

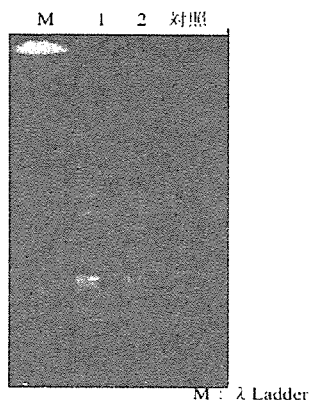
S.flexneriの家族内感染事例

<概要>

K市在住の大学生（No.1）が10月2日より下痢など症状を呈し、医療機関を受診した結果、患者糞便より志賀菌（S.flexneri）が分離された。保健所にて調査した結果、同居している祖母（No.2）が9月24日に中国から帰国しており、その際に下痢などの症状を呈していたことが判明し、祖母を含めた同居家族の検便を実施したところ、祖母から同菌が検出された。以上の結果から、今回の事例は中国旅行中に同菌に感染した祖母から孫への家族内感染であることが推定された。

<PFGE 解析結果>

分離された2株のPFGE解析結果は一致した



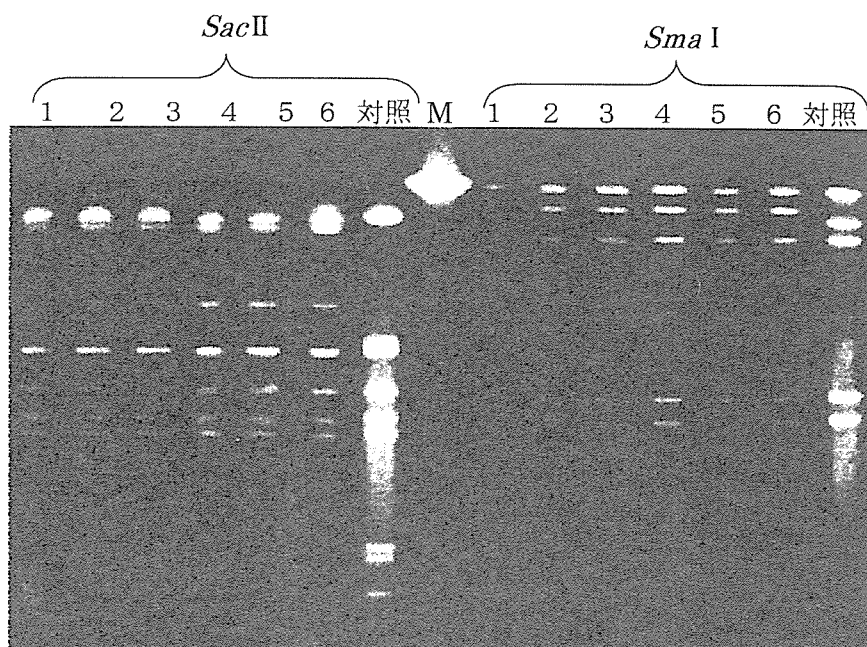
制限酵素：Xba I

泳動条件：6V/cm（200V） 5-50sec 21hr

C. jejuniによる食中毒事例

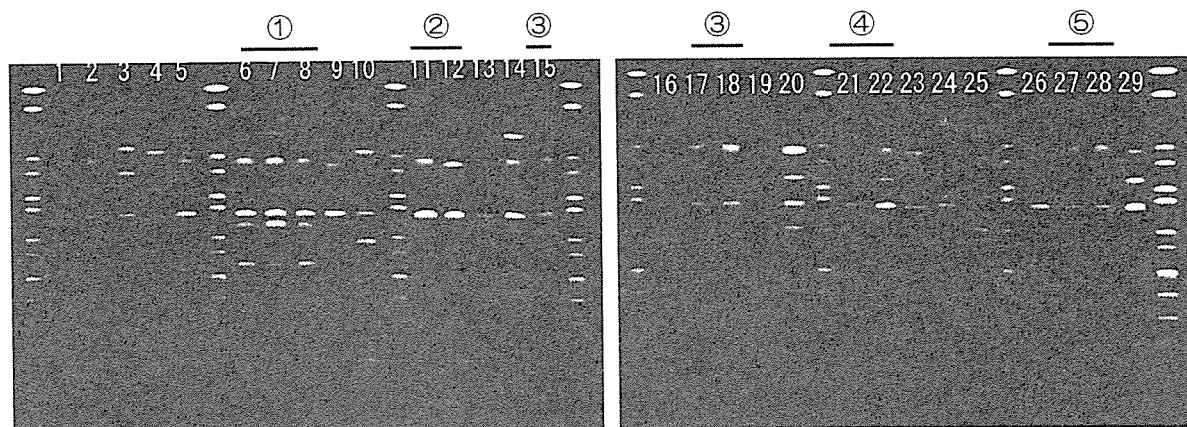
<概要>

平成18年5月31日から6月3日にかけて民宿に宿泊した高等学校の教師及び生徒が6月4日から食中毒症状を呈した。保健所が検便を実施したところ、患者6名よりC.jejuniが検出されたことから、民宿を原因とする食中毒事例であると断定した。 <PFGE 解析結果>分離された6株のPFGE解析結果は一致した。制限酵素：Sac II、Sma I 泳動条件：6V/cm（200V） 0.5-25sec 20hr



2. 三重県

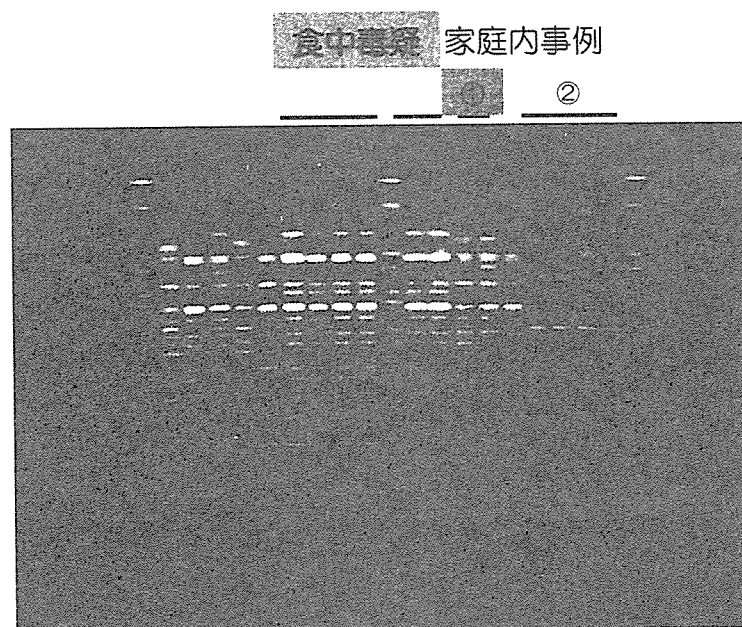
菌株：5 家庭内事例 1 2 株、1 7 散発事例等由来 1 7 株計 2 9 株の O157



