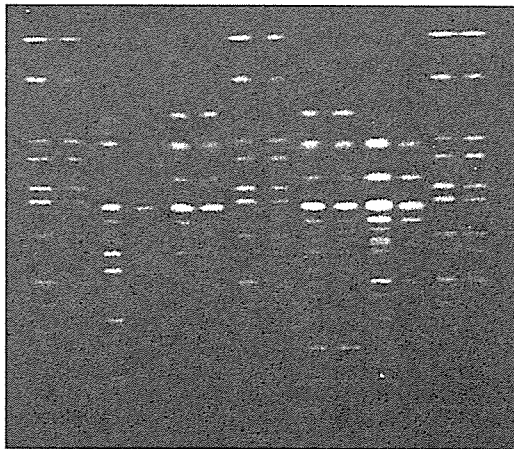


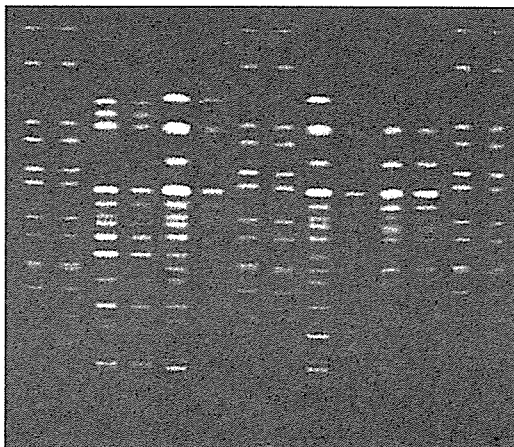
Lane
 1 marker プレート
 2 菌株1 プレート
 4 菌株2 プレート
 5 菌株3 プレート
 6 菌株4 プレート
 7 marker プレート

図4 E施設のPFGE画像



Lane
 1 marker ブイヨン
 2 marker プレート
 3 菌株1 ブイヨン
 4 菌株1 プレート
 5 菌株2 ブイヨン
 6 菌株2 プレート
 7 marker ブイヨン
 8 marker プレート
 9 菌株3 ブイヨン
 10 菌株3 プレート
 11 菌株4 ブイヨン
 12 菌株4 プレート
 13 marker ブイヨン
 14 marker プレート

図5 F施設のPFGE画像



Lane
 1 marker ブイヨン
 2 marker プレート
 3 菌株1 ブイヨン
 4 菌株1 プレート
 5 菌株2 ブイヨン
 6 菌株2 プレート
 7 marker ブイヨン
 8 marker プレート
 9 菌株3 ブイヨン
 10 菌株3 プレート
 11 菌株4 ブイヨン
 12 菌株4 プレート
 13 marker ブイヨン
 14 marker プレート

図6 G施設のPFGE画像

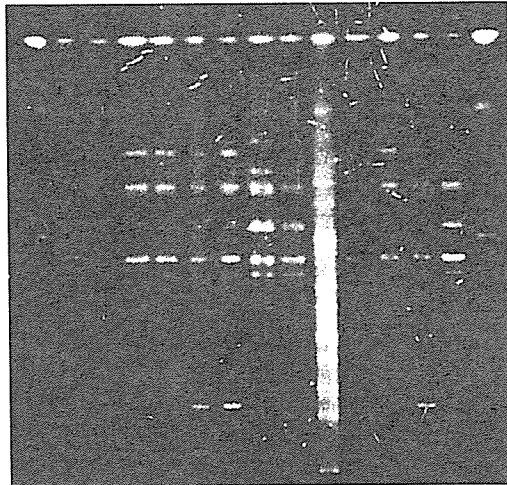


図7 H施設のPFGE画像

Lane	Content	Medium
1	marker	ブイオン
2	菌株1	ブイオン
3	菌株1	ブイオン
4	菌株2	ブイオン
5	菌株2	ブイオン
6	菌株3	ブイオン
7	菌株3	ブイオン
8	菌株4	ブイオン
9	菌株4	ブイオン
10	marker	ブイオン
11	菌株1	プレート
12	菌株2	プレート
13	菌株3	プレート
14	菌株4	プレート
15	marker	ブイオン

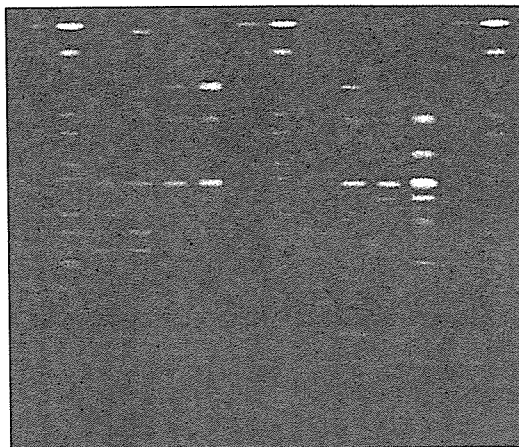


図8 I施設のPFGE画像

Lane	Content	Medium
1	marker	ブイオン
2	marker	プレート
3	菌株1	ブイオン
4	菌株1	プレート
5	菌株2	ブイオン
6	菌株2	プレート
7	marker	ブイオン
8	marker	プレート
9	菌株3	ブイオン
10	菌株3	プレート
11	菌株4	ブイオン
12	菌株4	プレート
13	marker	ブイオン
14	marker	プレート

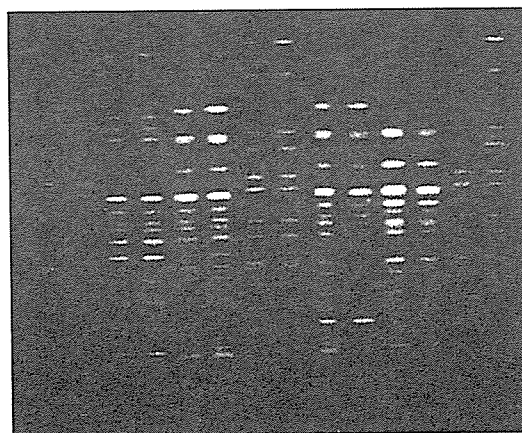


図9 J施設のPFGE画像

Lane	Content	Medium
1	marker	ブイオン
2	marker	プレート
3	菌株1	ブイオン
4	菌株1	プレート
5	菌株2	ブイオン
6	菌株2	プレート
7	marker	ブイオン
8	marker	プレート
9	菌株3	ブイオン
10	菌株3	プレート
11	菌株4	ブイオン
12	菌株4	プレート
13	marker	ブイオン
14	marker	プレート

