

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

研究代表者	寺嶋 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究分担者	渡辺治雄	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	三戸部 治郎	国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 国立感染症研究所(感染研)に送付された腸管出血性大腸菌(EHEC)等の分離株に対して PFGE 解析を行い結果のデータベース化を継続するとともに、EHEC O157 の広域分離株や集団発生事例由来株については IS-printing system や Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法での解析を行った。PFGE 解析結果については、感染研のサーバーを利用し ID とパスワード管理による限定公開システムとして、PulseNet Japan 上で地方衛生研究所を対象に公開を行った。PFGE で探知される広域分離株は本研究実施期間の 3 年においても分離されており、場合によっては毎年連続で分離されているパターンがあることが明らかになった。これらの広域分離株については、数ヶ月以上の長期間にわたって分離されている株では遺伝子構成に変異が生じている場合があること、また 1~3 ヶ月程度の期間で分離されている株ではほとんどが遺伝学的に同一と考えられる株であることが MLVA により明らかになった。このような PFGE および MLVA によっても同一タイプを示す EHEC O157 については、共通な感染源により多数の散発事例を含めた unrecognized outbreak を形成している可能性が考えられた。

A. 研究目的

現在までに構築されてきた EHEC の PFGE データベースに基づいて、新たに発生する事例由来株の動向を明らかにし、広域発生事例由来株の解析からその拡大防止対策に貢献することを目的とした。また、分離株の解析手法として PFGE の他に MLVA を用いて、特に広域分離株についてより詳細な情報を収集し、これらの分離株における MLVA による解析結果の実用上の妥当性について検証を行った。さらに、迅速な解析方法の一つ

として IS-printing system を用いて集団発生事例由来株の解析を行い、この解析方法の実用性について検討を加えた。解析結果を迅速に共有するシステムとして、地方衛生研究所を対象として限定的ではあるもののインターネット上の公開システムである PulseNet Japan を設定した。

B. 研究方法

平成 18 年から 20 年に感染研に送付された株に対して、PFGE 解析を行った。PFGE では *Salmonella* Braenderup H9812 株を基準株として

データベースの構築を継続し、BioNumerics (Applied Maths 社)による系統樹作成、また、これらの結果に基づいた遺伝子型別名の付与を行った。デンドログラムの作成では、クラスター解析を行う方法として UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic averages)法を用い、近似度の計算には Dice 係数を使用した。これらの解析結果に対してはデータベース化を行い、新規パターンを示す株が即時に探知できるシステムの構築を継続した。また、全国における分離株の動向を感染研と地研で共有するために、PFGE 解析結果、デンドログラム及び新サブタイプ名については、感染研のサーバーを利用して従来と同様ほぼ1ヵ月おきにインターネット上の「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。「PulseNet Japan」では地研の担当者を対象として ID とパスワードによる管理を行った。広域食中毒事例などへの迅速な対応が必要であると考えられる場合には、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の PFGE 画像配信を行った。現在解析方法として使用している PFGE 法以外の新規解析方法の一つとして、MLVA 法の有用性について検討した。MLVA に関しては、米国 CDC が中心となって進められている MLVA の標準化に関する validation project で使用された、9 種類の primer を選定し用いた。9 種類の primer は 3 種の蛍光色素(青、緑、黄色)で標識したものであり、既報に基づいて Applied Biosystems 社により作成されたものを使用した。PCR 反応は、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 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。

C. 研究結果

2006 年に分離された 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。このうち、26 都道府県から 131 株が分離された Type No a259 のパターンを示す株では、このなかでさらに変異株が存在することが MLVA で明らかになった。2007 年の EHEC O157 では、2150 株に対して 2007 年に分離された新しいサブタイプとして 790 種類、2006 年に分離されたことのあるサブタイプが 58 種類、その他が 22 種類見いだされた。また、EHEC O26 では、306 株に対して 164 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、22 都道府県から 119 株が分離された Type No c47 の株では MLVA でも大部分の株が同一リピート数を示し、これらの株の遺伝学的関連性が高いことが示唆された。2008 年の EHEC O157 では、1737 株に対して 2008 年に分離された新しいサブタイプとして

761 種類、2007 年に分離されたことのあるサブタイプが 60 種類、その他が 29 種類見いだされた。また、EHEC O26 では、421 株に対して 176 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 45 種類存在したが、そのうち 11 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 5 種類存在していた。特に、24 都府県から 56 株が分離された Type No d148 の株では、MLVA でも大部分の株が同一リピート数を示し、これらの株の遺伝学的関連性が高いことが示唆された。IS-printing system による 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が必要と考えられるが迅速な検査法としての有望性が示唆された。ヒトにおける動物由来サルモネラ症の可能性を探る目的で、ミシシッピアカガメ由来サルモネラの PFGE に合致する患者由来のサルモネラの探索を行った。その結果、患者由来 7 血清型の 121 株のサルモネラ分離株のうち、1 血清型 (S. Montevideo) において 43 株がカメ由来 2 株の示す PFGE パターン (XbaI) と類似性を示した。

