

A. 研究目的

我が国で 0157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働に向けた準備活動が現在行なわれている。本システムの概要は、各地方衛生研究所(地研)が都道府県内で検出された 0157 についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を行ない、その泳動図を国立感染症研究所(感染研)に電送し、感染研でこれら泳動図について解析ソフトを用いて比較を行なう。もし同一もしくは非常に類似した泳動図が複数の異なった都道府県から得られた場合には diffuse outbreak の発生が強く疑われ、迅速な diffuse outbreak の検出、及びその疫学情報の裏付けが可能となる。本システムが円滑にかつ信頼性を持って稼働するために最も重要な点は、「異なった地研で同一の PFGE 型の 0157 について PFGE を実施した場合、解析ソフトを用いてその泳動図を比較するとその同一性が 100% となる。」ことである。

本研究ではパルスネットジャパン稼働に向けた準備活動の一環として東海・北陸ブロック 8 地研と豊田市衛生検査所(豊田市)が参加して PFGE 精度管理を実施した。具体的には PFGE 型の異なる 0157 について各施設で統一もしくは各地研独自の実施条件で、各施設で PFGE を実施し、その泳動図を愛知県衛生研究所(愛知衛研)に電送した。愛知衛研では解析ソフトを用いてその泳動図の比較を行なった。そして、平成 15 年度から 17 年度までの 3 年間の精度管理を通して同一 PFGE 型の 0157 泳動図について地研間の同一性を 100% とするための問題点を明らかとし、その改善策について検討した。

B. 研究方法

菌株：散発事例 4 事例に由来する 4 株の EHEC 0157 を用いた。これら菌株は、愛知県で平成 12 年度(愛知衛研菌株番号：2000-48)、13 年度(2001-77)及び 14 年度(2002-58、2002-109)に検出され、その PFGE 型は何れも異なっている(図 1)。なお OH 血清型別分類に関しては、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清(デンカ生研)を用いて行なった。

精度管理

平成 15 年度

第 1 回

[I]送付菌株

5 検体の 0157 を精度管理に用いた。検体番号 1 から 5 はそれぞれ菌株番号 2001-77、2002-109、2000-48、2002-58 及び 2001-77 である。検体 1 と 5 は同一菌株である。

[II]方法

愛知衛研より 5 検体を 6 地研(石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県科学技術振興センター保健環境研究部)、それに豊田市衛生試験所(豊田市)に送付した。そして、愛知衛研を含む 8 施設(仮に施設 A から H とした。)において送付された 5 検体について PFGE を実施した。また、施設間の泳動図の比較を容易にするため、PFGE 実施条件のうち 2 つの条件を統一した。すなわち PFGE 泳動条件(感染研旧条件：6 V/cm、パルスタイム 4 秒から 8 秒 9 時間、8 秒から 50 秒 13 時間)と λ マーカーの使用である。しかし、溶菌過程、制限酵素処理等その他の条件は、各施設の条件で実施した。7 施設で PFGE 泳動図は郵送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一 PFGE 型の検体の場合には各施設内でパーセントで示される同一性に基づく系統樹を作成した。また異なった PFGE 型の検体の場合には各施設間で系統樹を作成した。また同時に PFGE 実施条件に関するアンケートも実施し施設の PFGE 実施条件を把握した。

第 2 回

[I]送付菌株

3 検体の 0157 を精度管理に用いた。検体番号 1 から 3 は第 1 回と同一検体である。

[II]方法

愛知衛研より 3 検体を第 1 回と同じ 7 施設に送付した。そして、愛知衛研を含む 8 施設において送付された 3 検体について PFGE を実施した。また、同一 PFGE 型検体の施設間の同一性を増すために PFGE 実施条件のうち 4 つの条件について統一、もしくは統一条件の変更を行な

った。すなわち PFGE 泳動条件の統一（感染研新条件：6V/cm、パルスタイム 2.2 秒から 54.2 秒 21 時間。なお、この変更は相同性の向上のために直接関係なく、平成 16 年 1 月より感染研の泳動条件が変更になるため）、プラグ菌液濃度の統一（OD610=0.5-0.6）、プラグ作成キットの使用（厚さ 0.7mm の薄いプラグを作成できる）、及びサルモネラマーカールへの変更（*Xba* I 処理 *Salmonella* Braenderup H9812 DNA）、である。しかし、その他の条件は、各施設もしくは感染研の新プロトコールの条件で実施した。8 地研全てで PFGE が実施され、その PFGE 泳動図が愛知衛研に郵送され、同所で解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて解析を行なった。具体的には、異なった PFGE 型の検体について各施設間でパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

平成 16 年度 第 1 回

[I]送付菌株

平成 15 年度精度管理で使用した菌株と同一である 4 検体（検体番号 1 から 4）を用いた。

[II]方法

愛知衛研よりそれぞれ 4 検体を 7 地研（平成 15 年度参加地研に加え名古屋市衛生研究所）、それに豊田市衛生試験所（豊田市）に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設（仮に施設 A から I とした。）において、送付された 4 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、原則として感染研の方法（表 1）で実施することとした。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。また同時に PFGE 実施条件に関するアンケートも実施し、各施設の PFGE 実施条件の確認を行なった。

第 2 回精度管理

「平成 16 年度地域保健総合推進事業 健康危機管理における地方衛生研究所の広域連携システム構築」の研修会（平成 17 年 1 月 20 日、21 日）の一環として実施した。

[I]菌株

検体番号 1 の 0157 を精度管理に用いた。

[II]方法

各施設に於いて第 1 回精度管理と同一の方法で DNA 調製、制限酵素処理を行なって PFGE 用ブロックを作成した。そして制限酵素反応液を TE 溶液（Tri-HCl（pH 8.0）、0.5M EDTA）に置換し、過剰な制限酵素反応が進行しないようにした。その後、8 地研の PFGE 担当者（豊田市は不参加）が愛知衛研に集まり、愛知衛研が作成した同一ゲル上に各施設が持参した PFGE 用ブロックを置いて電気泳動を実施した。得られた泳動図について「フィンガープリント II」を用いて解析を行なった。具体的には、得られた各施設間の相同性を第 1 回の精度管理で得られた検体 1 の相同性と比較し、同一ゲルで泳動した場合と各地研で個別に電気泳動を行なった場合とで各地研間の相同性にどの程度差があるかについて検討した。また、PFGE 用ブロックをゲル上に置く際、その厚さ、大きさの観察を行なった。

平成 17 年度

[I]送付菌株

2 検体の 0157 を精度管理に用いた。検体番号 3 と 4 はそれぞれ平成 15 年度及び 16 年度の何れかまたは両年に使用した使用した菌株と同一である。

[II]方法

愛知衛研よりそれぞれ 2 検体を平成 16 年度参加した 8 施設に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設（仮に施設 A から I とした。）において、送付された 2 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、サルモネラマーカールの使用と泳動条件は全ての施設で統一して行ない、その他の実施条件は感染研の方法若しくは各施設独自の方法で実施することとした。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「フィンガープリント II」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。また同時に PFGE 実施条件に関するアンケートも実施し、各施設の PFGE 実施条件の確認を行なった。

