

A. 研究目的

我が国で腸管出血性大腸菌 0157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働に向けた研究班活動が平成 12 年度から平成 20 年度まで行われた。

愛知県衛生研究所 (愛知衛研) ではこれまでの研究班活動として、0157、サルモネラ、赤痢菌の PFGE 実施統一プロトコール作成、及び愛知県下で過去 10 年間に検出されたサルモネラ、赤痢菌それぞれ約 150 株について PFGE を行い、そのバンドパターンのデータベース作成、また東海・北陸ブロック内の活動として 1) 年 1 回若しくは 2 回の 0157 の PFGE 精度管理、2) 東海・北陸ブロック地方衛生研究所 (地研) PFGE 担当者を愛知衛研に集め、PFGE 実施手順に関する研修会を実施 (平成 17 年 1 月)、3) 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) の調査を行った。

これらの研究班活動の成果として毎年 PFGE 担当者が 1 名～2 名程度変わることのある東海・北陸ブロック内地研においても精度管理のなかで同一 PFGE 型 0157 の PFGE バンドパターンの各地研相同性を約 90%若しくはそれ以上まで高めることができた。このことから東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の 0157 等集団発生の際にも疫学的資料として用いるに足る良質な画質を提供することが可能であると思われる。

今年度は、PFGE 精度管理を当所から送付した 3 株の腸管出血性大腸菌 (0157) を用いて 9 地方衛生研究所 (以下 9 施設と略す。) にて実施し PFGE 画質の向上をはかることを目的とした。さらに東海・北陸ブロック各地研が 0157 及び他の病原菌による事例発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁 (市役所) に報告した代表事例 (行政への還元) を主体として調査を行った。また、昨年度に引き続いて 0157 の PCR 型別法 IS printing system (東洋紡) についてブロック内 6 施設において解析力、簡便性及び迅速性について PFGE 法との比較検討等を行った。

B. 研究方法

[I]送付検体

3 検体の腸管出血性大腸菌 (0157:H7) を精度管理に用いた。これらは散発事例に由来する 3 株の腸管出血性大腸菌で愛知県内で平成 21 年度に検出された。その PFGE 型は何れも異なっている。なお OH 血清型別分類は、菌株を分離した各病院及び愛知衛研において市販の病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用いて行なった。

[II]方法

1. 腸管出血性大腸菌を用いた精度管理

愛知衛研よりそれぞれ 3 検体を 8 施設 (石川県保健環境センター、岐阜県保健環境研究所、岐阜市衛生試験所、富山県衛生研究所、福井県衛生研究所、三重県保健環境研究所、名古屋市衛生研究所、岡崎市総合検査センター) に送付した。そして、愛知衛研を含む 9 施設において、送付された 3 検体について PFGE を実施した。PFGE 実施条件に関しては、サルモネラマーカーの使用を統一した。8 施設の PFGE の泳動図はメールで電送され、その解析を愛知衛研にて解析ソフト「BioNumericus」を用いて行なった。具体的には、同一検体についてパーセントで示される相同性に基づく系統樹を作成した。

2. 行政への還元に関する調査

平成 21 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による事例の際に PFGE を行い保健所、及び県庁 (市役所) に報告した事例について、事例の概要、PFGE 泳動図を愛知衛研に送付した。

3. IS printing system (東洋紡) の実施

東海・北陸ブロック内 6 施設で検出された 54 株の 0157 について IS printing system (東洋紡) を実施した。方法は添付のマニュアルに従って行った。なお、解析に用いた菌株の株数、由来等は各施設任意で行った。

C. 研究結果

1. 精度管理

愛知衛研及び各施設より当所に送られた泳動図の解析を行い系統樹を作成した。

検体 1 に関しては 9 施設全体の相同性は 93.3%と高率であった。9 施設のうち 6 施設が相同

性 100%でひとつのクラスターを形成した。残り 3施設もこのクラスターと相同性 93.3、94.2、96.8%と高い相同性を示した。

検体 2 については 6 施設が相同性 100%を示し、ひとつのクラスターを形成した。残りの 3 施設はこのクラスターとそれぞれ 89.5%、94.7%、96.8%の相同性を示しそれぞれ単独でクラスターを形成した。

検体 3 に関してはそれぞれ 4 施設と 3 施設が相同性 100%であった。これら 7 施設は相同性 97%でひとつのクラスターを形成した。一方、残りの 2 施設はそれぞれ相同性 92.3、95.5%の相同性を示しそれぞれ単独でクラスターを形成した。

2. 行政への還元に関する調査

東海・北陸 9 地研のうち 2 地研（富山県、岐阜県）では今年度事例発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は 1 地研が 6 事例、1 地研が 1 事例であった。その概略を以下に示す。

1. 2009年富山県において発生したEHEC集団感染事例とそのPFGEパターンについて(事例報告) 富山県衛生研究所 細菌部 木全恵子、嶋智子、清水美和子、金谷潤一、磯部順子、倉田毅、綿引正則

平成21年1月～10月にかけて富山県で発生したEHEC感染事例は13事例で散发事例6事例、家族内感染事例7事例であった。家族内感染事例7事例の血清型および毒素保有型による内訳は0157 (*stx1 stx2*) による事例1事例、0157 (*stx 2*) による事例2事例、026、0111による事例がそれぞれ2事例であった。このうち本報告では0157 (*stx 2*) による家族内感染事例2事例、0111家族内感染事例2事例及び026家族内感染事例2事例について事例の概要と各事例間での分離株のPFGEパターンの比較について報告する。

上記の家族内感染事例の発生時期、感染者の内訳を表 1 に示す。各事例における有症者は事例 4 を除き初発患者のみであり、他の感染者は家族検便の結果感染が明らかとなった無症状保菌者であった。また、事例 1 の初発患者は下痢・血便のほかHUSを呈した。

これらの事例において分離されたEHECについてPFGEを行い、デンドログラム解析による各事例

の関連性について検討した。PFGEは標準化プロトコールに基づいて行い、得られたPFGEの泳動像の解析は解析ソフトFingerPrinting IIを用いて行った。FingerPrinting IIによるデンドログラム解析にはUPGMA法とDice係数を用いて行い、トレランス値は1.2%とした。

その結果、感染者由来分離株は、事例4を除き各事例ごとに同一パターンを示した(図1)。事例4において、感染者1名より他の感染者由来分離とは2バンド異なるPFGEパターンを示す株が分離されていた(図1 レーン18)。

デンドログラム解析結果では各事例間での分離株の PFGE パターンの一致は見られなかった。このことから、これらの家族内感染事例間の関連性は低いと考えられた。

2. 宿泊施設の浴場を原因とするレジオネラ症感染事例

集団感染事例の概要

- ・原因施設：宿泊施設
- ・患者数：5名
- ・発生期間：平成21年10月中旬～11月初旬

PFGE 解析結果

施設の浴槽水からは *L. pneumophila* 血清群 1、4、9、*L. oakridgensis* など複数の菌種が分離された。患者 1 名から *L. pneumophila* 血清群 1 が分離されたため、患者株 (2 株) と施設由来の *L. pneumophila* 血清群 1 (15 株) について、制限酵素 *Sfi I* による PFGE を実施した。その結果、患者株と施設株の泳動パターン(図 2 レーン 1, 2, 10, 13, 14, 15, 16) が一致したことから、施設の浴槽水がレジオネラ症の原因であると判断した。