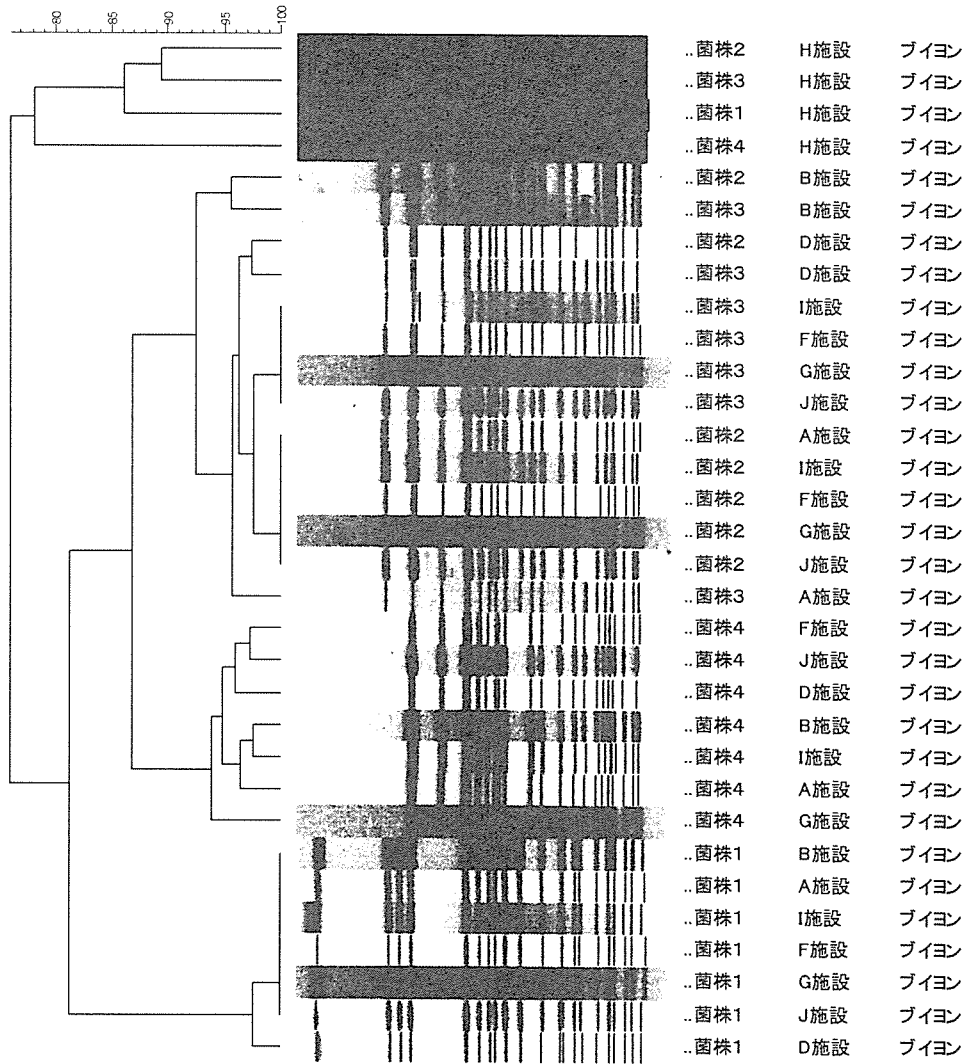


図 10 各施設間の O157(ブイオン)デンドログラム

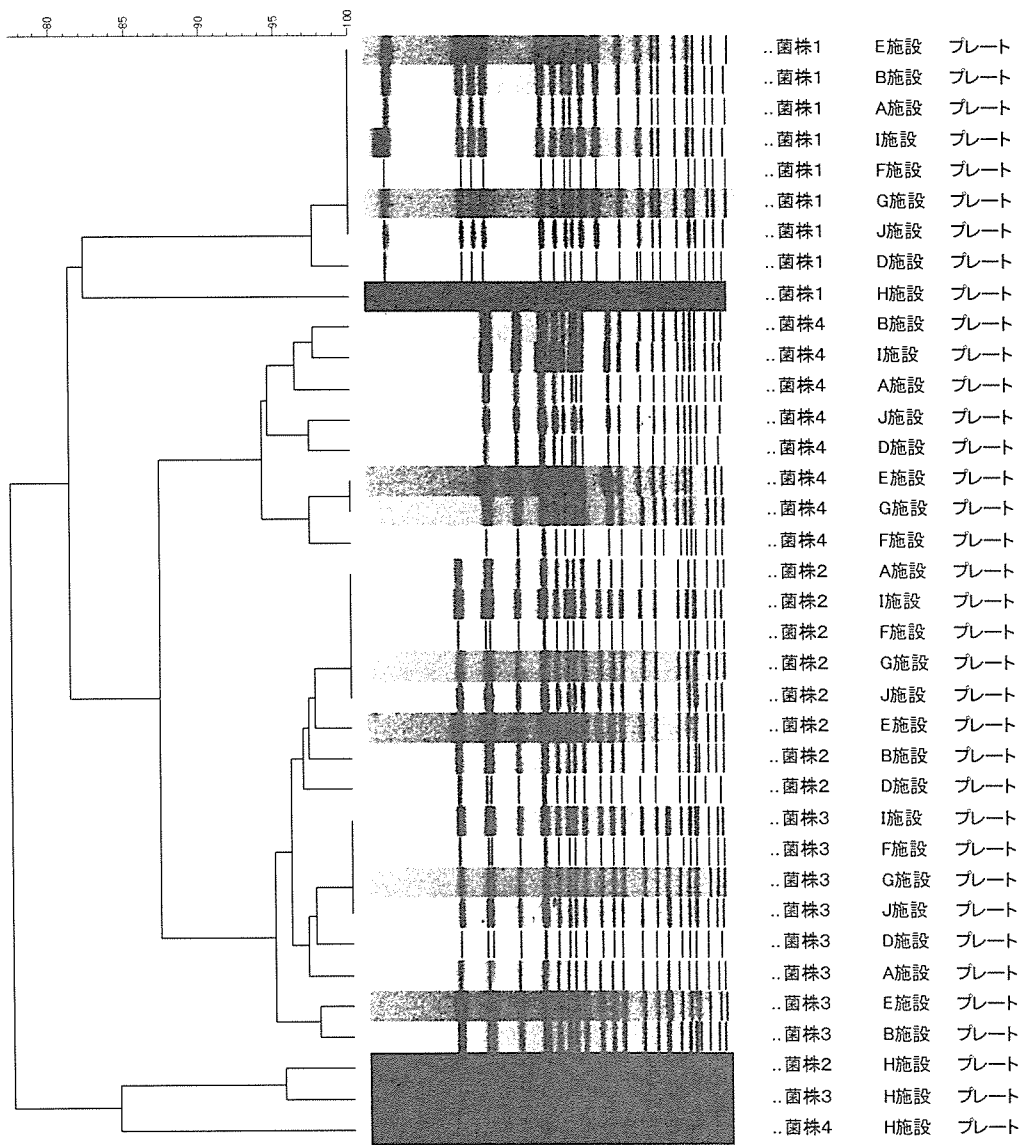


図 11 各施設間の O157(プレート)デンドログラム

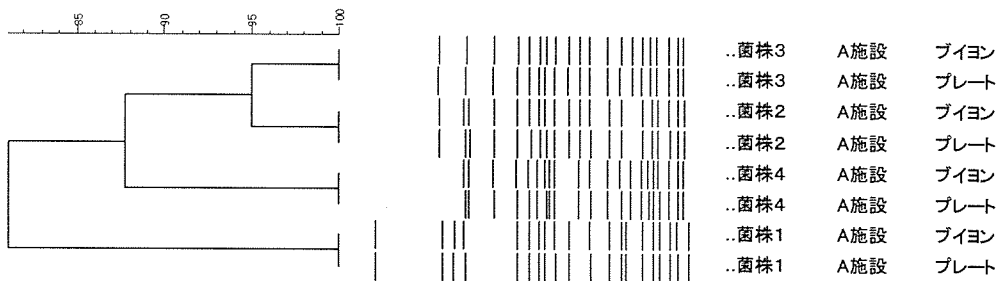


図 12 施設 A のデンドログラム

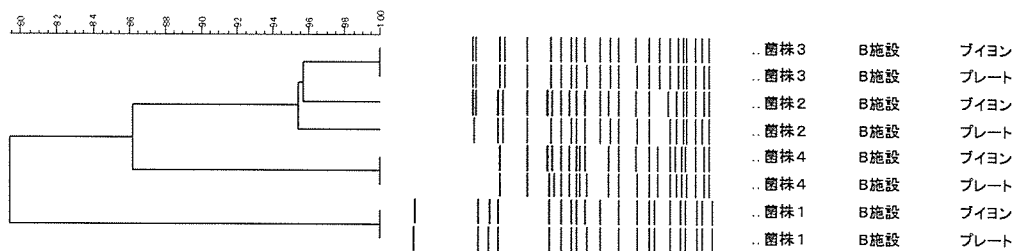


図 13 施設 B のデンドログラム

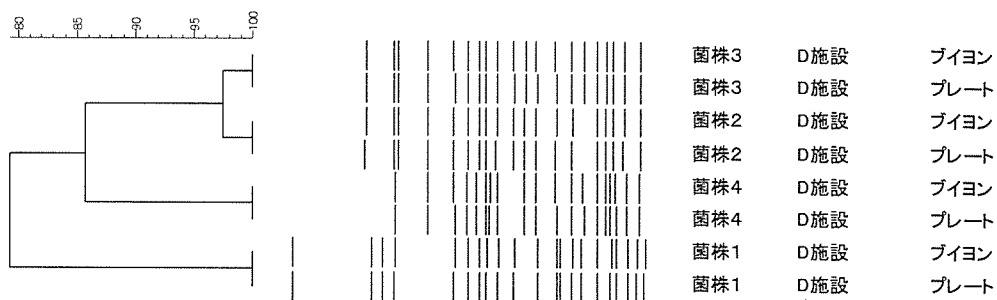


図 14 施設 D のデンドログラム



図 15 施設 E のデンドログラム

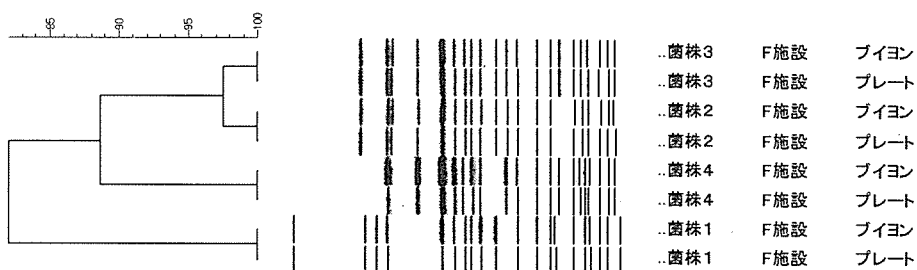


図 16 施設 F のデンドログラム

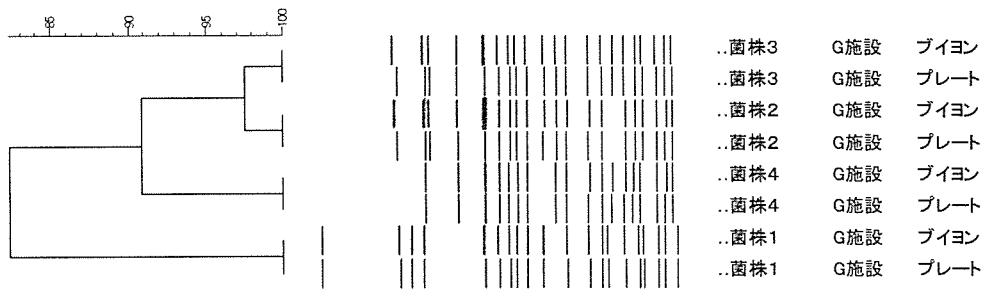


図 17 施設 G のデンドログラム

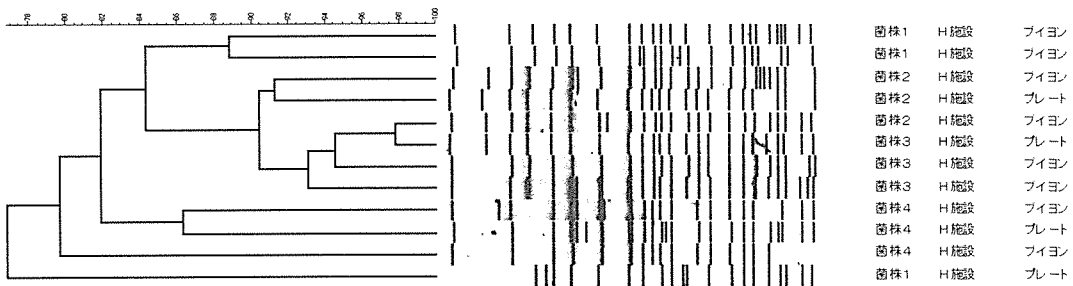


図 18 施設 H のデンドログラム

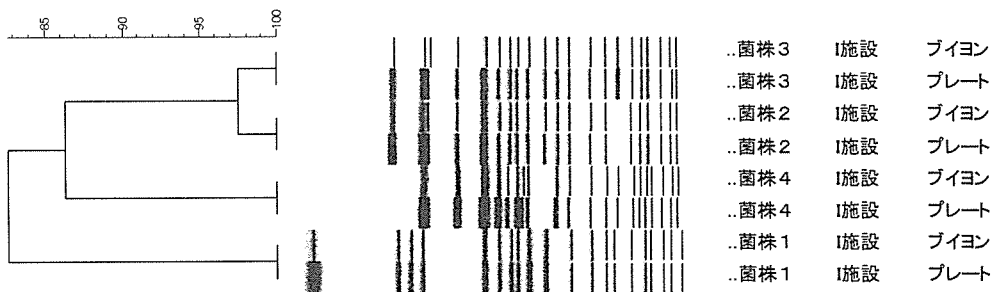


図 19 施設 I のデンドログラム

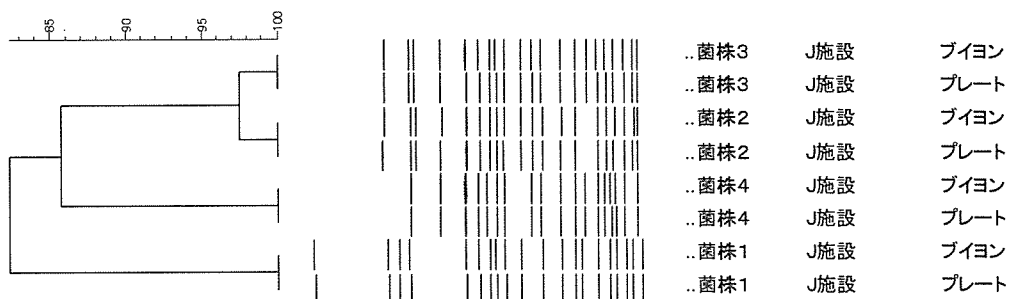


図 20 施設 J のデンドログラム

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
平成 18 年度分担研究報告書

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

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	榊美代子 大原祥子	広島県保健環境センター
	中嶋 洋 大島律子	岡山県環境保健センター
	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 谷脇 妙	高知県衛生研究所
	蔵田和正 笠間良雄	広島市衛生研究所

研究要旨

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために有効とされているパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）により解析された画像を基盤とした分散型システム（パルスネット）を構築するため、画像解析の精度管理とパルスネットの試行を実施した。

2006年に愛媛県内のウシから分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）の PFGE 画像（O157：H7、O157：HUT、O26：H11、O111：H-の画像）とヒトから分離された EHEC O157 の PFGE 画像を電子メールで中・四国地区内の 5 地方衛生研究所（地研）に送信した。この画像をもとに各施設の解析者が画像解析を行い、施設間変動の検討を行なう一方、各県・市で同時期に分離された EHEC の PFGE 画像との類異度を比較した。その結果、ウシ由来株とヒト由来株の PFGE 画像では同一のタイプは認められなかったが、広島市と広島県で分離されたヒト由来の O157：H7 と愛媛での分離株に同一の PFGE タイプを示す画像が確認された。今後、PFGE の手技および画像の解析精度を高めることにより本システムの信頼性が増すものと思われる。

A. 研究目的

パルスネットを構築し円滑に運用するには、PFGE の標準化と精度管理が必要とされている。中・四国地区の各地研では統一したプロトコールによる PFGE と定期的な精度管理を実施して来た。その結果、画像解析等いくつかの問題点が残るものの、各施設の画像作製技術は向上し、概ね良好な画像が作製できるようになった。今回は EHEC の PFGE 画像を電子メールで各施設に送信し、この画像を使用して、画像解析における施設間変動

の検討を行なった。さらに、各県・市で分離された菌株の画像とを解析・比較し、菌株間の異同を認識すること（パルスネットの試行）により、パルスネットの有効性と技術的問題点について検討した。

B. 研究方法

1. 参加施設

画像解析ソフトを保有する以下の 6 施設。
広島県保健環境センター、岡山県環境保健センター、愛媛県立衛生環境研究所、香川県環