C. 研究結果

平成 15 年度

[I] 第1回精度管理

1. 東海・北陸地方8施設のPFGE実施条件

PFGE 検体作成のうち、8施設の間でプラグ菌液の濃度に差が認められた。すなわち、3施設 (A, B, C) では比較的濃い菌液 (培養菌液の場合は、プラグ当たり一夜培養液 500 μ l、1000 μ l。又は平板の場合は Mac 4 の懸濁液 200 μ l) を作成していたが、残りの5施設では比較的薄い菌液 (それぞれ 50 μ l~200 μ l。又は Mac 2~3 の懸濁液の 1/10 量) を調製していた。溶菌、及び洗浄では、8施設のうち半数の4施設が市販の溶菌のためのキットを使用していた。残りの施設では2施設 (C, E) が溶菌過程の Lysozyme 処理を行っていなかった。また、1施設 (H) では洗浄の項で Pefabloc を用いた場合の反応温度が 25 $^{\circ}$ Cと、他の2施設 (50 $^{\circ}$ C) よりかなり低かった。しかし、その他の点では施設間で大きな差は認められなかった。制限酵素処理に関しては8施設中5施設でサンプル当たりの *Xba* I 量が 30U であり、残りの2施設は 50U を使用していた。PFGE 機器の項では機種の違いはあるものの、全ての地研でバイオラド社の機器を使用していた。マーカーに関しては、8施設中7施設でバイオラド社の λ マーカーを使用していたが、その前処理の条件は異なっていた。すなわち、45 $^{\circ}$ C、7分、又は 50 $^{\circ}$ C、10分がそれぞれ2施設認められたが、他の3施設では反応温度は何れも 50 $^{\circ}$ Cであったが、反応時間は 1.5、5、15分と異なっていた。電気泳動に用いるプラグの厚さは薄めの 0.7mm を用いていた施設が3、中程度の厚さの 1.4、1.5mm が2、厚めの 2、3、7mm が3であり、施設によって差が認められた。

2. 同一 PFGE 型 2 検体の各施設内での同一性の比較

8施設のうち、1施設は泳動図の質が劣っていたため解析ソフトを用いた解析が不可能であった。また他の1施設では同一菌株 (1番と5番) のうちの1検体が泳動されていなかった。したがって、今回は6施設の泳動図についてのみ解析を行なった。図2には同一性を示す系統樹を示した。解析を行なった6施設全てで同一 PFGE 型検体 1 と 5 は施設内で 100%の同一性が得られた。

3. 異なった PFGE 型検体の各施設間での同一性の比較

1施設は泳動図の質が劣っていたため解析ソフトを用いた解析が不可能であったので、解析が可能であった7施設それぞれの4検体の泳動図について解析を行なった。図3には検体1から3の系統樹を示した。検体1に関しては、2施設 (C, D) の泳動図は100%の同一性が得られた。また、これら2施設を含む6施設は同一性 63%で同一のクラスターに含まれた。しかし1施設 (E) の泳動図はこのクラスターには含まれず、クラスターとの同一性は低かった (40%)。検体2については、2施設 (C, D) の泳動図は100%の同一性が得られた。またこれら2施設を含む4施設は同一性 73%で同一のクラスターに含まれた。残り3施設のうち、2施設 (E, F) の泳動図は同一性 72.3%で前述とは別のクラスターを形成した。また1施設 (G) はこれら2つのクラスターとは 47.2、及び 40%の低い同一性であった。検体3に関しては、同一性 100%が得られた泳動図はなかった。3 (C, D, H)、及び 2施設 (E, F) の泳動図がそれぞれ同一性 71.9、68.4%で異なった2つのクラスターを形成した。しかし残りの2施設 (A, G) は何れのクラスターにも属さず前述の2つのクラスターとは何れも同一性は低かった。検体4については2施設 (C, D) の泳動図は 100%の同一性が得られた (系統樹は省略)。またこれら2施設を含む4地研は同一性 71.4%で同一クラスターを形成した。他の2施設 (E, F) は同一性 86.7%で別のクラスターを形成した。1施設 (G) の泳動図はこれら2つのクラスター何れとも同一性が低かった。

[II] 第2回精度管理

1. 異なった PFGE 型検体の各施設間での同一性の比較

第2回精度管理の検体1から3の系統樹を図4に示した。第2回は参加8施設全ての泳動図を解析することが可能であった。検体1に関しては、同一性 100%の2施設を含む4施設 (B, D, E, G) と同一性 100%の3施設を含む4施設 (A, C, F, H) の泳動図がそれぞれ同一性 92.4、94.5%で2つの異なったクラスターを形成した。しかも両クラスターの同一性は 87.7%と高かった。

また高分子量領域のバンド（図4、検体1のバンド模式図の左から2本目と4本目のバンド）が施設によって比較的薄く認められる場合と全く認められない場合があった。検体2については、施設Bを除く7施設（3施設、及び2施設でそれぞれ相同性100%）の泳動図が相同性88.4%で同一クラスターを形成した。施設Bとこのクラスターとの相同性は72.7%と低かった。しかし、施設Bの泳動図では高分子量領域のバンド（図4、検体2、施設B（B2）のバンド模式図の左から1本目と2本目のバンド）が明らかに他の施設とは異なっていた。検体3は検体1、2の泳動図より施設間の相同性は高かった。すなわち8施設のうち、7施設が相同性100%であった。また残りの1施設（B）との相同性も89.2%と高かった。

平成16年度

[I] 第1回精度管理

1. 東海・北陸地方9施設のPFGE実施条件

DNA調製及び制限酵素処理（表1の感染研のPFGE実施条件のPlug agaroseからRestriction digestionに相当する）に関しては、9施設のうち6施設が感染研と全く同一の方法で行っていた。残りの3施設うち2施設ではバイオラド社のキットを用い、1施設は施設独自の方法で行っていた。泳動条件に関しては、7施設が感染研の泳動条件を用いていた。残りの2施設のうち1施設は泳動時間のみ異なる条件、1地研は泳動条件の入力ミスによって感染研の泳動条件で実施した後さらに3時間ほど異なった泳動条件が加えられていた。なお、菌懸濁液の調製、マーカー（感染研のPFGE実施条件のCell suspension bufferとMarkerに相当する。）は全ての施設で感染研の実施条件に従っていた。

2. 異なったPFGE型検体の各施設間での相同性の比較とその泳動図

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体1から4までの泳動図の解析を行ない系統樹を作成した。

検体1（図5）に関しては9施設全体の相同性は60.6%とやや低かった。これは9施設の泳動図が2つの大きなクラスターに分かれたためと考えられ、ひとつのクラスターには7施設が含

まれ、もうひとつのクラスターには残りの2施設が含まれた。それぞれの2つのクラスター内の相同性は66.7%、及び75.1%であった。また全体の相同性が低かったことを反映してか100%の相同性を示した施設間の泳動図は認められず、最も高い相同性を示したのは施設BとI、及びDとHの90.1%であった。泳動パターンを解析してみると、施設Eのように同一の泳動パターンとは明らかに異なる場合が認められた。

検体2（図6）については9施設全体の相同性は71.1%と検体1に比べて高かった。9施設のうち7施設は81.5%と高い相同性を示す同一のクラスターを形成していた。このクラスター内に含まれる3及び2施設間でそれぞれの相同性が100%を示した。一方残りの2施設は前述のクラスター内と比較し約72%と低い相同性を示していた。検体2でも検体1の場合と同様にクラスターに含まれなかった地研Eの泳動パターンは他の地研の泳動パターンとはやや異なっていた。

