

写真1

共通菌株(O157)5株のPFGE画像(施設1~11)

共通菌株:

腸管出血性大腸菌O157

No.1 E07877 (VT1+VT2)

No.2 E07885 (VT2)

No.3 E07961 (VT2)

No.4 E07974 (VT1+VT2)

No.5 E07971 (VT1+VT2)

DNAサイズマーカー:

S.Braenderup H9812

電気泳動条件:

6 V/cm, 2.2sec~54.2sec

20時間前後

Buffer温度 12°C

PFGE画像:

レーン1 マーカー(写真左側)

2 菌株No.1

3 菌株No.2

4 菌株No.3

5 菌株No.4

6 菌株No.5

7 マーカー

8 菌株No.1

9 菌株No.2

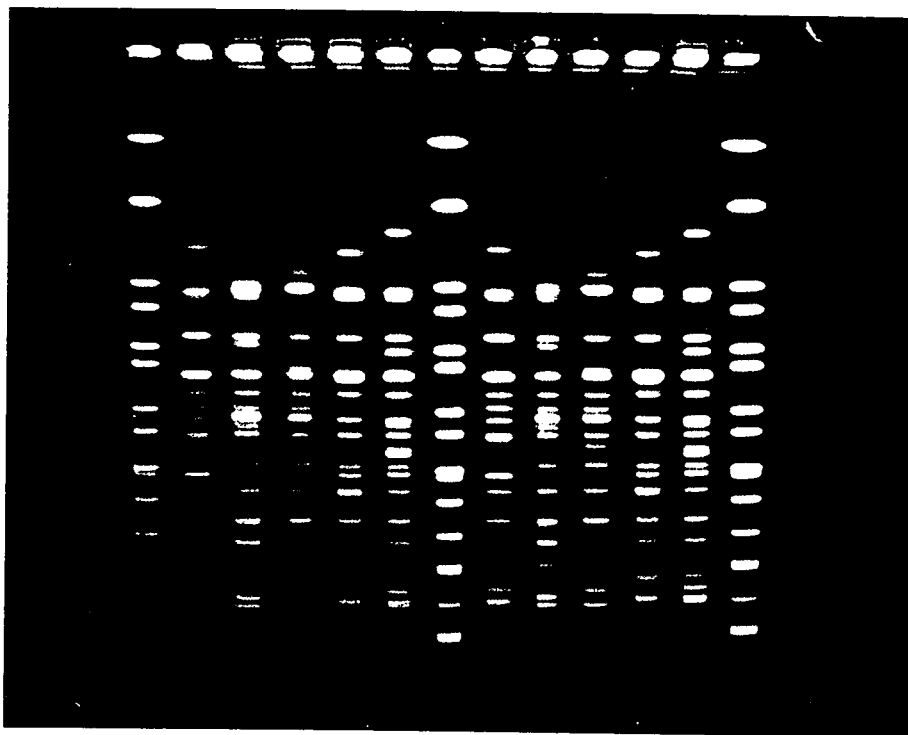
10 菌株No.3

11 菌株No.4

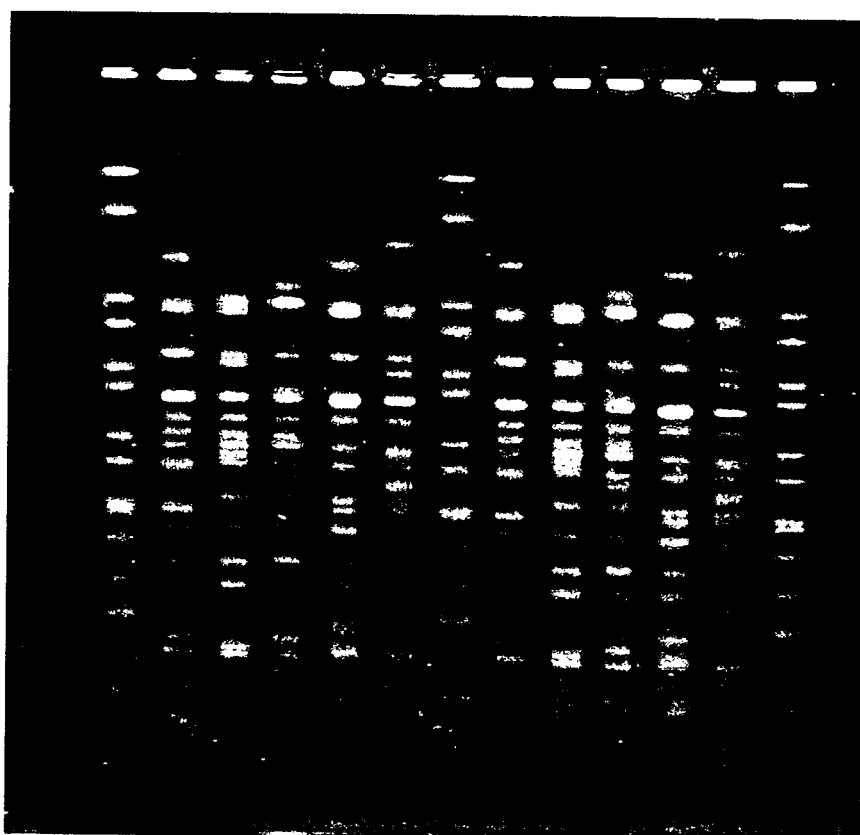
12 菌株No.5

13 マーカー(写真右側)

