

- 58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
22. 原田誠也、西村浩一、岡智一郎、片山和彦. 「熊本県における感染性胃腸炎の起因病原体調査とサポウイルス genogroup の年次変化」. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
23. 斎藤博之、東方美保、岡智一郎、片山和彦、田中智之、野田衛. 食品検体のノロウイルス検査のためのパンソルビン・トラップ法の開発と拡大適用. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
24. 村上耕介、岡智一郎、脇田隆字、松田幹、片山和彦. ノロウイルスのヒト腸管由来細胞への結合様式の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
25. 北島正章、岡智一郎、原本英司、武田直和、片山和彦、片山浩之. 国内の下水および河川水からの Genogroup IV ノロウイルスの検出および遺伝子解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
26. 岡智一郎、高木弘隆、遠矢幸伸、村上耕介、脇田隆字、片山和彦. ネコカリシウイルスの新規リバーシジェネティクス系の構築. 第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日～9日、徳島
27. 浅野有香、村上耕介、鈴木さやか、灘野大太、宇理須厚雄、岡智一郎、片山和彦、松田幹「母乳に含まれるヒトノロウイルス感染抑制因子の探索」日本農芸化学会中部支部第159回例会 2010年10月30日 名古屋
28. Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Takeda N, Katayama K, Katayama H. Genetic diversity of human noroviruses and sapoviruses in river water, Japan. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
29. Yokoyama M, Oka T, Katayama K, Kanda T, Sato H. Structural Insight into Substrate Recognition based on P4 and P1 residues by Sapovirus 3C-like Protease. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
30. Motomura K, Yokoyama M, Ode H, Oka T, Katayama K, Noda M, Tanaka T, Sato H, and Norovirus Surveillance Group of Japan. Evolution of Norovirus GII/4 in Japan by Genome Recombination. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
31. Murakami K, Oka T, Wakita T, Matsuda T, Katayama K. Analysis of Mechanism of Human Norovirus Binding to Caco-2 Cells. Fourth International Conference on Caliciviruses. October 16-19, 2010, Santa Cruz, Chile
32. Oka T, Yokoyama M, Takagi H, Tohya Y, Motomura K, Murakami K, Wakita T, Sato H, Katayama K. Antiviral Development Fourth International

Conference on Caliciviruses.
State-of-the Art October 16-19, 2010,
Santa Cruz, Chile.

33. Hnasman, G. S. Chen, L. Georgeiv,
I. McLellan, J.S. Katayama, K. Kwong,
P.D. Crystal Structures of a rare
Norovirus P-Domain in Complex with
Histo-Blood Group Antigens. 4th
International Conference on
Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct
16-19, 2010.

34. Sharp, T. M., GUIX, S., Katayama,
K., Crawford, S.E., Estes, M.K.
Inhibition of Cellular Protein
Secretion by Norwalk Virus
Nonstructural Protein P22 requires a
Mimic of an Endoplasmic Reticulum Export
Signal. 4th International Conference on
Calicivieruses. Santa Cruz, Chile, Oct
16-19, 2010.

H. 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

「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

研究分担報告書

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
研究協力者		地方衛生研究所	

研究要旨 平成 21 年度の本研究において、PulseNet Japan の機能強化を目的として BioNumerics(BN) server によるオンラインシステムを構築した。平成 22 年度では、BN のアップグレード等により全国 6 ブロックの研究分担者が BN server 上のデータベースにアクセスして直接解析できるようになるとともに、サーバー上に掲示版を設定し情報共有の補助とした。今後、精度の高いデータを蓄積し得るシステム管理が実用的な BN server 運用の鍵と考えられる。2010 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。2010 年に分離された EHEC の PFGE 解析結果は、BN 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、1819 株に対して 2010 年に分離された新しいサブタイプとして 661 種類、2009 年に分離されたことのあるサブタイプが 48 種類、その他が 75 種類見いだされた。また、EHEC O26 では、350 株に対して 159 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 34 種類存在したが、そのうち 7 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。2010 年 6～7 月に東海地方を中心とした O157 の広域発生では、共通 PFGE パターンを示す分離株において Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) でも大部分の株が同一リピート数を示し、共通感染源の存在を強く示唆する結果となった。

A. 研究目的

細菌性食品由来感染症の調査において、食品或いは患者由来株の細菌学的な解析を行

い、その結果を関係機関で共有することで、当該事例の早期探知、拡大阻止に結びつけることを目的とした。そのために、まず腸管出

血性大腸菌の PFGE 等による解析から国内分離株の遺伝子型に基づく動向を調べた。また、PFGE 解析結果のデータベースを共有するために、BN server の設置によるネットワークの構築を行った。

B. 研究方法

平成 22 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。PFGE 解析結果のデータベース化を BioNumerics (Applied Maths 社) により行うとともに、結果については、E-mail により菌株送付機関に返信し、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 (URL; <http://www0.nih.go.jp/~terajima/opn/index.html>)。全国 6 ブロックの研究分担者に対しては、昨年度に設置した感染研細菌第一部の BN server との internet を介した通信を確立し、サーバー内のデータベースへ直接アクセスしてデータをアップロード、ダウンロードするシステムを構築した。また、情報共有の補助の目的で同サーバーに PulseNet Japan の掲示板も設置した (<https://jpulsenet.nih.go.jp/cgi-bin/login.cg>)。いずれのアクセスも、分担研究者の ID とパスワードが必要となっている。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。PFGE 及び MLVA の結果は BioNumerics を用いて解析した。

C. 研究結果

1. PFGE 解析結果とデンドログラムによるサブタイピング

EHEC 0157 については、2010 年に分離・送付された 1819 株が、2010 年に分離された新しいサブタイプとして 661 種類、2009 年に分離されたことのあるサブタイプが 48 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 026 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)。後述するように、EHEC 0157 では散发事例由来株においても *Xba* I 消化による PFGE 解析結果において同一クラスターに属する分離株が検出された。0157 以外の血清群の株については、このようなクラスター形成をする広域散发事例由来株はみられなかった。

2. EHEC0157 における広域共通パターンを示す株の解析

2010 年に分離された 1819 株の EHEC 0157 は、661 種類のサブタイプに分かれ、そのうち 34 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。これらのなかで、特に分離地域数の多いパターンについて、6 ヶ所以上の異なる都府県から分離されデンドログラム上でクラスターを形成している株を、そのパターン名である Type No. (TN) で表示した (図 1)。分離地については、2007 年から連続して分離されているパターンである TN c57、及び N c293 が 2010 年においても見いだされた (図 3, 4)。分離時期に

