

表1 1st Primer Mix判定結果

1st 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	eee	1-16	hlyA
Size(bp)	974	905	839	742	645	595	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
①	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
②	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
③	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
④	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
⑤	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
⑥	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
⑦	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
⑧	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
⑨	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
⑩	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
⑪	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑫	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑬	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑭	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑮	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑯	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑰	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
⑱	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
⑲	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

表2 2nd Primer Mix判定結果

2nd Primer Mix																		
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
Size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
①	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
②	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
③	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
④	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
⑤	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
⑥	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
⑦	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
⑧	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
⑨	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
⑩	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
⑪	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
⑫	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	*0	0
⑬	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
⑭	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
⑮	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
⑯	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
⑰	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
⑱	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
⑲	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

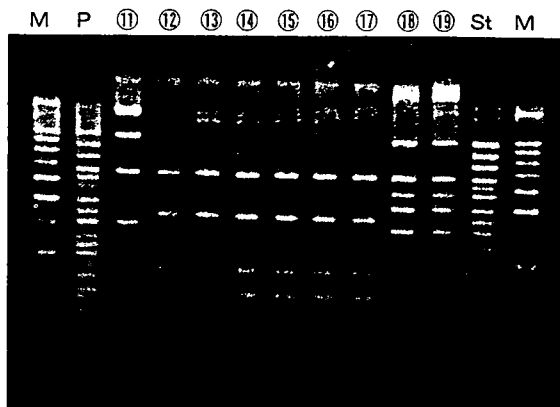
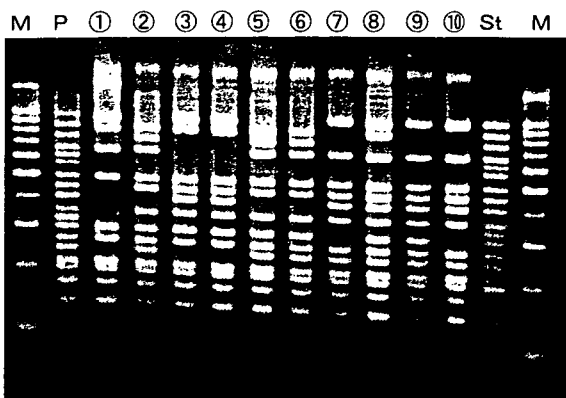
*⑩:小林プライマーでもVT2検出なし、但しRPLAでVT2毒素検出

表3 IS-printing SystemとPFGEとの比較

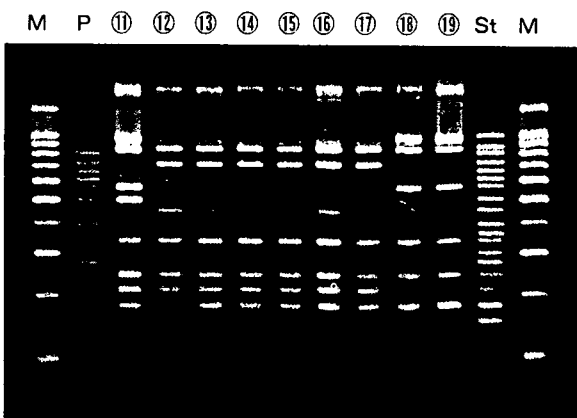
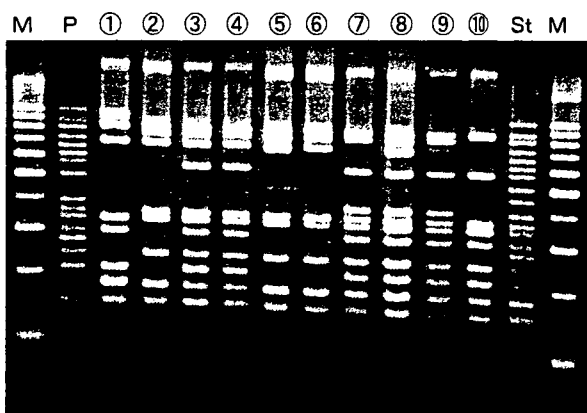
菌株No	分離年月	毒素型	年齢	性別	発生状況	感染研でのPFGE型別	IS-printing Systemの型別	
							1st	2nd
①	Jul-07	VT1&2	19	男	散発	c123	A	a
②	Aug-07	VT1&2	13	女	散発	c192	B	b
③	Aug-07	VT1&2	4	男	同一保育所(患者)	c187	C	c
④	Aug-07	VT1&2	3	女	同上	c187	C	c
⑤	Sep-06	VT1&2	1	男	家族内・集団	b330	B	b
⑥	Oct-06	VT1&2	32	女		b330	B	b
⑦	Oct-06	VT1&2	21	女	散発	a781	D	d
⑧	Nov-06	VT1&2	2	男	患者	a718	E	e
⑨	Nov-06	VT1&2	55	女	家族内	a718	F	d
⑩	Dec-06	VT1&2	50	男	散発	b879	D	f
⑪	May-07	VT2	2	男	散発	c26	G	g
⑫	Jul-07	VT2	31	女	家族内	c120 3band differ.c122	H	h'
⑬	Jul-07	VT2	3	女		c121 3band differ.c122	H	h
⑭	Jul-07	VT2	5	女		c120	H	h
⑮	Jul-07	VT2	6	男	患者	c122	H	h
⑯	Aug-07	VT2	31	女	家族内	c184 1band differ.c122	H	h
⑰	Aug-07	VT2	3	女	姉が⑭と同一幼稚園	c122	H	h
⑱	Sep-07	VT2	59	女	家族内	c345	I	i
⑲	Sep-07	VT2	3	女	患者	c345	I	i

図 1

1st IS-printing

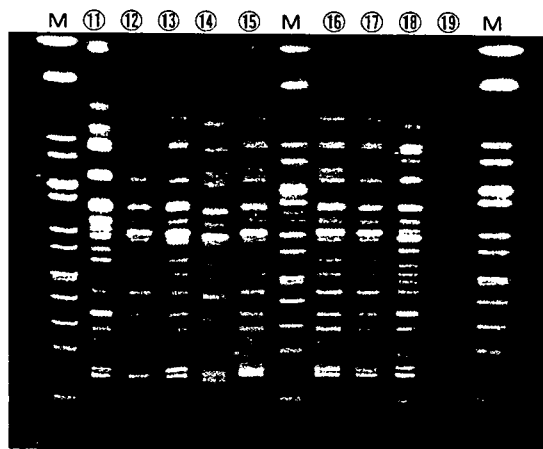
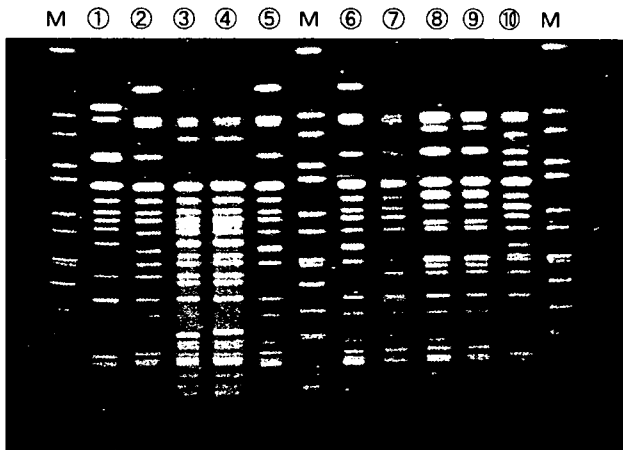


