

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

「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」

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
	野呂 キョウ	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
	山口 友美	宮城県保健環境センター
	瀬戸 順次、鈴木 裕	山形県衛生研究所
	千葉 一樹	福島県衛生研究所
	新井 礼子	新潟県保健環境科学研究所
	廣地 敬	札幌市衛生研究所
	千葉 久子	仙台市衛生研究所

研究要旨：パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）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る。精度管理方法としては、生菌を送付してプラグ作成、制限酵素処理、PFGE、泳動像の解析を行うことが一般的である。しかし、生菌の送付には多くのリスクが伴う。北海道・東北・新潟ブロックでは、生菌にかわる精度管理方法としてプラグを送付する方法での精度管理方法を検討した。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、これを北海道衛研に送付して、制限酵素処理、PFGE を行い、泳動像を解析する方法を試みた。その結果、送付によるプラグの破損等は認められず、ブロック内 10 地研のうち 8 地研がクラスター分析（類似係数：Dice、デンドログラムタイプ：UPGMA、トレランス設定：1.0%）で 99%以上の相同性を得ることができた。しかし、残り 2 地研のうち 1 地研は 310.1Kbp のバンドが 2 本に別れ、他の 1 地研は、452.7Kbp のバンドがずれていた。この 2 施設については、保存株の変異が考えられた。平成 22 年度には、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きづらかった。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。平成 23 年度には、各地研で分離された腸管出血性大腸菌を使用してプラグを作成し PFGE を行い、また、同時に作成したプラグを北海道衛研に送付し PFGE を行い、それぞれの泳動像を比較する方法で精度管理を実施した。また、精度管理用プラグ作成時の菌量測定方法の検討として、暗視野顕微鏡による菌数測定と Misra 法によるコロニー数を比較し、簡易菌数測定法について検討した。

## 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 構築のためには各施設の精度管理が欠かせない。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。そこで本研究では、これらのリスクを回避し、定期的な精度管理実施方法として、プラグを送付して精度管理を行う方法について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 平成 21 年度

各地研で PFGE 用マーカーとして保存している SB 株を使用し、それぞれのプロトコールに従いプラグを作成し、制限酵素処理前の段階まで処理した。このプラグをバッファーが入った 2mL のマイクロチューブ(丸底スクリューキャップタイプ)に入れ、蓋をしてパラフィルムでシールし通常郵便で北海道衛研に送付した。送付されたプラグを制限酵素 *Xba* I (TaKaRa) で 30units/plug、処理温度 37°C、処理時間 6 時間、処理し、コームにのせる切り出し幅をほぼ 2mm になるように心がけ、同一条件で PFGE できるよう注意して、パルスフィールドゲル電気泳動装置 CHEFF DRII

(BIO-RAD) を使用し、泳動条件は、6V、2.2~54.2sec、21hr、buffer 0.5×TBE、温度 14°C で実施した。また、マーカーとしては Lambda ladder (BIO-RAD) を使用した。

泳動結果の解析は、Fingerprinting II を使用し、クラスター解析の条件は、類似係数: Dice、デンドログラムタイプ: UPGMA、トレランス設定: 1.0% で行った。

### 2. 平成 22 年度

菌株は SB 株を使用し、サンプル A が  $3.6\sim 4.0 \times 10^8$ /plug、サンプル B が  $3.0\sim 3.3 \times 10^8$ /plug、サンプル C が  $2.3\sim 2.6 \times 10^8$ /plug、サンプル D が  $1.8\sim 2.0 \times 10^8$ /plug になるように調整した A から D までの 4 種類のプラグを作成し、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。これらのプラグをバッファーが入った 2mL のマイクロチューブ(丸底スクリューキャップタイプ)に入れ、蓋をしてパラフィルムでシールし通常郵便で各地研に送付した。各地研では、それぞれで作成した SB 株のプラグと共に、制限酵素 *Xba* I を使用し、それぞれが行っているプロトコールに従い、制限酵素処理、PFGE を行い、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。

### 3. 平成 23 年度

各協力地研で分離した腸管出血性大腸菌各 2 株を使ってそれぞれのプロトコールでプラグを作成した。作成したプラグの半分を北海道衛研に送付してもらい、残りを各地研で制限酵素 (*Xba* I) 処理し、それぞれのプロトコールに従い PFGE を行い、泳動像をメールで送付してもらった。この泳動像と北海道衛研で行った泳動を比較することで精度管理を実施した。

また、精度管理用プラグ作成時の菌量測定方法の検討として SB 株と腸管出血性大腸菌 10 株を使用し、LB broth, Lennox (DIFCO 製) 10mL で 37°C 18~24 時間培養した菌液を使用して暗視野顕微鏡による菌数測定と Misra 法によるコロニー数を比較し、簡易菌数測定法について検討した。

## C. 研究結果

### 1. 平成 21 年度

各地研からプラグが届くまでにかかった日数は 1～3 日で、7 施設で 2 日目に到着した。到着したプラグには肉眼的な破損等は認められなかった。

アンケート調査結果から、使用菌量の確認方法としては、濁度計を使用している地研が 2 地研、マックファーランド比濁法が 2 地研、ペレットの目視が 1 地研、白金耳による掻き取り量が 2 地研でブロスの培養時間による方法が 2 地研、OD610=0.6 の標準液を作成してこれと比較する方法が 1 地研であった。

なお、PFGE のプロトコールは、全ての地研で感染研 New プロトコールに準拠していた。

PFGE の結果について、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。泳動像では、J 地研、E 地研のバンドが濃く、B 地研のバンドがやや薄かった。しかし全ての地研で 167.1 と 173.4Kbp のバンドの分離は確認できた。B 地研で 310.1Kbp のバンドが 2 本に別れていた。また、H 地研で 452.7Kbp のバンドが 398.4Kbp のバンド側へずれていた。また、クラスター解析ソフトによる解析結果では、8 地研が 100%の相同性を示したが、J 地研が 99%の相同性であった。また、バンドに違いが認められた残り 2 地研のうち B 地研が 96%で、H 地研が 93%であった。

### 2. 平成 22 年度

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。

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。

PFGE の結果では、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、菌量の調整をブロ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。

### 3. 平成 23 年度

プラグは各地研発送後 1～2 日で到着した。

いずれの地研から送付されたプラグも破損は認められなかった。

アンケート調査から、7 地研が平板培養から菌塊を取り菌液調整し、3 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 3 地研、OD 値を測定した懸濁液と比較する方法が 1 地研、光度計 (OD600nm : 0.7) が 1 地研、培養時間が 3 地研、白金耳による掻き取りが 2 地研で、前回の調査とは若干の違いが認められた。また、制限酵素量は、ほとんどの地研が 30U/plug で、処理時間は、4 時間が 3 地研、2 時間が 3 地研、10 時間以上が 4 地研で、こちらも前回の調査とは異なる結果となった。

