

れ事例内において同一パターンを示した(表 10)。PFGE のタイプ分けでタイプ ED に分類された事例 4、事例 5、事例 8 とタイプ EK に分類された事例 15、タイプ EA に分類された事例 9、事例 13 とタイプ EB に分類された事例 6 が IS-Printing System では同一パターンとなった。また、同じクラスターに分類されたが IS-Printing System で異なるパターンを示したものは、事例 1 の 2 菌株、タイプ ED に分類された事例 2 と事例 4、事例 5、事例 8、タイプ EA に分類された事例 9、事例 13 と事例 11、タイプ ED に分類された事例 2 と事例 17 と事例 4、事例 5、事例 8 であった(表 11)。

#### 6. 施設 F

PFGE によるタイプ分けの結果、FA～FG の 7 クラスターに分類された(図 5)。集団事例 1 はタイプ FA で、このうち 4 株については、感染研タイプ c442 であった。事例 2 はタイプ FB で感染研タイプ c642、事例 3 と事例 4 がタイプ FC で感染研タイプ b293、事例 5 がタイプ FD で感染研タイプ b219、集団事例 6 がタイプ FE で感染研タイプ c251 と FF で感染研タイプ c633 に分類され、家族内事例 7 がタイプ FG で感染研タイプ c630 と c631 であった。

IS-Printing System でも、同様に 7 パターンに分類され、事例 1 が F-C3DFD3EB、事例 2 が D-11095893、事例 3 と事例 4 が F-D3DFF7FB、事例 5 が F-9AA3C413、事例 6 が D-110B4883 及び D-110A488B、事例 7 が D-C69AC35B であった(表 12)。事例 7 の菌株 17 と菌株 18 は、同一クラスターに分類され、IS-Printing System のパターンも一致したものの、感染研タイプ分けでは、c630 と c631 にタイプ分けされた(表 13)。

#### 7. 施設 G

PFGE によるタイプ分けの結果、GA～GI の 9 クラスターに分類された。散发事例 1～8 は、それぞれ別のクラスターに分類され、家族内事例 9 は、同一のクラスターに分類された。

IS-Printing System でも、同様に 9 パターンに分類され、散发事例 1～8 はそれぞれ F-D35D703B、F-D3DF727B、F-F3DC723B、F-C3D5527B、

F-D3DF327B、B-D3DC727B、F-9FA56313、B-F3D578FB と別のパターンを示し、家族内事例 9 は F-D3DF78FB で同一のパターンを示し(表 14)、PFGE のタイプ分けとよく一致した(表 15)。

#### 8. 施設 H

PFGE によるタイプ分け(感染研)では、事例 1、事例 2 が b481、事例 3 が b705、集団事例 4 が b213、集団事例 5 が c389、c390、事例 6 が b423、事例 7 が c388、集団事例 8 が c495 に分類された。

IS-Printing System では、事例 1、事例 2 が F-F3DB523B で同一パターンを示し、事例 3、事例 6、事例 7 がそれぞれ F-F3DF723B、D-110B5093、D-9683C313 と異なるパターンを示した。また、集団事例 4 が F-93CF627A、事例 5 が D-928BC313、事例 8 が D-110B5092 とそれぞれ事例内菌株は同一パターンを示した(表 16)。

集団事例 5 において感染研タイプ分けでは c389、c390 に分類されたが、IS-Printing System では同一のパターンとなった。その他の事例については、感染研タイプ分けと IS-Printing System のパターンは良く一致した(表 17)。

#### 9. 施設 I

PFGE によるタイプ分け(類似係数: Dice、トランス設定: 2.3%、クラスター範囲: 90.0～100.0%)の結果、単一クラスターに分類された。また、事例 2、事例 4、事例 5、事例 8、事例 9 が類似性 100%であった(図 5)。

IS-Printing System では、事例 1、事例 2、事例 4、事例 5、事例 8、事例 9 が同一パターンの F-C3DB5276 であったが、事例 3 が F-D1DE7276、事例 6 が F-D3DFF276、事例 7 が F-735F7024 と、それぞれ異なるパターンとなった(表 18)。

PFGE において全事例が単一のクラスターに分類されたが、IS-Printing System のパターンでは事例 1、事例 2、事例 4、事例 5、事例 8、事例 9 のパターンと事例 3 のパターン、事例 6 のパターン、事例 7 のパターンの 4 パターンが認められた(表 19)。

#### 10. 施設間の比較

PFGE の感染研タイプ分けでは、施設 C の菌株 S2

と施設 D の菌株 1、菌株 2、菌株 3 が同じ c179 であったが、施設 C の菌株 S2 が F-01DB007B で施設 D の菌株 1、菌株 2、菌株 3 が F-C3DB527B と施設間で異なった。また、施設 D の菌株 7 と施設 F の菌株 6、菌株 7、菌株 8、菌株 9 が c442 であったが、施設 D の菌株 7 は F-C3DF527B、施設 F の 4 菌株は F-C3DFD3EB と施設間で異なった。

IS-Printing System において、施設 E の事例 14 と施設 H の事例 6 が D-110B5093、施設 A の事例 13 と施設 E の事例 3 が F-729BD23A、施設 D の事例 1、事例 2、事例 3 と施設 E の事例 4、事例 5、事例 8、事例 15 が F-C3DB527B、施設 A の事例 3、事例 15 と施設 B の事例 7、施設 E の事例 17、施設 G の事例 2 が F-D3DF727B、施設 E の事例 12、施設 H の事例 3 が F-F3DF723B でそれぞれ同一のパターンを示した。