2nd IS-printing



M : 100bp ラダー, P : ポジティブコントロール, St : Standard DNA

PFGE



腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析における IS-Printing System の検討

研究協力者 香川県環境保健研究センター 砂原千寿子

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 10 株について、マルチプレックス PCR による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法をキット化した IS-Printing System の検討を行い PFGE 法と比較した。その結果、PFGE とほぼ同等の識別能が得られ、操作の簡便性と迅速性が優れていることから、疫学解析の手法として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の PFGE による疫学解析は有用な手法で広く用いられているが、解析結果を得るまでに 3 日以上を要し迅速性に欠ける。そこで、近年開発されたマルチプレックス PCR による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法 IS-Printing System について、識別能、操作の簡便性、迅速性について検討した。

B. 研究方法

使用菌株は、2006 年、2007 年に香川県内で発生した 6 事例の患者由来株 10 株を用いた。

検査方法は IS-Printing System は試薬キット添付のプロトコールに準じて実施した。PFGE 法については制限酵素 Xba I を用い、感染研ニュープロトコールに準じて実施した。

C. 研究結果及び考察

表 1 に使用菌株の概要を、PFGE パターンを図 1 に示す。PFGE 遺伝子パターンは以前実施した結果では 5 種類に分かれたが、今回は 6 種類に分類された。菌株 No1 から 3 は表 1 に示すように感染研 Type No a85 に分類された菌株であるが、今回は No3 の菌株でバンドパターンに変化がみられた。

IS-Printing System の結果を図 2、図 3、表 2、表 3 に示す。IS-Printing System では 1st set primer、2st set primer いずれも No1~3 は同一のパターンに、また、No4 と No5~7 は PFGE で 2 バンドの違いがみられたが、IS-Printing System では同一のパターンに分類され 10 株は 4 種類に分類された。

今回の検討では PFGE が識別能が高い結果となったが、PFGE は良質な画像が得られないと、同じ菌株においても解析時に若干違いがみられる場合があり、No4 と No5~7 は以前の PFGE では同じパターンに分類されている。IS-Printing System は簡便性、迅速性に優れており、PFGE と同一結果は得

られなかったが、集団感染発生時の疫学解析の手段として有用であることが示唆された。

試薬キット添付のプロトコールでは大きさ 1mm 程度のコロニーをアルカリ抽出法で処理とされているが、研究班の昨年度の結果に基づき 2mm 程度のコロニーを用いた。図 2、3 にみられるように Standard DNA、ポジティブコントロールに比べるとやや DNA 量が多く判定しにくいバンドもみられた。また、判定では明らかに増幅が弱いバンドは陽性としないとされているが、Standard DNA とポジティブコントロールでもバンドにより増幅量に違いがみられ、ポジティブコントロールで 1-06(561bp)、2-02(861bp)、2-07(555bp)のバンドがやや不明瞭であったことから、判定が困難な場合も考えられる。

表 1 使用菌株

No	血清型	毒素型	備考	Type No	IS
1	O157:H7	1+2	(2006年分離株)散発例	a85	
2	O157:H7	1+2	(2007年分離株)	a85	
3	O157:H7	1+2	2の兄	a85※	
4	O157:H7	2	(2006年分離株)	b113	
5	O157:H7	2	(2007年分離株)	b664	
6	O157:H7	2	5の父	b664	
7	O157:H7	2	5の母	b664	
8	O157:H7	2	(2007年分離株)散発例	c674	
9	O157:H7	1+2	(2007年分離株)	c364	
10	O157:H7	1+2	9の兄	c364	

D. 結論

比較した菌株数が 10 株と少ないため、今後さらに検討が必要であるが、IS-Printing System は PFGE に比べやや識別能が劣ったが、操作の簡便さ、迅速さが優れていることから、集団感染発生時の疫学解析の手段として有用であることが示唆された。しかし、バンドの有無を正確に判定するためには、増幅や泳動の条件等についてさらに検討を要する。

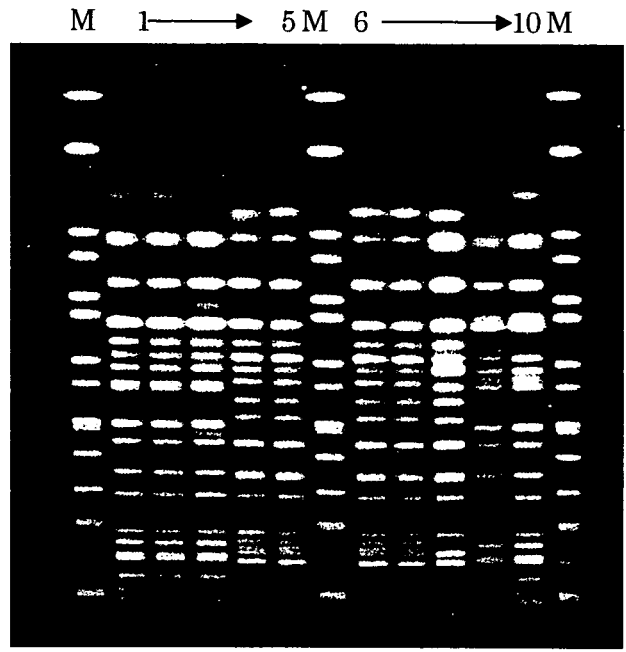


図1 PFGE 泳動像

M PC 1 → 5 ST 6 → 10 PC M

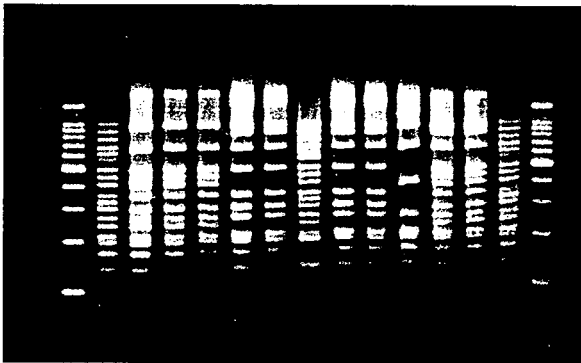


図2 IS-Printing System 1st set Primer Mix 泳動画像

M PC 1 → 5 ST 6 → 10 PC M

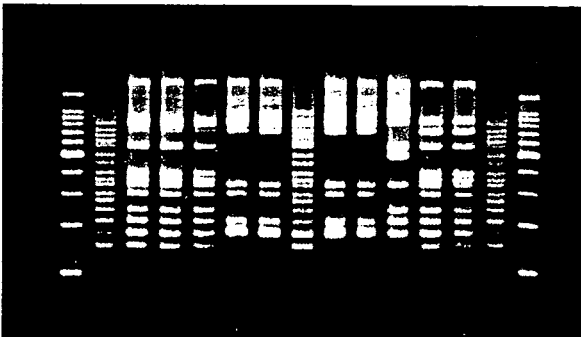


図3 IS-Printing System 2nd set Primer Mix 泳動画像

M:100bp DNA Ladder

PC:キットの Template Mix の PCR 産物

ST:キットの Standard DNA

表2 1st set判定結果

Primer No	Size (bp)	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	No8	No9	No10
1-01	974	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-02	839	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
1-03	742	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-07	495	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1-08	442	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
1-09	405	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
1-10	353	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	300	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eaε	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

