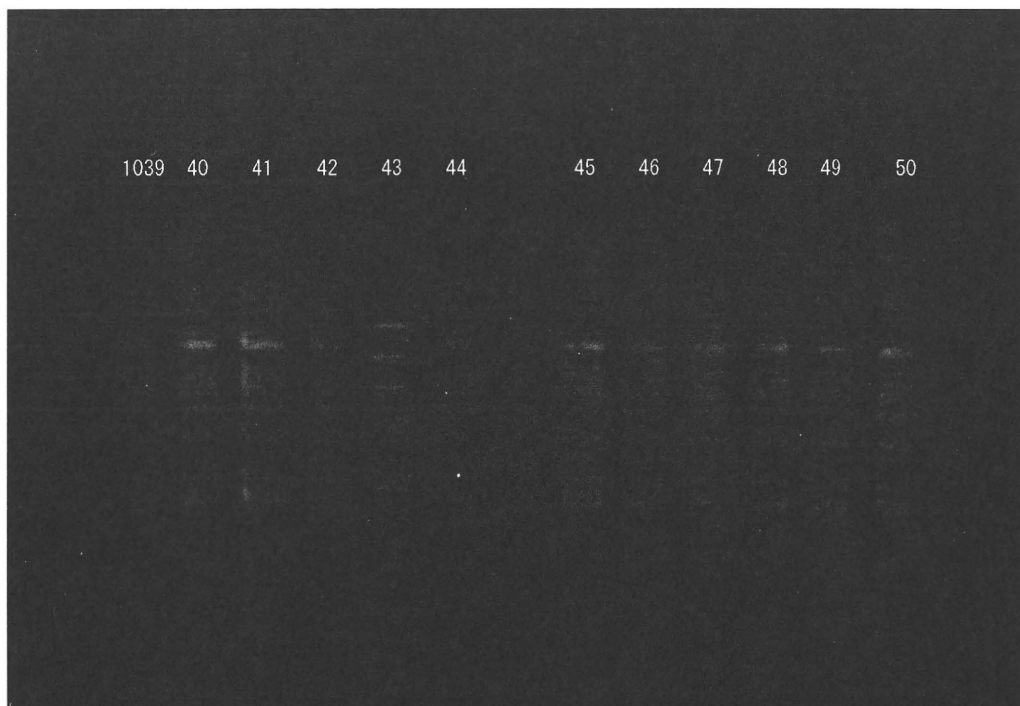


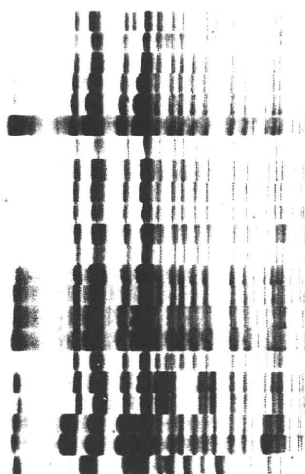
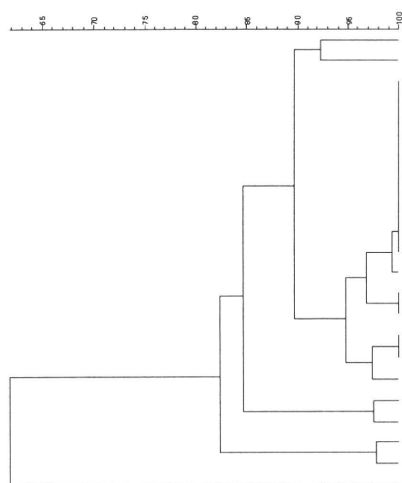
026 PFGE ☒



岡崎市
PFGE 活用例

DnaE (Tat15k-15M-H100KS-0100 [D-0k-1000k])
EHEC

EHEC

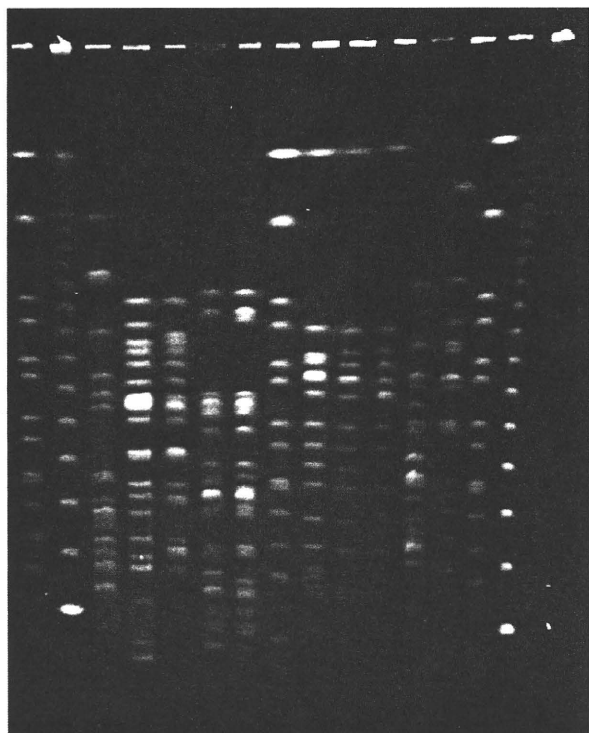


A-120-2	EHEC O157:H7	1+2	f142
A-42	EHEC O157:H7	1+2	
A-108-2	EHEC O157:H7	1+2	63
A-115-2	EHEC O157:H7	1+2	63
A-117-2	EHEC O157:H7	1+2	63
A-113	EHEC O157:H7	1+2	63
A-119	EHEC O157:H7	1+2	63
A-123	EHEC O157:H7	1+2	63
A-124	EHEC O157:H7	1+2	63
A-121-2	EHEC O157:H7	1+2	61
A-122-2	EHEC O157:H7	1+2	61
A-118	EHEC O157:H7	1+2	63
A-111-2	EHEC O157:H7	1+2	61
A-112-2	EHEC O157:H7	1+2	61
A-109	EHEC O157:H7	1+2	61
A-110	EHEC O157:H7	1+2	63
A-43	EHEC O157:H7	1+2	
A-106-2	EHEC O157:H7	1+2	c272
A-107-2	EHEC O157:H7	1+2	c272
A-114-2	EHEC O157:H7	1+2	63
A-116-2	EHEC O157:H7	1+2	e305(63 one band diff)
A-105-2	EHEC O103	1+2	