各地研から送られてきたプラグを使用して、北海道衛研で PFGE を行った泳動像と、各地研から

送られてきた泳動像にはバンドの照度の違いがあったもののバンド位置については、肉眼的に差が認められなかった。しかし、クラスター分析ソフトによる解析では、2 菌種共に 90%以上の相同性が得られた地研は 4 地研で、1 菌種が 90%以上の相同性を得た地研は 3 地研、2 菌種とも 90%以上の相同性が得られなかった地研が 2 地研あった。1 菌種のみ相同性がとれた地研の内、地研側の泳動像が 90%以上の相同性を示し、PFGE 時にプラグの取り間違いをした可能性が高いと思われるものがあつた。また、1 地研では、マーカーの照度が高いため、クラスター解析時にバンド位置の補正にずれが生じ相同性がとれなかったものがあつた。2 菌種とも相同性がとれなかった地研では、写真全体の照度が高い地研が 1 地研、写真のサイズが大きいためサイズの変更時にバンドサイズにずれが生じたと思われるものが 1 地研あつた。2 菌種とも相同性がとれなかった地研では、写真全体の照度が高い地研が 1 地研、写真のサイズが大きいためサイズの変更時にバンドサイズにずれが生じたと思われるものが 1 地研あつた。

18~24 時間培養後の SB 株の菌数は、Misra 法で平均が  $1.4 \times 10^9$ 、最大が  $3.2 \times 10^9$ 、最小が  $5.2 \times 10^8$  であつた。また、暗視野顕微鏡観察では、平均が  $1.6 \times 10^9$ 、最大が  $4.6 \times 10^9$ 、最小が  $5.0 \times 10^8$  であつた。それぞれの菌液での誤差率は、最大で 240%、最小で 0%であつた。腸管出血性大腸菌では、Misra 法で平均  $6.5 \times 10^8$ 、最大が  $2.4 \times 10^9$ 、最小が  $2.8 \times 10^8$  であつた。暗視野顕微鏡観察では、平均で  $6.9 \times 10^8$ 、最大が  $1.8 \times 10^9$ 、最小が  $2.3 \times 10^8$  であつた。それぞれの菌液での誤差率は、最大で 267%、最小で 0%であつた。

誤差率が  $\pm 50\%$ 以内に収まったものは、SB 株で 73%、腸管出血性大腸菌で 84%であつた。

誤差率の高かつたものについて、視野全体を確認すると菌の塊が認められ、カバーガラス内で菌が均一化されていない状態であつた。これらの菌液について、再度十分攪拌して顕微鏡標本作製したが、完全に菌が均一化されなかつた。そこで、これらの標本について、観察視野を 16 カ所に増

やして菌数測定を行ったところ、誤差率は 40~60%に改善された。

#### D. 考察

平成 21 年度の調査で 2 地研の SB 株でバンドの変異が認められた。B 地研では、310.1Kbp のバンドが 2 本に別れていた。また、H 地研で 452.7Kbp のバンドが 398.4Kbp のバンド側へずれていた。これらは、菌株の変異の可能性が高く、保存方法等について検討する必要があると考える。SB 株は Pulse-net 上で基準となるマーカーであり、SB 株のバンドの違いは、クラスター分析に大きな影響を与えるため、各地研で保存している SB 株について、定期的な確認が必要となる。今回の菌株の変異は明らかな違いがあるため、それぞれの地研での確認が可能だと思われるが、細かい変異の場合、気が付かずに使用してしまう場合も考えられることから、SB 株の管理方法、確認方法についても今後統一したプロトコルの作成を検討する必要があると思われる。

平成 21 年度の調査では、プラグ作成段階の精度管理方法として各地研の SB 株を使用して行ったが、バンドの変異を起こした 2 地研を除く 8 地研で 99%以上の相同性が得られており、北海道・東北・新潟ブロック内でのプラグ作成までの処理については、概ね良好な状態にあると考える。

また、2 地研で SB 株の変異と思われるバンドの違いが認められたことは、今回の調査方法で、マーカーとして使用する SB 株の状況確認も可能であり、マーカー株の確認方法としても有用な方法の 1 つであると思われる。

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、平成 21 年度の調査で、北海道・東北・新潟ブロックでの精度管理として、統一した菌量の調整方法の検討と制限酵素処理・PFGE・画像解析部分の精度管理を重点的に行うことで、さらに PFGE の精度を向上させられることが判明した。

平成 22 年度に制度管理で使用したプラグは、サンプル A で  $3.6\sim 4.0\times 10^8/\text{plug}$ 、サンプル B で  $3.0\sim 3.3\times 10^8/\text{plug}$ 、サンプル C で  $2.3\sim 2.6\times 10^8/\text{plug}$ 、サンプル D で  $1.8\sim 2.0\times 10^8/\text{plug}$  と、多めに菌量を調整した。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  $1.5\times 10^8\text{CFU/mL}$  の菌量に相当し、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  $1.2\times 10^9\text{CFU/mL}$  で、この菌液を  $200\mu\text{L}$  使用しているため、 $1.2\times 10^8/\text{plug}$  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、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、 $2.5\times 10^8/\text{plug}$  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。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

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。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。

平成 23 年度では、各地研で作成した腸管出血性大腸菌 O157 のプラグを使って制度管理を行った。プラグ当たりの菌量は 1 地研を除いてほぼ  $1.0\times 10^8/\text{plug}$  と推定された。平成 23 年度の精度管理では、4 地研で 90%以上の相同性が得られたが、90%の相同性が得られなかったところが 2 地研あった。この 2 地研については、1 地研が写真のバンドの照度が高くバンドが解析ソフトで太くなり、相同性が得られず、また、もう 1 地研は、写真ファイルのサイズが大きく縮小した際の画質の低下などによるバンドのずれが原因と考えられた。平成 23 年度の精度管理では、同一のプラグを使用して 1 地研とそれぞれの地研間で検証する方法を行っ

たが、この方法では、使用するプラグが同一であるので、同一の菌量での検証が行えた。これにより、バンド照度の違いの原因としてそれぞれでの写真撮影の条件の違いが相同性の違いに影響を与えることが検証された。写真撮影は、7 地研でゲル写真撮影装置を使用し、2 地研がポラロイドカメラ、1 地研が一眼のデジカメであったが、バンドの照度は撮影機器の違いに影響されていなかった。これらのことから、写真撮影時のバンド照度を統一する方法について検討する必要がある、さらに写真ファイルのサイズ等を一定の条件に合わせることも、PFGE の精度管理上重要である事が判明した。