表3 2nd set判定結果

Primer No	Size (bp)	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	No8	No9	No10
2-01	987	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
2-02	861	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
2-04	710	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2-05	642	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-07	555	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
2-08	499	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2-09	449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	394	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
2-11	358	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15	240	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
2-16	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx2	181	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1

判定：増幅あり 1 増幅なし 0

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-Printing System の検討

研究協力者 愛媛県立衛生環境研究所 吉田紀美 青木紀子 田中博

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157(O157)8 株について、マルチプレックス PCR による O157 サブタイピング法をキット化した IS-Printing System(以下、IS-Printing)の検討を行い、PFGE 法と比較した。その際に当所で所有している A、B2 台の遺伝子増幅装置を用いた結果、装置 B では試薬キットで設定された PCR 条件ではプライマーの一部で正常な反応がみられないことが確認された。このことから、IS-Printing による遺伝子型別に際しては、ポジティブコントロールにおける増幅の有無を照準として使用機種、PCR 条件等について検討することの必要性が示唆された。また、全国で散発的に分離された PFGE 型の O157 について、IS-Printing 法と PFGE 法はそれぞれ原理、検出系が異なるサブタイピング法であるが、両法ともほぼ同等の識別能を有することが確認された。

A. 研究目的

O157 感染症の分子疫学的解析法として、構造多形成を示すゲノム領域を標的としたマルチプレックス PCR 法による O157 サブタイピング法 IS-Printing が開発された。その際に遺伝子増幅装置による PCR 条件等の特性が遺伝子増幅に与える影響の有無を調べるため、当所で所有している A、B2 台の遺伝子増幅装置を用いて実施することとした。今回供試した O157 は、2006 年から 2007 年に県内で分離された O157 のうち、全国各地で散発的に分離された PFGE 型 3 種類 8 株とし、IS-Printing による遺伝子型別とパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) パターンを行い、比較検討を行った。

B. 研究方法

1 供試菌株

2006 年 7 月から 2007 年 10 月までに愛媛県内で分離された 8 株で、全国各地で散発的に分離された 3 種の PFGE 型(サブタイプ名 a259,b193,c177)を用いた(表 1)。a259 は家族内発生を含め、2006 年 2007 年に県内で散発的に分離された 6 株、また b193 及び c177 は各 1 株を供試した。

2 検査方法

・IS-Printing System

試薬キット IS-printing System (東洋紡績(株))を用い、添付の取扱説明書に準じて行った(図 1)。PCR 反応には当所で所有している A、B2 台の遺伝子増幅装置を用いた。

・PFGE 法

感染研ニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素は Xba I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2-63.8 秒、泳動時間 19 時間で行った。なお、供試した菌株は国立感染症研究所において PFGE 型サブタイプ名が付与された。

C. 研究結果と考察

今回の試薬キットからポジティブコントロールが入り、全プライマーに対する遺伝子増幅の確認ができるようになった。今回、このポジティブコントロールを使用することにより、当所で使用している 2 台の遺伝子増幅装置の PCR 反応性を検証することとした。

遺伝子増幅装置 A を用いたときの 1st 及び 2nd primer に対する PCR 泳動写真を図 2 に、

また肉眼判定により増幅生成物によるバンド有りを1、無しを0、判定困難を2として数値化した結果を表2に示した。同様に装置Bの結果を図3、表3に示した。

装置Aではポジティブコントロールに対して36種のプライマー全てに増幅バンドがみられたことから、全プライマーに対する反応性が正常であることが確認された。

一方、装置Bではポジティブコントロールに対し1-06(561bp)、*eae*(185bp)、*hlyA*(137bp)、2-09(449bp)で増幅バンドが確認できなかった。このことから、装置Bでは取扱説明書に記載されたPCR条件では不適であり、さらに条件設定が必要であると考えられた。さらに、装置Bでは臨床分離株No.1からNo.8においても、ポジティブコントロールの場合と同様に、*eae*、*hlyA*に対するバンドが確認できないか、または判読に苦慮する結果となった。

このように装置Bの場合は、試薬キットで設定されたPCR条件ではプライマーの一部に正常な反応がみられないことが確認され、IS-Printingには不適と判断した。一方、装置Aでは36種類のプライマー全てで良好な結果であったことから、臨床分離株の判定には装置Aの結果を用いることとした。

今回IS-Printingに供試したO157は2006年から2007年に県内で分離された8株で、全国各地で散発的に分離された3種のPFGE型(サブタイプ名a259,b193,c177)に型別されたものを用いた。そのうち、a259は2006年2007年の広域流行株で、石川県、大阪市、東京都、島根県、横浜市、埼玉県、愛知県岡崎市、島根県、大阪府、愛媛県等全国各地で多数分離された株である。また、b193は2006年岡山県、7月愛媛県で、さらにc177は2007年5月岡山県、7月山形県、東京都、神奈川県、横浜市、10月愛媛県で分離された株である。3種類のサブタイプ8株のPFGE法による泳動像を図4に、Figer-Printingによる系統樹解析

のデンドログラムを図5に示した。さらにIS-Printingによるパターンおよび薬剤感受性試験の結果を表4に示した。

まずa259の6株は家族内感染の2例を含む散発例で、PFGE型と同じくIS-Printingでも同一パターンIを示したことから、遺伝学的には同一菌株の可能性が示唆された。しかし、薬剤感受性試験の結果、No.4とNo.5はアンピシリン/オグメンチン及びテトラサイクリンに各々耐性であったことから、感染の原因となったO157は全く同一ではないことが推察された。これら2株以外のNo.1、2(家族内感染)、No.3およびNo.6の4株は、IS-PrintingおよびPFGE法どちらも同じ結果となり、同一菌の可能性が示唆され、事例間の関連性が考えられる結果となった。