境保健研究センター、高知県衛生研究所、広島市衛生研究所

2. 参照画像

2006年に愛媛県内のウシから分離されたEHEC 9株(O157:H7 4株、O157:HUT 1株、O26:H11 3株、O111:H- 1株)とヒトから分離されたEHEC 6株(O157:H7 5株、O157:H- 1株)のPFGE画像を参照画像(図1)とした。画像の作製方法は感染研ニュープロトコールに準拠し、制限酵素は*Xba*Iを用いて行なった。

愛媛県立衛生環境研究所で行なったPFGE画像のパターン解析では、ウシ由来の9株は9タイプに分かれた。また、ヒト由来の6株は4タイプであったが、このうち3株(ST9、ST10、ST11)は同一タイプであった(図1)。なお、ヒト由来の6株は国立感染症研究所(感染研)に送付し、PFGEを実施した結果、4タイプに型別された。同一タイプの3株はa259(感染研No)と型別された。

3. 画像解析

参照画像を電子メールで愛媛県立衛生環境研究所から各施設に送信した。各施設では解析者が画像解析ソフト(Fingerprinting II、Bio-Rad)を用いてウシ由来株とヒト由来株の各画像についてクラスター解析を行なった。さらに、同時期(2006年)に各県・市でヒトやウシから分離されたEHECについて、PFGE画像を作製し、提示された画像との類異度をクラスター解析で比較した。なお、各解析者は、画像のバンドを目視で補正し、デンドログラムタイプUPGMA、トレランス設定は最適化0%、トレランス1.2%でデンドログラムを作成した。

C. 研究結果

1. 各施設の画像解析の変動

提示されたウシ由来株とヒト由来株の画像

について6施設が画像解析を試みた。その結果、ウシ由来9株の画像では6施設とも各々9タイプに判読された。また、クラスター解析では、異なった3種類のデンドログラムに区別された(広島市、広島県、香川県は同形、岡山県と高知県は同形)(図2~7)。一方、ヒト由来6株の画像解析では、広島市、岡山県、香川県、愛媛県の各施設での解析では各々4タイプに判読され、クラスター解析でも4施設は同形のデンドログラムが示された(図8~11)。しかし、高知県と広島県の解析では、6株の画像は5タイプに判読され、デンドログラムも上記3施設とはそれぞれ異なった形であった(図12、13)。

2. 各県・市での分離株との比較

参照画像と各県・市で分離されたEHECのPFGE画像とを各施設で解析・比較した結果(図14~19)、ウシ由来株の画像パターンと同一の画像はいずれの施設でも認められなかった。しかし、ヒト由来のO157:H7 ST10、ST11株の画像は、広島市で分離されたヒト由来株10-N.T6021、13-N.T6025の画像パターンと同一であった(図14)。さらに、広島県で分離されたヒト由来株05-EH06-24の画像も愛媛で分離されたヒト由来株ST10、ST11の画像と一致した(図15)。

D. 考察

提示された画像を6施設で解析したところ、作製されたデンドログラムおよびクラスターの類異度に施設間の差異が見られた。これらの差異の生じる原因の一つは各解析者によって認識されるバンドの数、位置の違いによるものである。従来からの精度管理でも指摘されているように、分子サイズの小さい所ではバンドが薄くなり、大きい所では太すぎるため、バンドが認識されにくい。今回の画像解析でもこのような個所にバンドの未認識等が見ら

れた。一方、ヒト由来株の画像解析では、同形のデンドログラムを示した施設は4施設であったが、ウシ由来株では同形のデンドログラムは3施設で、クラスター間の類異度もヒト由来株の画像と比べ大きい傾向であった。これは、今回提示した画像が肉眼的に判断しても、ヒト由来株の画像よりウシ由来株の画像が不明瞭であったためと考えられ、画像の良否が解析結果に影響することを再確認した。

今回、画像が同一（a259）であった3株のうち2株（ST9、ST10）は平成18年7月に愛媛県M市内の親子から分離され、他の1株（ST11）は同じく7月に愛媛県U市で分離された。この2事例について、疫学調査の範囲内では直接の因果関係は無かったが、県内でのdiffuse outbreakも推察された。感染研からの情報ではa259と型別されたO157:H7は日本各地から分離されていたことから、広範囲なdiffuse outbreakも考えられたため、これらの菌株の画像も使用した。その結果、広島市、広島県で同一の画像の存在が確認され、画像を介したパルスネットシステムの有