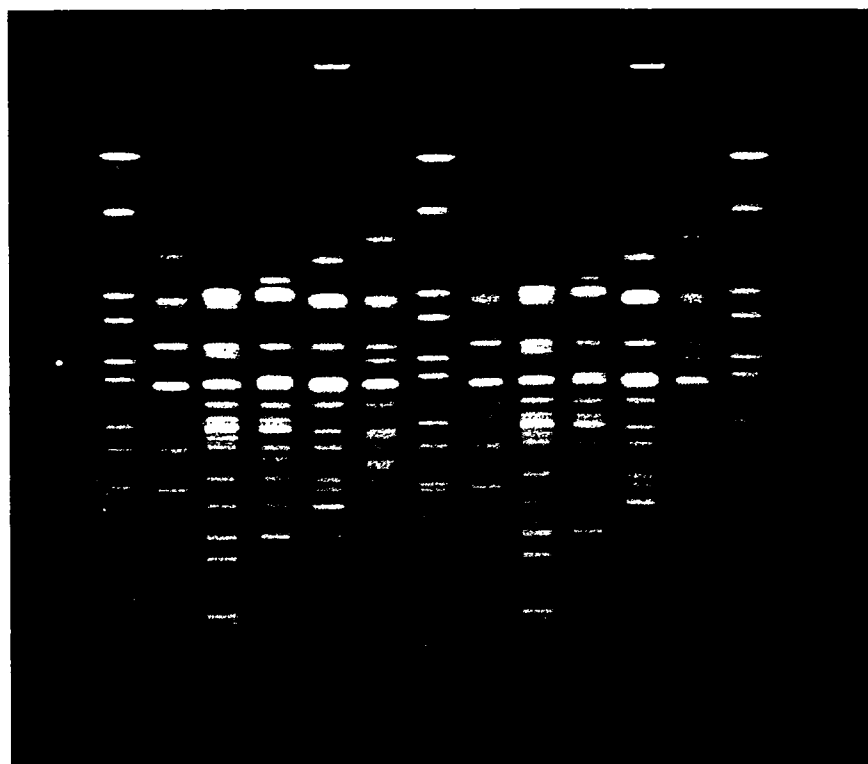
施設1



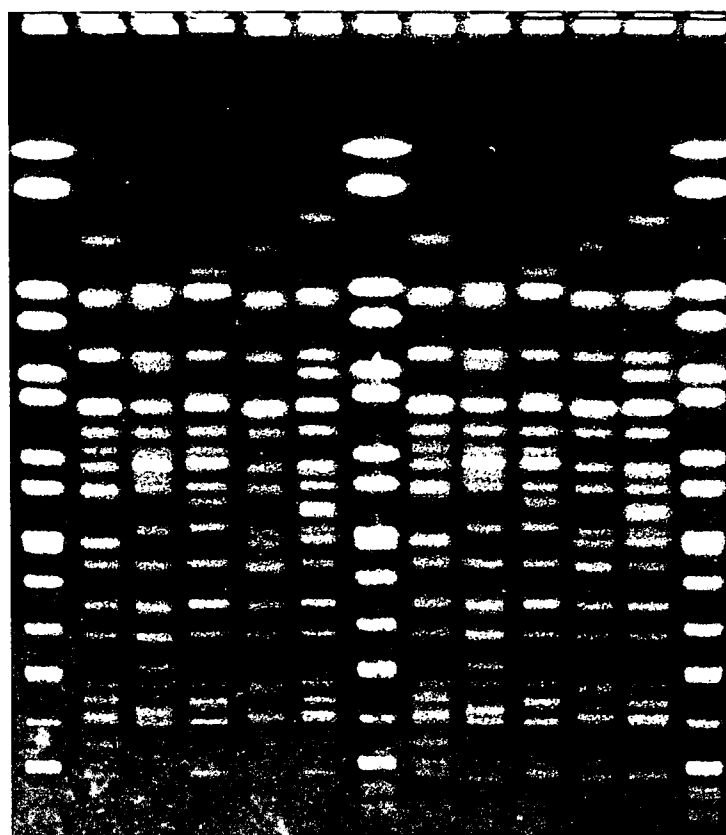
施設2



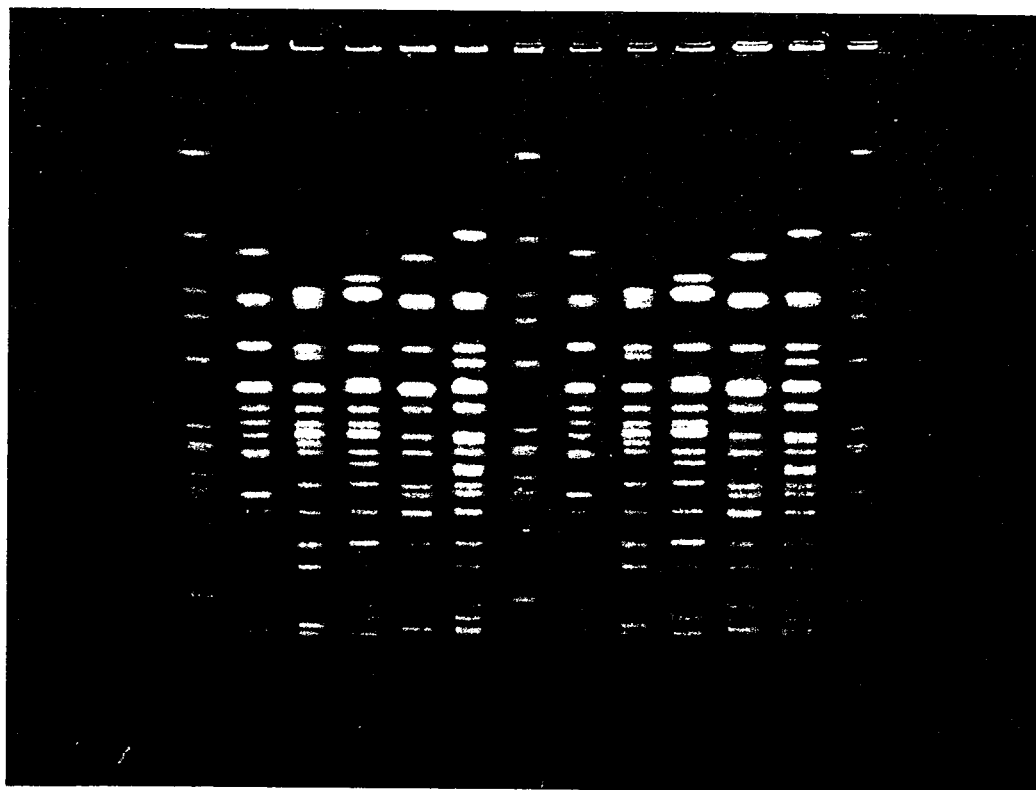
施設3



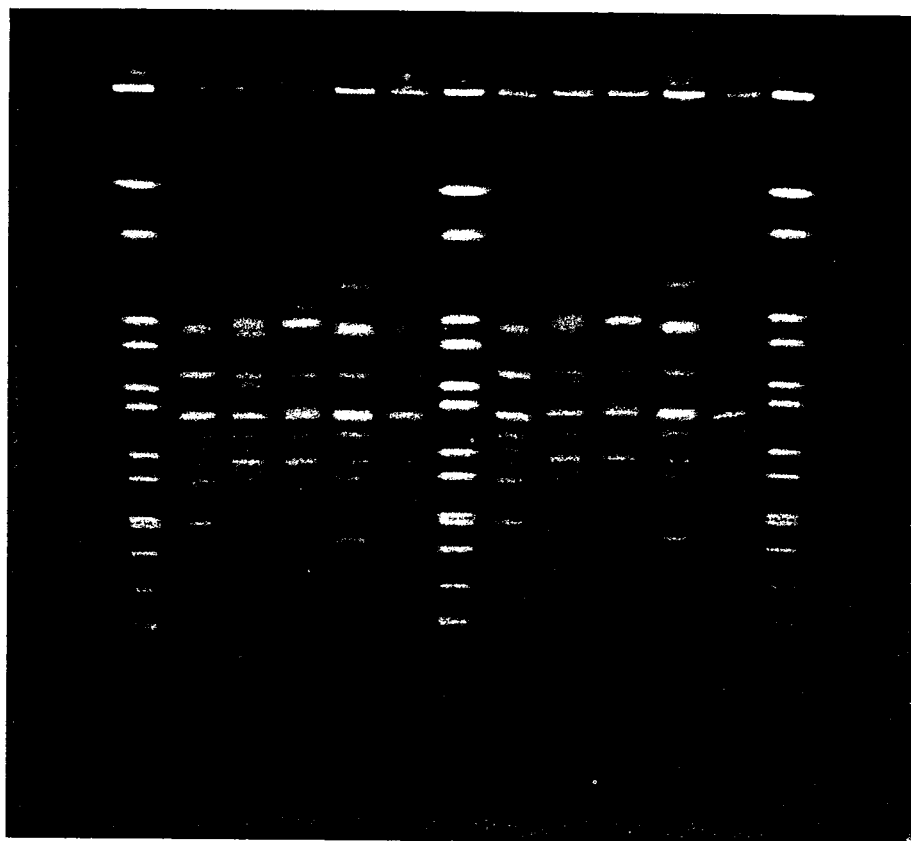
施設4



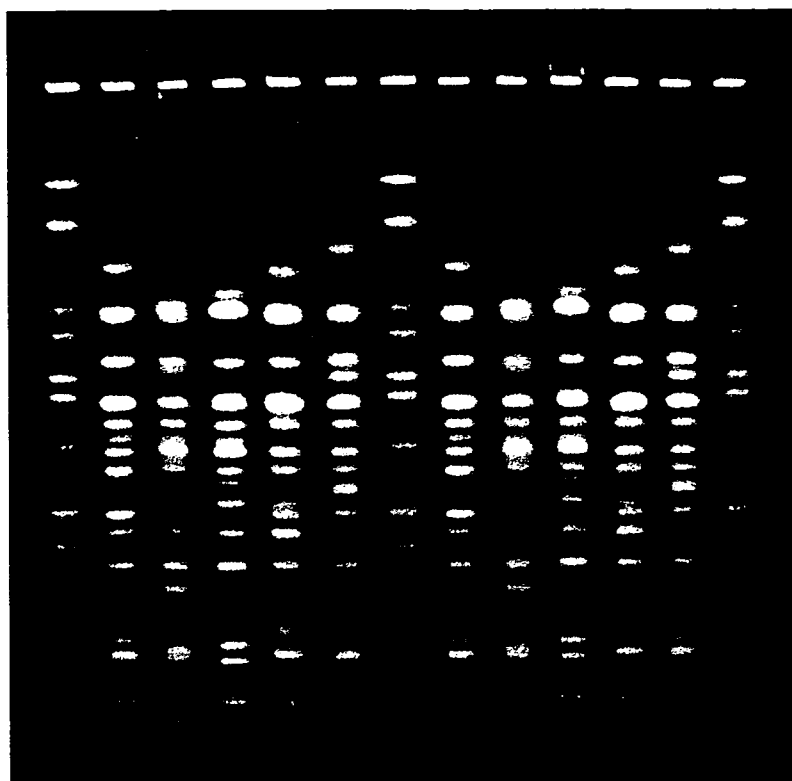
施設5



