

13. Uchino K, Miyoshi T, Matsuo M, Ikeda Y, Yoshida H, Teranaka Y, Sugimoto M, Sakai Y, Sibata H, Fujii F and Tanaka T. Combined genogroup I and II Norovirus infection at a nursery. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2006; 59; 2007-272
14. Okada M, Tanaka T, Oseto M, Takeda N, Shinozaki K: Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virol* 2006;151:1635-1641.
15. Hansman GS, Natori K, Shirato-Horikoshi H, Ogawa S, Oka T, Katayama K, Tanaka T, Miyoshi T, Sakae K, Kobayashi S, Shinohara M, Uchida K, Sakurai N, Shinozaki K, Okada M, Seto Y, Kamata K, Nagata N, Tanaka K, Miyamura T, Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. *J Gen Virol* 2006;87:909-919.
16. 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 世界的に見たノロウイルスの現状. *臨床と微生物* 2006; 33:385-391
17. 田中智之、三好龍也、内野清子、武田直和. 新興・再興感染症の感染制御の実際 8. ノロウイルス. *治療学* 2006; 40:79-82
18. 小林宣道、田中智之. ノロウイルス感染症. *Pharma Medica* 2006;24:21-25
2. 学会発表
1. Jun Terajima, Pei Yingxin, Hidemasa Izumiya, Sunao Iyoda, Jiro Mitobe, Haruo Watanabe : Molecular Epidemiological Investigation of Enterohemorrhagic E. coli Isolates in Japan 2004 - 2005、6th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections, Oct. 2006, Melbourne Australia
2. Tadasuke Ooka, Yoshitoshi Ogura, Keisuke Nakayama, Ken Kurokawa, Makoto Ohnishi, Jun Terajima, Haruo Watanabe, Tetsuya Hayashi: The mechanism of genomic diversification in Enterohemorrhagic E. coli O157:H7, 6th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections, Oct. 2006, Melbourne Australia
3. Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Ken Kurokawa, Jun Terajima, Keisuke Nakayama, Haruo Watanabe, Toru Tobe, Tetsuya Hayashi: Comparative Genome Analysis of O157 and Non-O157 Enterohemorrhagic Escherichia coli Strains Using the Whole Genome PCR Scanning and the O157 OligoDNA Microarray, 6th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections, Oct. 2006, Melbourne Australia
4. 寺嶋 淳: 堺以後の日本における O157 の発生動向、第 27 回日本食品微生物学会学術総会、2006 年 9 月、大阪
5. 大岡唯祐、小椋義俊、中山啓介、黒川 颯、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也: IS

- 分布を利用したマルチプレックス PCR による迅速な O157 菌株識別システムの開発  
第 79 回日本細菌学会総会、2006 年 3 月
6. 小椋義俊、大岡唯祐、黒川 颯、大西真、中山啓介、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也：腸管出血性大腸菌ゲノムの比較解析  
第 79 回日本細菌学会総会、2006 年 3 月
7. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、石原朋子、渡辺治雄：EHEC の疫学—最近の状況 第 10 回腸管出血性大腸菌シンポジウム、2006 年 8 月、東京
8. 大岡唯祐、小椋義俊、中山恵介、黒川颯、大西 真、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也：腸管出血性大腸菌 O157 のゲノム多様性メカニズムの解析 第 10 回腸管出血性大腸菌シンポジウム、2006 年 8 月、東京
9. 井口 純、伊豫田 淳、寺嶋 淳、渡辺治雄、大澤 朗：大規模な逆位による腸管出血性大腸菌 O157 ゲノムの多様化 第 79 回日本細菌学会総会、2006 年 3 月
10. A. Kai, N. Konishi, H. Obata, Y. Shimojima, C. Monma, A. Nakama, S. Yamada; Epidemiological and bacteriological aspects of EHEC infection in Tokyo, 6th International Symposium on Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections, Melbourne 2006
11. 鈴木匡弘、松本昌門 フェージ由来 ORF 検出による MRSA の迅速遺伝子型別分類法の開発とその安定性の検証 第 43 回日本細菌学会中部支部総会 平成 18 年 10 月 19, 20 日 岐阜市
12. 勢戸和子、田口真澄、山崎渉、塚本定三、小林一寛：大阪府における minor serotype STEC の検出状況と分離株の細菌学的特徴、第 10 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2006 年 8 月、東京)
13. 久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、勢戸和子、山崎 渉、河原隆二、塚本定三、堤 千津、足立和人：学校給食によるカンピロバクター集団食中毒、第 27 回日本食品微生物学会 (2006 年 9 月、大阪)
14. 福永真治、押部智宏、近平雅嗣、兼子めぐみ、田中哲也、柴折浩幸：兵庫県内の食鳥処理場から分離されたカンピロバクターの分子疫学的解析、平成 18 年度全国公衆衛生獣医師協議会調査研究発表会 (2006 年 9 月、東京)
15. 福永真治、押部智宏、近平雅嗣：下痢症患者から分離された変異型 *stx2* 遺伝子保有大腸菌 O128:HNM の性状、平成 18 年度日本獣医公衆衛生学会(近畿) (2006 年 10 月、大阪)
16. 山本京子、河野通大、三谷亜里子、藤原恵子、時武正明、安藤明典、星野桃子、上田郁夫：食鳥処理場由来カンピロバクター属菌の PFGE 遺伝子解析による汚染状況の一考察、平成 18 年度日本獣医公衆衛生学会(近畿) (2006 年 10 月、大阪)
17. 勢戸和子、田口真澄、塚本定三：大阪府で分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) O165 の細菌学的特徴、第 80 回日本細菌学会総会 (2007 年 3 月、大阪)
18. 古田 喜美ほか：Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA) による腸管出血性大腸菌

0157:H7 の分子疫学的解析法の検討, 衛生微生物技術協議会第 27 回研究会(2006 年 7 月, 札幌市)

19. Takeda N: Norovirus and Sapovirus Activities in Japan. In 2006

International symposium for emerging enteric pathogens. Seoul, 2006. 11.

20. Takeda N: Genetic and antigenic diversity among noroviruses. In 2006 International workshop on foodborne pathogens. Taipei, 2006. 8.

21. Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. In American Society for Microbiology 106th General meeting. Orlando, FL, 2006. 5.

22. 武田直和, 白土東子, 宮村達男: ノロウイルス感染症. 第 80 回日本感染症学会学術講演会. 東京, 2006. 4

白土東子, 小川智子, 鎌田公仁夫, 片山和彦, 脇田隆字, 武田直和: ノロウイルスと血液型抗原との結合の解析. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11

23. Kamata K, Katoh D, Mangan K, Gondaira F, Hirano M, Satoh S, Sakae K, Kobayashi S, Oseto M, Seto Y, Kitamoto N, Tanaka T, Takeda N: Development of a New ELISA for Detection of Noroviruses in Stool Specimens. In American Society for Microbiology 106th General meeting. Orlando, FL, 2006. 5.