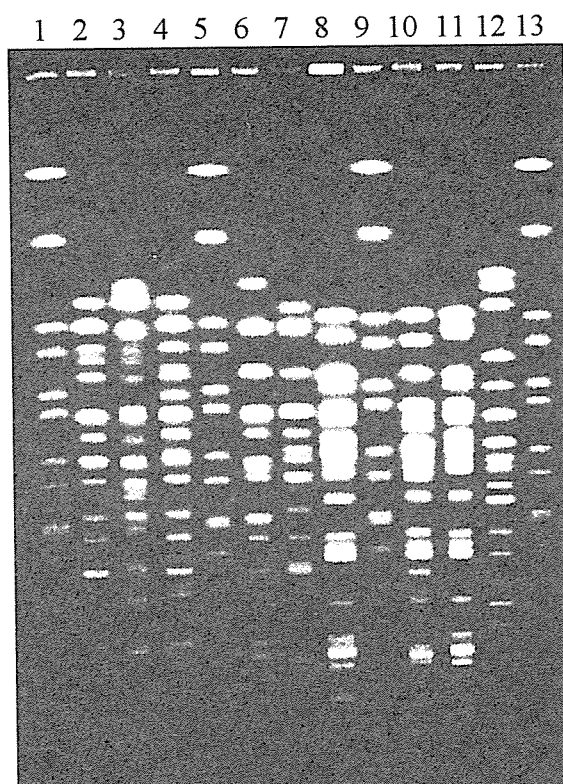
用性が示唆された。しかし、同一タイプとされた上記のような菌株間でも2施設の画像解析では類異度に差が生じた。今後、これらの問題点を改善し、画像の解析精度を高めることにより本システムの信頼性が増すものと思われる。

E. 結論

EHECのPFGE画像を電子メールで各施設に送信し、画像解析における施設間変動の検討を行なった。さらに、各県・市で分離された菌株の画像とを解析・比較し、菌株間の異同を認識することにより、パルスネットの有効性と技術的問題点について検討した。その結果、パルスネットは食品由来感染症等の広域流行の探知に有効であることが示唆された。今後、PFGEの手技および画像の解析精度を高めることにより本システムの信頼性が増すものと思われる。

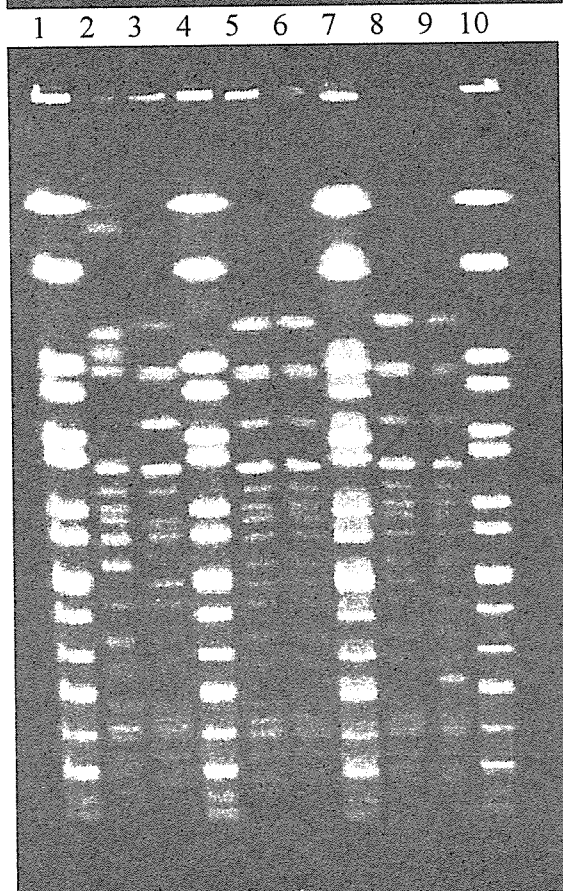
F. 研究発表

なし



EHEC ウシ由来株

- レーン 1 : マーカー
- レーン 2 : 295-1 O157 : H7
- レーン 3 : 295-2 O157 : HUT
- レーン 4 : 296-1 O157 : H7
- レーン 5 : マーカー
- レーン 6 : 303-1 O157 : H7
- レーン 7 : 366-1 O157 : H7
- レーン 8 : 349-1 O26 : H11
- レーン 9 : マーカー
- レーン 10 : 356-1 O26 : H11
- レーン 11 : 375-1 O26 : H11
- レーン 12 : 295-1 O111 : H -
- レーン 13 : マーカー

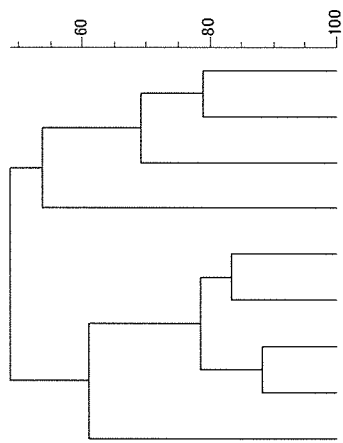


EHEC 人由来株

- レーン 1 : マーカー
- レーン 2 : ST5 O157 : H - (b 3)
- レーン 3 : ST8 O157 : H7 (b 188)
- レーン 4 : マーカー
- レーン 5 : ST9 O157 : H7 (a 259)
- レーン 6 : ST10 O157 : H7 (a 259)
- レーン 7 : マーカー
- レーン 8 : ST11 O157 : H7 (a 259)
- レーン 9 : ST12 O157 : H7 (b 193)
- レーン 10 : マーカー

図 1 各施設に送信したウシおよびヒト由来株の PFGE の参照画像

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_XbaI



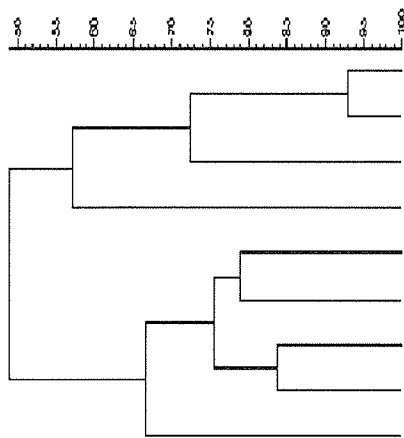
marker_XbaI



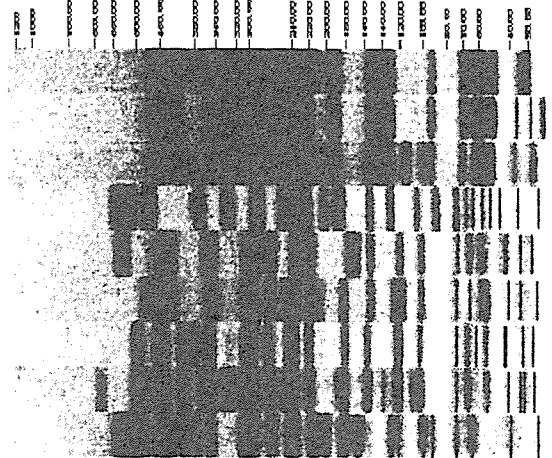
349-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
375-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
356-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
295-1	O111:H-	愛媛ウシ由来
303-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
366-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
295-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
296-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
295-2	O157:HUT	愛媛ウシ由来

図2 広島市衛生研究所で実施したウシ由来株の画像解析

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
EHEC,PFGE



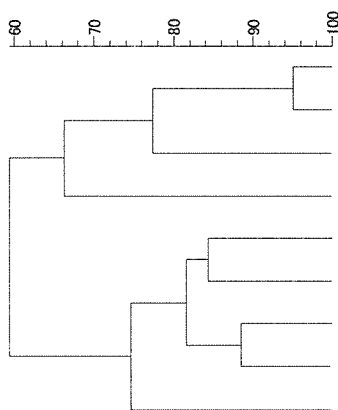
EHEC,PFGE



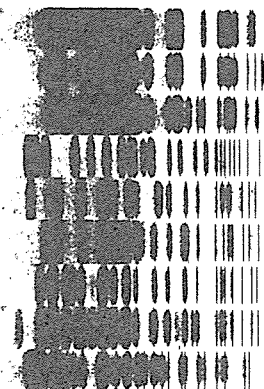
349-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
375-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
356-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
295-1	O111:H-	愛媛ウシ由来
303-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
366-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
295-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
296-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
295-2	O157:HUT	愛媛ウシ由来

図3 広島県保健環境センターで実施したウシ由来株の画像解析

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
STECO157



STECO157



349-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
375-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
356-1	O26:H11	愛媛ウシ由来
295-1	O111:H-	愛媛ウシ由来
303-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
366-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
295-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
296-1	O157:H7	愛媛ウシ由来
295-2	O157:HUT	愛媛ウシ由来