菌株No.	分離日	由来	備考
A-42	2007/9/10	A1焼肉店従業員由来 (H19.9月検出株)	
A-43	2007/9/14	B焼肉店従業員由来 (H19.9月検出株)	
A-105		ウシ由来株 (O103)	
A-106	2010/6/30	京都旅行事例	同一事例
A-107	2010/6/30	京都旅行事例	
A-108	2010/7/4	保菌者 (C焼肉店)	A-108~ A-113同 一家族
A-109	2010/7/5	保菌者 (C焼肉店)	
A-110	2010/7/5	保菌者 (C焼肉店)	
A-111	2010/7/1	患者 (C焼肉店)	
A-112	2010/7/2	患者 (C焼肉店)	
A-113	2010/7/7	保菌者 (C焼肉店)	
A-114	2010/7/5	患者 (D焼肉店)	A-116と同一事例
A-115	2010/7/6	患者	A-117と同一家族
A-116	2010/7/6	患者 (D焼肉店)	A-114と同一事例
A-117	2010/7/9	保菌者	A-115と同一家族
A-118	2010/7/7	患者 (E焼肉店)	
A-119	2010/7/8	患者 (A2焼肉店)	
A-120	2010/7/13	患者 (A1焼肉店)	
A-121	2010/7/6	患者 (B焼肉店)	同一事例
A-122	2010/7/16	保菌者 (B焼肉店)	
A-123	2010/7/28	患者 (A1焼肉店)	同一事例
A-124	2010/8/1	A1焼肉店従業員由来 (A-42と同一従業員)	

分離株の PFGE 泳動図

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮



レーンNo.	菌株No.	菌種	備考
1	E-80	S.Braenderup	
2	ラムダーマーカー		
3	***	E.coli	
4	***	E.coli	
5	***	E.coli	
6	B-22	S.sonnei I	H22.10月 食中毒事例株(患者)
7	B-17	S.sonnei I	H19.9月 患者分離株
8	E-80	S.Braenderup	
9	E-139	S.Infantis	H22.9月 鶏肉分離株
10	E-134	S.Infantis	H22.3月 鶏肉分離株
11	E-83	S.Infantis	H21.7月 鶏肉分離株
12	***	E.coli(ESBL)	
13	***	E.coli(ESBL)	
14	E-80	S.Braenderup	
15	ラムダーマーカー		

① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮

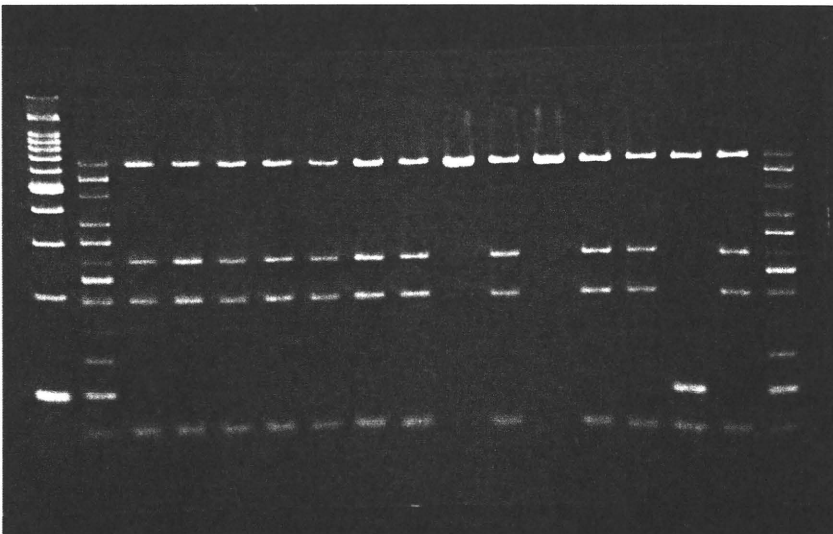


レーンNo.	菌株No.	菌種
1	E-80	S.Braenderup
2	A-105	EHEC O157
3	A-106	EHEC O157
4	A-107	EHEC O157
5	A-108	EHEC O157
6	A-111	EHEC O157
7	ラムダーマーカー	
8	E-80	S.Braenderup
9	A-112	EHEC O157
10	A-114	EHEC O157
11	A-115	EHEC O157
12	A-116	EHEC O157
13	***	
14	***	
15	E-80	S.Braenderup

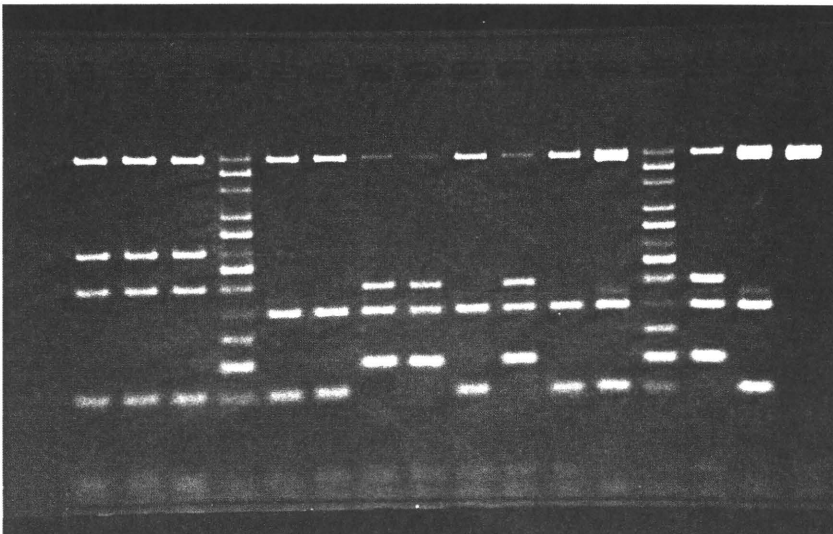
POT 法

Reaction mixture 1

M p G G G G G G G G G G G G G G p
o 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 o
s 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 s

