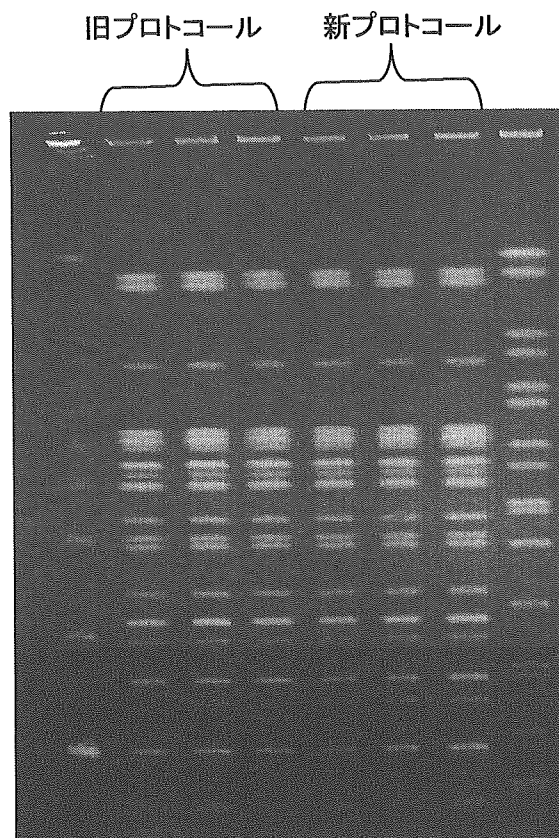


写真2

DNA抽出法の検討 (旧プロトコールと新プロトコールの比較)



旧プロトコール:

- ① 1mg/ml lysozyme in 0.5M EDTA (3時間)
- ② 1mg/ml ProteinaseK, 1%N-laurylsarcosine in 0.5M EDTA (overnight)

新プロトコール:

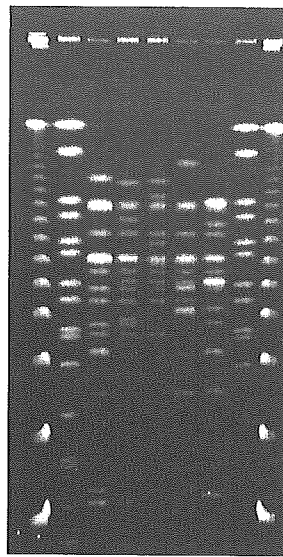
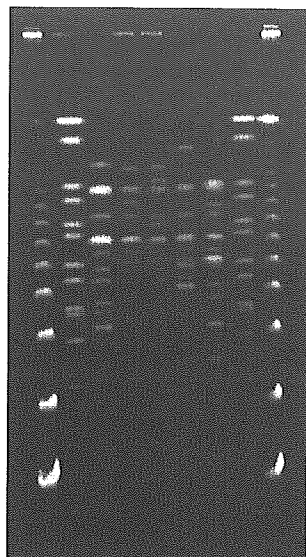
- ① 1mg/ml ProteinaseK, 1%N-laurylsarcosine in 0.5M EDTA (overnight)

写真3 泳動用アガロースの検討

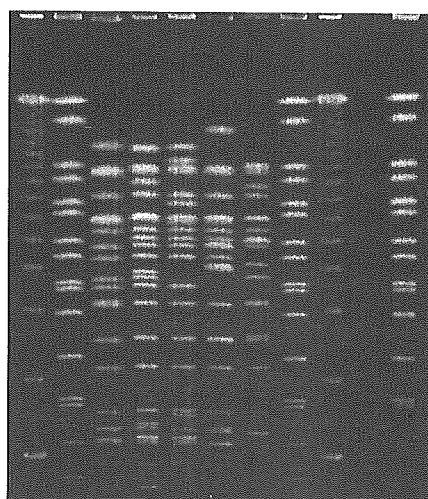
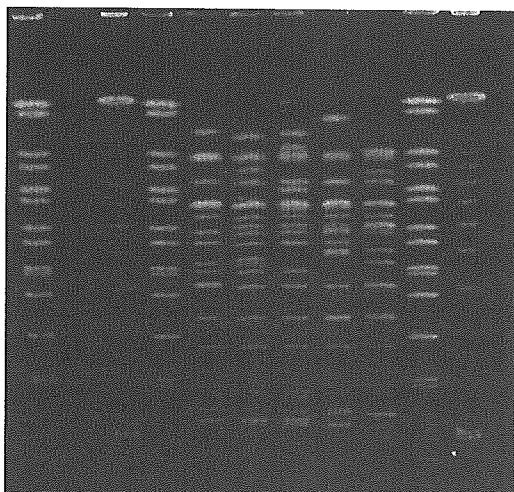
PFCアガロース

SeaKem Goldアガロース

施設A



施設B



施設C

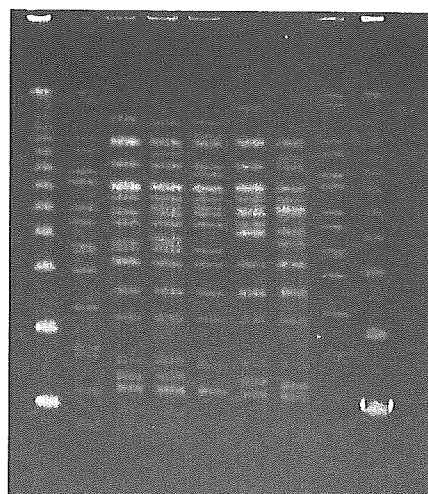
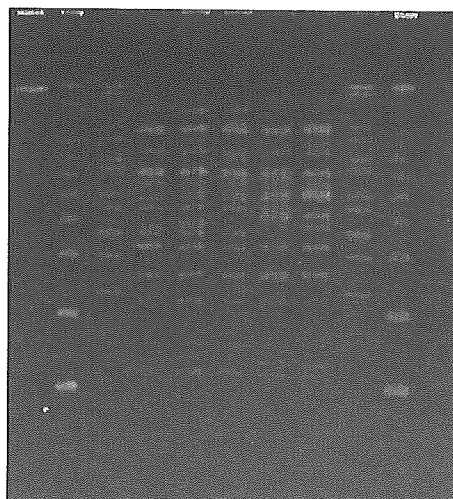
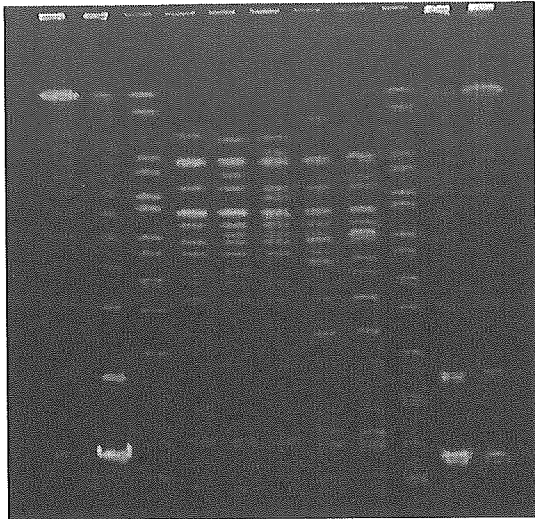
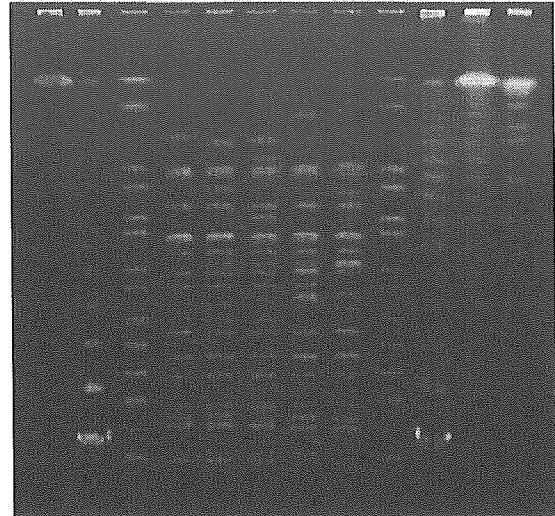