#### D. 考察

今回の研究結果では、各集団事例内での IS-Printing System のパターンの一致度は高かった。集団発生事例において事例内で IS-Printing System のパターンが一致しなかったものは、施設 A の事例 6 と施設 F の事例 6 及び施設 D の事例 6 の 3 事例であった。このうち施設 A の事例 6 については、PFGE では同一のタイプ AK に分類されたが、IS-Printing System では、病原性関連遺伝子 hlyA のバンドの有無と、1<sup>st</sup>セットの 1-04 のバンドの有無の違いが認められた。事例 6 の菌株は、菌株 45 が患者便由来、菌株 46 が健康保菌者便由来であり、このことが、IS-Printing System でのパターンの違いに現れた可能性も示唆されるが、今後更に検討する必要があると思われる。施設 F の事例 6 については、事例内 3 菌株において菌株 14 及び菌株 15 が感染研タイプ分けで同一タイプ c251 に、菌株 16 が c633 に分類されており、IS-Printing System のパターン分けと一致していた。また、施設 D の事例 6 については感染研タイプ分けで全て異なるタイプに分類されたが、IS-Printing System のパターン分けでは、事例 7、事例 8 が同一パターンで、事例 9 が Stx2 遺伝子のバンドがないもの

の、その他の病原性関連遺伝子、IS エリアのパターンはこれらと同一であり、事例 10 は 1<sup>st</sup>セットの 1-16 のバンドの違いのみであった。これらのことから、IS-Printing System による菌株のタイプ分けは、集団発生事例において、有効であると考えられるが、IS-Printing System のパターンの違いと類似性については更に検討が必要であると思われる。

しかし、各事例間でのパターンを比較すると、施設 E の事例 1 と事例 2 の PFGE タイプ EJ、ED が IS-Printing System で F-D3DE527B と、事例 4、事例 5、事例 8 のタイプ ED と事例 15 のタイプ EK が、IS-Printing System で F-C3DB527B、施設 A の事例 3 と事例 15 のタイプ AD、AC が IS-Printing System で F-D3DF727B のように、IS-Printing System で同一のパターンを示し、PFGE のタイプ分けが異なったもの、また、反対に施設 A のタイプ AC の事例 11、事例 14 (F-D3DF527B)、事例 13 (F-729BD23A)、事例 15 (F-D3DF727B)、施設 A のタイプ AE の事例 12、事例 17 (F-D3DF527A)、事例 18 (F-D3CF727A)、施設 A のタイプ AK の事例 5 (7-10884000)、事例 6 (F-10929904、7-00929904)、事例 7 (F-93529904)、施設 B のタイプ BA の事例 5 (E-D3DB727A)、事例 7 (F-D3DF727B)、事例 8 (F-D3DFF27B)、事例 9 (E-D3DF727B)、施設 B のタイプ BD の事例 2 (F-1683C203)、事例 4 (F-9EA3C313)、施設 C のタイプ CA の事例 1 (F-01DF007A)、事例 2 (F-01DB007B)、事例 3 (3-015F0033)、施設 E のタイプ EA の事例 9、事例 13 (D-C29B7232)、事例 11 (D-C29B5232)、施設 E のタイプ ED の事例 2 (F-D3DF527B)、事例 4、事例 5、事例 8 (F-C3DB527B)、事例 17 (F-D3DF727B)、及び施設 I の事例 1、事例 2、事例 4、事例 5、事例 8、事例 9 (F-C3DB5276)、事例 3 (F-D1DE7276)、事例 6 (F-D3DFF276)、事例 7 (F-735F7024) のように PFGE のクラスター分けで同一クラスターに分類されたが、IS-Printing System で異なるパターンとなったものが認められた。PFGE のクラスター分けは、類似係数の選択とトレランス設定に

よって変化する場合があります、更に精査する必要があると思われる。施設間では、施設 E の事例 14 と施設 H の事例 6 が D-110B5093、施設 D の事例 1、事例 2、事例 3 と施設 E の事例 4、事例 5、事例 8、事例 15 が F-C3DB527B、施設 A の事例 3、事例 15 と施設 B の事例 7、施設 E の事例 17 及び施設 G の事例 2 が F-D3DF727B、施設 E の事例 12 と施設 H の事例 3 が F-F3DF723B で IS-Printing System のパターンが一致した。また、感染研タイプ分けの同じ菌株が施設間で IS-Printing System のパターンに相違が見られた。今回、PFGE タイプ分けを各施設で行ったため、検証するまでには至らなかったが、感染研タイプ分けの同じ菌株が IS-Printing System で異なるパターンを示したことなどから PFGE だけではなく IS-Printing System を併用することで、更に多くの情報が収集され、より正確な分子疫学的分析が可能になるのではないかと考えられた。

IS-Printing System の判定については、小さいサイズのバンドが不明瞭、バンドの濃淡による判定者間での差異、大きいサイズのバンドが重なり判定しづらい等の意見があった。原因としては、菌株、使用菌量、泳動時間等による差が考えられるが、今後、各施設でのプロトコール、装置、条件等の違いについて検証を行う必要があると考える。

IS-Printing System のデータは、1<sup>st</sup>セット 18 本、2<sup>nd</sup>セット 18 本の計 36 本のバンドをその有無により 1 と 0 に置き換えて比較する。この場合、少ない菌株数であれば、相違の確認も容易にできるが、菌株数が増えてくると相違の確認に手間取ってしまうばかりか、見落としなどの危険性も出てくる。今回、独自に IS-Printing System のデータをコード化し比較検討を行ったが、コード化することでデータを簡素化でき、また、比較検討が容易となった。今回のデータのコード化で用いた 16 進数は、0~9 と A~F を使って標記するコンピュータなどのデジタルデータを数値化するとき用いられ、デジタルデータを効率よく数値化するものである。IS-Printing System では、1<sup>st</sup>セット、2<sup>nd</sup>セットの IS エリアがそれぞれ 16 本のバンドで構

成され、更に病原性関連遺伝子が 4 本のバンドで構成されているため、これらを 4 本ずつまとめ、16 進数へ変換することで効率よくコード化することができた。また、病原性関連遺伝子の欠落、1<sup>st</sup>セット、2<sup>nd</sup>セットのどのバンドが有り、どのバンドが無いかなどをコードから判断できることから、単に数値化したものよりも有益であった。しかし、16 進数については、一般にあまりなじみがないことから、一般的な 10 進数を用いたコード化についても検討して行く必要があると思われる。