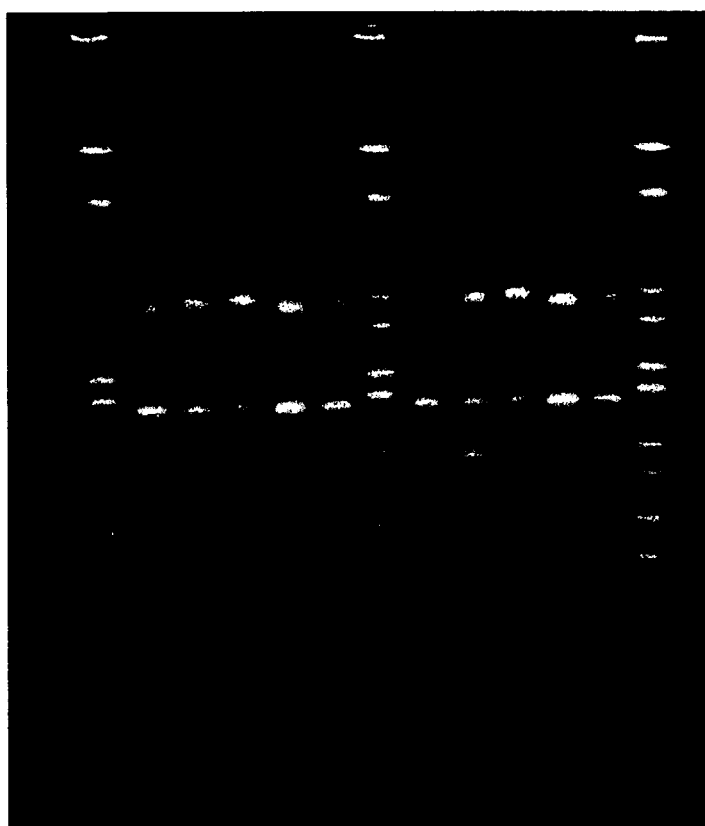
施設6



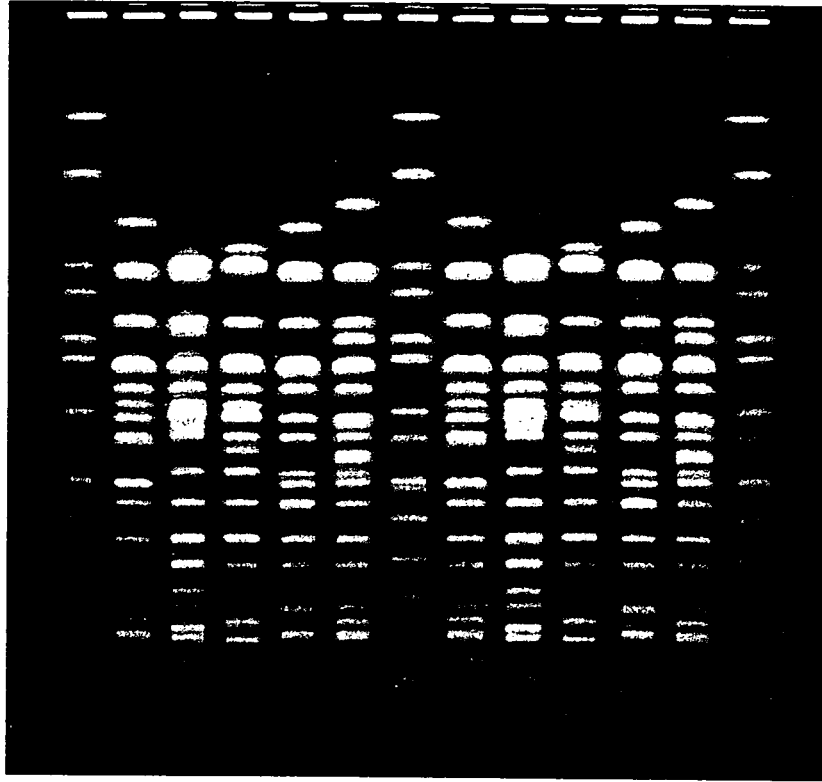
施設7



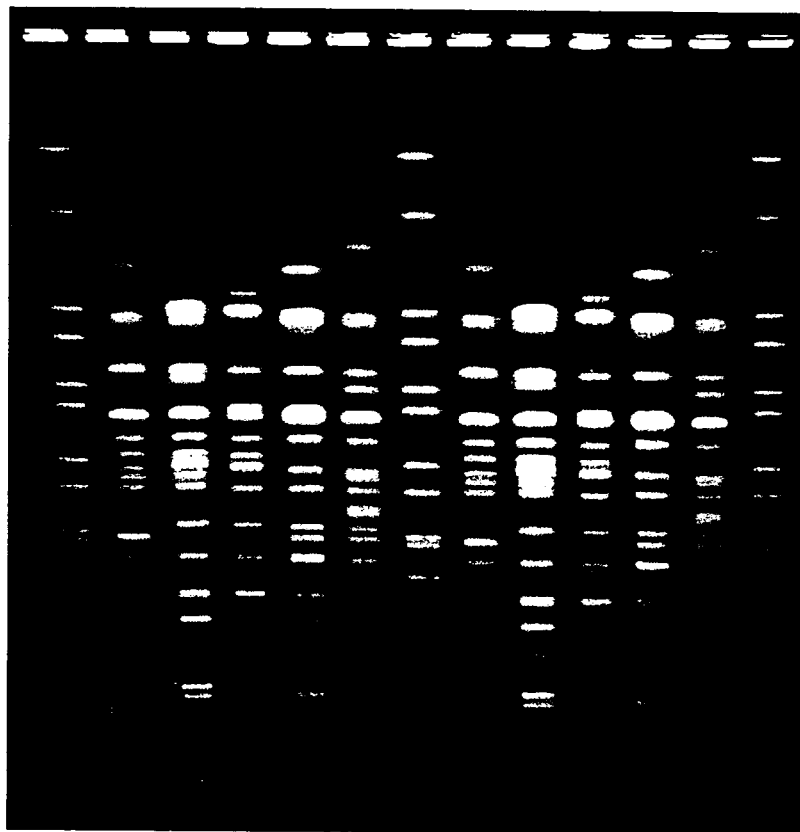
施設8



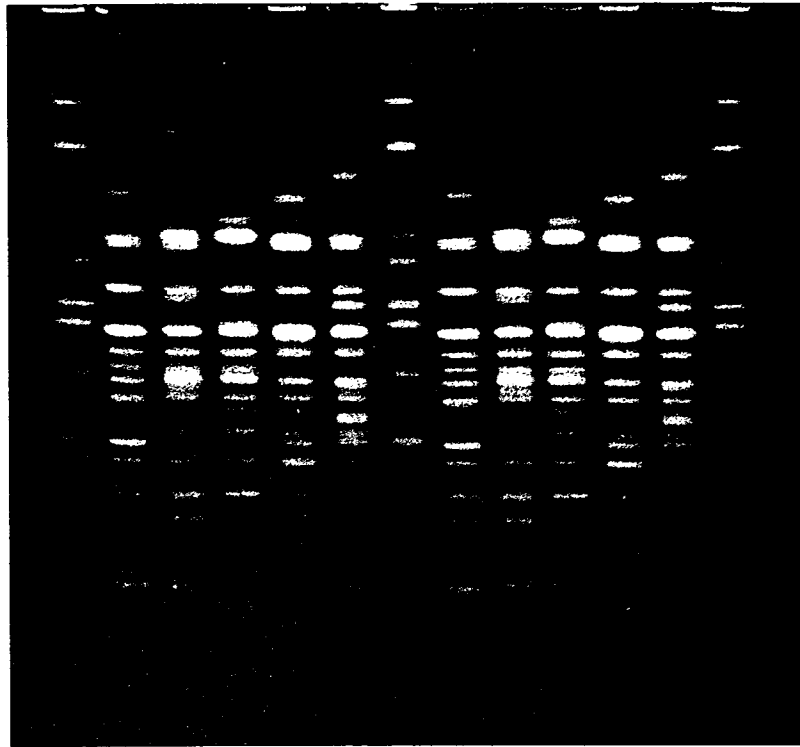
施設9



施設10



施設11



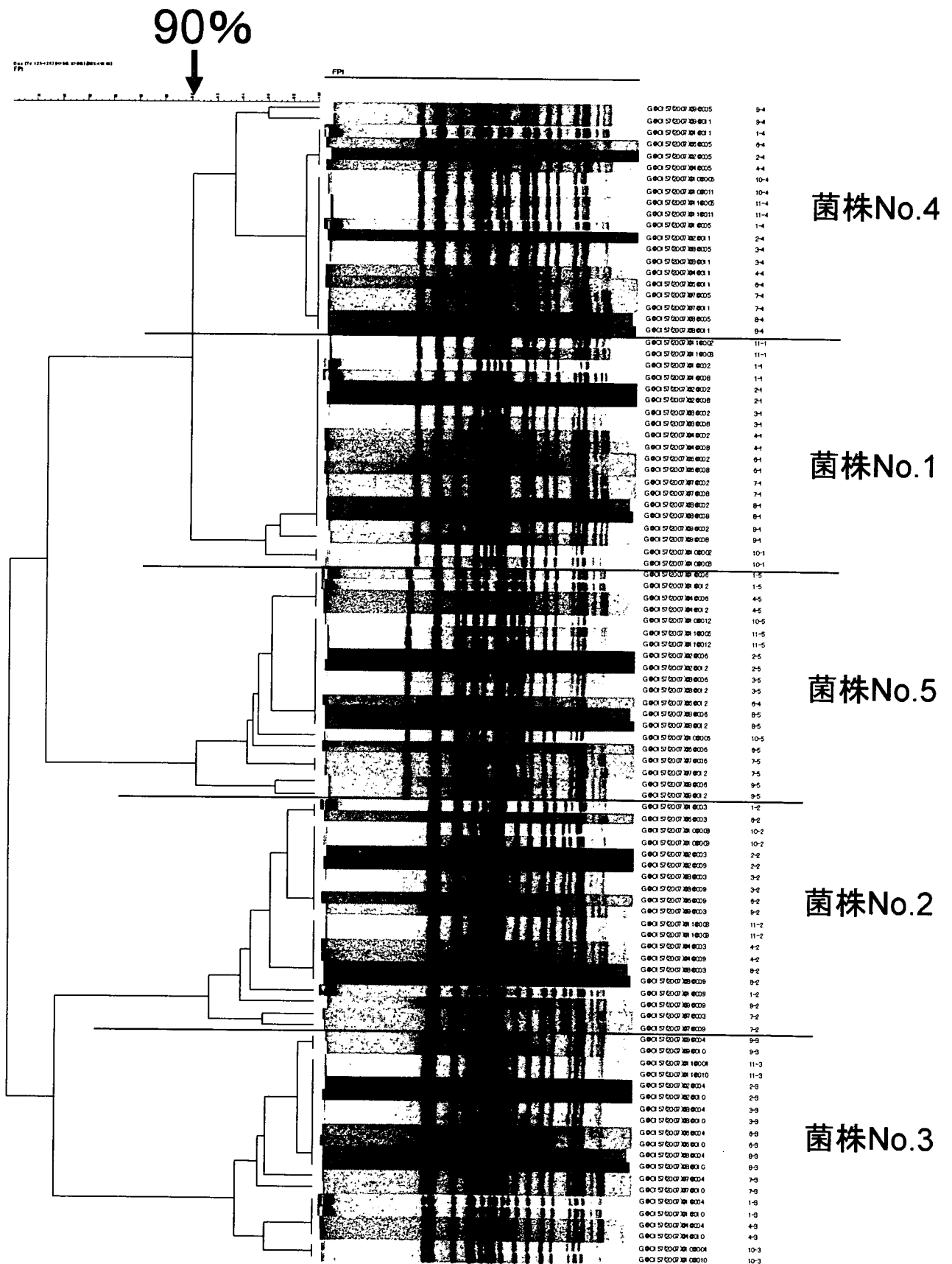