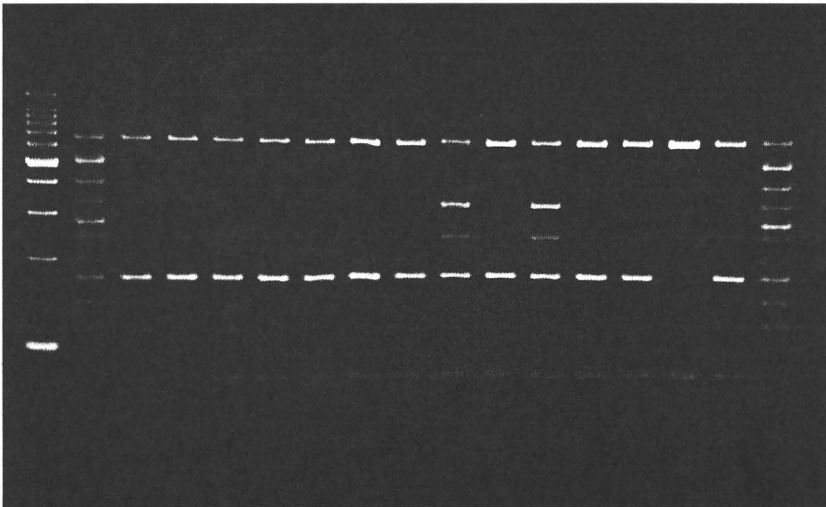


G G G p G G G G G G G G p G G G
4 4 4 o 6 6 6 6 6 7 7 7 7 o 7 7 7
3 4 5 s 6 7 8 9 9 0 1 2 3 s 4 5 7



Reaction mixture 2

M p G G G G G G G G G G G G G G p
 o 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 o
 s 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 s



M G G G p G G G G G G G G p G G G
 4 4 4 o 6 6 6 6 6 7 7 7 7 o 7 7 7
 3 4 5 s 6 7 8 9 9 0 1 2 3 s 4 5 7

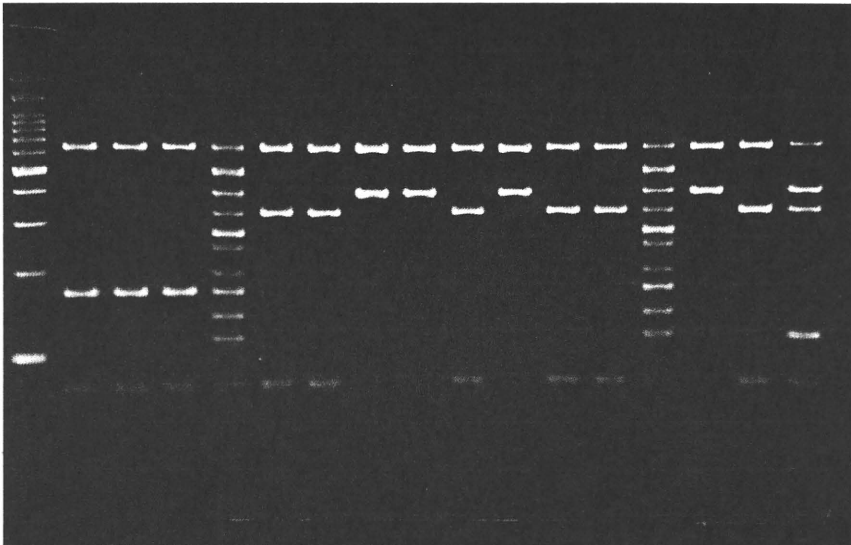


表1. 使用菌株の概要

菌株 No.	血清型	毒素型	事例	PFGE 型別 (感染研結果)
1	O157:H7	VT1, 2	A	f23
2	O157:H7	VT1, 2	B	f75
3	O157:H7	VT2	C	f74
4	O157:H7	VT1, 2	D	f140
5	O157:H7	VT1, 2	E	f143
6	O157:H7	VT1, 2	F	f198
7	O157:H7	VT1, 2	G	f199
8	O157:H7	VT2	H(家族内)	f372
9	O157:H7	VT2		f373(f372 と 1 バンド違い)
10	O157:H7	VT1, 2	I	f379
11	O157:H7	VT1, 2	J(家族内)	e570
12	O157:H7	VT1, 2		c293(e570 と 1 バンド違い)
13	O157:H7	VT1, 2	K	f75
14	O157:H7	VT1, 2	L	f75
15	O157:H7	VT1, 2	M	f199
16	O157:H7	VT1, 2	N	f199
17	O157:H7	VT1, 2	O	f199

表2. 腸管出血性大腸菌O157 12株のIS-printing Systemの結果

菌株 No.	1st set Primer Mix												2nd set Primer Mix												事例	<参考> 感染研 PFGE 結果														
	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	1-16	hiyA	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			
	974	839	742	645	595	581	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	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	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	A	f23			
2	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	B	f75		
3	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	C	f74	
4	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	D	f140	
5	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	E	f143	
6	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	F	f198	
7	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	G	f199	
8	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	H	f372
9	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	H	f373 (f372と 1バンド違い)
10	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	I	f379
11	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	J	e570
12	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	J	e293 (e570と 1バンド違い)