3. IS printing system の実施

6 施設で検出された 0157 について IS printing system を実施した結果の概略を以下に示した。IS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌 0157サブタイピング法の検討について 富山県衛生研究所 細菌部 主任研究員 木全恵子

今回、我々は平成21年度パルスネット研究班検討課題として昨年度に引き続き、IS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌0157サブタイピング法の検討を行った。IS-printing Systemによる0157サブタイピングは宮崎大学・林教授らにより開発され、IS (insertion sequence) の

分布をマルチプレックスPCRにより検出する。

方法：供試菌は平成20年11月から平成21年10月までに本県で発生した腸管出血性大腸菌0157（以下0157）感染事例より分離された0157 9株（表2）を用いた。鋳型DNAの調製は以下の方法で行った。5%キレックス懸濁液（TE pH8.8）に菌体を懸濁し、100℃で10分加熱したのちに、遠心（12000rpm 5分）分離を行った。得られた上清を鋳型DNAとしてPCRに用いた。

調製した全ての鋳型DNAの濃度を吸光度OD260より計算し、各鋳型DNA 15ngをIS-printing SystemのマルチプレックスPCRに用いた。PCR条件及びアガロース電気泳動はIS-printing Systemの推奨条件に従い、3%アガロース（Nusieve GTG Agarose : SeaKem GTG Agarose =2:1混合、0.5×TBE buffer）を、泳動装置にはMupidミニゲル電気泳動装置を用いた。泳動に用いるアガロースゲルと泳動バッファはあらかじめ4℃で冷却し、使用した。

さらに、大阪府立公衆衛生研究所のコード変換法（平成20年度報告書参照）に準じ、得られた泳動像を12桁の数値からなるIS-コードに転換した。

PFGEは標準化プロトコールに基づいて行い、得られたPFGEの泳動像の解析は解析ソフトFingerPrinting IIを用いて行った。FingerPrinting IIによるデンドログラム解析にはUPGMA法とDice係数を用いて行い、トレランス値は1.2%とした。

結果と考察：図3、表3に供試菌のIS-printing SystemマルチプレックスPCR産物のアガロースゲル電気泳動像と判定結果を示した。今回供試菌9株のPFGEパターン及びIS-コードは全て異なっていた（図4）。このうちPFGEのデンドログラム解析による類似度90%以上を示した事例1と事例8（図4レーン4・5）及び事例4と事例9（図4レーン6・7）の組み合わせを比較するとIS-printing Systemのバンドパターンのうち異なる増幅バンドは36バンド中2-3バンドとわずかであった。特に毒素保有型が異なる事例1（*stx1 stx2*）と事例8（*stx2*）においてPFGE・IS-printing Systemによるゲノム全体の構造パターン及びIS分布が非常に類似していることから、事例8由来株について*stx1*脱落の可能性を

含めた事例1由来株との関連性が示唆された。

当衛生研究所では平成18年以降に当課題に参加しており、県内で発生した0157感染事例についてIS-printing Systemによる0157サブタイピングを検討し、報告した。そこで上記の本年度の解析結果をあわせ、平成18年から平成21年10月までに富山県内で発生した0157感染症87事例の代表株99株（同一事例内でのPFGEパターンの異なる株も含む）のIS-コードとPFGEパターンの比較を行った。その結果、これら99株のIS-コードは47タイプ検出された。一方、上記99株のPFGEパターンは60パターン検出され、IS-printing Systemによる0157サブタイピングに比べてPFGEによる型別はより細分化していた。次にPFGEパターンとIS-コードの対応を比較した。PFGEパターンとIS-コードが一对一の固有な組み合わせであった株は36株（36事例）であり、総事例数の41.4%であった。このうち2事例以上の株においてPFGEパターンとIS-コードが一致した事例は8事例であり、これらのPFGEパターンとIS-コードの組み合わせは3組であった（表4①）。このうちIS-コード317575611756、305457611642が検出された事例はそれぞれ2事例、4事例であり、同一年度内の近接した時期に発生した事例であったが、各事例間の関連性は不明であった。

同一IS-コードで複数のPFGEパターンが検出された事例は44事例（54株）で総事例数の56%を占めた（表4②）。このうち同一IS-コードで最も多くのPFGEパターンが見られたのはIS-コード613577610646でPFGEパターンは5パターン、感染事例数は8事例であった。IS-コード613577610646株による感染事例は平成18年度に7事例、19年度に1事例発生していた。これらの事例は2事例を除き全て散発事例であった。IS-コード613577610646株のPFGEパターンは2パターンを除き、類似度90%以上のクラスターを形成しており、同一株由来であると考えられた。上記の例を含め、同一IS-コードで複数のPFGEパターンが検出された事例は、表4②のIS-コード10タイプのうち、2タイプは同一年度に、5タイプは2年間連続して検出されたが、3年間以上同一タイプのIS-コードが継続して検出される事例はなかった。これらの結果は本県において

同一 IS 分布を示す 0157 株の流行は 1 年～2 年以内に推移する傾向を示唆していると考えられる。同一 IS-コードで PFGE パターンが異なる原因としては PFGE に用いられる制限酵素切断部位の変異、IS 間でのゲノムの逆位などが考えられる。一方、同一 PFGE パターンに複数の IS-コードが検出された事例は 27 事例(総事例数の 31.0%)であり、PFGE パターンと IS-コードは 7 パターン、12 タイプであった(表 4③)。PFGE のクラスター解析から上記 7 パターンのうち PFGE パターン W と H を除く 5 パターンは類似度 90%以上の大きなクラスターを形成していること、同一 PFGE パターンを示した異なる IS-コード間の違いは 1 から 2 箇所のみであった(PFGE パターン X を示した IS-コード 717577611657 と 307577211757 を除く)ことから、これらの PFGE 5 パターンに属する分離株のゲノム構造が非常に近い、若しくは同一であった可能性が考えられた。また、同一 PFGE パターンに複数の IS-コードが検出された事例に関しては IS が小さい分子(IS629 で 1.3kb 程度)であるため、これらの分子の excision や増幅によるコピー数の変化やゲノム内への挿入による IS の分布状況の変化について、20 kb～30 kb 以上のゲノム制限酵素切断片のパターンを解析する PFGE では反映されなかったと考えられる。

以上のように PFGE と IS-コードによるタイピングはその型別対象がゲノム制限酵素切断部位、IS 挿入位置と異なることからその型別は完全には一致しない。しかし IS-printing System はその迅速性・簡便性の点から、発生時期が近接した感染事例(集団感染事例や疫学的関連性の疑われる事例(diffuse outbreak)等)の比較に関してスクリーニングとして有効な手段であると考えられる。また、近年大腸菌において IS-excision を促進し、ゲノムの多様化に関与する因子として IS-excision enhancer (IEE)が報告されている(腸管出血性大腸菌シンポジウム、2009)。上記の同一 PFGE パターンに複数の IS-コードが検出された事例およびそのクラスターに属する株は高頻度 IS-excision が引き起こされている可能性があり、これらの株について IS-excision enhancer がどのように寄与しているかは今後の課題である。

