

表 1 腸管出血性大腸菌 O157 VNTR locus primers

VNTR	Dye	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	最終濃度 (μM)
Multiplex 1 (R1)				
O157-3	6-FAM	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCCCTCGCCATCG	0.2
O157-9	PET	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCCTTCCTCC	GTGTCAAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC	0.2
O157-25	VIC	GCCGGAGGAGGTGATGAGCGGTTAATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACAATTCCTGTGTTGGTTTACACCGAC	0.1
O157-34	6-FAM	GACAAGGTTCTGCGGTGTACCACCGG	GTTACAACCTCACCTGCGAATTTTTTAAGTCCC	0.2
Multiplex 2 (R2)				
O157-17	NED	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTCAGTGATGA	GGAAATGGTTTTACATGAGTTTGACGATGGCGGATC	0.06
O157-19	NED	GCAGTGATCATATTAGCACCGCTTCTGGATGTTT	GGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTGTTAAGC	0.04
O157-36	PET	GGCGTCCCTTCATCGGCCCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAAGCCACACCCATGC	0.03
O157-37	6-FAM	GCCGCCCTTACATTACGGGACATTC	GCAGGAGAACAACAACACAGACAGTAATCAGAGCAGC	0.04
Simplex (R3)				
O157-10	VIC	CAGCCTCCTGCAAACTTTACTGTTTCATTTCTACAGTCTC	GGATCTGTCGTGTATCATCATTGAAATGAACAACCCATTTC	0.3

表2 各領域のアレル分布 (RNはリピート数)

VNTR-25		VNTR-34		VNTR-17		VNTR-36		VNTR-10	
RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>
2	22	6	8	2	1	0	5	0	10
3	14	7	34	3	28	3	1	3	1
4	22	8	25	4	3	4	21	4	1
5	78	9	37	5	13	5	12	5	3
8	1	10	31	6	9	6	48	6	3
		11	2	7	44	7	8	9	2
				8	9	8	8	11	10
				9	15	9	8	19	6
				10	5	10	13	20	6
				11	6	11	9	21	4
				12	1	13	1	22	1
				13	2	14	3	23	2
				15	1			25	5
								26	3
								27	4
								28	4
								29	3
								30	5
								31	9
								32	4
								33	5
								34	5
								36	6
								37	6
								39	1
								40	2
								41	10
								42	2
								44	1
								45	2
								58	1
								59	9
								61	1

VNTR-3		VNTR-9		VNTR-19		VNTR-37	
RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>	RN	<i>n</i>
0	11	0	11	4	7	0	3
4	9	5	1	5	14	4	4
6	11	6	1	6	65	5	22
7	2	7	1	7	34	6	34
8	3	8	3	8	16	7	49
9	26	9	12	10	1	8	9
10	10	10	12			9	4
11	9	11	22			10	5
12	12	12	15			11	6
13	8	13	7			21	1
14	4	14	14				
15	10	15	16				
16	10	16	6				
17	2	17	12				
18	9	18	3				
20	1	19	1				

表3 VNTR-34 と VNTR-37 のサイズ違いによる識別

VNTR-34			VNTR-37		
RN	サイズ (bp)	SD (bp)	RN	サイズ (bp)	SD (bp)
			9	201.2	0.02
6	208.4	0.16	10	207.2	0.08
			11	213.3	0.06
			12	219.3	
7	226.5	0.17	13	225.3 (n = 1)	
8	244.5	0.11			
9	262.4	0.16			
			21	273.4	0.17
10	280.1	0.11			

注 SDは標準偏差 両矢印で示したアレルどうしのサイズが近いが、サイズ差に比べてSDが十分に小さいため識別可能であった

表4 テイルドプライマーによるサイズ変化

VNTR-34							
RN	テイルド			テイルなし			サイズ差(bp)
	平均サイズ(bp)	SD(bp)	n	平均サイズ(bp)	SD(bp)	n	
6	208.4	0.01	2	202.0	0.23	2	6.4
7	226.5	0.06	8	219.8	0.19	8	6.6
8	244.6	0.06	7	237.7	0.12	7	6.8
9	262.4	0.06	6	255.7	0.20	6	6.7
10	280.2	0.11	3	273.6	0.09	3	6.7
11	297.9	0.06	2	291.3	0.09	2	6.7