#### E. 結論

IS-Printing System での分子疫学的分析は、集団事例の事例内での相同性が PFGE とよく一致しており、短時間で行えること、操作が簡単で、広く普及している PCR ベースで行えることなどから、事例発生初期の段階での集団事例か散発事例かの判断材料として有用であると思われる。

散発事例については、PFGE よりも劣る場合と優れている場合があり、更に、事例を増やして、PFGE との比較検討を行う必要があると考える。

IS-Printing System の判定においてバンドが不明瞭等の問題が認められた。今後、菌株、使用菌量、使用機器、泳動時間等による差異について検証を行っていく必要があると思われる。

IS-Printing System のデータをコード化することで、その解析が容易になった。16 進数を用いたコード化は、9 桁の数値にバンドの有無の情報を含むことができるもので有用であると考えられるが、一般的な数値ではなく、一般的な 10 進数等でバンド情報を含むコードの生成を検討する必要があると思われた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

表 1-1 施設別供試菌株

施設	事例	発症年	菌株番号	血清型	毒素	由来	備考		
A	1	2007年	1	O157:H7	Stx2	Patient			
			2	O157:H7	Stx2	Patient			
			3	O157:H7	Stx2	Patient			
			4	O157:H7	Stx2	Patient			
			5	O157:H7	Stx2	Patient			
	2	2006年	6	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			7	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			8	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			9	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			10	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	3	2005年	11	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			12	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			13	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			14	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			15	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			16	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			17	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			18	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			19	O157:H7	Stx1.Stx2	Staff			
			20	O157:H7	Stx1.Stx2	Staff			
			21	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			22	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			23	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			24	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			25	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			26	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			27	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			28	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			29	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			30	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			31	O157:H7	Stx1.Stx2	Carrier			
			32	O157:H7	Stx1.Stx2	Carrier			
			33	O157:H7	Stx1.Stx2	Staff			
			34	O157:H7	Stx1.Stx2	Staff			
			35	O157:H7	Stx1.Stx2	Staff			
			36	O157:H7	Stx1.Stx2	Relatives			
			4	1996年	38	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	
					39	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	
					41	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	MUG(-)
					42	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	MUG(-)
					43	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	MUG(-)
			6	1996年	44	O157:H7	Stx1.Stx2	Swab	MUG(-)
					45	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	MUG(-)
			7	1996年	46	O157:H7	Stx1.Stx2	Carrier	MUG(-)
					47	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient	MUG(-)
			8	1998年	48	O157:H7	Stx1.Stx2	Carrier	MUG(-)
	49	O157:H7			Stx1.Stx2	Carrier	MUG(-)		
	50	O157:H7			Stx1.Stx2	Carrier	MUG(-)		
	9	2007年	51	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			52	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
			53	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	10	2007年	57	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	11	2007年	58	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	12	2007年	59	O157:H7	Stx1.Stx2	Carrier			
	13	2007年	60	O157:H7	Stx1.Stx2	Carrier			
	14	2007年	61	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	15	2007年	63	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	16	2007年	64	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	17	2007年	65	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
	18	2007年	66	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient			
				67	O157:H7	Stx1.Stx2	Patient		

表 1-2 施設別供試菌株

施設	事例	発生年	菌株番号	血清型	毒素	由来	備考
B	1	2007年	1	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c167
	2	2007年	2	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c163
	3	2007年	3	O157:H7	Stx2		感染研Type c162
	4	2007年	4	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c160
	5	2007年	5	O157:H7	Stx1,Stx2		
	6	2007年	6	O157:H7	Stx2		
	7	2007年	7	O157:H7	Stx1,Stx2		
	8	2007年	8	O157:H7	Stx1,Stx2		
	9	2006年	9	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b143
			10	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b189
			11	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b143
C	1	2007年	1	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c466
	2	2007年	2	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c179
	3	2007年	3	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c465
	4	2007年	4	O157:H-	Stx1,Stx2		感染研Type c458
	5	2007年	5	O157:H7	Stx2		感染研Type c471
D	1	2007年	1	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c179
	2	2007年	2	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c179
	3	2007年	3	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c179
			4	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c214
	4	2007年	5	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c221
	5	2007年	6	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c221
	6	2007年	7	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c442
			8	O157:H7	Stx1		感染研Type c494
			9	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c522
			10	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c523
E	1	2007年	2509	O157:H7	Stx1		
			2511	O157:H7	Stx1,Stx2		
	2	2007年	2513	O157:H7	Stx1,Stx2		
	3	2007年	2515	O157:H-	Stx1,Stx2		
	4	2007年	2518	O157:H7	Stx1,Stx2		
	5	2007年	2521	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2523	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2525	O157:H7	Stx1,Stx2		
	6	2007年	2527	O157:H-	Stx1,Stx2		
	7	2007年	2529	O157:H7	Stx1,Stx2		
	8	2007年	2531	O157:H7	Stx1,Stx2		
	9	2007年	2535	O157:H7	Stx2		
	10	2007年	2537	O157:H7	Stx1,Stx2		
	12	2007年	2635	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2639	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2641	O157:H7	Stx1,Stx2		
	13	2007年	2643	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2645	O157:H7	Stx2		
			2647	O157:H7	Stx2		
	14	2007年	2649	O157:H7	Stx2		
			2651	O157:H7	Stx2		
			2653	O157:H7	Stx2		
	15	2007年	2655	O157:H7	Stx1,Stx2		
	16	2007年	2657	O157:H-	Stx1,Stx2		
	17	2007年	2659	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2661	O157:H7	Stx1,Stx2		