また 6 施設の使用した菌株数、結果を表にまとめた(表 5)。

E. 結論

東海・北陸地方 9 施設による腸管出血性大腸菌を用いた精度管理を実施した。PFGE 実施条件はサルモネラマーカ使用を統一し、3 検体(0157:H7)について行なった。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、何れの検体においても施設間の相同性が 89.5%以上と高率であった。

平成 21 年度東海・北陸 9 地研のうち 2 地研では事例発生の際に 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。特にこれまでの精度管理では腸管出血性大腸菌のみを検体としてきたが、レジオネラ菌感染事例のようなその他の病原菌の事例に対しても十分応用可能であることを証明した。

6 施設で検出された 0157 について IS printing system を実施した。若干の非特異バンドは依然出現するものの、散发事例、及び集団事例株を用いた検討からその解析力は PFGE と同程度と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

A 群レンサ球菌の産生する M タンパク産生量の多様性 松本昌門、鈴木匡弘、皆川洋子、岡本陽、太田美智男、長谷川忠男 第 46 回日本細菌学会中部支部総会 2009 10.23 名古屋市

表1 家族内感染事例概要

事例 No.	発生時期	血清型(<i>stx</i> 保有型)	感染者数(名)	有症者再掲(名)
1	2009.5.	O157:H7(<i>stx2</i>)	2	1
2	2009.5.	O111:HNM(<i>stx1</i>)	2	1
3	2009.6.	O111:HNM(<i>stx1</i>)	3	1
4	2009.6.	O26:H11(<i>stx1</i>)	6	2
5	2009.7.	O157:H7(<i>stx2</i>)	5	1
6	2009.9.	O26:H11(<i>stx1</i>)	4	1

表2 本報告に用いた腸管出血性大腸菌 O157

菌株No.	発生時期	発生態様	血清型	ヘロ毒素遺伝子	
				<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
1	2008.11	散発	O157:H7	+	+
2	2008.12	散発	O157:H7	-	+
3	2009.5	家族内感染	O157:H7	-	+
4	2009.5	家族内感染	O157:H7	+	+
5	2009.6	散発	O157:H7	-	+
6	2009.6	散発	O157:H7	-	+
7	2009.7	散発	O157:H7	-	+
8	2009.7	家族内感染	O157:H7	-	+
9	2009.8	散発	O157:H7	+	+

表3 IS-printing Systemによる O157 サブタイピングパターン

Primer No.	Size(bp)	菌株No.								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
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	+	+	+	+	+	+	+	+	+
aaa	185	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-16	171	-	+	+	-	+	+	+	-	-
hlyA	137	+	+	+	+	+	+	+	+	+
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	278	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-15	240	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2-16	211	-	+	+	+	-	-	+	-	+
stx2	181	+	+	+	+	+	+	+	+	+
stx1	151	+	-	-	+	-	-	-	-	+

表4 平成18年度—21年度(10月)までに富山県で分離された0157のISコードとPFGEパターンの対応

①複数事例においてISコードとPFGEパターンがともに一致した事例

IS-コード	事例数(発生形態)
317575611756	2(散発2事例)
305457211642	2(散発2事例)
305457611642	4(散発3事例、家族内感染1事例)

②同一ISコードに複数のPFGEパターンが検出された事例

IS-コード	PFGEパターン(事例数)	株数(事例数)
012057214443	F(1), G(1)	2(2)
613575610646	H(4), I(1)	5(5)
613577610646	J(1), K(3), L(2), M(1), N(1)	8(8)
317577611757	O(13), P(1), Q(1), R(1)	17(16)
717577611657	W(1), X(1)	2(2)
717555611757	Y(3), Z(1)	4(4)
317575211757	b, c(1) ^{*1} , d(1), e(1)	4(3) ^{*1}
317575611757	e(1), f(1)	2(2)
217055715403	D, E(1)	2(1) ^{*2}
707557611657	S, T, U, V(1) ^{*3}	8(1) ^{*2}
707555611657	a(1) ^{*3}	

*1: 同一感染事例だがPFGEのみ異なるパターン(b, c)株が検出された。

*2: 同一集団感染事例で固有のISコードが検出されたが、PFGEパターンは複数であった。

*3: *2と同様に同一集団感染事例で固有のISコードが検出されたが、PFGEパターンは複数であった。しかし1株のみPFGEパターン・ISコードがともに異なる株が分離された。

③同一PFGEパターンに複数のISコードが検出された事例

PFGEパターン	IS-コード(コード数)	株数(事例数)
W	717477611657	4(3)
	717577611657	1(1)
X	717577611657	1(1)
	307577211757	1(1)
c	317475411757	1(1)
	317575211757	1(1)
e	317575211757	1(1)
	317575611757	1(1)
g	717575611657	1(1)
	717555211657	1(1)
O	717577211757	1(1)
	317577611757	14(13)
H	613575610642	1(1) ^{*4}
	613575610646	1(1)

*4: 613575610642(O157:stx2)と317577611757(O157:stx1+stx2)が同じ患者から分離

表5 6施設の使用した菌株数、IS-printing Systemの結果

地研	菌株数 (由来)	結果
A	1 (散発)	精度管理株1株と1バンド違い。
B	1 1 (2食中毒: 5株と3株、1家庭内事例2株、散発事例1株)	食中毒(3株)、家庭内事例は事例内でバンドパターンが一致。食中毒(5株)は4株が一致、1株は1本違い。散発事例株は家庭内事例株と一致。
C	1 1 (2集団事例: 各2株、散発事例7株)	同一集団事例株はバンドパターン一致。散発事例株では同一 PFGE 型株は IS-Printing 型もバンドパターン一致。
D	9 (2集団事例: 2株と1株、散発事例6株)	9株全てバンドパターンが異なっていた。
E	9 (3食中毒: 3株と各2株、1集団事例2株)	食中毒及び集団事例とも同一事例内では由来株のバンドパターン一致。
F	1 3 (全て散発事例)	5つのバンドパターンに型別された。その内訳は5株が1グループと各2株が4グループであった。このうち2グループではバンドが1本異なっていた。