①から⑤は家庭内事例

3. 豊田市

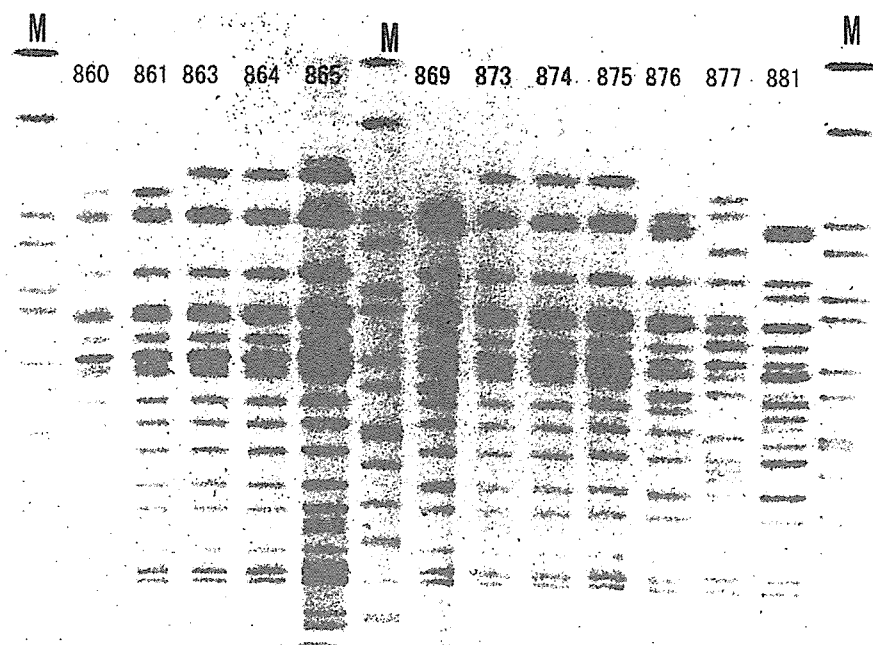
1 食中毒疑い 6 株、2 家庭内 6 株、6 散発事例 6 株、計 1 8 株の O157



4. 名古屋市

菌株情報 (serovar で同じ色は同一事例)

| Serovar | Toxin | 症状 | 喫食 | 年齢 | 職業 | 発病or採取日 | 保健所 | 病院 | 備考 |
|---------|-------|-------------|-------|----|----|---------|-----|---------|--------|
| O157:H7 | Stx 2 | なし | ハンバーグ | 6 | | | 守山 | | |
| O157:H7 | Stx 2 | 出血性下痢、腹痛、発熱 | ハンバーグ | 4 | | 7/23 | 守山 | 守山市民 | 860の兄弟 |
| | Stx 2 | 出血性下痢 | - | 2 | | 7/30 | 瑞穂 | 宇井こどもCL | |
| | Stx 2 | なし | - | 23 | | | 瑞穂 | 接触者 | 864の父 |
| | Stx 2 | なし | - | 22 | | | 瑞穂 | 接触者 | 864の母 |
| O157:H7 | Stx 2 | 下痢 | - | 1 | | 8/11 | 南 | みなみこども | |
| O157:H7 | Stx 2 | - | - | | | | 天白 | | |
| O157:H7 | Stx 2 | - | - | | | | 天白 | | 873の父 |
| O157:H7 | Stx 2 | - | - | | | | 天白 | | 873の母 |
| O157:H7 | Stx 2 | なし | 生肉(牛) | 46 | 調理 | 8/24 | 中川 | 細川外科 | |
| O157:H7 | Stx 2 | 出血性下痢、腹痛、発熱 | ハンバーグ | 66 | 主婦 | 8/24 | 緑 | 長谷川胃腸科 | |
| O157:H7 | Stx 2 | 出血性下痢 | 生肉(牛) | 22 | | 11/8 | 中 | 横山胃腸科 | |



東海・北陸6地研の IS printing system の検討

各地研の代表泳動図、及び結果を以下に示す。

1. 富山県 前述の「PFGE が行政に還元された 5 地研の代表 1 事例」に示した。

2. 岐阜県



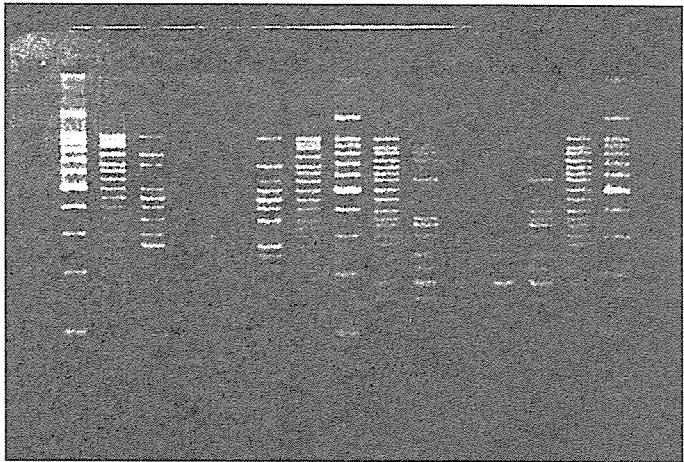
IS-printing System 泳動像

M : 100bp Ladder

Std : Standard DNA

| レーン | 感染研 No. | PFGE Type No. | 1st set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | 2nd set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | 非特異バンド | | | |
|------|------------|------------------|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|--------|------|-----------------------|---------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | | sta2 | sta1 | |
| 1 | 030284 | III k'ND III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1st: 510 bp, 225 bp |
| 2 | 030651 | II a II c I | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | | |
| 3 | 040722 | 176 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1st: 225 bp, 2nd: 220 | |
| 4 | 040777 | 96 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2nd: 480 bp |
| 5 | 050455 | a38 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2nd: 480 bp | |
| 6 | 050819 | a136 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2nd: 480 bp | |
| 7 | 050840 | a154 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 8 | 051492 | a265 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1st: 225 bp |
| 9 | 060874 | b181 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | | |
| 10 | 061157 | b268 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | |
| 11 | 061462 | b410 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1st: 225 bp | |
| 12 | 061469 | b396 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| 13 | 062219 | b277 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | | |
| 14 | 062224 | a259 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | | |
| 写真なし | 030650 | II a II c I | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | | |
| | 040778 | 96 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2nd: 480 bp | |
| | 050841 | 851 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | |
| | 061467 | b387 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |

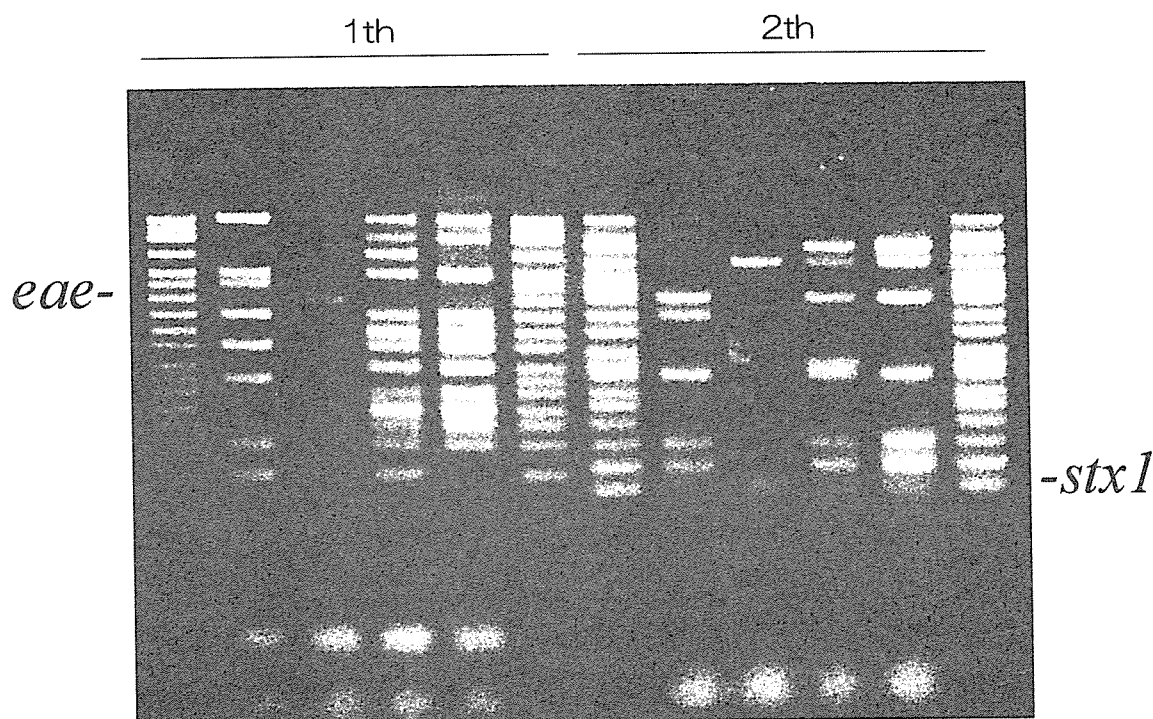
3. 豊田市



| | 1st set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | 2nd set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|--------|
| Primer No | 1-01 | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | 1-16 | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | stx2 | stx1 | 備考 | |
| Size (bp) | 974 | 905 | 839 | 742 | 645 | 595 | 547 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 171 | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | 非特異バンド |
| No.25 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| No.26 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| No.40 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | |
| No.42 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| No.44 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 0 | 0 | 0 | 1 | | 0 | 1 | 1 | 1 | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 0 | 0 | 0 | 1 | | 0 | 1 | 1 | 1 | | | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| No.50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| No.54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | |
| No.55 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |

No. 50 から 55 は食中毒疑い、No. 63、64 は家庭内事例

4. 愛知県

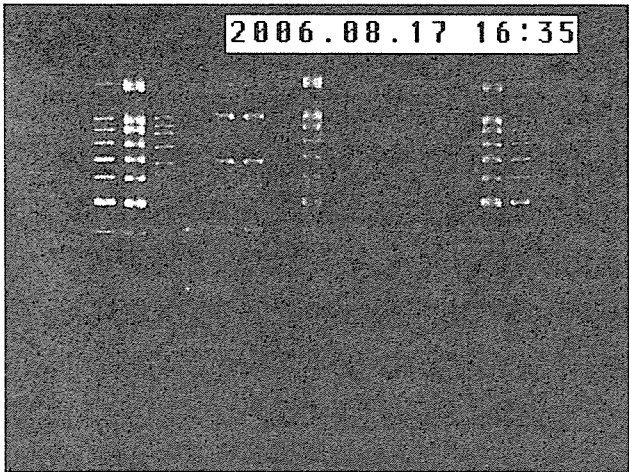


1th、2th：プライマーセット。1th、2thとも両端はマーカ。マーカに挟まれた4検体の菌株番号は左から6-34、35、42、43。

| Primer No | 1-01 | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | ese | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | 1-16 | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | stx2 | stx1 | P | GE | type | | |
|-----------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|----------|------|-----|--|
| Size (bp) | 974 | 905 | 839 | 742 | 645 | 595 | 547 | 495 | 442 | 405 | 353 | 3258 | 300 | 269 | 241 | 211 | 171 | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | | | | | |
| 5-122 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | a | 891 | | |
| 6-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | b | 233 | | |
| 6-3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | b | 233 | | | |
| 6-4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | b | 223 | | | |
| 6-5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | b | 223 | | |
| 6-6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | b | 223 | | |
| 6-9 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | | | b | 51 | | |
| 6-10 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |
| 6-11 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |
| 6-12 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |
| 6-13 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | |
| 6-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | | | | |
| 6-18 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | a | 259 | | |
| 6-19 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | b | 329 | | |
| 6-20 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | a | 259 | | |
| 6-21 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | a | 239 | | |
| 6-22 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | a | 259 | | |
| 6-23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | | | |
| 6-27 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | b | 321 | |
| 6-28 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | | b | 320 | |
| 6-29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | 726 | |
| 6-30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | 726 | |
| 6-31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | | | 726 | | |
| 6-32 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | Degradat | | | |
| 6-33 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | | | b | 336 | | |
| 6-34 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | b | 335 | | | |
| 6-35 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | | |
| 6-42 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | b | 58 | | |
| 6-47 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | b | 327 | | |

PFGE type の同じ色は同一集団事例。

5. 岐阜市



| | | 1st set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | 2st set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|----|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------------|-----------|-----------|
| Primer | | 1-01 | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | 1-16 | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | sb2 | sb1 | Primer No. | | |
| # | ze | (1974 | 905 | 839 | 742 | 645 | 595 | 547 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 171 | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | Size (bp) | |
| O157#1068 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | O157#1068 | |
| O157#1069 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | O157#1069 |
| O157#1070 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | O157#1070 |
| O157#1071 | | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | O157#1071 |