次にb193のNo.7株については、No.1からNo.6の株(a259)とIS-Printingで同じ増幅パターンIであった。PFGE型では別名であるが、約80Kbのバンド1本の違いであり、両株の相同性は97%と高い。このことから、IS-Printingパターンの類似した株はPFGE法による相同性も高いことが推察された。さらにc177はO157:H-でH抗原の有無で上記の2パターンとは異なっている。PFGE法で相同性77%、IS-Printingでも11プライマーに対する増幅反応でa259と異なる結果となった。

以上のことからIS-Printing法とPFGE法はそれぞれ原理、検出系が異なるサブタイプング法であるが両法ともに同等の識別能を有するものと推察された。

IS-Printingは半日で結果判定が可能であり迅速性に優れているが、今回当所で使用している2台の遺伝子増幅装置で実施した結果、機種によっては試薬キットで設定されたPCR条件ではプライマーの一部に正常な反応がみられないことが確認された。

昨年度の同研究の際に、1stで500bp以上のバンドがやや不明瞭であったこと、*eae*、*stx1*

という EHEC 必須バンドの検出が確実でなかったこと等を報告しているが、これも PCR 条件の設定に問題があり、使用機種に応じた検討が必要であったと推察された。

今後、IS-Printing 法の標準化に向けてはポジティブコントロールにおける増幅の有無を照準として使用機種、PCR 条件等について検討することの必要性が示唆された。

D. 結論

当所で所有している 2 台の遺伝子増幅装置を用い IS-Printing を実施した結果、機種によっては試薬キットで設定された PCR 条件では

プライマーの一部に正常な反応がみられないことが確認された。ポジティブコントロールにおける増幅の有無を照準として使用機種、PCR 条件等について検討することの必要性が示唆された。

IS-Printing 法と PFGE 法はそれぞれ原理、検出系が異なるサブタイピング法であるが両法ともに同等の識別能を有することが確認された。

F 研究発表

なし

表1 供試菌株情報

No.	Type No.	血清型	VT1	VT2	発症日	患者等の住所	年齢	性別	発生状況
1	a259 ¹⁾	O157:H7	+	+	2006/7/15	南宇和郡	7	F	家族内
2	a259 ¹⁾	O157:H7	+	+	2006/7/21	南宇和郡	34	F	家族内、1の母
3	a259 ¹⁾	O157:H7	+	+	2006/7/17	松山市	10	F	散発
4	a259 ¹⁾	O157:H7	+	+	2007/9/7	西条市	6	F	散発
5	a259 ¹⁾	O157:H7	+	+	2007/10/1	今治市	18	F	散発
6	a259 ¹⁾	O157:H7	+	+	2007/10/16	今治市	14	M	散発
7	b193 ²⁾	O157:H7	+	+	2006/7/27	松山市	8	M	散発
8	c177 ³⁾	O157:H-	+	+	2007/9/27	伊予市	56	F	散発

- 1) a259: 2006年広域流行株
2007年7月石川県, 大阪市, 東京都, 島根県, 横浜市 8月東京都, 埼玉県, 愛知
- 2) b193: 2006年岡山県, 7月愛媛県
- 3) c177: 2007年5月岡山県, 7月山形県, 東京都, 神奈川県, 横浜市, 10月愛媛県

反応液の調製

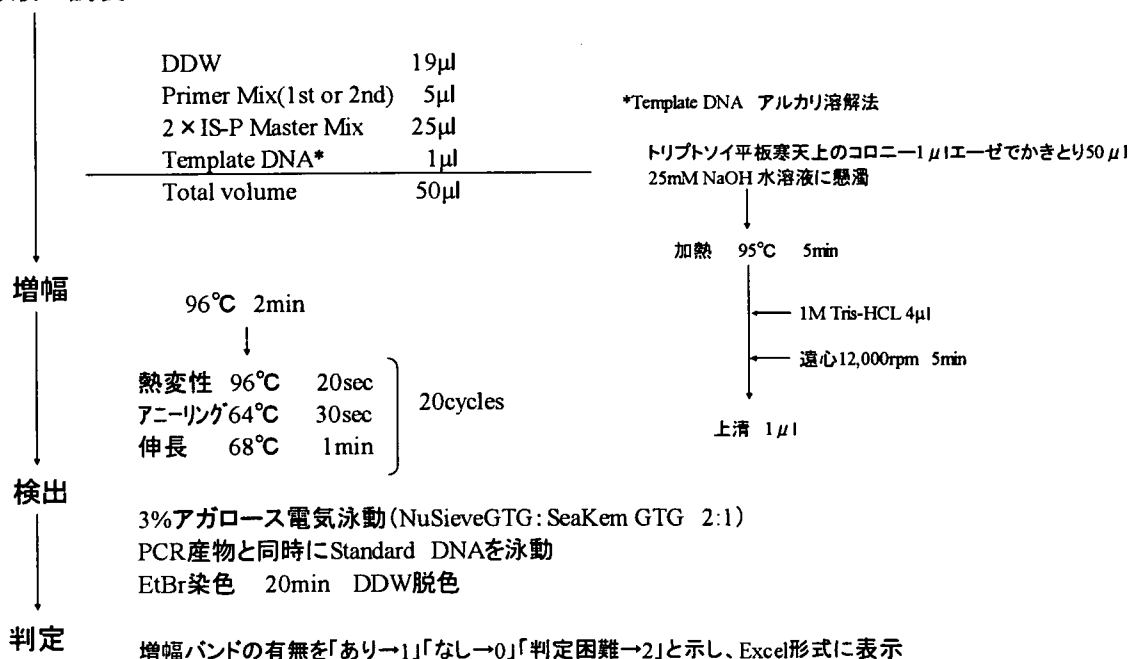


図1 IS-Printing Systemプロトコール

図2 装置AにおけるPCR後の電気泳動像
(上図:1st, 下図:2nd)

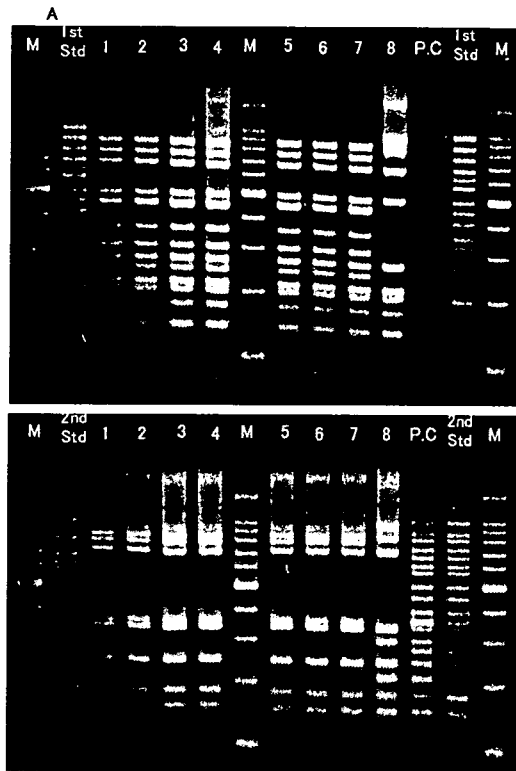


図3 装置BにおけるPCR後の電気泳動像
(上図:1st, 下図:2nd)