図4 香川県環境保健研究センターで実施したウシ由来株の画像解析

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE

PFGE

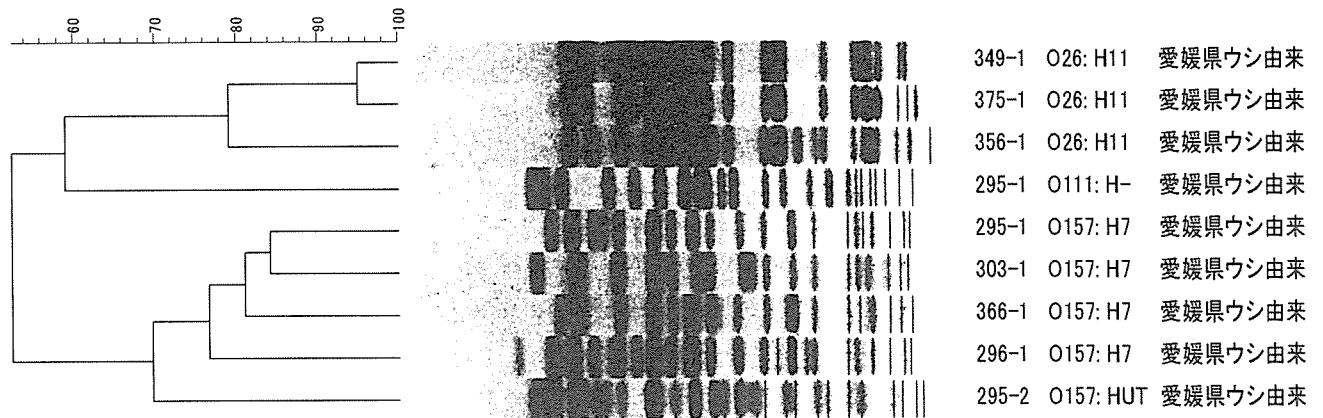


図5 岡山県環境保健センターで実施したウシ由来株の画像解析

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
愛媛 高知

愛媛 高知

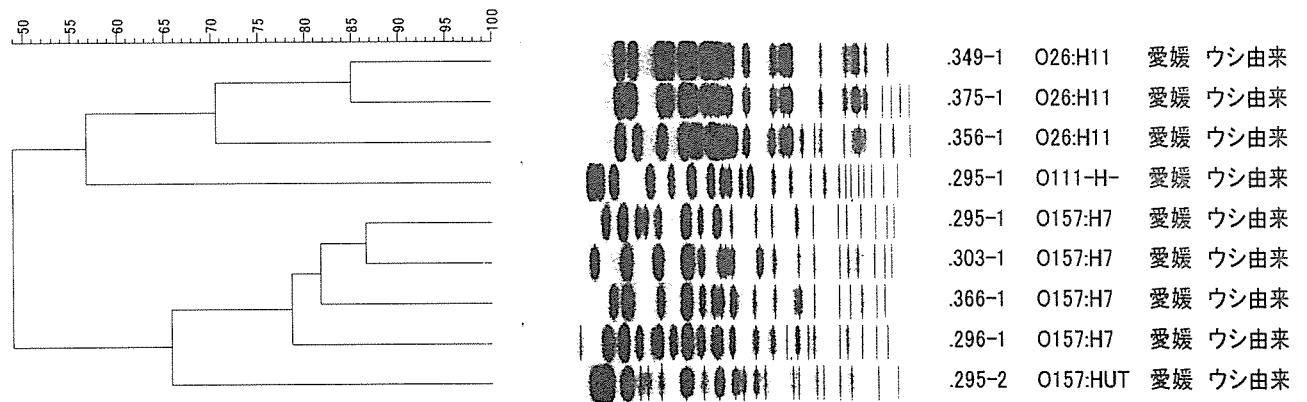


図6 高知県衛生研究所で実施したウシ由来株の画像解析

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
FPI

FPI

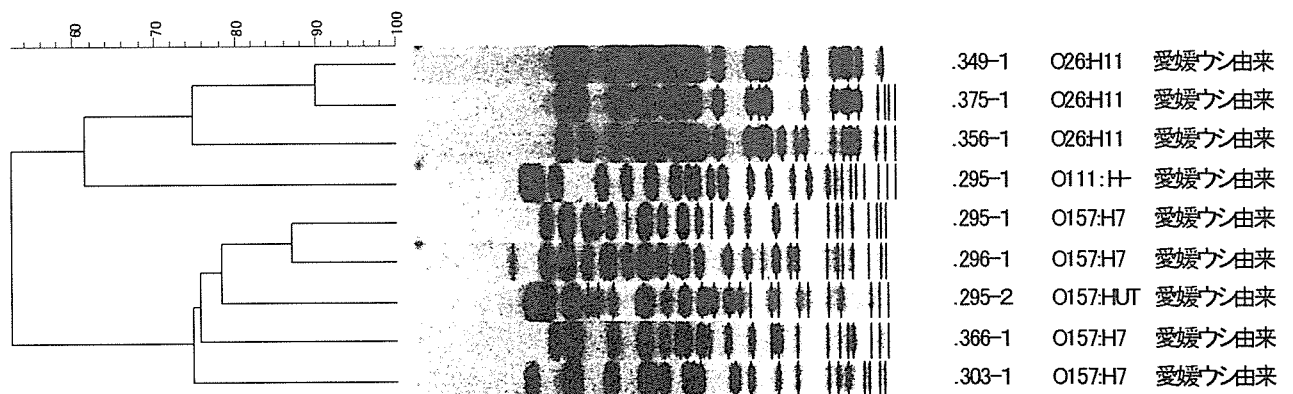
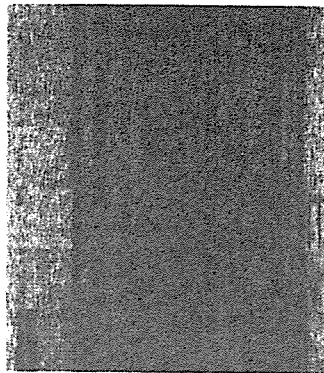
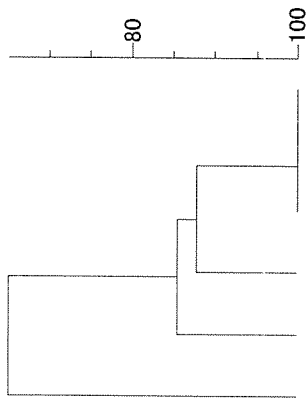


図7 愛媛県立衛生環境研究所で実施したウシ由来株の画像解析

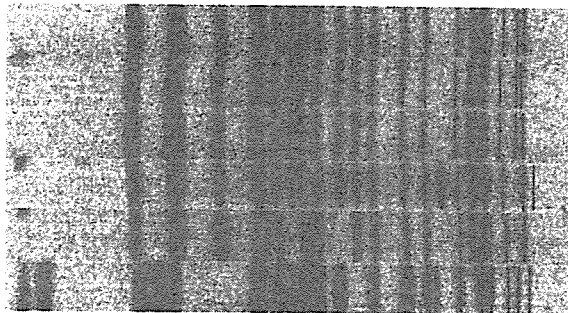
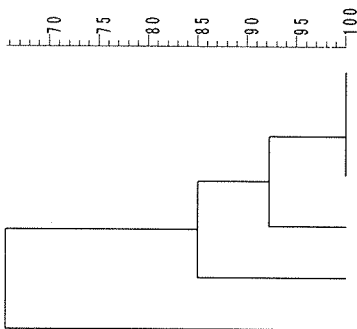
Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 marker_XbaI marker_XbaI



ST9	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST10	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST11	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST12	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST8	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST5	O157:H7	愛媛ヒト由来

図8 広島市衛生研究所で実施したヒト由来株の画像解析

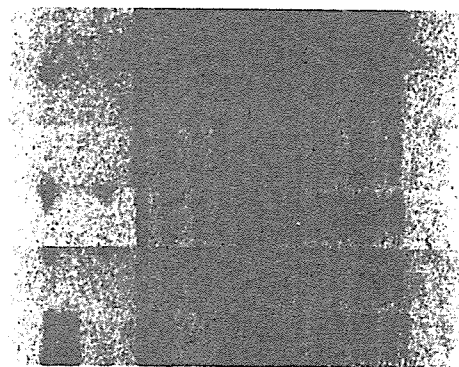
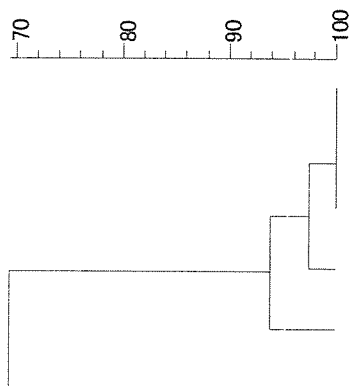
Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 PFGE



ST9	O157:H7	愛媛県ヒト由来
ST10	O157:H7	愛媛県ヒト由来
ST11	O157:H7	愛媛県ヒト由来
ST12	O157:H7	愛媛県ヒト由来
ST8	O157:H7	愛媛県ヒト由来
ST5	O157:H7	愛媛県ヒト由来

図9 岡山県環境保健センターで実施したヒト由来株の画像解析

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 STEC0157 STEC0157



ST9	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST10	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST11	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST12	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST8	O157:H7	愛媛ヒト由来
ST5	O157:H7	愛媛ヒト由来