関しては、TN c57 が約 3 ヶ月、TN c293 が約 5 ヶ月に渡って分離されていた。TNc57 では、三重県の中高で集団発生をひきおこしているが他県での散発事例の関係については不明である。TNb864 については、約 4 ヶ月に渡って分離されており、高校及び保育園での集団発生を引き起こしていた (図 3)。TNf34 では 2 ヶ月にわたって主に九州北部で分離されており、TNd482 では 6 ヶ月にわたって主に中国地方と近畿地方の一部で分離されていた (図 5)。2010 年に初めて分離された TNf91 及び f93 については、7 月上旬に愛知県、三重県で集中的に分離され、一部については生レバーの流通と喫食歴との疫学的関連が明らかになった。その後、8 月中旬～下旬に埼玉県、神奈川県、栃木県、静岡県で分離され、9 月上旬に三重県、長野県、岐阜県、さらに 10 月上旬に岐阜県で分離されたが、8 月以降の分離株についてはいずれも散発事例由来株でその疫学的関連については不明である。当該パターンの事例については、一部に疫学的に関連する事例が含まれ個別の散発事例とすることが困難であることから、該当する各自治体における分離株数での表記とした (図 6)。TNf91 と f93 の XbaI-PFGE パターンは、相互に 1 本程度の違いがあるものの、BlnI-PFGE についてはほとんどの株で同一パターンを示した。2010 年に初めて観察された PFGE パターンを示す 32 株と TNf91/93 を示す株 81 株について MLVA を実施したところ、これらの株は主に 3 つのクラスターを形成しており (図 7 デンドログラム及び Minimum Spanning Tree(MST))、そのうちの 2 つのクラスターに属する株では、1 遺伝子座で繰り

返し数が 1 だけ異なる極めて類似したタイプであった。残りのクラスターの株では、2 遺伝子座でリピート数が 1 またはそれ以上異なっていた。また、その他にも MLVA タイプの異なる複数の株が存在した (図 7)。

3. BioNumerics server を利用したネットワークの構築

平成 21 年度に設置した BN server によるオンラインシステム (PulseNet Japan: URL <http://jpulsenet.nih.go.jp/>) において、全国 6 ブロックの分担研究者からのアクセスを確認した。今後データベースへ直接データを送信することが可能となるが、現在のデータ品質を維持しつつ蓄積していくためには受信するデータ規格の統一性が必要である。特に、データの根幹となる泳動像ファイルの送受信が発生するため、ファイルサイズが 300kb 前後であることが望ましく、高解像度の巨大ファイルは受け付けられない。また、情報共有のツールとして、サーバー上に掲示板を設置し分担研究者にアクセス権を設定した (図 8)。BN を使用した送受信とは別で、通常の internet 経由であるため、柔軟な運用が可能である。

D. 考察

異なる数ヶ所の都道府県における広域散発事例でありながら PFGE パターンが同一と考えられる EHEC O157 は、3 ヶ所以上である場合は毎年 30～40 種類が検出されている。2010 年では、7 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、2010 年に初めて分離された TNf91 及び f93 については、7 月上旬に愛知県、三重県で集中的に分離され、

一部については生レバーの流通と喫食歴との疫学的関連が明らかになった。しかしながら、その1~2ヶ月後に分離された同一パターンを示す株についてはいずれも散发事例由来株でその疫学的関連については不明である。また、後半の時期に分離された株については、MLVAの結果でも前半分離株とはわずかにリピート数の異なる株が含まれており、分離時期の異なる株が同一感染源由来ではない可能性も考えられた。MLVAの解析結果の変異の度合いについては、集団発生株については1遺伝子座について1~2リピート程度の変異があり得ることが報告されている。したがって、f91/93のパターンを示すEHEC 0157についても、分離時期・地域が異なってもこの範囲内の変異である場合は、相互の関連性があり得ると考えられるが、疫学的な関連性を示す情報は得られていない。また、c293, c57等の長期にわたる広域分離株では、MLVAの結果でも少しずつ変異していることが明らかになっていることから、2010年に分離されたEHEC 0157のc293, c57においても以前の分離株とは感染源が異なっている可能性が考えられる。

BNによるPFGE画像データの送受信に基づいたデータベースの更新が可能となった。分担研究者がBN serverにアクセスすることにより、データベースにあるデータをダウンロードして解析することができるが、情報量が膨大にならないように画像解像度等の制御が必要である。今後、サーバーにアップロードする情報を統一的に管理することが重要となる。

E. 結論

BN serverによるデータベースを有効に利用するために、入力データの統一的基準を設定し、適切な精度管理による正確なデータ確保が重要である。EHEC 0157における同一PFGEパターンを示す株が、MLVAでどのような動態を示すかを継続的に監視する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

1. Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: 0157, 026, and 0111. *Microbiol Immunol.* 2010, 54, 569-577.

2) 学会発表

1. 寺嶋 淳 食中毒事件の原因究明やディフューズアウトブレイクの早期発見に向けた検査技術開発と全国ネットワークー腸管出血性大腸菌感染症を例にー 第69回日本公衆衛生学会総会、東京、2010
2. 伊豫田淳, 寺嶋淳, 大西真 腸管出血性大腸菌におけるLEE遺伝子群のマスターレギュレーターPchのグローバル発現制御機構の解析 第92回日本細菌関東支部総会、東京、2010
3. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部治郎、石原朋子、大西 真 腸管出血性大腸菌の分子疫学と広域ネットワーク 第59回

日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京、2010

4. 伊豫田 淳、本田尚子、寺嶋 淳、大西 真 LEE遺伝子群のマスターレギュレーター Pchの分別発現制御機構の解析 第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、宮崎市、2010

5. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部 治郎、石原朋子、大西 真 最近の腸管出血性大腸菌感染症の動向について 第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム、宮崎市、2010

6. 寺嶋 淳、伊豫田淳、泉谷秀昌、三戸部 治郎、石原朋子、渡辺治雄 Molecular epidemiological investigation of Enterohaemorrhagic Escherichia coli infection in Japan; Perspectives and problems. 腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学研究の現状と課題、第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010

7. 勢戸和子、田口真澄、寺嶋 淳 Molecular typing of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 by using the IS-printing System. IS-printing Systemによる志賀毒素産生性大腸菌O157遺伝子型別の有用性、第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010

8. 伊豫田淳、寺嶋 淳、泉谷秀昌、大西 真、渡邊治雄 腸管出血性大腸菌ワーキンググループ Virulence traits of EHEC O157:H7 clade 8, a possible high virulent lineage、第83回日本細菌学会総会、横浜市、2010