写真4 泳動条件の比較



旧条件



新条件

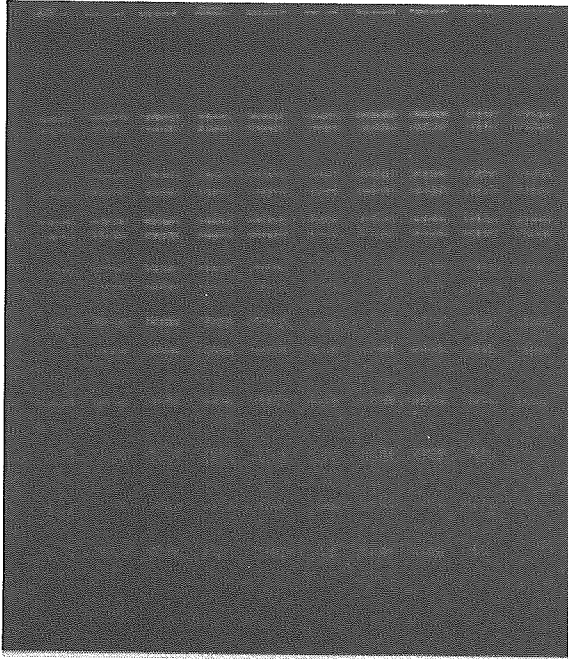
泳動条件

旧条件: 6v/cm
4-8sec 9時間
8-50sec 13時間

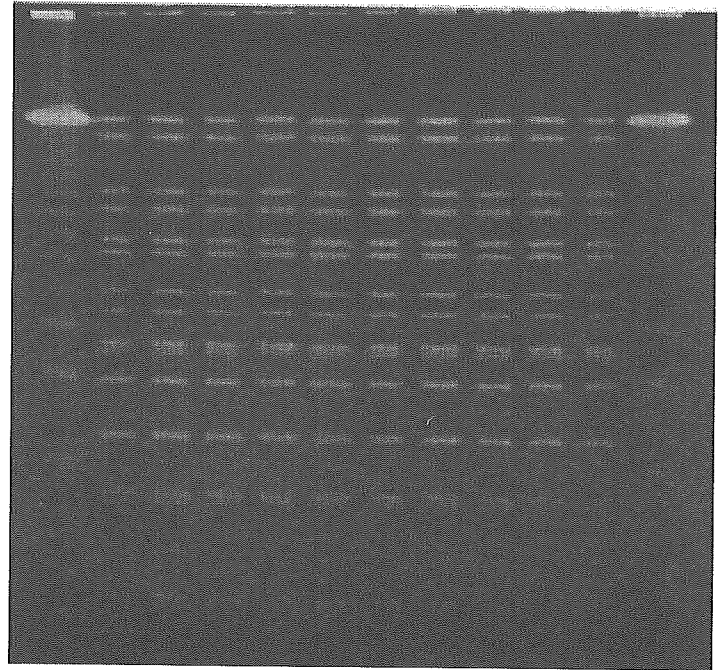
新条件: 6v/cm
2.2-54.2sec 21時間

写真5 S.Braenderup 株のPFGE解析像

1% PFC アガロース



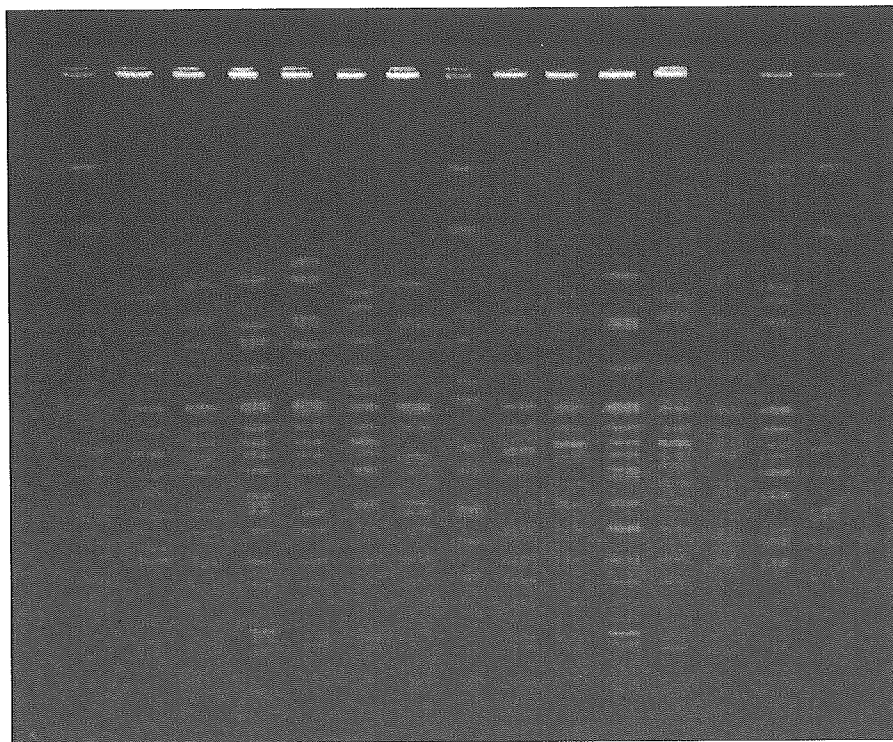
1% SeaKem Gold Agarose



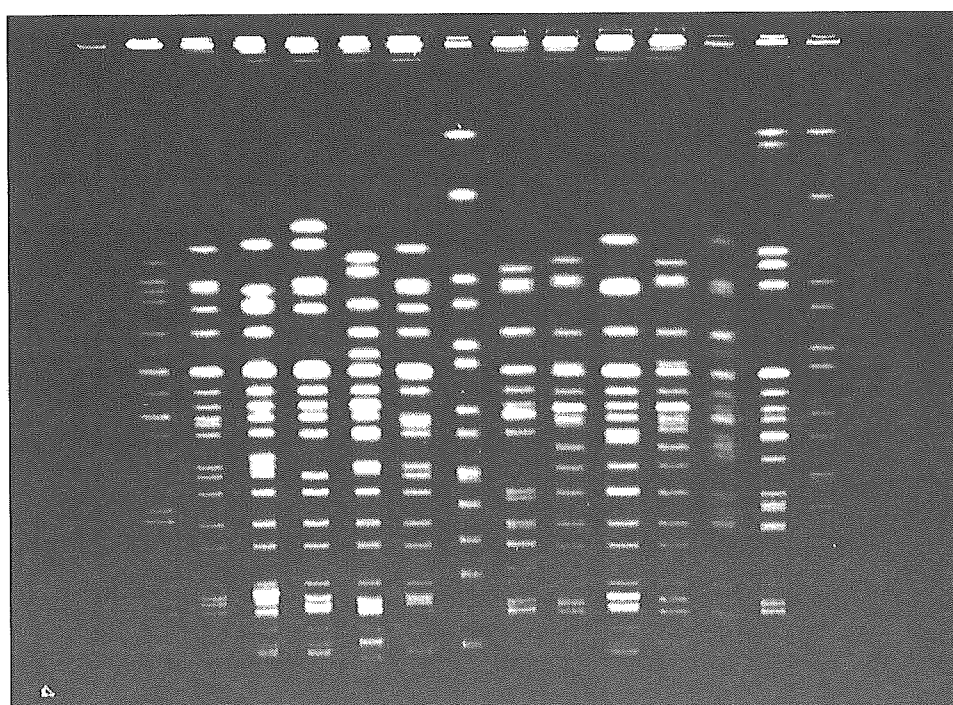
制限酵素: Xba I
泳動条件: 4~8sec 9時間
8~50sec 13時間
泳動温度: 12°C