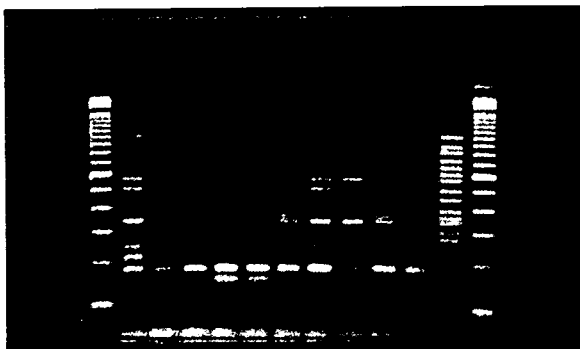


図1 11施設で実施した共通菌株5株のデンドログラム

写真2. IS-Printing system解析を行うためのサンプルDNA調整法の検討(1)

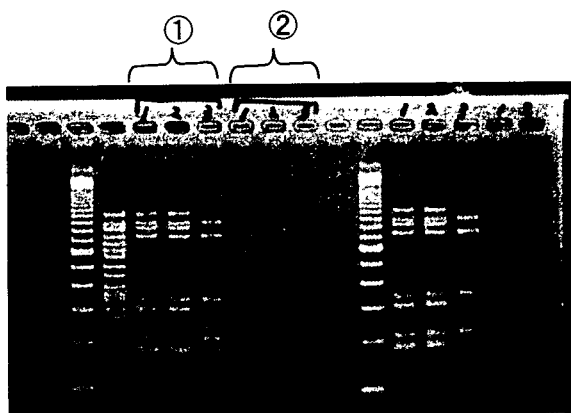
写真A



DNA抽出法: 熱抽出のみ
電気泳動: 3%アガロース
(Agarose S, ニッポンジーン)

IS-printing解析: Ver.1キット

写真B-1



