

図4 5施設の IS-printing system ver2 の泳動図と結果

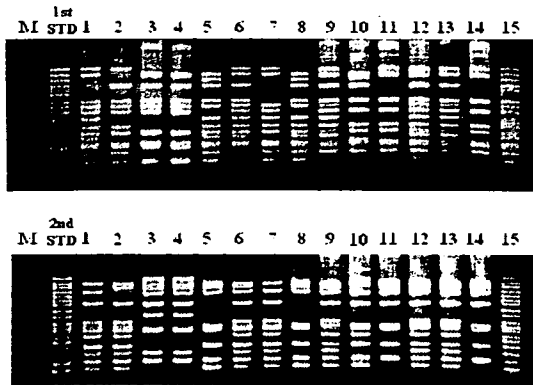


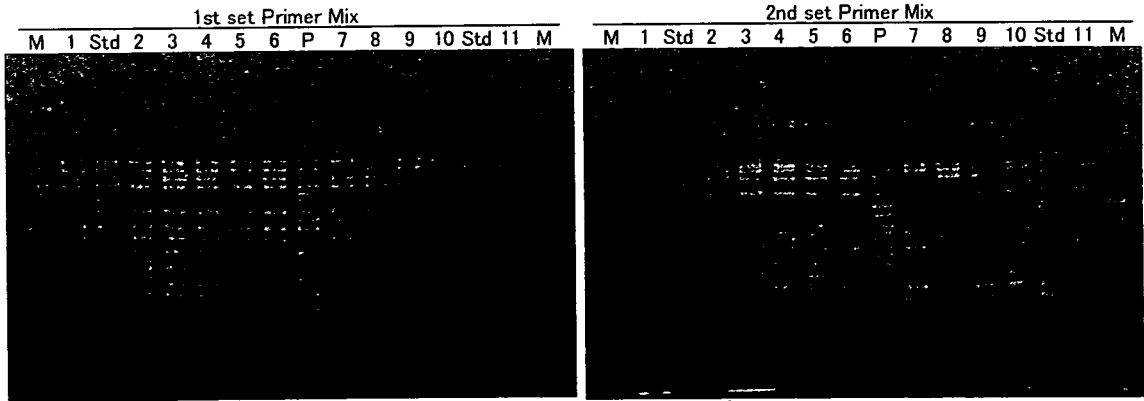
図2. 改良版IS-printing SystemIによるマルチプレックスPCRの電気泳動像

M:FX *Hinc*II Marker; lane1 EC2685, lane2 EC2688, lane3 EC2691, lane4 EC2692, lane5 EC2690, lane6 EC2698, lane7 EC2697, lane8 EC2699, lane9 EC2728, lane10 EC2816, lane11 EC2823, lane12 EC2826, lane13 EC2828, lane14 EC2829, Lane15 PCR positive control

1st STD, 2nd STD: 電気泳動用positive control

Primer No	Size (bp)	EC2598	EC2599	EC2600	EC2604	EC2608	EC2612	EC2688	EC2693	EC2694	EC2697	EC2698	EC2699	EC2728	EC2816	EC2823	EC2826	EC2828	EC2829	
1-01	974	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-02	839	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-03	742	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-04	545	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-05	395	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-06	561	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-07	465	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-08	442	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-09	425	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-10	353	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-11	323	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-12	300	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-13	269	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-14	241	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-15	211	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
see	185	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-16	171	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hyA	137	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-01	987	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-02	981	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-03	901	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-04	710	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-05	642	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-06	599	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-07	555	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-08	499	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-09	449	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-10	394	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-11	359	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-12	331	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-13	301	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-14	278	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-15	240	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2-16	211	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
std2	181	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
std1	151	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

備考
1-primer setC は 171-180の間にバンドあり
2-primer setC は 801-710の間にバンドあり
3-primer setC は 259-331の間にバンドあり
4-primer setC は 742-595-451に