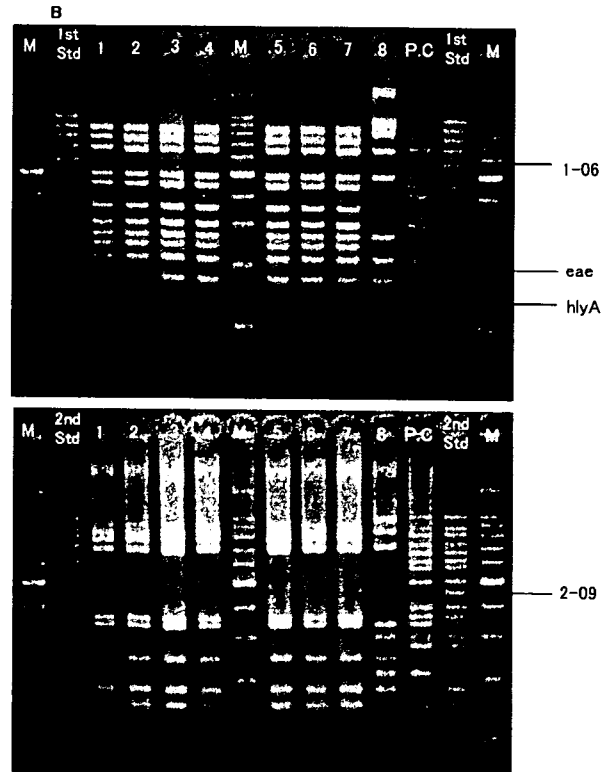


表2 装置AのIS-Printing System 判定結果

primer No	Size (bp)	No 1 (a259)	No 2 (a259)	No 3 (a259)	No 4 (a259)	No 5 (a259)	No 6 (a259)	No 7 (b193)	No 8 (c177)	PC
1-01	974	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1-02	839	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-03	742	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-07	495	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-09	405	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-10	353	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-12	300	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eae	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-01	987	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2-02	861	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2-04	710	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-05	642	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-07	555	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-08	499	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-09	449	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-10	394	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-11	358	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-15	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	0	0	0	0	0	0	0	1	1
stx2	181	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	1	1	1	1	1	1

表3 装置BのIS-Printing System 判定結果

primer No	Size (bp)	No 1 (a259)	No 2 (a259)	No 3 (a259)	No 4 (a259)	No 5 (a259)	No 6 (a259)	No 7 (b193)	No 8 (c177)	PC
1-01	974	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1-02	839	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-03	742	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-07	495	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-09	405	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-10	353	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-12	300	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eae	185	0	0	0	0	2	2	2	0	0
1-16	171	1	0	1	1	1	1	1	1	1
hlyA	137	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-01	987	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2-02	861	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2-04	710	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-05	642	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-07	555	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-08	499	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-09	449	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	394	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-11	358	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-15	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	0	0	0	0	0	0	0	0	1
stx2	181	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	1	1	1	1	1	1

PC:ポジティブコントロール

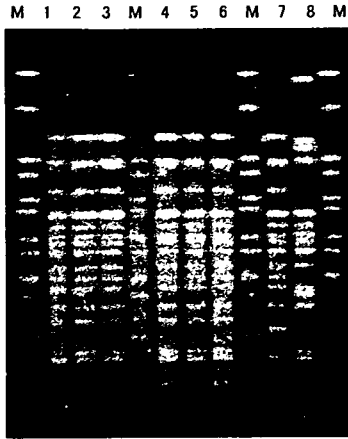


図4 O157分離株のPFGE泳動像

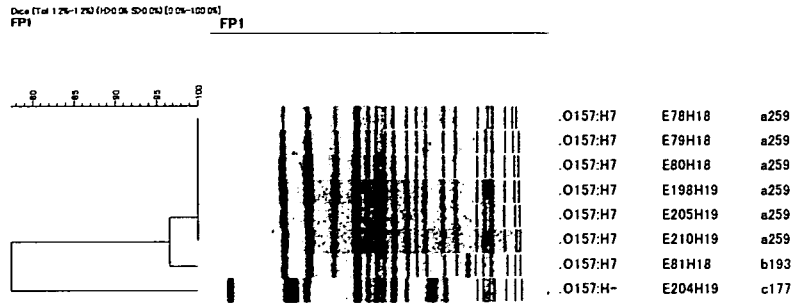


図5 O157分離株のデンドログラム

表4 O157の遺伝子解析結果

No.	血清型	VT1	VT2	PFGE Type No. (コメント)	ISタイピング	耐性薬剤	菌株番号	発症日	患者等の住所	年齢	性別	発生状況
1	O157:H7	+	+	a259	I	無	E78H18	2006/7/15	南宇和郡	7	F	家族内
2	O157:H7	+	+	a259	I	無	E79H18	2006/7/21	南宇和郡	34	F	家族内、1の母
3	O157:H7	+	+	a259	I	無	E80H18	2006/7/17	松山市	10	F	散発
4	O157:H7	+	+	a259	I	ABPC, ABPC/CVA	E198H19	2007/9/7	西条市	6	F	散発
5	O157:H7	+	+	a259	I	TC	E205H19	2007/10/1	今治市	18	F	散発
6	O157:H7	+	+	a259	I	無	E210H19	2007/10/16	今治市	14	M	散発
7	O157:H7	+	+	b193 (a259とoneband違い)	I	無	E81H18	2006/7/27	松山市	8	M	散発
8	O157:H-	+	+	c177	II	無	E204H19	2007/9/27	伊予市	56	F	散発

高知県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-Printing System の検討

研究協力者 高知県衛生研究所 松本紀子 平松佐穂 戸梶彰彦

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 による diffuse outbreak の把握を目的として、pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法による解析が行われているが、解析結果を得られるまでに3日以上を要しまた操作が煩雑なため、迅速で簡便な遺伝子解析法の開発が求められている。そこで、宮崎大学林教授のグループにより、構造多形性を示すゲノム領域を標的とし数時間で判定が可能な IS-Printing System が開発された。この IS-Printing System を用い、高知県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析を行い、PFGE 法による解析との比較を行ったのでこれについて報告する。

B. 研究方法

1 供試菌株

平成 19 年 4 月に 1 家族 3 名から分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 stx1,2 3 株(表1)を用いた。国立感染症研究所で解析された PFGE 型はいずれも c45 であった。

2 検査方法

(1)IS-Printing System

試薬キット IS-Printing System(東洋紡)を用い、添付のプロトコールにしたがって行った。

(2)PFGE 法

感染研ニュープロトコールに基づいて行った。制限酵素は Xba I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2-54.2sec、泳動時間 18.5 時間で行った。