試料: ① TSB, 37°C18時間培養
→10倍希釈
② TSB, 37°C18時間培養
→100倍希釈

DNA抽出法: アルカリ処理
電気泳動: 3%アガロース
(Agarose S, ニッポンジーン)

IS-printing解析: Ver.1キット

写真B-2



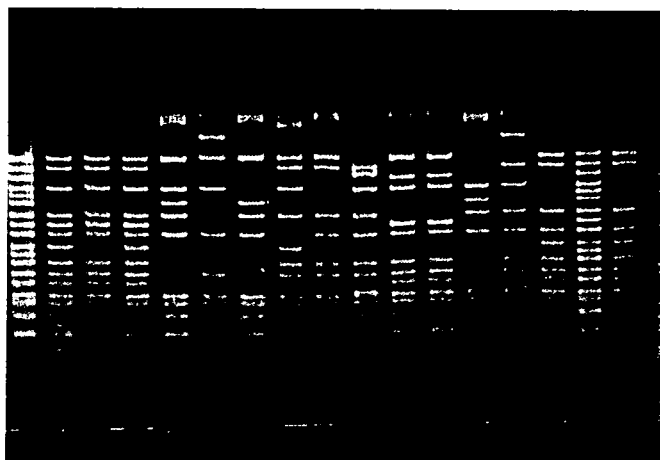
試料: TSB, 37°C18時間培養→10倍希釈

DNA抽出: アルカリ処理
電気泳動: 3%アガロース
(NuSieve:Seakem=2:1)