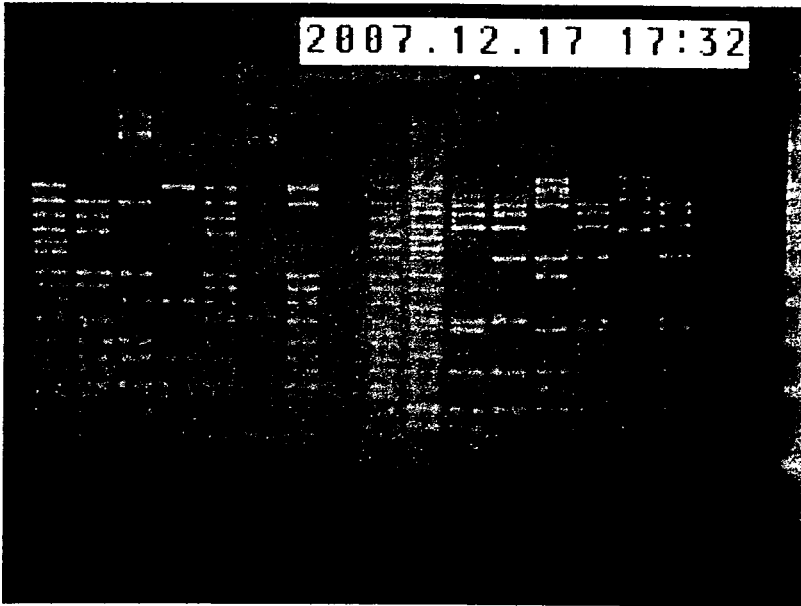
IS-printing System 泳動像

M : 100bp Ladder
Std : Standard DNA
P : Template Mix

IS-printing System 集計データ

レーン	感染研 No.	PFGE Type No.	1st set Primer Mix																2nd set Primer Mix																					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	16 ^{hVA}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	16 ^{st2}	16 ^{st1}			
1	072499	b293	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1					
2	070597	c62	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
3	070654	b705	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
4	070655	c71	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
5	071035	c168	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
6	071038	c172	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
7	071275	c49	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
8	071276	b330	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
9	072134	c168	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
10	072135	c491	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
11	072140	b293	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	062219	b277	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
	062220	a27	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	070015	a165	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	070016	c3	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	072495	c590	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	072497	c591	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
	072502	c589	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
	072503	b142	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	

2007.12.17 17:32



(1) 1st set primer		1	2	3	4	5	6	7
Primer No.	Size (bp)	PN#1	PN#2	#1077	#1078	#1079	#1104	#1105
1-01	974			+	+			+
1-02	839	+	+		+			+
1-03	742	+			+			
1-04	645	+			+			
1-05	595							
1-06	561							
1-07	495	+	+		+			+
1-08	442	+			+			+
1-09	405		+	+	+			+
1-10	353	+			+			+
1-11	325				+			
1-12	300	+	+		+			+
1-13	269	+	+	+	+			+
1-14	241	+			+			+
1-15	211	+	+	+	+			+
eae	185	+	+	+	+			+
1-16	171	+	+					+
hlyA	137	+	+	+	+	+	+	+

(2) 2nd set primer		1	2	3	4	5	6	7
Primer No.	Size (bp)	PN#1	PN#2	#1077	#1078	#1079	#1104	#1105
2-01	987			+		+		
2-02	861	+	+	+		+		+
2-03	801	+	+		+	+		+
2-04	710	+	+		+			+
2-05	642							+
2-06	599							
2-07	555		+	+	+			+
2-08	499			+				
2-09	449							
2-10	394							
2-11	358	+	+		+			+
2-12	331	+		+	+			+
2-13	301				+			+
2-14	276							
2-15	240	+	+	+	+			+
2-16	211			+	+			+
stx1	181	+	+	+	+			+
stx2	151	+			+	+	+	+



1st set

2nd set

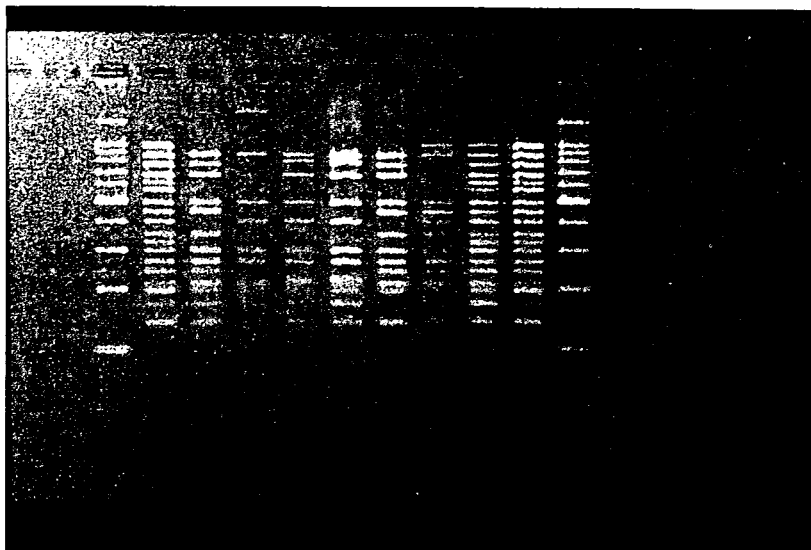
(2)PCRサイクル条件は今回配布されたプロトコルで実施

1st set

	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	ea	1-16	hyA	備考		
供試菌株	H19-1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+		
	H19-3	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
	H19-5	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+		
	H19-11	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
	H19-15	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+		
	H19-22	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
	H19-23	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
	H19-24	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
	H19-30	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+		