24. 三好龍也, 内野清子, 田中智之: ノロウイルス感染者のウイルス排泄期間と排出コピー数. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 名古屋, 2006. 11

25. 黒木俊郎, 泉山信司, 八木田健司, 三宅芳枝, 宇根有美, 林谷秀樹, 中臺文, 森哲, 黒尾正樹, 片山亮, 鳥羽通久, 森ロー, 遠藤卓郎: 国内に生息するへびにおけるクリプトスポリジウムの保有 第 57 回全国水道研究発表会 2006 年 5 月, 長崎

26. 黒木俊郎, 泉山信司, 八木田健司, 遠藤卓郎, 宇根有美: 国内に生息するへびのクリプトスポリジウム感染 第 66 回日本寄生虫学会東日本支部大会 2006 年 10 月, 東京

27. 李華芳, 秋葉道宏, 国包章一: Survey of Contamination with *Cryptosporidium* in the Tone River. 第 40 回日本水環境学会年会, 529, 2006.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# グループ 1： 細菌

研究課題名:「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」

分担研究報告書

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 大岡 唯祐、林 哲也	宮崎大学・医学部・医学科
協力研究者 楠本 正博	東洋紡・バイオフィロンティアプロジェクト推進室

研究要旨 1) 2006 年に分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) について PFGE 解析を行い、その遺伝子型別に基づいて分離株の動向について調べた。PFGE 解析結果は、FingerPrintingII による系統樹作成に基づくサブタイプ名の付与と PFGE パターンのデータベース構築に使用した。EHEC O157 では、1791 株に対して 2006 年に分離された新しいサブタイプとして 761 種類、2005 年に分離されたことのあるサブタイプが 36 種類、その他が 12 種類見いだされた。また、EHEC O26 では、440 株に対して 221 種類のサブタイプが見出された。一方、広域共通パターンを示す EHEC 株については、XbaI 消化でのパターンが同一と考えられる O157 では、3ヶ所以上の異なる都道府県で分離されたパターンが 37 種類存在したが、そのうち 5 箇所以上の都道府県で分離されかつ BlnI 消化でも一致するパターンは 6 種類存在していた。特に、26 都府県から 131 株が分離された Type No a259 のパターンを示す株について Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) による解析を行い、このサブタイプを示す株のなかでさらに変異株が存在することを明らかにした。2) 宮崎大学の岡村らが開発した IS-printing system を用いて、EHEC O157 の識別能について PFGE 及び MLVA との比較を行いその実用性を検討した。その結果、迅速性に優れ、識別能も PFGE には及ばないもののそれに準じる結果が得られたことから、検査法の標準化などの改善点が残るものの、迅速な検査法としての有望性が示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の PFGE による解析から国内分離株の遺伝子型に基づく動向を把握し、広域発生事例等の拡大防止対策に貢献することを

目的とした。また、平成 17 年度に引き続き、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行っ

た。さらに、IS-printing system を用いて、EHEC O157 の識別能について PFGE 及び MLVA との比較を行いその実用性を評価・検討した。

## B. 研究方法

1) 平成 18 年度に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析を行った。結果については、E-mail により菌株送付機関に返信するとともに、感染研のサーバー上で全国の地研の担当者に対して ID とパスワードの組合せによる限定公開を行った。MLVA については、米国 CDC が使用している 9 組の primer を用いて行った。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 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。MLVA の結果を比較する際には、BioNumerics (Applied Maths 社) によるデンドログラムを用いた。

2) EHEC O157 の解析方法の一つとして、宮崎大の大岡らが開発した IS-printing system (東洋紡) を用いて PFGE 及び MLVA の結果との比較を行った。供試菌として、PFGE による解析結果から分離株の近縁度が離れていると予想される 16 株を用いた。検査法としては、添付のプロトコールに準じたが、PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem 社) で行い、アガロースゲル電気泳動は、3% SeaKem Gold Agarose, 0.5x TAE で行った。また、Template DNA として DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) により精製した DNA を用いた。

+

## C. 研究結果と考察

### 1. PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイプピング

EHEC O157 については、2006 年に分離・送付された 1791 株が、2006 年に分離された新しいサブタイプとして 761 種類、2005 年に分離されたことのあるサブタイプが 36 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(図 1)。EHEC O26 についても同様に、集団発生由来株がクラスターを形成した(図 2)。一方、後述するように、散発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。しかしながら、実際に関連性が証明された事例はなかった。

### 2. EHEC における広域共通パターンを示す株の解析

2006 年に分離された 1791 株の EHEC O157 は、839 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 37 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た。このうち、2005 年に出ているパターンである、Type No.(TN) a259 のパターンについては、26 都府県から 131 株が分離されたおり、すべてが散発事例由来株で分離期間も 4 月から 12 月の長期に及んでいた(図 3)。また、5 箇所以上の異なる都府県において分離される広域共通パターンとして、やはり 2005 年に引き続いて分離されていたパターンである TN a829、及び 2006 年になって初めて分離されたパターンである TN b330, b328, b223 が見いだされた(図 4 及び 5)。これらの 6 種類のパターンを示す株は、*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。また、TN a829 及び b328 については、散発事例だけでなく集団発生(OB)をも引き起こしていた。しかしながら、両者の関連性を示唆するような疫学的情報は得られていない。

広域に及ぶ分離株である TN a259 のパターンを示す株のうち BlnI でも同一パターンを示す株 68 株について MLVA を行った結果、2005 年分離株 (NIID No. 051219) は 2006 年の多数の分離株が示すパターンと 6 箇所の locus において一つ以上のリピート数の違いが見られ、2006 年分離の株とは大きく異なっていることが示された(表 1)。一方、68 株中 17 株は全ての locus においてリピート数が同じであり、Single Locus Variant でかつリピート数が1違いである変異株(SLV1)は 37 株存在した。したがって、13 府県から分離されている EHEC O157 が、PFGE 及び MLVA により同一遺伝子型と考えられ、その感染源の共通性が強く疑える結果となった。

### 3. PulseNet Japan による解析結果の公開

平成 18 年度途中から解析結果について感染研のサーバーによる地研への限定公開を開始した。複数の地域からの分離株が同一パターンを示す事例等について、感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部を公開し、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、2006 年分離株に対しては番号に”b”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。現在解析結果が PDF での閲覧という形式になっているが、個々の機関においても全国的な

発生動向を把握するためには、全国的な集計が可能となるようなファイル抽出機能も今後検討が必要と考えられる。

### 4. IS-printing system による EHEC O157 の解析とその有用性について

2006 年に分離された EHEC O157 のうち PFGE による解析結果からそのパターンの近縁度が離れていると予想される 16 株について IS-printing system による解析を行った(図 6)。予想されるサイズのバンドは鮮明なものがほとんどであったが、一部では増幅の弱いバンドがありバンドの有無の判定が難しい場合があった(図 7)。1st set primer あるいは 2nd set primer のみでは識別ができない株もあったが、両者の組合せでは用いた 16 株全てを識別することが可能であった(図 8)。リピート数の組合せで評価している MLVA との単純な比較はできないが、それぞれの解析方法において株間の違いが小さく判定される株が数株ずつ見られた。PFGEによる株間の近似度が94%以下である株がほとんどである株を用いたが、IS-printing system では95%程度の近似度になる株が数株みられた(図 8, 9)。しかしながら、株間の識別能という意味では、今回使用した株については IS-printing system によっても PFGE とほぼ同程度の識別能があることが示された。

実験操作の簡便性と迅速性において IS-printing system は優れており、分離株の異同について迅速な判断が求められる現場では非常に有効であることが示唆された。今後、プロトコールの詳細について検討を加え、各機関における結果の共有が可能であるような検査法となることが期待される。

#### D. 結論

PFGE で共通パターンを示す株が広域から分離されていることが示される一方で、MLVA によりさらに識別が可能な株と PFGE と MLVA で同一タイプとなる株が存在していることが明らかになった。MLVA による結果を疫学的に応用する上での判定基準設定が今後の課題であろう。IS-printing system による EHEC O157 の識別法では、操作の簡便性及び迅速性が優れており、集団発生等での解析における実用性が期待される。今後、操作法の標準化を進めることで解析結果の共有性を確保することが課題と考えられた。

#### E. 研究発表

##### 1) 誌上発表

1. Terajima J., Tosaka N, Ueno K, Nakashima K, Kitsutani P, Gaynor MK, Park SY, Watanabe H. Shigella sonnei outbreak among Japanese travelers returning from Hawaii. Jpn J Infect Dis. 2006, 59, 282-3.
2. Iguchi A, Iyoda S, Terajima J., Watanabe H, and Osawa H. Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the Escherichia coli O157:H7 chromosome. Gene, 2006, 10;372:199-207
3. Terajima J., Izumiya H, Iyoda S, Mitobe J, Miura M, Watanabe H. Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing Escherichia coli in Japan. Foodborne Pathogens and Disease. 2006, 3(1):68-73.
4. Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, Tashiro K, Tobe T, Ohnishi M, Nakayama K, Morimoto T, Terajima J., Watanabe H, Kuhara S, Hayashi T. Complexity

of the genomic diversity in enterohemorrhagic Escherichia coli O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai OligoDNA microarray and the Whole Genome PCR scanning. DNA Res. 2006, 13, 3-14.