D. 考察

複数の都道府県から分離され PFGE パターンが同一となる EHEC O157 は、毎年数十種類見出される。特に、2008 年に分離株については、11~24 都府県とかなり多い地域で分離されている種類が 5 種類あった。広域から分離されるパターン自体は年により変化しているが、連続で分離されるパターンもある。2006 年に広域で分離された、TN

a259 では、26 都府県から 131 株が分離されたおり、すべてが散发事例由株で分離期間も 4 月から 12 月の長期に及んでいた。このタイプは、分離数、地域ともに少なくなつたとはいえ、2007 年と 2008 年にも分離された。ただし、分離年度が変わるとともに、変異株といえる遺伝子構成の変化があることが MLVA で明らかになったことから、PFGE では同一のパターンであるが必ずしも同一クローンの分離株が検出されているわけではないと考えられる。また、2007 年に出現して集団発生も引き起こした TN c47 については、2008 年においても数こそは少ないが、MLVA でも同一タイプが連続して分離されていることから、感染源が完全に消滅しているわけではないことが考えられた。同一クローンではなくとも、極めて類似した EHEC O157 が長期間に出現するには、恒常的な供給源が存在することが必要である。EHEC の主たる保菌動物である牛など、感染源の解明と EHEC の浄化を行わない限り、このような広域流行株の出現を阻止できないものと考えられる。

カメ由来サルモネラの PFGE 画像をパルスネット上で共有し患者由来のサルモネラのうち泳動パターンが合致する分離株の探索を行った。まだ十分な解析とは言えないが、部分的な解析結果から患者株とカメ由来株の類似性を示す可能性が示唆されたことは意義深いと考えられる。今後の継続的かつ詳細な研究結果が望まれる。

E. 結論

複数年度にわたり広域から分離され PFGE パターンが同一の EHEC O157 が存在することが明らかになった。さらに、これらの広域流行株では、MLVA でも同一タイプの極めて均一性の高い株とわずかではあるが MLVA タイプの異なる変異株があった。いずれの株も遺伝子構成は極めて類似し

ていることから、これらは散発事例由来株を含めた規模の大きな集団発生を形成していた可能性が示唆された。このような分離株の解析情報を迅速に共有し疫学調査に活用することで感染源の探知・感染拡大の阻止に結びつくことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

5. Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M,

Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H. Molecular Characterization of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Isolates Dispersed across Japan by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. Jpn J Infect Dis. 2008 Jan;61(1):58-64.

6. Yoshitoshi Ogura, Tadasuke Ooka, Asadulghani ., Jun Terajima, Jean-Philippe Nougayrede, Ken Kurokawa, Kousuke Tashiro, Toru Tobe, Keisuke Nakayama, Satoru Kuhara, Eric Oswald, Haruo Watanabe and Tetsuya Hayashi. Extensive Genomic Diversity and Selective Conservation of Virulence-Determinants in Enterohaemorrhagic Escherichia coli strains of O157 and non-O157 serotypes. Genome Biology. 2007;8(7):R138.

7. Kam KM, Luey CK, Parsons MB, Cooper KL, Nair GB, Alam M, Islam MA, Cheung DT, Chu YW, Ramamurthy T, Pazhni GP, Bhattacharya SK, Watanabe H, Terajima J, Arakawa E, Ratchtrachenchai OA, Huttayanant S, Ribot EM, Gerner-Smidt P, Swaminathan B; for the Vibrio parahaemolyticus PulseNet PFGE Protocol Work Group. Evaluation and Validation of a PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Subtyping Vibrio parahaemolyticus: an International Multicenter Collaborative Study. J Clin Microbiol. 2008 Aug. 46 (8):2766-2773.

8. Saitoh T, Iyoda S, Yamamoto S, Lu Y, Shimuta K, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H. Transcription of the ehx enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator

encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008 Jul;190(14):4822-30.

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

ルチブレックス 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

10. 寺嶋 淳:腸管出血性大腸菌感染症の動向と分離菌株の分子疫学解析。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京

11. 江藤良樹、中村祥子、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、堀川和美、大岡唯祐、林哲也、楠本正博、寺嶋 淳:腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing 法とパルスフィールドゲル電気泳動法の比較。第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2008 年 3 月、東京

12. 杉本典彦、寺嶋 淳、伊豫田 淳、嶋 謙介、呉 育羅、日野根谷淳、朝倉昌博、渡邊治雄、山崎伸二:我が国で分離した様々な血清型の腸管出血性大腸菌を用いた志賀毒素ファージを標的とした PCR-RFLP 法の評価。第 12 回腸管出血性

- 大腸菌感染症シンポジウム、2008年3月、東京
13. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄：2006年におけるO157:H7を中心としたEHECの動向について。第11回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007年8月、安曇野市
14. 伊豫田 淳、山本章治、佐藤人美、寺嶋 淳、渡邊治雄：LEEの発現制御因子GrlAによる病原性遺伝子群グローバル発現制御機構。第11回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、2007年8月、安曇野市
15. 齋藤 剛仁、伊豫田 淳、陸 彦、志牟田 健、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：腸管出血性大腸菌におけるエンテロヘモリシンの発現制御機構。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
16. 伊豫田 淳、齋藤 剛仁、石原 朋子、小泉信夫、志牟田 健、陸 彦、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：腸管出血性大腸菌のGrlR-GrlA制御システムによる病原性関連遺伝子群の協調発現機構。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
17. 大岡唯祐、小椋義俊、井口 純、Asadulghani、中山啓介、戸邊 亨、寺嶋 淳、渡邊治雄、林 哲也：non-O157 EHECゲノムにおけるIS分布の解析。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
18. 三浦雅史、伊豫田 淳、大西 真、安部 裕順、戸邊 亨、林 哲也、泉谷秀昌、寺嶋 淳、渡邊治雄：感染宿主細胞の形態維持に關する病原性因子の機能解析。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
19. 泉谷秀昌、大西 真、伊豫田 淳、寺嶋 淳、山崎伸二、石原朋子、渡邊治雄：サテラージェドプロテアーゼをコードするsubA遺伝子の志賀毒素産生性大腸菌株における分布状況。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
20. 陸 彦、伊豫田 淳、トウマ クラウディア、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：LEE非保有型STECに存在する接着因子EibGの機能解析と保有株の系統解析。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
21. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、田村和満、渡邊治雄：2006年におけるO157:H7を中心としたEHECの動向について。第80回日本細菌学会総会、2007年3月、大阪
22. 寺嶋 淳、伊豫田 淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、渡邊治雄：2006年におけるO157:H7を中心としたEHECの動向について。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
23. 陸 彦、伊豫田 淳、Claudia Toma、伊藤健一郎、八柳 潤、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：LEE非保有型の志賀毒素産生性大腸菌が保有する新規免疫グロブリン結合遺伝子ファミリーの解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
24. 大岡唯祐、小椋義俊、中山啓介、寺嶋 淳、渡邊治雄、林 哲也：腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型に関する詳細な解析。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
25. 齋藤 剛仁、伊豫田 淳、山本章治、陸 彦、志牟田 健、大西 真、寺嶋 淳、渡邊治雄：腸管出血性大腸菌におけるLEEとエンテロヘモリシンの協調発現制御機構。第81回日本細菌学会総会、2008年3月、京都
26. 伊豫田 淳、山本章治、陸 彦、寺嶋 淳、渡邊治雄：腸管出血性大腸菌における病原性遺伝子群の統括的発現制御因子GrlAの機能に関する遺伝学的解析。第81回日本細菌学会総会、