検体3（図7）に関しては9施設全体の相同性は76.4%と検体1及び2より高かった。9施設のうち7施設は85.4%と高い相同性を示す同一のクラスターを形成していた。特にこれら7施設のうち2施設ではその相同性が100%を示していた。残りの2施設に関しては、2施設が同一のクラスターを形成したが、クラスター内の相同性は前述のクラスターと比べ低く約77%であった。

検体4（図8）は全体の相同性は他の3検体に比べて最も高く82.4%を示した。特に6施設の相同性は高く約87%で同一のクラスターを形成した。しかし、相同性が100%を示した泳動図は認められず、最も高い相同性は地研IとF及び地研CとHで何れも94.1%であった。一方、残りの3施設では2施設が同一クラスターを形成し、そのクラスター内の相同性は約94%であった。1施設は他の施設とクラスターを形成せず単独で存在した。

[II] 第2回精度管理

8地研（豊田市は不参加）が参加して、同一ゲル上に各施設で独自に作成し持参したPFGE用ブロック（第1回検体1）を置き電気泳動を実施した。そして得られた泳動図の解析を行なった（図9）。その結果、8地研全体の相同性は77.6%であり、第1回検体1の60.1%に比べ相同

性の向上を得ることができた。系統樹解析の結果、数の上では第1回精度管理(図5)の時と同様に、6つの地研からなるクラスターと2つの地研からなるクラスターに分かれたが、それぞれのクラスターの相同性は87.4%、89.5%と第1回(66.7%と75.1%)に比べ、何れも高率であった。さらに6地研が属するクラスターのうち3地研はその相同性が100%となった。また、ゲルに置くPFGE用ブロックの厚さ、及び大きさには地研間で大きな違いがあることが明らかとなった。

平成17年度

[I]精度管理

1. 東海・北陸地方9施設のPFGE実施条件

泳動条件に関しては全施設統一であったが、9施設のうち1施設は泳動時間が22時間と統一条件より3時間長かった。これはPFGE機器に既にプログラムされている0157のプログラムを用いたためであった。しかし残りの8施設は感染研の統一条件を用いていた。サルモネラマーカーは全ての施設で統一されていた。DNA調製及び制限酵素処理(表1の感染研のPFGE実施条件のCell suspension bufferからRestriction digestionに相当する)に関しては、9施設のうち3施設が感染研と全く同一の方法で行っていた。残りの6施設うち3施設ではバイオラド社のキットを用い、3施設は感染研類似の方法を用いていた。具体的には2施設ではCell suspension bufferの項目で、感染研法より濃い菌懸濁液(OD=2程度)を用いていた。1施設では電気泳動用のアガロースがPFGE用アガロースであった。

2. 異なったPFGE型検体の各施設間での相同性の比較とその泳動図

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体3、4の泳動図の解析を行ない系統樹を作成した。

検体3(図10)に関しては9施設全体の相同性は78.6%とやや低かった。これは9施設の泳動図が2つの大きなクラスターに分かれたためと考えられ、ひとつのクラスターには8施設が含まれ、もうひとつのクラスターには残

りの1施設が含まれた。しかし8施設が含まれたクラスター内の相同性は84.0%であった。またクラスター内で100%の相同性を示した泳動図は5施設と2施設の泳動図で認められた。

泳動パターンを解析してみると、8施設が含まれたクラスターに属さない1施設で同一の泳動パターンとは明らかに異なる場合が認められた。平成17年度の検体3の相同性を平成15、16年度の結果と比較してみると(表2)、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(図10)については9施設全体の相同性は87.8%と検体1に比べて高かった。9施設のうち8施設は96.0%と非常に高い相同性を示す同一のクラスターを形成していた。このクラスター内に含まれる5施設間で相同性が100%を示した。平成17年度の検体4の相同性87.8%は平成16年度の82.4%より高い値となった。

9施設の検体3、4の泳動図を図11に示した。泳動図からも分かるように、いずれの泳動図も解析ソフトを用いた解析に供するのに十分な画質であった。

D. 考察

平成15年度

第1回精度管理では、PFGE実施条件のうちPFGE泳動条件、及びλマーカーの使用は施設間で統一したが、その他の条件は全て各施設の方法で実施した。同一PFGE型の2検体について解析が可能であった6施設について各施設内で相同性の比較を行なったところ、全ての施設においてその相同性は100%となった。よって、これら施設では、同一ゲルで0157のPFGEを実施した場合には、そのPFGE型の相違を正しく判定できるものと思われた。しかし、解析が不可能であった1施設(B)の泳動図では鮮明なバンドパターンが得られなかった。これはプラグ菌液の濃度が過剰で制限酵素による消化が不十分であると推察された。この推察は同時に行なったPFGE実施条件のアンケート結果からも裏付けられた。

異なった PFGE 型 4 検体について 7 施設間での相同性を比較した場合には、4 検体中 3 検体で相同性が 100% となったのは特定の 2 施設のみであった。また、形成されるクラスターは 1 検体では 1 つであったが、残りの 3 検体では 2 つとなった。しかも、これらクラスターの相同性は検体 4 のクラスターで 86.7% と高かったが、他のクラスターでは何れも 63~73% と低かった。さらに、4 検体何れの場合にもクラスターに属さない泳動図が 1 つ認められた。

これらの原因としては、1) 異なった泳動図を比較する際の標準となる λ マーカーのバンドがシャープでない (図 1 のマーカーの参照)。2) プラグ菌量が少なすぎる。3) プラグ菌量が多すぎる。4) 電気泳動する際のプラグの厚さが厚すぎる。特に 2) から 4) はバンドが薄すぎたり、太すぎる原因となり解析ソフトが正しくバンドを認識できない大きな要因であることが推察された。

第 2 回では、第 1 回の精度管理の結果を踏まえて PFGE 実施条件の統一、及び統一条件の変更を行ない、施設間の相同性の向上に努めた。具体的には、1) PFGE 泳動条件の統一。2) プラグ菌量の統一。3) 薄いプラグが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 処理したマーカーへの変更である。その結果、図 3 と 4 を比較すれば明らかなように、同一 PFGE 型検体の施設間での相同性の向上に著しい成果が認められた。検体 1 と 3 では 8 施設全ての泳動図が 1 つのクラスターを形成した。しかもこれらクラスターの相同性は 87.7、89.2% と第 1 回に比べかなり高かった。検体 2 に関しては 8 施設のうち 7 施設の泳動図がクラスターを形成し、その相同性も 88.4% と高かった。また第 2 回で明らかとなった問題点として、検体 1 と 2 では高分子量領域のバンドで施設によって薄いバンドが認められない場合があった。また検体 2 では 1 施設で高分子量領域で明らかに異なるバンドパターンが認められた。これらの原因として 1) 制限酵素処理が不十分であった。2) 0157 の *Xba* I 認識部位に変異が起きた。等が考えられる。