##### 2) 学会発表

1. Jun Terajima, Pei Yingxin, Hidemasa Izumiya, Sunao Iyoda, Jiro Mitobe, Haruo Watanabe : Molecular Epidemiological Investigation of Enterohemorrhagic E. coli Isolates in Japan 2004 - 2005, 6th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections, Oct. 2006, Melbourne Australia
2. Tadasuke Ooka, Yoshitoshi Ogura, Keisuke Nakayama, Ken Kurokawa, Makoto Ohnishi, Jun Terajima, Haruo Watanabe, Tetsuya Hayashi: The mechanism of genomic diversification in Enterohemorrhagic E. coli O157:H7, 6th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections, Oct. 2006, Melbourne Australia
3. Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Ken Kurokawa, Jun Terajima, Keisuke Nakayama, Haruo Watanabe, Toru Tobe, Tetsuya Hayashi: Comparative Genome Analysis of O157 and Non-O157 Enterohemorrhagic Escherichia coli Strains Using the Whole Genome PCR Scanning and the O157 OligoDNA Microarray, 6th International Symposium on 'Shiga Toxin(Verocytotoxin)-producing Escherichia coli Infections, Oct. 2006, Melbourne Australia
4. 寺嶋 淳: 堺以後の日本における O157 の発生動向、第 27 回日本食品微生物学会学術総会、2006 年 9 月、大阪

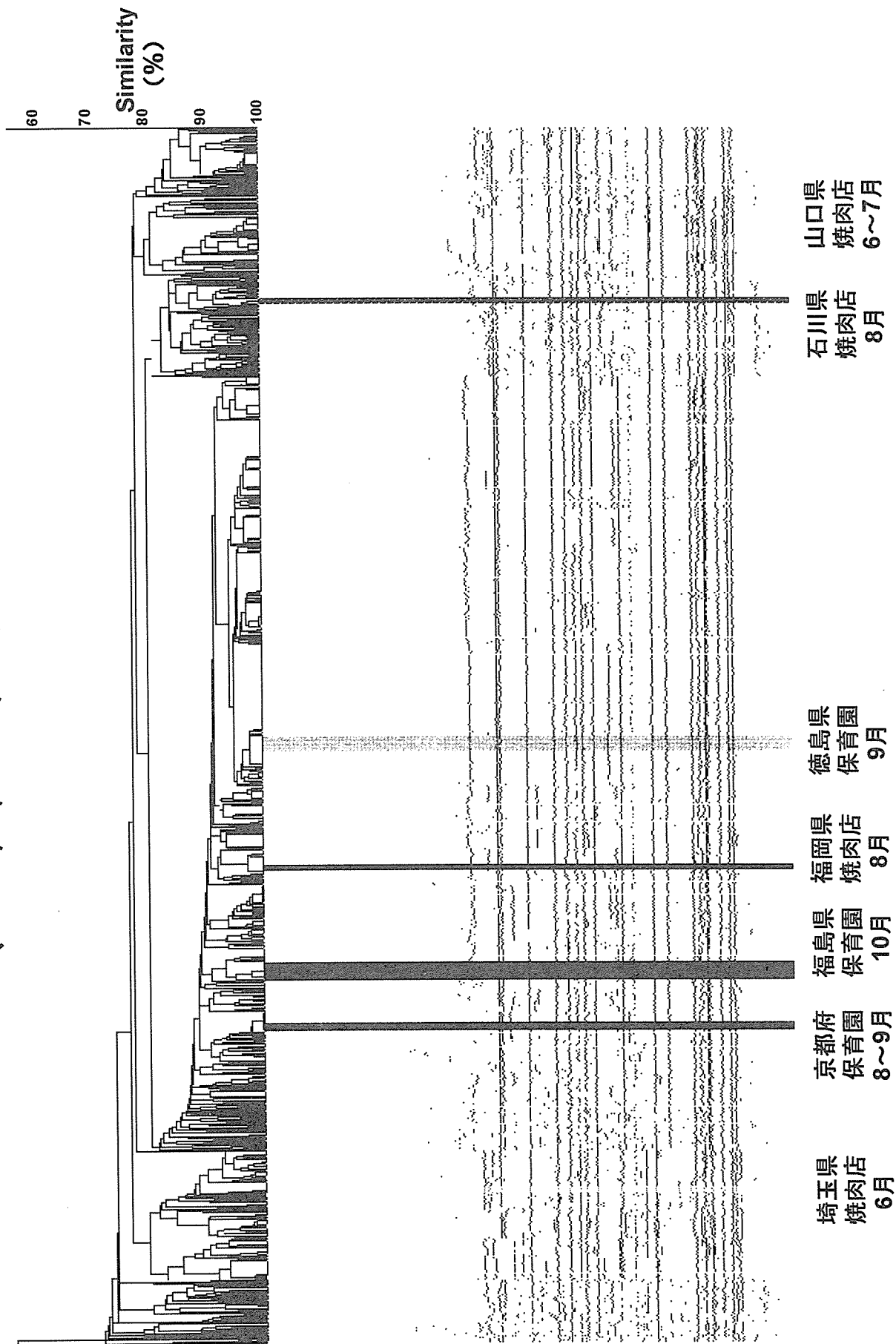


5. 大岡唯祐、小椋義俊、中山啓介、黒川 顕、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也:IS 分布を利用したマルチプレックス PCR による迅速な O157 菌株識別システムの開発 第 79 回日本細菌学会総会、2006 年3月
6. 小椋義俊、大岡唯祐、黒川 顕、大西 真、中山啓介、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也:腸管出血性大腸菌ゲノムの比較解析 第 79 回日本細菌学会総会、2006 年3月
7. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、石原朋子、渡辺治雄:EHEC の疫学—最近の状況 第 10 回腸管出血性大腸菌シンポジウム、2006 年8月、東京
8. 大岡唯祐、小椋義俊、中山恵介、黒川 顕、大西 真、寺嶋 淳、渡辺治雄、林 哲也:腸管出血性大腸菌 O157 のゲノム多様性メカニズムの解析 第 10 回腸管出血性大腸菌シンポジウム、2006 年8月、東京
9. 井口 純、伊豫田 淳、寺嶋 淳、渡辺治雄、大澤 朗:大規模な逆位による腸管出血性大腸菌 O157 ゲノムの多様化 第 79 回日本細菌学会総会、2006 年3月

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図 1 Dendrogram of EHEC O157:H/- isolates in Japan (1791 entries)  
 (2006/1/1-12/31) Tol : 1.2%