H. 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

図 2

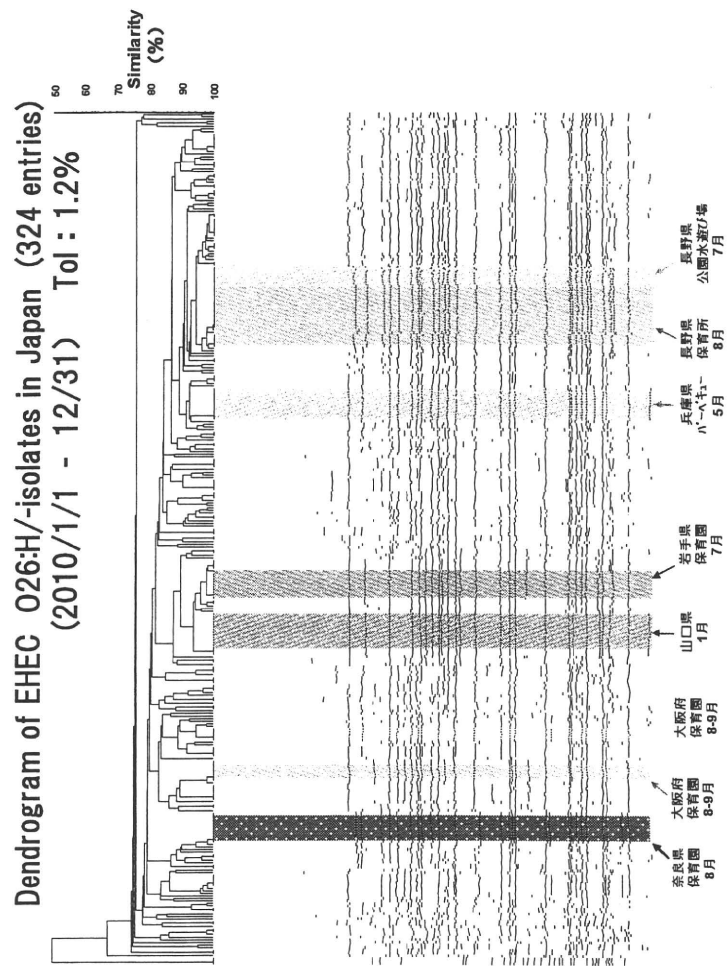


図 1

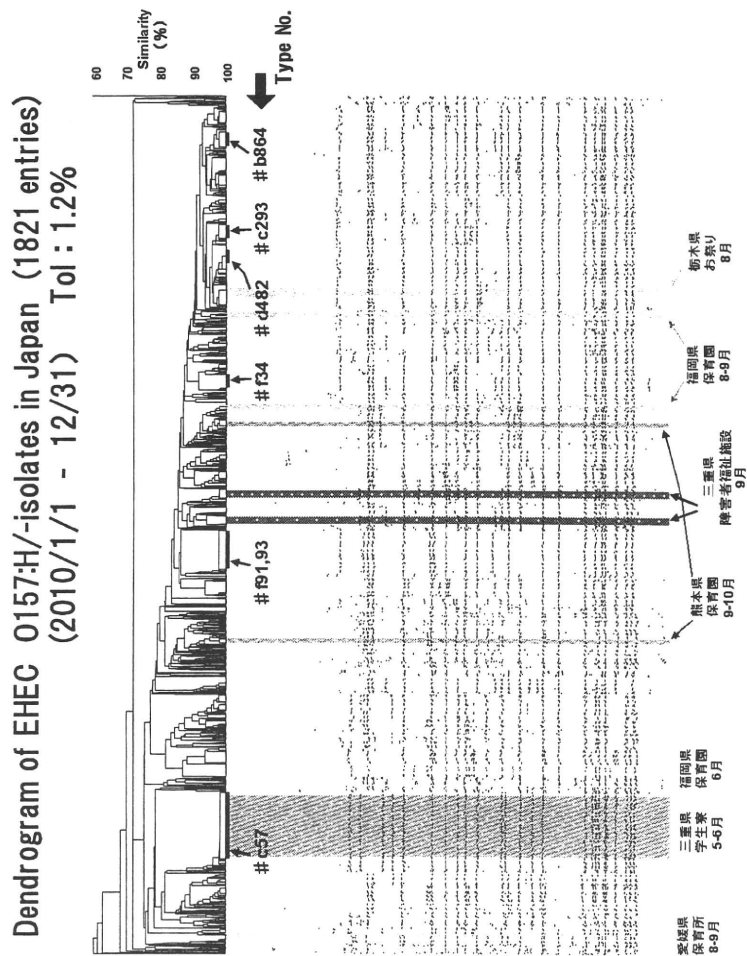


図 3

2010年 PFGEパターンの一致している事例の分布図 (I)

- ★ Type No.b864, Jun-Sep
- Type No.c57, Jun-Oct

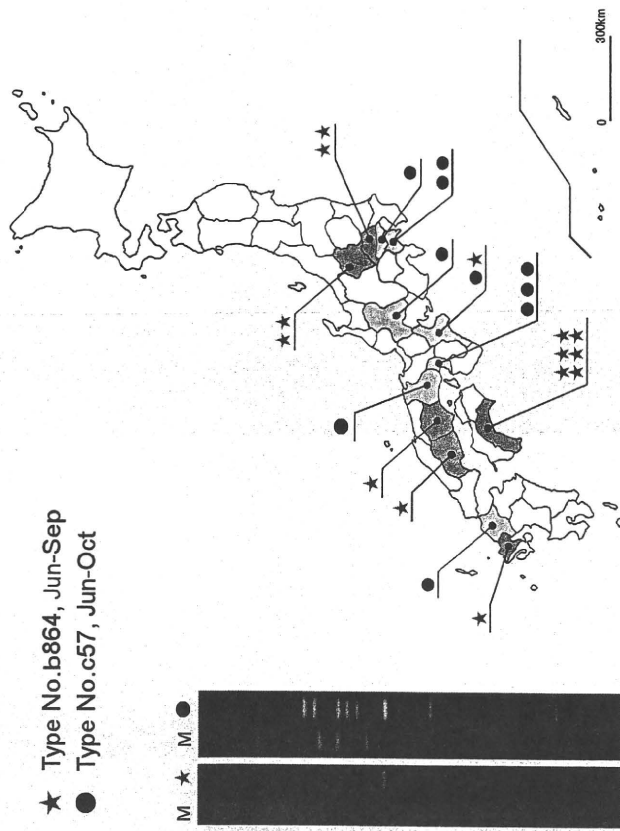


図 4

2010年 PFGEパターンの一致している事例の分布図 (II)