写真6 写真の取り込み方法による違い

1. Kodak Electrophoresis Documentation system (デジカメ)



2. BIO-RAD Fluor-S Multimager (白黒CCDカメラ)



各施設で検討した共通菌株のPFGE画像

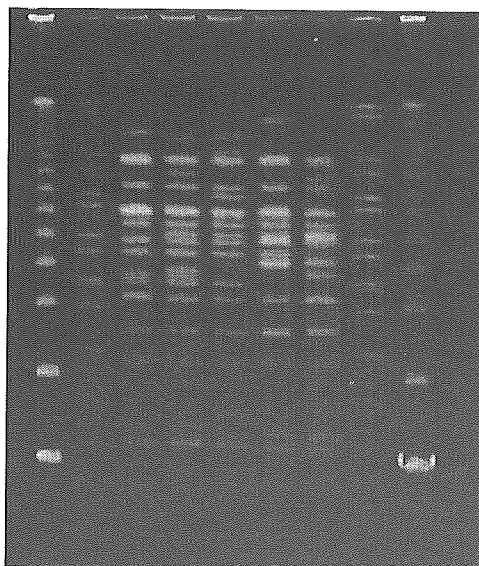


写真7-1 平成15年度

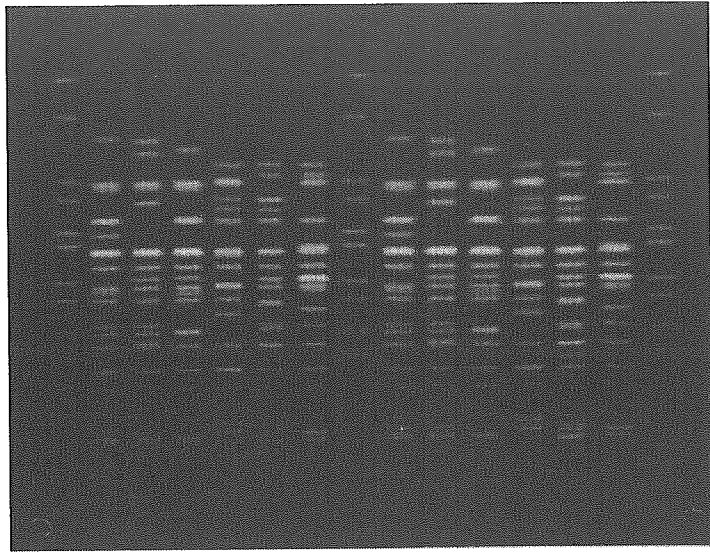


写真7-2 平成16年度

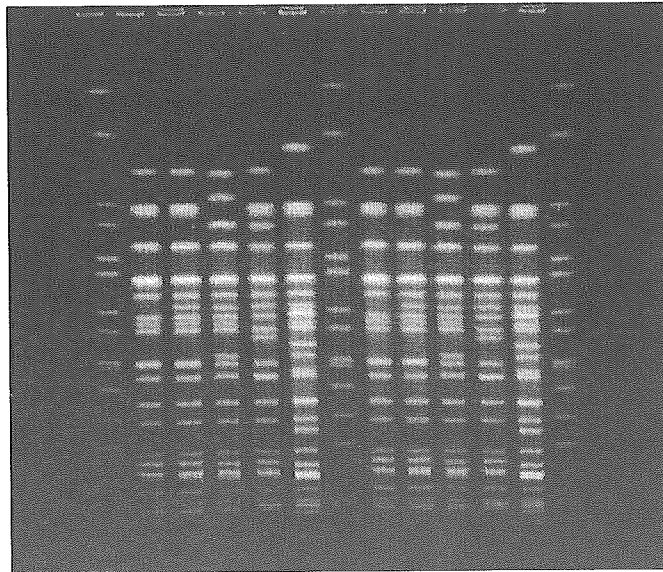