2nd set

	Primer No	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	
供試菌株	H19-1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+		約900bpに非特異バンド?
	H19-3	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+		
	H19-5	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-		約900bpに非特異バンド?
	H19-11	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+		約900bpに非特異バンド?
	H19-15	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+		約900bp,700bpに非特異バンド?
	H19-22	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+		約900bpに非特異バンド?
	H19-23	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+		約700bpに非特異バンド?
	H19-24	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+		
	H19-30	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+		約900bp, 700bpに非特異バンド



2nd primer set の泳動図

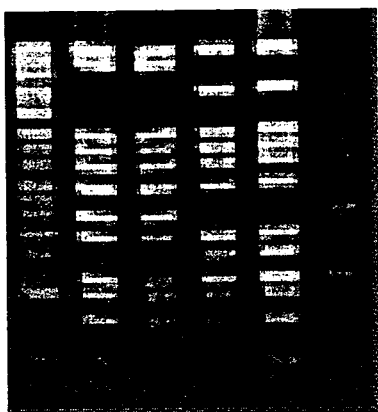
Primer No	Size (bp)	1st set Standard DNA	1st set Template Mix	#1	#2	No.73	No.74	No.75	No.76	Primer No	Size (bp)	2nd set Standard DNA	2nd set Template Mix	#1	#2	No.73	No.74	No.75	No.76
1-01	974	+	+	-	-	-	-	-	+	2-01	987	+	+	-	-	+	+	-	-
1-02	839	+	+	+	+	+	+	+	+	2-02	861	+	+	+	+	+	+	+	+
1-03	742	+	+	+	-	+	+	+	-	2-03	801	+	+	+	+	-	-	+	+
1-04	645	+	+	+	-	+	+	+	-	2-04	710	+	+	+	+	+	+	+	+
1-05	595	+	+	-	-	-	-	-	-	2-05	642	+	+	-	-	-	-	-	-
1-06	561	+	+	-	-	-	-	-	-	2-06	599	+	+	-	-	-	-	-	-
1-07	495	+	+	+	+	+	+	+	+	2-07	555	+	+	-	+	+	+	-	+
1-08	442	+	+	+	-	-	-	+	+	2-08	499	+	+	-	-	-	-	-	-
1-09	405	+	+	-	+	+	+	-	+	2-09	449	+	+	+	-	-	-	-	-
1-10	353	+	+	+	-	-	-	+	+	2-10	394	+	+	-	-	-	-	-	-
1-11	325	+	+	-	-	-	-	-	-	2-11	358	+	+	+	+	+	+	+	+
1-12	300	+	+	+	+	+	+	+	+	2-12	331	+	+	+	-	+	+	+	+
1-13	269	+	+	+	+	+	+	+	+	2-13	301	+	+	-	-	+	+	-	+
1-14	241	+	+	+	-	-	-	+	+	2-14	278	+	+	-	-	-	-	-	-
1-15	211	+	+	+	+	+	+	+	+	2-15	240	+	+	+	+	+	+	+	+
eee	185	+	+	+	+	+	+	+	+	2-16	211	+	+	-	-	-	-	-	+
1-16	171	+	+	+	+	+	+	-	+	stx2	181	+	+	+	+	+	+	+	-
HyA	137	+	+	+	+	+	+	+	+	stx1	151	+	+	+	-	+	+	+	+
備考						1-03 (742bp) のバンドは、742bpより大きい非特異バンドの疑				備考									