2 Dendrogram of EHEC O26 isolates in Japan (453 entries)  
 (2006/1/1-12/31) Tol: 1.2%

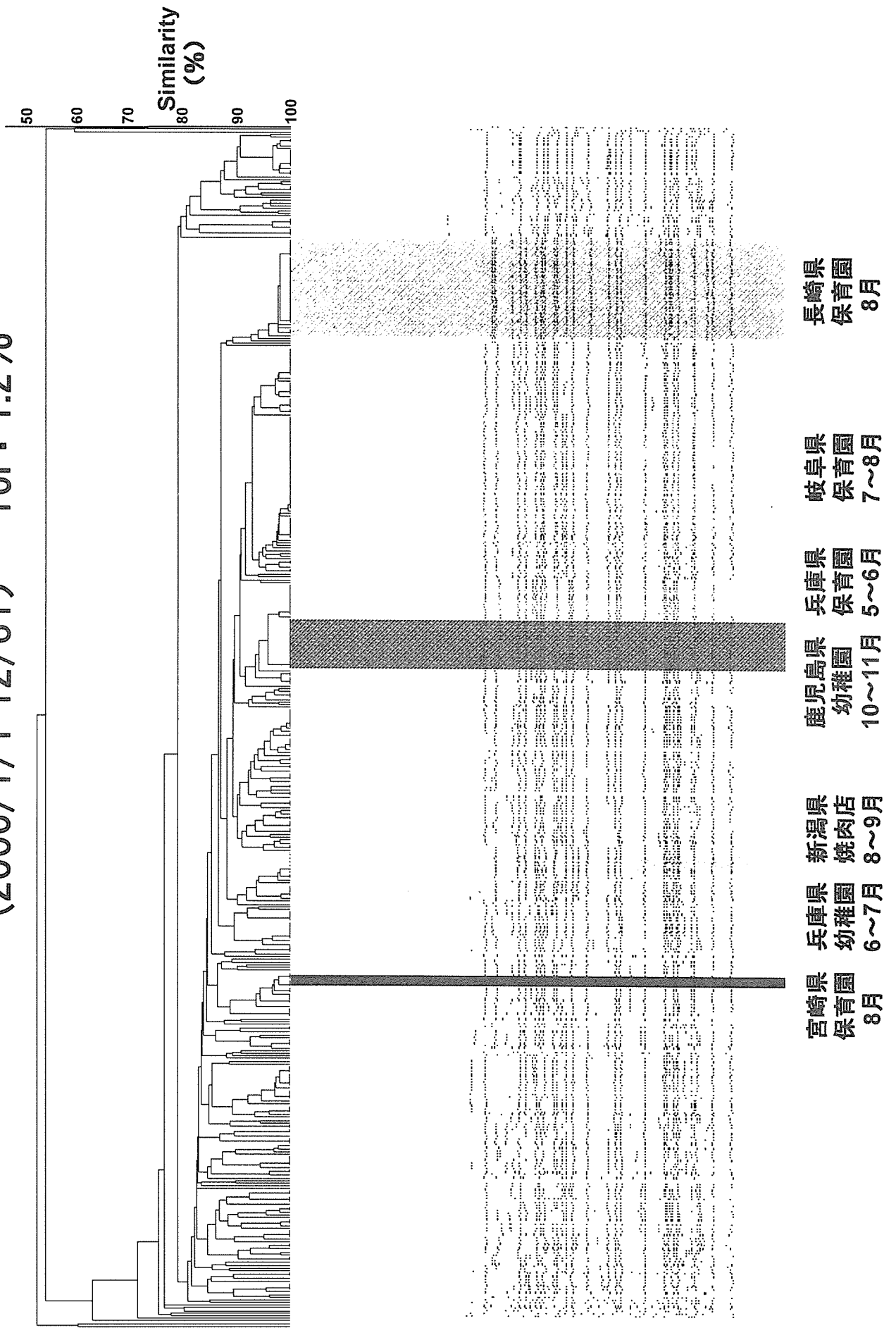


図3 2006年 PFGEパターンの一致している事例の分布図(1)

◆ Type No. a259, Apr-Dec

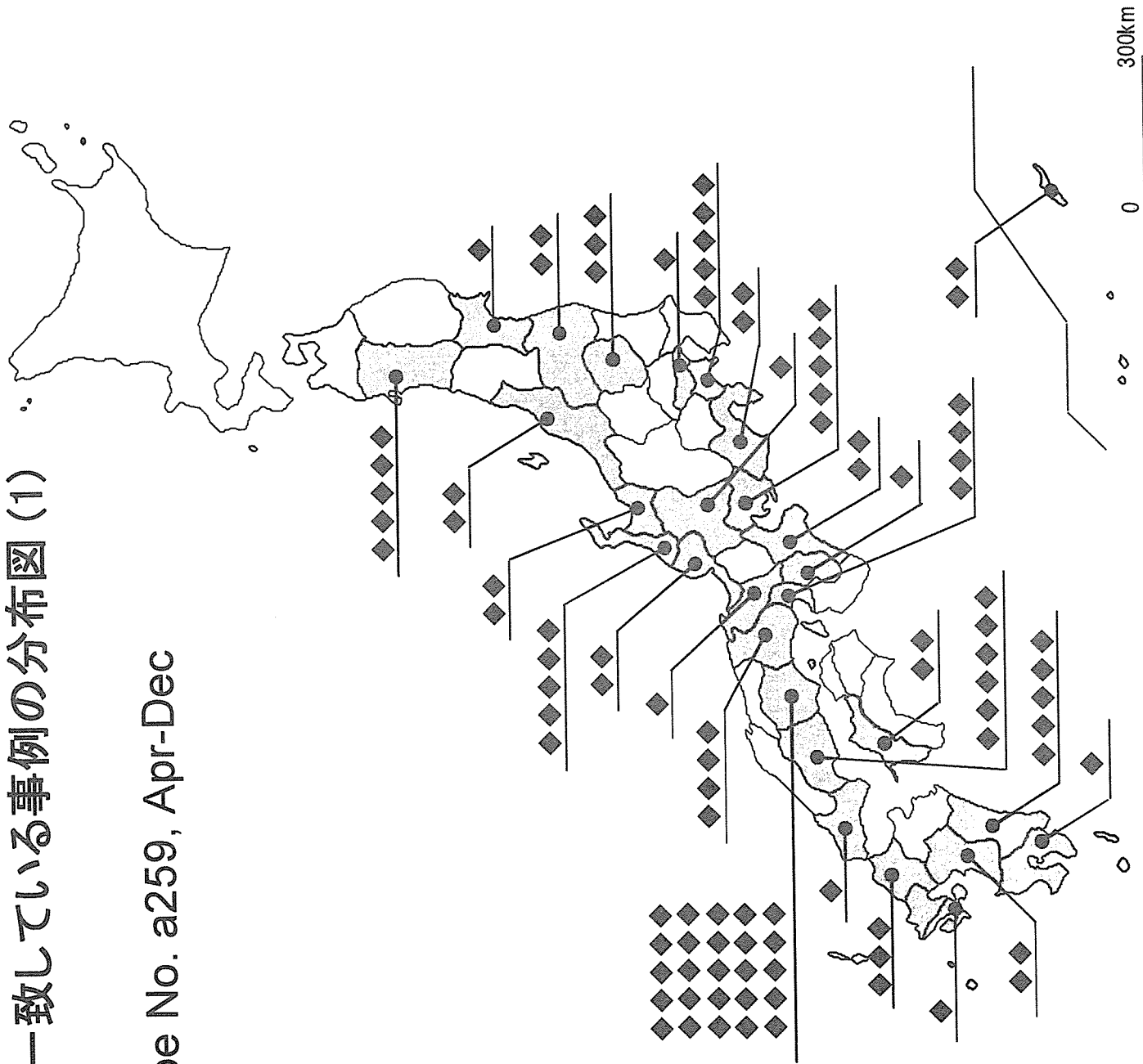
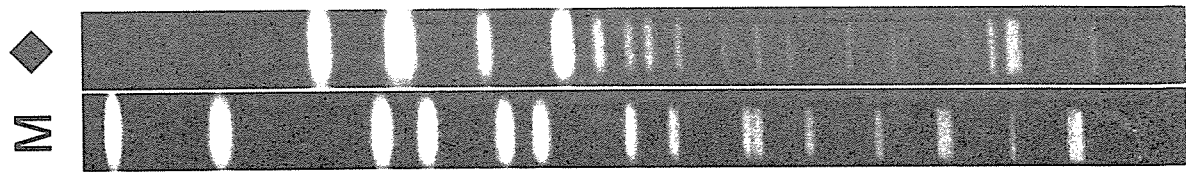