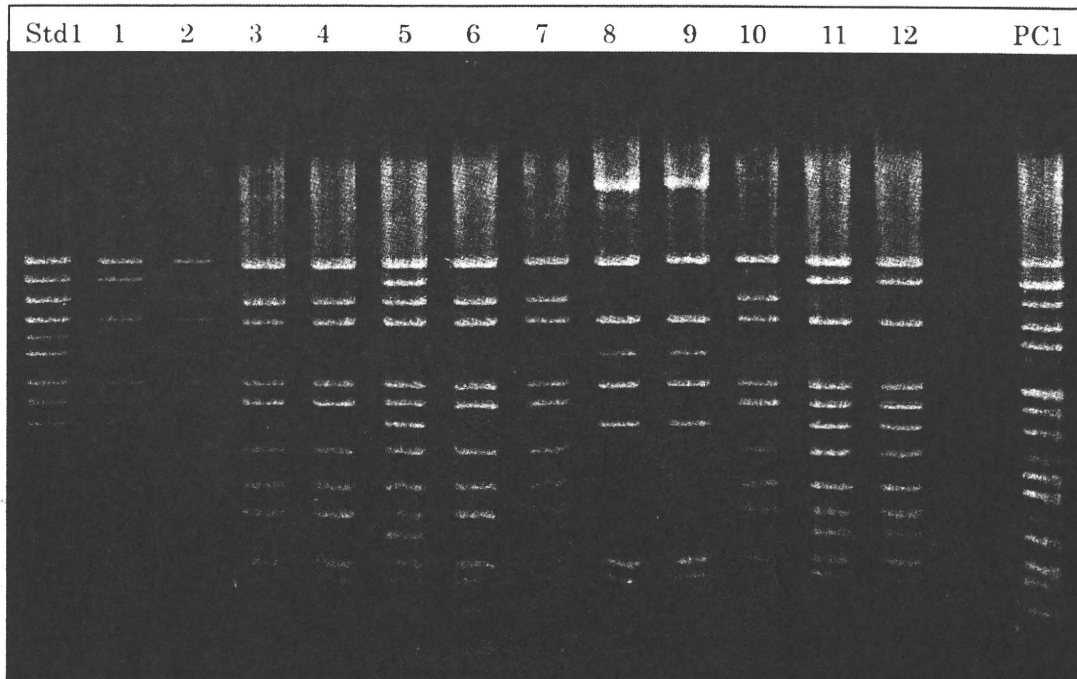


図 1. IS-printing の結果(1st set Primer Mix) (No.1~12 抜粋)

Std1 : 1st set Standard DNA

PC1 : 1st set ポジティブコントロール

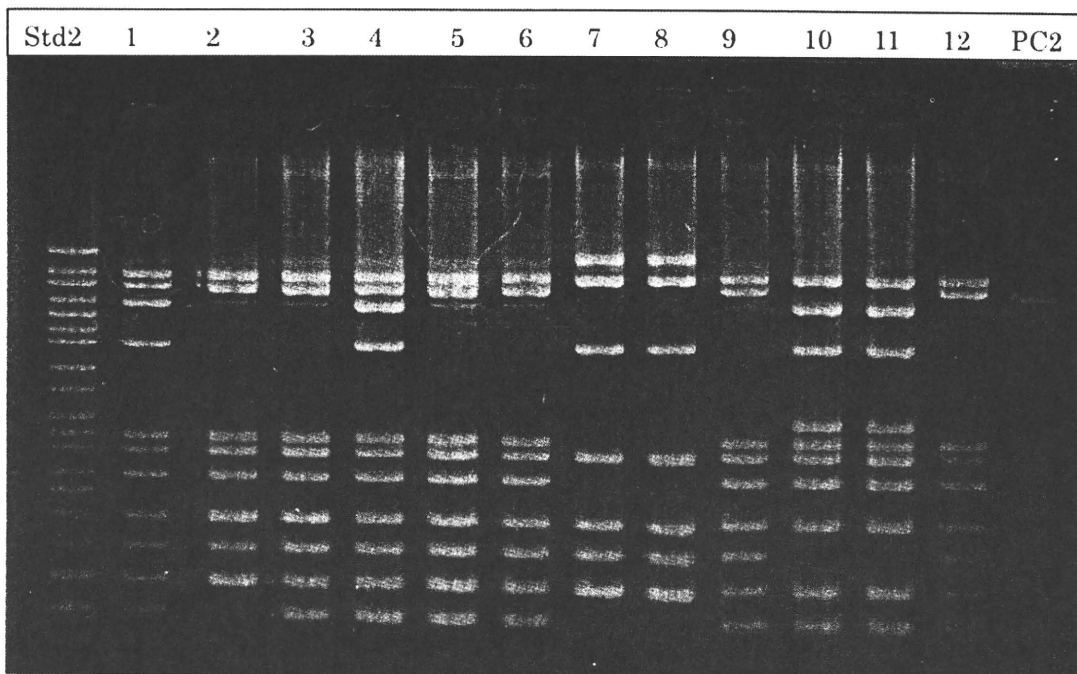


図 2. IS-printing の結果(2nd set Primer Mix) (No.1~12 抜粋)

Std2 : 2nd set Standard DNA

PC2 : 2nd set ポジティブコントロール

表2. POT法の結果

POT No. size 菌株No	菌株情報		Reaction mixture 1														Reaction mixture 2													
	由来	コアラーゼ 型	エンテロキシン 型	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	fem	1-4	1-5	1-6	1-7	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7				
				601	530	449	355	304	271	228	197	161	131	104	81	601	477	388	320	273	243	197	171	140	115	95	78			
1	患者A糞便①	判定不能	C	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1				
2	患者A糞便②	IV	A~E(-)	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1					
3	患者B糞便①	判定不能	A~E(-)	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1					
4	患者B糞便②	I+VII	C	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0					
5	患者C糞便①	VII	B	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
6	患者C糞便②	VII	A~E(-)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
7	患者D糞便①	IV	A~E(-)	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0					
8	患者D糞便②	IV	A~E(-)	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0					
9	患者E糞便①	判定不能	A~E(-)	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0					
10	患者E糞便②	判定不能	A~E(-)	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0					
11	従業員G 手指拭き取り①	VII	A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1					
12	冷蔵庫内部 拭き取り	VII	A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1					
13	フキン 拭き取り①	VII	A	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1					
14	フキン 拭き取り②	判定不能	A~E(-)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0					