写真7-3 平成17年度

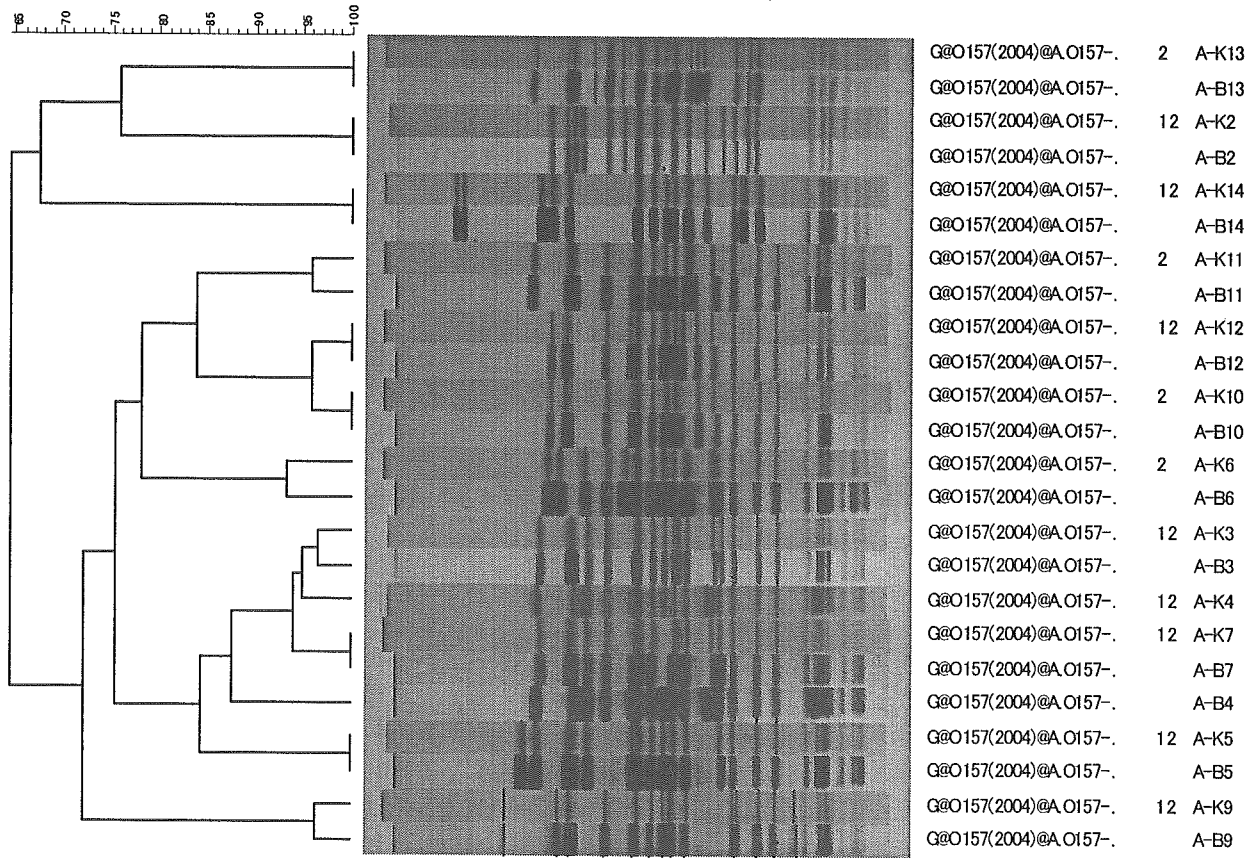


図1. 写真の取り込み方法による違い

K: Kodak Electrophoresis
Documentation system (デジカメ)

B: BIO-RAD Fluor-S Multimager (白黒CCDカメラ)

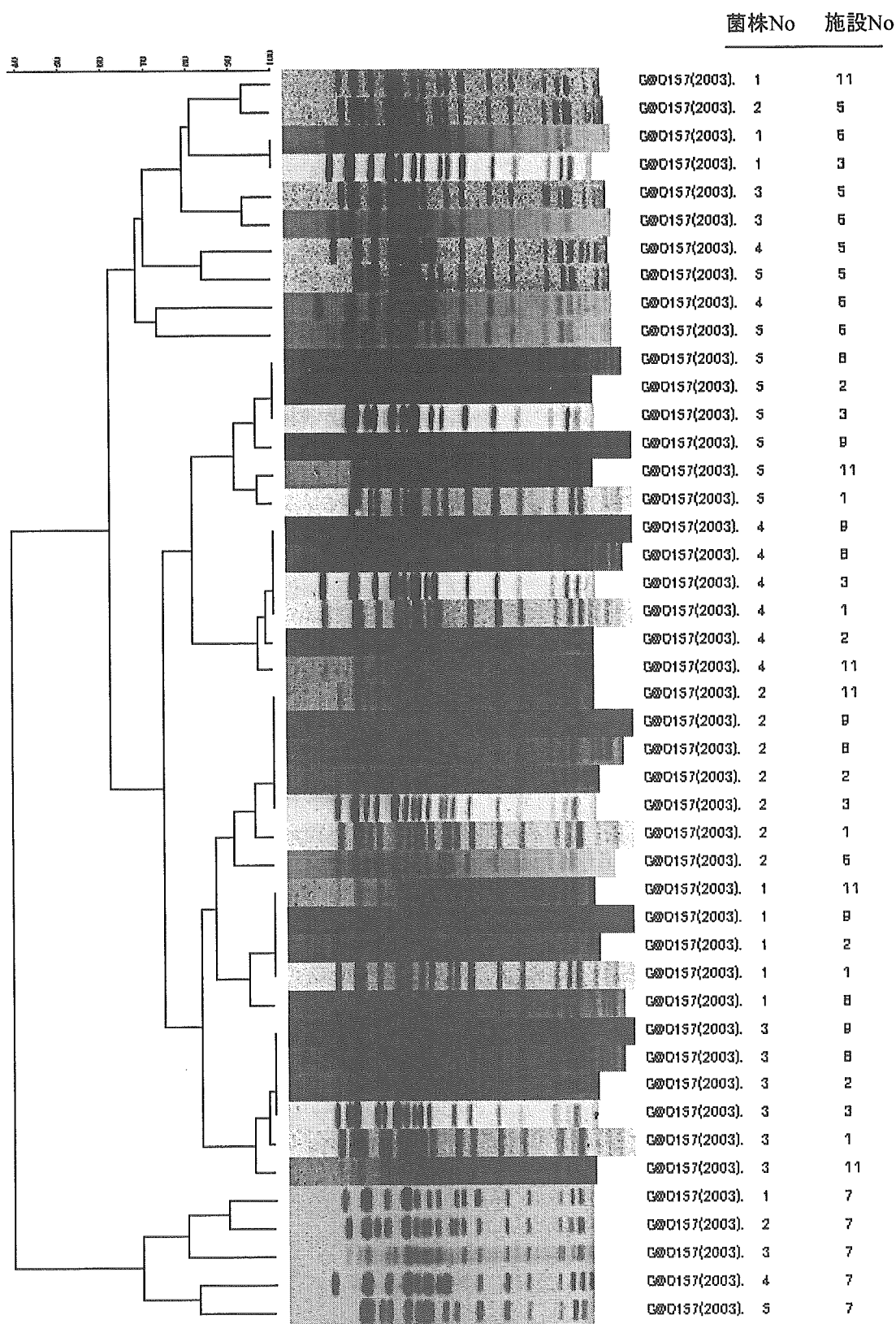


図2 共通菌株(O157)5株の各施設におけるPFGE解析像をもとにしたデンドログラム: λを基準にした解析
 (平成15年度)