- Type No.c293, Jan-Oct

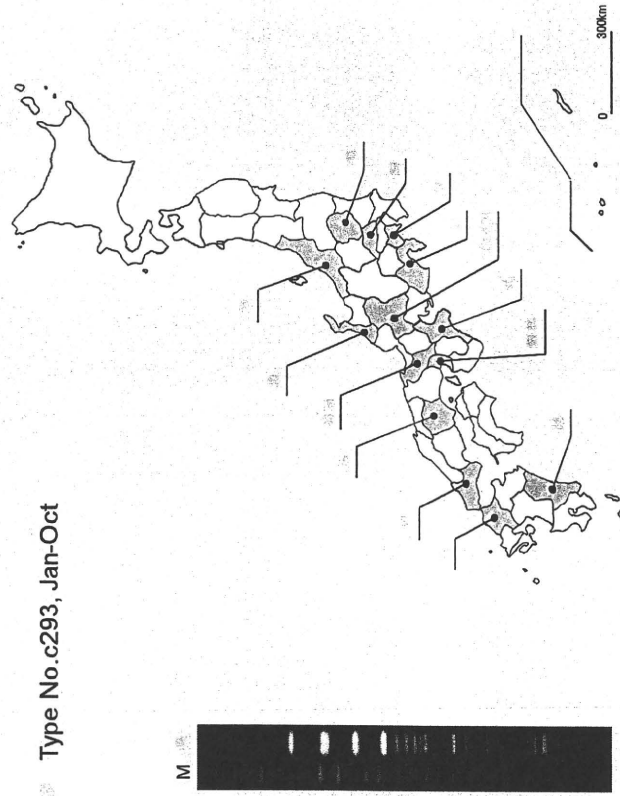


図 5

2010年 PFGE/パターンの一致している事例の分布図 (III)

- ▲ Type No.f34, May-Jun
- ◎ Type No.d482, Apr-Sep

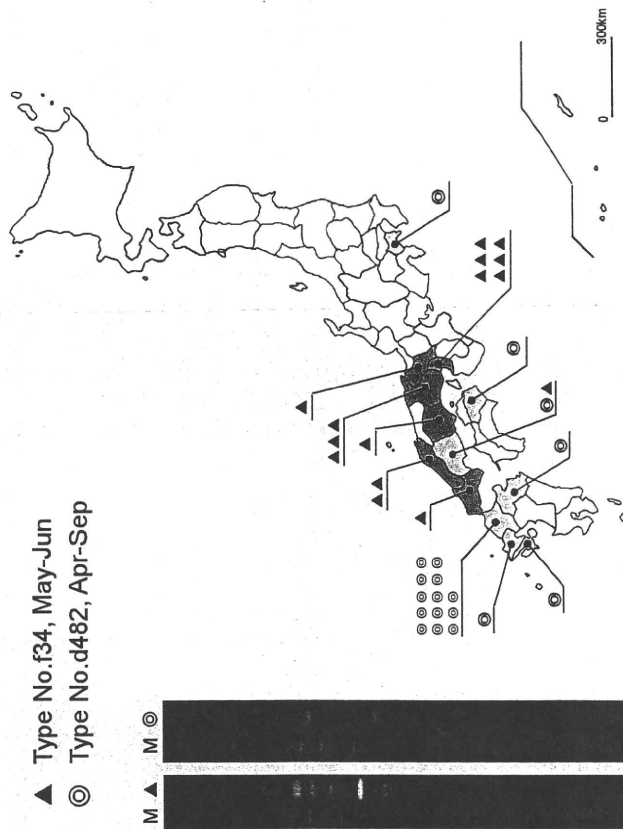


図 6

2010年 PFGE/パターンの一致している事例の分布図 (IV)

Type No.f93 / 91, Jun-Oct

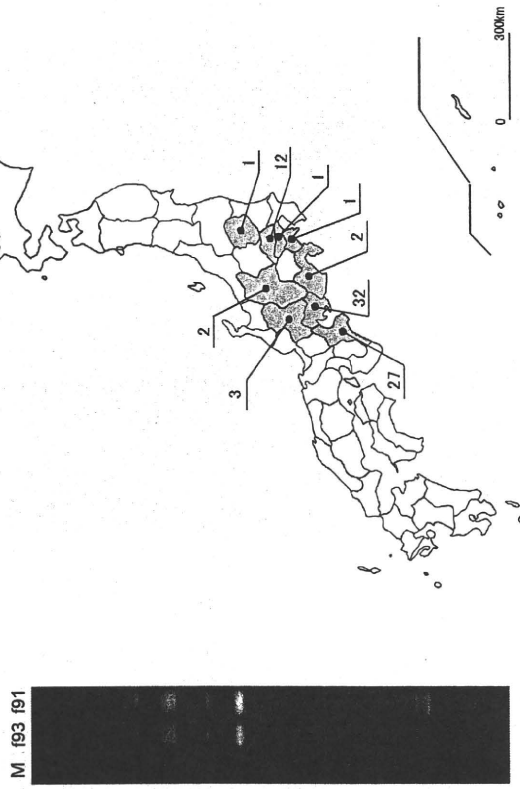
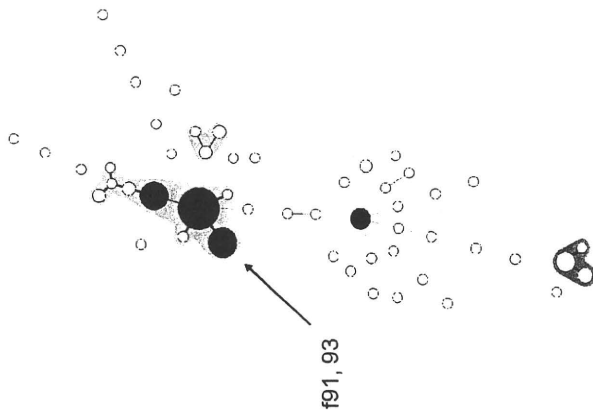
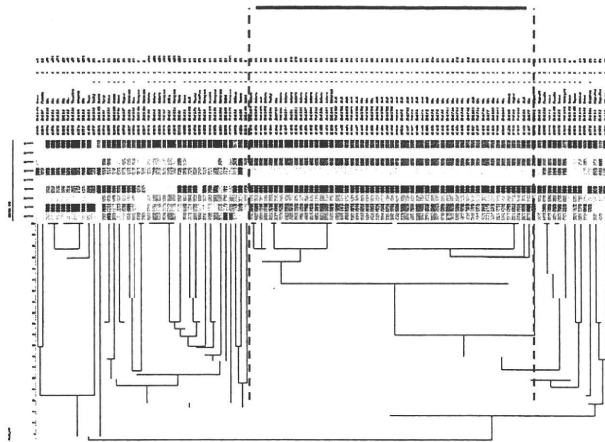


