

表 1 供試菌株リスト

感染研番号	発症日	分離日	患者等の住所	菌株番号	年齢	性別	備考	症状	Type No.	VT1	VT2	PFGE コメント
081728	2008/3/25	2008/3/28	山口県 下関市	08Y01	23	M	散発	腹痛、嘔吐、下痢	d337	-	+	
081156	2008/4/2	2008/5/18	山口県 周南市	08Y02	18	M	散発	腹痛、下痢、血便	b558	-	+	
081157	2008/5/14	2008/5/16	山口県 岩国市	08Y03	4	F	散発	下痢、血便	d169	+	+	
081158	2008/5/22	2008/5/26	山口県 山口市	08Y04	34	F	散発、韓国料理?	腹痛、嘔吐、下痢、血便	d173	+	+	
081159	-	2008/5/28	山口県 山口市	08Y05	40	M	散発、二次感染者、1158の関係者	無症状	d174	+	+	
081160	-	2008/5/22	山口県 山口市	08Y06	18	F	散発、保菌者、食品従事者検便で検出	無症状	d183	+	+	
081162	2008/6/1	2008/7/4	山口県 下関市	08Y08	24	F	散発	腹痛、軟便(1ヶ月)	d170	+	+	
081164	2008/7/21	2008/7/27	山口県 下関市	08Y10	4	F	散発	下痢	d92	+	+	
081165	2008/7/21	2008/7/27	山口県 宇部市	08Y11	7	F	散発、7/19福岡県にて親身受食	腹痛、嘔吐、発熱、下痢	d177	+	-	
081166	2008/7/24	2008/7/28	山口県 宇部市	08Y12	37	M	散発	腹痛、血便	d175	+	+	
081167	2008/7/29	2008/7/31	山口県 下関市	08Y13	8	M	散発	下痢	d178	-	+	
081168	2008/7/29	2008/8/1	山口県 下関市	08Y14	4	M	散発、二次感染者	腹痛、下痢	d179	-	+	
081169	2008/7/25	2008/8/3	山口県 下関市	08Y15	33	F	散発、1168の母	下痢	d180	-	+	
081729	2008/7/29	2008/8/5	山口県 下関市	08Y16	25	F	散発	腹痛、嘔吐、下痢、血便	d335	+	+	
081730	2008/8/17	2008/8/20	山口県 下関市	08Y17	3	F	散発	腹痛、下痢、血便	b588	+	+	
081731	2008/8/15	2008/8/20	山口県 下関市	08Y18	14	M	散発	腹痛、下痢	d352	-	+	
081732	2008/8/18	2008/8/24	山口県 下関市	08Y19	4	M	散発	発熱、下痢	d28	+	-	
081733	-	2008/8/26	山口県 下関市	08Y20	37	M	散発、二次感染者、1731の父	無症状	d352	-	+	same as 1731
081734	2008/8/21	2008/8/26	鳥取県 出雲市	08Y21	9	M	散発、8/15焼肉、生セシマイ、8/16、19馬刺し、8/17鶏たたき喫食	腹痛、嘔吐、下痢	c796	-	+	
081735	2008/8/20	2008/8/24	山口県 山口市	08Y22	11	M	散発	腹痛、下痢	c304	-	+	
081736	2008/8/22	2008/8/27	山口県 山陽小野田市	08Y23	8	M	散発	腹痛、血便	d200	+	+	
081737	2008/8/4	2008/8/24	山口県 防府市	08Y24	88	F	散発	腹痛、下痢	d180	-	+	same as 1169
081738	2008/8/24	2008/8/28	山口県 防府市	08Y25	7	F	散発	腹痛、嘔吐、発熱(37.3℃)、下痢	d350	-	+	
081739	2008/8/29	2008/9/2	山口県 下関市	08Y26	1	M	散発、1732の弟	腹痛、発熱、下痢	d28	+	+	same as 1732
082341	2008/9/25	2008/10/1	山口県 山口市	08Y28	24	F	散発	腹痛、下痢、血便	d547	+	+	
082521	2008/11/3	2008/11/9	山口県 周南市	08Y29	2	F	散発	下痢、血便	b423	-	+	
082810	2008/12/6	2008/12/10	山口県 周南市	08Y30	3	F	散発、千葉県で感染の可能性あり	腹痛、下痢、血便	d690	+	+	
082811	2008/12/4	2008/12/10	山口県 下関市	08Y31	1	F	散発	発熱、下痢、血便、HUS	d693	-	+	
082812	2008/12/11	2008/12/14	山口県 下関市	08Y32	35	M	散発、二次感染者、2811の父	腹痛、下痢	d693	-	+	same as 2811
082813	-	2008/12/14	山口県 下関市	08Y33	35	F	散発、保菌者、2811の母	無症状	d693	-	+	same as 2811

表2 PFGE型、IS-printingプロファイルおよび発生状況

菌株No.	患者等の住所	PFGE型	1st	2nd	VT型	発生状況
08Y01	下関市	d337	716577	611653	VT2	散发
08Y02	周南市	b858	012057	214443	VT2	散发
08Y03	岩国市	d169	717557	611657	VT1+2	散发
08Y04	山口市	d173	613577	610646	VT1+2	散发、韓国料理?
08Y05	山口市	d174	613575	610646	VT1+2	08Y04の関係者、二次感染
08Y06	山口市	d183	115057	303447	VT1+2	散发、食品従事者様便で保菌が発覚
08Y08	下関市	d170	717557	611657	VT1+2	散发
08Y10	下関市	d92	717557	611657	VT1+2	散发
08Y11	宇部市	d177	055047	303443	VT2	散发、福岡県で刺身喫食
08Y12	宇部市	d175	613575	610646	VT1+2	散发
08Y13	下関市	d178	155047	303443	VT2	散发
08Y14	下関市	d179	114057	303443	VT2	散发、二次感染
08Y15	下関市.08Y14の母親	d180	114057	303443	VT2	散发、08Y14の母親
08Y16	下関市	d335	311555	710417	VT1+2	散发
08Y17	下関市	b558	613177	210646	VT1+2	散发
08Y18	下関市	d352	311557	610253	VT2	散发
08Y19	下関市	d28	717557	611655	VT1	散发
08Y20	下関市	d352	311557	610253	VT2	散发、08Y18の父親、二次感染
08Y21	島根県出雲市	c796	105057	303443	VT2	散发、焼肉・馬刺し、鶏たき喫食
08Y22	山口市	c304	317557	611653	VT2	散发
08Y23	山陽小野田市	d200	717557	611657	VT1+2	散发
08Y24	防府市	d180	114057	303443	VT2	散发
08Y25	防府市	d350	055045	303043	VT2	散发
08Y26	下関市	d28	717557	611657	VT1+2	散发、08Y19の弟
08Y28	山口市	d547	311057	300457	VT1+2	散发
08Y29	周南市	b423	012057	214443	VT2	散发
08Y30	周南市	d690	717557	611657	VT1+2	散发、千葉県での感染の可能性あり
08Y31	下関市	d693	351557	710413	VT2	08Y32,33の家族
08Y32	下関市	d693	351557	710413	VT2	08Y31の父親、二次感染
08Y33	下関市	d693	351557	710413	VT2	08Y31の母親、保育園者