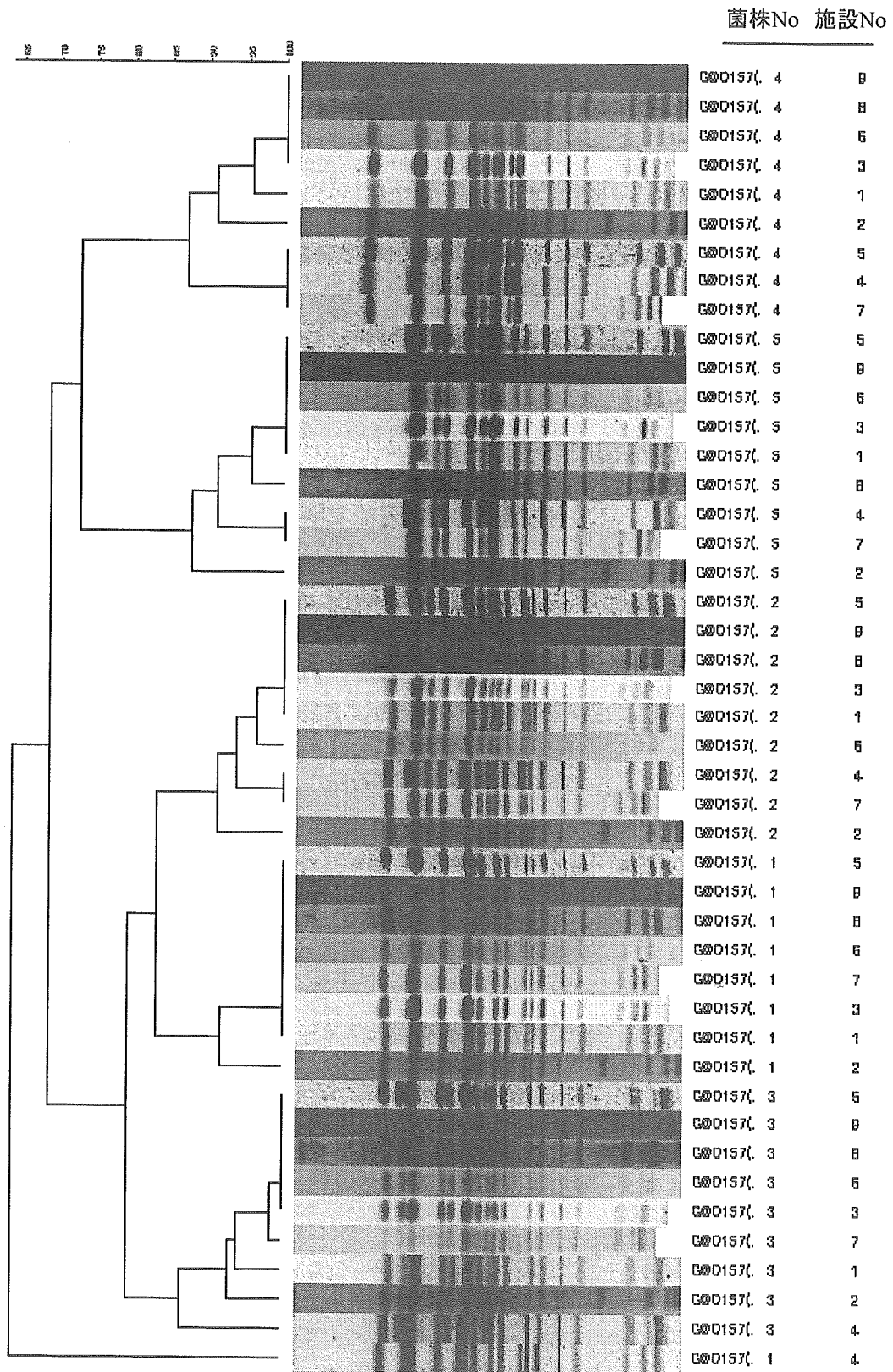


図3 共通菌株(O157)5株の各施設におけるPFGE解析像を
 もとにしたデンドログラム:S.Braenderup株を基準にした解析
 (平成15年度)

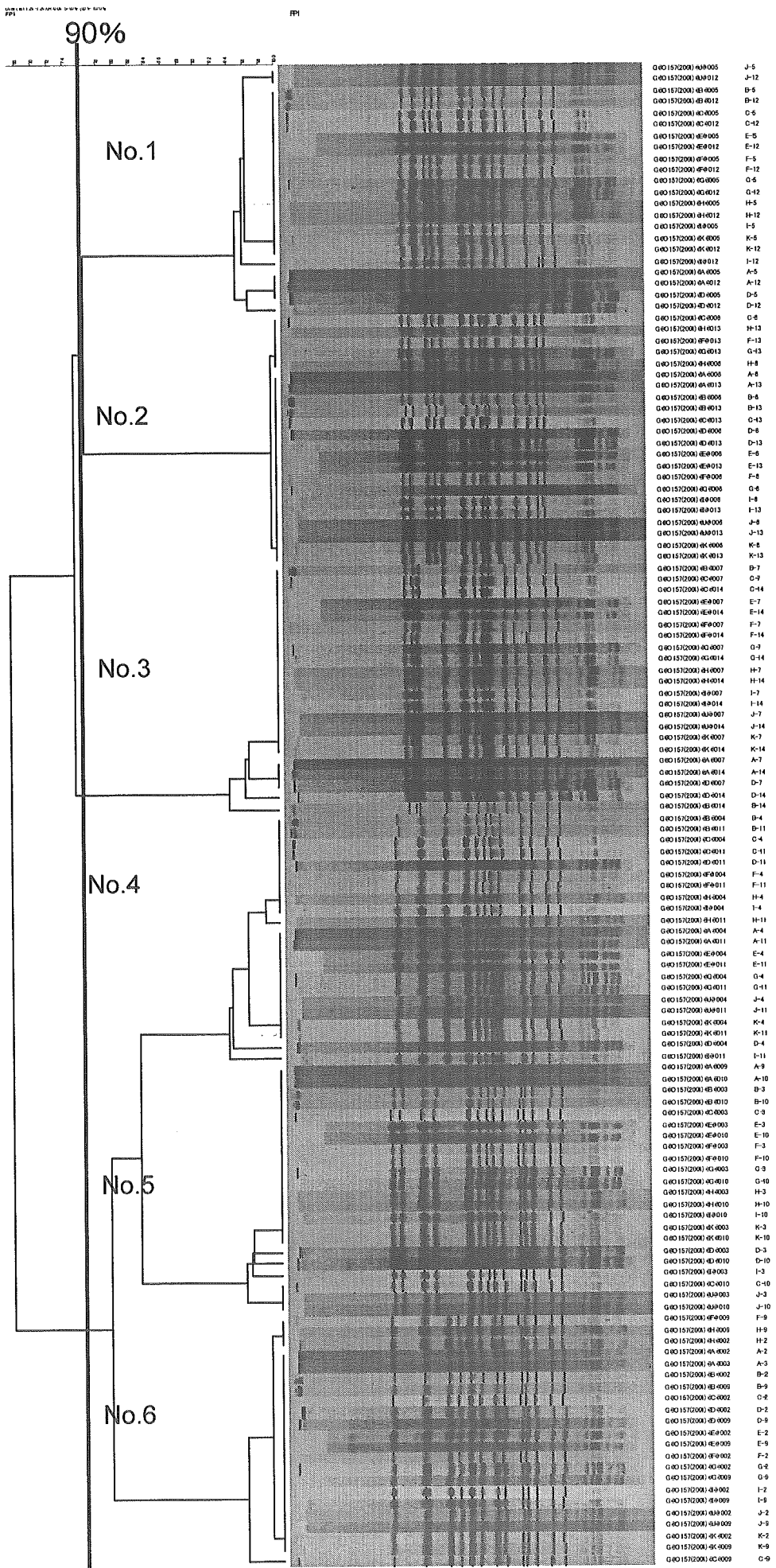


図4. 11施設で実施した共通株6株のデンドログラム(平成16年度)