図10 香川県環境保健研究センターで実施したヒト由来株の画像解析

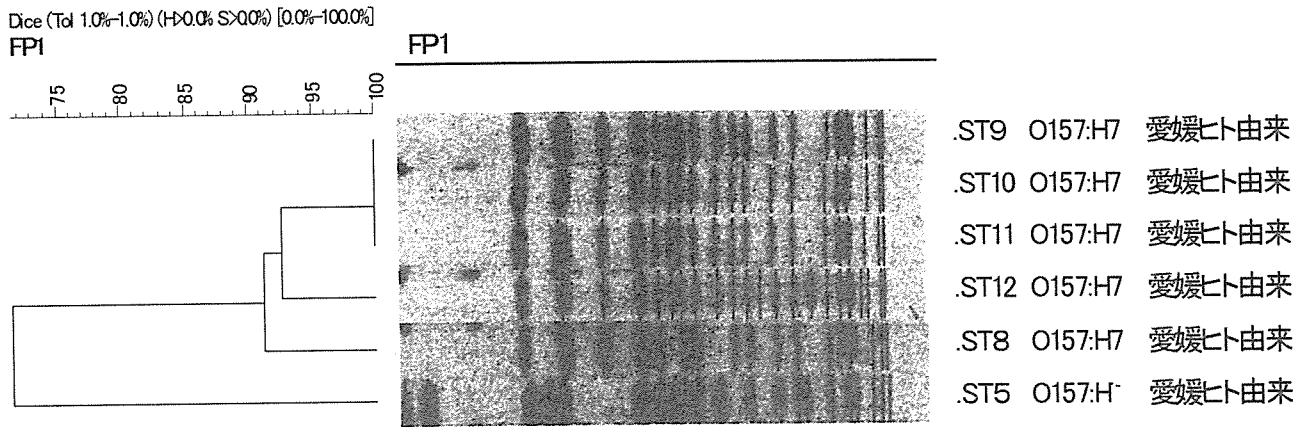


図 11 愛媛県立衛生環境研究所で実施したヒト由来株の画像解析

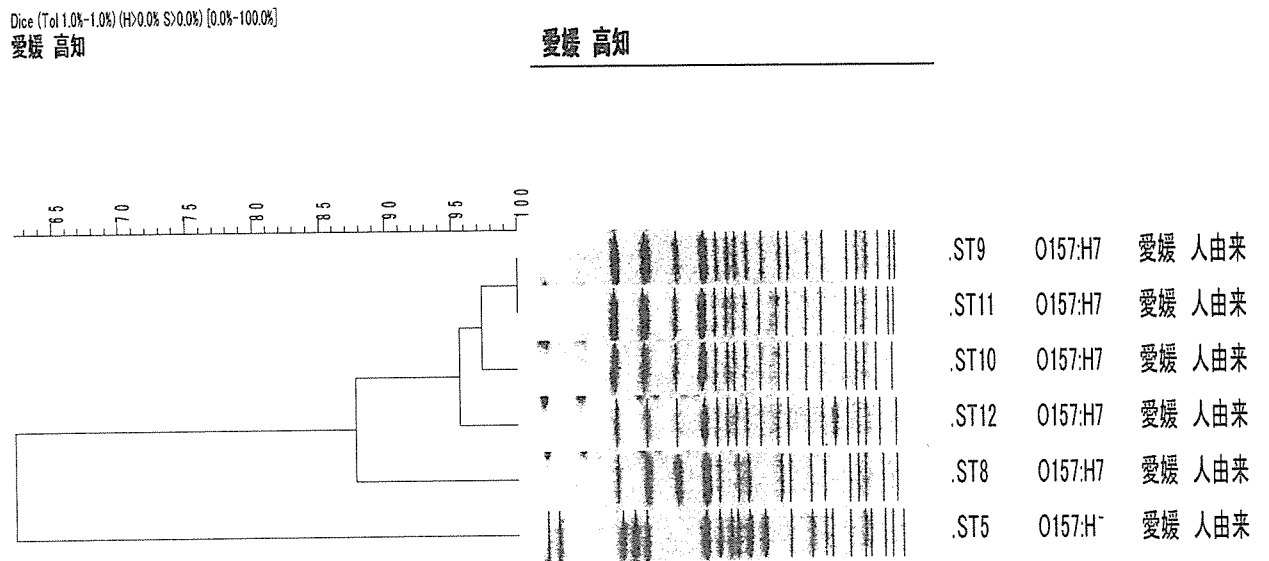


図 12 高知県衛生研究所で実施したヒト由来株の画像解析

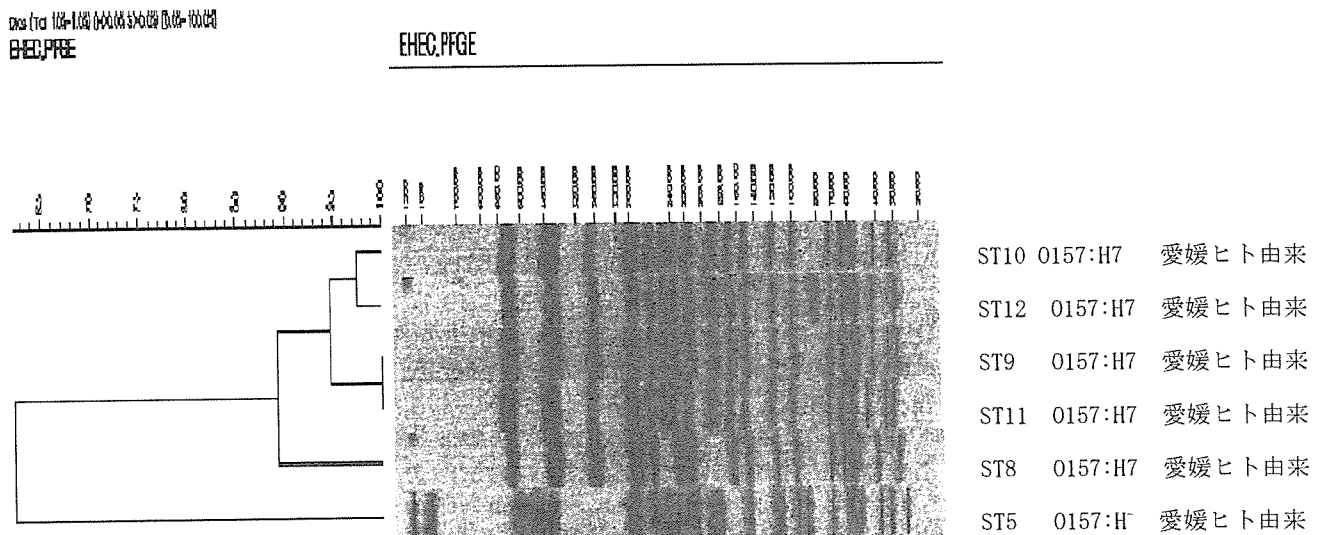


図 13 広島県保健環境センターで実施したウシ由来株の画像解析

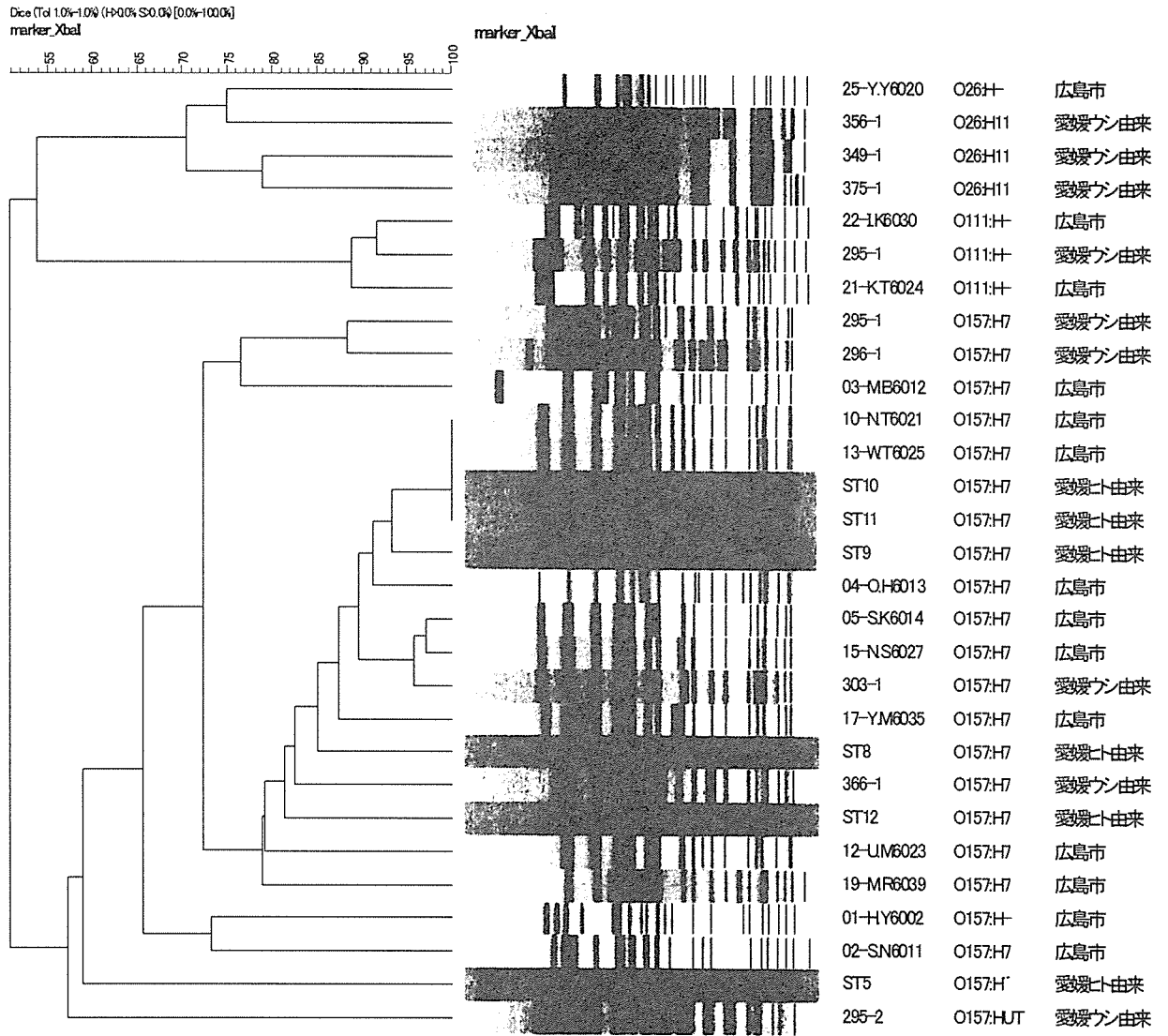


図 14 広島市で分離されたヒト由来 EHEC との画像解析比較

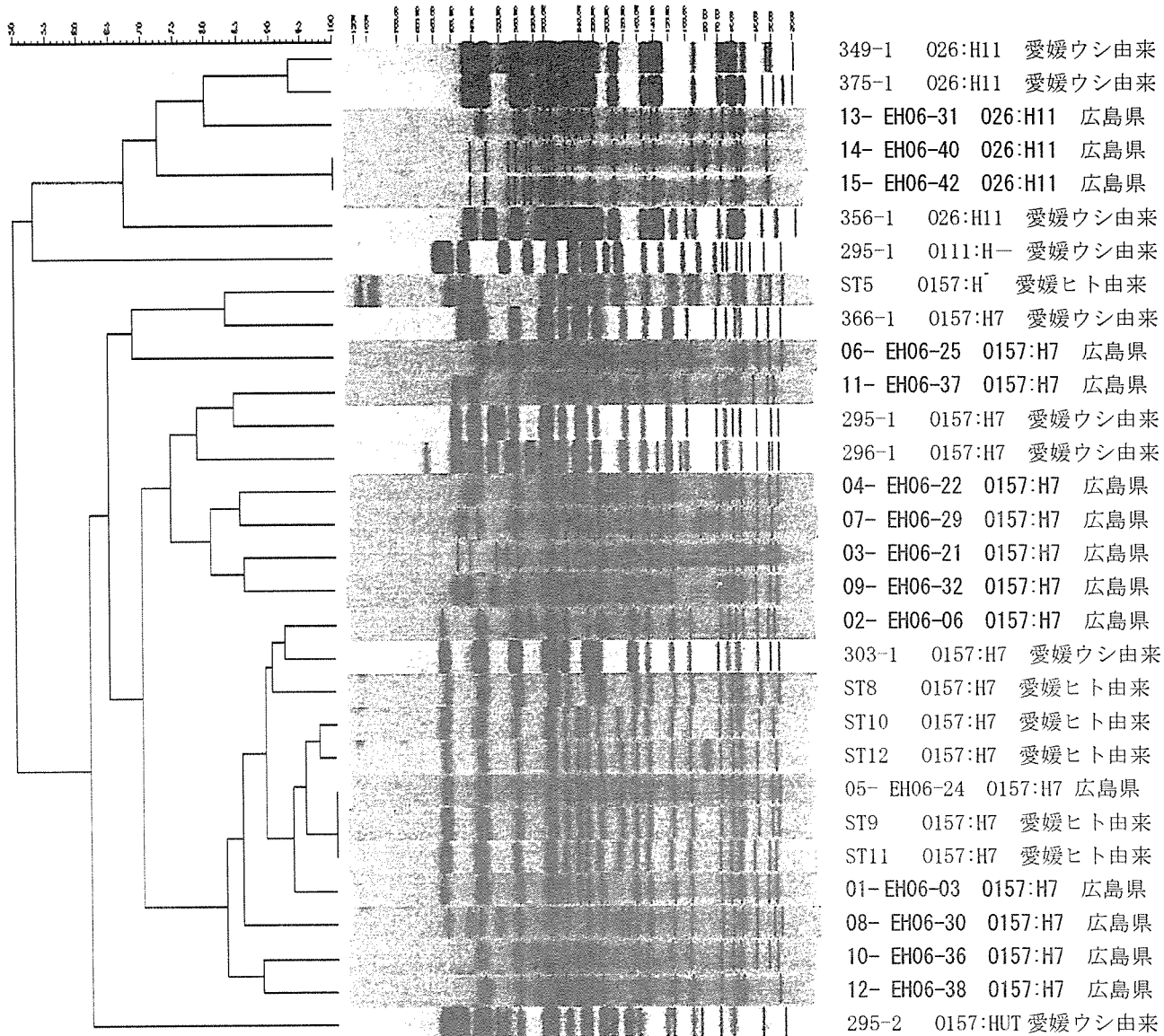


図 15 広島県で分離されたヒト由来 EHEC との画像解析比較

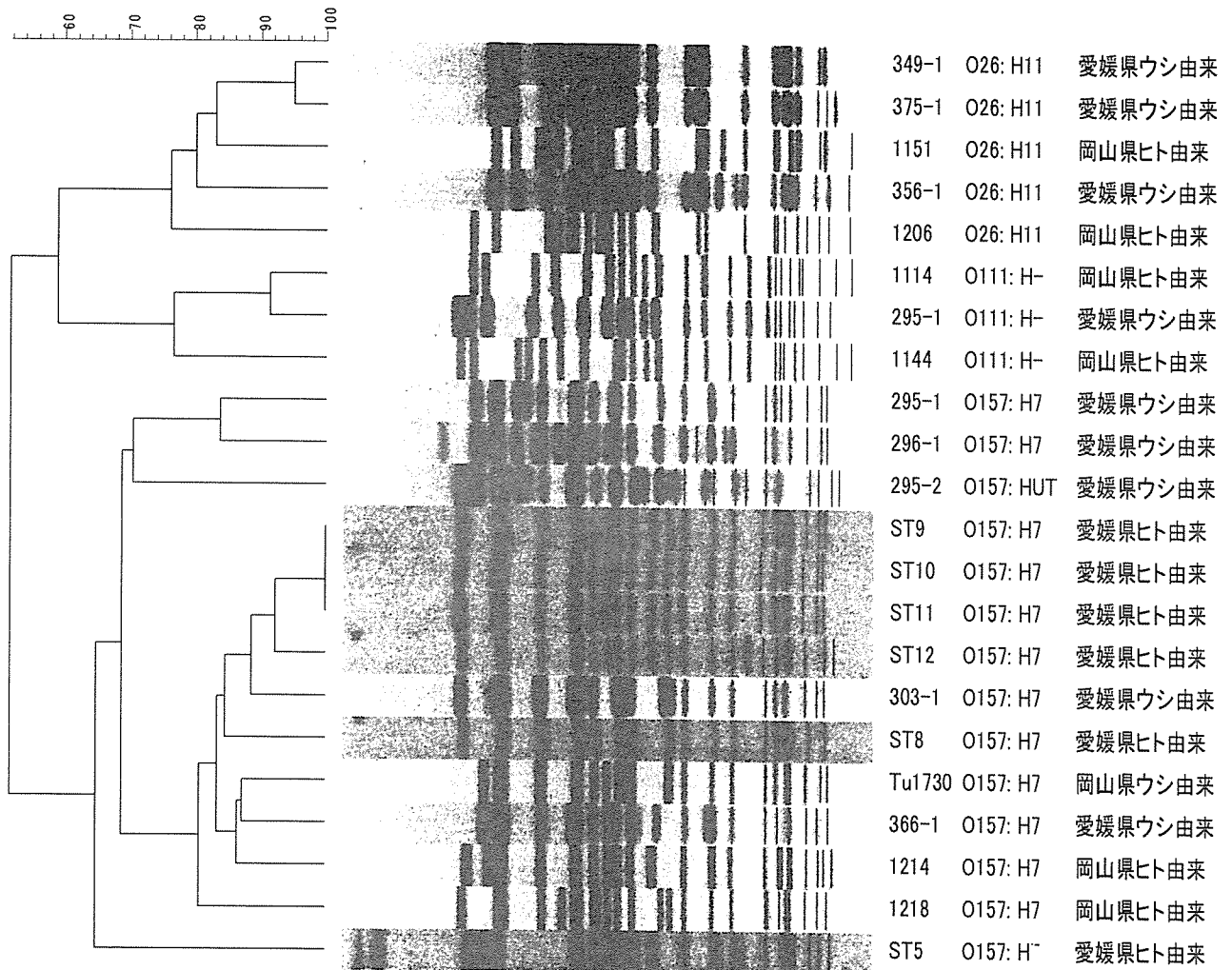


図 16 岡山県で分離されたヒトおよびウシ由来 EHEC との画像解析比較

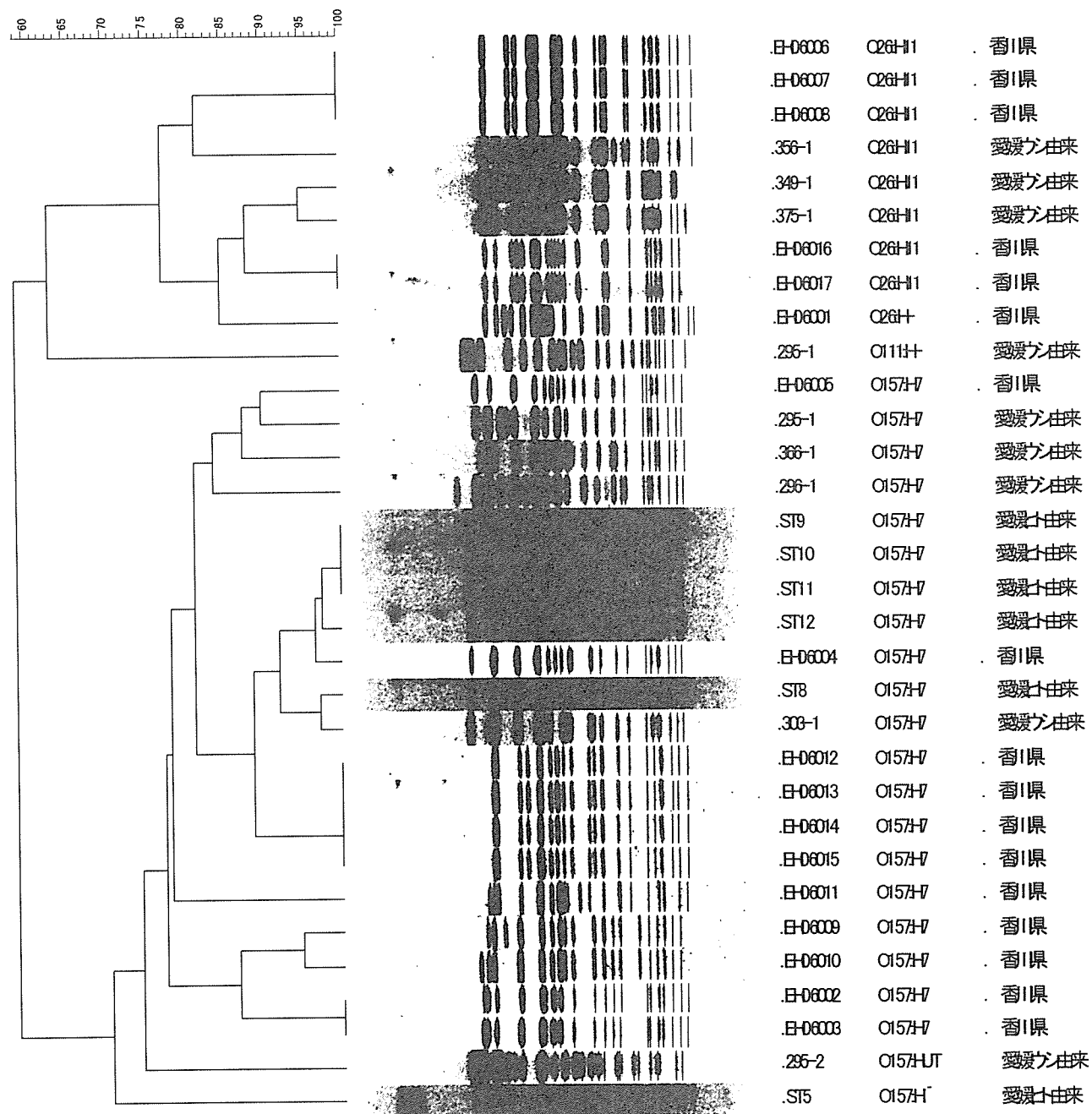


図 17 香川県で分離されたヒト由来 EHEC との画像解析比較

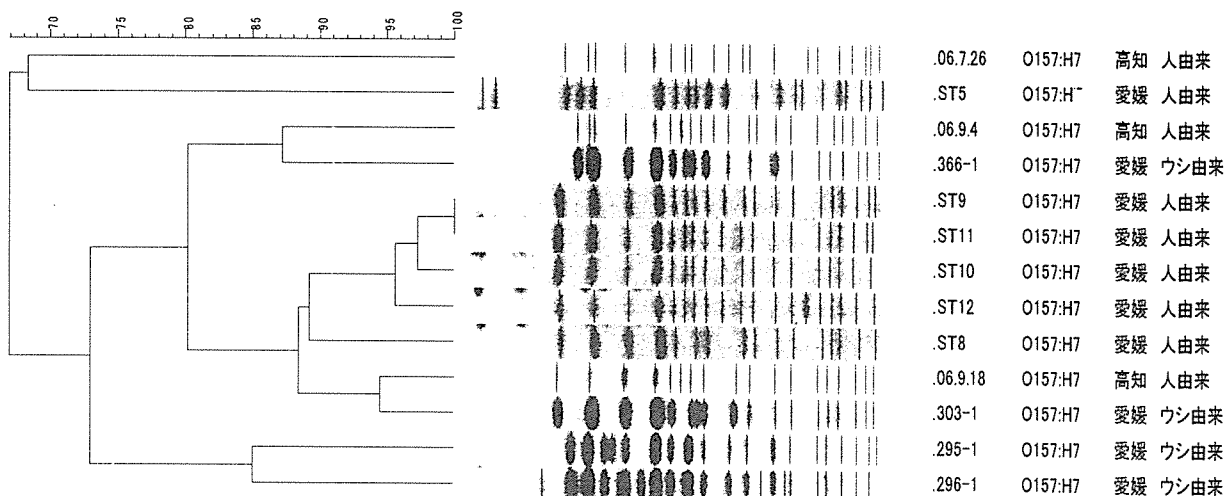


図 18 高知県で分離されたヒト由来 EHEC との画像解析比較

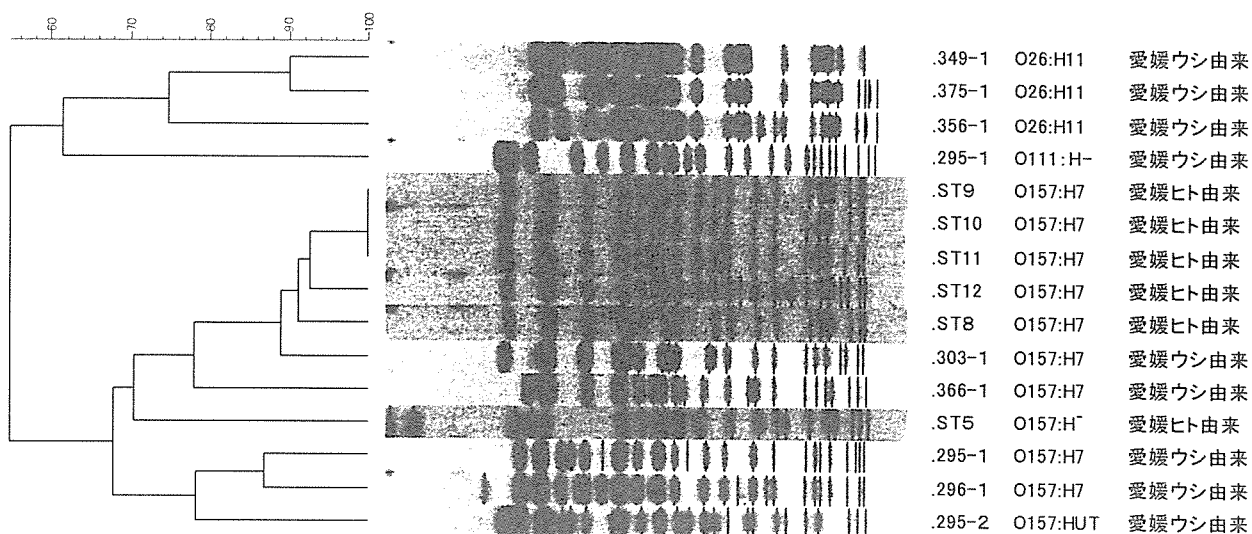


図 19 愛媛県で分離されたヒトおよびウシ由来 EHEC との画像解析比較

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-Printing System の検討

研究協力者 愛媛県立衛生環境研究所 青木紀子 吉田紀美 田中博