6. 福井県

| 1st set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Primer N. | 1-01 | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | eee | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | 1-16 |
| Size (bp) | 974 | 905 | 839 | 742 | 645 | 595 | 547 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 171 |
| F18-4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| F18-12 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| F18-13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| F18-14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| F18-15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| F18-16 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-20 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-21 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| F18-22 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-23 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-24 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-25 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| F18-27 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-28 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-29 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-30 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| F18-31 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| F18-32 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| F18-33 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| F18-34 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| F18-35 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| F18-36 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |

| 2nd set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|
| | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | stx2 | stx1 | 備考 |
| | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 | 非特異バンド |
| F18-4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-12 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-13 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-14 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-15 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-16 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-20 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-21 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-22 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | なし |
| F18-23 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-24 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | なし |
| F18-25 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-28 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | なし |
| F18-29 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-30 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-31 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-32 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |
| F18-33 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | なし |
| F18-34 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | なし |
| F18-35 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | なし |
| F18-36 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | なし |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 18 年度分担研究報告書

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究

| | | |
|-------|-----------|------------------|
| 分担研究者 | 勢戸和子 | 大阪府立公衆衛生研究所 |
| 協力研究者 | 岩崎由紀 | 滋賀県衛生科学センター |
| | 藤原恵子 | 京都府保健環境研究所 |
| | 平野 隆 | 京都市衛生公害研究所 |
| | 小笠原準、中村寛海 | 大阪市立環境科学研究所 |
| | 横田正春 | 堺市衛生研究所 |
| | 西海弘城、福永真治 | 兵庫県立健康環境科学研究センター |
| | 黒川 学 | 神戸市環境保健研究所 |
| | 川西伸也 | 姫路市環境衛生研究所 |
| | 榮井 毅 | 奈良県保健環境研究センター |
| | 金澤祐子 | 和歌山市衛生研究所 |
| | 田口真澄 | 大阪府立公衆衛生研究所 |

研究要旨

近畿ブロック内で発生した食中毒事例の関連性を明らかにするため、聞き取り調査に加えて分離菌の精査と比較に基づいた科学的な裏付けが求められる。遺伝子解析法のひとつであるパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法を共通の疫学指標として使用するため、11 衛生研究所の施設間差および 3 名の解析者による変動を検討した。精度管理株として腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 5 株を配布し、各施設で実施した PFGE 画像について解析を行った結果、解析者によって小さいサイズのコリゲンバンド認識にばらつきがあり、画像間の近似度を左右していた。これは、画像ソフトの自動バンド認識を目視で修正したためで、画像のコントラストにおける施設間差を解消することにより改善できると考えられた。また、より迅速な遺伝子解析法として IS-printing System を検討したが、実用化には電気泳動条件の統一、テンプレート調整法の検討、PCR 反応の成否を確認できる陽性対照の 3 点が課題であった。細菌性食中毒として事例数の多い *Campylobacter jejuni* について、*Sma*I と *Kpn*I を用いた PFGE 解析が有用であるかどうかを検討したが、*Sma*I ではバンド数が少なくその解析能力にやや問題が見られた。また、*Kpn*I では小さいサイズのコリゲンバンドが近接したためパルスタイプの検討が必要であると考えられた。

A.研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 感染症は、毎年 3000 名以上の届出があり、その多くは汚染食品の摂食によるものである。夏季は患者発生が集中するが、各府県の事例が同一の感染源である可能性を見極め、感染の拡大を防ぐことは重要な行政対策である。EHEC の細菌学的疫学解析法として、パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法による遺伝子解析の有用性は確立されているが、共通の疫学指標として使用するため、近畿ブロックの 11 衛生研究所において同一の菌株を用いた精度管理を行い、施設間差および解析者による変動を検討した。さらに、宮崎大学林哲也先生らのグループによって開発された IS-printing System を試用し、EHEC O157 の遺伝子型別法としての有用性を PFGE と比較した。また、細菌性食中毒の原因菌として最も事例数の多い *Campylobacter jejuni* は、Lior 血清型別や Penner 血清型別によって、分離株の異同が判断されているが、いずれの方法によっても型別不能である株が頻繁に分離される。そこで、EHEC と同様に PFGE 法による遺伝子解析が実施可能であるか検討した。

B.研究方法

1.供試菌株

PFGE の精度管理には、2006 年に大阪府で分離された EHEC O157:H7 5 株（菌株 1～5）を用い、*Xba*I 切断されることを確認の上、11 施設に配布した（表 1）。IS-printing System の試用には、各自治体で 2006 年に分離され

た EHEC O157 を任意に選んで供試し、菌株情報として国立感染症研究所で実施された PFGE Type No.（PFGE 型）を添付した。*C. jejuni* は、大阪府で分離された 2 株（菌株 6、7）を 8 施設に配布し、各施設で分離、保存している菌株 2～10 株を加えて同時に PFGE を実施した（表 1、表 2）。

なお、菌株の配布にはマイクロバンク（アスカ純薬）を使用し、ドライアイスと同梱して郵送した。

2.PFGE 法

2-1.EHEC

平成 15 年度に示された感染研新プロトコールの Proteinase K 処理を 50℃一夜、制限酵素 *Xba*I 処理を 37℃ 2 時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施した（表 3）。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba*I 切断を使用した。プラグ作成および電気泳動には SeaKem Gold Agarose（タカラ）の使用を指定したが、制限酵素や泳動用バッファーなど他の試薬は、各施設で日常使用している製品を用いた。泳動時間は 19 時間を目安として、各施設の泳動装置でゲル下端から 1～1.5cm 程度の泳動距離になるようにした。また、泳動像はサイズマーカーの Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できることを条件とした。

2-2.*Campylobacter jejuni*

CDC のホームページで公開されている PulseNet USA の方法を前項の感染研新プロトコールに準じて改変した「*Campylobacter*

PFGE Protocol-Kinki」で実施した（表 3）。

すなわち、被検菌の前培養はスキロー寒天培地やミューラーヒントン培地などの平板培地とし、食塩加 PBS（0.01M PBS pH7.2、0.85%NaCl）500 μ l に菌を懸濁し、15,000 回転 1 分間の遠心操作で 2 回洗浄後にマックファーランド 1-2 の濃度に菌液を調整した。菌のアガロースブロック包埋や Proteinase K 処理は EHEC O157 と同様に行い、制限酵素処理は *Sma*I（ロッシュ）が 25°C、*Kpn*I（ロッシュ）が 37°C で 2 時間以上反応させた。電気泳動のサイズマーカーには EHEC と同じく *S. Braenderup* H9812 の *Xba*I 切断を使用した。なお、制限酵素は同一ロットを各施設に配布したが、その他の試薬は各施設で日常使用している製品を用いた。