C. 研究結果と考察

IS-Printing System の電気泳動像を図 1 に、判定結果を表 2 に示した。また、その PFGE 画像を図 2 に示した。今回使用した菌株は、2007 年 4 月に発症した患者及びその家族より分離された 3 株であるが、PFGE 法での解析と同じく IS-Printing System でも 3 株とも同じパターンを呈し、矛盾した結果ではなかった。

IS-Printing System は PFGE 法と違い 1 日で結果を見ることができ、また、普段行っている PCR 法と同じ簡便な手法のため、初めて実施する者でも良好な結果が得ることができた。しかし、Loading Dye による目視で泳動終了が計れないので事前に泳動時間について予備実験しておく必要があった。これについては今後改良する必要があると思われる。

今回は供試した株が 3 株と少なくかつ同じ PFGE パターンの株のみを使用したため、IS-Printing System と PFGE 法との比較は十分行うことができなかった。しかし、IS-Printing System は PFGE 法を実施する前のスクリーニングとして有望な方法で

あり、今後より多くの事例で検討をしていく必要が あると思われる。

表1 使用菌株の詳細

株 No	血清型	stx 型	性別	年齢	症状	PFGE 型 (感染研)	備考
Strain6817	O157 : H7	1,2	男	12 歳	有	c45	
Strain6819	O157 : H7	1,2	男	64 歳	無	c45	No 1 の祖父
Strain6820	O157 : H7	1,2	女	65 歳	無	c45	No 1 の祖母

表2 IS-Printing System 判定結果

1st Primar Mix

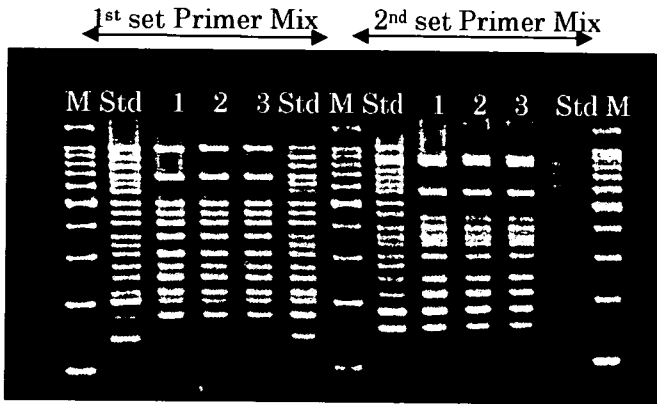
Primer No	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hlyA
Size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
Strain6817	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Strain6819	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Strain6820	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

2nd Primar Mix

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	stx1	stx2
Size (bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
Strain6817	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Strain6819	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Strain6820	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

*バンドあり→1、バンドなし→0

*Strain6817、Strain6819、Strain6820 とともに 430bp 付近に extra バンド



M:100bp ladder
 Std:Standard DNA
 1: Strain6817
 2: Strain6819
 3: Strain6820

図1 IS-Printing System 泳動画像



M:*Salmonella* Brenderup
 1: Strain6817
 2: Strain6819
 3: Strain6820

図2 PFGE 泳動画像

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症 研究事業)

分担研究報告書

九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み 2

— IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について —

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者

瓜生 佳世	福岡市保健環境研究所	村瀬浩太郎	北九州市環境科学研究所
眞子 純孝	佐賀県衛生薬業センター	右田 雄二	長崎県衛生公害研究所
江原 裕子	長崎市保健環境試験所	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
峯 真由美	熊本市環境総合研究所	緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所	上野 伸広	鹿児島県環境保健センター
久高 潤	沖縄県衛生環境研究所	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
小野塚大介	福岡県保健環境研究所	中村祥子	福岡県保健環境研究所

大岡 唯祐¹、林 哲也^{1,2} 宮崎大学¹医学部、²フロンティア

楠本 正博 東洋紡績・バイオフィロンティアプロジェクト推進室

寺嶋 淳 感染症研究所・細菌第一部

研究要旨 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、平成 19 年度は 1) IS-printing System に関する基礎的研究、2) 研修について、3) 事例検討の 3 課題について実施した。本稿では 1) について以下報告する。

九州ブロックでは平成 18 年度の研究において、IS-printing system を実用化するため、DNA 抽出条件、DNA ポリメラーゼ量や PCR 条件等について検討を行った。平成 19 年度は 18 年度の結果に基づき改良された IS-printing system を用いて、各地研で分離された O157 について解析し、その有用性を検討した。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有用な手段である。しかし、異なるゲルで泳動された DNA パターンを比較するには、「安定した PFGE マーカーの泳動、良好な PFGE および良好な画像の保存」などが必須である。また、PFGE は解析結果を得るまでに最短 3 日以上を要し、迅速性に欠ける。これらの理由から

PFGE 実施前にスクリーニングとして使用可能な細菌学的疫学情報が望まれている。

宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157 株のゲノム構造多型を有効に利用し、デジタル化可能な検査結果を得ることの出来る菌株識別システムの開発が行われ、平成 18 年度に九州ブロックにおいて「O157 感染症における細菌学的情報の迅速還元」を達成するため、IS-printing System に関する基

礎的研究」を行った。平成 18 年度の結果に基づき改良された IS-printing System を用いて、九州ブロック各地研で分離された O157 について解析し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

IS-printing System: 昨年検討課題として挙げた

- ① 1st set *eae* 遺伝子(495bp)検出用 primer set の改良
- ② 1st set の 1kb 付近の 3 種 primer set での PCR 産物のサイズが近似しているため、primer set の再検討
- ③ 2nd primer set で 480bp 付近(449bp と 499bp の間)及び 230bp 付近(211bp と 240bp の間)にエキストラバンドについての改良
- ④ マーカーとサンプルの塩濃度を含めた組成の改良
- ⑤ 100bp ladder と IS サンプル(スタンダードマーカーも含めて)との移動度の違いを防ぐため、ladder 添付の loading buffer 等の組成の違いをなくす。

以上の 5 点について、改良された IS-printing System を用いた。

菌株: 各地研で保存されかつ感染症研究所へ送付し PFGE Type が判明している 267 株の O157 を対象とした。

機器・機材: 検討に使用した PCR 機器、泳動槽および画像取り込み装置は、表 1 のとおりであった。

Template DNA の作製: 純培養に使用された培地は、クロモアガー O157、普通寒天など 9 種類で地研により異なっていた(表 2)。Template DNA は、シングルコロニーをアルカリ抽出法により作製した。

電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー: 泳動時間は各地研で PCR 産物の分離能を勘案した最適時間で行った。泳動用バッファーは、11 地研が TBE を他 1 地研が TAE を用いていた。Loading Dye は TaKaRa 社製を用いた 1 地研を除き、すべてキット添付品を用いた(表 3)。