図1 2009年に富山県において発生したEHEC家庭内感染事例

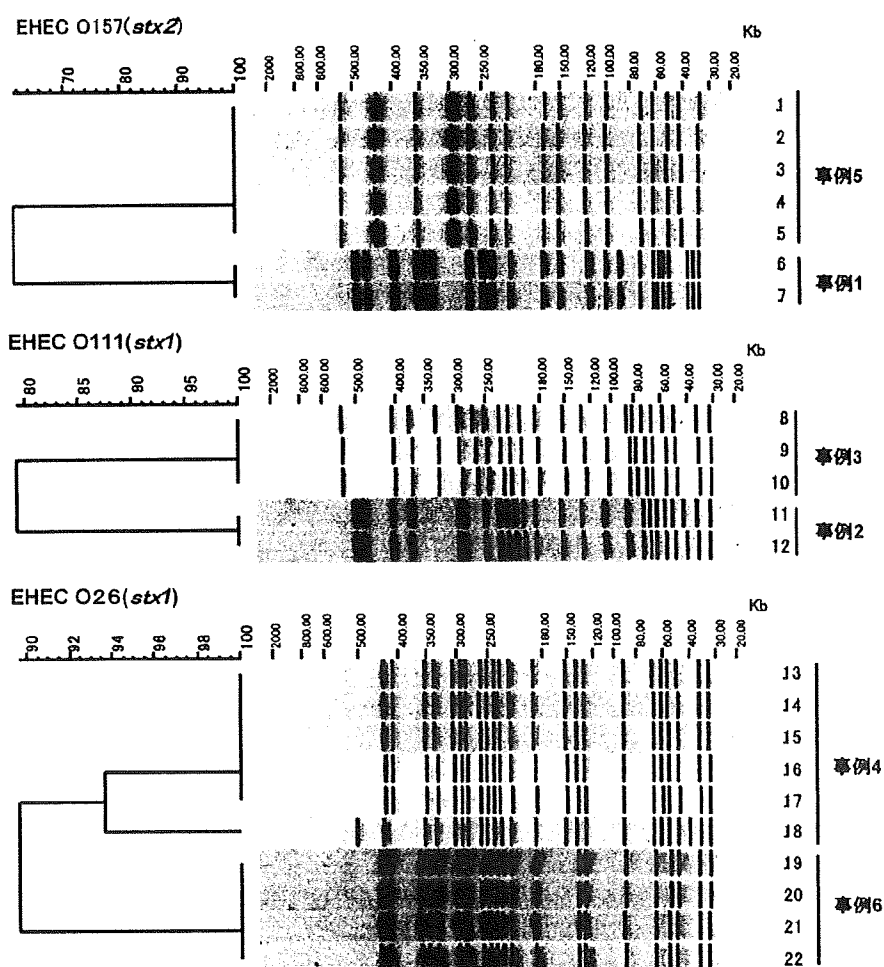
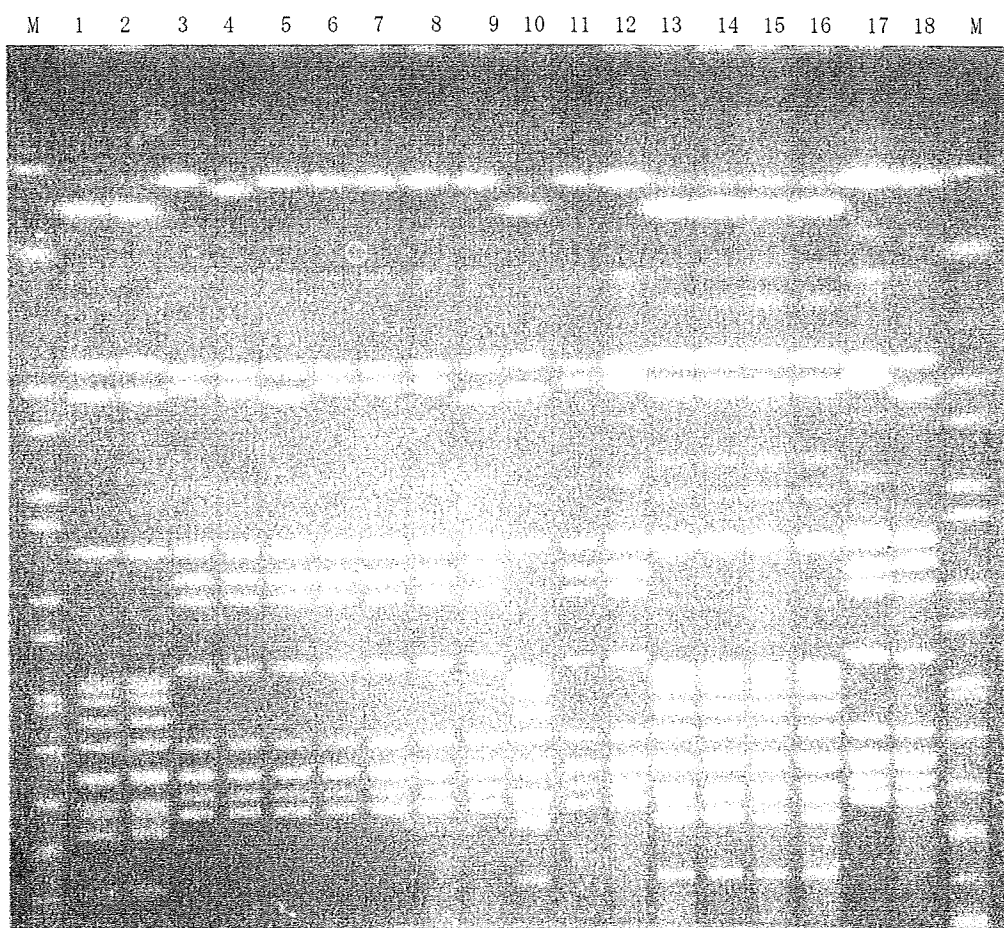
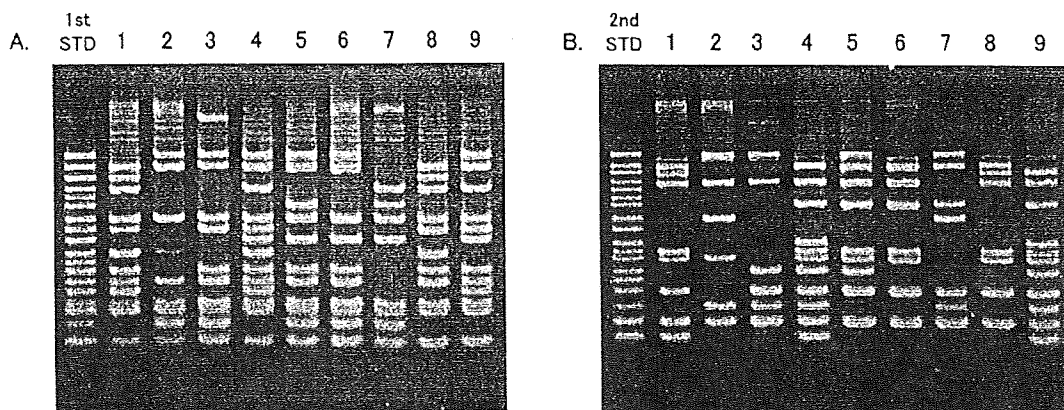


図 2



レーン 1~2 : 患者
 3~17 : 施設浴槽水
 18 : 当所保存 *L. pneumophila* 血清群 1 (H13 年度実態調査による同施設分離株)
 M : マーカー *S. Braenderup*