図 7

Dendrogram of EHEC O157, 2010, (n=113)



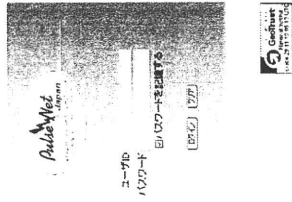
MST

PulseNet Japan 掲示板

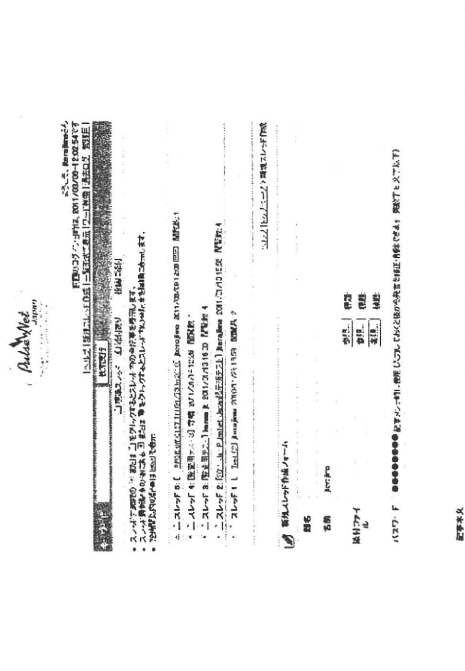
URL: <https://pulsenet.nih.go.jp/cgi-bin/login.cgi>

図 8

入口



掲示板



「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

北海道・東北・新潟ブロックにおけるパルスフィールドゲル電気泳動システムの
共通外部精度管理の実施方法について

分担研究者	清水 俊一	北海道立衛生研究所
協力研究者	山口 敬治、森本 洋、池田 徹也	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
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	沖村 容子、高橋 恵美	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
	細谷 美佳子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地 敬	札幌市衛生研究所
	勝見 正道	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（以下 PFGE）法によるパルスネットの構築のためには、各検査施設における精度管理が重要であり、北海道・東北・新潟ブロックでは平成 18 から 20 年度に行われた「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」の中で、共通の生菌を送付して行う精度管理以外の方法としてプラグ送付による精度管理方法について検討を行った。また、本研究の平成 21 年度には、プラグ作成部分の精度管理方法として、各地研が分子マーカーとして使用している *Salmonella Braenderup*H9812 株（以下 SB 株）でプラグを作成し北海道衛研に送付させ、制限酵素処理、PFGE を行い、泳動像を解析する方法を試みた。今回、これらの研究で得た結果を元に実際に制度管理を実施して有効性、問題点を検討した。制度管理方法としては、SB 株で菌濃度の異なるプラグを作成し、これを送付して、各地研で作成した SB 株のプラグとともに制限酵素処理を行い、その泳動像を送り返すという方法で行った。各地研の PFGE 泳動像は、ほぼ同様の結果を得ることができたが、一部地研でバンドのピントがあまく、167.1 と 173.4Kbp のバンドの識別がつけづらかった。また 1 地研で、プラグのマウントでプラグが曲がったためと思われるバンドの乱れが認められた。プラグのやり取りにより PFGE の精度管理を行う方法は、輸送コストの軽減と、生菌を送る場合のリスクをなくせ、定期的な外部制度管理方法として有用であった。

A. 研究目的

食中毒事件発生時に行う疫学調査は、食品由来感染症の拡大を防ぐと共に、再発防止のために大変重要なものである。近年、腸管出血性大腸菌 O157

やカンピロバクター等の原因菌の DNA を用いた分子疫学的分析が感染源究明に利用され、その有用性が報告されている。その中で PFGE 法は、特に優れた分子疫学的解析法であり、国立感染症研

究所を中心にデータベースの構築(以下 Pulse-net)が進んでいる。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、Pulse net には各施設の精度管理が欠かせないものである。PFGE の精度管理方法としては、共通の菌株をそれぞれの施設に送り、プラグを作成し、制限酵素処理、泳動、泳動結果の解析を行って、施設間格差を最小限にすることが行われている。この方法は、PFGE の全行程を確認することができ、それぞれの施設の問題点を確認する上で有用であるが、その反面、病原菌をそれぞれの施設に配布しなければならず、輸送コストの面や、輸送時の事故による病原菌の流出等のリスクが伴うため、定期的な外部制度管理を行う上で問題がある。

これらのリスクを回避する方法として、北海道・東北・新潟ブロックでは、プラグを送付して精度管理を行う方法について検討してきた。平成18～20年度に行われた「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」において、共通の菌株で作成したプラグをブロック内協力地研に送付し、制限酵素処理、PFGE、結果解析を行い、プラグ送付による精度管理方法の有用性を明らかにした。また、去年は、各地研が保存している PFGE 用マーカー菌株、SB 株を使用し、プラグ作成までの精度管理方法の検討を行った。

今回、これらのプラグを使った制度管理方法の検討で得られた結果を元に、共通外部制度管理の実施方法について検討を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

PFGE 用マーカーとして保存している SB 株を使用した。

2. プラグの作成

平板培養により単一コロニーを作成し、これを LB broth, Lennox (DIFCO 製) 10mL に摂取し、一夜培養後、暗視野顕微鏡を使用しておおよその菌量を測定した後、サンプル A が $3.6\sim 4.0\times 10^8/\text{plug}$ 、サンプル B が $3.0\sim 3.3\times 10^8/\text{plug}$ 、サンプル C が

$2.3\sim 2.6\times 10^8/\text{plug}$ 、サンプル D が $1.8\sim 2.0\times 10^8/\text{plug}$ になるように菌液量を調整し、感染研ニュープロトコールに従いプラグを作成し、プロテナーゼ K 処理及びペファブロック処理を施した。

3. 輸送方法

輸送用バッファーとしては、北海道衛研で通常プラグ保管用に使用している 0.5M EDTA (pH8.0) を使用した。2 mL のマイクロチューブ (丸底スクリューキャップタイプ) にバッファー1.5mL を加え、これにサンプルプラグキャストの1プラグ分を入れ、蓋をしてパラフィルムでシールし通常郵便で送付した。