平成 16 年度

平成 15 年度実施した第 1 回精度管理では、1 施設において鮮明なバンドパターンが得られなかったため系統樹解析が不可能であった。また、4 検体何れの場合にも同一検体であるにもかかわらず相同性が低いために同一クラスターに属さない泳動図が 1 つ認められた。しかし、昨年度と同じ検体を用いて実施した平成 16 年度の第 1 回精度管理では、全ての泳動図が解析ソフトを用いた解析に供するに十分な画質であった。さらに同一検体は 4 検体何れに於いても同一のクラスターを形成していた。昨年度実施した第 1 回精度管理の結果から相互比較のために最も重要と考えられる条件として 1) ブロック内菌量の統一、2) 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 処理したマーカーの使用、3) PFGE 泳動条件の統一、の 3 点が挙げられた。従って、平成 16 年度第一回精度管理においてはこの点に留意し、参加した 9 施設全てで感染研法もしくはそれに準じた実施条件によって PFGE を行なったことが今回の好結果につながったと考えられる。なお、DNA 調製、制限酵素処理の段階では 9 施設のうち 3 施設が感染研の方法とは異なる方法であったが、上述の 1) ブロック内菌量の統一はなされていた。泳動条件に関しては、2 施設では感染研類似の泳動条件で実施していたが、これらは感染研の泳動条件と比べ泳動時間が長い (3 時間) もの、それにミスにより感染研の本来の泳動時間に加えて更に約 3 時間長い異なった泳動条件が追加されたのみであったことから、その影響はきわめて小さかったものと考えられた。

平成 16 年度第 2 回精度管理では、第 1 回精度管理で最も相同性の低かった検体 1 に関して、各地研が愛知衛研に集まり持参した PFGE 用ブロック (検体 1) を同一ゲル上に置いて PFGE を行なった。その相同性を各施設で独自に行なった場合と比較すると同一ゲルで行なった場合の方が約 18% 高く (60.1% と 77.6%)、各施設で PFGE を実施した場合の相同性をさらに高める必要があることが明らかとなった。また、泳動図に大きな影響を与える PFGE 用ブロックの厚さ、及び大きさの観察も併せて行なったところ、ブロックの厚さ、及び大きさが各 PFGE 担当者間で異なっていることが明らかとなった。このような細

かい点に関しては感染研の PFGE 実施条件には記載されていない。そこで、各施設で実施した同一検体の PFGE の相同性をさらに向上させるためには、PFGE のひとつひとつの手順を細かく記載したマニュアルを作成し、ブロック内 PFGE 担当を一カ所に集め、マニュアルに従った実習を行ないその手技を確認することが最も有効であると思われた。

平成 17 年度

平成 16 年度実施した精度管理の結果から PFGE 泳動図の相互比較のために最も重要と考えられる実施条件として 1) シャープなバンドが安定して得られるサルモネラマーカの使用、2) PFGE 泳動条件の統一の 2 点が挙げられた。従って、この点に留意し、平成 17 年度においてもサルモネラマーカの使用と PFGE 泳動条件の統一を行なって精度管理を平成 15 年度、16 年度何れか若しくは両年度と同じ検体を用いて実施した。本年度の精度管理では、全ての泳動図が解析ソフトを用いた解析に供するに十分な画質であった(図 11)。さらに同一検体は 2 検体何れに於いても同一のクラスターを形成していた。特に参加した 9 施設のうち 2 施設の研究協力者は本年度からの PFGE 担当者であったにもかかわらず良好な結果が得られたことは、PFGE の実施条件のうち最低 2 点を統一すれば実施者の経験に大きく作用されることなく良好な結果を得ることが可能なことを示すものと考えられた。これは昨年度も 2 施設で PFGE 担当者の変更になったに関わらず通年で 76%以上の相同性を維持できたことから支持された。

PFGE 実施条件全てを統一することが各施設間の相同性比較のためには最も望まれることであるが、東海・北陸地方施設によっては年間の PFGE 実施回数が非常に少ないことや試薬の調製の煩雑さから DNA 調製及び制限酵素処理の項目でキットを用いる施設がある。PFGE 泳動条件のうち 2 点を統一した今年度及び昨年度の精度管理で好結果が得られたことは東海・北陸地方各施設に感染研の統一実施条件を周知させる必要はあるものの、サルモネラマーカ使用と PFGE 泳動条件の統一の 2 点のみでも本研究班の目的である「PFGE による 0157 diffuse outbreak の

検出」に十分な泳動図の画質は得られるものと思われる。

相同性の低かった検体 3 では目視で確認しても 1 施設のバンドパターンに違いが認められた。具体的には高分子量領域のバンドが施設によって薄いバンドが認められたり、認められない場合があり、バンドが 1 から 2 本程度異なる場合があった。平成 17 年度パルスネット研究班第 2 回会議において、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行なう必要があるが、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平成 15 から 17 年度の 3 年間で東海・北陸地方 9 施設(8 地研と豊田市衛生検査所)による腸管出血性大腸菌 0157 を用いた精度管理を計 5 回実施した。

その結果、PFGE 実施条件のうちサルモネラマーカの使用と PFGE 泳動条件の統一及びその他の実施条件は感染研または各施設の独自法で行なうことで施設によっては PFGE 担当者が期間中に変更になったに関わらず解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。さらに施設間の相同性の比較においても通年で 76%以上の相同性を維持できた。

また、平成 16 年度第 2 回精度管理では 8 施設の PFGE 担当者が愛知衛研に集まり PFGE 実習を実施した。その際、質疑応答等を行ない PFGE 手技の確認に有効であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid.

Daisuke Tanaka, Junko Isobe, Shiho Hosorogi, Keiko Kimata, Miwako Shimizu, Koji Katori, Yotaku Gyobu, Yoshiyuki Nagai, Takayoshi Yamagishi, Tadahiro Karasawa and Shinichi Nakamura.

Jpn. J. Infect. Dis. 56:137-139, 2003

2. Molecular mechanisms of high level tetracycline-resistance in group A *Streptococcus* isolates of T serotypes 4 and 11.

Masakado Matsumoto, Kenji Sakae, Michio Ohta, Miyoko Endo, Rumi Okuno, Shoko Murayama, Kyoko Hirasawa, Rieko Suzuki, Junko Isobe, Daisuke Tanaka, Chihiro Katsukawa, Aki Tamaru, Masaaki Tomita, Kikuyo Ogata, Tomihisa Yasuoka, Tadayoshi Ikebe, Haruo Watanabe and The Working Group for Group A *Streptococci* in Japan.

Int. J. Antimicrob. Ag. 25:142-147, 2005.

3. Analysis of a Novel Prophage-encoded Group A *Streptococcus* Extracellular Phospholipase A2. Nagiec MJ, Lei B, Parker SK, Vasil ML, Matsumoto M, Ireland RM, Beres SB, Hoe NP, Musser JM.

J. Biol. Chem. 279:45909-18. 2004.

4. Development of a rapid PCR method using the insertion sequence *IS1203* for genotyping shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157.

Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Mami Hata, Masao Takahashi and Kenji Sakae.

J. Clin. Microbiol. 42:5462-5466, 2004.

5. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis Performed at Selected Prefectural Institutes of Public Health for Use in PulseNet Japan.

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.

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

6. Close correlation of Streptococcal DNase B (*sdaB*) alleles with *emm* genotypes in *Streptococcus pyogenes*.

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.

Microbiol Immunol. 2005: 49, 925-929.

7. Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. To Survive in a Desiccation Model System and in Dry Foods.

Hiramatsu R, Matsumoto M, Sakae K, Miyazaki Y.

Appl Environ Microbiol. 2005 71:6657-63.