SB 株及び腸管出血性大腸菌を使用して、Misra 法と暗視野顕微鏡による菌数測定について比較検討した。SB 株での Misra 法と暗視野顕微鏡観察との比較で、誤差率が±50%を超えたものが8 標本あった。そのなかで誤差が最も大きかったものは、Misra 法が  $9.4 \times 10^8$ 、顕微鏡観察が  $3.4 \times 10^9$  で誤差率は 240%であった。また、腸管出血性大腸菌では、誤差率が±50%を超えたものが7 標本あった。この SB 株の 8 標本と腸管出血性大腸菌の 7 標本について、再度、弱拡大で全体を観察したところ、菌塊状態になっている部分が見受けられ、カバーガラス内で均一化されていないことが判明した。そこで希釈液をよく攪拌し、標本を作り直して、観察視野を 10 カ所から 16 カ所に増やして菌数をカウントしたところ、誤差率は 40%から 60%の範囲内に収まり、±50%内に収まった標本が、SB 株で 93%、腸管出血性大腸菌で 92%となった。誤差率±50%は、顕微鏡観察で得られた菌量が例えば、 $5.0 \times 10^8/\text{mL}$  となった場合、実際の菌量は  $3.3 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9/\text{mL}$  となる。この菌液を使ってプラグを作成した場合、プラグ当たりの菌量は、 $1.1 \times 10^8 \sim 3.3 \times 10^8/\text{plug}$  となる。これは、PFGE 泳動後のバンドにほとんど影響ない誤差範囲である。

プラグの菌量を一定にすることは、プラグを使った制度管理を行う上で重要である。この菌量測定法であれば、培地や培養時間などによる菌量の

誤差よりも少ない誤差で菌液を調製でき菌量の違うプラグ作成も容易である。また、16 カ所撮影し、菌数をカウントしても 10 分以内で測定ができるため短時間で菌量の確認が可能である。しかし、プラグ作成には支障がないものの誤差率がまだ高いので今後どのようにして精度を高めるか検討を重ねる必要がある。また、暗視野顕微鏡ではなく光学顕微鏡での測定方法についても今後検討していく必要があるだろう。

## E. 結論

平成 21～23 年度に行ったプラグを使った精度管理では、輸送時にプラグの破損はなく、また、PFGE の泳動結果への影響も認められなかった。

平成 21 年度に行った精度管理では、マーカー用に保存されている SB 株について、2 地研で菌株の変異と思われるバンドの変化が認められ、SB 株の保存方法と定期的な確認方法の検討が必要であると考えられる。

プラグ作成において菌量の調整方法が重要であるが、平成 22 年度の精度管理では、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。

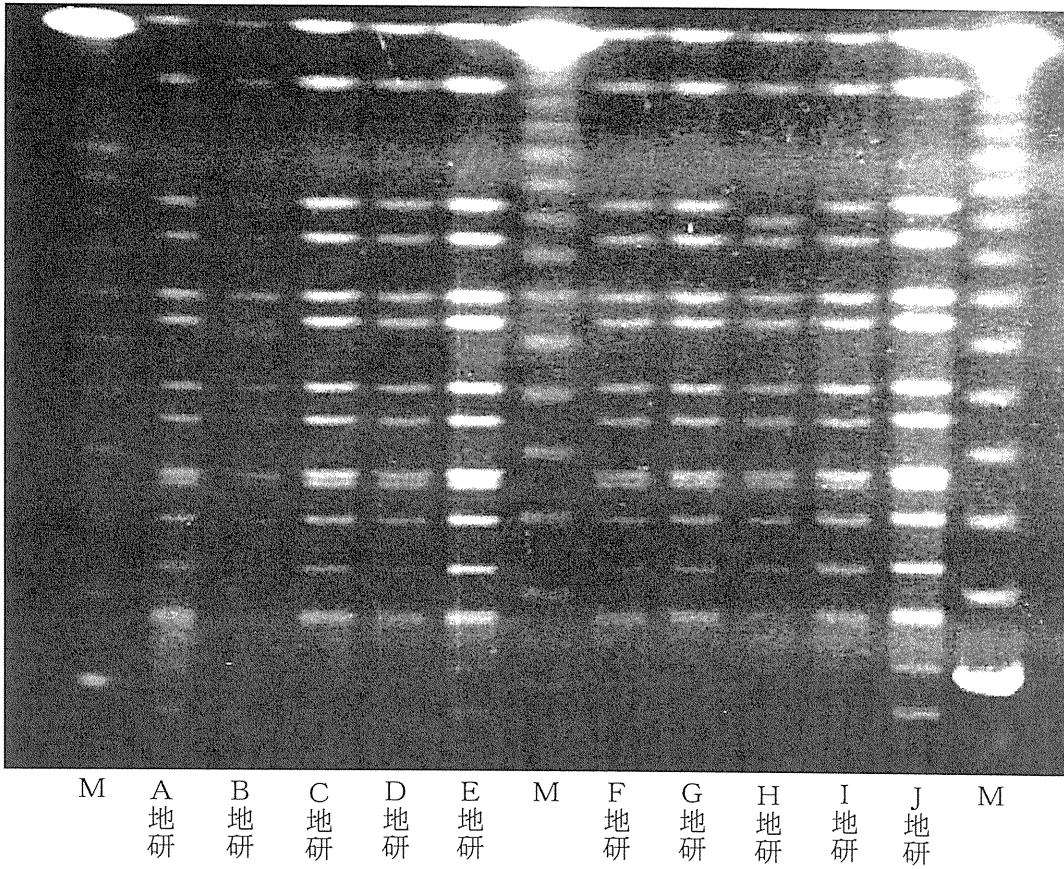
平成 23 年度の精度管理では、腸管出血性大腸菌 O157 を使用したプラグによる精度管理を実施し、同一の菌量のプラグを使用しても写真撮影で相同性に差が出ることが判明した。また、精度管理用プラグの作成方法として、菌量を暗視野顕微鏡で測定する方法は、平板培養法の菌量測定と比較して使用上支障ない測定方法であり、プラグ当たりの菌量を明らかにした精度管理用プラグの作成が可能であった。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