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 12 株について、マルチプレックス PCR による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法をキット化した IS-Printing System の検討を行い PFGE 法と比較した。その結果、9 事例 12 株は 9 タイプに分類され、PFGE と同等の解析が可能であると思われた。しかし、IS-Printing System では一部のプライマーの増幅バンドが不明瞭で判定に苦慮する場合があったことから、DNA 抽出および PCR の各段階で条件設定が必要であることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学的解析法として、現在制限酵素による DNA 切断パターンの比較によるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) が広く用いられているが、操作が煩雑であり、解析に 3 日間を要する。そこで近年、構造多形性を示すゲノム領域を標的とし、数時間で結果判定が可能であるマルチプレックス PCR 法による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法 IS-Printing System が開発された。この IS-Printing System の検討を行い、PFGE 法と比較した。

B. 研究方法

1 供試菌株

平成 17 年から 18 年 8 月までに愛媛県内で発生した 9 事例の患者から分離した 12 株を用いた。血清型はすべて O157:H7 で毒素型は VT 1 および 2 であった。

2 検査方法

・ IS-Printing System

試薬キット IS-printing System (東洋紡) を用い、添付のプロトコールに準じて行った。テンプレート DNA は、1mm のコロニーを 1 μ l エーゼでかきとり、50 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した後、熱処理を行った (図 1)。