表3 表2をPFGE型でソート

菌株No.	患者等の住所	PFGE型	1st	2nd	VT型	発生状況
08Y29	周南市	b423	012057	214443	VT2	散发
08Y02	周南市	b858	012057	214443	VT2	散发
08Y17	下関市	b558	613177	210646	VT1+2	散发
08Y22	山口市	c304	317557	611653	VT2	散发
08Y21	島根県出雲市	c796	105057	303443	VT2	散发、焼肉・馬刺し、鶏たたき喫食
08Y19	下関市	d28	717557	611655	VT1	散发
08Y26	下関市	d28	717557	611657	VT1+2	散发、08Y19の弟
08Y10	下関市	d92	717557	611657	VT1+2	散发
08Y03	岩国市	d169	717557	611657	VT1+2	散发
08Y08	下関市	d170	717557	611657	VT1+2	散发
08Y23	山陽小野田市	d200	717557	611657	VT1+2	散发
08Y30	周南市	d690	717557	611657	VT1+2	散发、千葉県での感染の可能性あり
08Y04	山口市	d173	613577	610646	VT1+2	散发、韓国料理?
08Y05	山口市	d174	613575	610646	VT1+2	08Y04の関係者、二次感染
08Y12	宇部市	d175	613575	610646	VT1+2	散发
08Y11	宇部市	d177	055047	303443	VT2	散发、福岡県で刺身喫食
08Y13	下関市	d178	155047	303443	VT2	散发
08Y14	下関市	d179	114057	303443	VT2	散发、二次感染
08Y15	下関市、08Y14の母親	d180	114057	303443	VT2	散发、08Y14の母親
08Y24	防府市	d180	114057	303443	VT2	散发
08Y06	山口市	d183	115057	303447	VT1+2	散发、食品従事者排便で保菌が発覚
08Y16	下関市	d335	311555	710417	VT1+2	散发
08Y01	下関市	d337	716577	611653	VT2	散发
08Y25	防府市	d350	055045	303043	VT2	散发
08Y18	下関市	d352	311557	610253	VT2	散发
08Y20	下関市	d352	311557	610253	VT2	散发、08Y18の父親、二次感染
08Y28	山口市	d547	311057	300457	VT1+2	散发
08Y31	下関市	d693	351557	710413	VT2	08Y32.33の家族
08Y32	下関市	d693	351557	710413	VT2	08Y31の父親、二次感染
08Y33	下関市	d693	351557	710413	VT2	08Y31の母親、保菌者

研究協力者 徳島県保健環境センター 宇佐美 実, 石田 弘子, 下野 生世

#### 研究要旨

徳島県内の患者及びその家族から平成20年に分離された腸管出血性大腸菌O157:H7 7株について、PFGE法とIS-printing法を実施し比較検討を行った。PFGE法で6タイプに分類された7菌株は、同様にIS-printing法でも6タイプに分類された。IS-printing法は、迅速性、簡便性、客観性において優れた方法であり、O157の分子疫学的解析において実用的な方法であると考えられた。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析におけるIS-printing法の有用性の検討を行った。また、昨年IS-printing法を実施した際に2ndブライマーによる分子量の大きいバンドの識別が困難であったことから、各バンドが良好に乖離する条件について検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1 供試菌株

平成20年に徳島県内で発生した患者及びその家族から分離された菌株7株(VT1&2型:3株, VT2型:4株)を使用した。

##### 2 検査方法

###### 1) PFGE法

国立感染症研究所に菌株を送付し実施したが、当所でも感染研ニューブコントロールに基づき実施した。

###### 2) IS-printing法

IS-printing System(東洋紡)を用い、添付のブコントロールに準じて実施した。但し、泳動用アガロースゲル(NuSieve GTG:SeaKem GTG=2:1)のゲル濃度は3%, 2.5%, 2%とし、バンドの乖離状況を比較した。なお、泳動にはMupid21を使用、0.5×TBE buffer

の泳動開始時温度を4℃とし、Loading Dyeの青の色素がゲルの端に到達した時点で泳動を終了した。

#### C. 結果及び考察

1) IS-printing法におけるゲル濃度の検討  
バンドの鮮明度においては、2%, 2.5%と比較して3%のゲル濃度が良好であるが、バンドの乖離幅においては、3%よりも2.5%ゲル濃度のほうが、やや良好であった。