IS-printing解析: Ver.1キット

IS-Printing system解析を行うためのサンプルDNA調整法の検討(2)

写真C

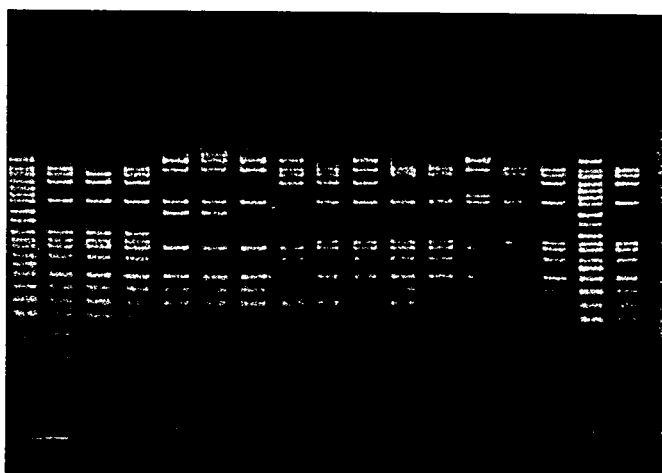


1 st プライマーセット

DNA抽出: アルカリ抽出
電気泳動: 3%アガロース
(NuSieve:Seakem=2:1)
60分泳動

IS-printing解析: Ver.2キット

写真D



2 nd プライマーセット

DNA抽出: アルカリ抽出
電気泳動: 3%アガロース
(NuSieve:Seakem=2:1)
60分泳動

IS-printing解析: Ver.2キット

表1 IS-Printing system解析とPFGE解析結果の比較

A施設

No.	菌株No.	IS パターン	非特異バンド数	PFGE型
1	070851	000100110000101111-010100101001001110	1	c115
2	070852	000100110000101111-010100101001001110	1	c115
3	070853	000100110000101111-010100101001001110	1	c115
4	071835	010100101001101111-011000101010001101	1	c423
5	071846	010100101001101111-011000101010001101	1	c424
6	071831	010100101001101111-011000101010001111	1	c423
7	071832	010100101001101111-011000101010001111	2	c424
8	071833	010100101001101111-011000101010001111	2	c424
9	071834	010100101001101111-011000101010001111	2	c423
10	071840	010100101001101111-011000101010001111	2	c423
11	071841	010100101001101111-011000101010001111	2	c423
12	071842	010100101001101111-011000101010001111	2	c424
13	071843	010100101001101111-011000101010001111	2	c423
14	071844	010100101001101111-011000101010001111	2	c425
15	071847	010100101001101111-011000101010001111	2	c424
16	071848	010100101001101111-011000101010001111	2	c423
17	071851	101100111101101111-011100100011101111	0	c407
18	070611	110000101001101111-011100100011001010	1	c47
19	070612	110000101001101111-011100100011001010	1	c47
20	071828	110000101001101111-011100100011001010	1	c47
21	070848	110100111101111111-011100100111011111	0	c119
22	070849	110100111101111111-011100100111011111	0	c118
23	070850	110100111101111111-011100100111011111	0	c118
24	IB07049	111100110101111111-010100000011101111	0	-
25	072535	111100111001111111-010100100011101111	0	c610
26	IB07050	111100111011011111-011100100011101111	0	-

IS-Printing system解析とPFGE解析結果の比較

B施設

No.	菌株 No.	IS パターン	非特異バンド	PFGE 型 (B施設)	PFGE型
1	G 5	10010011110011111-011000100111001111	有	C	a208
2	G 3	10010011110011111-011000100111001111	有	C	a206
3	G 7	10010011110011111-011000100111001111	有	C	a206
4	G 19	100101101000001111-110000110001001110	有	I	c597
5	G 20	100101101000001111-110000110001001110	有	I	c597
6	G 15	110000101001101111-011100100011001010	有	G	c47
7	G 16	110000101001101111-011100100011001010	有	G	c47
8	G 17	110000101001101111-011100100011001010	有	H	c298
9	G 18	110000101001101111-011100100011001010	有	H	c298
10	G 11	110100011101111111-011100100111101111	有	E	c596
11	G 12	110100011101111111-011100100111101111	有	E	c596
12	G 8	110100111100111111-011100100111101011	有	D	b293
13	G 10	110100111100111111-011100100111101011	有	E	b293
14	G 9	110100111100111111-011100100111101011	有	D	b293
15	G 1	110100111101111111-011100100111101111	有	A	b142
16	G 2	110100111101111111-011100100111101111	有	A	b142
17	G 3	111100110101101111-011100000111011111	有	B	233
18	G 4	111100110101101111-011100000111011111	有	B	233
19	G 13	111100111101101101-011100100011101111	有	F	c596
20	G 14	111100111101101101-011100100011101111	有	F	c599

IS-Printing system解析とPFGE解析結果の比較

C施設

No.	菌株No.	IS パターン	毒素型	PFGE型
1	EC07089	000000010000101111-010100001001001110	VT2	0721
2	EC07107	000100000100101111-010100001001001110	VT2	0729
3	EC07043	01110011010111111-011100000011001011	VT1&2	0706
4	EC07120	01110011010111111-011100000011001011	VT1&2	0730
5	EC07079	100100011101000000-011000100111101000	VT1&2	0717
6	EC07104	100100011101011111-010000100111101111	VT1&2	0726
7	EC07009	110000101001101111-011100100011001010	VT2	0701
8	EC07048	110000101001101111-011100100011001010	VT2	0710
9	EC07083	110000101001101111-011100100011001010	VT2	0720
10	EC07001	110100111101101111-011100100011001111	VT1&2	0705
11	EC07106	110100111101111111-011100100111101011	VT1&2	0728
12	EC07126	110100111101111111-010100100111101101	VT1&2	0736
13	EC07042	110100111101111111-011100100111101011	VT1&2	0703
14	EC07028	110100111101111111-011100100111101011	VT1&2	0705
15	EC07118	110100111101111111-011100100111101111	VT1&2	0734
16	EC07119	110100111101111111-011100100111101111	VT1&2	0732
17	EC07080	110100111101111111-011100100111101111	VT1&2	0718
18	EC07105	110100111101111111-011100100111101111	VT1&2	0727
19	EC07095	111100111101111111-011100100011101111	VT1&2	0725
20	EC07102	111100111101111111-011100100011101111	VT1&2	0725