表 1-3 施設別供試菌株

施設	事例	発生年	菌株番号	血清型	毒素	由来	備考
F	1	2007年	1	O157:H7	Stx1,Stx2		
			2	O157:H7	Stx1,Stx2		
			3	O157:H7	Stx1,Stx2		
			4	O157:H7	Stx1,Stx2		
			5	O157:H7	Stx1,Stx2		
			6	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c442
			7	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c442
			8	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c442
			9	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c442
	2	2007年	10	O157:H7	Stx2		感染研Type c642
	3	2007年	11	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b293
	4	2007年	12	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b293
	5	2007年	13	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type c219
	6	2007年	14	O157:H7	Stx2		感染研Type c251
			15	O157:H7	Stx2		感染研Type c251
			16	O157:H7	Stx2		感染研Type c633
	7	2007年	17	O157:H7	Stx2		感染研Type c630
			18	O157:H7	Stx2		感染研Type c631
G	1		1	O157:H7	Stx1,Stx2		
	2		2	O157:H7	Stx1,Stx2		
	3		3	O157:H7	Stx1,Stx2		
	4		4	O157:H7	Stx1,Stx2		
	5		5	O157:H7	Stx1,Stx2		
	6		6	O157:H7	Stx1,Stx2		
	7		7	O157:H7	Stx1,Stx2		
	8		8	O157:H7	Stx1,Stx2		
	9		9	O157:H7	Stx1,Stx2		
			10	O157:H7	Stx1,Stx2		
H	1	2007年	1	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b418
	2	2007年	2	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b418
	3	2007年	3	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b705
	4	2007年	4	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b213
			5	O157:H7	Stx1,Stx2		感染研Type b213
	5	2007年	6	O157:H7	Stx2		感染研Type c389
			7	O157:H7	Stx2		感染研Type c390
	6	2007年	8	O157:H7	Stx2		感染研Type c423
	7	2007年	9	O157:H7	Stx2		感染研Type c388
	8	2007年	10	O157:H7	Stx2		感染研Type c495
			11	O157:H7	Stx2		感染研Type c495
I	1	2007年	EC11999	O157:H7	Stx1,Stx2		
	2	2007年	EC12000	O157:H7	Stx1,Stx2		
	3	2007年	EC12010	O157:H7	Stx1,Stx2		
	4	2007年	EC12013	O157:H7	Stx1,Stx2		
	5	2007年	EC12017	O157:H7	Stx1,Stx2		
	6	2007年	EC12018	O157:H7	Stx1,Stx2		
	7	2007年	EC12021	O157:H7	Stx1,Stx2		
	8	2007年	EC12022	O157:H7	Stx1,Stx2		
	9	2007年	EC12027	O157:H7	Stx1,Stx2		



表3 施設AのPFGEタイプとISコード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード
			感染研Type No.	各施設別クラスター	
施設A	事例1	1		AA	D-C69BD23A
		2			
		3			
		4			
		5			
	事例2	6		AJ	F-F35F783B
		7			
		8			
		9			
		10			
	事例3	11		AD	F-D3DF727B
		12			
		13			
		14			
		15			
		16			
		17			
		18			
		19			
		20			
		21			
		22			
		23			
		24			
		25			
		26			
		27			
		28			
	29				
	30				
	31				
	32				
	33				
	34				
	35				
	36				
事例4	38		AI	F-19CB4282	
	39				
事例5	41		AK	7-10884000	
	42				
	43				
	44				
事例6	45		AK	F-10929904	
	46			7-00929904	
事例7	47		AK	F-93529904	
	48				
	49				
	50				
事例8	51		AH	F-93CB447B	
	52				
	53				
事例9	57		AF	F-F1DEF23B	
事例10	58		AB	F-C29B7232	
事例11	59		AC	F-D3DF527B	
事例12	60		AE	F-D3DF527A	
事例13	61		AC	F-729BD23A	
事例14	63			F-D3DF527B	
事例15	64			F-D3DF727B	
事例16	65		AG	F-D3DF727A	
事例17	66		AE	F-D3DF527A	
事例18	67			F-D3CF727A	



表 4 施設 B IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set																2nd set																ISコード						
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	ee	16	hyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	16	stx2	stx1		
施設B	事例1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DB521B
	事例2	2	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	F-1683C203	
	事例3	3	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	D-429B62A3	
	事例4	4	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	F-9EA3C313		
	事例5	5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	E-D3DB727A		
	事例E	6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	D-110A5093		
	事例7	7	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-D3DF727B		
	事例E	8	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-D3DF727B		
	事例9	9	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	E-D3DF727B		
		10	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	E-D3DF727B		
11		1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	E-D3DF727B			

表 5 施設 B の PFGE タイプと IS コード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード	
			感染研Type No.	各施設別クラスター		
施設B	事例1	1	c167	BB	F-C3DB521B	
	事例2	2	c163	BD	F-1683C203	
	事例3	3	c162	BC	D-429B62A3	
	事例4	4	c160	BD	F-9EA3C313	
	事例5	5		BA	E-D3DB727A	
	事例6	6		BE	D-110A5093	
	事例7	7			F-D3DF727B	
	事例8	8			F-D3DF727B	
	事例9	9		b143	BA	E-D3DF727B
		10		b189		
11			b143			

表 6 施設 C IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set																2nd set																ISコード				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	ee	16	hyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	16	stx2	stx1
施設C	事例1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	F-01DF007A	
	事例2	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	F-01DB007B	
	事例3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	3-015F0033
	事例4	4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	3-009B003A
	事例5	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1-010B0013

表 7 施設 C の PFGE タイプと IS コード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード
			感染研Type No.	各施設別クラスター	
施設C	事例1	S1	c466	CA	F-01DF007A
	事例2	S2	c179		F-01DB007B
	事例3	S3	c465		3-015F0033
	事例4	S4	c458	CB	3-009B003A
	事例5	S5	c471	CC	1-010B0013