2008年3月、京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「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」

研究分担者	清水俊一	北海道立衛生研究所
研究協力者	山口敬治、森本洋、駒込理佳	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	秋田県健康環境センター
	藤井伸一郎、高橋雅輝	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
	菅野奈美	福島県衛生研究所
	加藤美和子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地敏	札幌市衛生研究所
	野中陽子、沼田昇	仙台市衛生研究所

研究要旨：国立感染症研究所を中心に構築されたパルスネットの精度を維持するために北海道・東北・新潟ブロックの各衛生研究所におけるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）法の精度管理と行った。PFGE の精度管理は多くの管理ポイントを有し簡単にその精度を保てないのが現状である。そこで、管理ポイントをプラグ作成段階、制限酵素処理と電気泳動段階、及び結果解析段階の3つに大別し、それぞれの精度管理を行うことで全体の制度を向上させることを試みた。平成 18 年度には、同一の PFGE 泳動写真をもちいて結果解析の精度管理について検討した。その結果、同一菌株が 100%の相同性を得られたのは3地研のみであった。また、平成 20 年度には、プラグを送付して制限酵素処理と電気泳動段階について検討した。その結果、9 地研で同一菌株が 100%の相同性を得ることができた。更に、平成 18 年度と平成 19 年度には、腸管出血性大腸菌 O157 の解析のために考案された IS-Printing system と PFGE について比較検討を行い、PFGE による分子疫学的分析の補完が可能であるか検討を行った。異なる事例で、PFGE において異なるクラスターに分類されたものが、IS-Printing System では同一のパターンを示す場合と異なるパターンを示す場合が認められたが、同一事例内では、PFGE と IS-Printing System はよく一致した。

A. 研究目的

食品の広域流通に伴い食品由来感染症も全国的規模で発生するようになってきた。一地域で発生した食品由来感染症が、その地域のみでの感染ではない場合、情報を迅速かつ正確に共有することは、被害の拡大、発生予防に重要な役割を果たすことになる。これらの情報の一つとして分子疫

学的解析は、原因菌の相同性を確認し、原因食材等の特定に重要な役割を果たす。この分子疫学的解析の内、PFGE は特に優れた解析法のひとつである。しかし、PFGE は手技や解析者の違いによる施設間格差が生じることが多く、各施設の精度管理が重要である。また、近年、腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析のために開発された

IS-Printing System がキットとして販売され、PCR ベースでの分子疫学的解析が容易に行えるようになり、PFGE とともに腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析に役立つことが期待されている。しかし、その精度については、データの蓄積を重ねて更に検討していく必要がある。そこで、本研究では、PFGE の精度管理方法と IS-Printing System の有用性について検討を行った。

B. 研究方法

1. PFGE の精度管理

平成 18 年度：北海道で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 のうち、比較的太いバンドが多く見られる 6 株を 3 株ずつ 2 群に分け、更に 1 株をそれぞれの群に入れ、それぞれの群を別々に処理し PFGE による泳動写真を作成した。1 群を 12 月に各地研に送付し、2 群を 1 月に送付して各地研での解析を行った。解析に当たっては、解析ソフトの自動バンド選択を使用せずデンシトグラフの波形を基に判断し、解析法として Dice 法、Peason 法の 2 法により行うようにした。

平成 20 年度：北海道で 2005 年、2006 年、2007 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 の 3 株 (A、B、C) を用い、それぞれの株について 2 サンプル、合計 6 サンプルを使用し、プラグを作成後、ブロック内各地研にプラグを送付し、制限酵素処理、PFGE による泳動、泳動写真の解析を行った。また、プラグの送付方法として普通郵便での郵送を行いプラグ輸送時の問題を検討した。

2. IS-Printing System の検討

平成 18 年度：ブロック内の 2 地研で行った。A 地研は、事例の異なる 5 株について、PFGE で同一のパターンを示した 3 株と PFGE で異なるパターンを示した 2 株を使って IS-Printing System を評価した。他の B 地研は、PFGE で異なるパターンを示した腸管出血性大腸菌 O157:H7 を 3 株、同一パターンを示した腸管出血性大腸菌 O157:HNM を 3 株使用し IS-Printing System を評価した。

平成 19 年度：ブロック内各地研の管内で発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7 について、88 事