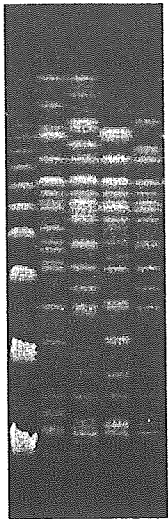
学会発表

鈴木匡弘、秦 眞美、松本昌門、鈴木康元、志賀毒素産生大腸菌 0157 の *IS1203* による PCR 遺伝子型別分類法の開発、第 40 回日本細菌学会中部支部総会、新潟市、2003. 10. 13.

松本昌門、鈴木匡弘、秦眞美、池辺忠義、渡辺治雄、鳥居啓三、長谷川忠男、太田美智男。A 群レンサ球菌が産生する DNase B の遺伝子解析とその発現に影響を及ぼす環境因子の検討。第 41 回細菌学会中部支部総会。岐阜市。2004. 10 30, 31.

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 精度管理に用いた 0157



M: λ マーカー、1 : 検体1 (菌株番号 2001-77) 、 2 : 検体2 (2002-109) 、 3 : 検体3 (2000-48) 、 4 : 検体4 (2002-58)

図2 同一 PFGE 型 2 検体の 6 地研内での相同性の比較

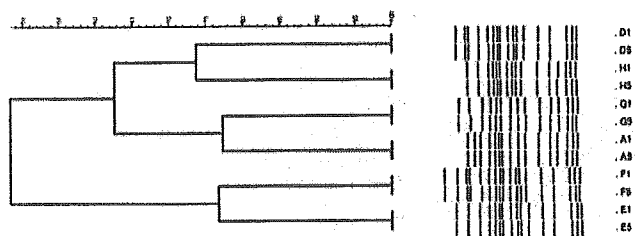


図3 異なった PFGE 型 3 検体の各地研間での相同性の比較 (第1回)

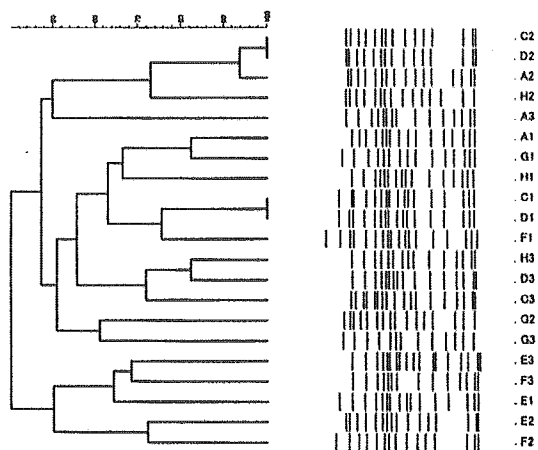


図4 異なった PFGE 型 3 検体の各地研間での相同性の比較 (第2回)