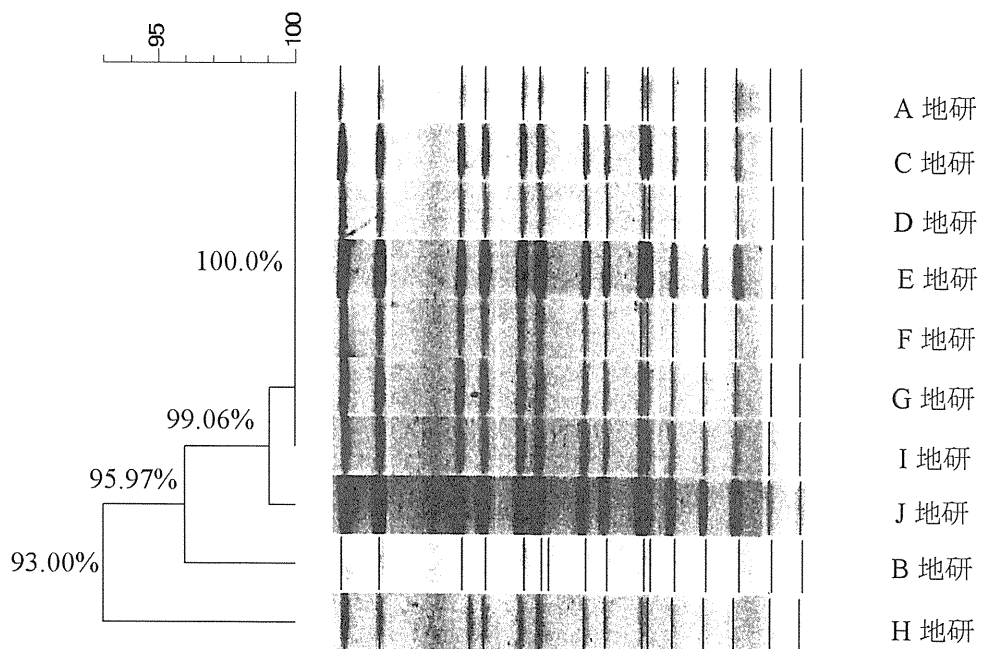
なし



M : Lambda ladder (BIO-RAD)