・ PFGE 法

感染研ニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素は *Xba* I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、

パルスタイム 2.2-63.8 秒、泳動時間 19 時間でを行った。なお、供試した菌株は国立感染症研究所でも PFGE を実施した。

C. 研究結果と考察

IS-Printing System の電気泳動像 (図 2) から、1st primerMix17 種、2nd primerMix18 種の各プライマーに対する増幅生成物の有無を肉眼で確認後、有した場合を 1、無い場合を 0、判定困難を 2 として数値表記し、表 1、表 2 に示した。その結果をパターン化し、PFGE 型別と併せて表 3 に示した。

平成 17 年から 18 年に県内で発生した 9 事例 12 株の EHEC O157:H7 (VT1,2) は IS-Printing System により、A から I の 9 種類のパターンに分けられた。また、PFGE 法による DNA 解析の結果は、8 種類に型別された。このことから IS-Printing System は PFGE 法と同等の識別能を有することが明らかになった。

家族内発生 3 事例のうち、事例 3 (分離株④⑤) では PFGE 法において 2 バンドの違いであったが、IS-Printing System では 2 株ともに同一であり、パターン D であった。一方、事例 1 では患者家族からの分離株が同一の PFGE 型であったが、IS-Printing System において primer No.1-03, 1-04, 1-05, 2-03, 2-04 の検出バンドの有無に差があり、別のパターンに分類された。事例 6 においても同様に、IS-Printing System で異なるパターンとなった。