図4 2006年 PFGEパターン的一致している事例の分布図(2)

▲ Type No. a829, Jun-Dec  
 OB: 集団発生事例

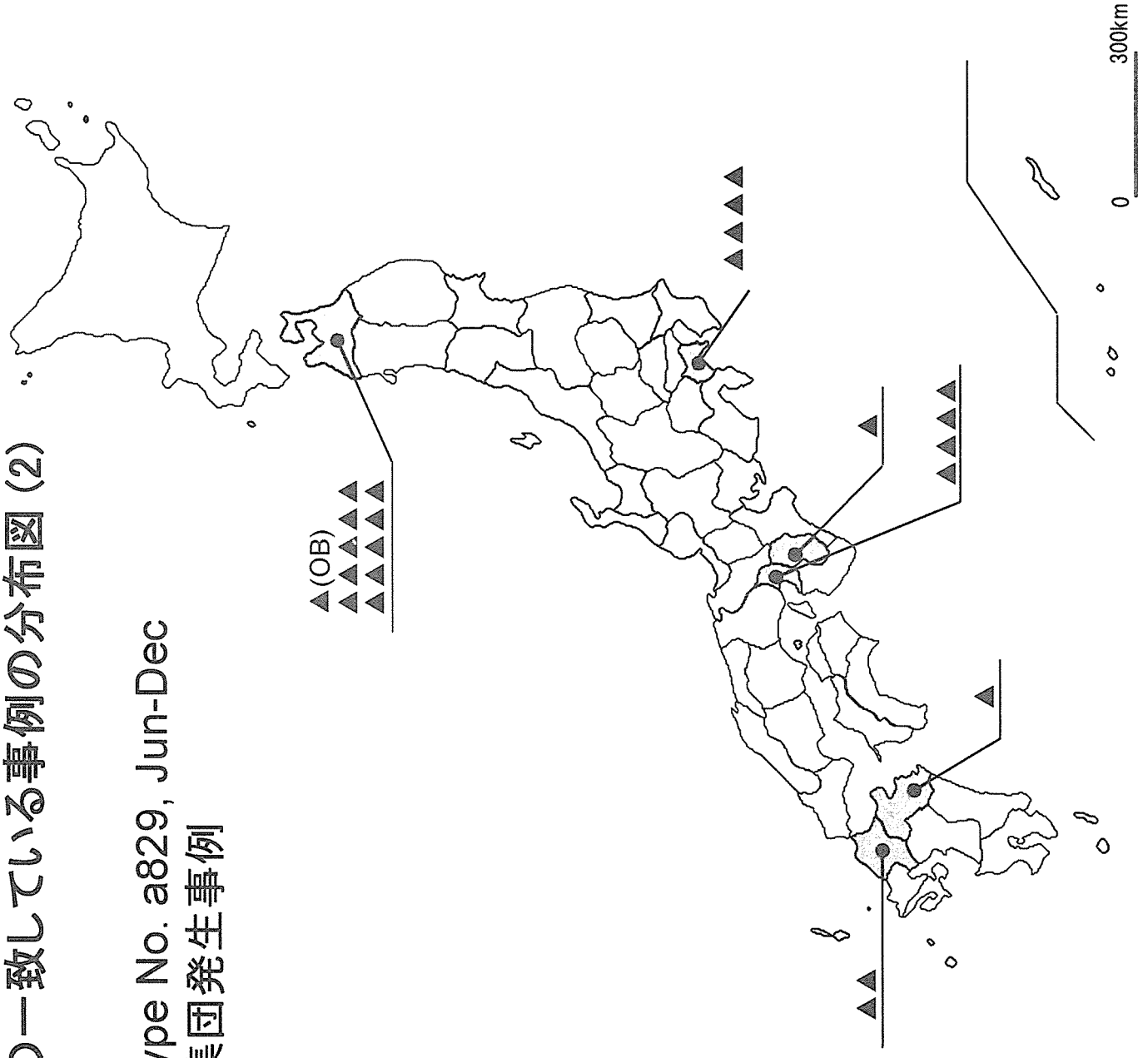
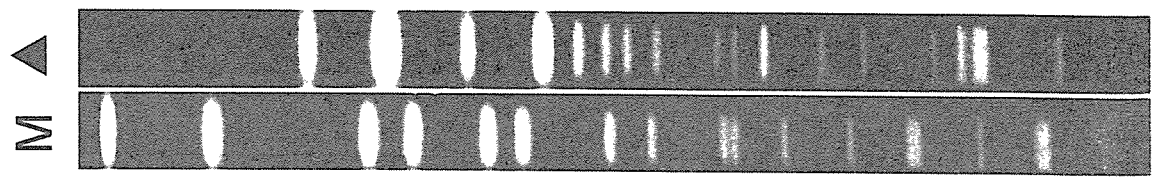
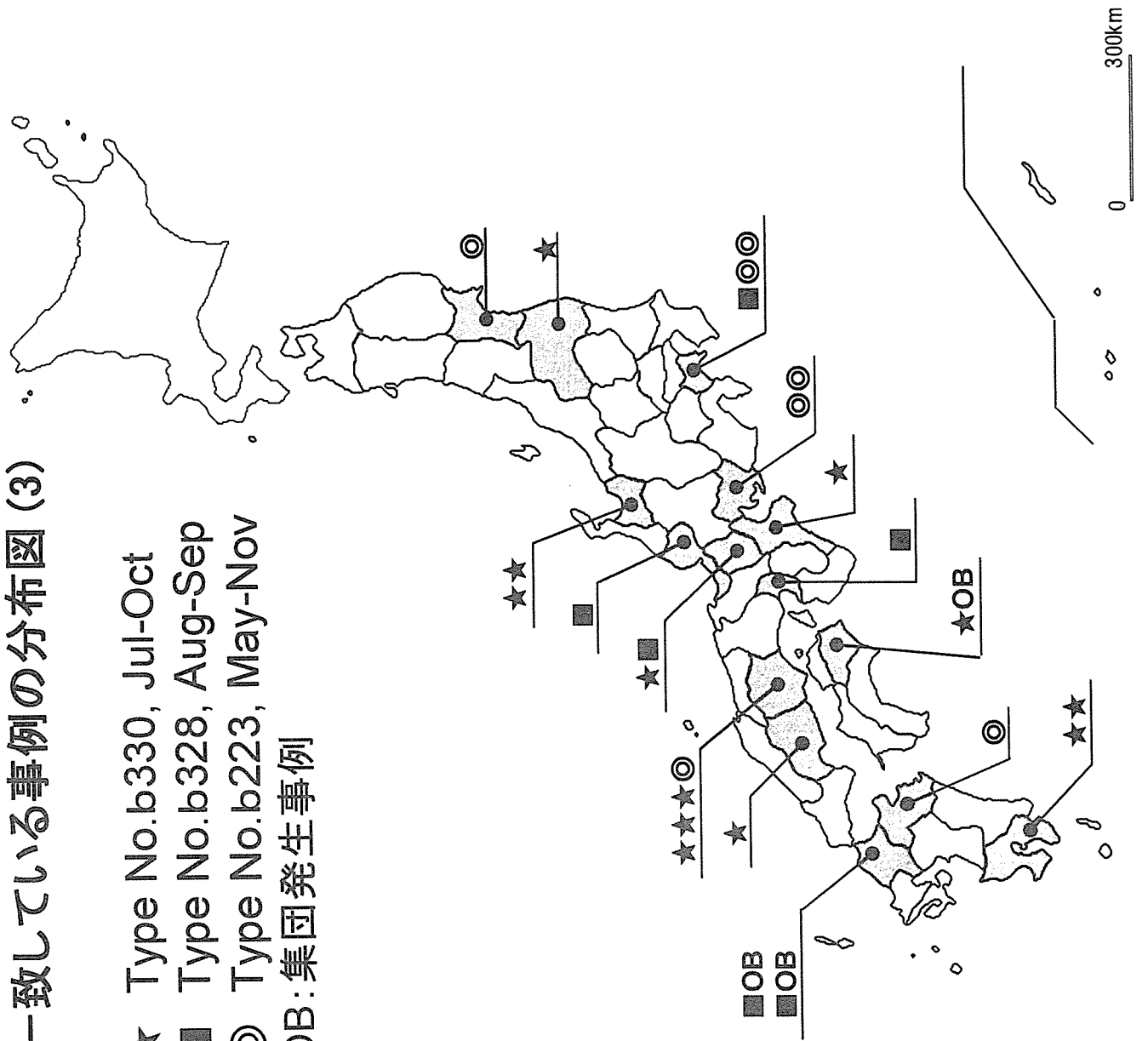
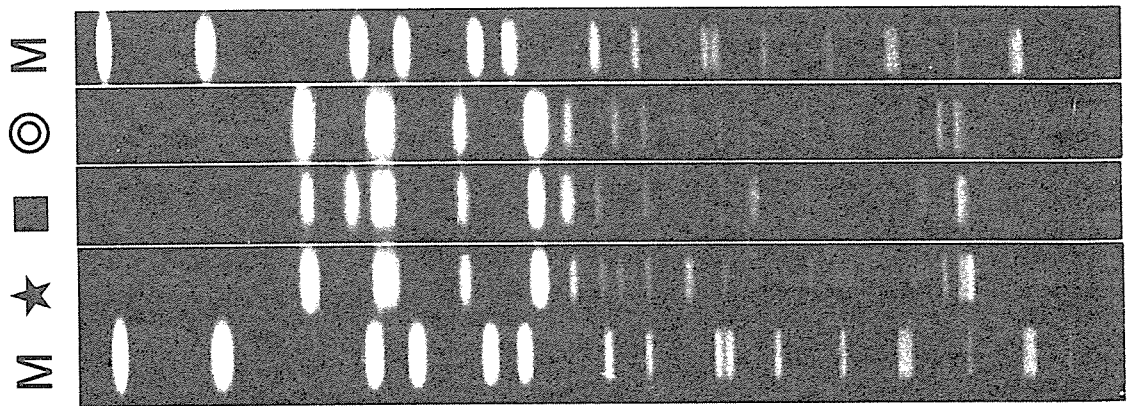