例 133 株を用い、IS-Printing System と PFGE を比較検討した。また、結果判定を容易にするために結果をコード化することを試みた。

C. 研究結果

1. PFGE の精度管理

平成 18 年度：1 群と 2 群に加えた同一株について各地研での解析結果で 100% 相同性が確認できたのは 3 施設のみであったが、全ての施設でクラスター範囲 90~100% で、相同性の確認は可能であった。Dice 法と Peason 法では、Dice 法がよい結果となった。

平成 20 年度：プラグの送付では、各地研にプラグが到着するまでにかかった日数は 1~3 日で、7 地研で 2 日目に到着した。到着したプラグは肉眼的な破損等は認められなかった。制限酵素処理では、ユニット数は 30U が 7 地研、50U が 2 地研、60U が 1 地研で、処理時間は 4 地研で 4 時間以内、6 地研で 10 時間以上であった。クラスター解析ソフトを所有する地研は 9 地研であった。PFGE の結果では、各地研の泳動結果の写真は、クラスター解析上支障がなかったものの、2 地研でバンドの照度が低くやや判定しづらいものであった。制限酵素の量と消化時間によるバンド出現の違いは認められなかった。

クラスター解析ソフトの設定は、類似係数が Dice の地研が 8 地研で、Jaccard が 1 地研であった。トランス設定は、0.3%~1.5% であった。解析ソフトを所有しない 1 地研については、北海道衛研において、送付された写真を使用して解析を行った。解析結果では、9 地研において、菌株 A、菌株 B、菌株 C のそれぞれの 2 サンプルが 100% の相同性を示したが、1 地研で、菌株 B の 2 サンプルが 100% の相同性を示さず、94.5% であった。クラスター分類では、全ての地研でクラスター範囲 90~100% において、菌株 A、B と菌株 C を別々のクラスターに分類した。また、4 地研では菌株 A と菌株 B についても異なったクラスターに分類した。また、マーカーとして *S.BraenderupH9812* 株を使用した 8 地研の泳動写真を使用してクラ

スター解析を行った結果、各菌株とも1地研を除きクラスター範囲90~100%で同一のクラスターに分類された。

2. IS-Printing System の検討

平成18年度：A地研では、PFGEで同一パターンを示した3株を含め、IS-Printing Systemでは、5株とも異なるパターンを示した。H地研では、O157:H7については、3株ともIS-Printing Systemで異なるパターンを示し、O157:HNMでは、3株とも同一のパターンを示した。

平成19年度：A地研では、18事例がPFGEによるタイプ分けで11クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、16パターンに分かれた。

B地研では9事例がPFGEによるタイプ分けで5クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、9パターンに分かれた。

C地研では、5事例がPFGEによるタイプ分けで3クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、全ての菌株で異なるパターンを示した。

D地研では、6事例がPFGEによるタイプ分け(感染研)で7クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、5パターンに分かれた。

E地研では、17事例がPFGEによるタイプ分けで11クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、12パターンに分類された。

F地研では、7事例がPFGEによるタイプ分けで7クラスターに分類され、IS-Printing Systemでも、同様に7パターンに分類された。

G地研では、9事例がPFGEによるタイプ分けで9クラスターに分類され、IS-Printing Systemでも、同様に9パターンに分類された。

H地研では8事例がPFGEによるタイプ分け(感染研)で8クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、7パターンに分類された。

I地研では、9事例がPFGEによるタイプ分けで単一クラスターに分類され、IS-Printing Systemでは、4パターンに分類された。

地研間の比較では、感染研によるタイプ分けで同じクラスターに分類された菌株が、地研Cと地研Dの間、地研Dと地研Fの間においてIS-Printing

Systemで異なるパターンを示した。また、地研Eと地研Hの間、地研Aと地研Eの間、地研Dと地研Eの間、地研Aと地研Bと地研Eと地研Gの間、及び地研Hと地研Eの間においてIS-Printing Systemで同一パターンを示す菌株が認められた。

D. 考察

PFGEの精度管理においては、平成18年度に行った泳動写真による解析では、バンドの判定方法を指定して解析を試みたが、同一の菌株で100%の相同性を得られた地研は3地研にとどまった。バンドの判定方法として、解析ソフトのバンド自動検出を使用せず、デンストグラフの波形を基にバンド判定を行ったが、自動検出よりも解析者の主観が判定結果に影響を与えた可能性が示唆された。

平成20年度に実施したプラグ送付による精度管理では、輸送方法として普通郵便での送付を行った。外気温等の条件を今後検討していく必要があるものの、普通郵便での送付は、定期的に行う精度管理のための輸送として一定の評価が可能であった。また、同一プラグを使用して精度管理を行う方法では、制限酵素処理以降について限定した施設間の相違を明らかにでき、プラグの作成、制限酵素処理と泳動、泳動結果判定という全行程の施設間格差の検討よりも問題点の洗い出しが容易となる利点があった。泳動データの解析では、9地研において同一菌株を100%相同性と判断できたが、菌株Aと菌株Bをクラスター分類できた地研は4地研にとどまった。また、菌株Aと菌株Bを同一クラスターに分類した地研の泳動写真を北海道衛研で再度解析したが、菌株Aと菌株Bは同様に同一クラスターとなった。このことから、解析者の違いによるものよりも別の要因によるものが原因ではないかと考えられた。

IS-Printing SystemとPFGEの比較においては、平成18年度では、PFGEで同一のクラスターに分類された菌株が、IS-Printing Systemでは別のパターンを示し、また、PFGEで別のクラスターに分類されたものが、IS-Printing Systemでも同様に別