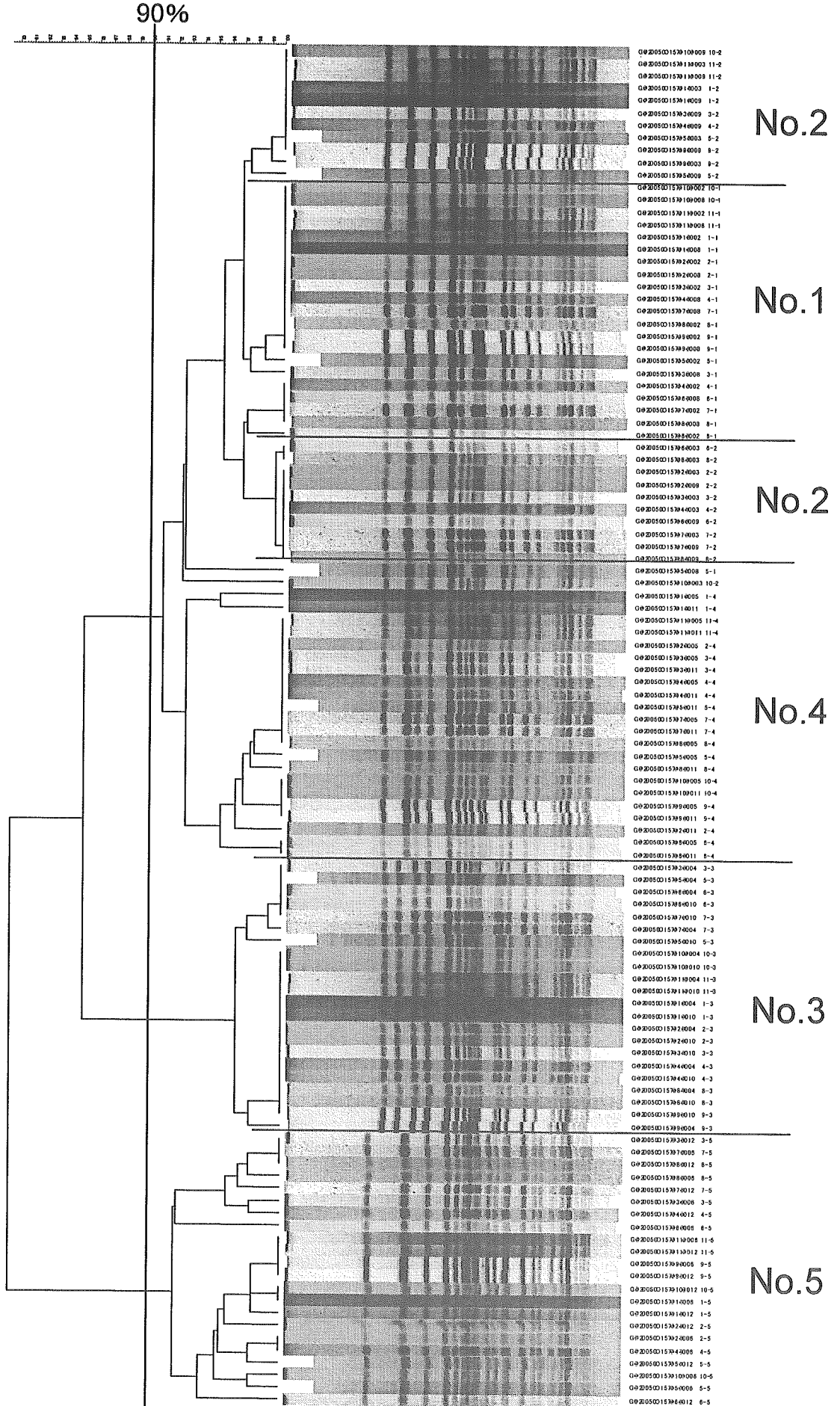


図5. 11施設で実施した共通菌株(5株)のデンドログラム
:全バンド対象(平成17年度)

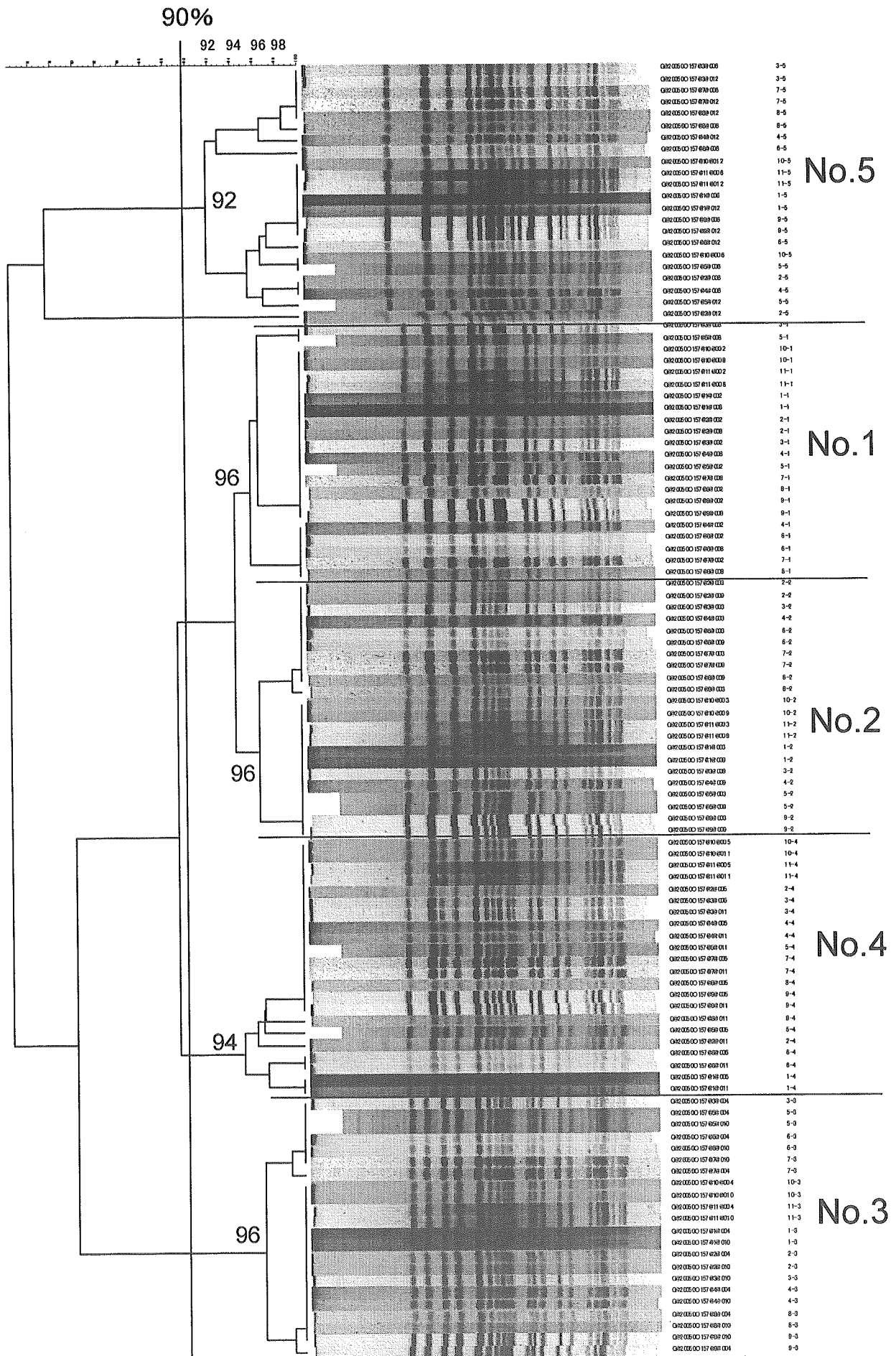


図6. 11施設で実施した共通菌株(5株)のデンドログラム :78.2Kb以上対象 (平成17年度)