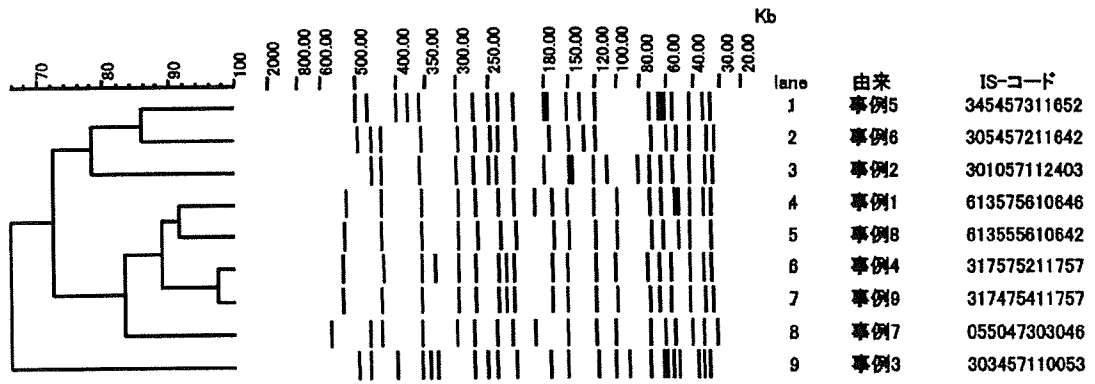
図 3 IS-printing System によるマルチプレックス PCR の電気泳動像



Lane1 から 9 表 1 菌株 No. と一致

1stSTD, 2nd STD : 電気泳動用陽性コントロールおよびサイズマーカー

図4 各0157感染事例由来株におけるPFGEパターンとIS-コード



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）
平成 21 年度分担研究報告書

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

研究分担者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	安田奈央、吉田時子	滋賀県衛生科学センター
	中嶋智子、浅井紀夫	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、中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	横田正春	堺市衛生研究所
	齋藤悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	岩本朋忠	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、田辺純子	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、原田哲也	大阪府立公衆衛生研究所
	河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は依然として多発しており、発生時期も夏季に集中している。近畿ブロックで分離される EHEC、特に血清群 O157 の関連性を迅速に把握するため、遺伝子解析法であるパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法と IS-printing System（IS）法について、その信頼性を検証し、それぞれの特徴を利用した活用法を検討した。同一の EHEC O157 を用いた PFGE 法の精度管理を 10 施設で実施したところ、いずれの施設でも明瞭な電気泳動画像が得られ、4 人の解析者による画像解析ではそれぞれ菌株ごとに近似度の高いクラスターを作った。IS 法は迅速性に優れ結果を数値化できることから、データベースの構築を目指した。データの信頼性を確保するため、非特異バンドの増幅がみられる株を用いて 10 施設で精度管理を行い、近接のバンドと明瞭に区別できる電気泳動画像の必要性が確認された。2010 年 2 月 12 日までに 9 施設で実施した 512 株の型別成績が登録されており、レファレンス・データベースとして各施設で閲覧、検索し、疫学情報や PFGE 画像の交換が必要な分離株をスクリーニングする手段として活用している。

A. 研究目的

食品の流通やヒトの活動が広域化している現代社会では、細菌やウイルス等によって汚染された食品が原因となって、広域にわたる食品由来感染症が発生する危険があり、原因となる病原体の分離同定とともに、各地で分離される病原体相互の関連性について科学的検証を行うことが重要である。

日本の腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の約 2 割は大阪府を中心とした近畿地方で発生しており、発生時期も 7 月から 9 月に集中する。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、いち早く汚染食品の流通を停止することが求められる。このような背景から、近畿ブロックでは EHEC の遺伝子解析法であるパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法と IS-printing System（IS）法について、その有用性と信頼性を検証し、それぞれの特徴を利用した活用法を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

PFGE 法および IS 法の精度管理には、2009 年に大阪府で分離された EHEC O157 6 株（菌株 1～6）を用い、*XbaI* で切断されることを大阪府立公衆衛生研究所（公衛研）で確認の上、研究協力者に送付した（表 1）。また、IS 型のデータベース化の検討には、各施設で収集、保管された EHEC O157 を使用した。

2. PFGE 法

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℃ 一夜、制限酵素 *XbaI* 処理を 37℃ 2 時間に統一した「PFGE New Protocol-Kinki」で実施し、サイズマーカーには、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *XbaI* 切断を使用した。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。

3. PFGE 画像の解析

EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像は、10 施設の研究協力者から公衛研に電子メールで集約した後、CD に記録して別々の施設に所属する 4 人の解析者に送付し、FingerprintingII バージョン 3（Bio-Rad）を用いて解析した。

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%、ショルダー感度 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）法

IS 法は、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。電気泳動は Standard DNA の 18 本のバンドが明瞭に分離される

ことを条件とし、9施設では3%アガロースゲル (NuSieve GTG : SeaKem GTG : = 2:1) と 0.5xTBE バッファーを用い、各施設で泳動量と泳動時間を設定した。1施設は自動電気泳動装置 QIAxcel(QIAGEN)を使用した。判定はプライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」とし、非特異バンドが増幅された場合はそのサイズを表示した。

5. IS 型のデータベース化

FileMaker Pro10 Advanced でデータベースを作成し、ランタイム版を研究協力者に配布した (図 1)。データ入力は、菌株番号、血清型、発症日・検体採取日、管轄保健所、IS 法の判定結果 (IS データ) を必須項目とし、住所・地域、IS 法のエクストラバンド、備考も入力できるようにした (図 2)。また、IS データは十進数に変換し、セット 1、セット 2 の順に組み合わせた「IS コード」としても表示した。研究協力者は各施設で実施した成績を「レファレンス用データ」として随時公衛研に送信し、公衛研では各施設から送付されたデータをもとにレファレンス・データベースを更新して、毎週金曜日に最新版を研究協力者に配布した。

データベース化にあたって、個々のデータの所有権は実施施設に帰属すること、データを報告や発表に使用する際は事前に実施施設の了解を取り、あわせて研究分担者へ連絡することをルールとした。

C. 研究結果

1. EHEC O157 の PFGE 精度管理

10 施設から電送された PFGE 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 (図 3)。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 4~7)。いずれの解析者でも菌株ごとにクラスターを作っており、その近似度は 91.9~100%であった (表 2)。中でも菌株 4 は、施設 10 でマーカーの Band 7 よりややサイズの大きいバンドが欠失していたが、他の施設の画像はいずれの解析者でも 6~9 画像が 100%一致し、B 解析者で 94.7%、他の 3 名は 97.1~97.4%と高い近似度を示した。菌株 1 は、施設 8 の画像でマーカーの Band 4 付近に見られた弱いバンドの認識で解析者による差がみられたが、A 解析者は全画像で、他の解析者でも 5~8 画像が 100%一致を示し、近似度は 94.1~100%であった。他の株についても、画像や解析者によって認識バンド数が 4~5 本異なっていたが、C 解析者で菌株 3 と菌株 6 のクラスターが近似度 92%前後とやや低値であった以外は、約 94%以上の近似度を示した。

2. IS 法の精度管理

各施設の判定結果を菌株ごとに比較したところ、セット 1 では菌株 2、菌株 4 および菌株 5 で、セット 2 では全株で 1~4 施設の判定が異なる結果となった。これは非特異バンドを増幅ありに、あるいは増幅ありを非特異バンドに誤って判定していた場合がほとんどで、これらの施設の画像では、Standard DNA は明瞭に区別できたものの、精度管理株の増幅バンドが太い、あるいは泳動像全体に歪みがみられた。施設 3、施設