4. 制限酵素処理

制限酵素は *Xba* I を使用し、各地研が普段行っている量と時間で行った。

5. PFGE

送付したプラグと各地研で作成したプラグを同時に処理し、それぞれのプラグの切り出しサイズでコームにのせ、各地研で実施している泳動条件で泳動を行った。

6. 結果の解析

泳動結果は、写真撮影後、電子メールの添付ファイルで北海道衛研に返送させ比較検討した。

7. アンケート調査及びプロトコールの確認

各地研に対し、プラグの到着日、実験開始日及び終了日、PFGE 実施経験、送付プラグの破損の有無、試験品送付方法の適否、試験品選定方法の適否、制度管理に関する意見について確認した。また、各地研が今回行ったプロトコールについて、培養方法、菌量の調整方法、プラグ作成方法、制限酵素処理方法、電気泳動方法、ゲル写真撮影方法について回答を求めた。

C. 研究結果

1. アンケート及びプロトコール調査

プラグは1～2日で各地研に到着した。

いずれの地研に送付したプラグも破損は認められなかった。また、送付方法、試験品の選定についても、適と判断された。各地研の研究協力者の PFGE 実施経験は全員2年以上であった。

PFGE 制度管理に関する意見としては、「菌株送付の煩雑化など、実験を伴う共同研究の実施がなかなか難しくなっている状況下において、プラグの送付による共同研究は現実的な選択肢かと、益々感じるようになってきています。」との意見があった。

今回、実施したプロトコールについては、6地研が平板培養から菌塊を取り菌液調整し、4地研が液体培地により培養後菌液を調製していた。菌量の測定方法は、濁度計が2地研、マックファーランド比濁法が3地研、光度計（OD600nm：0.7）が1地研、培養時間が2地研、白金耳による掻き取りが1地研であった。また、制限酵素量は、ほとんどの地研が30U/plugで、処理時間は、Over Nightが3地研、4時間が2地研、2時間震盪が3地研、19時間が1地研であった。

2. PFGE の結果

スメア状態となりバンドが確認できない地研はなかった。泳動像は、制限酵素処理時間に関係なく、全ての地研で良好であったが、H地研でバンドに乱れが認められた。

北海道衛研から送付したプラグと比較して、6地研がサンプルDよりも薄いバンドを示し、C地研がサンプルDと同等、I地研がサンプルCと同等、H地研がサンプルAとBの間であった。

C地研は、菌量の調整をプロセスの培養時間で決定しており、その時間は18時間であった。また、I地研は、白金耳での掻き取り量で決定していた。サンプルAとBの間であったH地研では、マックファーランドNo.5によって菌量を決めていた。

167.1と173.4Kbpのバンドの識別では、2地研で写真のピントがあまく識別しづらい状況であったが、残りの地研ではほぼ識別することが可能であった。写真撮影は、撮影装置を使用している地研が6地研、デジカメ使用、CCDカメラ使用が各1地研、ポラロイドカメラ使用が1地研で、もっとも鮮明な写真は、ポラロイドカメラによって撮影された物であった。

D. 考察

今回、制度管理に使用したプラグは、サンプルAで $3.6\sim 4.0\times 10^8$ /plug、サンプルBで $3.0\sim 3.3\times 10^8$ /plug、サンプルCで $2.3\sim 2.6\times 10^8$ /plug、サンプルDで $1.8\sim 2.0\times 10^8$ /plugと、多めに菌量を調整した。今回行った精度管理において、サンプルDよりも薄いバンドを示したA地研とD地研はともにマックファーランド比濁法で0.5程度の菌液を使用していた。マックファーランドNo.0.5は、ほぼ 1.5×10^8 CFU/mLの菌量に相当し、今回の送付サンプルとの比較と良く一致した。また、E地研は、吸光度（OD600）で0.7に調製しているが、これは、ほぼ 1.2×10^9 CFU/mLに相当し、この菌液を200 μ L使用しているため、 1.2×10^8 /plugに相当し、これも送付サンプルとの比較に一致した。これらの結果から送付サンプルとのバンドの比較により各施設のプラグ当たりの菌量を推定することが可能であり、菌量調整方法についても精度管理可能であった。

しかし、今回の送付サンプルは、菌量の誤差が起り難いようやや多めに菌量を調整したため、多くの地研でサンプルA、Bのバンドが太くなってしまった。今回のサンプルにおいてサンプルDでも菌量の誤差は認められなかったことから、今後の精度管理では、 2.5×10^8 /plugを上限に菌量を調整し、低い菌量のプラグでのバンドの確認等についても行えるよう更に検討する必要があると考える。

1レーン当たりの菌量は、コームにのせるプラグの幅によって変化する。また、コームにのせるプラグの幅が薄ければ薄いほどシャープなバンドが得られることが知られている。しかし、薄くすれば、コームにのせる時に曲がったりし、バンドが変形することもあり、ある程度の幅が必要である。今回、各地研の切り出したプラグの幅については確認していないので、今後のプロトコール確認にプラグの切り出し幅についても確認する必要があると思われる。また、プラグの切り出し幅による泳動像への影響についても検討を行い、もっとも良い、共通精度管理検体の作成方法についても更に検討する必要があると考える。

今回、菌量の測定方法として、菌の産出物などの影響を受けず、確実に適正な菌濃度を決定する方法として、暗視野顕微鏡を使って菌量測定を行った。この方法では、菌体自体をカウントするため他のものの影響を受けにくいという利点があり、また、平板培養法によるコロニーカウントに比べて迅速、簡便に結果が得られる利点があるものの、顕微鏡による菌体確認は、ある程度の慣れが必要であるという欠点もある。今回測定した一夜培養液の菌量は、顕微鏡観察法では、 $1.1\sim 1.2\times 10^9/\text{mL}$ で有り、平板法では、 $9.8\times 10^8/\text{mL}$ であった。このことは顕微鏡観察法で使用上支障のない菌量測定が可能であり、今後の精度管理検体作成上有用であると思われる。

プラグの送付による精度管理方法では、プラグの作成段階の精度管理と、制限酵素処理・PFGE・画像解析段階の精度管理をそれぞれ、別個に行うことが可能であり、今回の調査で、北海道・東北・新潟ブロックでの精度管理として、各地研の菌量の調整方法の評価と制限酵素処理・PFGE・画像解析部分の評価が可能であることが判明した。

今後は、実効性のある外部精度管理にできるよう、これらの結果の評価方法について検討する必要がある。また、定期的な精度管理を行う上では、常に一定の菌量で安定したプラグの作成方法に