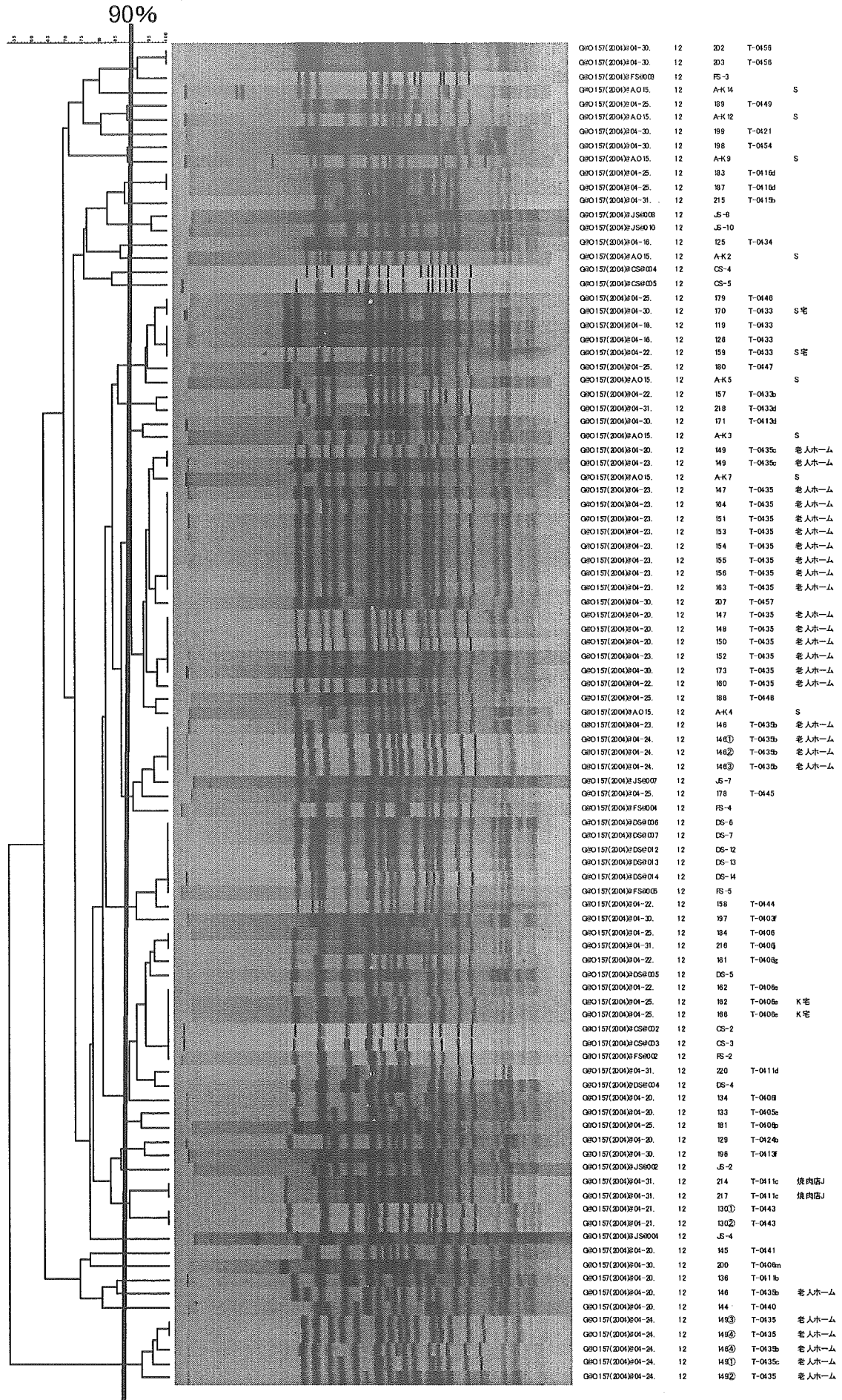


図7. 散発事例由来0157(VT1+VT2)のデンドログラム (平成16年度)

90%

FP1

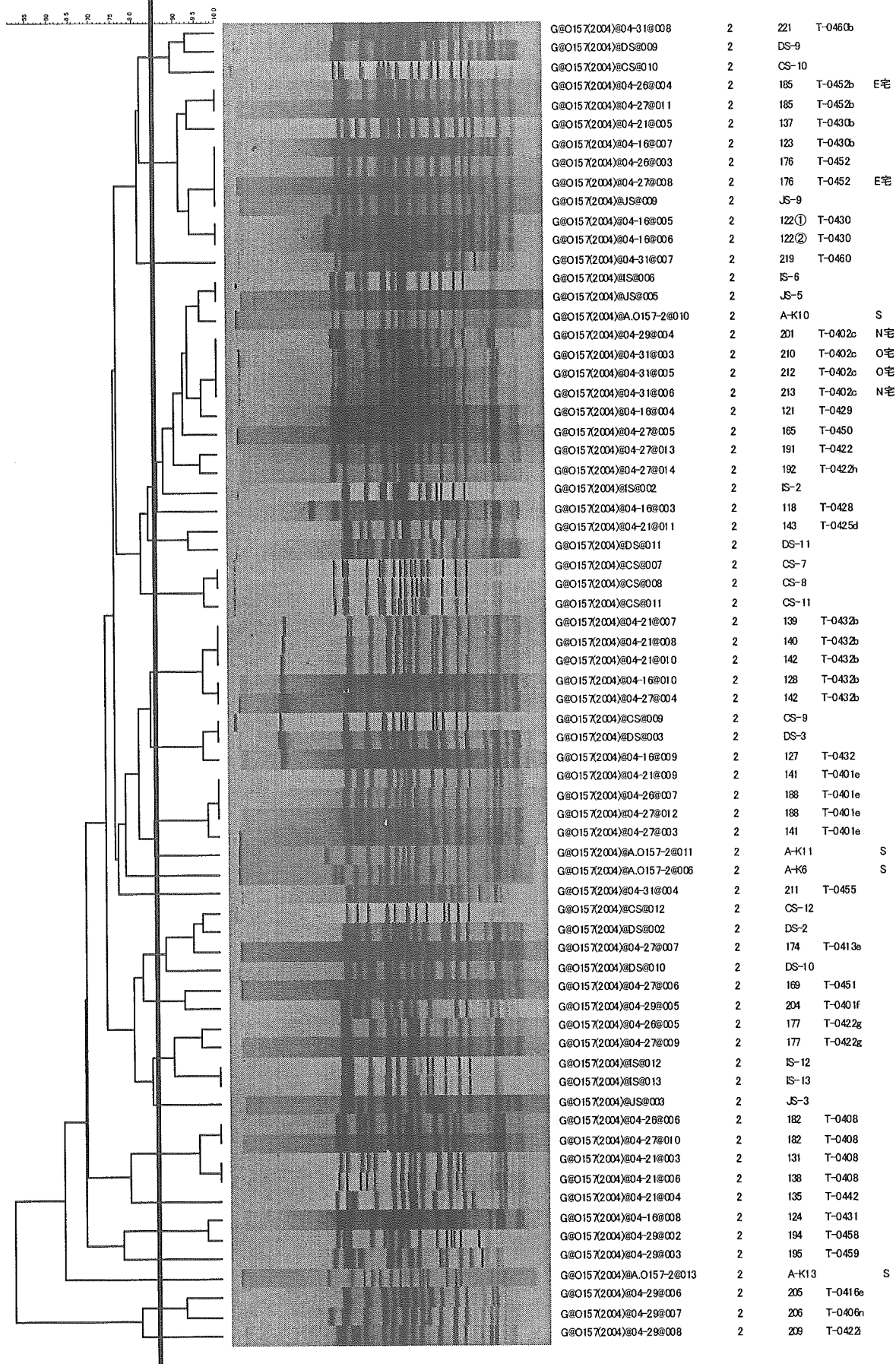


図8. 散発事例由来O157(VT2)のデンドログラム(平成16年)