表 8 施設 D IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set																2nd set																ISコード				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	ee	16	hyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	16	stx2	stx1
施設D	事例1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DB527B
	事例2	2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	F-C3DB527B
	事例3	3	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DB527B
		4	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DB527B
	事例4	5	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DE725E
	事例5	6	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DE725E
	事例5	7	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DF527E
		8	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DF527E
		9	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	E-C3DF527E
		10	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	F-C3DE527E



表 12 施設 F IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set																2nd set																ISコード			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	ere	hyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	16	st.2
施設F	事例1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	F-C3DFD3EB
		2	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB	
		3	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB	
		4	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB
		5	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	F-C3DFD3EB
		6	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB
		7	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB
		8	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB
		9	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-C3DFD3EB
	事例2	10	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	D-11095893	
	事例3	11	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	F-D3DFF7FB	
	事例4	12	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	F-D3DFF7FB	
	事例5	13	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	F-9AA3C413
	事例6	14	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	D-110B4883
		15	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	D-110B4883
	事例7	16	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	D-110A488B
		17	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	D-C69AC35B	
	18	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	D-C69AC35B	

表 13 施設 F の PFGE タイプと IS コード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード	
			感染研Type No.	各施設別クラスター		
施設F	事例1	1			FA	F-C3DFD3EB
		2				
		3				
		4				
		5				
		6				
		7				
		8	c442			
		9				
	事例2	10	c642	FB	D-11095893	
	事例3	11	b293	FC	F-D3DFF7FB	
	事例4	12				
	事例5	13	c219	FD	F-9AA3C413	
	事例6	14	c251	FE	D-110B4883	
		15				
	事例7	16	c633	FF	D-110A488B	
		17	c630			
	18	c631	FG	D-C69AC35B		

表 14 施設 G IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set																2nd set																ISコード		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	ere	hyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	16
施設G	事例1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	F-D35D703B	
	事例2	2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	F-D3DF727B	
	事例3	3	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	F-F3DC723B
	事例4	4	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	F-C3D5527B
	事例5	5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	F-D3DF327B
	事例6	6	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	B-D3DC727B
	事例7	7	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	B-9FA56313
	事例8	8	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	B-F3D578FB
	事例9	9	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	F-D3DF78FB
10	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	F-D3DF78FB	

表 15 施設 G の PFGE タイプと IS コード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード
			感染研Type No.	各施設別クラスター	
施設G	事例1	1		GA	F-D35D703B
	事例2	2		GB	F-D3DF727B
	事例3	3		GC	F-F3DC723B
	事例4	4		GD	F-C3D5527B
	事例5	5		GE	F-D3DF327B
	事例6	6		GF	B-D3DC727B
	事例7	7		GG	F-9FA56313
	事例8	8		GH	B-F3D578FB
	事例9	9			
10	10		GI	F-D3DF78FB	

表 16 施設 H IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set														2nd set														ISコード											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	13	14	15	16	sta2	sta1			
施設H	事例1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	F-F3DB523B			
	事例2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	F-F3DB523B			
	事例3	3	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	F-F3DF723B			
	事例4	4	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-93CF627A			
	事例5	5	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	F-93CF627A			
	事例6	6	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	D-928BC313		
	事例7	7	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	D-928BC313	
	事例8	8	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	D-110B5093	
	事例9	9	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	D-9683C313
	事例10	10	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	D-110B5092
	事例11	11	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	D-110B5092

表 17 施設 H の PFGE タイプと IS コード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード
			感染研Type No.	各施設別クラスター	
施設H	事例1	1	b481		F-F3DB523B
	事例2	2			
	事例3	3	b705		F-F3DF723B
	事例4	4			
	事例5	5	b213		F-93CF627A
	事例6	6			
	事例7	7	c389		D-928BC313
	事例8	8			
	事例9	9	c390		D-928BC313
	事例10	10			
	事例11	11	c495		D-110B5092
事例12	12				

表 18 施設 I IS-Printing System の結果

施設	事例	番号	1st set														2nd set														ISコード									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11	12	13	14	15	16	sta2	sta1	
施設I	事例1	EC11999	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	F-C3DB5276	
	事例2	EC12000	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	F-C3DB5276	
	事例3	EC12010	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	F-D1DE7276	
	事例4	EC12013	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	F-C3DB5276	
	事例5	EC12017	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	F-C3DB5276
	事例6	EC12018	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	F-D3DFF276	
	事例7	EC12021	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	F-735F7024	
	事例8	EC12022	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	F-C3DB5276
	事例9	EC12027	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	F-C3DB5276

表 19 施設 I の PFGE タイプと IS コード

施設	事例	番号	PFGE		ISコード
			感染研Type No.	各施設別クラスター	
施設I	事例1	EC11999	IA		F-C3DB5276
	事例2	EC12000			
	事例3	EC12010			F-D1DE7276
	事例4	EC12013			F-C3DB5276
	事例5	EC12017			
	事例6	EC12018			F-D3DFF276
	事例7	EC12021			F-735F7024
	事例8	EC12022			F-C3DB5276
	事例9	EC12027			