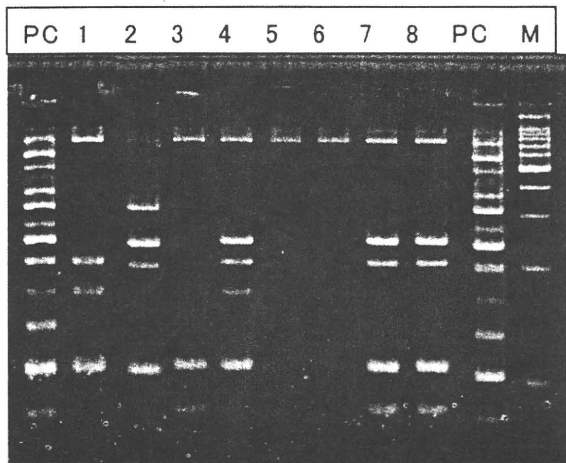


図1. POT 法の結果(Reaction mixture 1) (No.1~8 抜粋)

PC: ポジティブコントロール

M : 100bp DNA ladder (TaKaRa Bio)

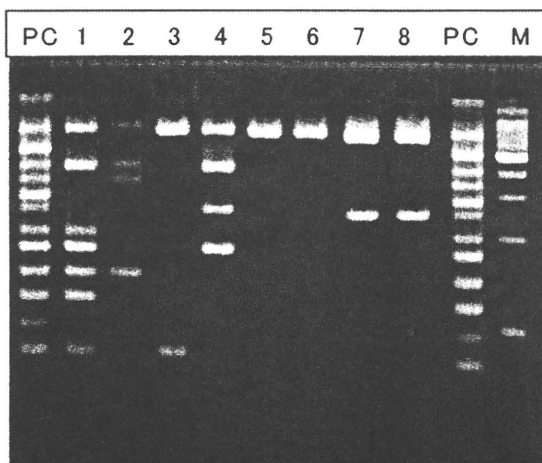


図2. POT 法の結果(Reaction mixture 2) (No.1~8 抜粋)

PC: ポジティブコントロール

M : 100bp DNA ladder (TaKaRa Bio)

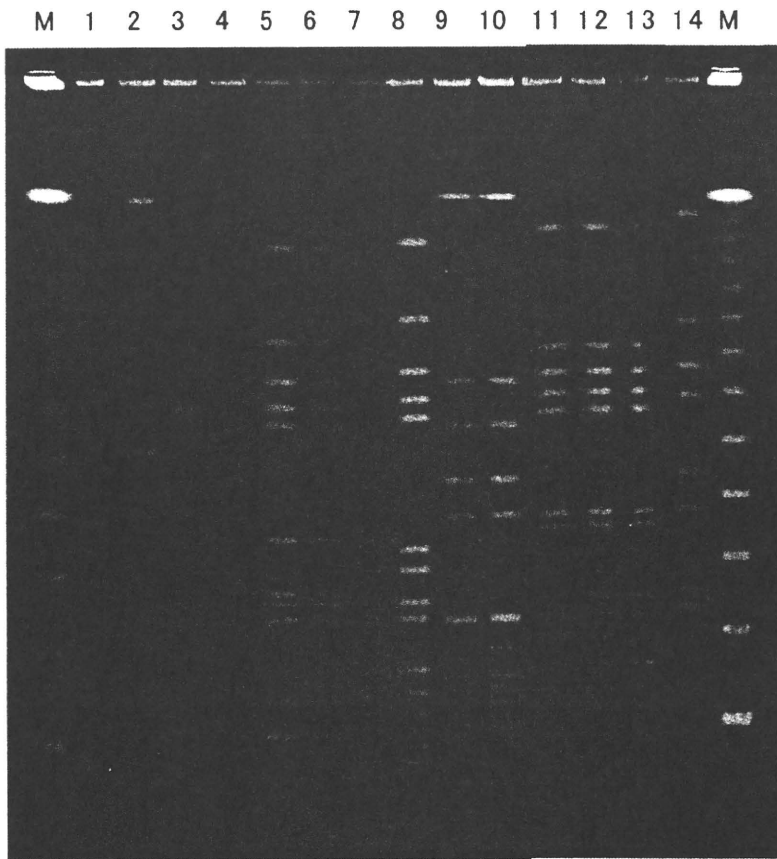
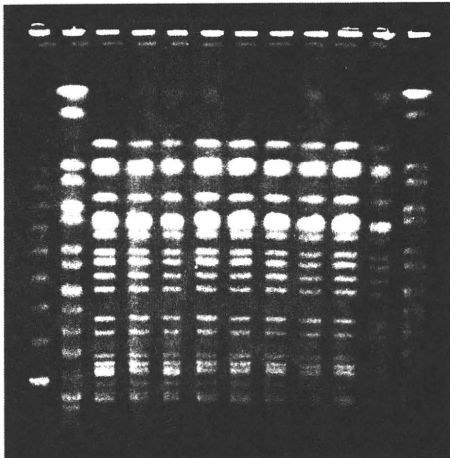


図1. 食中毒事例から分離された黄色ブドウ球菌 14 株の PFGE 解析結果
M: Lambda Ladder (BIO-RAD)