IS-Printing system解析とPFGE解析結果の比較

D施設

No.	菌株No.	IS パターン	非特異バンド	PFGE型
1	Y21350	010000100001101111-111100000011101010		c510
2	Y21376	010000100001101111-111100000011101010		c99
3	Y21459	010100100101101111-11110000001000110		c511
4	Y21466	011100110101111101-011100000011001011		c504
5	Y21488	011100110101111101-011100000011001011		c476
6	Y21004	011100110101111101-011110000011001011		c15
7	Y21490	011100110101111101-011100000011001011		b588
8	Y21316	100100100000101111-110100000000101011		c512
9	Y21460	100111101010001111-11000010001001111		c498
10	Y21472	110000101001001111-010100100011001010	stx1より、小さいサイズ(100bp?)に1本バンドあり。	b83
11	Y21158	110000101001100111-011110100111001010		c487
12	Y21369	110000101001101111-010110100011001010		a259
13	Y21370	110000101001101111-011110100011001010		c47
14	Y21331	110000111101111111-011110100011101111		c500
15	Y21483	110100100000101111-101100000001101111		c177
16	Y21354	110100100111101111-110100000001101111		c497
17	Y21404	110100111101111111-011100100111101111		c499
18	Y21420	111100110101111111-01110000001101111		c505
19	Y21493	111100111101001111-011100100011101111		c288
20	Y21333	111100111101101111-011110100011101111		c502

IS-Printing system解析とPFGE解析結果の比較

E施設

No.	菌株No.	IS パターン	非特異バンド数	毒素型	PFGE型	関係
1	EH3180	000100000000101111-010100001000001110		VT2	T-0733	
2	EH2799	010000101001000110-011100100010000010		VT2	T-0712b	M大学
3	EH3148	100100101001101111-010000100001101001		VT1	T-0734	
4	EH3178	100101101000001101-110000110001001101		VT1	T-0707n	
5	EH3169	100101101000001111-110000110001001010		VT2	T-0748	
6	EH3165	101100111101111111-011100100011101111		VT1+2	T-0717c	
7	EH2858	110000101001101101-011100100011001010		VT2	T-0712d	M大学
8	EH2789	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712	M大学
9	EH2843	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712c	M大学
10	EH2861	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712f	M大学
11	EH2941	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712g	
12	EH2876	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712h	M大学
13	EH2947	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712i	
14	EH2921	110000101001101111-011100100011001010		VT2	T-0712j	M大学
15	EH3168	110100111101111111-011100100111101111		VT1+2	T-0741b	
16	EH3170	110100111101111111-011100100111101111		VT1+2	T-0746	
17	EH3075	110100111101111111-111100100111101111		VT1+2	T-0707c	流行株
18	EH3079	110100111101111111-111100100111101111		VT1+2	T-0707c	流行株
19	EH3086	110100111101111111-111100100111101111		VT1+2	T-0707c-2	流行株
20	EH3101	110100111101111111-111100100111101111		VT1+2	T-0707c-2	流行株

表2 IS-printing 法についてのアンケート結果 ①

質問	回答	回答数	意見等
1. 試薬の調整は？	簡単 問題ない 煩雑	3 3 0	
2. DNAの抽出方法は？	平板からアルカリ抽出 平板から熱抽出(ボイルのみ) 平板から精製キットを使って その他	3 0 0 2	・液体培養→アルカリ抽出 ・液体培養→Insta Gene Matrix(Bio Rad)で抽出
3. PCR反応は？	簡単 問題ない 煩雑	3 3 0	
4. 泳動用ゲルやBufferは マニュアル通りに行ったか？	行った 行わない	4 2	・3%和光純薬Agarose ・ゲル組成: 2%I.D.NA Agarose(Cambrex) ゲルサイズ: 200mm × 150mm 泳動buffer: × 1TBE 泳動装置: サブマージ・アガロース30(Atto) 特記事項: bufferをiceで冷却して循環しながら泳動した
5. 電気泳動の時間は？	60分 75分 90分 7時間	3 1 1 1	
6. PCR結果を読むのは？	簡単 問題ない 煩雑 判断に迷う部分がある	0 3 0 3	<判断に迷った部分> ・2nd setの分子量が大きいところが読みにくい ・エキストラバンドがPCR付近に出現した部分 ・バンドが多すぎて読みにくい
7. PFGEパターンと相関性は あると思うか？	相関性あり(ある程度) PFGEよりも細かく分けられる PFGEのほうが良い	5 0 1	
8. PFGEに代わる手法として？	期待できる 改良が必要 困難	4 2 0	・もう少し、バンドの分離が良いと良いのではないか ・バンド数を4本程度のmultiplexとし、増幅バンドサイズを500bp以下にすればMupitでも簡単に行える。

IS-printing 法についてのアンケート結果 ②

- 実際にis-printing法をやってみて、PFGEに比べて検体の処理もあまり煩雑ではなく、全体的に作業にかかる時間もかなり短縮して行うことができる方法だと感じました。
- 結果の判定については、エキストラバンドの出現やバンド間の距離が短いと判定しづらいところもあったので、幅の長いゲルを使って泳動した方が良かったかと思いました。
- PFGEではゲルのゆがみや電気のムラなどにより判定が難しいことがあるので、IS-printing法でバンドをはっきり分離することができればこちらの方が結果を読みやすいと思います。
- 今回3組の家族内感染検体においてはそれぞれの組において同一のバンド(PFGEパターンもほぼ同一)がみられたことから、IS-printing法とPFGEパターンには相関性があり、PFGEに代わる手法として期待できると思います。しかし集団感染の検体においては13検体中2検体でバンドの出現が他とは異なっており(1本のバンドが出現しなかった)、この2検体の結果をどうとったらよいのかを少し悩みました。
- サンプルのDNA濃度が少し高かったことが反省点です。
- 初回にしては大変使い試薬キットであった。
- 非特異バンドが少なく精度の高い試薬キットであった。
- 同じDNAサンプルを使用した場合、2nd Setが1st Setよりもバンドパターンがスミアになる傾向があった。サンプルを1/10量から1/5量にして対処した。
- この方法は、PFGEでは不可能な系統発生的解析が行える可能性が高い。それを行うことで、我が国においてO157がどのようにして広がっているのか？あるいはどのような生態なのか？といったことを明らかに出来る可能性がある。そのためには、どの地衛研でも簡単に行えるように方法の改善が必要である。

別紙1.