Dice (Tot 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
PFGE

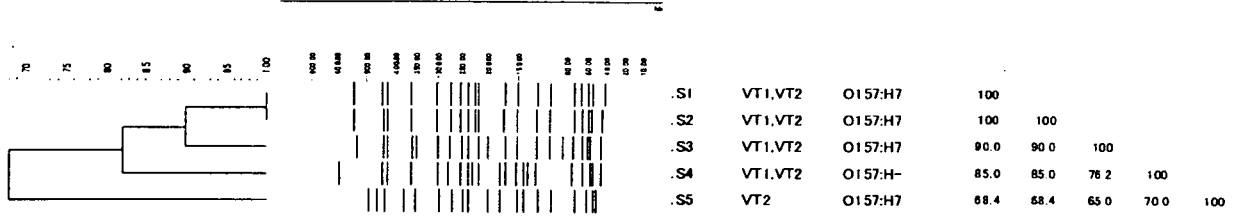


図3 施設C デンドログラム

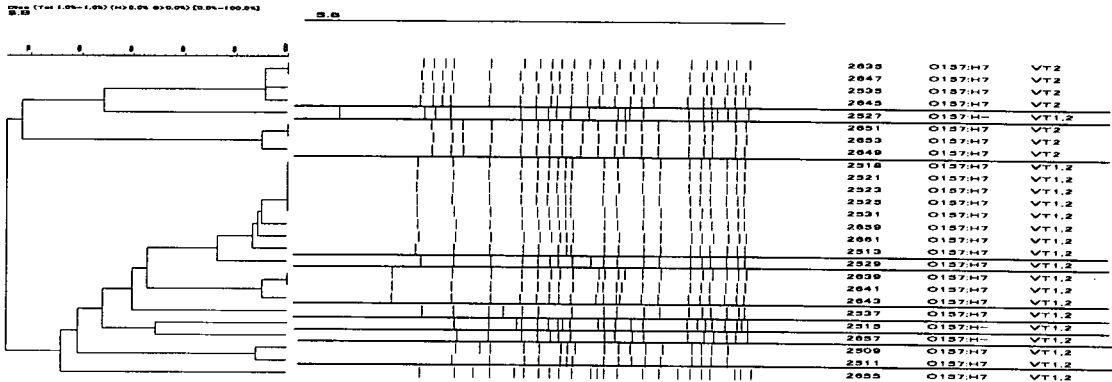


図4 施設E デンドログラム

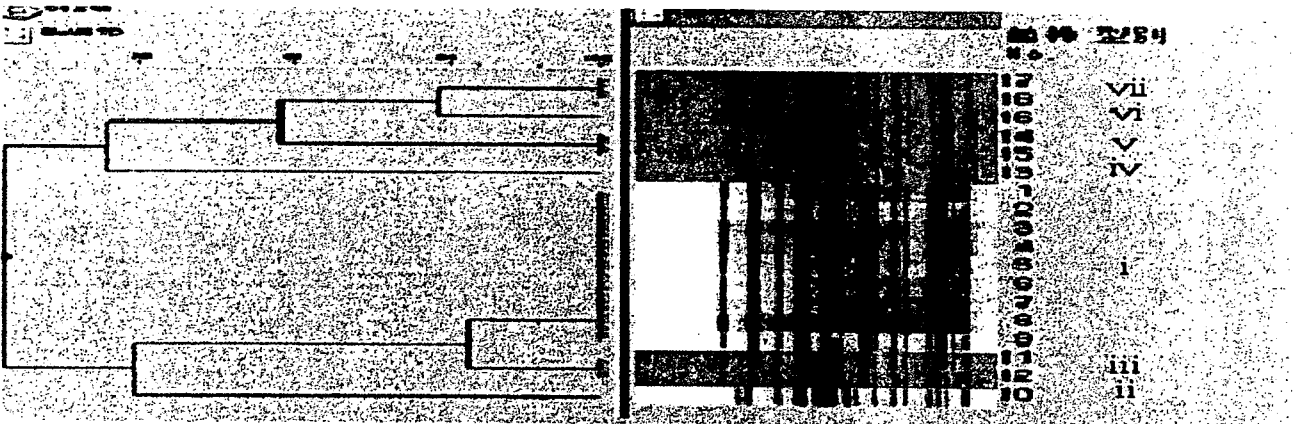


図5 施設F デンドログラム

Dice (Tot 2.3%-2.3%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
XbaI PFGE

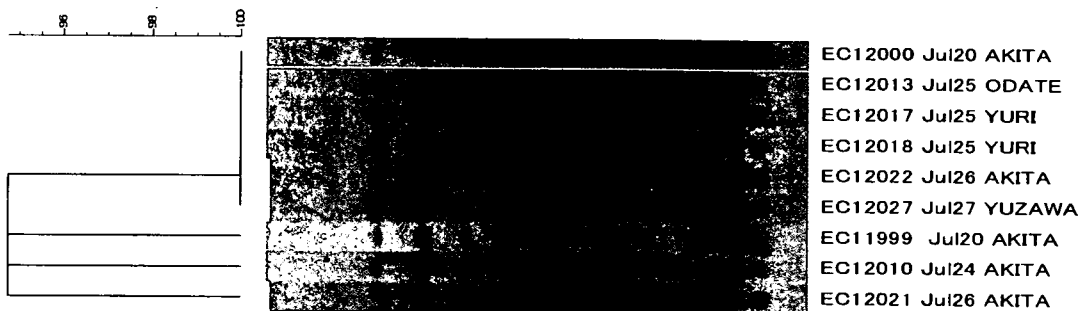


図6 施設I デンドログラム

厚生労働科学研究費補助金（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19年度 分担研究報告書

関東ブロックにおける PFGE 法の精度管理および PFGE 以外の  
解析方法の検討

分担研究者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
協力研究者	土井 育子	茨城県衛生研究所
	舩渡川 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
	石原ともえ	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	野田 裕之	山梨県衛生公害研究所
	小山 敏枝	長野県環境保全研究所
	廣井 みどり	静岡県環境衛生科学研究所
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	小西 典子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株を用いて、各地研で感染研プロトコールに従い、ほぼ同じ条件下で PFGE 解析を行った後、成績を東京都健康安全研究センターに電送して解析ソフトを用いて解析を試みた。その結果、いずれの地研で解析した場合においても非常に類似度が高く、技術力が均一化してきていることが確認された。今年度は写真の取り込みの際の解像度をなるべく統一して行ったが、解析のし易さ等に差異は認められなかった。

IS-Printing system 解析法（IS 法）は PFGE 成績とも非常に良く相関し、有用な方法であることが確認された。各地研へのアンケートの結果でも、IS 法は簡便であり、PFGE 法に代わる手法として非常に期待できるという結果であった。また、異なる施設間で、菌株の相同性を比較する場合は、PFGE 画像を電送し比較するよりも容易であることが示唆された。しかし、結果の解釈に迷う場合も認められ、これらの問題点を解決することが必要であることが示唆された。