愛知県

食中毒事例由来 0157 の PFGE 泳動図



IS printing system

1st set

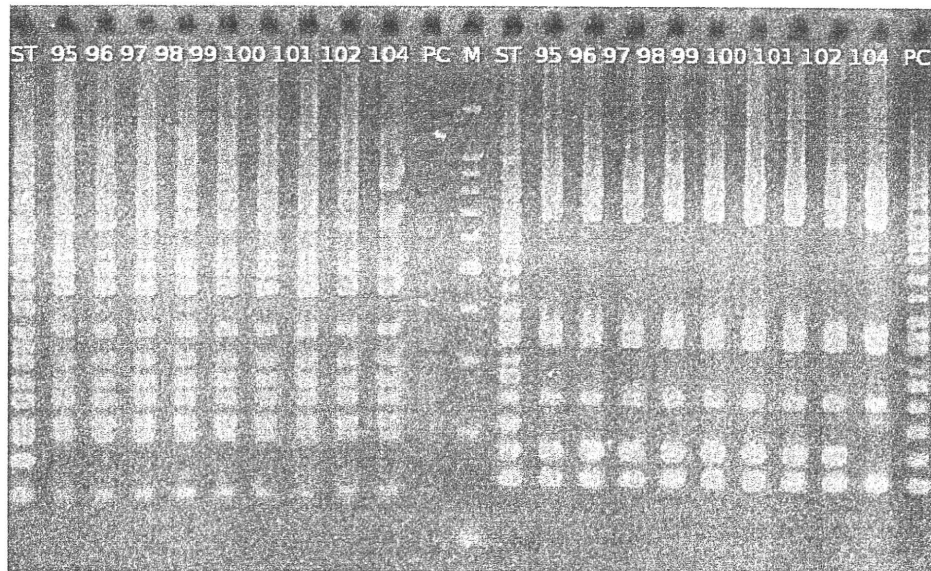
Primer No.	Size	10-95	10-96	10-97	10-98	10-99	10-100	10-101	10-102	10-104	10-105	10-112	10-113	10-114	10-115	10-116	10-120	10-121	10-122
1-01	974	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
1-02	839	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-03	742	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-07	495	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
1-09	405	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
1-10	353	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eae	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

2nd set

Primer No.	Size	10-95	10-96	10-97	10-98	10-99	10-100	10-101	10-102	10-104	10-105	10-112	10-113	10-114	10-115	10-116	10-120	10-121	10-122
2-01	987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-02	861	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-04	710	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-05	642	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-07	555	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
2-08	499	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-09	449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-11	358	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
stx2	181	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1

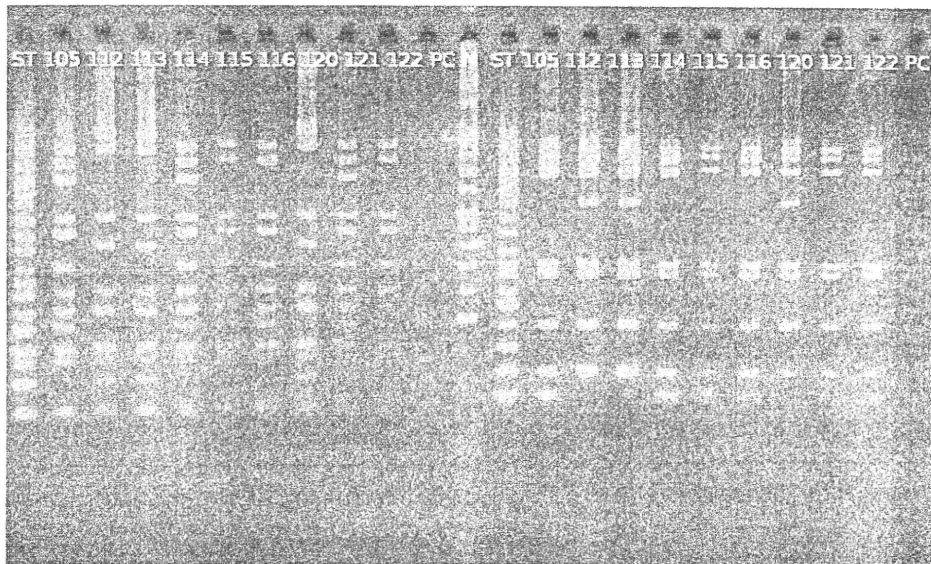
First set

Second set



First set

Second set



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 22 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、河野智美	滋賀県衛生科学センター
	中嶋智子、杉浦伸明	京都府保健環境研究所
	木澤正人	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
	濱 夏樹	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、河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
	原田哲也、神吉政史	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌の中で最も分離頻度の高い血清群 O157 について、IS-printing System (IS) 法とパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の信頼性確保のため精度管理を実施するとともに、近畿ブロック IS データベースの充実を図った。IS 法では、非特異バンドが増幅される株で 3 施設に誤判定があり、このような場合にも正確な判定が可能となる十分なバンド間隔の電気泳動画像が必要であると考えられた。データベースについては、2011 年 3 月 4 日までに 1,134 株の型別成績が登録され、同一 IS コードを示す株が複数の地域で発生していたケースもみられたが、積極的に疫学情報を交換するには至らず、患者発生から IS 型登録までの日数短縮や疫学情報の交換に踏み込む条件の設定が課題である。PFGE 法は、毎年精度管理を継続してきたことで施設間差を最小にとどめていると考えられ、10 施設から電送された PFGE 画像は、画像解析ソフトを使用した 4 人の解析者によって菌株ごとに高い近似度が得られた。Multilocus variable-number tandem repeat analysis 法の導入に向け、4 施設で同一のテンプレートを解析したところ、1 施設で測定値が小さくなる傾向がみられたものの他の 3 施設では同一の結果が得られ、近畿ブロックで共通の疫学指標として使用可能

であると考えられた。しかしながら、6～18bpのrepeat unitのくり返し数の違いで型別するため、わずかな測定値の差が判定結果に影響を与えることもあり、問題点の再現性を確認し原因を究明することが必要である。

A.研究目的

近畿地方は2府4県が互いに通勤圏内にあり、食中毒や感染症の患者が複数の自治体で探知されることが多い。各府県の事例が同一の感染源によるものか否かを見極めることは、原因追及だけでなく感染拡大防止にも重要で、疫学情報とともに、分離された病原体相互の関連性について科学的検証が必要とされる。