###### 2) PFGE型別とIS-printing型別の比較

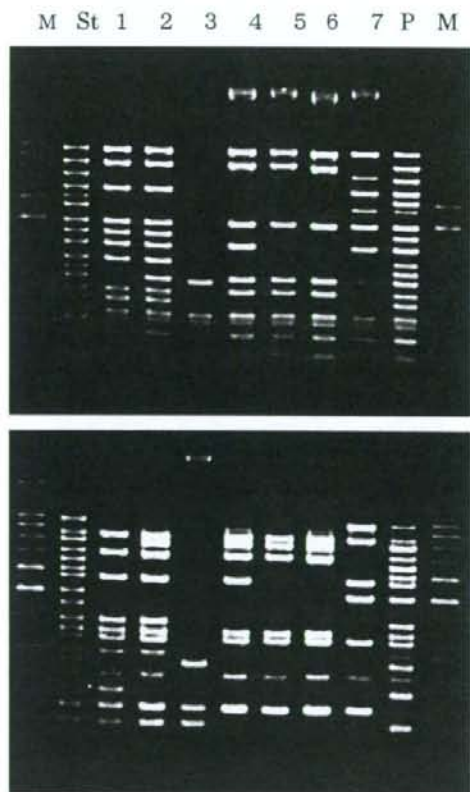
表1のとおり、PFGE法において疫学関連性のあるNo5, 6は同じ型を示し、その他の散発事例はすべて異なる型を示した。同様に、IS-printing法においても、1st, 2nd共にNo5, 6以外はすべて異なる型を示した。なお、増幅バンド数が少ない株が1株(No3)認められた。

今回の検討に使用した菌株数は7株と少ないが、IS-printing法は、迅速性、簡便性、客観性において優れた方法であり、多検体処理と迅速性が要求される現場での分子疫学的解析において実用的な手法であると考えられた。

表1 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	PFGE型別 (感染研)	IS-printing Systemの型別*	
							1st	2nd
1	Jun-08	VT1&2	77	女	散発	d125	317175	211757
2	Jul-08	VT1&2	60	男	散発	d148*	317577	611756
3	Aug-08	VT1&2	78	男	散発	d256	000445	000026
4	Jul-08	VT2	31	男	家族内感染(保菌者) <sup>1)</sup>	c47	305457	611642
5	Aug-08	VT2	3	男	家族内感染(患者) <sup>2)</sup>	d259	301457	610642
6	Sep-08	VT2	14	女	家族内感染(保菌者) <sup>3)</sup>	d259	301457	610642
7	Aug-08	VT2	6	男	散発	d440	555047	303442

2), 3)は同一家族, 1)は別事例 ★島根県, その他6県の散発事例の株, 及び1県の集発事例の株と一致  
 \* IS-printing Systemの型別は, 昨年度近畿ブロックが実施していたコード変換法により表記した



M : 100bp ラダー, P : フォファージコントロール, St : Standard DNA  
 上段 : 1st IS-printing / 下段 : 2nd IS-printing

## 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 久保由美子 内田順子 藤川名伊子

### 研究要旨

香川県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 10 株について、PFGE 法と IS-printing System を実施し比較検討した。その結果、両法ともに 5 パターンに分類され、同等の識別能が得られた。IS-printing System は操作の簡便性、迅速性に優れていることから、集団感染発生時の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疫学解析法に広く用いられている PFGE 法とマルチプレックス PCR による腸管出血性大腸菌 O157 の検出法 IS-printing System について昨年に引き続き、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

#### 1. 供試菌株

平成 20 年度に香川県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の 10 株を検討対象とした。その内訳は、集団発生が疑われた 1 事例の 4 株、家族内発生 2 事例 4 株、散発 2 事例 2 株であった。

#### 2. 検査方法

##### 1) PFGE 法

制限酵素 Xba I を用い感染研ニュープロトコルに準じて実施した。

##### 2) IS-printing System

試薬キット添付のプロトコルに準じて実施した。判定法は、大阪府が実施している方法を用いた。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「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算して 12 桁の ISコードとした。

### C. 研究結果及び考察

供試菌株の概要を表 1、PFGE パターンを図 1、IS-printing System パターンを図 2、図 3 に示す。

菌株 No. 1～4 は集団感染株で感染研ニュープロ名 Type No. c 146 に分類された株であり PFGE

法、IS-printing System とともに同一パターンとなった。

菌株 No. 6 (感染研 Type No. d359), 7 (Type No. d138) と No. 8 (Type No. d138), 9 (Type No. d138) は家族内発生例であるが、今回の PFGE 法では No. 6, 7, 8 は同一のパターンを示し No. 9 はそれらと異なったパターンを示した。感染研の結果と異なったが、IS-printing System でも PFGE 法と同様な結果であった。

10 株を用いて検討した結果、PFGE 法 5 パターン、IS-printing System でも 5 パターンに分類され、両方の識別能は同等であった。

従来の PFGE 法では解析結果を得るまでに 3 日以上を要していたが、IS-printing System では 1 日で判定でき、簡便性、迅速性に優れている。しかし、昨年同様 2mm 程度の集落を用いたが図 2、3 に見られるように、DNA 量に差がで判定しにくいパターンが見られた。また、増幅の弱いバンドを陽性とするかどうかの判定が困難な場合もあった。

### D. 結論

香川県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 10 株について、PFGE 法と IS-printing System の比較検討し、両法ともに同等の識別能が得られた。

今後、DNA 量、増幅の弱いバンドの判定基準など検討を要するが、IS-printing System は、操作の簡便性、迅速性に優れており集団感染発生時の疫学解析の手法として有用であることが示唆された。

表1 供試菌株

	血清型	毒素型	発生状況	香川県 PFGE 法	感染研 Type No.	IS-コード	
						1st	2st
1	O157:H7	Stx1+2	同一学校 (患者)	A	c 146	5 1 6 4 7 7	6 1 1 7 5 7
2	O157:H7	Stx1+2	同上	A	c 146	5 1 6 4 7 7	6 1 1 7 5 7
3	O157:H7	Stx1+2	同上	A	c 146	5 1 6 4 7 7	6 1 1 7 5 7
4	O157:H7	Stx1+2	同上	A	c 146	5 1 6 4 7 7	6 1 1 7 5 7
5	O157:H7	Stx1+2	散发例	B	c 293	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 7
6	O157:H7	Stx1+2	家族内 (患者)	C	d 359	3 1 7 5 7 5	6 1 1 7 5 7
7	O157:H7	Stx1+2	同上	C	d 138	3 1 7 5 7 5	6 1 1 7 5 7
8	O157:H7	Stx1+2	家族内 (患者)	C	d 138	3 1 7 5 7 5	6 1 1 7 5 7
9	O157:H7	Stx1+2	家族内 (無症状)	D	d 138	1 1 7 5 7 5	6 1 1 7 5 5
10	O157:H7	Stx1+2	散发例	E	d 354	0 1 2 0 5 7	2 1 5 4 4 3

M 1-----5 M 6-----10 M



図1 PFGE 泳動像

M : 100bp DNA Ladder

P : Template Mix

ST : Standard DNA

M P ST 1-----5 ST 6-----10 ST P M

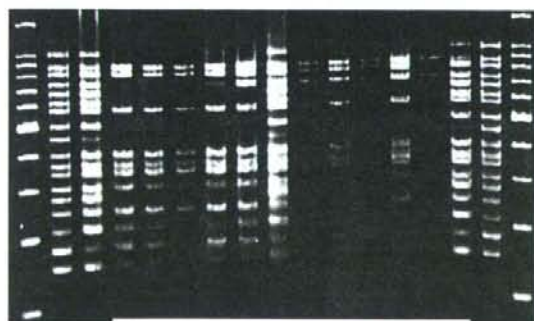


図2 IS-printing 1st 泳動像

M P ST 1-----5 ST 6-----10 ST P M

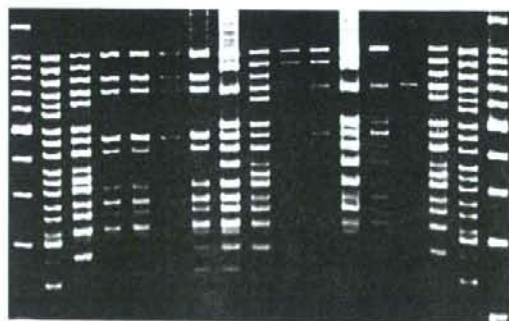


図3 IS-printing 2st 泳動像

## 研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 (EHEC O157) 24 株について、PFGE 法と IS-printing System について比較検討を行った。IS-printing System の型別では、判定結果をコード化することにより、容易に菌株間の比較を行うことが出来た。15 事例 24 株では、一部の株に 2 つの方法で異なる結果となるものもあったが、PFGE 法で 9 タイプに、IS-printing System でも 9 タイプに分類された。IS-printing System は EHEC O157 型別法として簡便で迅速性に優れ、スクリーニングに有用であると思われる。

### A 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学的解析法として、現在広く用いられている制限酵素による DNA 切断パターンを比較するパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) と、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 法による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法 (IS-printing System) と比較し、その有用性を検討した。

### B 研究方法

#### 1 供試菌株

平成 20 年に愛媛県内で発生した 14 事例の患者および無症状保菌者から分離した 23 株と岡山県内で発生し、その後愛媛県内で陰性確認を行った患者から分離した 1 株、計 15 事例 24 株を用いた。

#### 2 検査方法

##### ・ IS-Printing system

試薬キット IS-printing System (東洋紡) を使い、添付のプロトコールに準じて行ったが、泳動時間については 60 分とした (図 1)。電気泳動像から、1st primer set 18 種、2nd primer set 18 種の各プライマーに対する増幅生成物の有無を肉眼で確認後、有した場合を 1、無い場合を 0、として数値表記した後、昨年度の本研究において近畿ブロックが実施した手法、すなわち、増幅サイズの大きいバンド

から順に 3 バンドごと割り当てた「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st set, 2nd set の順に 12 桁で表示する方法に準じてコード化した。

##### ・ 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 を使い、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 サブタイプ名が付与された。

### C 研究結果と考察

IS-printing System の泳動像を図 2 に示し、その泳動像による判定結果を表 1 に示した。キットに添付されていた 1st Template set および 2nd Template set はポジティブコントロールとしてともに 18 本に分離でき、良好な泳動像を得ることが出来た。また、Standard DNA を泳動時に使用することにより、バンドの位置を的確に確認することが可能であった。今回 Template DNA を調整する際、1mm 程度のコロニーを用いた。この菌量を一定の適量に保つことで良好な泳動像を得られると思われた。また、当所では泳動槽としてミュービッドを使用している。キットに添付されている loading buffer を使用し、添付文書のとおり青色色素をゲルの末端まで泳動した場合、泳動距離が短くバンドの分離が悪いため 60 分間泳



動を行った。さらにバンドの判定が困難であったものについては、再度 70 分間泳動を行った。時間を調整することによってバンドの判定が可能になるが、泳動状況を把握するためにも他の最適な loading buffer を選定する必要があると思われる。

平成 20 年に愛媛県内および岡山県で発生した 15 事例 24 株の EHEC O157 は 1st primer set では 9 から 15 本、2nd primer set では 8 から 12 本の増幅がみられた (表 1)。*eaeA* および *hlyA* はすべての株で増幅が見られた。23 株は RPLA による毒素型と一致したが、VT1VT2 陽性株のうち 1 株は *stx2* で増幅がみられなかった。

PFGE の泳動像を図 3 に示す。また、PFGE のサブタイプ名 (type No.) を菌株情報および、IS-printing System のバンドの判定結果から得られた IS コードとともに表 2 に示した。今回供試した菌株は PFGE で 9 種類のサブタイプに型別された。IS コードでも 9 種類に型別されたが、その内容は少し異なっていた。

事例 1～5 は 4 月に愛媛県内各地で発生した事例であったが、事例 4 の保育園児以外は牛レバーの喫食歴があり、同一の PFGE 型を示したことから感染源が同じである可能性が示唆された事例であった。また、IS コードでも事例 4 以外は同じパターンを示した。事例 4 については 3 株のうち 2 株が別のパターンを示したが 1 バンドの違いであり、菌株 7 については VT1VT2 産生株であるにもかかわらず *stx2* が確認出来なかった。

家族内発生の事例 10、事例 13 ではそれぞれ PFGE 型・IS コードともに一致していた。

事例 11 の 2 名は同一グループでの感染でそのうち一人は無症状保菌者であった。PFGE では 2 バンドの違いがあったが、IS コードは同一であった。

一方、散发例の、事例 7・8・9 および事例 12・14 はそれぞれ PFGE 型も IS コードも一致していた。各事例間で共通の感染源が見出せなかったものの同一の菌である可能性が示唆され、事例間の関連性が考えられた。また、事例 7・

8・9 と家族内発生事例 13 は異なった PFGE 型であったが、IS コードは一致していた。

以上の結果から、IS-printing System は PFGE 法の型別と若干の違いが生じたものの、ほぼ同等の識別能力を有していると思われる。さらに、IS-printing System は試薬の調整が簡便であり、迅速性にも優れていることからスクリーニングとして有用であると思われる。

#### D 結論

腸管出血性大腸菌 O157 24 株について、IS-printing System を用いて型別し、PFGE 型別と比較・検討した。その結果、若干の違いはあるもののほぼ同等の識別能力を有していることが確認できた。また、IS-printing System の結果をコード化することによりさらに判定が容易となった。今後、diffuse outbreak の発生が疑われるような場合、迅速な分子疫学的解析方法として IS-printing System の利用が期待できると思われる。

#### E 研究発表

なし

反応液の調製

DDW	19 $\mu$ l
Primer Mix(1st or 2nd)	5 $\mu$ l
2 $\times$ IS-P Master Mix	25 $\mu$ l
Template DNA*	1 $\mu$ l
Total volume	50 $\mu$ l

増幅

96 $^{\circ}$ C	2min	} 20cycles
熱変性 96 $^{\circ}$ C	20sec	
アニーリング 64 $^{\circ}$ C	30sec	
伸長 68 $^{\circ}$ C	1min	

検出

3%アガロース電気泳動(NuSieveGTG:SeaKem GTG 2:1)  
 PCR産物と同時にStandard DNAを泳動  
 EtBr染色 20min DDW脱色

判定

増幅バンドの有無を「あり=1」「なし=0」とし、Excel形式に表示後コード化

図1 IS-printing System プロトコル

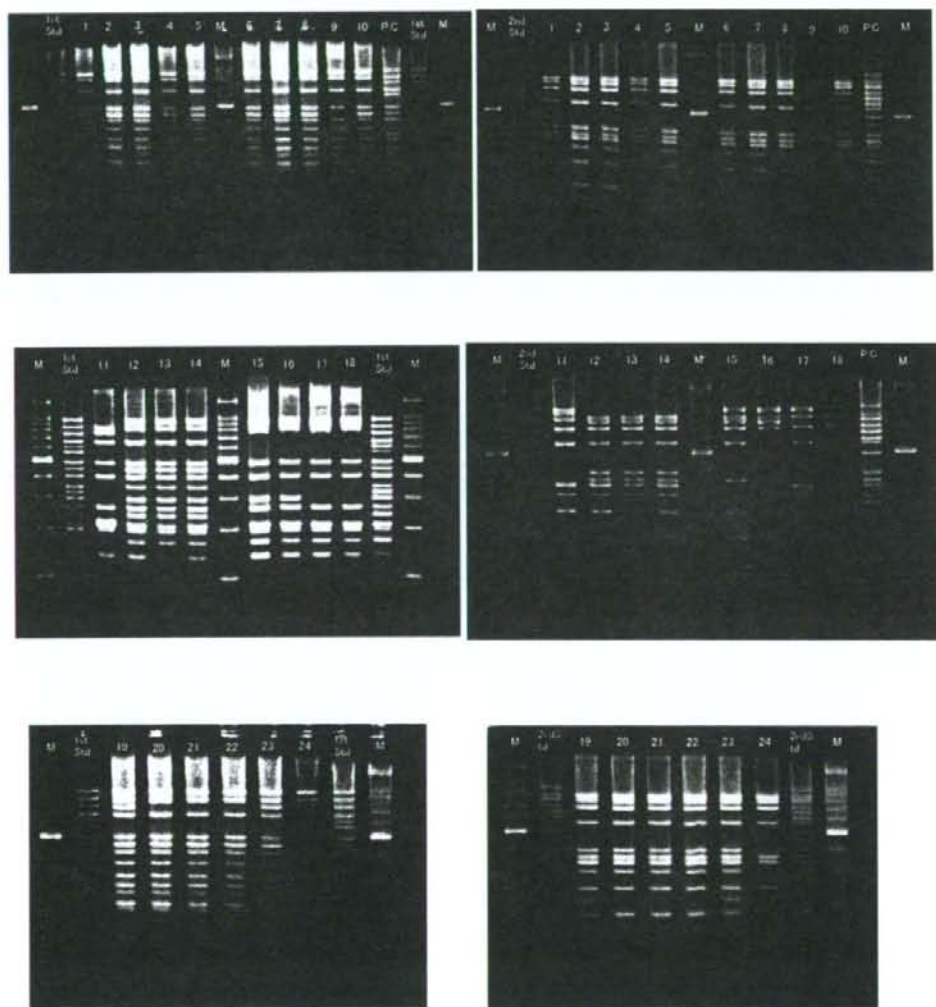


図2 IS-printing system の電気泳動像(左:1st set primer 右:2nd set primer)



図3 PFGE法泳動画像 (M: *Salmonella* Braenderup 1~24: 菌株 No.1~24)

表1 IS-printing system 判定結果

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	ese	1-16	HyA	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	stz1	stz2	stz3
Size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	987	861	801	710	642	599	555	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151		
Strain 1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Strain 2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 4	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 6	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 7	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Strain 8	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 9	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 10	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 11	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Strain 12	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 13	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 14	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 15	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 16	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 17	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 18	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 19	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 20	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 21	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 22	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 23	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Strain 24	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

表2 PFGE法とIS-Printing System法の比較

事例 No.	菌株 No.	発症日	患者住所	年齢	性別	血清型	毒素型	PFGE Type	No.(コメント)	ISコード	型別	耐性薬剤	発生状況
1	1	2008/4/5	今治市	58	男	O157:H7	VT1&2	d17		317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	家族内
	2	2008/4/7	今治市	25	男	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	
2	3	2008/4/6	北宇和郡	16	女	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	同一グループ
	4	2008/4/11*	北宇和郡	46	女	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	
	5	2008/4/11*	北宇和郡	56	男	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	
3	6	2008/4/18	宇和島市	47	女	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	散発
	7	2008/4/25	今治市	3	男	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611755	B	ABPC,AMPC/CVA	
4	8	2008/4/25	今治市	3	女	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	同一保育園
	9	2008/4/25	今治市	3	女	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	315577 - 611757	C	ABPC,AMPC/CVA	
5	10	2008/4/26	今治市	22	男	O157:H7	VT1&2	d17	菌株No.1と同じ	317577 - 611757	A	ABPC,AMPC/CVA	散発
	6	2008/5/13	今治市	56	女	O157:H-	VT1&2	d71		615055 - 311456	D	ABPC,AMPC/CVA	
7	12	2008/6/8	松山市	24	女	O157:H7	VT1&2	d73		317577 - 611756	E	ABPC,AMPC/CVA	散発
	8	2008/6/15	松山市	24	男	O157:H7	VT1&2	d73		317577 - 611756	E	ABPC,AMPC/CVA	
9	14	2008/6/16	松山市	33	女	O157:H7	VT1&2	d73		317577 - 611756	E	ABPC,AMPC/CVA	散発
	15	2008/7/4	松山市	2	女	O157:H7	VT2	d224		305457 - 711242	F	ABPC,SM AMPC/CVA,SXT	
10	16	2008/7/6	松山市	25	女	O157:H7	VT2	d224	菌株No.15と同じ	305457 - 711242	F	ABPC,SM, AMPC/CVA,SXT	家族内
	17	2008/7/7	松山市	34	女	O157:H7	VT1&2	d277		305057 - 311457	G	ABPC,SM AMPC/CVA,SXT	
11	18	2008/7/18*	松山市	33	男	O157:H7	VT1&2	d278	菌株No.17とサブタイプ違い	305057 - 311457	G	ABPC,AMPC/CVA	同一グループ
	19	2008/7/27	宇和島市	29	女	O157:H7	VT1&2	c-405		717577 - 611757	H	ABPC,AMPC/CVA	
12	20	2008/7/31	今治市	1	女	O157:H7	VT1&2	d148		317577 - 611756	E	ABPC,AMPC/CVA	家族内
	21	2008/8/9	今治市	5	女	O157:H7	VT1&2	d148	菌株No.20と同じ	317577 - 611756	E	ABPC,AMPC/CVA	
13	22	2008/8/9*	今治市	35	女	O157:H7	VT1&2	d148	菌株No.20と同じ	317577 - 611756	E	ABPC,AMPC/CVA	同一グループ
	23	2008/8/15	宇和島市	11	男	O157:H7	VT1&2	c-405	菌株No.19と同じ	717577 - 611757	H	ABPC,AMPC/CVA	
14	24	2008/6/12	岡山県	23	女	O157:H7	VT2	d70		305457 - 611642	I	ABPC,AMPC/CVA	散発(県外での発生)
	25	2008/6/12	岡山県	23	女	O157:H7	VT2	d70		305457 - 611642	I	ABPC,AMPC/CVA	

\* 検体採取日(無症状保菌者)

# 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 平松佐徳 藤戸亜紀 千屋誠造

表1 使用菌株の詳細

No.	血清型	stx型	性別	年齢	Type No. (感染研)	備考
1	O157:H7	2	男	1	a723	2005年分離株
2	O157:H7	2	男	60	a723	1の家族
3	O157:H7	2	女	56	a723	1の家族
4	O157:H7	2	女	37	d108	2008年分離株
5	O157:H7	2	女	73	c47	4の家族

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌O157による diffuse outbreak を把握することを目的として行われている pulsed field gel electrophoresis

(PFGE) 法による解析は、解析結果を得られるまでに3日以上を要するうえに、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、簡便・迅速に菌株の解析が行える方法として宮崎大学 林教授のグループにより開発された IS-printing System を用いて、昨年度に引き続き、当県で分離された腸管出血性 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 17 年 11 月に 1 家族 3 名から分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 3 株及び平成 20 年 7 月に 1 家族 2 名から分離された 2 株を用いた (表 1)。

## 2 検査方法

### (1) IS-printing System

試薬キット IS-printing System (東洋紡績(株)) 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 19 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、Finger-Printing による系統樹解析のデンドログラムを図 3 に示した。今回の検討では IS-printing System, PFGE はともに No. 1 ~ 3 及び No. 4, 5 の家族内でそれぞれ同じパターンを示し、解析能の違いはみられなかった。

IS-printing System は PFGE 法と異なり、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、初めて検査を実施する者でも今回のような結果を得ることができた。

このことから IS-printing System は PFGE 法を実施する前のスクリーニングとして有効な方法であると考えられる。

しかし、今回も供試菌が 5 株と少なく十分な比較検討ができていないため、株数を増やしてさらなる検討が必要であること、またバンドの有無を正確に判定するためには泳動時間等の条件の再検討が必要であると思われる。

表2 IS-printing System 判定結果

1 <sup>st</sup> 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	eee	1-16	hlyA
Size (bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1

2 <sup>nd</sup> 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	
1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	
2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	
3	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	
4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	

\*バンドあり→1, バンドなし→0

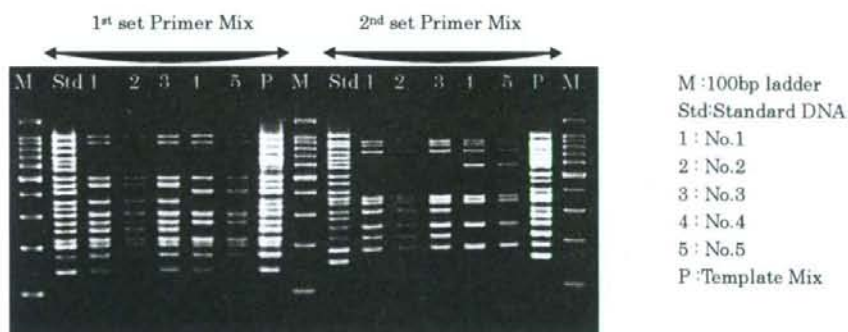


図1 IS-printing System 泳動画像

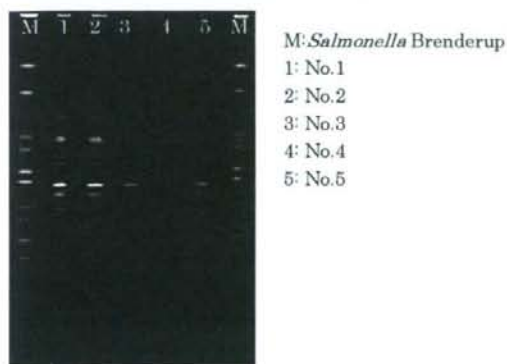


図2 PFGE 泳動画像

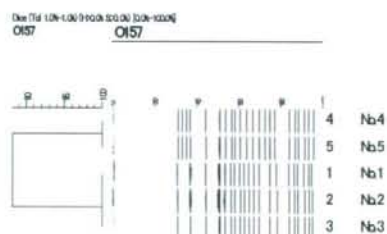


図3 デンドログラム

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 3

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

研究分担者	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	尾崎延芳	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
	西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
	右田雄二	長崎県環境保健研究センター
	江原裕子	長崎市保健環境試験所
	松本一俊	熊本県保健環境科学研究所
	岩永貴代	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
	大岡 唯祐 <sup>1</sup> 、林 哲也 <sup>1,2</sup>	宮崎大学 <sup>1</sup> 医学部、 <sup>2</sup> フロンティア
	楠本 正博	動物衛生研究所・安全性研究チーム
	江藤良樹、中村祥子	福岡県保健環境研究所
	濱崎光宏、小野塚大介、 村上光一、竹中 重幸	

研究要旨 九州地区 12 地方衛生研究所の参加により、平成 20 度は 1) IS-printing System に関する基礎的研究、2) 研修(新規遺伝子解析法:大腸菌の病原性因子の検査とその解析法)、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い、IS-printing system Ver.1 は改良され Ver.2 が作製された。IS-printing system Ver.2 を用いた平成 19 年度の結果から、いくつかの問題点が見いだされた。平成 20 年度は、その問題点の解明並びに各地研で分離された O157 について IS-printing system Ver.2 による解析を行い、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 年度及び 19 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 IS-printing System Ver.1 は、Ver.2 に改良された。平成 19 年度はこれを用いて、九州ブロックで解析したが、使用上の問題点があることが分かった。そこで、平成 20 年度はその問題解決を図ると共に平成 19 年に引き続き解析事例数を増やし、その有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 菌株

#### 1) 平成 19 年度の課題株

平成 19 年度に解析し、*eae* と *hlyA* が検出されない株(表 1)について宮崎大学にて再検討を行った。また、各地研においても再度検討を行った。

表 1. *eaeA*、*hlyA* が検出されない株

地研	Type No.	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>
12	a122	-	-
12	a122	+	+
12	a122	-	+
5	a259	-	-
12	a259	-	-
7	a259	+	+
5	a535	-	-
12	c116	-	-
12	c19	-	-
2	c195	-	-
7	c213	-	-
5	c52	-	-
3	c52	+	+
5	c785	-	-
5	c787	-	-

#### 2) 九州地区分離株の解析

各地研で保存され、感染症研究所へ送付し PFGE Type が判明している 237 株の O157 を対象とした。

## 2. IS-printing System

平成 18 年度検討課題として挙げた 5 項目について、改良された IS-printing System Ver.2 を用いた。

### 1) 機器・機材

PCR 機器は、ABI GeneAmp 9700 が 4、同 9600 が 1、同 2700 が 1、同 2720 が 1、BIO-RAD iCycler が 2、ASTECC PC320 が 2 および TaKaRa TP-400 が 1 地研であった。泳動槽は ADVANCE 社の Mupid シリーズが 9、Elechom 社、WARNING 社、東洋紡が各 1 地研であった。画像の取り込みは、写真をスキャナーで取り込んでいる地研が 4 で、ゲルから直接の取り込みは、BIO-RAD 社が 4、BioImage 社が 2、東洋紡とフナコシが各 1 地研であった(表 2)。

### 2) 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 7 種類で地研により異なっていた(表 3)。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。

表 3. Template DNA の作製

地研 番号	Temperate DNA		
	培地名	コロニー数	培養時間
1	LB寒天	大1	20h
2	HI寒天	大1	20h
3	普通寒天	大1	18h
4	CT-SM	1mm	18h
5	TSA寒天	1mm1	18h
6	普通寒天	大1	20h
7	クロモアガー-O157	大1	20h
8	TSA寒天	小1	20h
9	普通寒天培地	1mm 1コロニー	18h
10	普通寒天	1mm1個	24h
11	BHI寒天	1mm 1コロニー	18h
12	普通寒天	大1	20h

### 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

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、すべてキット添付品を用いた(表4)。

### 4) 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。

### 7. 解析

解析方法は、近似度計算はMatching法を用いた。

## C. 結果

### 1. 平成19年度課題株について

宮崎大学でIS-printing System Ver.2のキットを用いて2回検定した結果、全ての株で*eae*および*hlyA*は陽性となった。また、論文等でよく用いられる*eae*のuniversal primer (SK1/SK2)においても同様に全ての株で陽性を示した。さらに、数株について*eae*検出primer周辺部の配列決定を行った結果、得られた配列はprimer設計に用いたO157堺株と全く同じ配列であることが分かった。このことから、*eae*および*hlyA*が陰性であった結果は、PCRエラーによるものである可能性が高いと考えられた(図1)。

そこで、これらの株について各地研で再度確認を行った。その結果、すべて*eae*および*hlyA*は陽性であった(図2-1, 2-2, 2-3)。地研7と地研12では、平成20年度に使用したPCRマシンの昨年とは異なっていた。また、地研2と地研5は、PCRマシンがともにBIO-RAD社

のiCyclerであるが、実験者がともに昨年とは異なっていた。今後検討が必要であると考えられた。

### 2. 九州地区分離株の解析

解析を行った237株中18株(地研9)は、*eae*、*hlyA*が陰性であったため、18株を除いた219株について比較検討を行った。その結果、IS-printingが74タイプ、PFGEが140タイプに分類された(図3)。PFGEの分類は、IS-printingの分類の約2倍であった。

PFGE-Typeが同じでIS-printingのIDが異なる株は、4グループあった(表5)。PFGE-Type b423は地研3と地研7の各1株で2nd primer no.9が、PFGE-Type d599は地研10の2株で1st primer no.1の各1箇所が異なっていた。PFGE-Type d121は地研3と地研7の各1株で1st primer no.3と2nd primer no.11の2箇所が、PFGE-Type d524は地研1の3株と地研3および地研4の各1株の計5株で2nd primer no.6とno.7の2箇所が異なっていた。地研10を除く3グループは、相互はいずれも隣接した県であった。

IS-printing System IDコードが同一でPFGE-Typeが異なる菌株群は、31グループあった(表6-1, 6-2)。31グループ中18グループはVT1+2産生株、13グループはVT2単独であった。各グループ内での菌株間の関連性を見ると同一県、同一市である場合が殆どである。さらに同一家族や同一保育所で、互いに関連株であることが明白な事例が多い。3地研以上のグループはVT1+2のグループでは6グループ、VT2のグループでは2グループあり、これらはdiffused outbreakが示唆された。

## D. 考察

平成19年度、IS-printing System Ver2で一部

*eae*, *hlyA* が検出できない株があり、これらについて宮崎大学にて確認検査を行った。その結果、いずれも両遺伝子が検出され、問題のある菌株ではないことが判明し、PCR エラーによるものであることが示唆された。一方で、当該地研で再度 PCR 反応を行い、確認実験を行った。これらの株はいずれも両遺伝子共に陽性であった。4 地研のうち 2 地研は昨年度とは異なる PCR マシンを使用しており、このことが両遺伝子を検出できるようになった要因とも考えられた。しかし、他 2 地研については実験者が異なる以外に昨年と異なる点はなかった。いずれにしても IS-printing System による解析は、PCR 反応の確実性を担保することが前提となるため、PCR マシンの保守点検は勿論のこと PCR 反応毎の精度管理が必要である。特にスタンダード DNA で増幅が正確に行われていることを確認することは第一義である。今回の事例からも、*eae*, *hlyA* 遺伝子が検出できることを指標に PCR 反応を評価することは有用であると考えられる。また、正確にバンド認識をするためには PFGE と同様に泳動時に 100 bp ラダー、スタンダード DNA を等間隔に入れて泳動することを遵守しなければならない。マニュアルに定められた方法によることがより重要である。

IS-printing System の ID コード数は PFGE Type 数の約 3 分の 2 から半分で、識別能力は劣るが、疫学情報との相関性が良く、現場で発生している事例の大枠を把握するには有用であると考えられる。diffused outbreak を探知するためには、解析項目に発生年月日を入れることにより、さらに現状を把握することができる。

一方、O157 は変化しやすいため、PFGE 同様に、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ることに留意しなければ

ならない。特に菌株の取り扱いについては、注意が必要である。

#### E. 結論

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。但し、他の検査同様、機器および試薬の管理は厳しく行わなければならない。標準作業書を作成し、特に PCR マシンの精度管理を徹底することにより、細菌学的な疫学情報源としての正確性が担保される。

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、「パルスフィールドゲル電気泳動と IS-printing の結果が一致しない腸管出血性大腸菌 O157 についての解析」、第 29 回日本食品微生物学会学術総会 (2008.11.12-13)。

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、「福岡県内の食品取扱い従事者から分離された志賀毒素産生性大腸菌の性状」、第 29 回日本食品微生物学会学術総会 (2008.11.12-13)。

表2 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		泳動時間
	メーカー	型式	メーカー	型式	メーカー	型式	
1	TaKaRa	TP-400	コスモバイオ	Mupid-2	POLAROID	MP-4	60分
2	BIO-RAD	iCycler	Elchom	SEA 2000	BIO-RAD	Gel Doc EQ	125分
3	ASTEC	PC 320	ADVANCE	Mupid	BIO-RAD	Gel Doc 2000	70分
4	ABI	GeneAmp 9700	WARNING	MG 105	BIO-RAD	Gel Doc XR	70分
5	BIO-RAD	iCycler	ADVANCE	Mupid	POLAROID	MP-4	70分
6	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	TOYOBO	FAS-III	60分
7	ASTEC	PC320	ADVANCE	Mupid-α	BIO-RAD	Gel Doc XR	約60分
8	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid-2plus	Biolmage	Gel Print 2000i	約60分
9	ABI	GeneAmp 2700	東洋紡	GelMate2000	POLAROID	MP-4	87分
10	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	Biolmage	Gel Print 2000i	60分
11	ABI	2720 Thermal Cycler	ADVANCE	Mupid/Mupid-2plus	EPSON	GT-8400UF	68-72分
12	ABI	GeneAmp 9600	ADVANCE	Mupid-Ace	フナコシ	BIO DOC IT SYSTEM	100分

表4 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	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	日本ジーン	318-90041	×10	TaKaRa	3407A	TOYOBO ISキット添付のもの
2	invitrogen	15581-044	×10	Promega	G829B	-
3	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	SIGMA	T4415-1L	×10	-	-	TOYOBO キット添付のもの
5	bio-rad	161-0733	×10	BIONEXUS	BN2050	TOYOBO ISキット添付のもの
6	BIO-RAD	161-0733	×10	TaKaRa	3407A	TOYOBO ISキット添付のもの
7	日本ジーン	318-90041	×0.5	TOYOBO	DNA-130	TOYOBO ISキット添付のもの
8	日本ジーン	313-90035	TAEを使用	Amersham	274007D	TOYOBO ISキット添付のもの
9	TaKaRa	T905	×0.5	東洋紡(送付分)		
10	日本ジーン	318-90041	0.5×TBE	TaKaRa	3407A	TOYOBO ISキット添付のもの
11	日本ジーン	318-90041	×10	TaKaRa	3407A	TOYOBO ISキット添付のもの
12	BIO RAD	161-0733	×10	TOYOBO	DNA-030X	同左付属品

表5. PFGE -Type が同じで IS-printing の ID が異なるグループ

Name	10進数コード	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	PFGE VT-type	
3 08018	30671622280	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	b423
7 8009	30604513416	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	b423
10 MKE8	66456318921	1	0	0	1	0	0	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	1	1	1	1	d599
10 MKE12	65382577096	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	d599
3 08019	66055822287	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	d121	
7 8002	66324257739	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	d121	
1 08E106	66448980939	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	d524	
1 08E111	66448980939	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	d524	
1 08E112	66448980939	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	d524	
3 08092	66457369547	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	d524	
4 815	66457369547	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	d524	