パターンを示した。平成 19 年度には、検体数を増やし 88 事例 133 株について、PFGE と IS-Printing System の比較検討を行った。その結果、集団感染事例内での IS-Printing System の一致率は高く、集団事例発生時の早期判定に有用であると思われた。また、PFGE のクラスター分類で同一と判断された菌株が IS-Printing System では別パターンとなるものがあり、このような事例においては、PFGE の結果を補完する上で役立つものと思われた。ただ、PFGE で異なるタイプと判定されたものが、IS-Printing System では同パターンを示す場合があり、IS-Printing System 単独で判定するのではなく、PFGE も併せて行い結果判定する必要があると思われた。

IS-Printing System の結果は、バンドの有無を 1、0 の数字に置き換えて判定する方法がとられている。平成 19 年度では、これをコード化する検討も行った。コード化することで、多くの菌株のパターン確認が容易となり、コードの見間違いによる判定ミスを防ぐことが可能で、何らかの共通するコード化を検討する必要があると思われた。

E. 結論

PFGE の精度管理では、平成 18 年度に泳動写真による解析の精度について検討し、解析ソフトによるバンド判定方法等について解析者の主観が

入らないバンド判定方法が重要であることが判明した。

また、平成 20 年度にプラグを送付して制限酵素処理、PFGE による泳動、泳動結果解析について精度管理を行い、プラグの送付により、輸送コストとリスクの軽減が可能になることが判明したが、輸送方法については、更に厳寒期、高温期等の影響について検討する必要があると思われた。さらに、プラグ送付により、制限酵素処理以降の精度管理が可能となり、各処理工程別の精度管理方法として有用であった。

PFGE と IS-Printing System の比較検討では、平成 18 年度、19 年度に実際の感染症事例株を使用して検討し、集団事例については、その有用性が認められたものの、散発事例においては、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検討する必要があると思われた。