結果の判定: 各菌株の電気泳動により得られた 36 本の遺伝子増幅産物の出現パターンを 2 進数(1, 0)で表現した後に 10 進数に変換し、11 桁の挿入配列の組み合わせ固有の番号として管理した。

解析: 解析方法は、近似度計算: Matching 法、クラスター解析: Ward 法を用いた。

C. 結果

1) プレート上のコロニー間での *stx* 遺伝子型が異なる場合があった

地研 3 で、カジトン培地での保存菌 (No. 3_07014) を血液寒天培地に塗抹後、4 コロニーについて *stx* 遺伝子の検出を行った。プライマーはキット添付品と TaKaRa 社製を用いた。4 コロニー中 1 コロニーが、*stx2* で他 3 コロニーは *stx1* および 2 を保有していた。両プライマーいずれも同一結果であった。また、同一コロニーをアルカリ抽出および熱抽出の 2 法で行い同様に PCR を行ったが、いずれも結果に相違は見られなかった(写真 1)。当該株は、地研 3 から感染症研究所へ送付時の検査結果は *stx1* および 2 であった。同一株であっても Template DNA を作製するコロニーの段階で、コロニー間で相違が見られる場合があると考えられた。

2) IS-printing の結果

IS-printing の ID コードは 105 型、PFGE-Type は 159 型であった(表 4)。

同一 PFGE-Type で IS-printing の ID コードが

異なる菌株群は、リグループであった(表5)。同一地研内では家族や同一施設である場合はIDコードが同じであるが、地研が異なる場合にIDコードに相違が見られた。さらに、これらの関連性をまとめると(表6)、同一コードでPFGE-Typeが異なる菌株が2グループあった。

IS-printing Systemの同一IDコードでPFGE-Typeが異なる菌株群は、29グループあった(表7)。29グループ中7グループは、同一家族あるいは同一事例であった。また、7グループは同一県内の事例であった。さらにその他のグループにおいても隣接した県や市である場合が多かった。

一方、これらの結果の一部をクラスター解析した(図1)が、株数が多くなると関連性について判断が困難となり、むしろIDコードによる直接比較の方が解析する上で簡便であった。

表8にIS-printingの結果を示した。興味深い事に、地研2、5、7および12における12株が、*eae* および *hly* 両遺伝子検出されなかった。また、地研7および12における8株が *hly* 遺伝子を、地研12における1株が *eae* 遺伝子を保有していなかった。いずれの地研においても陽性コントロールは明瞭に検出され、PCRに問題はなかった。

D. 考察

旧バージョンのIS-printing Systemでは1st set *eae* 遺伝子(495bp)の増幅率が悪かったが、新バージョンでは改善され、明瞭なバンドが得られた。また、1st setの1kb付近の3種 primer setの増幅産物のサイズが近似していた点についても改善され、バンドの識別が容易であった。2nd primer setで480bp付近(449bpと499bpの間)および230bp付近(211bpと240bpの間)エキストラバンドが解消されていた。さらに、1kb

付近のバンドとスタンダードマーカータとずれる点については、マーカータとサンプルの塩濃度を含めた組成を同じにすることにより解消された。また、100bp ladderとISサンプル(スタンダードマーカータも含めて)との移動度の違いについては、loading bufferを同一にすることにより改善された。

昨年の検討を踏まえ改良されたIS-printing Systemは、初めて使用した実験者においても容易に再現性の良い結果が得られた。

IS-printing SystemのIDコード数はPFGE Type数の約3分の2で識別能力は劣るが、疫学情報との相関性が良かった。IS-printing Systemを用いた解析は、1日で数値データが得られ、過去のデータとの解析が容易である点で優れ、現場における細菌学的情報提供に適した解析方法であると考えられた。

一方、O157は変化しやすいため、同一菌株においても保存株を寒天培地上に発育させた場合、コロニーによって遺伝的性質を異にする場合があり、菌株の取り扱いについては、注意が必要である。

E. 結論

新バージョンのIS-printing Systemで得られた結果は、IDコード化が容易であり、他の機関や過去の結果と普遍的に比較することが可能である。また、IS-printing Systemは1日で結果が得られ迅速性が求められる公衆衛生分野での応用が期待される。

IS-printing Systemは、PFGEとは異なる原理を用いた遺伝子解析手法として有望であり、これまで実績のあるPFGE法と併用することにより、原因究明の迅速化に寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1) 江藤 良樹、中村 祥子、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、大岡 唯祐、林 哲也、楠本 正博、寺嶋 淳、「腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing 法とパルスフィールド・ゲル電気泳動の比較」、第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム(2008.3.7-8)に

て発表.

2) 中村 祥子、江藤 良樹、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、「福岡県で分離された稀な O 群血清型の腸管出血性大腸菌について」、第 12 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム(2008.3.7-8)にて発表.

表1 IS-printing System に使用した周辺機器

地研 番号	PCR機種名		泳動槽		画像取り込み装置	
	メーカー	型式	メーカー	型式	メーカー	型式
1	ABI	GeneAmp 9600	コスモバイオ	Mupid-2	Kodak	EDSA 290
2	BIO-RAD	iCycler	Elchom	SEA 2000	BIO-RAD	Gel Doc EQ
3	ASTECC	PC 320	ADVANCE	Mupid	BIO-RAD	Gel Doc 2000
4	ABI	GeneAmp 9700	WARNING	MG 105	BIO-RAD	Gel Doc XR
5	BIO-RAD	iCycler	ADVANCE	Mupid	POLAROID	MP-4
6	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	TOYOBO	FAS-III
7	ASTECC	PC800	ADVANCE	Mupid- α	BIO-RAD	Gel Doc 2000
8	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid-2plus	BioImage	Gel Print 2000i
9	ABI	GeneAmp 2700	コスモバイオ	Mupid-2 plus	POLAROID	MP-4
10	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	BioImage	Gel Print 2000i
11	ABI	2720 Thermal Cycler	ADVANCE	Mupid	EPSON	GT-8400UF
12	ABI	GeneAmp 9600	ADVANCE	Mupid-Ace	フナコシ	BIO DOC IT SYSTEM

表2 Template DNA の作製

地研 番号	Temperate DNA				
	培地名	コロニー数	培養時間	培養後、使用まで冷蔵庫等での保存の有無	DNA保存時間
1	LB寒天	大1	20h	無	1週間、-20℃
2	HI寒天	大1	20h	無	
3	血液寒天	大1	20h	無	
4	CT-SM	1mm	18h	無	無
5	TSA寒天	中2	18h	無	1日、4℃
6	普通寒天	大1	20h	無	検査終了まで
7	クロモアガー-O157	大1	20h	無	無
8	TSA寒天	小1	20h	無	無
9	SMAC寒天培地	1mm 1コロニー	18h	無	処理後すぐ使用と再検のため4日間
10	普通寒天	小2-3	20h	無	0~3日間、4℃
11	BHI寒天	大1	18h	無	1週間、4℃
12	普通寒天	大1	20h	無	

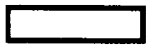
表3 電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

地研 番号	泳動時間	TBE Buffer			サイズマーカー			
		メーカー	品番	使用濃度	メーカー	品番	Lording Dye	
1	60分	日本ジーン	318-90041	×10	TaKaRa	3407A	TOYOBO	ISキット添付のもの
2	125分	invitrogen	15581-044	×10	TOYOBO	DNA-130	-	-
3	70分	ナカライテスク	35432-41	×0.5	SIGMA	MBMA 100BP-S	TOYOBO	ISキット添付のもの
4	70分	SIGMA	T4415-1L	×10	-	-	TOYOBO	ISキット添付のもの
5	80分	bio-rad		×10	BIONEXUS	BN2050	添付キット	
6	60分	BIO-RAD	161-0733	×10	TaKaRa	3407A	TOYOBO	ISキット添付のもの
7	65分	日本ジーン	318-90041	×10	TOYOBO	DNA-130	TOYOBO	ISキット添付のもの
8	約60分	日本ジーン	313-90035	TAEを使用	Amersham	274007D	TOYOBO	ISキット添付のもの
9	68分	TaKaRa	T905	×0.5	東洋紡(送付分)			
10	65分	日本ジーン	318-90041	×10	TaKaRa	3407A	TOYOBO	ISキット添付のもの
11	61-77分	日本ジーン	318-90041	×10	TaKaRa	3407A	TaKaRa	×6Loading Buffer
12	100分	BIO RAD	161-0733	×10	TOYOBO	DNA-030X	同左付属品	

表 4. IS-printing の ID コードと PFGE-Type

The table displays a comparison between IS-printing ID codes (left margin) and PFGE-Type data (main grid). The ID codes listed on the left are: 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000, 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 1012, 1013, 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019, 1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033, 1034, 1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041, 1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047, 1048, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058, 1059, 1060, 1061, 1062, 1063, 1064, 1065, 1066, 1067, 1068, 1069, 1070, 1071, 1072, 1073, 1074, 1075, 1076, 1077, 1078, 1079, 1080, 1081, 1082, 1083, 1084, 1085, 1086, 1087, 1088, 1089, 1090, 1091, 1092, 1093, 1094, 1095, 1096, 1097, 1098, 1099, 1100, 1101, 1102, 1103, 1104, 1105, 1106, 1107, 1108, 1109, 1110, 1111, 1112, 1113, 1114, 1115, 1116, 1117, 1118, 1119, 1120, 1121, 1122, 1123, 1124, 1125, 1126, 1127, 1128, 1129, 1130, 1131, 1132, 1133, 1134, 1135, 1136, 1137, 1138, 1139, 1140, 1141, 1142, 1143, 1144, 1145, 1146, 1147, 1148, 1149, 1150, 1151, 1152, 1153, 1154, 1155, 1156, 1157, 1158, 1159, 1160, 1161, 1162, 1163, 1164, 1165, 1166, 1167, 1168, 1169, 1170, 1171, 1172, 1173, 1174, 1175, 1176, 1177, 1178, 1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, 1186, 1187, 1188, 1189, 1190, 1191, 1192, 1193, 1194, 1195, 1196, 1197, 1198, 1199, 1200, 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207, 1208, 1209, 1210, 1211, 1212, 1213, 1214, 1215, 1216, 1217, 1218, 1219, 1220, 1221, 1222, 1223, 1224, 1225, 1226, 1227, 1228, 1229, 1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238, 1239, 1240, 1241, 1242, 1243, 1244, 1245, 1246, 1247, 1248, 1249, 1250, 1251, 1252, 1253, 1254, 1255, 1256, 1257, 1258, 1259, 1260, 1261, 1262, 1263, 1264, 1265, 1266, 1267, 1268, 1269, 1270, 1271, 1272, 1273, 1274, 1275, 1276, 1277, 1278, 1279, 1280, 1281, 1282, 1283, 1284, 1285, 1286, 1287, 1288, 1289, 1290, 1291, 1292, 1293, 1294, 1295, 1296, 1297, 1298, 1299, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1306, 1307, 1308, 1309, 1310, 1311, 1312, 1313, 1314, 1315, 1316, 1317, 1318, 1319, 1320, 1321, 1322, 1323, 1324, 1325, 1326, 1327, 1328, 1329, 1330, 1331, 1332, 1333, 1334, 1335, 1336, 1337, 1338, 1339, 1340, 1341, 1342, 1343, 1344, 1345, 1346, 1347, 1348, 1349, 1350, 1351, 1352, 1353, 1354, 1355, 1356, 1357, 1358, 1359, 1360, 1361, 1362, 1363, 1364, 1365, 1366, 1367, 1368, 1369, 1370, 1371, 1372, 1373, 1374, 1375, 1376, 1377, 1378, 1379, 1380, 1381, 1382, 1383, 1384, 1385, 1386, 1387, 1388, 1389, 1390, 1391, 1392, 1393, 1394, 1395, 1396, 1397, 1398, 1399, 1400, 1401, 1402, 1403, 1404, 1405, 1406, 1407, 1408, 1409, 1410, 1411, 1412, 1413, 1414, 1415, 1416, 1417, 1418, 1419, 1420, 1421, 1422, 1423, 1424, 1425, 1426, 1427, 1428, 1429, 1430, 1431, 1432, 1433, 1434, 1435, 1436, 1437, 1438, 1439, 1440, 1441, 1442, 1443, 1444, 1445, 1446, 1447, 1448, 1449, 1450, 1451, 1452, 1453, 1454, 1455, 1456, 1457, 1458, 1459, 1460, 1461, 1462, 1463, 1464, 1465, 1466, 1467, 1468, 1469, 1470, 1471, 1472, 1473, 1474, 1475, 1476, 1477, 1478, 1479, 1480, 1481, 1482, 1483, 1484, 1485, 1486, 1487, 1488, 1489, 1490, 1491, 1492, 1493, 1494, 1495, 1496, 1497, 1498, 1499, 1500, 1501, 1502, 1503, 1504, 1505, 1506, 1507, 1508, 1509, 1510, 1511, 1512, 1513, 1514, 1515, 1516, 1517, 1518, 1519, 1520, 1521, 1522, 1523, 1524, 1525, 1526, 1527, 1528, 1529, 1530, 1531, 1532, 1533, 1534, 1535, 1536, 1537, 1538, 1539, 1540, 1541, 1542, 1543, 1544, 1545, 1546, 1547, 1548, 1549, 1550, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1559, 1560, 1561, 1562, 1563, 1564, 1565, 1566, 1567, 1568, 1569, 1570, 1571, 1572, 1573, 1574, 1575, 1576, 1577.

IS-printing の ID コードが同じであるが PFGE-Type が異なる



IS-printing の ID コードが異なるが PFGE-Type が同じ