3. PFGE 画像の解析

PFGE 画像は、EHEC O157、*C. jejuni* ともに実施施設から施設 X（A 解析者）に電子メールで集約した。EHEC O157 の画像は CD に記録して施設 Y（B 解析者）および施設 Z（C 解析者）に郵送し、3 施設で FingerprintingII バージョン 3（Bio-Rad）を用いて解析した。*C. jejuni* は、施設 X（A 解析者）のみで解析した。

いずれも、バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 5%、シヨルダ-感度 0 で行い、目視で補正した後、20.5kb-1135kb 間のバンドについて類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

4. IS-printing System

東洋紡から提供された IS-printing System Version 1 を使用し、説明書に記載の条件で PCR を実施した。テンプレートの調整はボイル法で行い、電気泳動は各施設で Standard DNA のバンドがプライマーセット 1 で 17 本、プライマーセット 2 で 18 本に分離される条件で行った（表 4）。判定は、プライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」、判定不能を「2」とし、35 桁の数値で表し IS 型とした。

C. 研究結果

1. EHEC O157 の PFGE 精度管理

各施設で使用している電気泳動装置は、CHEF-DRII および GenePath が各 1 施設で、残りの 9 施設は CHEF-DRIII であった（表 5）。電気泳動条件をみると、泳動温度は全施設 14°C で、泳動時間は 19 時間が 8 施設、18 時間が 2 施設、19.5 時間が 1 施設であった。バッファーマーカーによる違いは認められなかった。画像の取込は、4 施設で CCD カメラを使用しパソコンに記録していたが、7 施設はインスタントカメラで撮影した写真をスキャナで取り込んでいた。

電送された PFGE 画像は、いずれの施設も目視でサイズマーカーの Band 9、Band 10、Band 16 が認識できたが、画像全体が白っぽくコントラストの弱い画像も見られた（図 1）。また、施設 5 では菌株 2 がスミアになり、バンドパターンが得られなかった。泳動バッファ-にチオ尿素を加えて再検討したが改善されず、送付後凍結保存されていたマイクロバンクから再分離を実施し、複

数株についてやり直したが、いずれもスミアであったため画像解析から除外した。その他の画像について、自動バンド認識後に各解析者が目視補正を行い、デンドログラムを作成した（図 2-4）。

A 解析者は、菌株ごとに 7-9 画像が 100% 一致しており、特に菌株 2 と菌株 4 では全画像の近似度が 97% 以上と良好な結果を示した。菌株 1 は、10 画像の近似度が 96% と高く、一番大きいサイズのバンドの位置が異なっていた施設 1 の画像を加えても近似度は 92.5% であった。菌株 3 および菌株 5 についても、10 画像は近似度 96% のクラスターを作ったが、両株とも施設 5 の画像が別のクラスターを作り、合わせて 22 画像が近似度 89.4% と判定された。（表 6、図 2）。

B 解析者は、5 株とも菌株ごとに高い近似度のクラスターを作っていた。すなわち、菌株 5 で全画像が 100% 一致し、菌株 3 は 100% 一致の 10 画像とバンド数が 1 本多く認識された 1 画像とが近似度 97.2% のクラスターを作った。また、菌株 2 はバンド数 19 本の 8 画像とバンド数 20 本の 2 画像が各々 100% 一致し、全画像の近似度は 97.2% であった。菌株 1 と菌株 4 は、それぞれ 6 画像と 10 画像が 100% 一致していたが、バンド認識に 2 本の差があり菌株ごとの近似度は 93.5%、94.1% であった（表 6、図 3）。

C 解析者は、菌株 4 で全画像が 100% 一致し、10 画像が 100% 一致した菌株 5 でも全画像の近似度は 95.1% であった。菌株 2 は画像によって認識バンド数が 3 本異なっていたが、近似度は 94.1% と高い値を示した。菌株 1 は 8 画像が 100% 一致し、一番大きい

サイズのバンドの位置が異なっていた施設 1 の画像を含む 2 画像を加えても近似度は 94.3% であったが、施設 10 の画像が菌株 2 の 3 画像と 100% 一致と判定されたため、菌株全体の近似度は 89.3% となった。菌株 3 はバンド数 17 本の 8 画像で 100% 一致し、1 本違いの 2 画像を加えた 10 画像の近似度は 96% であったが、施設 9 の画像は認識バンド数が 14 本と少なく、クラスターを作らなかった（表 6、図 4）。

2. IS-printing System の試用

5 施設で合計 75 株について検討したところ、プライマーセット 1 では 4-14 本、プライマーセット 2 では 3-15 本の増幅が見られた（図 5）。いずれの施設でも、Standard DNA が 17 本あるいは 18 本に分離できていたが、施設 4 ではバンド間の距離が短かった。施設 10 は、各増幅バンドの分離は良好であったが、菌株によってバンドの濃淡が見られた。また、施設 5、施設 8、施設 11 では、同一株内でバンドにより増幅の強弱が見られたほか、株によっては非特異バンドも観察された。各施設で増幅の有無を判定し、その成績を集約したところ（表 7）、施設 4、施設 5 ではインチミン遺伝子である *eae* が陰性と判定された株が多く、施設 4 では 9 株中 3 株、施設 5 では 24 株中 22 株見られた。

75 株の PFGE 型は、Degradation の株を除いた 70 株が 54 タイプに分かれており、同一 PFGE 型は 10 組 26 株あったが、IS 型が完全に一致していたのは a254 と b518 の各 2 株ずつと b102 の 3 株のうち 2 株の 3 組のみ

であった（表 8）。一方、異なる PFGE 型の 3 組で IS 型の一致が見られ、PFGE が Degradation の株のうち 4 株は、2 株ずつ IS 型が一致していた（表 9）。

3.C. *jejuni* の PFGE 型別法の検討

*Sma*I 切断のバンド数は比較的少なく、配布株はいずれの施設も菌株 6 が 9 本、菌株 7 が 8 本で、各施設株も 31 株中 29 株が 9 本以下であった（図 6）。デンドログラムでは、菌株 7 の 8 画像が 100%一致し、菌株 6 も 100%一致した 5 画像と 3 画像が近似度 98.2%のクラスターを作った（表 10、図 7）。このクラスターには施設 10 のレーン 5（2005 年 10 月食中毒由来株）も含まれていた。この他に、施設 3 レーン 4 と施設 4 レーン 4、施設 8 レーン 6 と施設 11 レーン 4 がそれぞれ 100%一致し、前者は認識バンド数の 1 本多い施設 11 レーン 5 を、後者は認識バンド数が同数の施設 10 レーン 4 を加えた 3 株ずつで 94%、92%と高い近似度を示した。