図5 2006年 PFGEパターン的一致している事例の分布図 (3)

- ★ Type No.b330, Jul-Oct
- Type No.b328, Aug-Sep
- ◎ Type No.b223, May-Nov
- OB: 集団発生事例



strain no.	locus 25	locus 3	locus 34	locus 9	locus 17	locus 19	locus 36	locus 37	locus 10
051219	4	13	9	13	7	6	8	7	11
060375	5	13	9	16	7	4	10	6	19
060526	5	13	9	16	7	4	10	6	20
060777	5	13	9	16	7	4	10	6	19
060800	5	13	9	16	7	4	10	6	19
060935	5	13	9	17	7	4	10	6	19
060969	5	13	9	16	7	4	10	6	20
061009	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061030	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061176	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061274	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061340	5	13	9	17	7	4	10	6	19
061421	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061474	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061496	5	13	9	16	7	4	9	5	19
060980	5	13	9	16	7	4	10	6	19
060990	5	14	9	16	7	4	10	6	19
061096	5	13	9	16	7	4	10	6	20
061431	5	13	9	16	7	4	10	6	20
061436	5	13	9	16	7	4	9	6	20
061438	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061471	5	13	9	16	7	4	9	5	19
061504	5	13	9	16	7	4	9	6	19
061510	5	13	9	16	7	4	10	6	20
061568	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061601	5	13	9	16	7	4	10	6	20
061713	5	13	9	16	7	4	10	6	20
061779	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061787	5	13	9	16	7	4	10	6	21
061824	5	13	9	16	7	4	10	6	19
061886	5	13	9	16	6	4	10	6	20
062038	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062042	5	13	9	16	7	4	8	6	19
062052	5	13	9	16	7	4	10	6	21
062070	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062074	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062075	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062076	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062088	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062095	5	13	9	16	7	4	10	6	21
062096	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062099	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062167	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062170	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062171	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062172	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062173	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062211	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062212	5	13	9	16	7	4	10	6	21
062224	5	13	9	15	7	4	10	6	19
062244	5	13	9	16	7	4	10	6	19
062245	5	13	9	16	7	4	10	6	19
062341	5	14	9	16	7	4	10	5	19
062425	5	13	9	9	7	4	10	6	21
062451	5	13	9	17	7	4	10	6	20
062488	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062533	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062595	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062617	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062618	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062619	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062620	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062621	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062622	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062651	5	13	9	16	7	4	10	6	20
062705	5	13	9	17	7	4	10	6	19
062716	5	13	9	15	7	4	10	6	19
062848	5	13	9	16	7	4	10	6	20

図 6 IS printing systemの解析に使用したO157のデンドログラム上の近縁度

Dendrogram of EHEC O157:H/- isolates in Japan (1795 entries) (2006/1/1-12/10) Tol: 1.2%