PFGE 装置 : CHEFF DR II 6V, 2.2~54.2Sec, 21hr Buffer 0.5×TBE 14°C

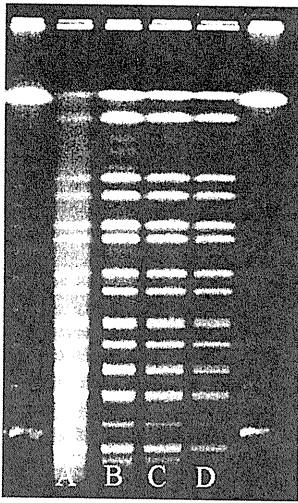
各地研 SB 株 PFGE 泳動像



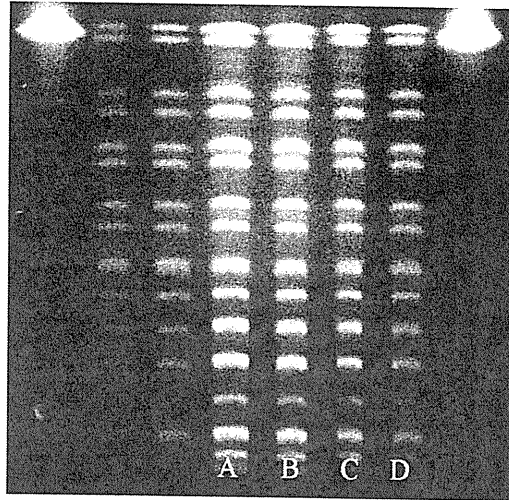
デンドログラム

図1 平成21年度精度管理

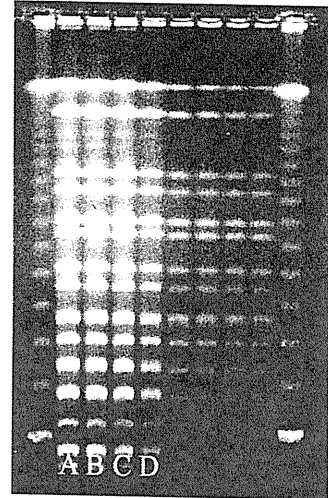




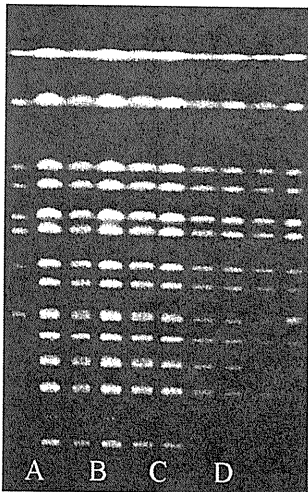
北海道



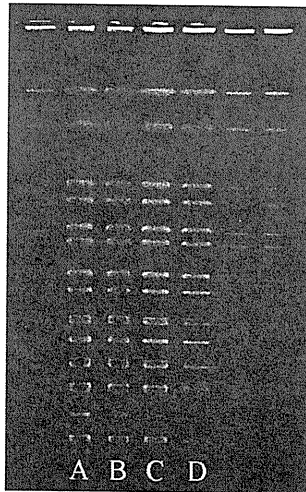
A地研



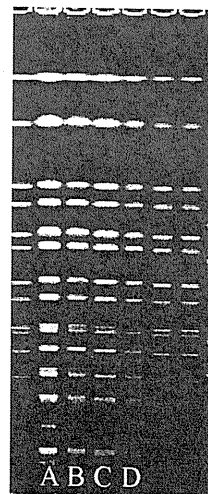
B地研



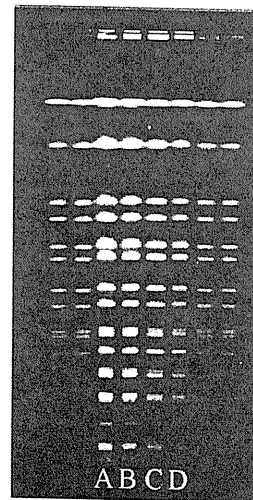
C地研



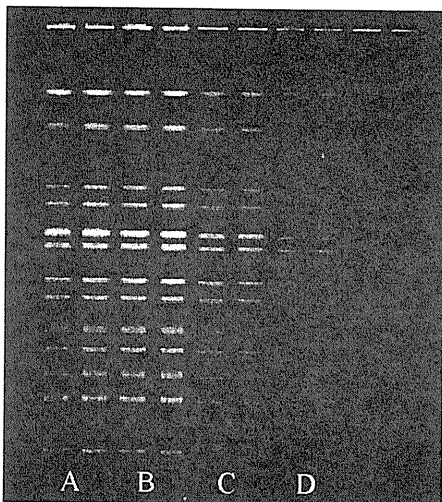
D地研



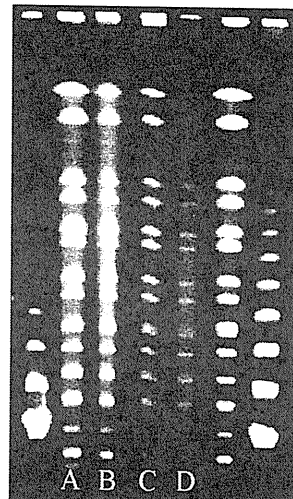
E地研



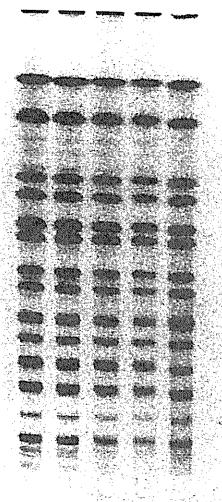
F地研



G地研



H地研



I地研

图2 平成22年度精度管理

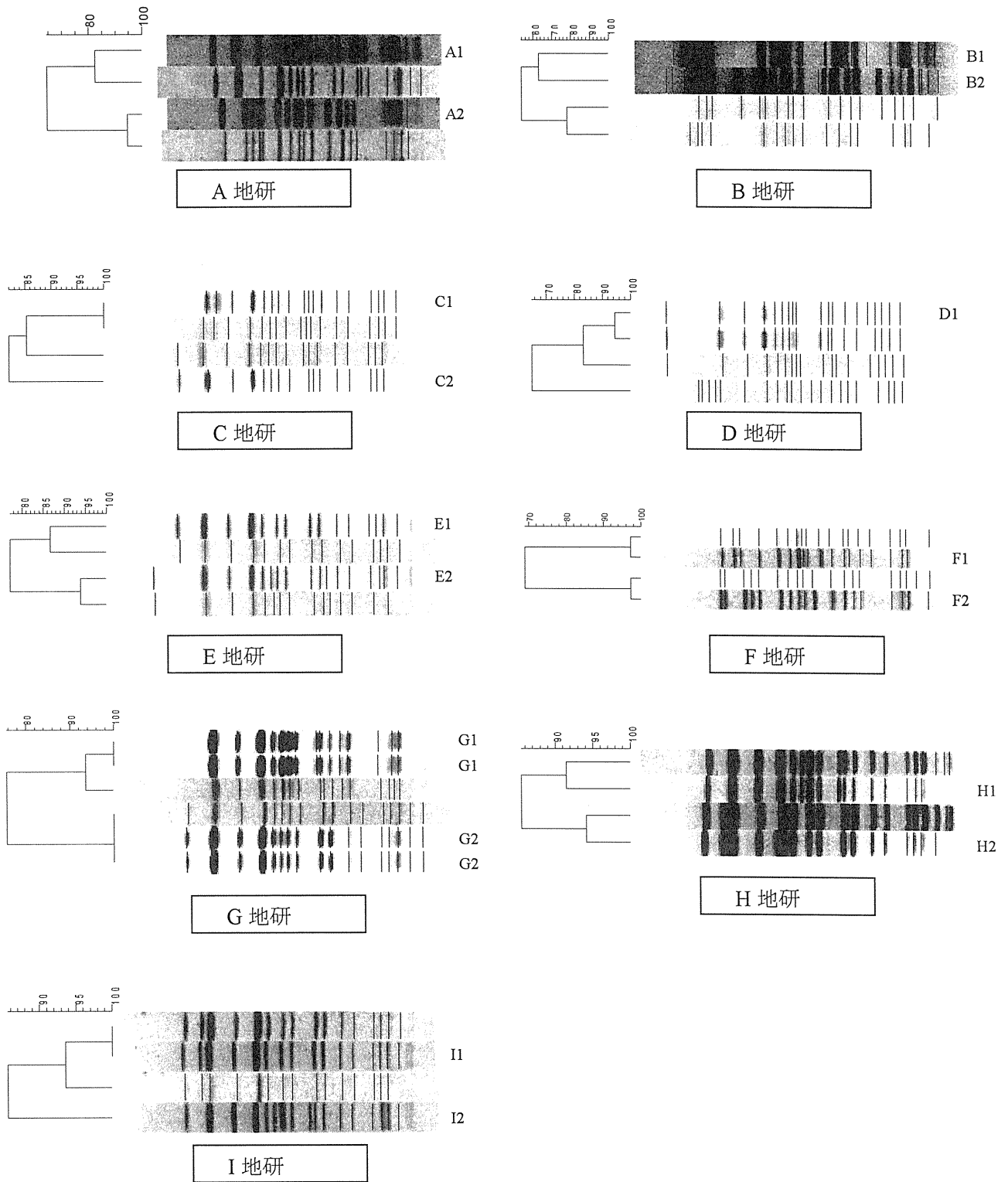


图3 平成23年度精度管理

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 21～23 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	東京都健康安全研究センター	甲斐明美
研究協力者	茨城県衛生研究所	白田忠雄，永田紀子
	栃木県保健環境センター	内藤秀樹
	群馬県衛生環境研究所	横田陽子，黒澤 肇
	埼玉県衛生研究所	倉園貴至
	千葉県衛生研究所	平井晋一郎，横山栄二
	神奈川県衛生研究所	古川一郎，石原ともえ
	横浜市衛生研究所	松本裕子
	山梨県衛生公害研究所	植松香星，大沼正行
	長野県環境保全研究所	笠原ひとみ
	静岡県環境衛生科学研究所	廣井みどり
	東京都健康安全研究センター	小西典子，齊木 大 尾畑浩魅，仲真晶子

研究要旨：

PFGE 解析法の技術レベルを各地研間で一定に保つことを目的として、毎年共通株を用いて PFGE 解析を実施し、成績を東京都健康安全研究センターに送付して比較検討した。多くの PFGE 画像はシャープなバンドが得られており、良好な泳動像であった。解析ソフトを用い、泳動像の類似度を比較した結果、同じ菌株では、同じクラスターを形成していた。

共通株を用いた IS 法 (IS-printing system)での解析では、全ての施設で同じコードを得ることができた。IS 法はサンプルの調整が容易で、非常に短時間で結果を得ることができるというメリットがある。また、複数の自治体で発生した食中毒事例では、PFGE 画像と合わせて IS コードを交換することで、迅速に分子疫学解析情報を比較できることが確認された。

次に、MLVA 法の導入を行なうために、分離株を用いて検討を開始した。しかし、正確に増幅サイズを読み取れない場合や、蛍光強度が強くと解析できない例等があった。サンプルの調整方法など、更に検討が必要である。

## A. 研究目的

広域的集団発生 (Diffuse outbreak) を迅速に発見し、いち早く拡大防止対策を講じるために、分離菌株のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法などの分子疫学解析法が用いられている。分離株を迅速に正確に解析するために、各地研には一定の精度を持った解析技術が求められている。そこで本研究では、関東ブロックの 11 地方衛生研究所を対象に PFGE 法の精度管理を実施した。

一方、PFGE 法はブロック作製・電気泳動に時間がかかるため、やや迅速性に欠けるといふ欠点がある。この点を補うために、近年新しく IS-printing system (IS) 法や MLVA 法が開発され、一部試験的に実施されている。これらの方法の実用化に向けデータの蓄積を行なうと共に、PFGE 解析データとの比較検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. PFGE 法技術向上のための精度管理 (平成 21~23 年度)

#### 1) 供試菌株

各地研で 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 O157 の 5 株を供試した。

#### 2) PFGE 解析

感染研プロトコールにより行なった。

アガロースゲルの作製：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、各施設の方法で行なった。

DNA 抽出法：ProteinaseK (1mg/ml), 1% N-lauroylsarcosin 0.5M EDTA(pH8.0)で 50°C, 18~20 時間反応させ、DNA を抽出した。