図5 4施設の IS-printing system ver2 の泳動図

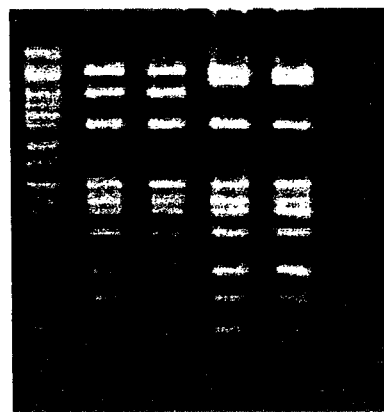


左が 1st primer set、右が 2nd primer set

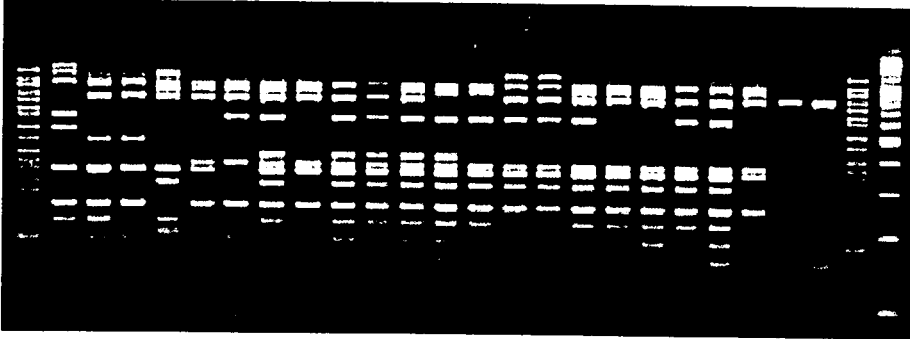
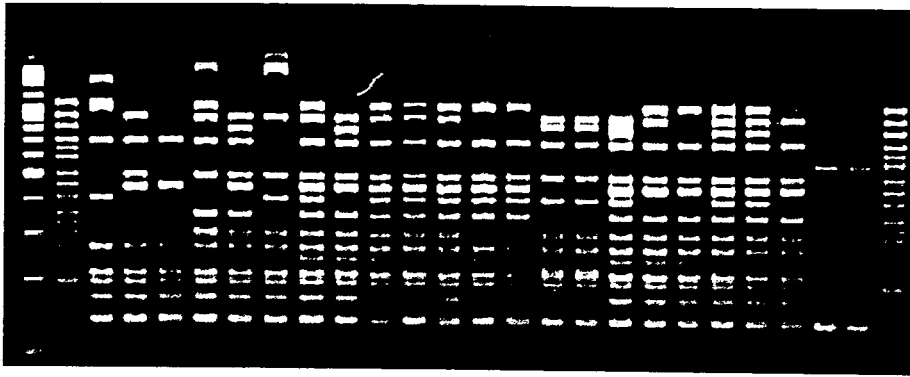
Std S1 S2 S3 S4 M



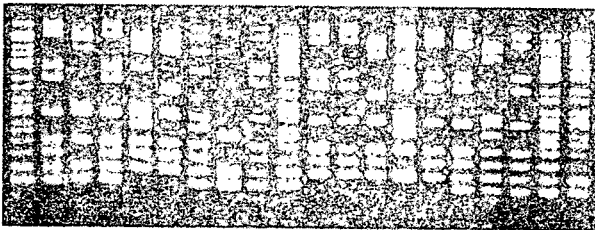
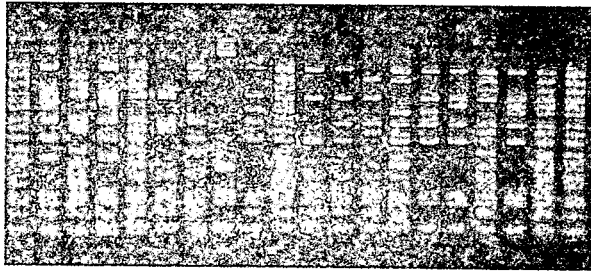
Std S1 S2 S3 S4 M



左が 1st primer set、右が 2nd primer set



上が 1st primer set、下が 2nd primer set



上が 1st primer set、下が 2nd primer set

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 19 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	河野智美	滋賀県衛生科学センター
	野村憲一	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	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	兵庫県立健康環境科学研究所
	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
	坂田淳子	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

全国で多発する腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 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、近畿ブロック 11 衛生研究所で精度管理株として配布した EHEC O157:H7 5 株を用いて PFGE を実施し、電送された電気泳動画像について解析して、施設間差および 3 名の解析者による変動を検討した。その結果、解析者によって不明瞭なバンドや小さいサイズの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。バンドを明瞭に認識できる画像を得るため、菌液の濃度に注意するとともに各施設で技術の維持を図ることが重要である。また、IS-printing System は迅速性に優れた EHEC O157 型別法としてスクリーニングに有用であると考えられたが、一部の株で PFGE 型と相関しないことがあり、原因を検討する必要がある。また、細菌性食中毒として事例数の多い *Campylobacter jejuni* について、*SmaI* と *KpnI* を用いた PFGE 解析を行ったところ、スイッチタイムの変更により *KpnI* 切断のサイズの小さいバンドが明瞭になったが、EHEC O157 同様バンド認識のばらつきが

近似度を下げる結果につながっていた。*SmaI* 切断はバンド数が少ないが、その泳動パターンは多様であり、*C. jejuni* 型別法として利用可能であると考えられた。