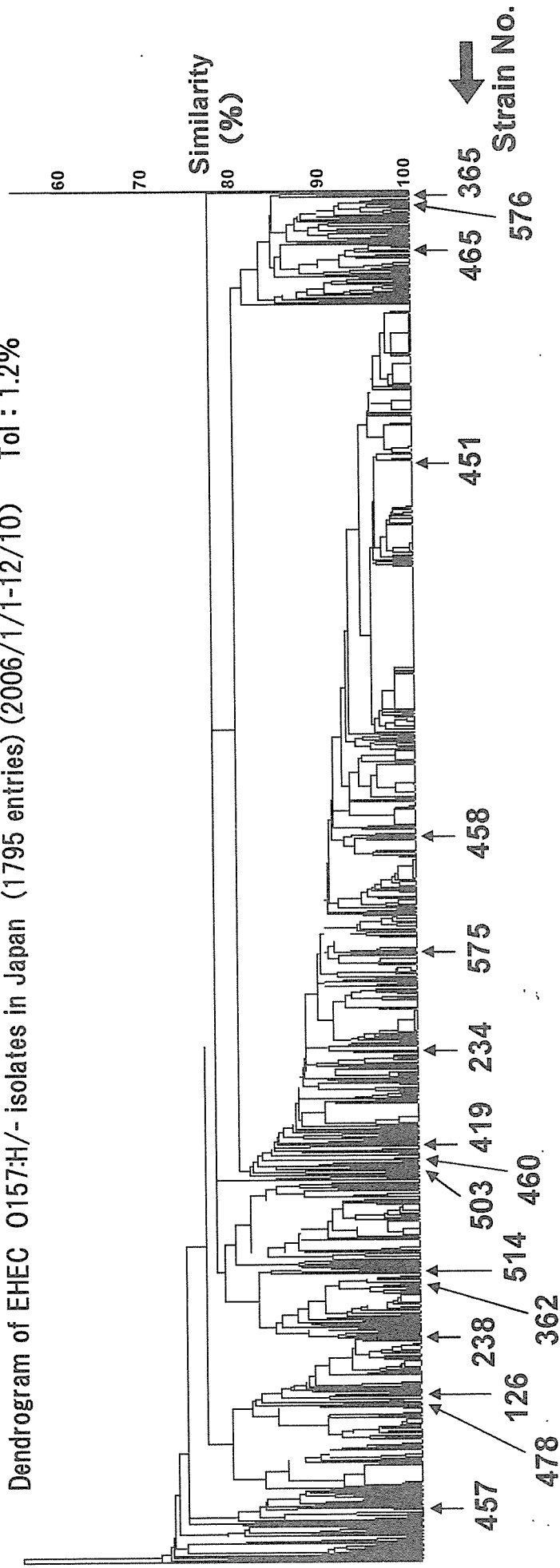




図7 IS printing systemによるO157解析(1)  
PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動像

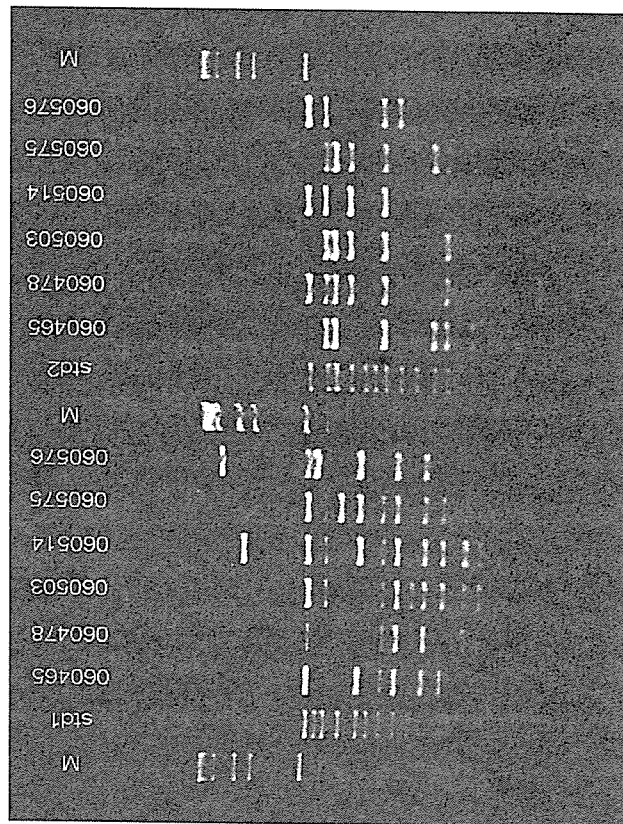
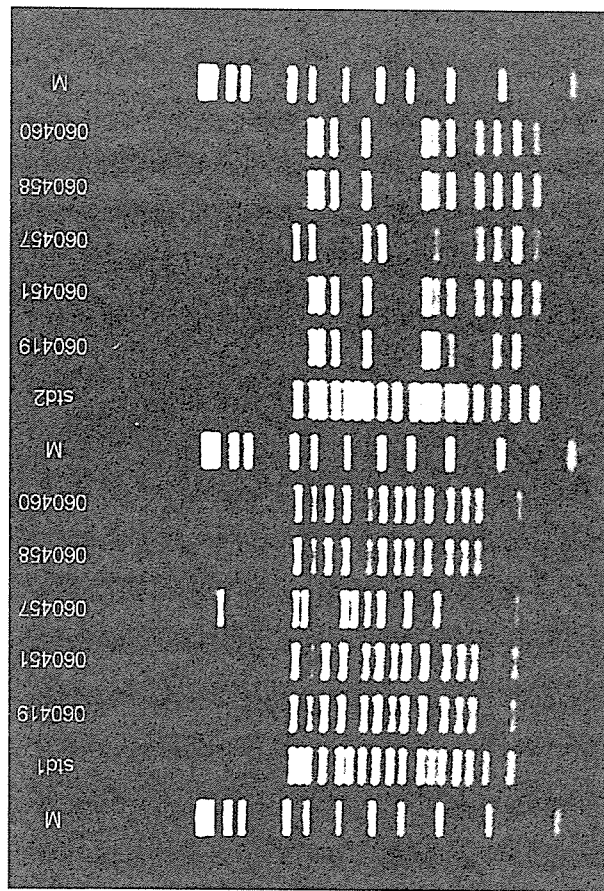
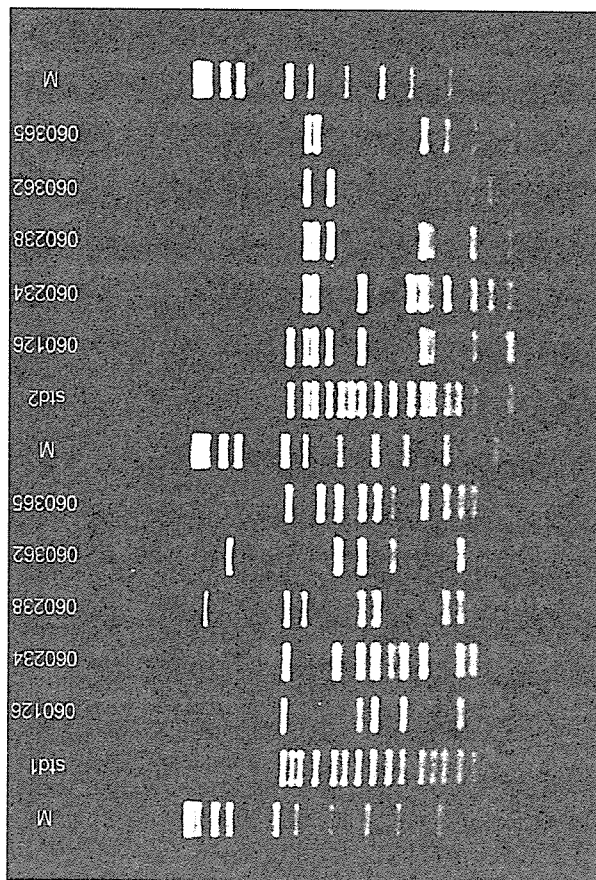
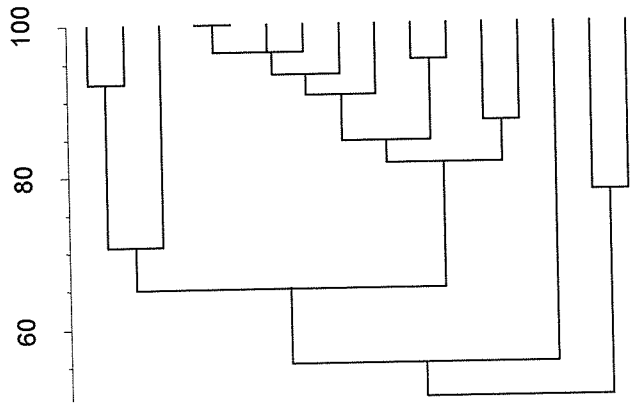
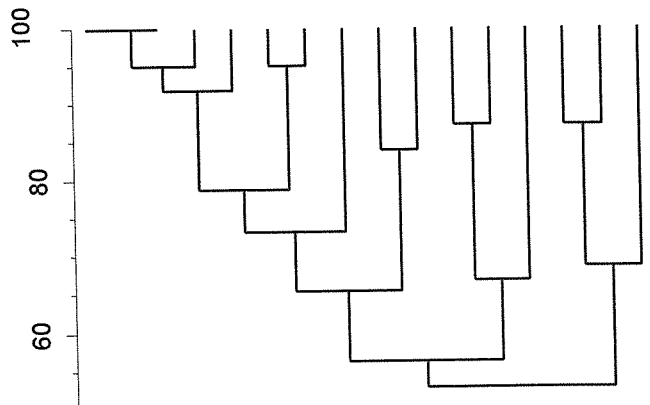