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で行なった。泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの下から 1cm~1.5cm 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：各地研で通常行なっている方法で撮影した。ただし、アガロースゲルは、ウェルからアガロースゲルの先端までが大きく写るよう統一した。

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。

画像解析：各施設から送付された PFGE 画像を対象に BioNumerics を用いてデンドログラム解析を行った。

### 2. IS-printing system 解析

#### 1) 共通菌株を用いた検討 (平成 22~23 年度)

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) IS-printing system 解析と PFGE パターンの相関性の比較（平成 21 年度）

2009 年に東京都内で発生した食中毒 2 事例から分離された O157（事例 1：4 株，事例 2：9 株）および 2009 年に同じ PFGE パターンを示した株 10 株について IS 解析を行い，PFGE パターンと比較した。

3) PFGE 法で解析できない株（スメア株）の検討（平成 22 年度）

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 O157 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（平成 21～23 年度）

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。

4. 特定の PFGE パターンを示す株を迅速にスクリーニングするための PCR 用プライマーの開発および分離状況

千葉県衛生研究所で実施した。

5. MLVA 法の検討（平成 23 年度）

疫学解析の 1 つとして新しい方法である MLVA 法の導入に向けて検討を開始した。腸管出血性大腸菌 O157 を対象とし，感染研 MLVA プロトコ-

ルに従って実施した。2010 年 6 月および 8～9 月に流行した PFGE パターン T-1000 株（スメア株）16 株について MLVA 解析を実施した。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた PFGE 解析の精度管理

毎年，腸管出血性大腸菌 O157 の共通菌株 5 株を用いて，関東ブロック内の各施設で PFGE 解析を行った。

1) 平成 21 年度

供試菌株の中には，11 施設中 10 施設が 100%一致となり，高い相同性を示す株もあった。しかし，染色の影響かバンドが非常に薄い施設や，写真全体が白っぽく，バンドと背景のコントラストに差がない写真があった。このような写真ではバンドを選ぶのが困難であった。

2) 平成 22 年度

いずれの施設の PFGE 画像も，シャープで明瞭なバンドが得られており，良好であった。今回は，写真の読み込ませ方まで細かく指定しなかったために，各施設で写真の大きさにばらつきが認められた。解析ソフトを使った解析時にバンドを選ぶ際は，大きい写真の方がバンドの選択がしやすいが，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写真もあった。

3) 平成 23 年

平成 23 年度はブロックを埋め込んだウェルからアガロースゲルの下ま

で、できるだけ大きく写すように統一した。いずれの施設でもシャープで明瞭なバンドが得られていた。

デンドログラム解析の結果、5菌株 (No.1~5) 中、菌株 No.1 から No.3 までは9施設中8施設が100%一致であった。1施設も90%以上の類似度であった。菌株 No.4 については、95%以上の類似度であるが、2グループに分かれた。写真を比較しても、泳動パターンにほとんど差が認められず、2グループの差が何処にあるのか明確にはできなかった。

## 2. IS-printing system による解析

### 1) 共通菌株による解析

PFGE 解析の精度管理用共通菌株について、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。2年間で10株の解析を実施し、全ての施設で同一の解析結果であった。通常の PCR 法よりも電気泳動時間が長いため、バンドが歪んでしまう場合もあったが、判定に影響するものではなかった。

### 2) IS 解析と PFGE パターンの相同性の比較

都内で発生した食中毒事例2事例由来株の PFGE パターンと IS パターンは、全て一致した。

同じ PFGE パターンを示した株の IS パターンは4種類に分離された。PFGE パターンを比較すると170kb 付近のバンドが太い株と細い株があ

り、この差が IS パターンに反映されたものと推定された。

### 3) PFGE 法で解析できない株 (スメア株) についての検討

2010年に東京都で分離された O157のうち PFGE 法で解析できなかった株 (6月分離株:6株, 8~9月分離株:9株) について、IS 解析を実施した。6月分離株と8~9月分離株の IS パターンは異なっており、異なる由来株であることが示唆された。6月には、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た結果、埼玉県由来株4株中3株が東京都6月分離株の IS パターンと一致したことから、これらの株の由来は同一である可能性が示唆された。

## 3. PFGE 解析の行政への応用

毎年、各地研では、EHEC やサルモネラ分離株について PFGE 解析を実施し、食中毒の解明や感染源の解明に有効に生かされる事例を数多く経験し、その都度行政に利用されていた。

### 4. 特定の PFGE パターンを示す株 (流行株) を迅速にスクリーニングするための PCR 用プライマーの開発および分離状況

VNTR 解析で対象とした *Vhec7* 領域が存在する *tolA-tra5* 領域の塩基配列をダイレクトシーケンスにて解析した。この塩基配列を用いて、特定の流行株を検出することができるプライマーを設計した。このプライマーを用いて全国的な分布を調査したとこ

ろ、2007年には長野県、大阪府、兵庫県、山口県および福岡県で、2008年には仙台市他9自治体での分離が確認された。今後も、新興クローンの分布を全国的に調査する必要があると思われる。

## 5. MLVA法の検討

2010年6月に都内で分離された流行株(O157, VT2)6株は、全てのlocusで同じリピート数であった。一方、8～9月流行株(O157, VT1+VT2)10株は、IS-printing system解析では全て同一コードであったが、MLVA法では、分離された10株中4株は1～2locusで異なるリピート数が確認された。解析時、蛍光強度が強すぎたためにピークが振り切れてしまったことや、バックグラウンドにノイズが入っていたため、正確に増幅サイズを読み取れていない可能性が示唆された。今後、DNA量やサンプル調整法について検討し、安定した結果が出せるように改良していく予定である。

## D. 考察

各地方衛生研究所で実施するPFGE法の標準化を目的として、腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を配布し、各地研でPFGE解析をした。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。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、平成22年度からは新しくBioNumericsを導入し解

析を試みた。

解析の結果、菌株によっては類似度が低くなってしまう株も認められたが、多くは類似度90%以上であった。写真の読み込み方については、できるだけアガロースゲルを大きく、画面一杯になるように撮影してもらうことで、バンドの選択が容易になった。取り込んだ画像のファイル形式を統一しなかった場合、送付後にファイルを変換後に解析を行うことになるが、解像度が低くバンドを選ぶのに困難な場合が認められるため、保存形式の指定が必要である。

関東ブロックでは毎年2～3施設で担当者の異動があり、中には技術の伝承が十分に行なわれない場合も認められた。そこで、PFGE法のプロトコルを統一し、毎年共通株でPFGE解析を実施することで、技術の向上を図ってきた。この試みが功を奏し、近年はいずれの地研も、非常にシャープで分子量の小さいバンドも分離の良いPFGE画像を得ることが可能となっている。

共通株を用いたIS法での解析結果を比較した結果、全ての施設で同じコードを得ることができた。IS法はサンプルの調整が容易で、非常に短時間で結果を得ることができるというメリットがある。また、複数の自治体で発生した食中毒事例では、PFGE画像の交換が行なわれることが多いが、その際にPFGE画像と合わせてISコードを交換することで、迅速に分子疫学解析情報を比較できることが確認され