*Kpn*I 切断は施設 11 で全株がスミアになり画像解析ができなかった。他の画像は *Sma*I に比べバンド数が多く、特に Band11（138.9Kb）以下に集中しており、バンド認識の難しい画像も見られた（図 8）。配布株の認識バンド数は菌株 6 で 12～15 本、菌株 7 で 10～14 本と画像によりばらつきがあり、100%一致画像は 2 株ずつ見られたものの、菌株ごとの近似度はいずれも 85%前後であった（表 10、図 9）。*Sma*I 切断で 100%一致した菌株 6 と施設 10 レーン 5 や施設 3 レーン 4 と施設 4 レーン 4 の *Kpn*I 切断パターンは、他の株よりも類似していたが、近似度

は約 72～75%であった。また、施設 1～4 と施設 8 で未消化のサイズの大きいバンドが見られた。

D. 考察

近畿ブロックでは、毎年 EHEC O157 の PFGE について精度管理を実施しており、各施設でも PFGE 実施の機会が多いことから、技術的な施設間差はある程度解消されつつある。しかしながら、画像のコントラストは均質ではなく、画像解析ソフトを用いたバンド検索を目視で修正する必要があった。今年度は 3 名の解析者が独立して画像解析を実施したが、3 名のバンド認識が一致したのは 54 画像中 27 画像で、菌株 3、菌株 4、菌株 5 はそれぞれ 11 画像中 6 画像、8 画像、9 画像のバンド認識が同一であった。菌株 1 と菌株 2 では、マーカの Band3（452.7Kb）付近の太いバンドを A 解析者は 2 本、B および C 解析者は 1 本に認識する傾向が見られたが、画像解析の結果には影響を与えていないと考えられた（図 2～図 4）。また、菌株 1 は施設 1 で一番大きいサイズのバンド位置が異なっていた（図 1）。これは供試菌株の前培養の段階で変異の入った株が選択されたと考えられるが、他の施設の画像との近似度は 3 名の解析者とも 93～94%であり、画像解析の結果への影響は小さいものであった。むしろ、小さいサイズのバンド認識の違いが近似度を左右しており、菌株 3 の施設 5 の画像（◆）で B 解析者と C 解析者はマーカの Band14（76.8Kb）以下を 6 本認識しており、他の画像と 100%一致したクラスターに含めていたが、A 解析者

は4本しか認識しておらず、他の10画像との近似度は89.4%にとどまっていた。また、施設9の画像(◇)では、A解析者とB解析者は6本認識し、他の画像と100%一致していたが、C解析者は3本のみで近似度は85.2%と、本研究で最も低い数値であった。

したがって、EHEC O157のPFGE解析では施設間差および解析者による変動を解消するため、サイズの小さいバンドを明瞭に認識できる画像が必要であると考えられる。これには技術的な問題だけでなく、電気泳動装置や写真撮影装置など機器類の維持管理も課題となる。また、施設5では菌株2がスメアな泳動像となったことから、菌株の輸送方法や保存方法に配慮が必要であると考えられた。

PFGEの手順の煩雑さと施設間差を解消し、より迅速に菌株間の異同を判断するため、IS-printing Systemの有用性が期待されたが、実用には3つの課題があると考えられた。第一は、1レーンで17~18本のバンドを明瞭に分離する電気泳動条件である。同じ泳動バッファーを使用しているアガロースの種類により泳動像は異なっており、特に大きいサイズのバンドを区別するため、アガロースや泳動バッファーの種類を統一すべきであると考えられた。第二に、菌株によってバンドの濃淡が見られたことから、増幅効率に差のないテンプレート調整法あるいはサイクル数などの増幅条件を検討しなければならない。第三には、PCR反応の成否を判定する陽性対照の必要性である。施設によって*eae*が増幅されていない株が見られたが、EHEC O157は全株インチミン

を保有しており、これらの株ではPCR反応に問題があったと推察される。同一PFGE型でIS型の判定が異なった株が8組あったが、電気泳動像やPCR反応に問題があった可能性もあり、今回の検討だけではPFGEとの相関性を評価できない。また、異なるPFGE型でIS型の一致した株も見られたが、これは両方法の型別能力の差であると考えられた。PFGEでは1本異なれば型名が異なるものの、肉眼的な画像観察で全体的な類似性を判断することができる。今回の検討でも、施設11の菌株1と2は家族であり、PFGE型名は異なっていたが泳動パターンは1本違いであった。しかし、IS型ではプライマーセット1-05の判定が異なっており、IS型の判定と菌株の遺伝子型の異同をどのように関連づけるのかも課題である。

以上の問題点はあるものの、IS-printing Systemはコロニーからの実施が可能で迅速性に優れ、PFGEでスメアになる株についても型別可能であることは利点である。来年度以降、上記の課題についてさらに検討したい。

近畿ブロックでは、カンピロバクターの疫学指標は血清型別が主流であり、同一事例で多種類の血清型の株が分離されることが問題であった。PFGEの有用性を検討するに当たってまずプロトコルの簡便さを重要視し、EHEC O157のプロトコルをもとにPulseNet USAの方法を改変した。Degradationを抑えるためのホルマリン処理は行わなかったが、今回供試した配布株と各施設株はDNA変性は起こらなかった。施設11の*KpnI*

切断で全株がスメアになったが、これはブロックを作製してから PFGE 実施まで約 1 ヶ月保存していたことが影響したものと考えられた。実際の泳動パターンは、*Sma*I 切断で配布株の画像が高い近似度を示し、良好な結果であった。しかし、これはバンド数が 8-9 本と少ないためで、型別能力には劣ると推察された。すなわち、各施設株で *Sma*I の切断パターンが 100%一致した株の *Kpn*I 切断パターンは異なっていた。*Kpn*I 切断のバンド数は 8-15 本程度と *Sma*I よりも多いが、未消化バンドも多く、実施したパルスタイムでは小さいサイズのバンドの分離が良くなかった。配布株の認識バンド数は 2 株とも 3-4 本異なっており、近似度も 85%程度にとどまっていた。これは、EHEC 同様 *C. jejuni* の *Kpn*I 切断画像においても、認識バンド数のばらつきは小さいサイズのバンドが不明瞭であることが影響しており、マーカーの Band16 (33.3Kb) 以下を省いて画像解析をおこなっても、大きな改善は見られなかった。今後は、パルスタイムや制限酵素の変更について検討するとともに、*Sma*I 切断の被検株数を増やしてスクリーニング法としての有用性を調べる。

E. 結論

EHEC の PFGE 型別法の実施に際して、施設間差と解析者による変動を最小限にするには、サイズの小さいバンドを明瞭に認識できる画像が必要であり、各施設で技術の維持を図るとともに機器類の保守管理も重要である。また、より迅速性に優れた EHEC O157 型別法として IS-printing System を実用