図 8

アガロースゲル  
電気泳動像の  
デンドログラム



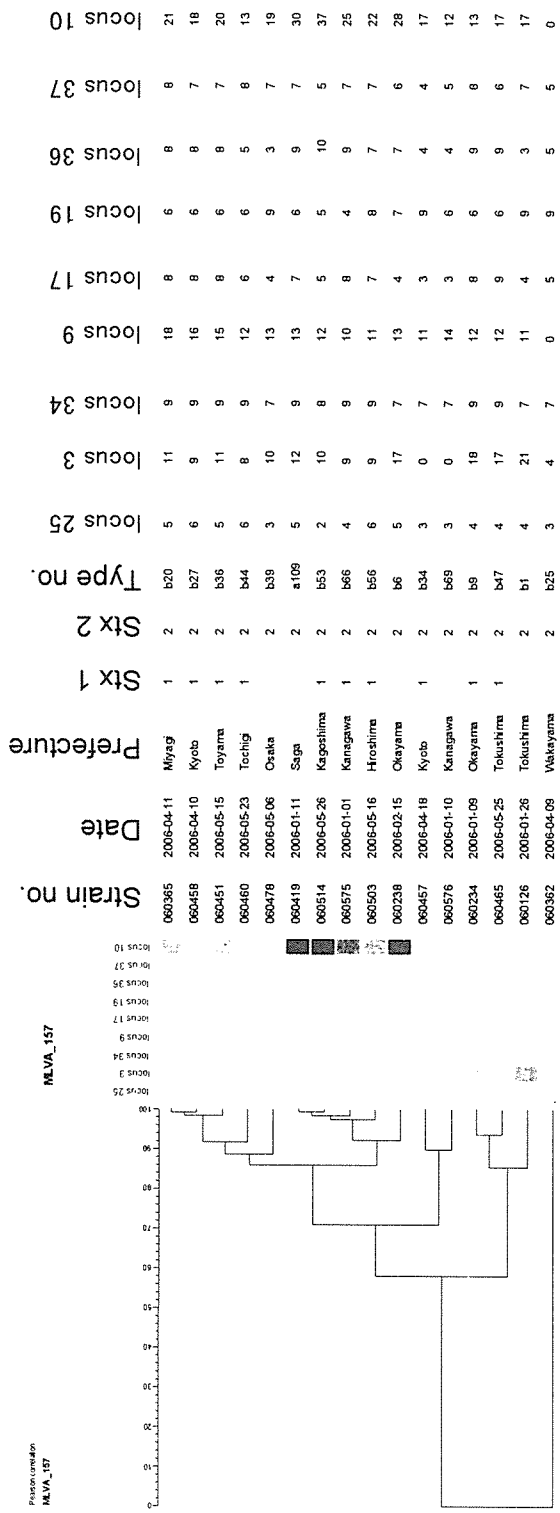
IS-std1



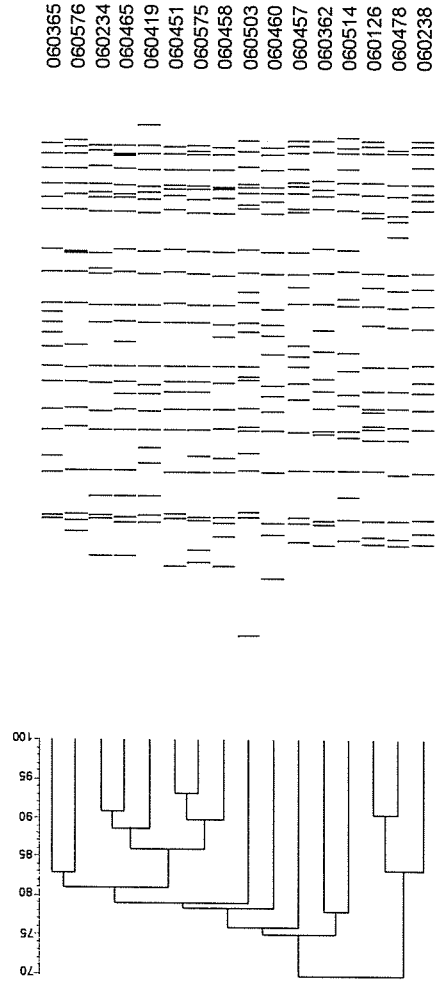
IS-std2

図 9

(A) 9 lociのMLVAによるデンドログラム及びリポート数



(B) PFGE(XbaI)によるデンドログラム



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
「広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究」  
平成18年度分担研究報告書

北海道・東北・新潟ブロック内のPFGE 画像解析に関する施設間差

分担研究者	長野秀樹	北海道立衛生研究所
協力研究者	木村浩一、伊東拓也、合田悟	北海道立衛生研究所
	和栗 敦	青森県環境保健センター
	八柳 潤、斎藤志保子	秋田県健康環境センター
	藤井伸一郎	岩手県環境保健研究センター
	谷津壽郎	宮城県保健環境センター
	金子紀子	山形県衛生研究所
	渡邊奈々子	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
	広地 敬	札幌市衛生研究所
	沼田 昇	仙台市衛生研究所

研究要旨：パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）画像を正確に解析するには、バンドパターンの認識が重要であることは、これまでの調査から明らかにされている。今回はその認識方法について検討を行った。供試した PFGE 画像は昨年度の本調査に用いたものであり、それによって昨年度との比較が可能となった。同一菌株である No.2 と No.7 についての類似度が 100%であった施設は昨年度が 2 施設、今年度が 3 施設であった。また、昨年度、100%であった 2 施設は今年度は 100%とはならなかった。このことは、担当者によって PFGE バンドの指定方法が異なっていることを示しており、バンド指定を行うときは、担当者の個人差がでないような明確な基準を検討する必要がある。

#### A. 目的

昨年度の報告書において、同一菌株 1 株を含む 2 群の試料について時間間隔をあけて 2 回別々に PFGE 解析した場合、それぞれの群に含まれる同一の菌株を同一 PFGE パターンとして検出することが出来ない例の多いことを示した。各地研より送付されたデータベース画像を見る限り、PFGE 手技そのものに問題点があるとは考えられなかった。特に、バンドパターンの解析をすべて同一人物が行った 3 地研の結果で、2 つの群にそれぞれ含まれる同一菌株の類似度がほぼ同じ値に計算されたことは、問題

点が電気泳動ではなく、解析側にあることを強く示唆していた。データベース画像を詳細に検討すると、2 群に含まれる同一菌株試料の特定のバンドを、同じ施設でも 1 本のバンドと判定している場合と、2 本のバンドの重なりと判定している場合があり、このことが同一 PFGE として検出されない要因の一つであった。しかし、各バンドの読み取り方が同じであっても、同一 PFGE パターンとして検出されなかった例もあり、PFGE 終了後のバンドパターンのデータベースへの入力だけではなく、解析ソフトそのものにも原因のあることが示唆された。