A. 研究目的

感染症発生動向調査によると 2007 年の EHEC 感染者届出数は 6 年ぶりに 4,000 人を越え、その約 2 割は大阪府を中心とした近畿ブロックで発生していた。患者発生は 7 月から 9 月に集中しており、原因の多くが汚染食品の摂食であると考え、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。

事例間の関連性を明らかにするために、感染者の聞き取り調査に加え、分離菌を共通の疫学指標で比較し、同一性を判定する必要がある。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、より簡便な解析法として開発された IS-printing System の改良版を試用し、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 *C. 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、昨年制限酵素 *SmaI* と *KpnI* を用いた PFGE 法について検討したが、*KpnI* の切断パターンではバン

ドが近接し、解析が困難であったことから、今年度はパルスタイムを変更してその有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

PFGE の精度管理には、2007 年に大阪府で分離された EHEC O157:H7 5 株 (菌株 1-5) を用い、*XbaI* で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 の検討には、各自治体で 2006-2007 年に分離された EHEC O157 を任意に選んで供試し、菌株情報として毒素型と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) を配布し、各施設で分離、保存している菌株 3 株を加えて同時に PFGE を実施した (表 1、表 2)。

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°C 一夜、制限酵素 *XbaI* 処理を 37°C 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 *XbaI* 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*

昨年作成した「*Campylobacter* PFGE Protocol-Kinki」のスイッチタイムを変更した「*Campylobacter* PFGE Protocol-Kinki ver.2」で実施した(表3)。この方法はCDCのホームページで公開されているPulseNet USAのプロトコルを前項の感染研新プロトコルに準じて改変したもので、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 $^{\circ}$ C、*Kpn*I(ロッシュ)が37 $^{\circ}$ Cで2時間以上反応させた。電気泳動は*Sma*I、*Kpn*Iともに電圧6V/cmスイッチタイム6.8-65.4秒で18時間行い、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%、シールド感度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

IS-printing System Version 2(東洋紡)の2種類のプライマーセット(セット1、セット2)と反応液を用い、説明書に記載の条件でPCRを実施した。本方法は、insertion sequence (IS)の分布に由来する領域をセットごとに16か所と病原性関連遺伝子(セット1は*eae*と*hlyA*、セット2は*stx1*と*stx2*)を増幅するマルチプレックスPCRである。テンプレートの調整はアルカリ溶解法で行い、陽性対照としてキットに添付のTemplate Mixを使用した。電気泳動には3%アガロースゲルと0.5xTBEバッファーを用い、Standard DNAの18本のバンドが明瞭に分離される条件で行った(表4)。各施設でプライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定し、判定表と電気泳動像を大阪府立公衆衛生研究所に集約した。判定表は、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に3バン

ドごとに割り当てた「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット1、セット2の順に12桁で表してISコードとした(表5)。

C. 研究結果

1. EHEC O157 の PFGE 精度管理

11施設から電送されたPFGE画像のうち、施設2は電気泳動像の一部が欠落していたため解析から除外した(図1)。それ以外の10画像は、いずれも目視でサイズマーカーのBand 9、Band 10、Band 16が認識できた。施設5はコントラストが弱く全体的にバンドが不明瞭であったが(図1)、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解析者の作成したデンドログラムは、菌株2、3および5で施設5の画像が大きく離れており、他の9画像との近似度は菌株2で45%、菌株3および5は77.5%と同一性を評価することはできなかった(図2、表6)。これらの画像ではA解析者の認識バンド数が少なく、特に菌株2は他の9画像の認識バンド数が21~22本であったのに対し、施設5の画像では9本しか認識されていなかった(表6)。施設5を除いた9画像では、3株とも100%一致した7画像と他の2画像を合わせた近似度は97~97.5%と良好な結果が得られていた。菌株1および4でも同様の傾向があり、菌株ごとにクラスターを作っていたものの、10画像の近似度は77%と90%で、施設5を除いた9画像では92.5%と94.5%と高い値を示した。

B解析者の作成したデンドログラムでは、菌株ごとにクラスターを作り、それぞれ4

~9画像が100%一致していた(図3、表6)。菌株1、3、4および5では近似度90~94.5%を示していたが、菌株2は、バンド数22本の8画像で100%一致していたものの施設5のバンド数が16本と少なく、10画像の近似度は83.5%であった。施設5を除外した9画像では、5株とも95%以上の近似度を示し、特に菌株5は100%、菌株2は99.5%であった。