ついて検討する必要と、その他の菌についても同様に実施するための方法の検討をする必要がある。菌量の測定方法、均一なプラグの作成方法について更に検討を加える必要があると考える。

E.結論

プラグを使った精度管理方法において、輸送における、プラグの破損やPFGEの泳動結果への影響は認められなかった。

プラグ作成において菌量の調整方法が重要であるが、今回、菌量の異なるサンプルを送付し、各地研で作成したプラグとの泳動像での比較により、作成されたプラグの菌量を確認することが可能であった。

精度管理用プラグの作成方法として、菌量を暗視野顕微鏡で測定する方法は、平板培養法の菌量測定と比較して使用上支障ない測定方法であり、プラグ当たりの菌量を明らかにした精度管理用プラグの作成が可能であった。

F.健康危機情報

特になし

G.研究発表

なし

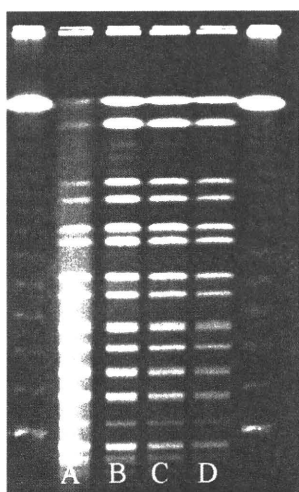


图1 北海道

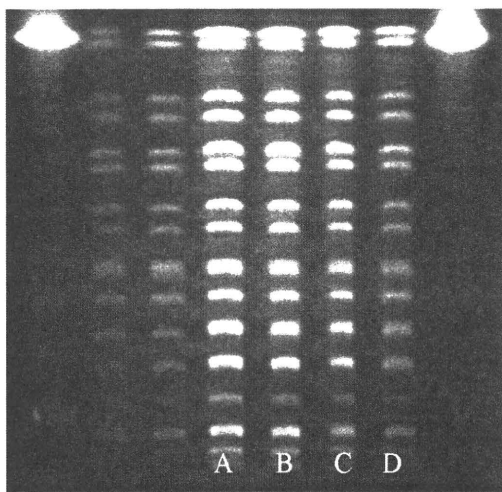


图2 A地研

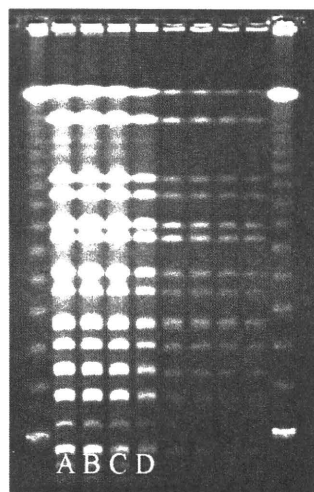


图3 B地研

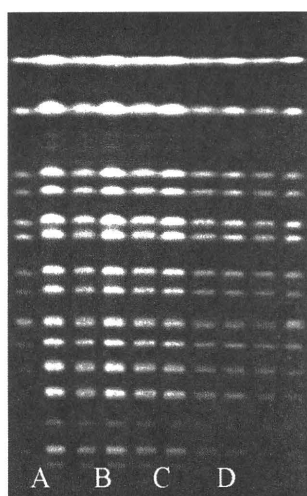


图4 C地研

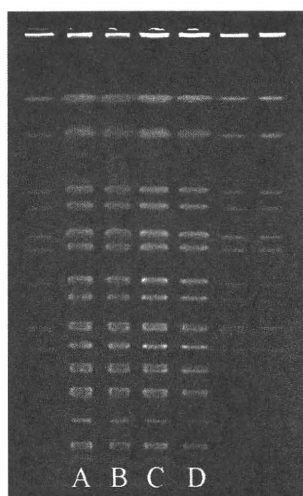


图5 D地研

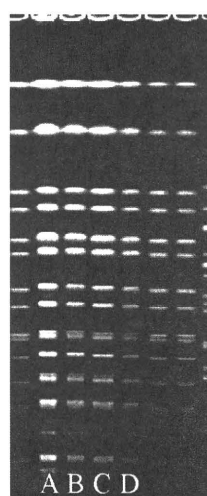


图6 E地研

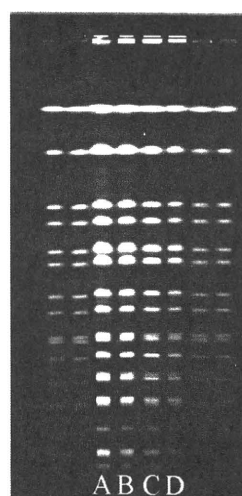


图7 F地研

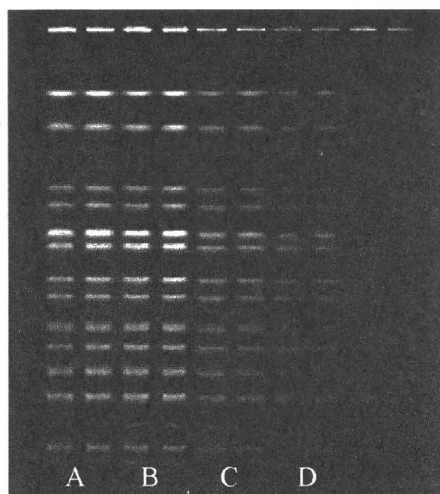


图8 G地研

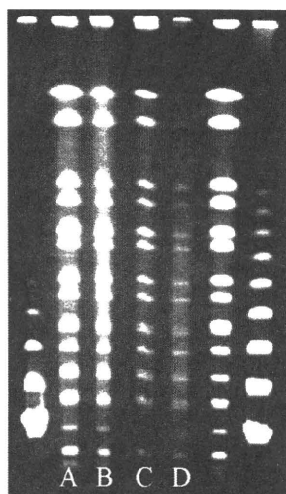


图9 H地研

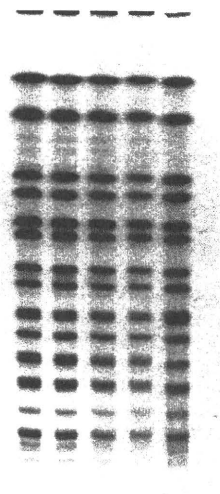


图10 I地研

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

平成 22 年度 研究分担報告書

関東ブロックにおける PFGE 法の精度管理および菌株の
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	白田 忠雄	茨城県衛生研究所
	内藤 秀樹	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
	横山 栄二	千葉県衛生研究所
	古川 一郎	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	植松 香星	山梨県衛生環境研究所
	笠原ひとみ	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 5 株を用いて、11 施設で PFGE 解析を行った。多くの PFGE 画像はシャープで明瞭なバンドが得られていたが、一部にはバンドの分離が不十分である施設も認められた。各施設から送られた画像をもとに解析を行った結果、同じ菌株は同じクラスターを形成していた。しかし、いずれも全ての施設で 100%一致となった株は無かった。写真を目視で比較すると同じパターンであることは判断できるが、画像解析ソフトを使ってデンドログラム解析をすると 100%一致とはならなかった。この理由として泳動されたバンドの選び方、写真の取り込み方あるいは手技等の問題が考えられるが、どこが問題となっているのかは明確ではない。異なる施設で行った PFGE 画像でも 100%一致となるような条件等について今後さらに検討していく予定である。