化するため、電気泳動条件やテンプレート調整法など、いくつかの問題点を解決しなければならない。*Campylobacter* 食中毒においても PFGE を活用するため、*Sma*I 切断の解析数を増やすとともに他の制限酵素についても検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、濱野米一、勢戸和子、山崎 渉、河原隆二、依田知子、石橋正憲、塚本定三、堤 千津、足立和人：学校給食によるカンピロバクター集団食中毒-大阪府，病原微生物検出情報，27:172-173, 2006

2. 学会発表

1) 勢戸和子、田口真澄、山崎渉、塚本定三、小林一寛：大阪府における minor serotype STEC の検出状況と分離株の細菌学的特徴，第 10 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム（2006 年 8 月，東京）

2) 久米田裕子、田口真澄、川津健太郎、河合高生、神吉政史、浅尾 努、勢戸和子、山崎 渉、河原隆二、塚本定三、堤 千津、足立和人：学校給食によるカンピロバクター集団食中毒，第 27 回日本食品微生物学会（2006 年 9 月，大阪）

3) 福永真治、押部智宏、近平雅嗣、兼子めぐみ、田中哲也、柴折浩幸：兵庫県内の食鳥処理場から分離されたカンピロバクターの

分子疫学的解析, 平成18年度全国公衆衛生
獣医師協議会調査研究発表会 (2006年9月,
東京)

4) 福永真治、押部智宏、近平雅嗣: 下痢症
患者から分離された変異型*stx2*遺伝子保有
大腸菌O128:HNMの性状, 平成18年度日本
獣医公衆衛生学会(近畿) (2006年10月, 大阪)

4) 山本京子、河野通大、三谷亜里子、藤原
恵子、時武正明、安藤明典、星野桃子、上田
郁夫: 食鳥処理場由来カンピロバクター属菌

のPFGE遺伝子解析による汚染状況の一考察,
平成18年度日本獣医公衆衛生学会(近畿)
(2006年10月, 大阪)

5) 勢戸和子、田口真澄、塚本定三: 大阪府
で分離された志賀毒素産生性大腸菌
(STEC) O165 の細菌学的特徴, 第 80 回日
本細菌学会総会 (2007 年 3 月, 大阪)

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 精度管理などに用いた配布株

| 菌株番号 | 菌種 | 分離年月 | 備考 |
|------|-----------------------------|----------|--------------|
| 1 | EHEC O157:H7 (VT1,VT2) | 2006年4月 | PFGE型 b23 |
| 2 | EHEC O157:H7 (VT1,VT2) | 2006年4月 | PFGE型 a259 |
| 3 | EHEC O157:H7 (VT1,VT2) | 2006年7月 | PFGE型 b274 |
| 4 | EHEC O157:H7 (VT1,VT2) | 2006年7月 | PFGE型 a458 |
| 5 | EHEC O157:H7 (VT1,VT2) | 2006年8月 | PFGE型 b272 |
| 6 | <i>Campylobacter jejuni</i> | 2005年11月 | Penner血清型 A群 |
| 7 | <i>Campylobacter jejuni</i> | 2006年6月 | Penner血清型 D群 |

表2 *Campylobacter jejuni* PFGE 実施株

| 施設 | レーン (左から) | 菌株の由来 | 施設 | レーン (左から) | 菌株の由来 |
|------|--------------|-----------------------------|-------|--------------|-----------------------------|
| No.1 | 1 | Marker | No.4 | 12 | と体表面(2003年9月) 血清型 F群 |
| | 2 | 菌株6 | | 13 | と体表面(2003年4月) 血清型 R群 |
| | 3 | 菌株7 | | 14 | ブロイラー盲腸便(2003年3月) 血清型 Y群 |
| | 4 | 食品 | | 15 | Marker |
| | 5 | Marker | No.8 | 1 | Marker |
| | 6 | 食中毒 | | 2 | 菌株6 |
| | 7 | 食中毒 | | 3 | 菌株7 |
| | 8 | 食中毒 | | 4 | Marker |
| | 9 | Marker | | 5 | 鶏レバー |
| No.2 | 1 | Marker | | 6 | 散発 |
| | 2 | 菌株6 | | 7 | 海外渡航者下痢症 |
| | 3 | 菌株7 | | 8 | Marker |
| | 4 | 食中毒(2004年) | No.9 | 1 | Marker |
| | 5 | 食中毒(2003年) | | 2 | 菌株6 |
| | 6 | Marker | | 3 | 菌株7 |
| No.3 | 1 | Marker | | 4 | 食中毒 |
| | 2 | 菌株6 | | 5 | 食中毒 |
| | 3 | 菌株7 | | 6 | 食中毒 |
| | 4 | 散発 | | 7 | Marker |
| | 5 | 散発 | No.10 | 1 | Marker |
| | 6 | 散発 | | 2 | 菌株6 |
| No.4 | 1 | Marker | | 3 | 菌株7 |
| | 2 | 菌株6 | | 4 | 食中毒(2006年5月) |
| | 3 | 菌株7 | | 5 | 食中毒(2005年10月) |
| | 4 | 食中毒(2006年5月) 血清型 A群 | | 6 | 有症苦情(2005年11月) |
| | 5 | 食中毒(2006年5月) 血清型 O群 | | 7 | Marker |
| | 6 | 食中毒(2005年6月) 血清型 O群 | No.11 | 1 | Marker |
| | 7 | 食中毒(2004年5月) 血清型 J群 | | 2 | 菌株6 |
| | 8 | 食中毒(2005年6月) 血清型 S群 | | 3 | 菌株7 |
| | 9 | Marker | | 4 | 食中毒 |
| | 10 | 食鳥処理施設(2003年12月) 血清型 C群 | | 5 | 食中毒 |
| | 11 | ブロイラー盲腸便(2003年6月) 血清型 D群 | | 6 | 食中毒 |
| | | | | 7 | Marker |