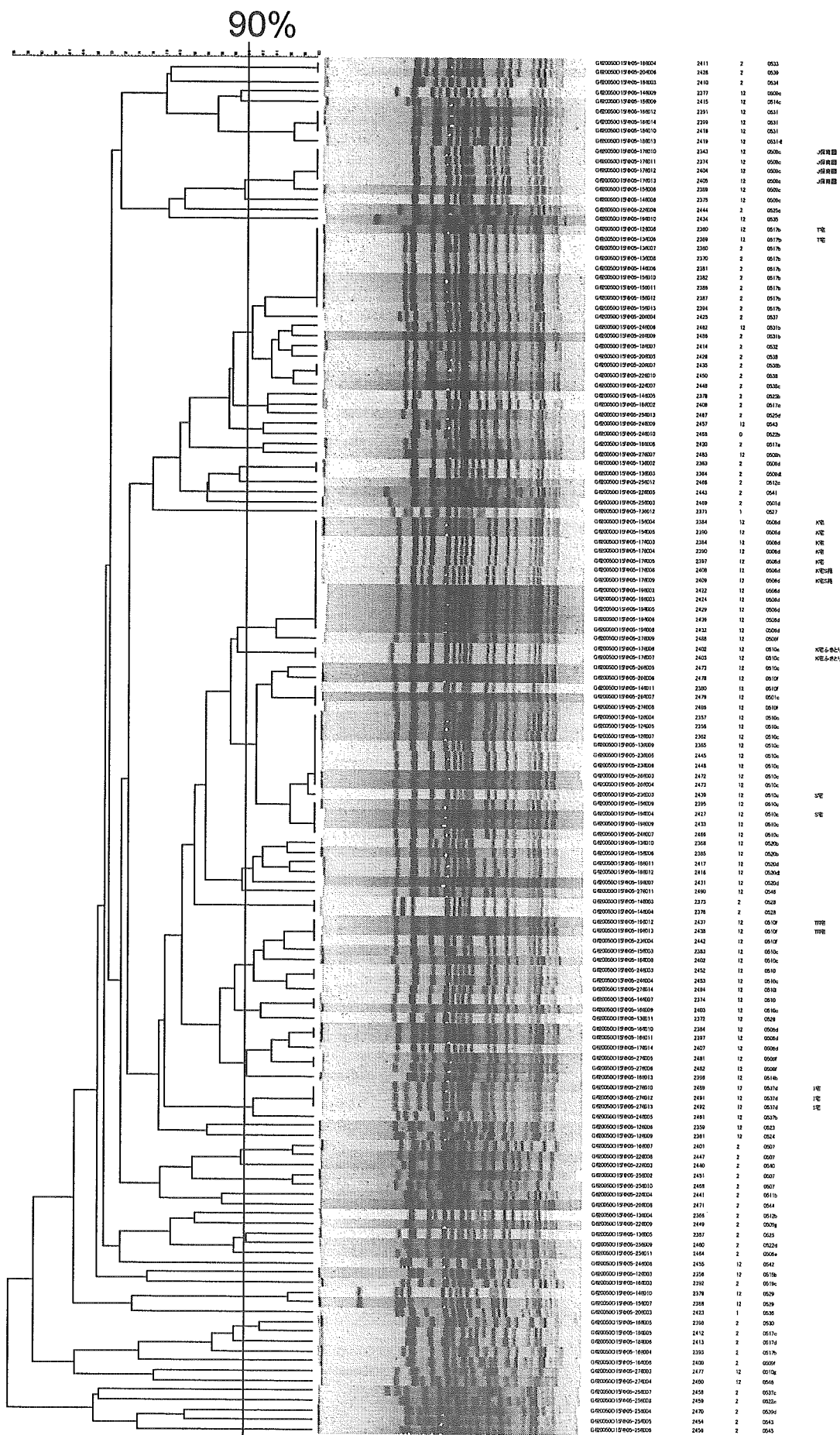


図9. 2005年8～9月に東京都内で分離されたO157株のデンドログラム(141株)

表1. 腸管出血性大腸菌O157集団事例および散発事例へのPFGE解析の応用例(平成17年度)

1. 栃木県で分離されたO157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O157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O157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O157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 O157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 O157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 O157: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O157のPFGEパターン(長野県環境保全研究所)
 10. 静岡県分離株(O157: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O157事例(東京都健康安全研究センター)
-

詳細は各年度報告書参照

表2. サルモネラ食中毒事例へのPFGE解析の応用例

平成16年度

1. *Salmonella* Enteritidis 集団食中毒事例(茨城県衛生研究所)
2. SEを原因菌とする食中毒事例(群馬県衛生環境研究所)
3. 2004年8月分離*S. Enteritidis*散発事例のPFGEパターン(埼玉県衛生研究所)
4. 仕出し弁当を原因とした*Salmonella* Enteritidis食中毒事例(長野県環境保全研究所)
5. 飲食店を原因とした*Salmonella* Enteritidis食中毒事例(長野県環境保全研究所)
6. *S. Enteritidis*食中毒事例の概要および分離株のPFGE画像 事例1, 事例2
(静岡県環境衛生科学研究所)

平成17年度

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)
・「ドレッシング」を原因とした食中毒事例
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)
・「うなぎの厚焼き玉子」が原因食品と推定された食中毒事例
・仕出し弁当を原因とした食中毒事例

詳細は各年度報告書参照

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

分担研究・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 0157
を用いたパルスネット構築のための精度管理

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
	鈴木匡弘	愛知県衛生研究所
研究協力者	倉本早苗	石川県保健環境センター
	板垣道代	岐阜県保健環境研究所
	安田陽子	岐阜県保健環境研究所
	白木 豊	岐阜県保健環境研究所
	深尾敏夫	岐阜市衛生試験所
	田中保知	岐阜市衛生試験所
	田中大祐	富山県衛生研究所
	酒井高子	豊田市衛生検査所
	多和田充紀	豊田市衛生検査所
	奥村貴代子	豊田市衛生検査所
	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保健環境研究部
	藪谷充孝	名古屋市衛生研究所

研究要旨

「パルスネットジャパン」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 O157 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 λ 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 17 年度は 78.6%であり、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。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。