IS-printing system (IS) 法による解析は迅速性かつ異なる施設間での比較が容易であるというメリットがある。また、PFGE 解析では比較できない株（スメア株）については IS 解析が有効であることが確認できた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌による食中毒・感染症は全国で年間約 3000 事例報告され、一向に減少する傾向はない。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 Diffuse outbreak (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 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る必要がある。そのためには、分離菌株の迅速で正確な分子疫学的解析が必要であり、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不可欠である。

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 IS 法による解析を実施し、その活用方法および有用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、2010 年に分離された腸管出血性大腸菌 0157 5 株 (VT1+VT2 産生株 3 株, VT2 産生株 2 株) を供試した。

2) PFGE 解析

感染研プロトコールにより行った。

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 時間行った。

制限酵素処理: 制限酵素 *Xba*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 で消化したものを用いた。

PFGE 写真の撮影: 各地研で通常おこなっている方法で撮影した。

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 BioNumerics (Applied Math 社) を用いてデンドログラム解析を行った。

2. IS-printing system 解析

1) 共通菌株を用いた IS 法による解析

精度管理用の共通菌株 5 株について、各施設で IS 法により解析を行い、結果を比較した。

2) PFGE 法で解析できない株 (スメア株) の検討

2010 年に東京都および埼玉県で散発事例として分離された株のうち、PFGE 解析ではスメアとなり型別できなかった 0157 について IS 解析を行い、結果を比較した。

3. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例への応用

各地方衛生研究所で経験した PFGE 解析が有効に活用された事例について報告する。

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。写真の取り込みは、各地研で通常行っている方法で行った。多くの PFGE 画像はシャープで明瞭なバンドが得られており、良好なものが多かった。しかし、一部にはバンドの分離が不十分である施設も認められた。今回は、写真の読み込み方法までは細かく指定せず、各施設で行っている方法で実施した。このため、各施設で写真の大きさにばらつきが認められた (写真 1)。解析時にバンドを選ぶ際は、ある程度バンドが大きく撮影されている方が選びやすいが、中には写真が小さく、バンドの選択が困難であった施設や画像が粗くバンドを選ぶことが困難な施設もあった。

各施設で PFGE 解析を実施した後、

写真を電送してもらい、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。これまで解析用ソフトとして Fingerprinting II (Bio-Rad 社) を用いてきたが、今年度からは新しく通信機能を備えた BioNumerics を導入し、解析を試みた。同一菌株で施設間の比較をした結果、同じ菌株では同じクラスターを形成していた。しかし、同じクラスターの中でも更に 2~3 グループ分類されてしまい、いずれの菌株も全てが 100% 一致となった株はなかった。特に、菌株 No. 2 は変異しやすい株であったためか、施設によってバンドの数が異なってしまう、相同性は低くなってしまった (図 1)。

今回電送された写真の中には、マーカー株 (*S. braendrup* H9812 株) のバンドが 2 本脱落している施設が 1 施設あった。詳細については現在確認中である。

2. IS-printing system 解析

1) 共通菌株を用いた IS 法による解析

精度管理用の共通菌株について各施設で IS 解析を実施した。PCR 法でバンドが認められた場合を「1」、認められない場合を「0」として判定表に記入し、IS パターンを比較した。

今回の解析ではいずれの施設もほぼ同一の結果であった。しかし Primer セット 2 の高分子領域のバンドが見難く判定が困難な場合が認められた。IS 法は PFGE 法に比べ PCR 増幅バンドの有無で比較するため、施設間の比較が

容易であった。施設間で分離菌株の比較を行う際は、PFGE 画像のみではなく、IS 解析結果を添付することで比較が容易になると考えられた。

2) PFGE 法で解析できない株（スメア株）の検討

東京都で分離された 0157 のうち 6 月に分離された 6 株および 8～9 月に分離された 9 株が PFGE 法でスメアとなった。これらの株について IS 法による解析を行った結果、6 月分離株と 8～9 月分離株とは IS 解析結果が異なっており、それぞれ異なる由来であることが示唆された（事例 1）。

同時期に埼玉県でもスメア株が 4 株検出されたため、IS 法による解析を実施し比較した結果、埼玉県由来の 3 株と東京都 6 月分離株の IS パターンが一致したことから、これらの株の由来は同一である可能性があることが示唆された。

この様に、PFGE 解析では比較できない株については IS 解析が有効であることが確認された。

3. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例への応用

各施設で経験した PFGE 解析が有効に活用された事例について事例 2～9 にまとめた。

D. 考察

今年度から新しい解析ソフト（BioNumerics）を導入したため、新たにデータベースの構築を行った。本

ソフトは通信機能を備えており、感染研のデータベースへアクセスし PFGE パターンを比較することが可能である。今年度はまず、感染研のデータベースへアクセスするための設定を行った。

各地方衛生研究所で実施する PFGE 法の標準化を目的とし、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、画像解析ソフトを用いて解析を試みた。

今年度は PFGE に用いる基本的なブロック作製方法の統一は行ったが、写真撮影は各施設が通常行っている方法で行った。デンドログラム解析の結果、同一菌株は同一クラスターを形成したが、全ての施設で 100%一致を示した株は認められなかった。写真を目視で比較すると同じパターンであることは判断できるが、画像解析ソフトを使って解析すると 100%一致とはならない。この理由として泳動されたバンドの選び方、写真の取り込み方あるいは手技等の問題が考えられるが、どこが問題となっているのかは明確ではない。少なくとも今回は、泳動条件は統一しているので、それ以外の問題だと考えられた。異なる施設で行った PFGE 画像でも 100%一致となるような条件等について今後更に検討していく予定である。今年度の関東ブロックは 11 施設中 3 施設で担当者の異動があった。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