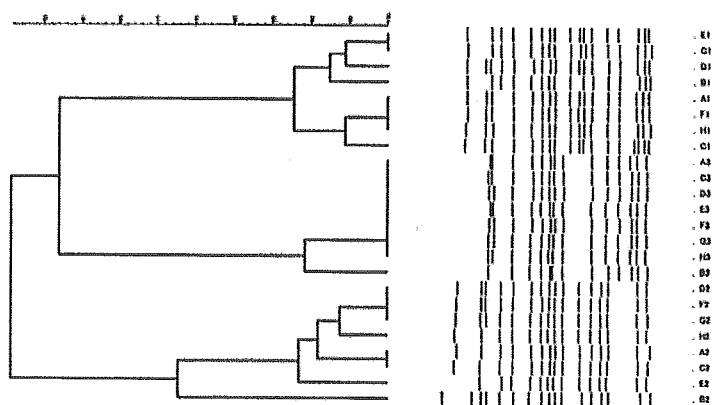


図5 検体1の系統樹解析

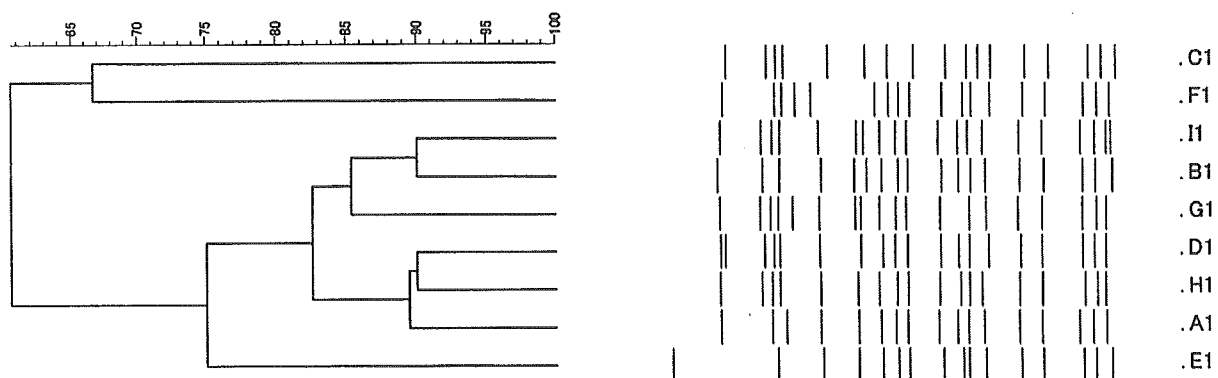


図6 検体2の系統樹解析

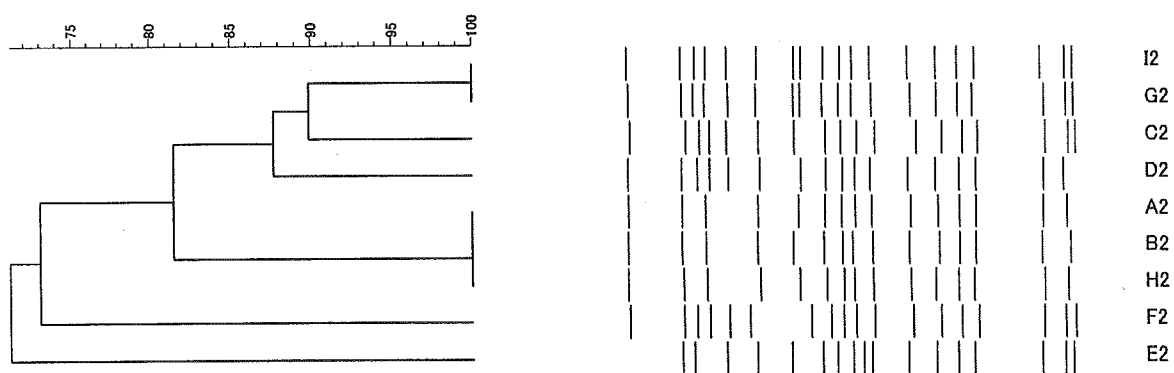


図7 検体3の系統樹解析

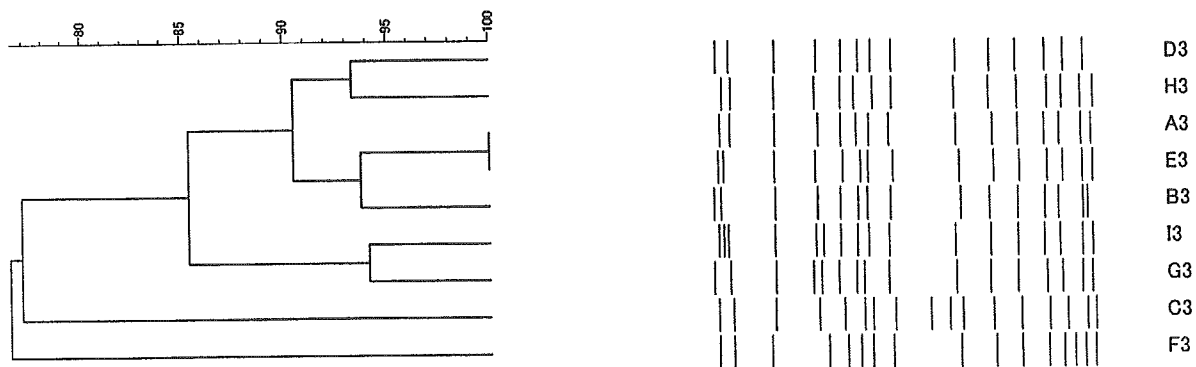


図8 検体4の系統樹解析

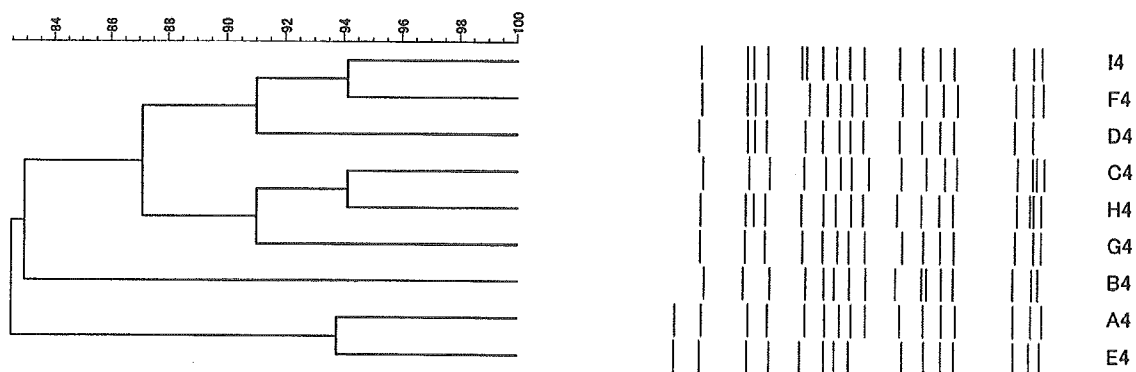


図9 同一ゲルで行なった検体1の系統樹解析

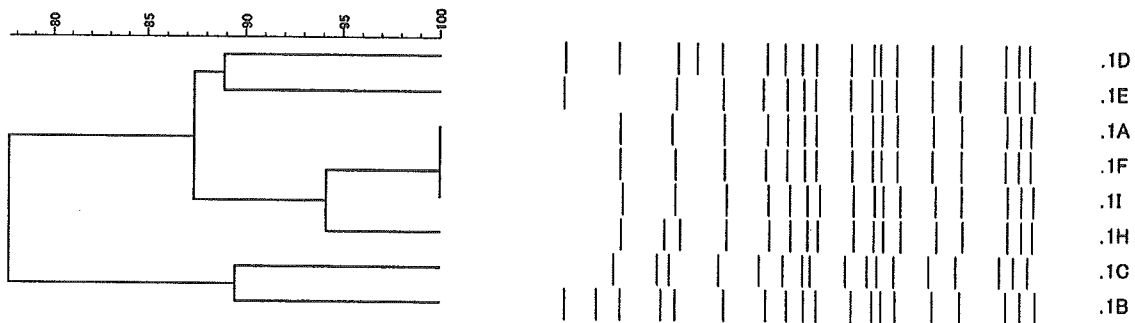


図10 検体3、4の系統樹解析

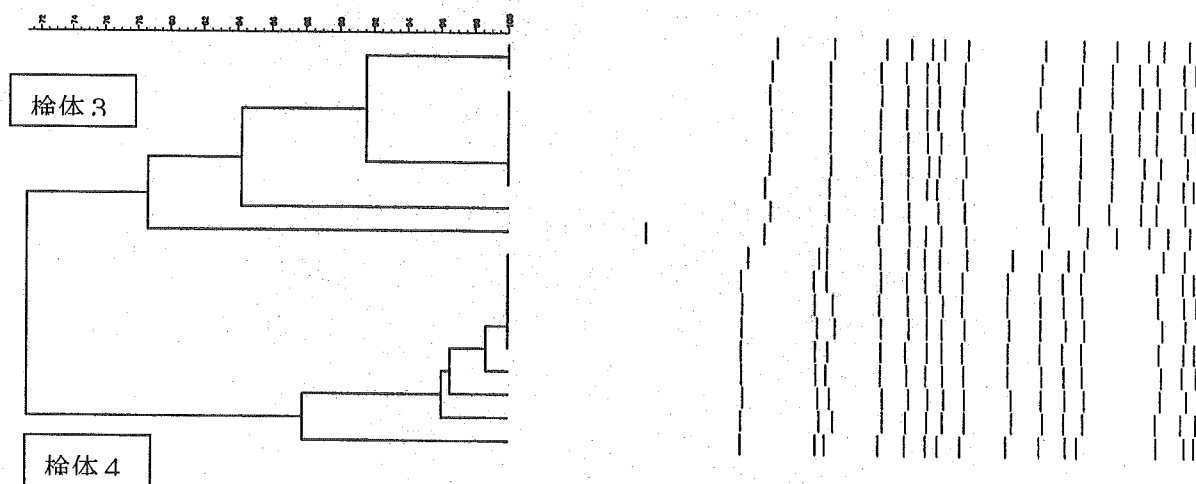


図 1 1 9 施設の泳動図

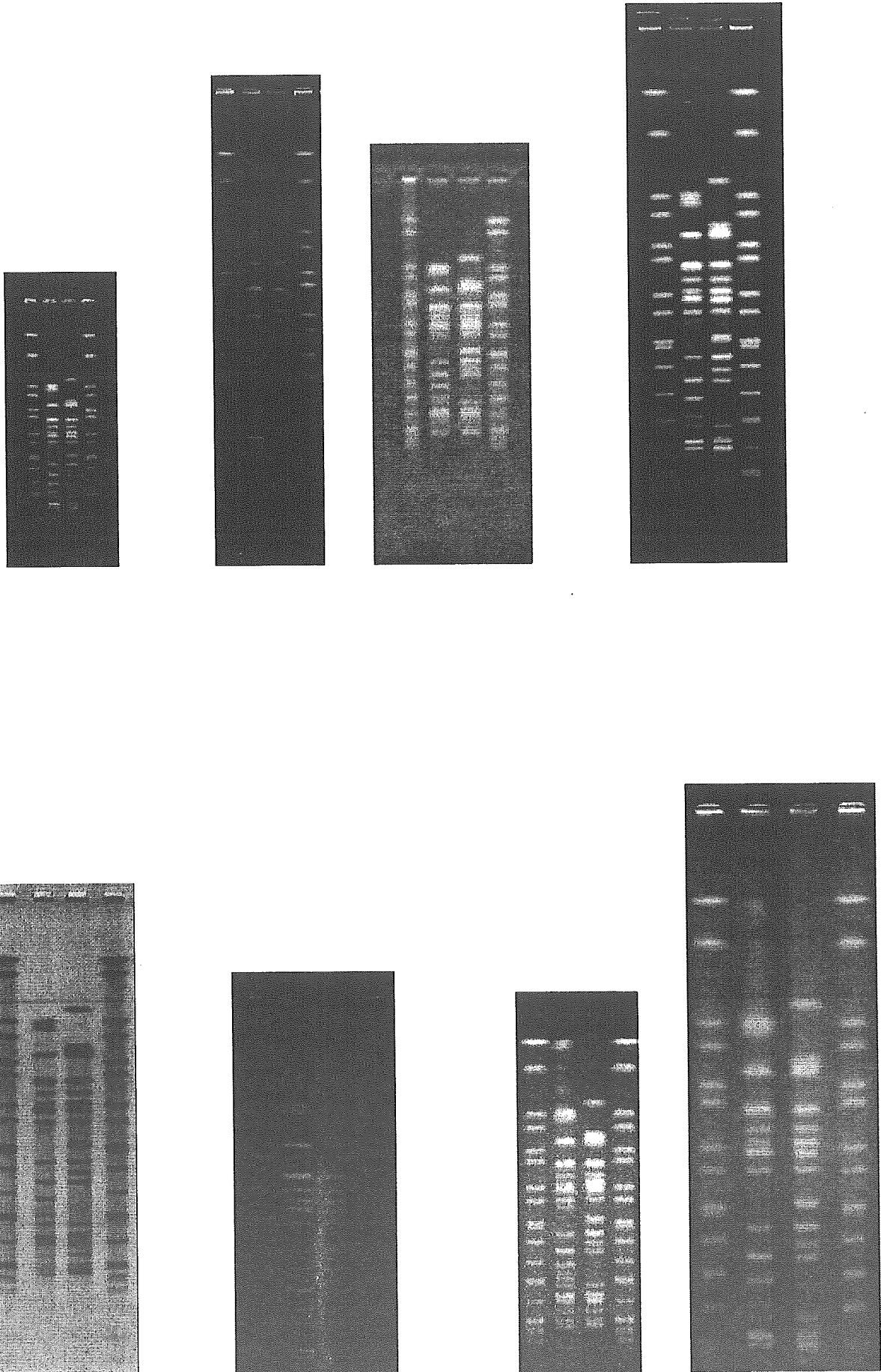


図 1 1 続き

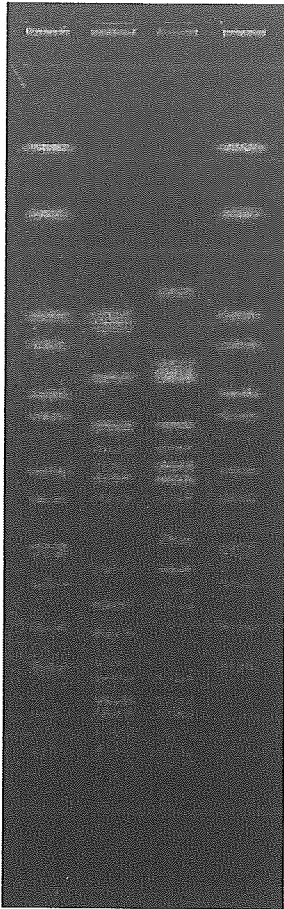


表1 感染研の PFGE 実施条件

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 μ l と1% SeaKem Gold Agarose in DW 200 μ l 希混和。
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 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

分担研究・*Salmonella* Typhimurium と *Shigella sonnei*（ソソネ菌）の Pulsfield ゲル電気泳動画像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

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

愛知県で1980年から1999年の間に検出された143株の *Salmonella* Typhimurium について Pulsfield 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った。その結果、143株は20のクラスター（お互いの菌株の相同性が70%以上で2株以上が含まれるグループとした。）(n=98)と45の1菌株1 PFGE型 (n=45) に分類された。前期（80年代検出）のみに検出されたクラスターは7つで含まれる過半数以上（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株は全く認められなかった。後期（90年代検出）のみ認められたクラスターは9つで、このクラスターに含まれる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。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。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。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り、主に移動可能な耐性遺伝子群が複数の異なったクラスター、もしくは1菌株1 PFGE型菌に水平伝播した結果、新たに生じたこと可能性が推察された。

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 PFGE データの追加を行なった。合計156株は17のクラスター（お互いの菌株の相同性が75%以上で2株以上が含まれるグループとした。）(n=125)と31の1菌株1 PFGE型 (n=31) に分類された。2000年以降検出された13株のうち9株はクラスターに属した。そ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3つのクラスターに属していた。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1 PFGE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1 PFGE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。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 1 PFGE 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。