IS-Printing System のデータをコード化することで、その解析が容易となった。

F. 健康危機情報
特になし

G. 研究発表
なし

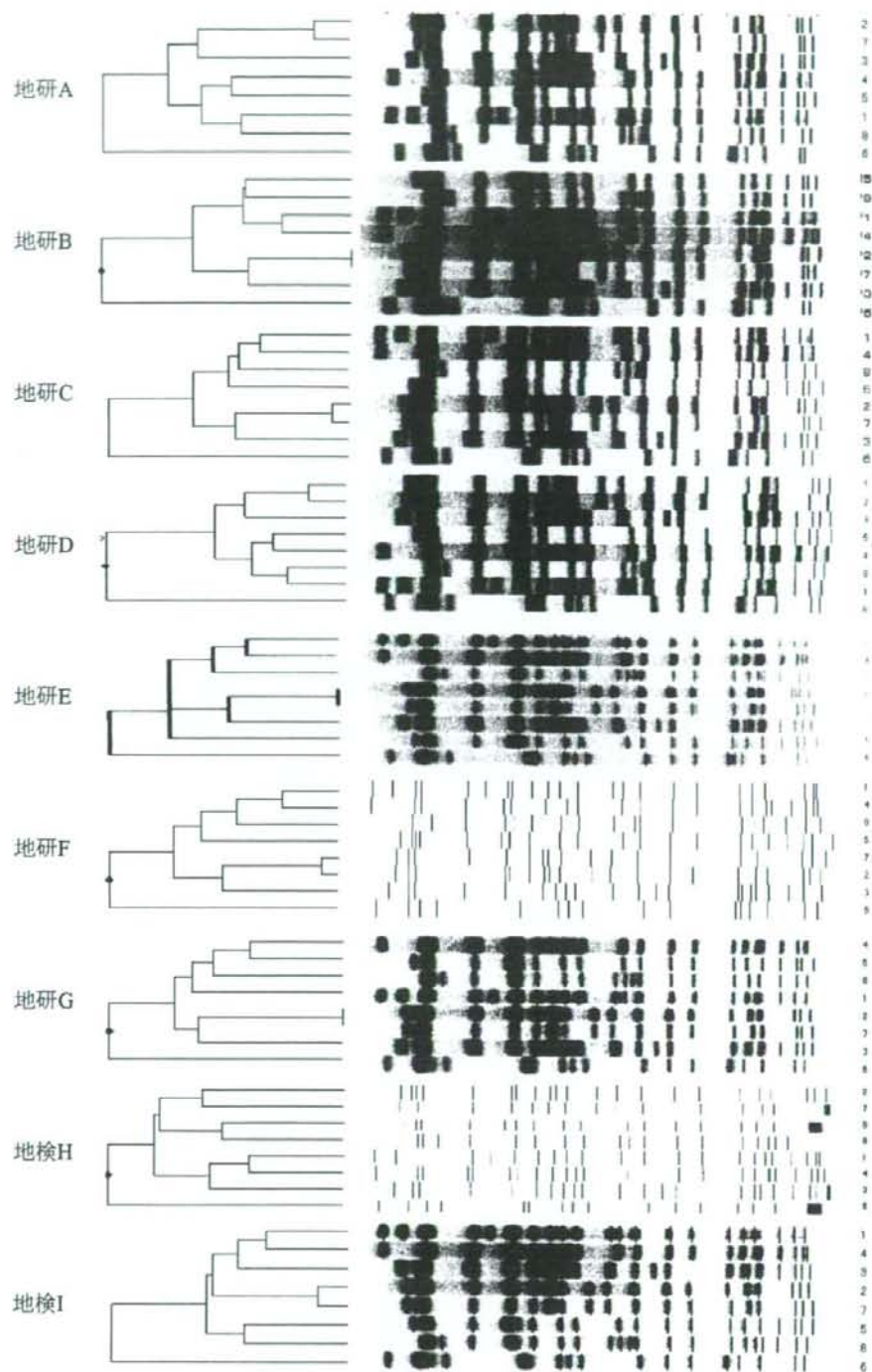


図1 平成18年度精度管理結果

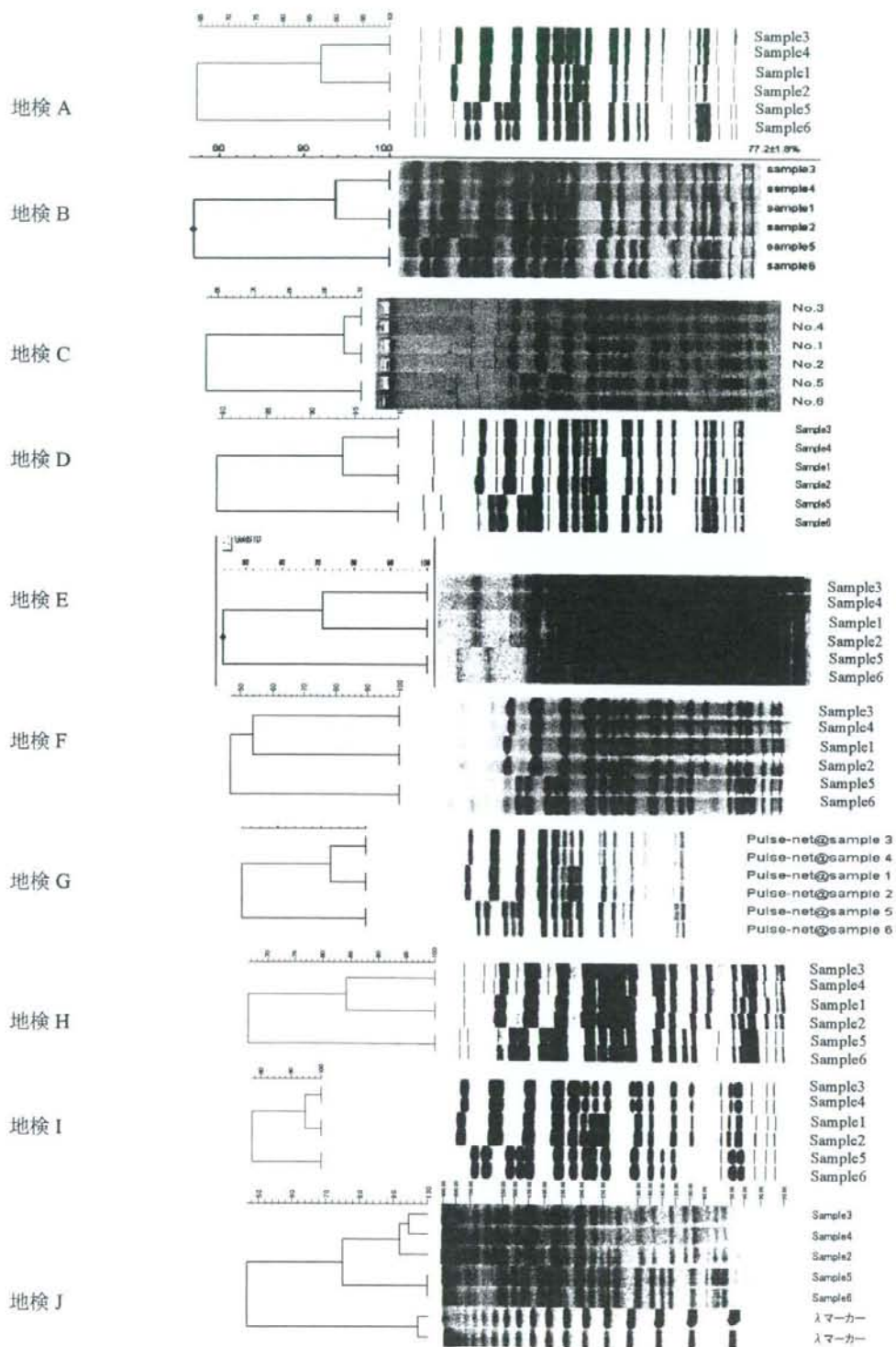


図2 平成20年度制度管理結果

表1 平成19年度 IS-Printing System と PFGE の比較1

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			
	事例2	5		AJ	F-F35F783B
		6			
		7			
		8			
	事例3	9		AD	F-D3DF727B
		10			
		11			
		12			
		13			
		14			
		15			
		16			
		17			
		18			
19					
20					
21					
22					
事例4	23		AI	F-19CB4282	
	24				
事例5	25		AK	7-10884000	
	26				
事例6	27		AK	F-10929904	
	28			F-00929904	
事例7	29		AK	F-93529904	
	30				
事例8	31		AH	F-93CB447B	
	32				
事例9	33		AF	F-F1DEF23B	
	34				
事例10	35		AB	F-C29B7232	
	36				
事例11	37		AC	F-D3DF527B	
	38				
事例12	39		AE	F-D3DF527A	
	40				
事例13	41		AC	F-729BD23A	
	42				
事例14	43		AC	F-D3DF527B	
	44				
事例15	45		AG	F-D3DF727A	
	46				
事例16	47		AE	F-D3DF527A	
	48				
事例17	49		AE	F-D3CF727A	
	50				
事例18	51		AE	F-D3CF727A	
	52				
施設B	事例	53		BA	E-D3DF727B
		54			
		55			
		56			
		57			
		58			
		59			
		60			
		61			
		62			
		63			
施設C	事例	64		CA	F-01DF007A
		65			
		66			
		67			
		68			
		69			
		70			
		71			
		72			
		73			
		74			
施設D	事例	75		CB	3-009B003A
		76			
		77			
		78			
		79			
		80			
		81			
		82			
		83			
		84			
		85			
施設E	事例	86		CC	1-010B0013
		87			
		88			
		89			
		90			
		91			
		92			
		93			
		94			
		95			
		施設F	事例		
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					
105					
施設G	事例			106	
		107			
		108			
		109			
		110			
		111			
		112			
		113			
		114			
		115			
		施設H	事例	116	
117					
118					
119					
120					
121					
122					
123					
124					
125					
施設I	事例			126	
		127			
		128			
		129			
		130			
		131			
		132			
		133			
		134			
		135			