た。今後は実際の事例で試みていく予定である。

PFGE 法と IS 法で解析した結果を比較したところ、PFGE パターンは同じであったが、IS パターンでは複数のタイプに分類できる事例があった。この様に同じ PFGE 型を示す株の場合、更に細かく分類するためのサブタイピング法としても有効である可能性が示唆された。しかし、異なる PFGE パターンでも IS 法では同じコードになってしまう場合もあるため、結果の解釈が難しい場合もあった。

新しい分子疫学解析法の 1 つである MLVA 法の導入を行なうために、2010 年に分離された株について MLVA 法を検討した。正確に増幅サイズを読み取れなかったものや、蛍光強度が強すぎて判定できない場合などがあった。安定した結果が出せるように、サンプルの調整方法など更に検討が必要である。

#### E. 結論

PFGE 解析法の技術レベルを各地研間で一定に保つことを目的として、毎年共通株を用いて PFGE 解析を実施し、成績を東京都健康安全研究センターに送付して比較検討した。多くの PFGE 画像はシャープなバンドが得られており、良好な泳動像であった。解析ソフトを用い、泳動像の類似度を比較した結果、同じ菌株では、同じクラスターを形成しており、類似度は 90% 以上であった。

共通株を用いた IS 法での解析では、

全ての施設で同じコードを得ることができた。IS 法はサンプルの調整が容易で、非常に短時間で結果を得ることができるというメリットがある。また、複数の自治体で発生した食中毒事例では、PFGE 画像と合わせて IS コードを交換することで、迅速に分子疫学解析情報を比較できることが確認された。

MLVA 法の導入を行なうために、分離株を用いて検討を開始した。しかし、正確に増幅サイズを読み取れない場合や、蛍光強度が強く解析できない検体等があった。サンプルの調整方法など、更に検討が必要である。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科：東京都内の 3 保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染事例，病原微生物検出情報（国立感染症研究所），30，5，9-10，2009.

Yokoyama E, Etoh Y, Ichihara S, Hirokawa K, Konishi N, Kai A, Matsumoto Y, Kurosaki M, Kasahara H, Kurazono T, Yoda K: Emergence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Serovar O157 Strains in Clade 8 with Highly Similar Pulsed-Field Gel Electrophoresis Pattern, J Food



Prot.74(8), 1324-1327, 2011.

東京, 2011.

横山栄二：腸管出血性大腸菌 O157 の分子系統学的解析, 第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム, 大阪, 2009.

H. 知的所有権の取得状況  
なし

倉園貴至, 砂押克彦, 大島まり子, 小野一晃, 大塚佳代子, 青木敦子, 野口貴美子, 中川俊夫：ステーキチェーン店での STEC O157 発生事例, 第 22 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会, 前橋市, 2010.

小川敦子, 松本裕子, 小泉充正, 山田三紀子, 高橋一樹, 武藤哲典：焼肉チェーン店における腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例における原因食材（サガリ）の汚染状況, 第 23 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会, 栃木, 2011.

笠原ひとみ, 上田ひろみ, 宮坂たつ子, 吉田徹也, 畔上由佳, 内山友里恵, 長瀬博, 藤田暁：保育所及び親水施設で発生した腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例, 第 23 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会, 栃木, 2011.

小西典子, 尾畑浩魅, 齋木大, 門間千枝, 仲真晶子, 甲斐明美：多種類の PFGE パターンを示す腸管出血性大腸菌 O157 による Diffuse outbreak について, 第 85 回日本感染症学会総会,

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方11地方衛生研究所によるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）及び IS printing System を用いた腸管出血性大腸菌 0157 の精度管理、PFGE 解析結果の行政への還元、MRSA の PCR 型別法 POT 法の実施

研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所  
研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所  
北川恵美子 石川県保健環境センター  
白木 豊 岐阜県保健環境研究所  
田中保知 岐阜市衛生試験所  
木全恵子 富山県衛生研究所  
中根邦彦 岡崎市総合検査センター  
石畝 史 福井県衛生研究所  
岩出義人 三重県保健環境研究所  
藪谷充孝 名古屋市衛生研究所  
竹内由香 豊田市衛生検査所  
山本新也 豊橋市保健所

研究要旨

平成 21 年度：東海・北陸地方 9 地方衛生研究所（以下施設と略す）において腸管出血性大腸菌 3 検体（0157:H7）を用い実施した。その結果、3 株何れにおいても施設間の相同性が 89.5%以上（89.5%から 100%）と高率であった。平成 21 年度に PFGE 解析結果を行政への還元した事例の調査を行ったところ、2 施設で PFGE を実施しその結果を行政に還元していた。対象となった事例の原因菌は 0157（2 事例）、026（2 事例）をはじめ 0111（2 事例）、レジオネラ菌（1 事例）が含まれていた。また、6 施設において 54 株の 0157 を用いて PCR 型別法である IS printing System を行った。その結果、若干の非特異バンドは出現するものの、PFGE に比べ迅速性、簡便性に優れ、その解析力も PFGE と同程度と考えられた。平成 22 年度：PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査：8 施設で PFGE の結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。病原菌は 0157 をはじめ 026、0145、サルモネラ、及びエンテロバクタークロアカであった。0157 の PCR 型別法である IS printing System の実施：本法は PFGE が同じか非常に類似した集団事例由来株は同一若しくは IS パターンのひとつ異なるパターンに分かれたことからその解析力は PFGE と同程度と考えられた。黄色ブドウ球菌の PCR 型別法である POT の実施：6 施設で行った検討では POT 型とエンテロトキシン型及びコアグラゼ型はよく一致し、その解析力は PFGE と同程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関しては POT の方が PFGE より優っていた。よって本法は PFGE と同様、集団発生時の疫学解析の有力な手段となることが期待される。平成 23 年度：東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所（施設）による 3 株の腸管出血性大腸菌 0157 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）と IS printing System の精度管理を実施した。その結果、PFGE に関しては、検体 1 では 11 施設全体の相同性は 93.8%と 3 検体中最も高率であった。検体 2 は 11 施設の泳動図は全体で 88.6%と 3 検体中最も低い相同性であった。検体 3 の 11 施設の泳動図は全体で 92.1%の相同性であった。従って、何れの検体も相同性約 90%とこれまでと同様に良好な結果であった。また、IS printing System 精度管理に関しては、11 施設のうち 8 施設では 3 検体全てで正しく型別が行われていた。しかし、3 施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。これらの原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスマアになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。従って、来年度以降も精度管理を実施し、IS printing System のデータベース化のための技術向上を図りたい。行政への還元に関する調査では平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研から 3 件の事例報告があった。具体的には 1) 保育所における腸管出血性大腸菌 026 集団感染事例、2) 介護老人福祉施設における腸管出血性大腸菌 0157 集団感染事例、3) 仕出し弁当を原因とする 026 食中毒事例。またこれ以外に散発下痢症患者由来サルモネラ属菌（09:-:-）PFGE 解析結果も報告された。