表3 EHEC O157 および *Campylobacter jejuni* の PFGE プロトコール

| | PFGE New Protocol - Kinki | <i>Campylobacter</i> PFGE Protocol - Kinki |
|---------------|--|---|
| 菌の前培養 | TSB 一夜培養液 | 平板培地 |
| 菌液調整 | 培養液200 μ lを遠心集菌し、滅菌蒸留水200 μ lに再懸濁する | 食塩加PBS 500 μ lに菌を懸濁し2回洗浄後MacFaland 1~2に調整する |
| 菌のアガロースブロック包埋 | 1% SeaKem Gold agarose in DW 50°C Cell suspension 200 μ l + 1% agarose 200 μ l | 1% SeaKem Gold agarose in DW 50°C Cell suspension 200 μ l + 1% agarose 200 μ l |
| 菌体処理 | 1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl-sarcosine in 0.5M EDTA, pH8.0 1ml 50°C, over night | 1mg/ml Proteinase K, 1% N-lauryl-sarcosine in 0.5M EDTA, pH8.0 1ml 50°C, over night |
| 洗浄と制限酵素前処理 | 4mM Pafabloc SC in TE 500 μ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min Enzyme buffer for <i>Xba</i> I 200 μ l on ice, 20min | 4mM Pafabloc SC in TE 500 μ l 50°C, 20min, twice TE 1ml on ice, 20min Enzyme buffer for <i>Sma</i> I or <i>Kpn</i> I 200 μ l on ice, 20min |
| 制限酵素処理 | 30unit/sample enzyme buffer 100 μ l 37°C, 2hr | 40unit/sample enzyme 100 μ l 25°C(<i>Sma</i> I), 37°C(<i>Kpn</i> I) 2h - over night |
| 電気泳動 | 6V/cm, 2.2 - 54.2s, 19h 14°C, 0.5xTBE | <i>Sma</i> I 6V/cm, 6.8 - 35.4s, 18h 14°C, 0.5xTBE <i>Kpn</i> I 6V/cm, 5.2 - 42.34s, 18h 14°C, 0.5xTBE |
| マーカー | <i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I) | <i>Salmonella</i> Braenderup H9812(digested by <i>Xba</i> I) |

表 4 IS-printing System の電気泳動条件

| 施設 | agaroseの濃度と種類 | 泳動バッファー | 泳動時間 |
|-------|---|-----------|--------------|
| No.4 | 3% NusieveGTG: Certified Molecular Biologyagarose (BIO-RAD)=1: 2 | 0.5 x TBE | 100V, 55分 |
| No.5 | 3% Agarose 21 (ニッポンジーン) | 0.5 x TBE | 100V, 2時間10分 |
| No.8 | 3% NuSieve GTG: Agarose I=2: 1 | 1 x TBE | 100V, 約90分 |
| No.10 | 3% NuSieve GTG: AgaroseX (WAKO)=2: 1 | 1 x TBE | 100V, 60min |
| No.11 | 4% NuSieve GTG: Agarose I=3: 1 | 1 x TAE | 100V, 64min |

表 5 各施設の電気泳動装置と撮影装置

| 施設 | 電気泳動装置 | 撮影装置 (メーカー) | | 画像取り込み装置 | |
|-------|------------|-------------|------------|----------|----------------------|
| No.1 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (Polaroid) | Canon | CanoScan N676U |
| No.2 | CHEF-DRII | CCDカメラ | (ATTO) | ATTO | AE6920 (Printgraph) |
| No.3 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (Polaroid) | Canon | PIXUS MP700 |
| No.4 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (Mamiya) | SHARP | JX-250 |
| No.5 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (フナコシ) | EPSON | GT700 |
| No.6 | CHEF-DRIII | CCDカメラ | (BIO-RAD) | BIO-RAD | InstaDocII |
| No.7 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (フナコシ) | Canon | CanoScan N1220U |
| No.8 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (Polaroid) | EPSON | GT-7700U |
| No.9 | GenePath | CCDカメラ | (ATTO) | ATTO | Image Saver AE-6905C |
| No.10 | CHEF-DRIII | インスタントカメラ | (Polaroid) | | |
| No.11 | CHEF-DRIII | CCDカメラ | (ATTO) | ATTO | AE6920 (Printgraph) |

表 6 EHEC O157 の PFGE 画像解析における各解析者の近似度と認識バンド数

| 菌株 番号 | A解析者 | | | B 解析者 | | | C解析者 | | |
|----------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|
| | 100% 一致 画像数 | 近似度 (%) | 認識 バンド数 (本) | 100% 一致 画像数 | 近似度 (%) | 認識 バンド数 (本) | 100% 一致 画像数 | 近似度 (%) | 認識 バンド数 (本) |
| 1 | 8 | 92.5 | 18, 19, 20 | 6 | 93.5 | 18, 19, 20 | 8 | 89.3 | 18, 19 |
| 2 | 7, 2 | 97.1 | 19, 20, 21 | 8, 2 | 97.4 | 19, 20 | 5, 3 | 94.1 | 17, 19, 20 |
| 3 | 8 | 89.4 | 16, 17, 18 | 10 | 97.2 | 17, 18 | 8 | 85.2 | 14, 16, 17, 18 |
| 4 | 9, 2 | 97.3 | 18, 19 | 10 | 94.1 | 16, 18 | 11 | 100 | 18 |
| 5 | 8 | 89.4 | 16, 18, 20 | 11 | 100 | 18 | 10 | 95.1 | 17, 18 |

表7 IS-printing System の判定結果

| 施設 | 菌株 | 1st set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | 2nd set Primer Mix | | | | | | | | | | | | | | | | PFGE型 | | |
|---------|----|--------------------|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--------------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|--------|------|
| | | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | eae | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | | 16 | stx2 |
| No.4-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | b450 | |
| No.4-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | b93 | |
| No.4-3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | b440 | |
| No.4-4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a259 | |
| No.4-5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | b446 | |
| No.4-6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | a205 | |
| No.4-7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | b449 | |
| No.4-8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | b432 | |
| No.4-9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | b300 | |
| No.5-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | b105 |
| No.5-2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | b102 |
| No.5-3 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a b102 | |
| No.5-4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | b102 |
| No.5-5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | b45 | |
| No.5-6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | b114 | |
| No.5-7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | a388 | |
| No.5-8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | b104 | |
| No.5-9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | a388 | |
| No.5-10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | a388 | |
| No.5-11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | b100 | |
| No.5-12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | b104 | |
| No.5-13 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | b103 |
| No.5-14 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | a b115 | |
| No.5-15 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | b111 | |
| No.5-16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | b101 | |
| No.5-17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a b58 | |
| No.5-18 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 112 | |
| No.5-19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | b138 | |
| No.5-20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | b520 | |
| No.5-21 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | b513 | |
| No.5-22 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | b512 | |
| No.5-23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | a b518 | |
| No.5-24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | b518 | |
| No.8-1 | 1 | 0 | w | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | b 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a62 | |
| No.8-2 | 0 | 0 | w | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | c 750 | |
| No.8-3 | 1 | 0 | w | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a401 | |
| No.8-4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a401 | |
| No.8-5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 247 | |
| No.8-6 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | d a241 | |
| No.8-7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 247 | |
| No.8-8 | 1 | 0 | w | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | a269 | |
| No.8-9 | 1 | 0 | w | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | a397 | |
| No.8-10 | 0 | 0 | 0 | w | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | a254 | |
| No.8-11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | a254 | |
| No.8-12 | 0 | 0 | w | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a258 | |
| No.8-13 | 0 | 0 | w | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | a258 | |
| No.8-14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |