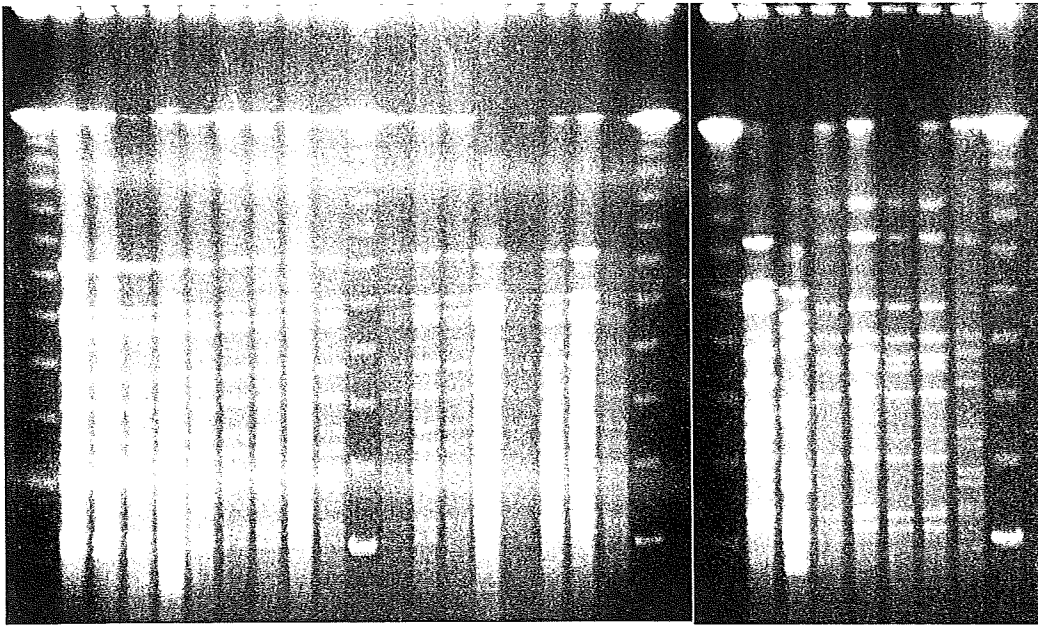


表1 性状試験、Penner 型別、PFGE

PFGE	Penner	Motility	Indoxyl acetate hydrolysis	Hippurate hydrolysis	Resistance to Cephalothin	Resistance to Nalidixic acid	Growth at 25°C (microaerobic)	Growth at 42°C (microaerobic)	Growth in air	Catalase	Oxidase	Patient No.
Ca08A	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-1
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-2
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-3
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-4
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-5
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-6
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-7
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-8
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-9
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-10
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	1-11
Ca08A	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-1
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-2
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-3
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-4
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-5
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-6
	O	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	2-7
Ca08B	F	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	3-1
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	3-2
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	3-3
	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	+	3-4
Ca08C	C	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	4-1	
Ca08D	UT	CS	+	+	R	S	-	+	-	+	5-1	



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

図1 各菌株の PFGE 像

1、11、20、21、29 : Size Marker (Lambda ladder) 、2~10、12 : 事例1、13~19、22 : 事例2、23 : 事例4、24~27 : 事例3、28 : 事例5

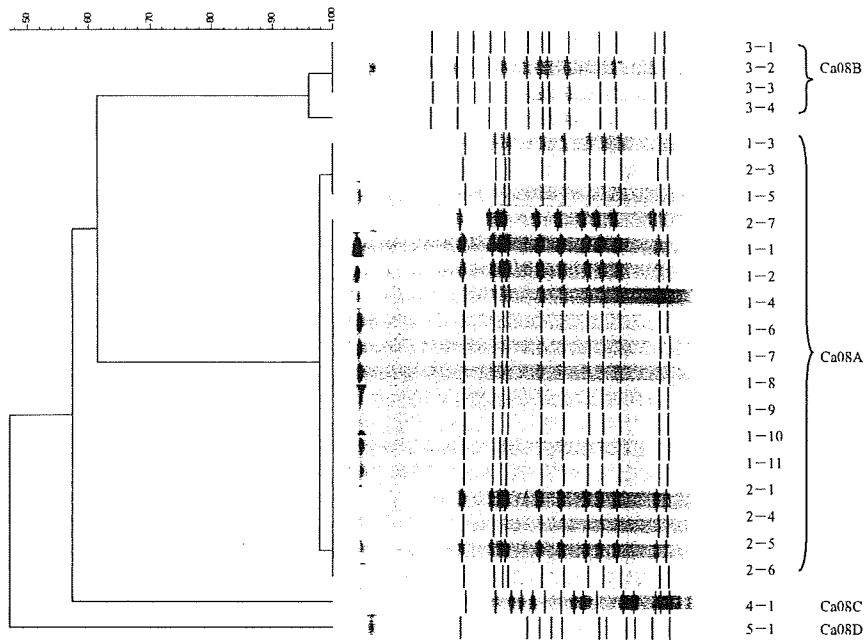


図2 デンドログラム

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」

平成 21 年度 研究分担報告書

関東ブロックにおける PFGE 法の精度管理および菌株の  
解析方法の検討

研究分担者	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
研究協力者	永田 紀子	茨城県衛生研究所
	内藤 秀樹	栃木県保健環境センター
	黒澤 肇	群馬県衛生環境研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	横山 栄二	千葉県衛生研究所
	石原ともえ	神奈川県衛生研究所
	松本 裕子	横浜市衛生研究所
	大沼 正行	山梨県衛生公害研究所
	笠原ひとみ	長野県環境保全研究所
	廣井みどり	静岡県環境衛生科学研究所
	尾畑 浩魅	東京都健康安全研究センター
	小西 典子	東京都健康安全研究センター

研究要旨：腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 5 株を用いて、11 ヶ所の地方衛生研究所でほぼ同じ条件下で PFGE 解析を行い、その成績を解析ソフトで解析した結果、菌株ごとにクラスターを形成していたが、相同性が低い施設もあった。その原因として、電気泳動したゲルの写真の解像度や染色方法に問題がある事が判明した。泳動用ブロックの作製方法や泳動条件についてはほぼ標準化されたので、今後は染色方法や写真の取り込み方等の統一を図っていく予定である。

IS-printing system 解析法（IS 法）は PFGE 成績とも非常に良く相関し、有用な方法であることが確認された。しかし、ほぼ同じ PFGE パターンを示す「流行株」が、4 種類の IS パターンに分類された。この菌株の PFGE パターンをみると 170Kb 付近のバンドが太い株と細い株があり、この差が IS パターンに反映されたものと推定された。今後、さらに精査が必要である。

焼肉チェーン店で発生した食中毒事例では、患者由来株や食品由来株の PFGE パターンを関係自治体に迅速に送付し、情報の共有化を図ったことで効率良く行政対応が図れた。

## A. 研究目的

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法は、腸管出血性大腸菌 O157 やサルモネラ等の集団発生や Diffuse outbreak (散在的集団発生) の感染源究明に利用されており、その有用性が確認されている。腸管出血性大腸菌等による Diffuse outbreak が起きた場合、感染源を迅速に特定し、拡大を防止するための策を早急に講じなければならない。そのためには、分離菌株の迅速で正確な分子疫学的解析が必要であり、各地方衛生研究所で行う PFGE 解析法の技術レベルを常に一定に保つことが必要である。

本研究では、関東ブロック 11 地方衛生研究所を対象に、PFGE 法の技術向上のための精度管理を行った。また、新しい手法である IS-printing system 解析法 (IS 法) を実施し、その有用性および PFGE パターンとの相関性等について検討した。

更に関東ブロックでは、比較的長期間、広域に出現している特定の PFGE パターンを示す株 (流行株) を決め、各地研での発生状況をまとめている。今回は「流行株」を簡単にスクリーニングできる PCR プライマーを開発し、分離株について検証を行った。

## B. 研究方法

### 1. PFGE 法技術向上のための精度管理

#### 1) 供試菌株

各地研で PFGE 解析をするための共通菌株として、2009 年に分離された腸管出血性大腸菌 O157 5 株 (VT1+VT2

産生株 3 株、および VT2 産生株 2 株) を供試した。

#### 2) PFGE 解析

感染研プロトコールにより行った。

アガロースブロックの作製：0.7m プラグキャストを使用し、SeaKem Gold Agarose (TAKARA, 1%) で作製した。使用する菌の濃度は各施設の方法で行った。

DNA 抽出法：1mg/ml Proteinase K, 1%N-lauroylsarcosine in 0.5M EDTA (pH8.0) で 50°C, 18~20 時間行った。

制限酵素処理：制限酵素 *Xba* I で処理した。

電気泳動用アガロース：電気泳動用アガロースは SeaKem Gold Agarose (1%) を使用した。

泳動条件：6V/cm, 2.2sec~54.2sec, 20 時間, buffer 温度 12°C で行った。泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの下から 1 cm~1.5 cm になるように、各施設で調整した。

サイズマーカー：*S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したものを用いた。

PFGE 写真の撮影：各地研で通常おこなっている方法で撮影した。

PFGE 解析成績の電送：各地研で解析した PFGE 画像を電子メールで送付した。

3) 画像解析：11 施設から送付された PFGE 画像を対象に、画像解析ソフト Fingerprinting II (BIO-RAD 社) を用いてデンドログラム解析を行った。

## 2. IS-printing system 解析

### 1) IS-printing system 解析と PFGE パターンの相関性の比較

2009年に東京内で発生した食中毒2事例から分離された0157および2009年に分離された「流行株」合計28株についてIS解析を行い、PFGEパターンと比較した。

### 2) IS 法解析結果の比較方法の検討

IS法はプライマーセット1で18カ所、プライマーセット2で18カ所を増幅させ、出現したバンドのパターンを比較することで、菌株間の相同性を推定する方法である。バンドが有る場合を「1」、バンドが無い場合を「0」として判定した後、「0」および「1」の並びを2進法と想定し、その値を10進法に変換して比較した。

## 3. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例への応用

東京都を中心とした複数自治体で発生した0157による食中毒事例で、PFGE解析が有効に活用された事例について報告する。

## 4. 特定の PFGE パターンを示す株（流行株）を迅速にスクリーニングするためのPCR用プライマーの開発および分離状況

千葉県衛生研究所で実施した。その概要は別紙のとおりである。

## C. 研究結果

### 1. PFGE 法技術向上のための精度管理

腸管出血性大腸菌0157の共通菌株5株を用いて、11施設（施設1～11）で行ったPFGE画像を写真1に示した。写真の取り込みは、各地研で通常行っている方法で行った。そのため画像が粗くバンドを選ぶことが困難な施設があった（施設2,8）。また染色が薄いためか、バンドが非常に薄く読み込むのに苦労した施設（施設9）、染色の影響が写真全体が白っぽく、バンドと背景のコントラストに差がない写真があり、バンドを選ぶのに非常に苦労した。

各地研で菌株5株を各2箇所のレーンで泳動した写真を電送してもらい、電送されたPFGE画像をもとにデンドログラム解析を行った。11施設中8施設では、同一写真内の同一菌株は100%一致であった（図1）。100%一致とならなかった菌株も90%以上の相同性であった（図2）。

次に同一菌株について施設間での比較を行った。その結果、菌株ごとにクラスターを形成していた。菌株3では11施設中10施設が類似度100%を示した。残る1施設も類似度95%以内であり、高い相同性を示した。菌株5では8施設が、菌株1では7施設が100%一致であった。菌株2あるいは菌株4では、同じクラスター内に更に2つのグループを形成していた。施設によっては泳動像が全く異なっており、大きくはずれた菌株もあった（図3）。

## 2. IS-printing system 解析と PFGE パターンの相関性の比較

東京都で発生した食中毒事例由来株 13 株（事例 1：4 株，事例 2：9 株）および関東ブロックで比較的長期間、広域に検出される「流行株」10 株について PFGE 法と IS 法で解析した結果を表 1 に示した。IS 法の解析は前年度に行った方法に従い比較した。

事例 1 および 2 由来株は、全て PFGE パターンと IS 法で一致した。

流行株 10 株は同じ PFGE パターンを示していたが、IS 法では 4 タイプに分かれた。流行株の PFGE パターンをみると 170Kb 付近のバンドが太い株があり、この差が IS パターンに反映されたものと推定された。

## 3. 腸管出血性大腸菌集団食中毒事例への応用

2009 年 12 月～2010 年 1 月にかけて東京都を中心とした複数自治体で焼肉チェーン店を原因とした 0157 の Diffuse Outbreak が発生した。今回の事例では、複数の PFGE パターンを示す株が原因菌であったが、この PFGE 画像を関係自治体間で共有することによって、迅速に対応することができた。患者および食品から分離された 0157 の PFGE 解析を行った成績を写真 2 に示した。

### D. 考察

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株を各地研で PFGE 解析し、その成績を東京都健康安全研究センターに電送

後、解析ソフトを用いて解析を試みた。今年度は基本的なブロック作製方法の統一を行ったが、写真撮影は各施設が通常行っている方法で行った。デンドログラム解析の結果、同一写真内の同一菌株は類似度が 90～100% と高い相同性を示した。しかし、同じ菌株を異なる施設（異なる写真間）で比較した結果、類似度が 80% 程度と低くなってしまった施設もあった。すなわち、目視では明らかに同一の PFGE パターンを示しているにも関わらず、デンドログラム解析では 100% 一致とならない株があった。この原因としては、画像の読み込みを低い解像度で行っているため、画像が粗くなってしまいバンドの選択が困難であった、サンプルの菌量が多く太いバンドになってしまった、染色が薄くバンドが明瞭でない、あるいは染色し過ぎてバックグラウンドが上がってしまった等の理由が考えられた。また今回は写真の取り込み方法については統一した方法を示さなかったため、取り込んだ写真の大きさが施設ごとに異なっていたことも、低い類似度になってしまった理由であると考えられる。ブロックの作成方法や泳動条件については標準化されたので、今後は染色方法や写真の取り込み方等の統一を行う予定である。

今年度の関東ブロックは 11 施設中 4 施設で担当者の異動が認められた。PFGE 法は操作が複雑であるため、技術が伝承されにくいという欠点がある。常に技術力を一定に維持していくためには、定期的に精度管理を行ってい

くことが必要であると考えられた。

IS 解析と PFGE 解析とを比較した結果、PFGE パターンが明らかに異なっている場合は IS 解析でもパターンは異なっており、両者はよく相関していた。しかし、同じ PFGE パターンを示した株でも IS 法では複数種類のパターンを示すこともあった。流行株では 170Kb 付近のバンドが太い株があり、この差が IS パターンに反映されたものと推定された。今後他の制限酵素を用いて PFGE 解析を行う等、精査が必要である。

複数の自治体にまたがって発生した食中毒事例の場合、特に今回の事例のように複数の PFGE パターンの 0157 が原因となった場合は、迅速に関係自治体間で PFGE パターンの共有化を行うことが必要である。

#### E. 結論

腸管出血性大腸菌 0157 の共通菌株 5 株を用い各地研でほぼ同じ条件下で PFGE 解析を行い、その成績を解析ソフトで解析した結果、菌株ごとにクラスターを形成していたが、相同性が低くなってしまった施設もあった。今回、写真の取り込みについては、各地研で通常行っている方法で行った。そのため解像度が低くバンドを選ぶことが困難な施設があった。また染色が薄い場合や、逆に染めすぎてしまってバックグラウンドまで白くなっている場合もバンドの検出が困難であった。ブロックの作成方法や泳動条件についてはほぼ標準化されたので、今後は染

色方法や写真の取り込み方等の統一を図っていく予定である。

IS-printing system 解析法 (IS 法) は PFGE 成績とも非常に良く相関し、有用な方法であることが確認された。しかし同じ PFGE パターンを示す「流行株」では、4 種類の IS パターンに分類された。この菌株の PFGE パターンをみると 170Kb 付近のバンドが太い株と細い株があり、この差が IS パターンに反映されたものと推定された。今後、他の制限酵素を用いて PFGE 解析を行う等の精査が必要である。

今回の焼肉チェーン店利用者で発生した食中毒事例では、患者由来株や食品由来株の PFGE パターンを関係自治体に迅速に送付し、情報の共有化を図ったことで効率良く食中毒と決定することができた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

- 1) 東京都健康安全研究センター 微生物部食品微生物研究科：東京都内の 3 保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染事例、病原微生物検出情報(国立感染症研究所)，30, 5, 9-10, 2009
- 2) 横山栄二：腸管出血性大腸菌 O157 の分子系統学的解析，第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム，2009，大阪府
- 3) 倉園貴至，砂押克彦，大島まり子，

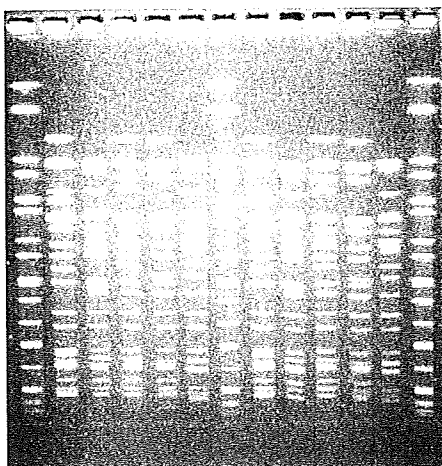
小野一晃，大塚佳代子，青木敦子，野口貴美子，中川俊夫：ステーキチェーン店での STEC O157 発生事例，第 22 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会，2010，前橋市

H. 知的所有権の取得状況  
なし

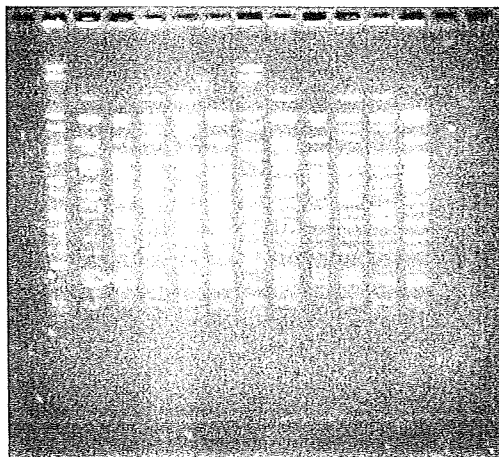


# 写真1 共通菌株5株のPFGE画像

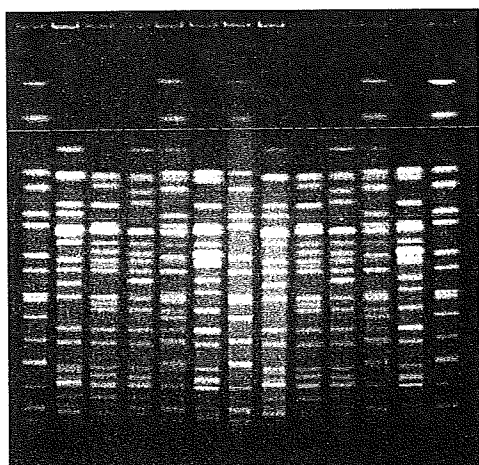
施設1



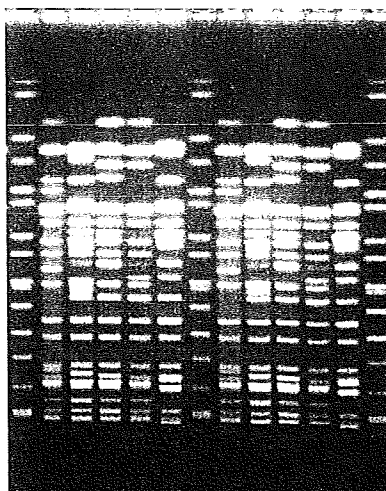
施設2



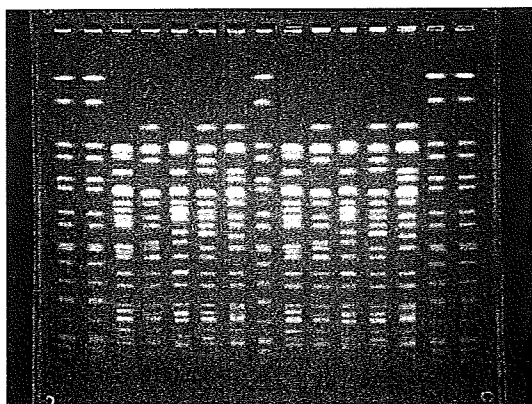
施設3



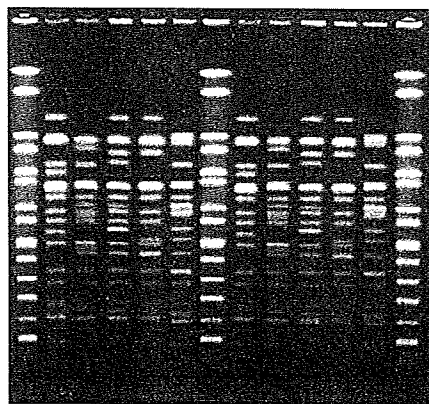
施設4



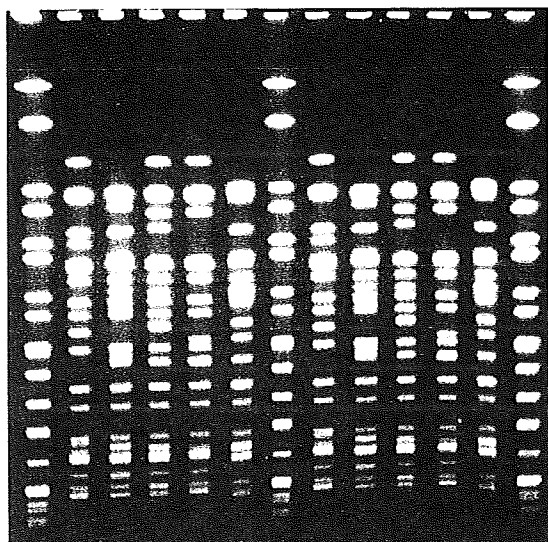
施設5



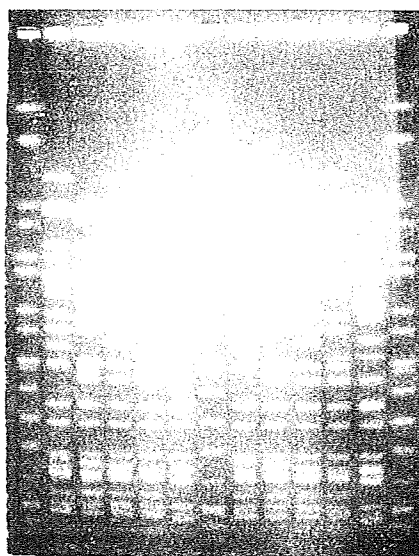
施設6



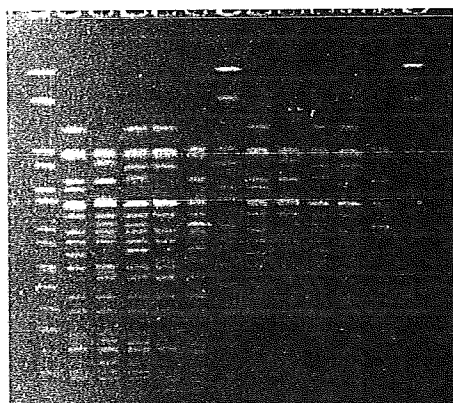
施設7



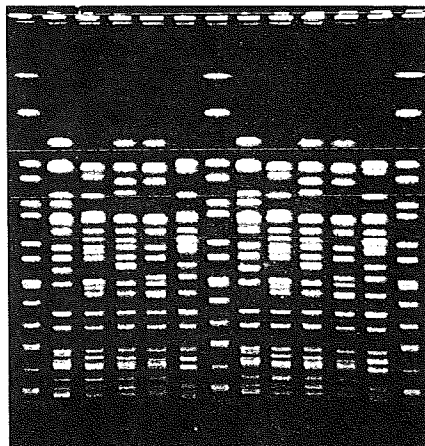
施設8



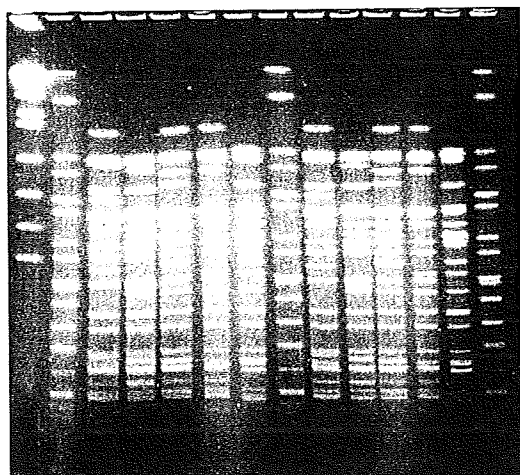
施設9



施設10



施設11



Dice (Tol 1.2%-12%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
 FP1 FP1

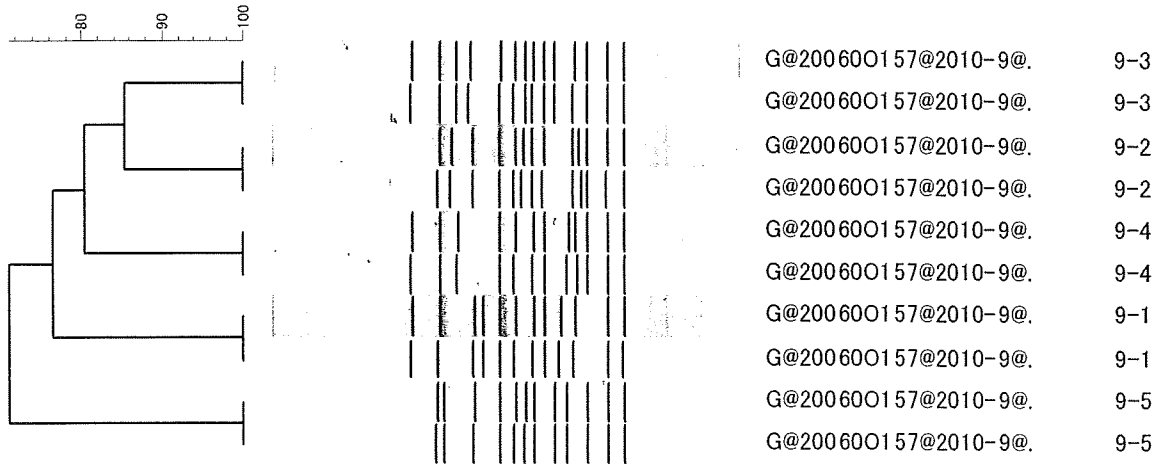


図1 同一写真内でのデンドログラム解析①

Dice (Tol 1.2%-12%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
 FP1 FP1

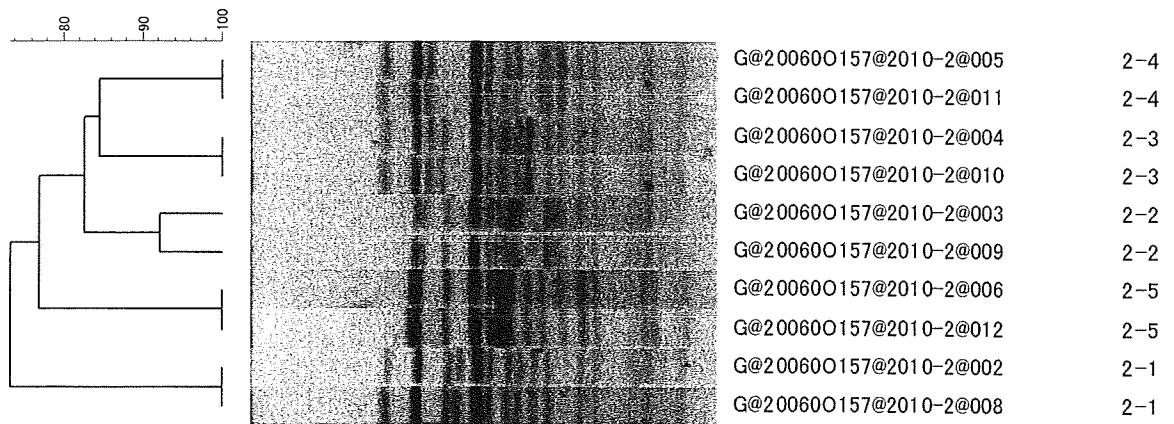


図2 同一写真内でのデンドログラム解析②

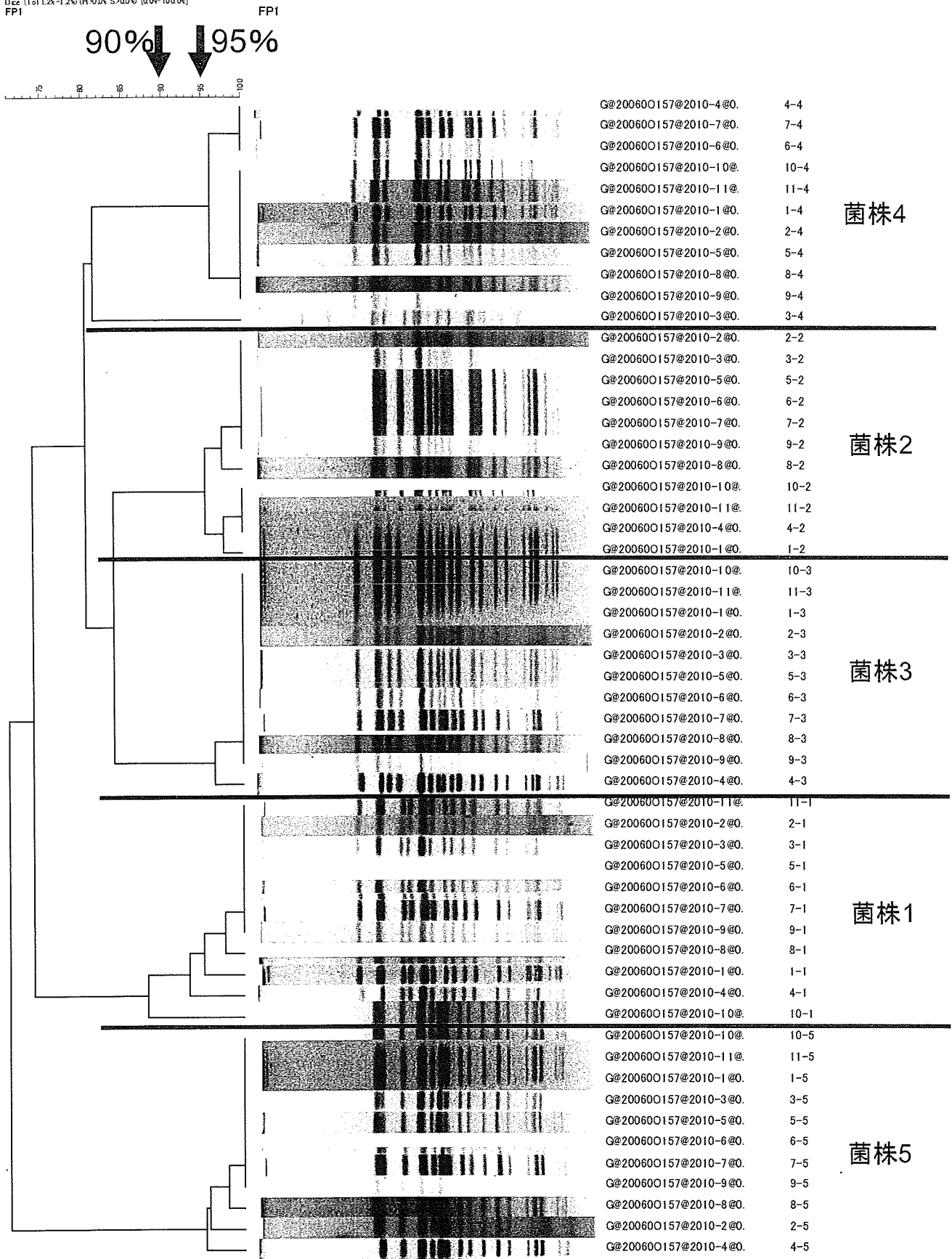
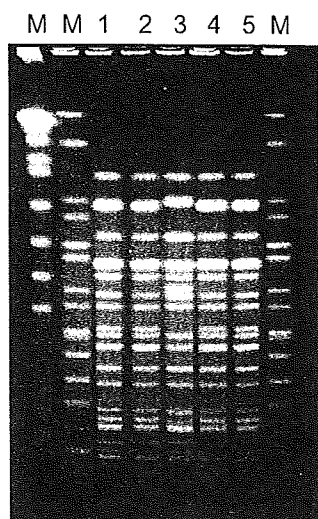


図3 11施設で実施した共通菌株5株のデンドログラム

表1. IS-printing System法とPFGEパターンの比較

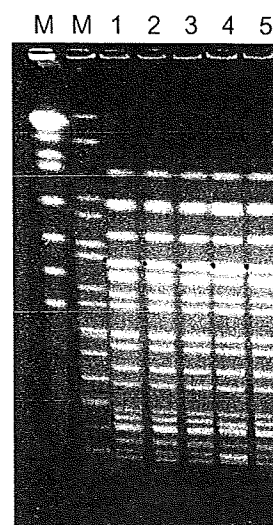
1. 事例1由来株(P焼肉店)  
PFGEパターンとISパターンは一致した

	PFGE パターン	プライマー1		プライマー2			
		1-9	10-18	1-9	10-16	VT2	VT1
1	T-0936	431	317	228	123	1	1
2	T-0936	431	317	228	123	1	1
3	T-0937	391	383	228	59	1	1
4	T-0936	431	317	228	123	1	1



2. 事例2由来株(D焼肉店)  
PFGEパターンとISパターンは一致した

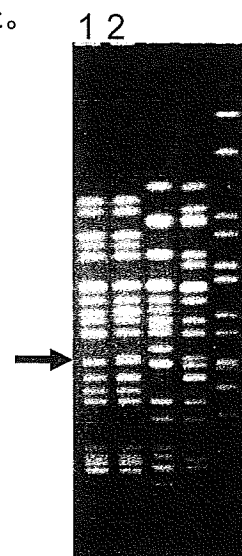
	PFGE パターン	プライマー1		プライマー2			
		1-9	10-18	1-9	10-16	VT2	VT1
1	T-0943	423	383	164	123	1	1
2	T-0943	423	383	164	123	1	1
3	T-0943	423	383	164	123	1	1
4	T-0943b	455	381	228	59	1	1
5	T-0943	423	383	164	123	1	1
6	T-0943	423	383	164	123	1	1
7	T-0943	423	383	164	123	1	1
8	T-0943	423	383	164	123	1	1
9	T-0946	487	365	228	59	1	1



PFGEパターン  
レーン1, 2, 3, 5: T-0943  
レーン4 : T-0943b

3. 流行株  
10株は同じPFGEパターンを示したがIS法では3タイプに分かれた。

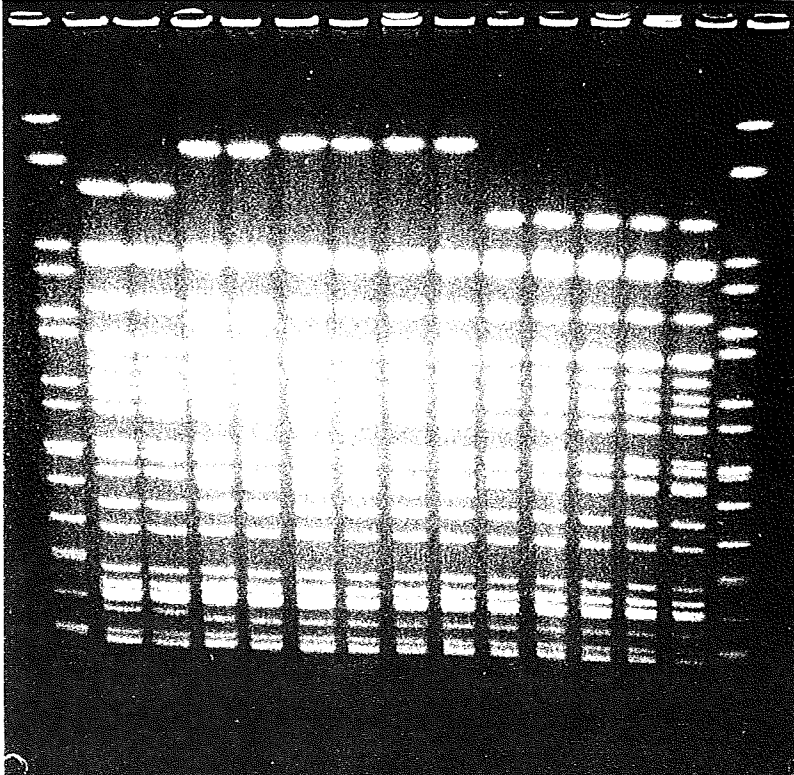
	PFGE パターン	プライマー1		プライマー2			
		1-9	10-18	1-9	10-16	VT2	VT1
1	T-0912	397	111	420	58	1	0
2	T-0912	397	111	420	58	1	0
3	T-0912	396	111	416	58	1	0
4	T-0912	397	111	420	58	1	0
5	T-0912	396	111	420	56	1	0
6	T-0912	396	111	416	58	1	0
7	T-0912	396	111	416	58	1	0
8	T-0912	397	111	420	58	1	0
9	T-0912	397	111	420	58	1	0
10	T-0912	389	70	420	40	1	0



レーン1,2: 流行株  
PFGEパターンは矢印の箇所が少し異なる  
→この差がISに反映?

## 写真2 焼肉チェーンA由来O157株のPFGEパターン(2010.1.8)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M



菌株:  
O157(VT1+VT2)

レーンNo	由来	PFGE型
1	埼玉県患者	T-0955
2	東京都患者A	T-0955
3	東京都患者B	T-0953
4	川崎市患者	T-0953
5	川崎市 牛サガリ由来株	T-0954
6	東京都A店 牛サガリ由来株①	T-0954
7	東京都A店 牛サガリ由来株②	T-0954
8	東京都A店 牛サガリ由来株③	T-0954
9	東京都B店 牛サガリ由来株①	T-0943c
10	東京都B店 牛サガリ由来株②	T-0943c
11	東京都B店 牛サガリ由来株③	T-0943c
12	東京都B店 牛サガリ由来株④	T-0943c
13	東京都B店 牛サガリ由来株⑤	T-0943c

同一検体由来

同一検体由来

### コメント

- 患者は2種類のPFGEパターンであった。  
T-0955型(埼玉県患者, 東京都患者A)  
T-0953型(東京都患者B, 川崎市患者)
- 牛サガリは2種類のPFGEパターンであった→牛サガリは複数のO157に汚染されていた  
T-0954型(川崎市由来, 東京都A店)  
T-0943c型(東京都B店)

東京都健康安全研究センター  
微生物部食品微生物研究科

「別紙」

腸管出血性大腸菌血清型 O157 のクローンの新興

研究協力者 横山栄二、依田清江 千葉県衛生研究所

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌血清型 O157 (O157)による diffuse outbreak 把握を目的として、千葉県では県内で分離された O157 菌株の分子疫学的解析を行い、類似した遺伝子型の菌株の増加を監視している。2008 年 8～9 月に特定の遺伝子型の O157 (VT2)による感染事例が多発し、diffuse outbreak が発生していることが疑われた。最終的に diffuse outbreak の全貌を把握することは出来なかったが、当該 O157 (VT2)菌株について詳細に調査したところ、特定の clone の新興が示唆されたので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 分子疫学的解析

千葉県内で分離された O157 の全菌株について、PFGE[1]および VNTR[2]解析を行った。それぞれのデータに基づきクラスター解析[1, 3]を行い、PFGE 解析では類似度 90%以上、VNTR 解析では類似度 95%以上を同一クラスターと定義した。

### 2. Vhec7 周辺領域の塩基配列解析

VNTR 解析で調査対象とした Vhec7 領域が存在する *tolA-tra5* 領域の塩基配列解析を、PCR 産物の direct sequencing により行った。primer は、VNTR 解析に使用する Vhec7-F (ATGCGCGGTTAGCTACACGACA) および Vhec7-R (TGAAAGCCCACACCATGCGATAAT)を使用し、dye terminator 法により行った。

### 3. 特定遺伝子型 O157 の全国的分布状況

PulseNet Japan のデータとして公開されている PFGE パターンを利用し、県内で分離数が増加した特定遺伝子型の O157 (VT2)の全国的検出状況を調査した。

### 4. 特定遺伝子型の O157 (VT2)菌株の検出法の開発

県内で分離数が増加した特定遺伝子型の Vhec7 領域周辺の塩基配列解析によ

り明らかとなった *tolA-tra5* 領域の塩基配列を利用し、Primer 3[4]を用いて特定遺伝子型の O157 (VT2)菌株を検出可能な primer を設計した。

## C. 研究結果

### 1. 分子疫学的解析

2008年9月までに千葉県内で分離された O157 (VT2) 59株中 32株が PFGE および VNTR 解析でクラスターを形成した。Vhec7 の repeat 数は計算上、クラスターしなかった菌株では 3~12 repeat であるのに対し、クラスターした 32 菌株では 130 repeat 以上であった。

### 2. Vhec7 周辺領域の塩基配列解析

Vhec7 領域が存在する *tolA-tra5* 領域の塩基配列の解析を行ったところ、Vhec7 の tandem repeat 中に IS629 (IS1203)が insertion しており、tandem repeat 数は intact repeat が 4、incomplete repeat が 2 であることが明らかとなった。

### 3. 特定遺伝子型 O157 の全国的分布状況

PulseNet Japan のデータによれば、県内で増加した特定遺伝子型の PFGE パターンと同一、またはきわめて類似した PFGE パターンを有する菌株は、2007年には長野県、大阪府、兵庫県、山口県および福岡県で、2008年には仙台市、東京都、埼玉県、横浜市、川崎市、長野県、石川県、奈良県、大阪府、島根県および熊本県で分離されていた

### 4. 特定遺伝子型の O157 (VT2)菌株の検出法の開発

primer を *tolA*、IS629、*tra5* に設計し(表 1)、multiplex PCR を行った。PCR の条件は、94℃で 5 分間加熱後、94℃ 30 秒、58℃ 30 秒、72℃ 30 秒を 30 サイクル行い、72℃で 7 分間 final extension を行った。この PCR により、特定遺伝子型の菌株は 2 本の増幅バンドが、それ以外では 1 本の増幅バンドが確認された(図 1)。

## D. 考察

一般に tandem repeat 領域は repeat 数が多くなると不安定になることが知られており、Vhec7 の repeat 数は通常、3~12 repeat である。2008年に千葉県内で分離された O157 (VT2) のうちクラスターを形成した 32 株は、Vhec7 の repeat 数



が 130 repeat 以上であったため、計算上の repeat 数に疑問が生じた。そこで、Vhec7 領域が存在する *tolA-tra5* 領域の塩基配列の解析を行ったところ、Vhec7 の tandem repeat 中に IS629 が insertion しており、そのために計算上の repeat 数が巨大な値となっていることが判明した。

千葉県では、2004 年以降に分離された全ての O157 菌株の VNTR 解析を行っているが、これまでに Vhec7 に IS629 が insertion していた菌株はなく、また PulseNet Japan のデータでは 2007 年以降に同一または類似 PFGE パターンの菌株分離が全国的に増加していることから、今回調査した特定遺伝子型 O157 は直近の 2~3 年に新興したクローンであることが示唆された。

この新興クローンの検出には VNTR 解析が有効であるが、VNTR 解析は実施可能な機関に限られていることから、insertion している IS629 を利用した primer 設計を行い、新興クローンを検出可能な multiplex PCR を開発した。今後、新興クローンの全国的分布状況を調査するため、この multiplex PCR を用いて全国で分離された O157 (VT2) 菌株を調査する必要があると思われる。

#### E. 研究発表

1. 横山栄二、依田清江 (2009) 腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) の clone の新興と diffuse outbreak の発生. 平成 21 年度日本獣医公衆衛生学会 (関東・東京地区)
2. 横山栄二、内藤秀樹、小西典子、甲斐明美、黒崎守人、江藤良樹、市原祥子、堀川和美、松本裕子、依田清江 (2009) 腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) の new clone の emerging. 第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム

#### 参考文献

1. Yokoyama et al., 2006. Epidemiol. Infect. 134: 1004-1014.
2. Lindstedt et al., 2004. J. Microbiol. Methods 58: 213-222.
3. Yokoyama et al., 2007. J. Food Prot. 70: 2583-2588.
4. Untergasser et al., 2007. Nucleic Acids Res. 35: W71-W74.

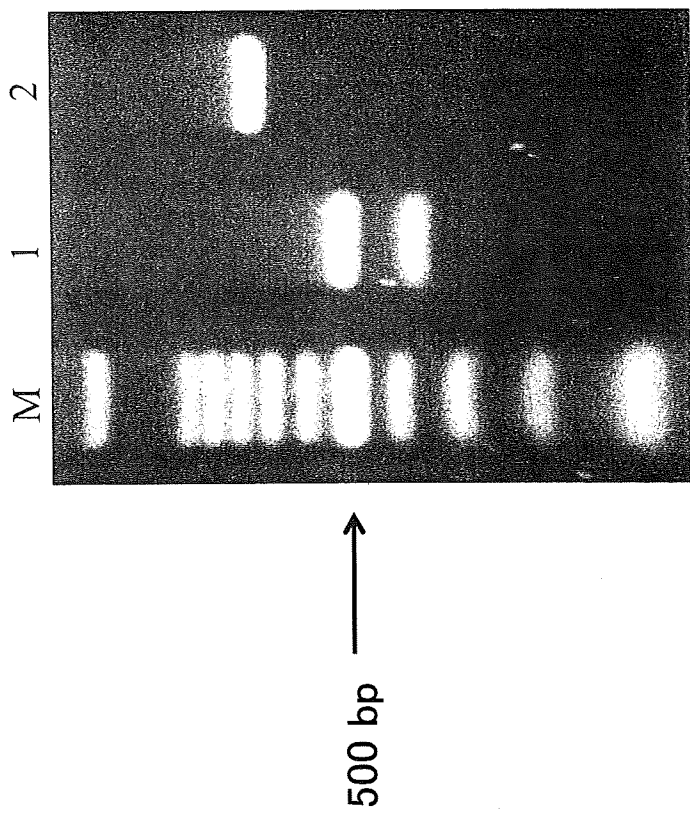


図1 新興クローン検出用プライマーによるmultiplex PCR

Lane M: 100 bp ladder

Lane 1: CEC08062 (新興clone)

Lane 2: CEC08090 (千葉県分離発株)

表1 新興クローン検出用プライマー

プライマー名	シーケンス(5'-3')
<i>tolA</i> -F	CTATTGCCGAAGCGATAAAGT
IS629-R	GACTTTCAGAACCATACGA
IS629-F	CTCCATCAGAAACGATGAT
<i>tra5</i> -R	TAGGACGAGGTCGTCTAAAA

厚生科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方9地方衛生研究所によるパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いた腸管出血性大腸菌の精度管理、PFGE 解析結果の行政への還元と IS printing system の実施

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所  
研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所  
研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所  
北川恵美子 石川県保健環境センター  
白木 豊 岐阜県保健環境研究所  
田中保知 岐阜市衛生試験所  
木全恵子 富山県衛生研究所  
中根邦彦 岡崎市総合検査センター  
石畝 史 福井県衛生研究所  
岩出義人 三重県保健環境研究所  
藪谷充孝 名古屋市衛生研究所

研究要旨

東海・北陸地方9地方衛生研究所（以下施設と略す）において腸管出血性大腸菌3検体（0157:H7）を用い、サルモネラマーカ―使用を統一して精度管理を実施した。その結果、9施設全ての泳動図は解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。施設間の相同性の比較を行なったところ、3株何れにおいても施設間の相同性が89.5%以上（89.5%から100%）と高率であり、良好な結果が得られた。

平成21年度にPFGE解析結果を行政への還元した事例の調査を行ったところ、2施設でPFGEを実施しその結果を行政に還元していた。何れも良質な泳動図が得られていたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われた。対象となった事例の原因菌は0157（2事例）、026（2事例）をはじめ0111（2事例）、レジオネラ菌（1事例）が含まれていた。

東海・北陸6施設において54株の0157を用いてIS printing systemを行った。その結果、若干の非特異バンドは出現するものの、PFGEに比べ迅速性、簡便性に優れ、その解析力もPFGEと同程度と考えられた。よって集団事例発生時の疫学解析の手段として十分応用可能と思われた。