1982 年から 2003 年に愛知県内で検出された 139 株のソネ菌を対象に、PFGE を実施した。その結果、139 株のうち 106 株 (76.3%) は 19 のパルス型 (バンドパターンの相同性が 85%以上を示すものを同一のパルス型と見なした。以下 PT と略す。) に型別分類され、残りの 33 株 (23.7%) は 85%以上の相同性を示す菌株が他になく、単独で存在していた。前期に分離された 50 株は 26 株 (52%) が 11 の PT に型別され、残りの 24 株 (48%) は PT に型別されなかった。これに対し、後期に分離された 89 株は 80 株 (90%) が 15 の PT に型別され、残りの 9 株 (10%) は PT に型別されなかった。従って、前期には比較的多数の異なる PFGE パターンのソネ菌が存在していたが、後期では比較的限られた PFGE パターンのソネ菌のみが存在していたと考えられた。139 株のうち 106 株が 19 の PT に型別分類されたが、このうち 13PT には国内事例及び国外感染事例の両事例由来株が含まれていた。また、国外感染事例由来株の主な患者渡航先はインドネシア、インド、フィリピン、タイ、ネパール、及び中国であった。一方、残り 6PT のうち 4PT は国外感染事例のみ、2PT は国内事例のみに由来する株が含まれていた。以上の結果から、特に、後期では国内事例及びアジア地域を中心とする国外感染事例を問わずソネ菌の PFGE パターンが類似していることが明らかとなった。

A. 研究目的

サルモネラは我が国で年間の食中毒発症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 *Salmonella* 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 年度には愛知県で 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ェ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。さらに平成 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。

また、平成 16 年度研究班活動では、1982 年から 2003 年の約 20 年間に愛知県内で検出された 139 株のソーンネ菌についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施し、その画像をデータベースとして保存した。そして、そのデータベースを用いて解析を行ない、過去約 20 年間での PFGE 型の推移、国内感染事例株と国外感染事例株との PFGE 型の比較等の分子疫学的解析を実施した。されるのみである。

B. 研究方法

S. Typhimurium

菌株：愛知県内で 1980 年から 99 年に分離された *S. Typhimurium* 143 株に用いたこれら菌株は県内の保健所、当研究所、及び病院において分

離され、86 株は健康保菌者 86 名、35 株が散発下痢症患者 35 名、それに 22 株が食中毒 11 事例（1 事例当たり 1~3 株）に由来するものである。平成 17 年度に用いた株は 13 株の *S. Typhimurium* で、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 株ずつ）6 株である。なおこれら 13 株については以下の薬剤感受性試験とフェージ型別分類は実施しなかった。