このような背景から、近畿ブロック内の地方衛生研究所（地研）で実施される遺伝子解析法の信頼性確保は重要な課題であり、本研究では腸管出血性大腸菌（EHEC）の中で最も分離頻度の高い血清群 O157 について、IS-printing System (IS) 法とパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法の精度管理を実施した。また IS 法については、昨年度その活用法のひとつとしてデータベースを立ち上げたが、今年度はデータの充実をはかった。さらに第三の遺伝子解析法として、数塩基のくり返し配列数を比較する Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法を共通の疫学指標として使用するため、施設間差を検討した。

B.研究方法

1. 供試菌株

IS法およびPFGE法の精度管理には、2010年に大阪府で分離された EHEC O157 6株（菌株1～6）を用い、*Xba*I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、保存された EHEC O157 を使用した。

MLVA法には、2005～2008年に大阪府内で分離された8株の EHEC O157 を使用し、95℃ 10分間加熱して作製したテンプレートを3施設に配布した。

2. IS法

IS法は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を使用し、Standard DNAの18本のバンドが明瞭に分離されるよう電気泳動を行って、プライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定した。非特異バンドが増幅された場合はそのサイズを記載した。電気泳動は、精度管理に参加した9施設では3%アガロースゲル（NuSieve GTG：SeaKem GTG := 2:1）と0.5xTBEバッファを用い、各施設で泳動量と泳動時間を設定した。データベースにのみ参加した1施設は自動電気泳動装置 QIAxcel（QIAGEN）を使用した。

3. IS型データベース

昨年度の本研究で作成したデータベースに、各施設で分離、収集した EHEC O157 の IS 型別成績を追加した。すなわち、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、IS データは、十進数に変換してプライマーセット1、セット2の順に組み合わせた「ISコード」としてもデータベース上に表示した。

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。

4. 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°C 一夜、制限酵素 *Xba* I 処理を 37°C 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 *Xba* I 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。

5. 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 5 人の解析者に送付した。

3 施設では Fingerprinting II ver. 3 (Bio-Rad) を、1 施設では BioNumerics ver. 6.1 (Applied Maths) を使用し、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。

残りの 1 施設では、Lane & Spot Analyzer ver. 6.0 と Lane Analyzer ver. 3.0 (アトー) を使用して各バンドの分子量を求めた後、菌株ごとにバンド数、各バンドを約 100kb ごとにグループ化した分子量とバンド出現数を変数として正規化し、ユークリッド距離を計算して Ward 法でデンドログラムを作成した。クラスター解析には Black-Box (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.html>) を使用した。

6. MLVA法

感染研 MLVA プロトコール (細菌第一部 2008 年 7 月現在) に準じ、Locus 10 は new version に変更して実施した (表 2)。プライマー (インビトロジェン) は公衛研で購入して研究協力者 (施設 X および Y) に送付し、その他の試薬は各施設のものを使用した。フラグメント解析には Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer を使用し、測定した各 Locus の増幅サイズを公衛研に集約して比較した。なお、蛍光発色強度が高く結果測定に支障をきたす場合には、PCR

反応液のプライマー濃度を半量にするか、フラグメント解析時に PCR 産物を 250〜1000 倍に希釈することを指示した。

施設 Z は、感染研プロトコールと識別領域は同一であるが標識蛍光色素の異なるプライマーによる MLVA 変法 (JJID, 63: 152-153, 2010) で実施し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer でフラグメント解析を行った後、独自の方法で補正した増幅サイズを報告した。

C. 研究結果

1. 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、菌株 1〜4 については全施設で判定が一致していた (表 3)。菌株 5 では、セット 1 で 800bp 付近の非特異な増幅バンド (図 1 矢印 a) を 1-03 プライマーの増幅ありと判定した施設が 3 箇所あり、再泳動あるいは再判定の結果、非特異バンドとの認識に修正された。菌株 6 は 9 施設の判定が一致したものの、施設 4 は 2-09 プライマーを増幅なしと判定し、他と異なる結果になった (図 1 矢印 b)。

2. IS型データベース

2010 年 4 月〜2011 年 2 月の 11 か月間に、データベースを 24 回更新した。2011 年 3 月 4 日現在の登録数は 1,134 株で、255 タイプの IS 型に区別されていた。このうち登録数の最も多い IS コードは「249727 116975」で、2009 年に大阪府で発生した保育園事例由来 10 株を含む 68 株が該当した。

2010 年の分離株で登録数 10 株以上の IS

コードは 12 タイプあった (表 4)。このうち IS コード「216959 117231」が最も多く、7 月から 10 月の約 4 ヶ月間に 12 の家族事例を含む 40 株の分離が 4 施設から登録された。一方、3 施設で 11 株が分離された IS コード「249727 116974」は、発症時期が 5 月 14〜23 日と集中していた。

3. EHEC O157 の PFGE 精度管理

10 施設から電送された PFGE 画像は、施設によってコントラストに差がみられたものの、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、画像解析に適していた (図 2)。

4 人の解析者が作成したデンドログラムは、いずれも菌株ごとにクラスターを作っており、その近似度は 94.2〜100%であった (図 3〜6、表 5)。中でも菌株 3 は、いずれの解析者でも画像による認識バンド数の違いがなく、3 人の解析者で 10 画像が、D 解析者も 9 画像が 100%一致していた。菌株 2、菌株 4 および菌株 6 は、いずれの解析者でも画像による認識バンド数の違いが 1 本以内であり、95.2〜100%のクラスターを作っていた。菌株 5 は、施設 4 の画像でマーカーの Band 5 付近にバンドが 1 本多かったが (図 2 矢印 c)、他の施設の画像は 5〜8 画像が 100%一致し、いずれの解析者も近似度は 94.2〜97.0%であった。菌株 1 は、解析者による認識バンド数の違いが 4 本あったが、解析者ごとに 6〜9 画像が 100%一致しており、95〜97.4%の近似度が得られた。