6、施設 8、施設 10 は電気泳動量やコームの幅を変更して再泳動を実施し、他と同じ判定結果を得ることができた（表 3、表 4、図 8）。自動電気泳動装置を使用した施設 5 の結果は他施設の結果と一致しており、菌株 2 のプライマー 1-15 付近および菌株 4 のプライマー 1-10 付近の非特異バンドが標的サイズと約 5bp 異なると判定されていた。

3. IS 型のデータベース化

2009 年 10 月にデータベースを配布し、2010 年 2 月 12 日現在で 512 株が登録された。分離年の内訳は、2007 年 134 株、2008 年 138 株、2009 年 240 株であった。このうち、2009 年に発生した角切りステーキ食中毒事例関連株は 4 施設から 17 株登録され、いずれも同じ IS コードを示し、他の株とは異なっていた。

D. 考察

PFGE 法は型別能力や再現性に優れているため、EHEC の遺伝子型別法としてプロトコルも標準化されている。しかしながら、菌液の濃度やゲルブロックの作製には注意すべき点もあり、広域流行株の解析に備えて日頃から精度管理を実施する必要がある。近畿ブロックの 10 施設で実施された電気泳動像は施設によってバンドの濃さが多少異なっていたが、マーカの Band 16 付近までバンド認識が可能であった（図 3）。画像解析の結果、A 解析者は太いバンドを 1 本と認識する傾向が、C 解析者はややバンド認識のばらつきが大きい傾向が見られたが、4 人の解析者でいずれも菌株ごとに近似度約

92%以上と良好な結果が得られた（表 2）。解析者による認識バンド数のばらつきが少なかった画像と 4～5 本異なると認識された画像の比較から、1 菌株の画像でバンドの濃淡の差が大きい場合に認識バンド数がばらつきやすいと考えられた。PFGE 解析では、ソフトウェアの自動バンド認識を目視で補正することため、画像によって、あるいは解析者によってある程度バンド認識に差が生じる。しかしながら、デンドログラムは菌株ごとに近似度の高いクラスターを作っており、同一の画像を解析する場合には、解析者の主観や「くせ」は菌株の異同の判断に影響を与えないと推察された。

本研究で用いた PFGE 法のプロトコルは、従来法に比べて簡略化されており、最短でゲルブロックの作製を始めた翌日には判定可能であるが、より迅速な遺伝子型別法として IS-printing System が開発された。これまでにスクリーニング法として有用であることを確認してきたが、IS 型は結果を数値化できることから、近畿ブロックで分離される EHEC O157 について、IS 型のデータベースの構築を目指したが、そのためには IS 法の信頼性確保が必要であることから、10 施設で同一の菌株を用いた精度管理を行った。供試菌株に、陽性バンドに近いサイズの非特異バンドが増幅される株を選択したところ、のべ 5 施設で判定の異なる結果になった。IS キットの説明書どおりに反応液 5 μ L を泳動すると、バンドが太くなりすぎて近接のバンドと区別がつかない、あるいは移動度が異なって見えることが多く、各施設で至適電気泳動条件を得るためにか

なりの予備実験が必要であった。バンドの太さが Standard DNA と同程度になるよう泳動量を調整し、供試菌株の両端に Standard DNA や陽性対照の増幅産物を泳動することで改善されたが、試薬のロットによっては Standard DNA や陽性対照の泳動像が不明瞭な場合があり、メーカーのロット管理に問題があると思われた。自動電気泳動装置は判定が正確な上、アガロースゲル電気泳動に比べて泳動時間が短い点が優れていた。

1 施設で菌株 4 の判定結果（プライマー 2-02）の不一致が解消されなかったが、電気泳動画像によっては判定に注意が必要であることを共通認識として、データベースへの登録を開始した。複数の施設で同一 IS コードを示す株が分離されていたが、8月に発生した角切りステーキ食中毒事例の他には疫学情報を交換する事例はなかった。来年度以降は積極的にデータベースを活用し、同一時期に同一 IS コードを示す株が分離された場合は、各施設で PFGE を実施して画像を交換するなど、一見散発的な事例の関連性を明らかにしていきたい。

E. 結論

EHEC の PFGE 型別法を近畿ブロックで共通の疫学指標に用いるため、精度管理を実施し、バンドの濃淡の差が解析者による認識バンド数の違いにつながるものの、画像解析では高い近似度を得ることができた。また、IS-printing System は EHEC O157 型別

法としてスクリーニングに有用であるが、非特異バンドが増幅されることもあり、データの信頼性確保のために明瞭な電気泳動画像を得る必要があり、非特異バンドとの判別に注意を要すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也, 川津健太郎, 神吉政史, 依田知子, 井上清, 柴田敏之, 萩原粒子, 山本サエコ, 中田栄子, 長澤登美代, 伊吹てるみ, 濱石裕紀: 保育所における EHEC O157 集団感染事例、2008 年一大阪府, 病原微生物検出情報, 30: 77-78, 2009
- 2) 勢戸和子: STEC, 食品由来感染症と食品微生物 (仲西寿男, 丸山務監修), 中央法規出版, 東京, 2009

2. 学会発表

- 1) 勢戸和子, 田口真澄, 坂田淳子, 原田哲也, 寺嶋淳: 志賀毒素産生性大腸菌 O157 の遺伝子型別における IS-printing System と PFGE 法の比較, 第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2009 年 10 月, 大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 PFGE および IS-printing System の精度管理に用いた配布株

菌株No.	菌種 (毒素型)	分離年	感染研Type No.
1	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2009	d496
2	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2009	e91
3	EHEC O157:H7 (VT2)	2009	e89
4	EHEC O157:H7 (VT2)	2009	e149
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2009	e153
6	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2009	e223

表2 EHEC O157 の PFGE 画像解析結果

菌株	解析者	近似度(%)	100%一致画像数 ^{a)}	認識バンド数(本)
1	A	100.0	10(21)	21
	B	94.1	6(21), 3(22)	21, 22, 24
	C	96.8	5(21), 3(22)	21, 22, 23
	D	97.7	8(21)	21, 22
2	A	95.5	5(22), 2(23)	21, 22, 23
	B	96.2	4(22), 2(21)	20, 21, 22, 23
	C	94.8	3(20), 2(21), 2(22)	20, 21, 22, 23
	D	94.7	4(22), 3(21)	21, 22, 23
3	A	94.4	7(19), 2(17)	17, 18, 19
	B	95.4	5(18)	17, 18, 19, 20
	C	92.3	3(18), 2(18), 2(17)	16, 17, 18, 19, 20
	D	95.4	4(19), 3(17), 2(18)	17, 18, 19
4	A	97.4	9(20)	19, 20
	B	94.7	8(20)	19, 20
	C	97.1	6(20), 2(19)	19, 20, 21
	D	97.4	8(20)	19, 20
5	A	100.0	10(18)	18
	B	97.0	7(19)	18, 19, 20
	C	94.4	3(17), 2(18), 2(19)	17, 18, 19, 20
	D	93.9	6(18)	18, 19
6	A	96.8	8(21)	20, 21, 22
	B	96.3	4(22), 3(21), 2(23)	20, 21, 22, 23
	C	91.9	3(21), 2(21), 2(20)	20, 21, 22, 24
	D	93.6	4(20), 2(22)	20, 21, 22, 23, 24