薬剤感受性試験：薬剤感受性試験は 9 種類の抗生剤について寒天平板希釈法にて行なった。試験に用いた抗生剤は、アンピシリン (A)、クロラムフェニコール (C)、ゲンタマイシン (G)、ナリジクス酸 (N)、ピペラシリン (P)、ストレプトマイシン (S)、スルファメトキサゾール (Su)、テトラサイクリン (T)、トリメトプリム (Tp) である。それぞれの薬剤の耐性と見なす濃度は A : 16 μ g/ml、C : 8 μ g/ml、S : 16 μ g/ml、Su : 256 μ g/ml、T : 8 μ g/ml、G : 4 μ g/ml、N : 16 μ g/ml、P : 64 μ g/ml、Tp : 8 μ g/ml である。

フェージ型別分類：*S. Typhimurium* DT104 と同じ耐性パターン (ACSSuT) を持つ 5 剤、もしくはこれら 5 剤に N または P 耐性を有する 6 剤耐性株計 28 株について国立感染症研究所 (感染研) にて Public Health Laboratory Services (PHLS), London, United Kingdom の方法に従って行なった。

PFGE：*S. Typhimurium* の一夜培養液 100 μ 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 μ 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 6 V / 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 70% 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（但し、平成17年度は75%以上とした。）、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----）。

S. sonnei

菌株：愛知県内で1982年から2003年に分離された *Shigella sonnei* 139株を用いた。これら菌株は県内の保健所、当研究所、及び病院において分離されもので、129株が下痢症患者129名、10株は健康保菌者10名に由来するものである。また、これら139株のうち113株は散発事例113事例由来、26株は集団事例18事例由来（1事例当たり1から2株）である。感染地域として国内が推定された国内事例株は67株（散発事例53事例53株、集団事例11事例14株）、海外が推定された国外感染事例株は72株（散発事例60事例60株、集団事例7事例12株）である。海外での感染が推定された事例における渡航先としてはインドネシア（n=20）、インド（n=10）、フィリピン（n=6）、タイ、及びネパール（n=5）、中国（n=4）で、愛知県内で検出された国外感染事例の場合にはこれら上位6カ国で海外事例株の69.4%（50/72）を占めていた。

PFGE: *Shigella sonnei* の一夜培養液100 μ 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 μ Lをインサートプラグ内に注入し、水中で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 *Xba*I で処理を行ない、CHEF DR III（バイオラド社）を用い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54.2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、PFGEパターン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85%以上を示し、かつ2株以上の菌株が含まれるものをパルス型(PT)とし、含まれる菌株数が多いものから順にPTの後に1から順に算用数字を付けた（例えばPT1, PT2）。

C. 研究成果

S. Typhimurium（前期及び後期検出株）

[I] 薬剤感受性試験

表1にその結果を示した。分離年によって1980年から89年までを前期、1990年から99年までを後期とした。薬剤耐性菌の割合は前期が53%であったのに対して後期は76%と大きく増加し、90年代には80年代と比べ耐性菌が増加していることが明らかとなった。また、前期には3剤までの薬剤に対する耐性菌の割合が耐性菌全体の69%を占めていたのに対し、後期になるとその割合は37%とほぼ半減し、4剤以上の薬剤に対する耐性菌の割合が63%を占めていた。これらの結果から、90年代における耐性菌の増加の原因は主として *S. Typhimurium* の4剤以上の抗生剤に耐性を示す多剤耐性菌の増加によるものと考えられた。

愛知県内における分離株からも、諸外国から報告されている5剤耐性 *S. Typhimurium* フェージ型DT104と同じ耐性パターンを示すACSSuT耐性株が、前期には4株（1984,85,89年）、後期には8株（90,99年）検出された。また、前期には、この5剤耐性にピペラシリ（P）耐性が加わった6剤耐性株が4株（88,89年）認められたのに対し、後期になると同様の6剤耐性菌7株（91~93年、96,97,99年）に加え、ACSuT耐性にナリジクス酸（N）耐性が加わった6剤耐性菌が5株（90,99年）認められた。なお、これらACSSuT+N耐性5株の内訳は、2株が健康保菌者に、3株は99年に発生した食中毒1事例に由来するものであった。

[II] フェージ型別分類

欧米で検出された *S. Typhimurium* DT104と同じ耐性パターン（ACSSuT）を示す12株、及びこれら5剤にPまたはN耐性が加わったACSuT+P耐性11株、及びACSSuT+N耐性5株、計28株についてフェージ型別分類を行なった。その結果、フェージ型DT104は7株検出された。これら菌株の耐性パターンは全てACSSuT+Pの6剤耐性菌であり、その分離年は前期3株（88年2株、89年1株）、後期4株（91,93,96,99年それぞれ1株ずつ）であった。また、その他21株は全てがフェージ型NT104に分類された。

[III] PFGE 解析

143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、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 (図1)。

1. クラスター

表2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、耐性数を示した。クラスターに含まれる菌株数が最も多かったのはC1で22株、次いでC2で15株、以下C3(8株)、C4, C5(7株)、C6, C7, C8, C9(4株)、C10(3株)、残りの10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 (C4, 12, 13, 15, 17, 19, 20) で、これらクラスターに含まれる菌株数は19であったが、このうち13(68.4%)が薬剤感受性株であった。また、4剤以上の抗生剤に耐性を示す多剤耐性菌は認められなかった。一方、後期のみに認められたクラスターは9つ (C2, 6-11, 14, 18) であった。これらクラスターに含まれる菌株数は40であった。前期に比べ特徴的なのは、これら40株のうち、25株(62.1%)が耐性を示し、うち16株は前期には全く存在しなかった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。そのうちC5は7株中6株が後期にのみ認められた。さらにこれら4クラスターの菌株は後期、及び後期にのみ認められたクラスターの場合と同様に、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。

また全体で7株検出された *S. Typhimurium* DT104は1株を除き6株が何れかのクラスターに分類されたが、このうちの5株はC3に属しており前期、後期共検出された。

2. 1菌株1 PFGE型

前期、後期併せて45株が1菌株1 PFGE型に型別分類された(表3)。このうち前期は26株(57.8%)、後期19株(42.2%)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株は1-3剤耐性であった。一方、後期に検出された菌株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、このグループに前期に分

離された1株の *S. Typhimurium* DT104が認められた。

3. 4-6剤耐性 *S. Typhimurium* のクラスター及び1菌株1 PFGE型

4-6剤耐性 *S. Typhimurium* のクラスター及び1菌株1 PFGE型を表4に示した。前期では4剤以上に耐性を示す菌株数が限られているため顕著ではないが、後期では4, 5, 及び6剤耐性を示す多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。即ち、後期の4剤耐性菌ではC5が3株で、他の3つのクラスターはそれぞれ1株、1菌株1 PFGE型が3株であった。「5剤耐性、ACSSuTパターン」菌ではC1が3株、C10が1株、1菌株1 PFGE型が4株であった。「5剤耐性、その他パターン」ではC2が7株と多数を占め、C9が1株、1菌株1 PFGE型が2株であった。「6剤耐性、ACS SuT+Pパターン」ではC3が4株、C1, C9がそれぞれ2, 1株であった。「6剤耐性、ACSSuT+Nパターン」ではC8が3株、1菌株1 PFGE型が2株であった。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、4剤のC5クラスター(前期は感受性株1株のみ)、5剤ACSSuTのC1、及び6剤ACSSuT+PのC3は前期、後期何れからも検出された。

S. Typhimurium (2000年以降検出株)

[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1 PFGE型 (n=31) に分類された。

1. クラスター

表5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