C解析者の作成したデンドログラムは、菌株ごとにクラスターを作ったが、菌株2は施設5のバンド数が16本と少なく、10画像の近似度は86.5%であった(図4、表6)。施設5を除外した9画像では、近似度95%と高い値を示した。他の4株については、他の解析者と異なり、施設5の画像が近似度を下げる結果にはなっておらず、菌株ごとの近似度は菌株1が90%とやや低かったが、菌株3~5は95~96%と良好な結果が得られていた。

2. IS-printing System の検討

7施設で合計194株(VT1陽性株6株、VT2陽性株81株、VT1およびVT2陽性株107株)について検討したところ、セット1では6~15本、セット2では5~12本の増幅が見られた(図5)。一部の株では非特異バンドの増幅も見られ、特にセット2では900bp付近に弱いながらも増幅されることが多く、泳動像によっては2-02との区別が困難であった。この他に、セット1では約800bpと約220bp、セット2では約200bpと150bp以下に明瞭な非特異バンドが見られた。

セット1に含まれる *eae* は全株で増幅されたが、*hlyA* は2株で陰性と判定された。また、192株は各施設から報告された毒素型とセット2の *stx1* および *stx2* の判定が一致していたが、VT1 および VT2 陽性株のうち2株は *stx2* で増幅が見られなかった。IS領域を増幅するプライマーでは2-14は全株で増幅が見られず、1-11、2-06もそれぞれ増幅が見られたのは4株と3株にとどまっていた。いずれの施設でも、Standard DNAは18本に分離できていたが、1-15と *eae* および2-02と2-03の間隔が狭く判定が困難な泳動像も見られた。

194株のPFGE型は135タイプに分かれていたが、ISコードでは91タイプに区別された。このうちPFGE型25タイプの65株は、PFGE型ごとにISコードも一致していた(表7)。同一PFGE型でISコードの異なった株は、10タイプ29株あり、特にPFGE型c114の2株は、12桁のISコードのうち8桁で異なっていた(表8)。PFGE型b27(3株)、b423(4株)およびc47(4株)は、それぞれISコードが1-3桁異なっていたが、同一施設の株は同じISコードを示した。施設11において、家族や同行者など事例内でPFGE型の異なった14グループの分離株について検討したところ、PFGEパターンが1-7本異なっても事例内でISコードは一致していた(表9)。一方、関連性の明らかでない複数のPFGE型がISコードでは区別できない例もあり、5タイプ以上のPFGE型で一致したISコードは3タイプ見られた(表10)。特にISコード717577 611657は11タイプのPFGE型で一致しており、これと1-16の増

幅のみ異なるISコード717575 6116577は別の5タイプのPFGE型で一致していた。

3. *C. jejuni* のPFGE型別法の検討

C. jejuni のPFGEは7施設で実施した。*SmaI*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21株も5-10本であった(図6、表11)。デンドログラムでは、菌株6、7ともに全画像で100%一致していた(図7)。各施設株は、施設3の菌株8と10(●)が100%一致し、施設1の菌株10と施設11の菌株9(○)が95%と高い近似度を示した。施設1菌株9と施設4菌株9(◆)、施設8菌株8と施設11菌株10(◇)、施設8の菌株9と10(▲)は近似度80%以上であった。

*KpnI*の切断パターンは*SmaI*に比べバンド数が多く、特にBand10(167.1Kb)以下に集中していた(図6)。施設3の画像はバンドが不明瞭であったため画像解析から除外した。残りの6画像において、菌株6の認識バンド数は12-14本であり、100%一致した2画像を含む5画像は近似度91.5%のクラスターを作ったが、施設4の画像は施設10の菌株9とクラスターを作り、6画像の近似度は77.5%と低い値を示した(図8、表11)。菌株7は認識バンド数12-14本の5画像は近似度91%を示したが、認識バンド数10本の施設10を含む6画像の近似度は87%であった。*SmaI*切断で高い近似度を示した施設1の菌株10と施設11の菌株9(○)は、*KpnI*切断でも近似度96%であった。80%台の近似度を示した3組については、施設1

菌株 9 と施設 4 菌株 9 (◆) が近似度 89% を示したが、他の 2 組は離れたクラスターになった。

D. 考察

近畿ブロックでは毎年 EHEC O157 を用いて PFGE の精度管理を実施し、技術的な施設間差はある程度解消されてきたが、今年度は 2 施設で担当者の変更があったため、技術研修会を実施した。しかしながら、施設 2 の画像は欠落があったため画像解析に供試できず、今後は初めてでも問題なく良好な PFGE 画像が得られるよう研修会の内容を見直す必要があると考えられた。また、経験者が実施しても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。