PFGE解析の腸管出血性大腸菌集団食中毒事例および散発事例への応用

1. 群馬県衛生環境研究所
焼肉店が原因施設と疑われたO157食中毒事例
2. 神奈川県衛生研究所
EHEC O157(VT1+VT2) 散発事例
3. 横浜市衛生研究所
横浜市内の焼肉店を原因とするEHEC O157(VT1+VT2産生)による食中毒事例
4. 長野県環境保全研究所
O157による集団事例
5. 東京都健康安全研究センター
焼肉店を原因とした食中毒事例

別紙2

PFGE解析のサルモネラ集団食中毒事例および散発事例への応用

6. 埼玉県衛生研究所
2007年に発生したサルモネラ食中毒事例
7. 横浜市衛生研究所
Salmonella 血清型 Typhimurium による食中毒事例
8. 長野県環境保全研究所
Salmonella 血清型 Typhimurium による食中毒事例
9. 静岡県環境衛生科学研究所
S. Enteritidis 食中毒事例の概要および分離株のPFGE画像

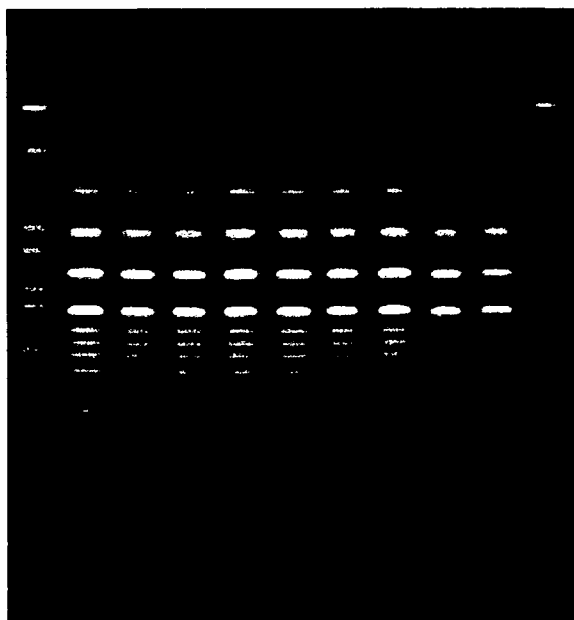
〈別紙 1〉

1. 群馬県衛生環境研究所

焼肉店が原因施設と疑われたO157食中毒事例

2007年5月11日、千葉県から本県へEHEC感染症原因調査依頼があった。千葉県在住の6名(1グループ)のうち、2名からEHEC O157が分離され届出となった。原因調査から、このグループは4月29日に群馬県内の焼肉店を利用していたことが判明した。また、本県でも5月10日から15日に4名(4グループ)のO157による患者発生届が提出された(3名は有症者、1名は無症状)。この4グループは5月2日から5月6日の間に同焼肉店を利用していた。同店ではこの間に568名の利用者があり、喫食した5グループの31名(県内4グループ25名、県外1グループ6名)のうち、10名(発症者5名、無症状保菌者5名)からO157:H7 Vero毒素(VT1,VT2)産生株が分離された。本調査から千葉県の1グループおよび群馬県の4グループの共通利用施設は同店のみであることから、同店を感染原因施設と推定した。食品、環境等の調査では、食材(ユッケ用生牛肉)1検体、拭き取り5検体、従事者便5検体からは、本菌を含む食中毒原因菌は検出されなかった。本事件で5グループから分離されたO157の9株について、パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)による遺伝子解析を実施した。制限酵素 *Xba* I を用いた解析では供試9株はDNAパターンが全て一致した。本事件では複数のグループからO157 Vero毒素(VT1&VT2)産生株が分離されたこと、利用したグループ間では事前に感染を疑う接触がないこと、共通の喫食場所は当該焼肉店のみであること等の疫学調査とPFGE解析結果などから、同店が提供した食事を原因とする集団食中毒事件と断定した。患者発生が他県にまたがる事例であったが、疫学情報の共有とPFGE解析が有効に活用され早期対応が図られた。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 M



M : Marker

(*S. Braenderup* H
9812)

Lane 1 : グループ1

Lane 2-3 : グループ2

Lane 4-5 : グループ3

Lane 6-7 : グループ4

Lane 8-9 : グループ5

グループ1-4 : 群馬県

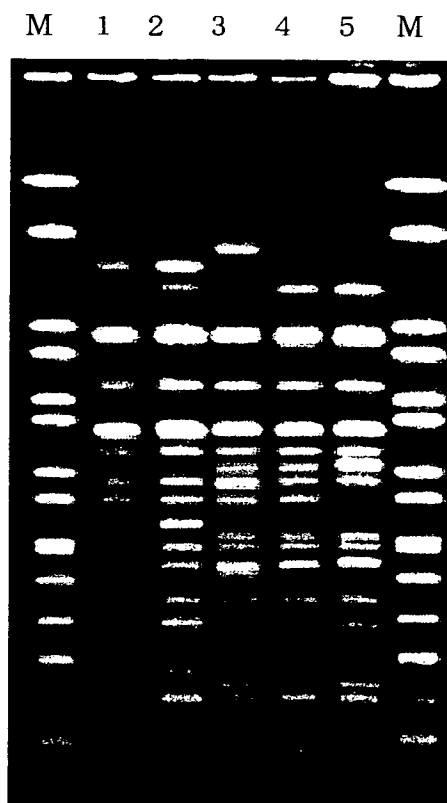
グループ5 : 千葉県

制限酵素 *Xba* I

2. 神奈川県衛生研究所

EHEC O157(VT1&2) 散発事例

平成19年度は食中毒事例が認められなかったため、O157(VT1&2)による散発事例についてPFGEを実施した。レーン1と2およびレーン4と5は、類似したパターンを示したが、再度の喫食調査でも患者相互に共通食は認められなかった。



M : マーカー *Salmonella* Braenderup

泳動条件 : 6V/cm、2.2-54.2sec、20hr
Buffer 温度 : 12°C

すべて *Xba* I 処理