表2 IS-Printing System と PFGE の比較2

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E	事例1	2509			E-D3DE527B	
		2511		EJ	F-D3DE527B	
	事例2	2513		ED	F-729BD23A	
	事例3	2515		EH		
	事例4	2518				
	事例5	2521			ED	F-C3DB527B
		2523				
		2525				
	事例6	2527		EB	D-C29B7232	
	事例7	2529		EE	F-735F5032	
	事例8	2531		ED	F-C3DB527B	
	事例9	2535		EA	D-C29B7232	
	事例10	2537		EG	F-735E7032	
	事例11	2635		EA	D-C29B5232	
		2639				
	事例12	2641		EF	F-F3DF723B	
		2643				
事例13	2645					
	2647		EA	D-C29B7232		
	2649					
事例14	2651		EC	D-110B5093		
	2653					
	2655					
事例15	2655		EK	F-C3DB527B		
事例16	2657		EI	F-329BD23A		
事例17	2659					
	2661		ED	F-D3DF727B		

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				
		2				
		3				
		4				
		5			FA	F-C3DFD3EB
		6				
		7				
		8		c442		
		9				
	事例2	10	c642	FB	D-11095893	
	事例3	11				
	事例4	12	b293	FC	F-D3DFF7FB	
	事例5	13	c219	FD	F-9AA3C413	
		14				
	事例6	15	c251	FE	D-110B4883	
		16	c633	FF	D-110A488B	
	事例7	17	c630			
		18	c631	FG	D-C69AC35B	

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-F3DG723B
	事例4	4		GD	F-C3D5527B
	事例5	5		GE	F-D3DF727B
	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			
	事例10	10		GI	F-D3DF78FB

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			
	事例2	2	b481		F-F3DB523B
	事例3	3	b705		F-F3DF723B
	事例4	4			
		5	b213		F-93CF627A
	事例5	6	c389		D-928BC313
		7	c390		D-928BC313
	事例6	8	b423		D-110B5093
	事例7	9	c388		D-9683C313
	事例8	10			
		11	c495		D-110B5092

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			
	事例2	EC12000			F-C3DB527B
	事例3	EC12010			F-D1DE727B
	事例4	EC12013			F-C3DB527B
	事例5	EC12017			F-D3DFF527B
	事例6	EC12018			F-735F7024
	事例7	EC12021			F-C3DB527B
	事例8	EC12022			
	事例9	EC12027		IA	F-C3DB527B

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 18 年度－20 年度総合研究報告書

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

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	矢萩かをる, 土井 育子	茨城県衛生研究所
	船渡川主次, 馬淵 佐知子	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, 横山 栄二	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
	川森 文彦, 廣井 みどり	静岡県環境衛生科学研究所
	尾畑 浩魅, 小西 典子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：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 0157 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。各地研における PFGE 解析の技術力を均一化することを目的として、毎年、腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株（5 株程度）を各地研でそれぞれ PFGE 解析後、成績を東京都健康安全研究センターで比較検討した。毎年、菌株によっては類似度に多少のバラツキが認められたが、いずれも概ね 90%以上の高い類似度であった。写真の解像度が低く、バンドの位置が選びにくかった写真やバンドがシャープではない場合等では類似度が低くなってしまった。また各地研では、いずれも実際に発生した集団および散发事例について 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。

PFGE 法以外の分子疫学解析法として IS-printing System 法の有用性について検討した結果、本法は PFGE 法と比較して非常に短時間で結果が判定できることや、試薬の調整等も容易な事から、PFGE 法に代わる手法として期待できることが判明した。

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 0157 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。腸管出血性大腸菌等による Diffuse Outbreak (散在的集団発生) が起きた場合、感染源を迅速に特定し、拡大を防止するための策を早急に講じなければならない。分離菌株の迅速で正確な分子疫学的解析を行うためには、各地方衛生研究所で行う PFGE 解析法の技術レベルを常に一定に保つことが必要である。

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. 供試菌株

1) PFGE 解析用共通菌株

各地研の PFGE 解析を比較するための共通菌株として、毎年、腸管出血性大腸菌 0157 の 5 株を供試した。

2) 散発または集団下痢症事例由来株

EHEC 株：各地研毎に、その年度に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例で分離された株を供試した。

サルモネラ：各地研毎に、その年度

に発生した食中毒あるいは散発下痢症事例由来のサルモネラ菌株を供試した。

2. PFGE 解析

感染研プロトコールに準拠して同一条件で行った。

アガロースブロックの作製：0.7mm プラグキャストを使用し、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 時間反応させた。

制限酵素処理：EHEC では制限酵素 *Xba* I で、サルモネラでは *Xba* I および *Bln* I で処理した。

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：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。

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

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。

3. PFGE 解析成績の電送

各地研で解析した PFGE 画像を tif ファイルまたは jpeg ファイルとして、電子メールで送付した。

4. PFGE 画像の解析

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試みた。

5. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例および散发事例への応用

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、PFGE 法の有用性について検討した。

6. サルモネラ食中毒事例への PFGE 解析の応用

各地研で経験したサルモネラによる感染症および食中毒事例から分離された菌株について PFGE 解析を行い、PFGE の有用性について検討した。

7. IS-printing System 解析

1) サンプル DNA 調整法の検討

サンプルの DNA 量を一定にするために液体培地 (TSB) で 37℃, 18~20 時間培養した菌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 μ l に懸濁し、100℃, 10 分間加熱後、50 μ 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