## A. 研究目的

我が国で腸管出血性大腸菌 0157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働に向けた研究班活動が平成 12 年度から平成 20 年度まで行われた。

愛知県衛生研究所 (愛知衛研) ではこれまでの研究班活動として、0157、サルモネラ、赤痢菌の PFGE 実施統一プロトコール作成、及び愛知県下で過去 10 年間に検出されたサルモネラ、赤痢菌それぞれ約 150 株について PFGE を行い、そのバンドパターンのデータベース作成、また東海・北陸ブロック内の活動として 1) 年 1 回若しくは 2 回の 0157 の PFGE 精度管理、2) 東海・北陸ブロック地方衛生研究所 (地研) PFGE 担当者を愛知衛研に集め、PFGE 実施手順に関する研修会を実施 (平成 17 年 1 月)、3) 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行った。

これらの研究班活動の成果として毎年 PFGE 担当者が 1 名～2 名程度変わることのある東海・北陸ブロック内地研においても精度管理のなかで同一 PFGE 型 0157 の PFGE バンドパターンの各地研相同性を約 90% 若しくはそれ以上まで高めることができた。このことから東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の 0157 等集団発生の際にも疫学的資料として用いるに足る良質な画質を提供することが可能であると思われる。

平成 21 年度は、PFGE 精度管理を当所から送付した 3 株の腸管出血性大腸菌 (0157) を用いて 9 地方衛生研究所 (以下 9 施設と略す。) にて実施し PFGE 画質の向上をはかることを目的とした。さらに東海・北陸ブロック各地研が 0157 及び他の病原菌による事例発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) を主体として調査を行った。また、0157 の PCR 型別法 IS printing system (東洋紡) についてブロック内 6 施設において解析力、簡便性及び迅速性について PFGE 法との比較検討等を行った。

平成 22 年度の活動内容は 1) 東海・北陸ブロック各地研が 0157 及び他の病原菌による集

団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行い、PFGE 画像がどの程度活用されているかを調査した。2) 0157 の PCR 型別法 IS printing System ver2 (東洋紡) 及び黄色ブドウ球菌の PCR 型別法である Cica Geneus Staph POT KIT (関東化学) についてブロック内施設において解析力、簡便性及び迅速性について PFGE 法との比較検討等を行った。

平成 23 年度は 1) PFGE 及び 0157 の PCR 型別法 IS printing System (東洋紡) 精度管理を当所から送付した 3 株の 0157 を用いて東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所 (以下施設と略す) にて実施し、一層の PFGE 画質の向上と IS printing System のデータベース化のための技術向上をはかる。2) 東海・北陸ブロック各地研が 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行い、PFGE 画像がどの程度活用されているかを知ることが目的とした。

## B. 研究方法

平成 21 年度

[I] 送付検体

3 検体の腸管出血性大腸菌 (0157:H7) を精度管理に用いた。これらは散発事例に由来する 3 株の腸管出血性大腸菌で愛知県内で平成 21 年度に検出された。その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて行なった。

[II] 方法

### 1. 腸管出血性大腸菌を用いた精度管理

愛知衛研よりそれぞれ 3 検体を 8 施設 (石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県保健環境研究所、名古屋市衛生研究所、岡崎市総合検査センター) に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設において、送付された 3 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、サルモネラマーカの使用を統一した。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソ

フト「BioNumericus」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

## 2. 行政への還元に関する調査

平成 21 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による事例の際に PFGE を行い保健所、及び県庁（市役所）に報告した事例について、事例の概要、PFGE 泳動図を愛知衛研に送付した。

## 3. IS printing System（東洋紡）の実施

東海・北陸ブロック内 6 施設で検出された 54 株の 0157 について IS printing system（東洋紡）を実施した。方法は添付のマニュアルに従って行った。なお、解析に用いた菌株の株数、由来等は各施設任意で行った。

平成 22 年度

### 1. 行政への還元に関する調査

平成 22 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による集団事例の際に PFGE を行い保健所、及び県庁（市役所）に報告した事例について事例の概要、PFGE 泳動図を愛知衛研に送付した。

### 2. IS printing System ver 2 の実施

添付のプロトコールに従い東海・北陸 7 地研で検出された 0157 について行い、その代表泳動図、菌株情報及び結果を愛知衛研に送付した。なお試供菌株数、PFGE との比較検討は各地研が独自に行った。

### 3. Cica Geneus Staph POT KIT の実施

東海・北陸ブロック内 7 施設で検出された黄色ブドウ球菌について Cica Geneus Staph POT KIT（関東化学）を実施した。方法は添付のマニュアルに従って行った。その代表泳動図、菌株情報及び結果を愛知衛研に送付した。なお、解析に用いた菌株の株数、由来等は各施設任意で行った。

平成 23 年度

### 1. 精度管理

#### [I]送付菌株

3 検体の 0157（検体 1 から 3）を精度管理に用いた。これら 3 株の腸管出血性大腸菌 0157 は愛知県内で検出され、その愛知衛研番号とベロ毒素型は検体 1. 2007-96, VT2；検体 2. 2008-3, VT1&2；検体 3. 2011-161, VT2 である。その PFGE

E 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清（デンカ生研）を用いて行なった。

## [II]方法

愛知県衛生研究所（愛知衛研）よりそれぞれ 3 検体を 10 施設（石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、岡崎市総合検査センター、福井県衛生研究所、三重県保健環境研究所、名古屋市衛生研究所、豊田市衛生試験所、豊橋市保健所）に送付した。そして、愛知衛研を含む 11 施設において、送付された 3 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、サルモネラマーカの使用を統一した。10 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「BioNumerics Version 6.0」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。IS printing system に関しては、方法は添付のマニュアルに従って行い、得られた泳動図及び結果のエクセルファイルは愛知衛研にメールにて電送し、解析を行った。

## 2. 行政への還元に関する調査

平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による集団事例の際に PFGE を行い保健所、及び県庁（市役所）に報告した事例について事例の概要、PFGE 泳動図を愛知衛研に送付した。

## C. 研究結果

平成 21 年度

### 1. 精度管理

検体 1 に関しては 9 施設全体の相同性は 93.3%と高率であった。9 施設のうち 6 施設が相同性 100%でひとつのクラスターを形成した。残り 3 施設もこのクラスターと相同性 93.3、94.2、96.8%と高い相同性を示した。

検体 2 については 6 施設が相同性 100%を示し、ひとつのクラスターを形成した。残りの 3 施設はこのクラスターとそれぞれ 89.5%、94.7%、96.8%の相同性を示しそれぞれ単独でクラスターを形成した。

検体 3 に関してはそれぞれ 4 施設と 3 施設が