E 解析者の作成したデンドログラムでは、解析方法が異なるものの、菌株ごとにクラ

スターを作り、その近似度は 80～92%であった (図 7)。

4. MLVA法の施設間差

公衛研および 3 施設から報告された増幅サイズを比較したところ、Locus によってまたは菌株によって施設間差がみられた (図 8)。Reaction 1 では、すべての株で施設 X の測定値が他施設に比べ Locus 25 は 2bp 程度、Locus 3 は 3～5bp 程度、Locus 34 は 3bp 程度小さく、Locus 9 は菌株 5～7 の 3 株で 4～7bp 程度小さい値であった。Reaction 2 は、Locus 19 で施設 X の測定値がすべての株で 4bp 程度小さかったが、Locus 17、Locus 36 および Locus 37 は各施設の測定値に 1bp 程度のばらつきしか見られなかった。Reaction 3 の Locus 10 では、増幅産物が確認されなかった菌株 No.1 を除く 7 株について、施設 X の測定値が他施設と比較し、4bp 程度小さく測定された。

D. 考察

IS 法は結果を数値化できることから、近畿ブロック内で分離される EHEC O157 の IS 型をデータベース化し、各自治体で一見散発的に発生した事例の関連性を迅速に探知することを目指している。そのためには、各施設で実施される IS 型別の信頼性確保が重要であり、本年度も精度管理を実施した。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 (菌株 5) を選択したところ、3 施設で誤判定がみられた。このうち 1 施設は、電気泳動画像からバンド間隔が不十分なために判定困難であったと

考えられ、泳動時間の延長を依頼し改善された。他の 2 施設は、非特異バンドの増幅を考慮せずに判定したことによる判定ミスであると考えられた。施設 4 で、菌株 6 の 2-09 プライマーの判定が異なった点については、再泳動によっても Standard DNA よりサイズが小さいと判定された。他のバンドに比べて増幅が弱いことも判定に影響を与えており、18 本の陽性対照が均等に増幅される反応条件について、一律に取扱説明書どおりに実施するのではなく、各施設の遺伝子増幅装置に適した反応条件を検討する必要があると考えられた。

これらの問題点の解決には、試薬に添付の Standard DNA や陽性対照 Template Mix の品質保証が欠かせないが、今年度の購入ロット (Lot. O2252C4) は陽性対照 Template Mix の増幅が悪い傾向がみられた。昨年度も Standard DNA や陽性対照の泳動像が不明瞭なロットがあり、メーカーには品質管理の徹底を望みたい。

IS 型データベースについては、登録数は 512 株から 1,134 株へと大幅に増加したものの、積極的に疫学情報を交換するようなケースはなかった。各施設で医療機関等から分離株を入手し、IS 型別を実施してデータベースに登録するまでに相当な日数がかかっていることが問題点として考えられる。また、同一 IS コードの株が登録されていても、分離時期が異なった場合には他施設への問い合わせを躊躇していると推察される。少なくとも IS コード「249727 116974」のように、5 月中旬に集中して発生した株については、登録時期が遅れていても積極的に疫

学情報を調査すべきであった。この他にも、近畿ブロック内で数ヶ月間に渡って同一 IS コードの株が複数タイプ分離されており、来年度は分離時期や地域など疫学情報を交換する条件設定を課題としたい。

PFGE 法については、毎年精度管理を継続することで施設間差を最少にとどめていると考えられた。プロトコールは標準化されているものの、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、電気泳動装置や画像撮影装置の維持管理も重要である。10 施設から電送された PFGE 画像の中には、コントラストのやや不明瞭な画像もみられたが、マーカの Band 16 付近までバンド認識が可能であり、各解析者が目視補正することで解析に問題はなかった。また、解析者によって認識バンド数には多少のばらつきがみられたが、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考えられる。

MLVA 法については、6-18bp の repeat unit のくり返し数の違いで型別するため、プロトコールの標準化や施設間差の検証が必須であると考えられる。近畿ブロックとして初めて取り組むにあたり、公衛研および 3 施設で同一のテンプレートを使用して検討したところ、Locus 3、25、19 および 10 について、施設 X の測定値が他施設よりも平均して小さい結果であった。この傾向はすべての供試株で認められたことから、測定機器の特性である可能性が高い。一方、Locus 34 および 9 では一部の供試株につい

てのみ機関 X の測定値が小さくなる傾向がみられた。特に、Locus 9 では他機関との差が 4-7bp 程度あり、この Locus の repeat unit が 6bp であることを考えると、くり返し数の算出に影響すると推察される。これらの問題点について、その再現性を確認し原因を究明することが必要である。

E. 結論

IS-printing System 法は非特異バンドが増幅されることもあり、このような場合にも正確な判定が可能となる十分なバンド間隔の電気泳動画像を得る必要がある。メーカーにおける試薬の品質管理も重要であり、共通の菌株と同一ロットの試薬を用いた精度管理の果たす役割は大きいと考えられた。IS 型のデータベースについては、登録数は 512 株から 1,134 株へと大幅に増加したが、患者発生から IS 型登録までの日数短縮と積極的な疫学情報の交換が課題である。PFGE 法についても、毎年の精度管理により画像解析に適した PFGE 画像が得られ、施設間差を最少にとどめていると考えられた。解析者によってある程度認識バンド数に違いがみられたものの、画像解析では高い近似度を得ることができた。MLVA 法については、供試株数が少ないが、1 施設で測定値が小さくなる傾向がみられたものの、他の 3 施設では同一の結果が得られ、近畿ブロックの地研で共通の疫学指標として使用可能であると考えられた。しかしながら、数 bp のくり返し数の違いで型別するため、わずかな測定値の差が判定結果に影響を与えることもあり、問題点の再現性を確認して原