## A. 研究目的

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラ等の集団発生や散在的集団発生の感染源究明に利用されており、その有用性が確認されている。より迅速に散在的集団発生を見つけ、感染源を究明していくためには、迅速で正確な分子疫学的解析が必要である。そのためには、各地方衛生研究所で行う PFGE 解析法の技術レベルが常に一定でなくてはならない。

本研究では、関東ブロック 11 地方衛生研究所を対象に、PFGE 法の技術向上のための精度管理を行った。また、PFGE 法以外の分子疫学解析法として、宮崎大学・林哲也教授らのグループによって開発された IS-Printing system 解析法 (IS 法) を実施し、その有用性および PFGE パターンとの相関性等について検討した。

## B. 研究方法

### 1. PFGE 法技術向上のための精度管理

#### 1) 供試菌株

各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として、2007 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 5 株 (VT1+VT2 産生株 3 株および VT2 産生株, 2 株) を供試した。

#### 2) 感染研プロトコールによる PFGE 解析

ブロックの作製 : 0.7mm プラグキャスターを使用し、SeaKem Gold Agarose (TAKARA, 1%) で作製した。使用する

菌の濃度は各施設の方法で行った。

DNA 抽出法 : 1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) で 50°C, 18~20 時間行った。

制限酵素処理 : EHEC は制限酵素 *Xba* I で、サルモネラは制限酵素 *Xba* I および *Bln* I を用いた。

電気泳動用アガロース : 電気泳動用アガロースは SeaKem Gold Agarose (1%) を使用した。

泳動条件 : EHEC は、6V/cm, 2.2sec ~54.2sec, 20 時間, buffer 温度 12°C で行った。泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの下から 1 cm~1.5 cm になるように、各施設で調整した。サルモネラは、6V/cm, 2.2sec~63.8sec 20 時間, buffer 温度 12°C で行った。

サイズマーカ : *S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したものを用いた。

PFGE 写真の撮影 : ウェルからゲルの先端までを、できるだけ大きく撮影するようにした。

PFGE 写真の取り込み : PFGE 写真をスキャナー等で読み込む際、出力解像度が 500~600dpi 程度となるように設定し読み込んだ。

PFGE 解析成績の電送 : 各地研で解析した PFGE 画像を電子メールで送付した。

3) 画像解析 : 11 施設から送付された PFGE 画像を対象に、画像解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いてデンドログラム解析を行った。

### 2. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例および散発事例への応用



各地研で分離された腸管出血性大腸菌について PFGE 解析を行い、有用性を検討した。

### 3. サルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

各地研で分離されたサルモネラについて PFGE 解析を行い、有用性を検討した。

### 4. IS-Printing System 解析

#### 1) サンプル DNA 調整法の検討

泳動後に鮮明でシャープなバンドを得るためには、サンプルの DNA 量を一定にすることが必要である。そこで、液体培地 (TSB) で 37°C, 18~20 時間培養液からサンプル調整を行い、バンドの濃さや太さを比較し、最も安定したバンドが得られる方法について検討した。DNA 抽出は、アルカリ抽出法で行った。すなわち菌を 25mM NaOH 液 50  $\mu$ l に懸濁し、100°C, 10 分間加熱後、50  $\mu$ l の 1M Tris-HCl (pH7.0) で中和した。

#### 2) IS-Printing System 解析と PFGE パターンの相関性の比較

関東ブロック 5 施設にキットを配布し、各地研で分離された 0157 株 20 株以上について IS 解析を行い、PFGE パターンと比較した。

#### 3) IS-Printing System の評価

IS 解析について別紙のアンケートを実施し、意見・感想をまとめた。

### C. 研究結果

#### 1. PFGE 法技術向上のための精度管理

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 5 株を用いて、11 施設 (施設 1~11) で行った PFGE 画像を写真 1 に示した。各施設ともバンドの分離が良く、非常にシャープであり、解析の基準として適していることが確認された。

各地研から電送された PFGE 画像をもとに、デンドログラム解析を行った成績を図 1 に示した。11 施設中 1 施設は、サイズマーカーのバンドが一部欠損しており、解析ができなかった。サイズマーカーバンドの欠損原因については、現在究明中である。

各施設 5 菌株をそれぞれ 2 レーンで泳動した。いずれも、菌株ごとにクラスターを形成していた。類似度をみると、菌株 No. 1 では 9 施設で 100% 一致となったが、1 施設が 95% であった。その他の菌株でも、類似度はいずれも 90% 以上であったが、菌株 No. 2, No. 3, No. 5 では、施設ごとにバラツキが認められた。菌株によっては、500kb 付近に太いバンドが出現するが、このバンドを 1 本と判定するか、2 本と判定するか判定が困難な写真が数施設あった。また、180~310kb 付近のバンドが非常に細かいためバンド同士がつながってしまい、バンドの選択が困難であった。

前年度、写真が不鮮明なために、バンドの選択が困難であった施設があったため、今年度は写真を取り込む際に、500~600 dpi 程度の解像度で読み込むようにした。しかし、類似度や

バンド選択の容易さ等に大きな差異は認められなかった。

## 2. 腸管出血性大腸菌の PFGE 解析の応用

5 地研で経験した腸管出血性大腸菌による食中毒事例から分離された菌株について PFGE 解析を行った成績を別紙 1 に示した。患者発生が他県にまたがる事例では、疫学情報の共有と PFGE 解析が有効に活用されたため、迅速に対応することができた（群馬県、横浜市）。

## 3. サルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

4 地研で経験したサルモネラ血清型 Enteritidis による食中毒事例および血清型 Typhimurium による食中毒事例から分離された菌株について PFGE 解析を行った成績を別紙 2 に示した。患者由来株と検食由来株の PFGE パターンが一致したことから感染源が解明された事例があった（長野県）。