a) カッコ内は認識バンド数

表3 EHEC O157 の IS-printing System 判定結果—プライマーセット 1

菌株	施設	プライマーNo.と増幅サイズ(bp)																非特異 バンド (bp)		
		01 974	02 839	03 742	04 645	05 595	06 561	07 495	08 442	09 405	10 353	11 325	12 300	13 269	14 241	15 211	eac 185		16 171	hlyA 137
1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	3	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	4	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	5	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	6	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	8	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	9	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	11	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
	2	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	790, 220
2		0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	773, 226	
3		0	1	<u>0</u>	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	800, 220	
4		0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	800	
5		0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	782, 217	
6		0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	<u>1</u>	1	1	790, 220	
8		0	1	<u>0</u>	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	<u>1</u>	1	1	220	
9		0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	780, 220	
10		0	1	<u>0</u>	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	780, 220	
11		0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	800, 220	
3		1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	400
	2	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	4	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	5	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	6	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	8	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	9	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	10	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	11	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
	4	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	
2		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	459, 353	
3		0	0	0	1	0	0	1	0	1	<u>0</u>	0	0	1	0	1	1	1	460	
4		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	470	
5		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	358	
6		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	470	
8		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	470	
9		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	470, 370	
10		0	0	0	1	0	0	1	0	1	<u>0</u>	0	0	1	0	1	1	1	480, 360	
11		0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	470	
5		1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	>974
	2	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1262	
	3	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1421	
	4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		
	5	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		
	6	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		
	8	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		
	9	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		
	10	1	0	<u>0</u>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		740
	11	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1		1300
	6	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1		1
2		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
3		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
4		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
5		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
6		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
8		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
9		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
10		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
11		1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1		

1: 増幅あり、0: 増幅なし、アンダーラインは再提出時に判定が変更された結果

表4 EHEC O157のIS-printing System 判定結果—プライマーセット2

菌株	施設	プライマーNo.と増幅サイズ(bp)																	非特異 バンド (bp)		
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2		stx1	
		987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181		151	
1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1		
	2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	929	
	3	0	1	<u>1</u>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	900	
	4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
	5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1		
	6	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	940	
	8	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	960	
	9	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	900	
	10	0	1	<u>1</u>	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	940	
	11	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	900	
	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	
2		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	929	
3		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
4		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
5		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
6		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
8		<u>1</u>	1	<u>0</u>	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1400	
9		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
10		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
11		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1		
3		1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
	2	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	915,487	
	3	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0		
	4	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0		
	5	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0		
	6	0	<u>1</u>	<u>0</u>	1	0	0	0	<u>0</u>	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	940	
	8	0	1	<u>0</u>	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	960	
	9	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	900	
	10	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	940	
	11	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
	4	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
2		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	901,680	
3		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
4		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
5		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
6		<u>1</u>	1	<u>0</u>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
8		<u>1</u>	1	<u>0</u>	0	0	0	1	0	<u>0</u>	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
9		1	<u>0</u>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	830	
10		1	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	800,700,680	
11		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
5		1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	>987
	2	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1041,901,680	
	3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1000	
	4	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1000	
	5	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1121	
	6	1	1	<u>0</u>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
	8	1	1	<u>0</u>	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1100	
	9	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1000	
	10	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	680	
	11	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1050	
	6	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
2		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	670	
3		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
4		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
5		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
6		0	<u>1</u>	1	<u>0</u>	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
8		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	960	
9		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		
10		0	<u>1</u>	<u>1</u>	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	940	
11		0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1		