3 名の解析者が独立して画像解析を実施したが、50 画像中 25 画像は認識バンド数が一致していた。しかし、菌株ごとの近似度は A 解析者で 4 株が 45-77.5% と極端に低く、B 解析者および C 解析者でも 1 株は 80% 台であった (表 6)。これは、施設 5 の画像の影響で、A 解析者および B 解析者では全株、C 解析者では菌株 2 で、施設 5 の画像が他の画像が作ったクラスターと離れており、施設 5 以外の 9 画像はいずれも 94-100% と高い近似度を示した (図 2-4)。施設 5 の画像は、コントラストが弱くバンドが不明瞭で、解析者による認識バンド数のばらつきが際だっていた。すなわち、A 解析者はどの菌株も認識バンド数が少なく、特に菌株 2 では 9 本しか認識されていなかった。B 解析者と C 解析者は、菌株 2 の認識バンド数は

少なかったものの、菌株によっては他施設の画像より多い場合も見られた。

施設 5 の画像を除くと、いずれの解析者も菌株 4 で認識バンド数のばらつきが大きく、菌株 1 では認識バンド数のばらつきは小さいものの、近似度は 90.5-95% と他の菌株に比べてやや低い値であった。前者は、主にマーカの Band14 (76.8kb) 以下の小さいサイズのバンド認識に差があるためと考えられた (図 2-4)。また、後者は施設 6、10、11 の画像でマーカの Band 9 付近のバンドがなく、配布株を再分離した際に変異の入った株が選択されたと考えられた (図 1)。

これまでの研究で、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ことを確認してきたが、施設 5 でバンドが不明瞭になった要因には、菌液が薄いことも考えられる。

PFGE よりも迅速で簡便な疫学指標として期待される IS-printing System については、テンプレートをアルカリ溶菌法で調整することにより、菌株によるバンドの濃淡を解消することができた。また、キットが改良され、陽性対照となる Template Mix が添付されたことから、PCR 反応の成否を確認できるようになった。電気泳動条件についても、泳動バッファーや推奨アガロースが明示されたことで、昨年よりもバンドを明瞭に分離することができた (図 5)。施設 3、5、8 および 11 は同じ種類のアガロースを使用していたが、泳動像は若干異なり、施設 3 は他に比べバンド間隔が詰まっていた。ま

た、施設 1 の泳動像もバンド間隔が狭く、サイズの小さいバンドが太くなる傾向があった。いずれも判定は可能であったが、非特異バンドが増幅された場合に容易に判別できるよう、各施設の電気泳動装置で最適の泳動条件を見つけておく必要があると考えられた。

IS-printing System を用いた型別については、PFGE 型が一致する 25 タイプ 65 株で IS コードが一致したこと、同一事例由来株で PFGE パターンが 1-7 本異なる 14 組 32 株で同じ IS コードを示したことから、スクリーニング法として有用であると考えられる (表 7、9)。しかし、5 タイプ以上の PFGE 型が同じ IS コードを示す場合もあり、全 DNA を比較する PFGE に比べ、36 か所の DNA を調べる IS-printing System では型別能力に限界があると考えられた (表 10)。一方、同一 PFGE 型で IS コードが異なった株が 10 タイプ 29 株見られた (表 8)。このうち c114 の 2 株は菌株 9 が O157:H7 VT2 産生でテトラサイクリンおよびクロラムフェニコール耐性、菌株 10 が O157:HNM VT1 および VT2 産生でストレプトマイシン耐性と大きく異なっており、PFGE 型別の再検査が必要であると考えられた。また、c704 の 3 株は菌株 81 で *hlyA* が陰性を示したが、*hlyA* はプラスミド上に存在することから菌株保管中に脱落した可能性もある。これ以外の 8 タイプのうち 6 タイプ (a259、a637、b27、b326、b423、c47) は、プライマー 1-01、2-02、2-03 といった大きいサイズのバンドで判定が異なっていたが、同一施設の菌株では一致していたことから、大きいサイズの増幅効率

やバンド間隔の狭い 2-02、2-03 の判定において、何らかの施設間差があることを示唆する結果であった。diffuse outbreak の探知において、共通の感染源をもつ分離株が異なる施設で同一型であると判定されることが重要であり、PFGE 型と IS コードが相関しない結果には課題が残る。しかし、IS-printing System はコロニーからの実施が可能で迅速性に優れ、PFGE でスミアになる株についても型別可能であることは大きな利点である。したがって、テンプレートを施設間で交換して IS-printing System を実施する、あるいは *Bln I* を用いた PFGE 型を確認するなど、引き続き PFGE 型と IS コードが一致しない原因を検討する。