## 4. IS-Printing system 解析

### 1) サンプル DNA 調整法の検討

0157 を TSB に接種し 37°C 18~20 時間培養後、滅菌生理的食塩水で 10 倍、100 倍に希釈した。希釈した菌液 100  $\mu$ l を 12,000rpm で遠心後、沈渣に 50  $\mu$ l のアルカリ (25mM・NaOH) を加え 100°C 10 分間加熱して DNA の抽出を行った後、50  $\mu$ l の 1M Tris-HCl (pH7.0) で中和したものをテンプレートとして PCR 反応を行った。電気泳動後の写

真を比較した結果、菌液の 10 倍希釈液を用いた場合の方が、100 倍希釈液を使用した場合と比較してバンドの太さ・濃さが一定であった。検体間にバラツキは無く、いずれも判定し易いバンドであった（写真 2：A~D）。

### 2) IS-Printing System 解析と PFGE パターンの相関性の比較

関東ブロック 5 施設 (A~E) において、各施設 20 株以上の 0157 について IS 解析を行い、PFGE パターンと比較した（表 1）。A 施設では 26 株を実施し、IS では 10 パターン、PFGE では 9 パターンに分類された。B~E 施設では各 20 株を実施し、B 施設では IS 8 パターン、PFGE 9 パターン、C 施設では IS 10 パターン、PFGE 18 パターン、D 施設では IS 16 パターン、PFGE 20 パターン、E 施設では IS 10 パターン、PFGE 18 パターンに分類された。

いずれの施設でも PFGE 型の方が細かい型別が可能であった。

PFGE パターンと IS パターンの相関性をみると、PFGE パターンが全く異なる場合は IS パターンも異なり、両者は非常に良く相関していた。しかし、同一集団事例で、同じ PFGE パターンを示した株でも IS パターンが異なる場合や、PFGE パターンが異なる場合でも同じ IS パターンを示した場合がそれぞれ一部に確認された。

PFGE 型が c47 であった株が 4 施設で分離されており、うち 3 施設で同じ IS パターンであった。異なる施設間で、菌株の相同性を比較する場合は、PFGE

画像を電送し比較するよりも容易であることが示唆された。

### 3) IS-Printing System の評価

IS 解析についてのアンケート結果を表 2 にまとめた。試薬の調整や PCR 反応そのものについては、比較的簡便であり問題はなかった。電気泳動時間は 60 分が 3 施設、75 分、90 分、7 時間が各 1 施設と、施設により異なっていた。PFGE パターンとの相関性については 5 施設で相関性ありと回答し、4 施設が PFGE 法に代わる手法として期待できるとした。しかしバンドが多くて読みにくい、2nd set の分子量が大きいところを読みにくい、同一集団なのに結果が異なり、解釈に困った等の意見もあった。

### D. 考察

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株を各地研で PFGE 解析し、その成績を東京都健康安全研究センターに電送後、解析ソフトを用いて解析を試みた。昨年度に引き続き、基本的なブロック作製方法の統一および写真撮影時の標準化を試みた。更に、昨年度は読み込んだ写真が不鮮明であったために、Fingerprinting II を用いた解析でバンドの選択が困難であった施設があったことから、今回は写真を取り込む際に、500~600 dpi 程度の解像度で読み込み、解析を試みたがその効果はほとんど認められなかった。むしろ、画像データの重さの方が障害であった。解析結果の類似度は、供試する菌

株によっても異なるが、今回の 5 株においては、いずれの菌株でも 90%以上の類似性が得られた。しかし、菌株によっては多少のバラツキが認められ、特に 500kb 付近の太いバンドや 180~310kb 付近の非常に細かいバンドの位置の選び方には注意が必要であった。

今年度は関東ブロック 11 施設のうち 2 施設で担当者の異動があった。地方衛生研究所では、年によって担当者が代わることもあるため、このような精度管理の必要性が改めて示唆された。

また各地研では、いずれも実際に発生した集団および散発事例について PFGE 解析を実施し、それが行政に活用された事例を多く経験した。

IS 解析では、PCR 後の電気泳動後にシャープなバンドを得ることが、解析を行う上で非常に重要である。そこで安定したバンドを得るためのサンプル DNA の調整方法について検討した。その結果、液体培地で培養後の菌をアルカリ抽出した場合で、最も良い結果が得られた。

実際に分離された 0157 を対象に IS 解析を行い、PFGE 解析と比較した結果、PFGE パターンが明らかに異なっている場合では IS 解析でもパターンは異なっており、両者はよく相関していた。しかし、PFGE 解析で異なったパターンを示したのに IS 解析では同じパターンを示した事例や PFGE パターンは同じであったが IS パターンが異なっていた事例も認められた。IS 解析の結果解釈については、今後更に検討が必要である。

#### E. 結論

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株を各地研で感染研プロトコールに従い、ほぼ同じ条件下で 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解析ソフトを用いて解析を試みた結果、いずれの地研で解析した場合においても非常に類似度が高く、技術力が均一化してきていることが確認された。今年度は写真の取り込みの際の解像度をなるべく統一して行ったが、その差はあまり認められなかった。

IS 解析法は PFGE 成績とも非常に良く相関し、有用な方法であることが確認された。各地研へのアンケートの結果でも、IS 法は簡便であり、PFGE 法に代わる手法として非常に期待できるという結果であった。しかし、電気泳動ゲル上の一部のバンドは、あまりにも細かい（増幅 DNA サイズの差が小さい）ために判別が困難な場合があった。また、結果の解釈に迷う場合も認められ、これらの問題点を解決することが必要であることが示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

Fumihiko Kawamori, Midori Hiroi, Tetsuya Harada, Katsuhiko Ohata, Kanji Sugiyama, Takashi Masuda and Norio Ohashi ; Molecular typing of Japanese Escherichia coli O157:H7 isolates from clinical

specimens by multilocus variable-number tandem repeat analysis and PFGE, J Med Microbiol. 57, 58-63, 2008

#### H. 知的所有権の取得状況

なし