各地研に IS 試薬キット (東洋紡) を配布し、共通菌株あるいは、各地研で分離された 0157 株について IS 解析を行い、PFGE パターンと比較した。

3) IS 法解析結果の比較方法の検討

IS 法は「プライマーセット 1」で 18 カ所、「プライマーセット 2」で 18 カ所を増幅させ、出現したバンドのパタ

ーンを比較することで、菌株間の相同性を推定する方法である。バンドが有る場合を「1」、バンドが無い場合を「0」として判定した後、「0」および「1」の並びを 2 進法と想定し、その値を 10 進法に変換して比較した。

4) IS-printing System 解析の評価

IS 解析について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

3 年間に渡り、毎年腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 5~6 株を用いて、11 施設で PFGE 解析を行った。その代表例を写真 1 に、デンドログラム解析結果を図 1~3 に示した。

1) 平成 18 年度

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。一部の施設で泳動像の歪み (スマイリング) が認められたが、解析に大きく影響するものではなかった。

2) 平成 19 年度

デンドログラム解析において、いずれも菌株ごとにクラスターを形成していた。菌株によっては、多くの施設 (11 施設中 9 施設) で 100% 一致となった株もあったが、多少バラツキが多く認められた菌株もあった。これは、500kb 付近に出現する太いバンドを 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ためである。

3) 平成 20 年度

染色が薄いためか、バンドが非常に薄く読み込むのに苦労した施設があった。また、写真の解像度が低く、バンドの位置が選びにくかった写真や、バンドがシャープではないために、どの位置を選択したらよいか迷う写真があった。送付した菌株の中に、変異しやすい株があり、施設によって700kb付近にバンドが出現し、500kb付近のバンドが消えてしまったという現象が認められた。

2. 腸管出血性大腸菌のPFGE解析の応用

各地研で経験した腸管出血性大腸菌による食中毒事例や散発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表1に示した。各地研で発生した事例について行ったPFGE解析成績が行政に反映できた事例を数多く経験した。患者発生が他自治体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。

3. サルモネラのPFGE解析の応用

サルモネラについてもEHEC同様、PFGE解析成績が行政に反映された事例を多く経験した(表2)。中には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、感染源が解明できた事例もあった。

4. IS-printing System解析

1) サンプルDNA調整法の検討

O157をTSBに接種し37°C18~20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 μ lを12,000rpmで遠心後、沈渣に50

μ lのアルカリ(25mM \cdot NaOH)を加え100°C10分間加熱してDNAの抽出を行った後、50 μ lの1MTris-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)。

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

精度管理に用いた菌株5株および各地研で分離されたO157株15株程度についてIS法で解析を行い、PFGE法と比較した。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、同一集団事例由来株で同じ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認められた。

3) IS法解析結果の比較方法の検討

IS法はO157遺伝子をPCRにより合計36カ所増幅させ、出現したバンドのパターンを比較することで、菌株間の相同性を推定する方法であるが、バンド数が多数であるため、菌株間の比較は容易ではない。そこで増幅バンドが認められた場合を「1」、バンドが認められない場合を「0」として判定した後、「0」および「1」の並びを2進法と想定し、その値を10進法に変換

して比較した。「プライマーセット1」ではバンドNo1~9, No. 10~18の2カ所に、「プライマー2」ではNo. 1~9, No. 10~16の2カ所に区切り10進法に変換した。ペロ毒素型はそのままの標記とした。この方法で菌株NO.1を解析した場合、「プライマーセット1」で増幅した場合「110100111-101101111」という結果が「423-367」という数値に変換されるため、菌株間の比較が容易となった。

4) IS-printing System の評価

IS解析についてのアンケート結果を表3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10施設で相関性ありと回答し、9施設でPFGE法に代わる手法として期待できるとした。しかし分子量の小さいバンドが読みにくいので改良が必要という意見もあった。

D. 考察

各地研の技術力を均一化することを目的として、毎年5株程度の腸管出血性大腸菌0157を各地研に送付し、PFGE解析後、成績を東京都健康安全研究センターに電送してもらった。PFGE画像は解析ソフトを用いて解析を試みた。毎年、菌株によっては類似度に多少のバラツキが認められたが、概ね90%以上の高い類似度であった。類似度に差が出た菌株は、バンドに太い部分があり、1本と判定するか2本と判

定するか迷うような菌株であった。また、写真の解像度が低く、バンドの位置が選びにくかった写真やバンドがシャープではない場合等では類似度が低くなってしまった。

関東ブロック11施設中、平成18年は3施設、平成19年は2施設、平成20年度は3施設で担当者の交代があった。PFGE法は操作が複雑であるため、技術が伝承されにくいという欠点がある。常に技術力を一定に維持していくためには、定期的に精度管理を行っていくことが必要である。

各地研では、いずれも実際に発生した集団および散发事例について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。しかし、複数の自治体にまたがって同一PFGEパターンの0157が流行した場合、どの時点でどの様な情報を共有していけばよいか等が課題となった事例もあった。今後、自治体間のPFGEパターンの共有化や流行株情報の共有化をどのように行っていくかを検討する必要がある。

IS法は「プライマーセット1」で18カ所、「プライマーセット2」で18カ所をPCRで増幅させ、出現したバンドのパターンを比較することで、菌株間の相同性を推定する方法である。従来のPFGE法との相関性や、型別能について比較した比較した結果、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。

IS解析の結果を異なる施設間で比