C. jejuni の PFGE については、昨年と同じ制限酵素を用いて 7 施設で検討したが、*KpnI* の電気泳動条件を *SmaI* と同じスイッチタイムに変更し、昨年よりも *KpnI* 切断の小さいバンドが明瞭になった (図 6)。ただ、施設 3 の *KpnI* 切断画像はバンドが薄く画像解析はできなかった。配布株である菌株 6 と菌株 7 は *SmaI* 切断で全画像が 100%一致したが、*KpnI* 切断の近似度は菌株 6 が 77.5%、菌株 7 が 87%にとどまっていた。これは EHEC 同様小さいサイズのバンド認識にばらつきがあったためと考えられた。*SmaI* 切断ではバンド数が 5-10 本と少なかったが、泳動パターンは多様で、施設 3 以外の各施設株で近似度 80%以上を示した 4 組のうち 2 組は *KpnI* 切断でも比較的近似度の高いクラスターを作ったことから、*SmaI* を用いた PFGE 法が、*C. jejuni* 型別法として利用可能であると推察された。今後は流行期に各自

治体で分離された菌株など被検株数を増やし、流行菌型の探知に使用できるかどうか検討する必要がある。

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、バンドを明瞭に認識できる画像が必要であり、菌液の濃度に注意するとともに各施設で技術の維持を図ることが重要である。また、IS-printing System は迅速性に優れた EHEC O157 型別法としてスクリーニングに有用であると考えられたが、一部の株で PFGE 型と相関しないことがあり、原因を検討する必要がある。*Campylobacter* 食中毒において *Sma*I を用いた PFGE 法が利用可能であると考えられるが、食中毒多発期に分離された菌株などさらに多くの菌株について各自治体で解析し、その有用性を検証しなければならない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Seto, K., Taguchi, M., Kobayashi, K., Kozaki, S.: Biochemical and molecular characterization of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Osaka Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.*, 69:1215-1222,

2007.

2) Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., Tsukamoto, T.: Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. *J. Med. Microbiol.*, 56:1467-1473, 2007.

3) Shimosako, J., Onaka, T., Yamanouchi, M., Yokota, M., Nakamura, T., Fujii, F., Matsumoto, E., Shibata, H., Fukuda, M., Tanaka, T.: An Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Shigella sonnei* at a Day Care Nursery in Sakai City, 2006., *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:408-409, 2007.

2. 学会発表

1) 勢戸和子：多種類の下痢原性大腸菌が検出された集団下痢症事例，第 28 回衛生微生物技術協議会（2007 年 7 月，岡山）

2) 下迫純子，横田正春，大中隆史，田中智之，柴田仙子：保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例，第 50 回日本感染症学会中日本地方会学術集会（2007 年 10 月，神戸）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 PFGEの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 (VT2)	2007年3月	PFGE型 c23
2	EHEC O157:H7 (VT2)	2007年5月	PFGE型 c47
3	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2007年8月	PFGE型 c228
4	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2007年8月	PFGE型 c440
5	EHEC O157:H7 (VT1,VT2)	2007年10月	PFGE型 c704
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	菌株の由来	施設	レーン	菌株の由来
No.1	M	Marker	No.9	M	Marker
	1	菌株6		1	菌株6
	2	菌株7		2	菌株7
	3	食中毒 (2007年6月)		3	食中毒 (2007年)
	4	食中毒 (2007年6月)		4	食中毒 (2007年)
	5	食中毒 (2007年9月)		5	食中毒 (2007年)
	M	Marker		M	Marker
No.3	M	Marker	No.10	M	Marker
	1	菌株6		1	菌株6
	2	菌株7		2	菌株7
	3	散发事例 (2006年)		3	食中毒A (2007年)
	4	散发事例 (2006年)		4	食中毒A (2007年)
	5	散发事例 (2006年)		5	食中毒B (2007年)
	M	Marker		M	Marker
No.4	M	Marker	No.11	M	Marker
	1	菌株6		1	菌株6
	2	菌株7		2	菌株7
	3	食中毒 (2007年)		3	食中毒 (2007年7月) 血清型LIO7
	4	食中毒 (2007年)		4	食中毒 (2007年8月) 血清型LIO4
	5	食中毒 (2007年)		5	食中毒 (2007年9月) 血清型LIO1
	M	Marker		M	Marker
No.8	M	Marker			
	1	菌株6			
	2	菌株7			
	3	ヒト (1995年)			
	4	ヒト (1995年)			
	5	ヒト (1995年)			
	M	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 ver.2
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	6V/cm, 6.8 - 35.4s, 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)