1: 増幅あり、0: 増幅なし、アンダーラインは再提出時に判定が変更された結果

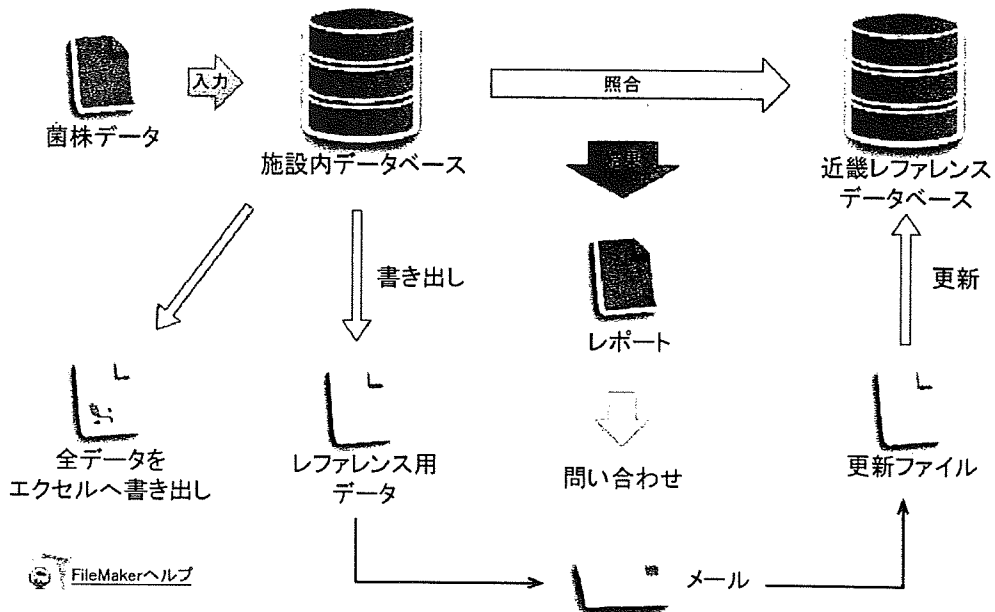


図1 近畿ブロック IS-printing System データベースのワークフロー画面

菌株データを登録

以下に各データ(白いフィールドは必須項目)を入力してから「新規登録」ボタンを押す

このデータを新規登録

ISの入力データをリセット

菌株番号 血清型 発症日・検体採取日等 管轄保健所 住所・地域

set 1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 eae 16 hivA エクストラバンド

set 2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 stx2 stx1

コード: 備考

図2 近畿ブロック IS-printing System データベースへの登録画面

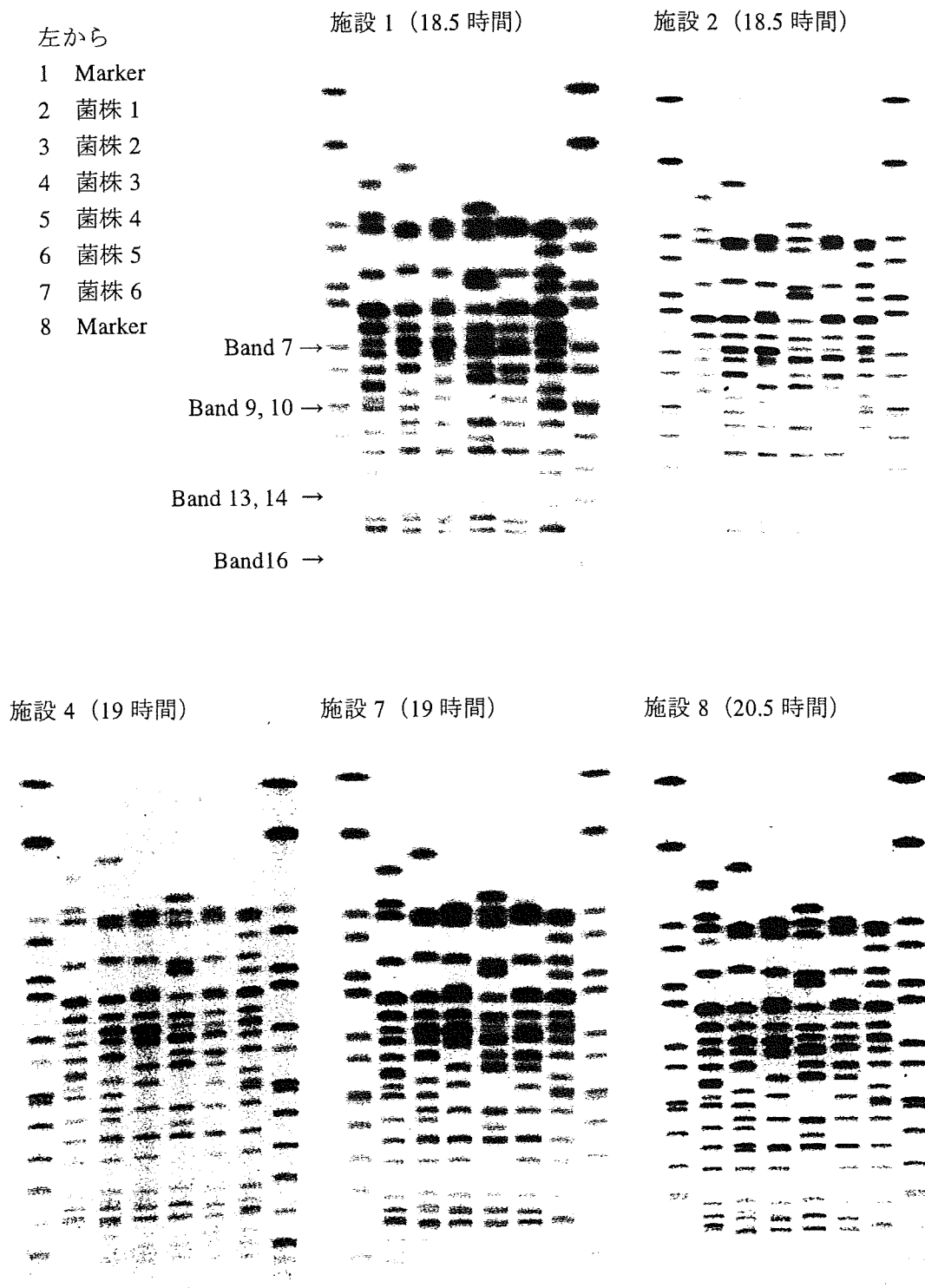
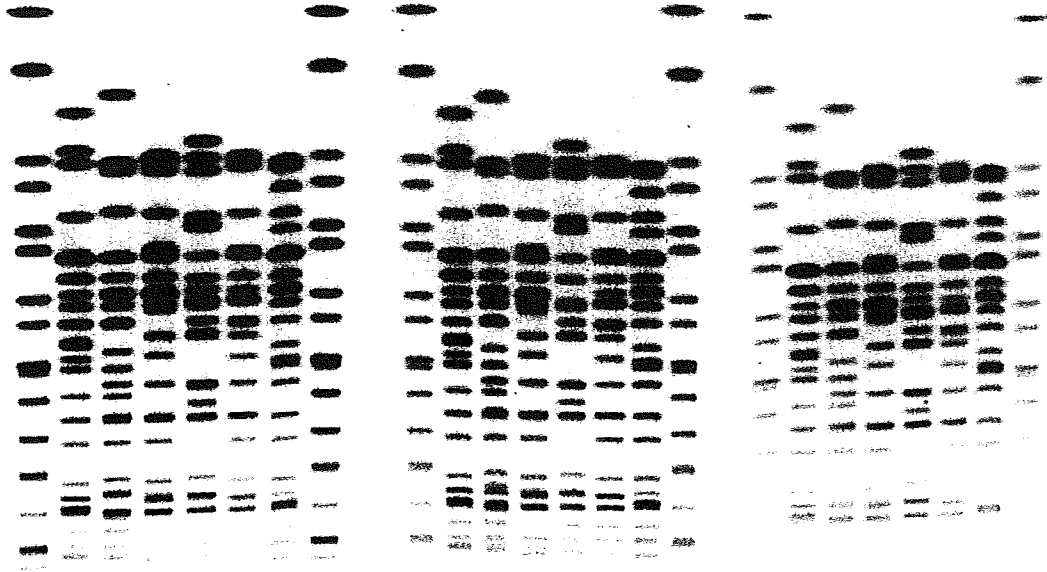


図3 EHEC O157 精度管理株の PFGE—各施設の画像 (カッコ内は泳動時間)

施設 9 (19 時間)

施設 10 (19.5 時間)

施設 11 (19.5 時間)



左から

- 1 Marker
- 2 菌株 1
- 3 菌株 2
- 4 菌株 3
- 5 Marker
- 6 菌株 4
- 7 菌株 5
- 8 菌株 6
- 9 Marker

施設 3 (18 時間)

施設 6 (19 時間)

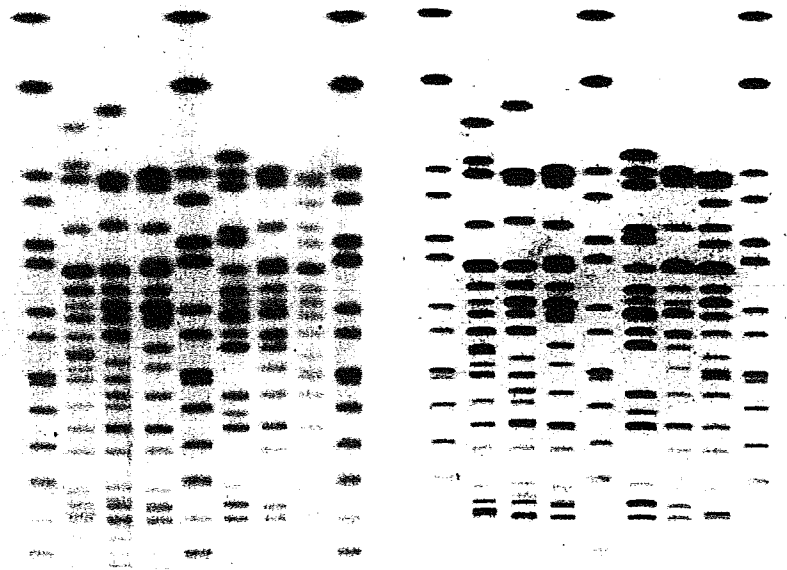


図 3 EHEC O157 精度管理株の PFGE—各施設の画像 (つづき)