VNTR-36							
RN	テイルド			テイルなし			サイズ差(bp)
	平均サイズ(bp)	SD(bp)	n	平均サイズ(bp)	SD(bp)	n	
3	128.9	(-)	1	122.6	(-)	1	6.4
4	135.7	0.02	6	129.3	0.05	6	6.4
5	142.4	(-)	1	135.9	(-)	1	6.5
6	149.5	0.04	9	142.8	0.05	9	6.6
7	156.4	0.00	2	149.7	0.05	2	6.7
9	170.2	0.04	2	163.7	0.03	2	6.6
10	177.1	0.04	3	170.5	0.04	3	6.5
11	184.0	0.10	2	177.4	0.01	2	6.6
13	197.9	(-)	1	191.3	(-)	1	6.6

注 Null Alleleを除く

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	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	上田 豊	鳥取県衛生環境研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	石井 学	〃
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	末永 朱美	広島市衛生研究所
	富永 潔	山口県環境保健センター
	下野 生世	徳島県保健環境センター
	内田 順子	香川県環境保健研究センター
	有塚 真弓	〃
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所

研究要旨

中四国ブロックでは、平成22年度はパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)とIS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌O157菌株の精度管理と、各県で発生した事例においてこれらの分子疫学手法を応用して解析し、その有用性を評価した。精度管理では各施設とも両方法によりほぼ同様の結果を示しおおよそ良好であったが、一部の施設においてIS-printing Systemにより他の施設と異なったバンドが増幅されたり、増幅バンドのコード化に単純なミスが見られた。今後もより安定した結果を得るために、精度管理の必要性が示された。各県の事例発生においてIS-printing Systemは、簡単・迅速な疫学解析ツールとして有用性が再確認され、特殊な機器も不要なことから保健所の検査課などで充分活用できる方法であり、さらに応用の場が広がるものと考えられる。昨年度一部の県で検討したMLVA法については特別な機器が必要であるため、今後機器の整備ができた県を加えて検討していく予定である。また、本年度はインターネット経由で国立感染症研究所に設けたPFGEデータ用サーバーへのアクセスを検討し、接続可能であることを確認した。

A. 研究目的

感染症や食中毒の発生事例において、遺伝子を用いた分子疫学的な解析方法は、今や疫学上重要なツールとして日常使用され

ている。その代表的な方法はパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE法という)であり、腸管出血性大腸菌O157をはじめ多くの事例で使用されているが、解析

精度は高いものの特別な機器が必要であり、また比較的操作が煩雑できれいな結果を出すには多少の経験が必要とする。それに対し本研究班で検討している IS-printing System による解析法は、対象菌が腸管出血性大腸菌 O157 のみに限られるが、特別な機器は必要なく操作も簡単で短時間に結果を得られるため、疫学解析ツールとして有用であることが、今までの検討結果<sup>1),2),3)</sup>から示されている。そこで、各県で発生した事例について実際にこれらの分子疫学解析手法を応用した事例を報告すると共に、中四国ブロック各県の施設で実施した PFGE 法と IS-printing System の精度管理の結果を報告する。

なお、まず中四国ブロックの PFGE 法及び IS-printing System による精度管理結果について記載し、続いて各県で実施した分子疫学解析法の応用事例について、それぞれの研究協力者から報告する。

## B. 研究方法

### 1. 使用菌株

岡山県で平成 22 年度に分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 菌株 5 株 (No.1555、1556、1562、1563、1564) を使用した。

### 2. 分子疫学解析法

#### (1) PFGE 法

PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、泳動像を画像解析ソフトを使用して解析した。

#### (2) IS-printing System

IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って

実施した。本法の各プライマーにより増幅される産物は各プライマーセット毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット Api の同定コード化にならって各区分の増幅バンドに順番に「1」「2」「4」の数字を当て、それぞれの産物が増幅された場合はその数字を足してコード化し、解析した。

#### (3) 精度管理

各県の施設(A~D)で両法(Iのみ PFGE 法による精度管理は不参加)により解析したのち、PFGE 法の結果は泳動像と解析ソフトを使用して解析したデンドログラムを、IS-printing System による解析結果は 1st および 2nd set primer ごとに増幅産物のバンドをコード化した表と泳動像を、何れもファイルに保存してメールで送付してもらい、回収した。

## C. 研究結果

### 1. PFGE 法による解析結果

解析に使用した 5 株は、当センターで実施した PFGE 法による遺伝子パターンにより①No.1555、No.1556、No.1562 と②No.1563、No.1564 の 2 グループに大きく分かれ、さらに①は No.1556 の 220Kb 付近のバンドと No.1562 の高分子量域のバンドの有無により、②では No.1563 の 30 および 50Kb 付近のバンドの有無により、各パターン内で差が見られた(図 1 の円で囲んだ部分)。各施設の結果は、図 1 に示した。上記の点について各施設の結果を比較すると、No.1556 の 220Kb 付近のバンドが検出されなかった施設が 4 施設(B, F, G, H)あり、No.1563 の 30 および 50Kb 付近のバンドが検出されなかった施設は 2 施設(C, E)あった。A 施設についてはデンドログラムによる解析結果がなかったが、泳動像からは上記の差異が認められた。

## 2. IS-printing System による解析結果

IS-printing System による精度管理はすべての施設が参加して実施した。当センターで実施した泳動像を図 2 に示した。また、各施設で実施した結果を増幅バンドの有無によりコード化し、図2の表に示した。各施設(B~I)とも No.1555、1556、1562 は、1st set primer のコードが「717577」、2nd set primer のコードが「611657」で、A 施設は 2nd set primer のコードが「737777」であった。No.1563、1564 は各施設(B~I)で 1st set primer のコードが「305455」、2nd set primer のコードが「211642」であったが、A 施設は 2nd set primer のコードが「313777」であった。また、2 施設(C, I)では、2nd set primer のコード化に間違いが見られた。A 施設の泳動像(図 3)では、他施設の泳動像では増幅されていないバンド(点線で囲んだ部分)が確認された。

## D 考 察

今回精度管理に供した菌株は本年度岡山県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 株 5 株であり、PFGE 法による遺伝子パターンは近似しているが多少の差異が認められた株を選択した。各施設で検査を実施した結果、PFGE 法で僅かな遺伝子パターンの差異を検出した施設と、同一のパターンと判定した施設に分かれた。これらの差異は、疫学指標として本解析法を使用した場合、菌株間の疫学的関連性を否定する程の違いではないが、施設により結果の異なった原因は、菌の濃度や酵素処理、泳動などの技術的な差や、泳動像から得られた遺伝子パターンのバンド認識の違いなどが考えられる。一方、IS-printing System による解析では、ほとんどの施設が同じ結果を示し、簡単・迅速で安定した結果が得ら

れる分子疫学解析手法として、有用性が再確認された。ただ、1 施設が他施設の結果に比べて 2nd set primer により多数のバンドが増幅され、異なった結果を示した。この原因については、コンタミネーションによる増幅や、高濃度のテンプレート DNA を用いたことによる非特異バンドの増幅などが考えられた。ミューピッドで泳動した場合、泳動距離が短いため増幅バンドの詳細な分子量の差が比較できないが、泳動距離の長いゲルを用いて泳動することにより増幅バンドの分子量の差がある程度確認でき、非特異バンドの判定が容易になると思われる。また、テンプレート DNA の濃度は結果の判定に影響を与えるので、段階的に希釈した各濃度のテンプレート DNA を用いて検査した結果を比較し、各施設の最適なテンプレート濃度の調製法を決めておく必要があると考える。

PFGE 法や IS-printing System は分子疫学解析手法として有用なツールであり、今後も精度管理によってその精度を十分管理して、疫学解析に役立てることが重要であると考える。

## E 結 論

1. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 菌株を用いて、PFGE 法と IS-printing System による精度管理を実施した。
2. PFGE 法による解析結果は、施設により僅かな遺伝子パターンの違いが見られたが、大凡良好な結果であった。
3. IS-printing System による解析結果は、多くの施設が同一の結果であったが、1 施設のみ他施設の結果以外の増幅バンドが確認された。
4. 分子疫学解析手法として有用な PFGE 法

と IS-printing System について、精度管理の重要性が示された。

F. 研究発表  
なし。

G. 参考文献

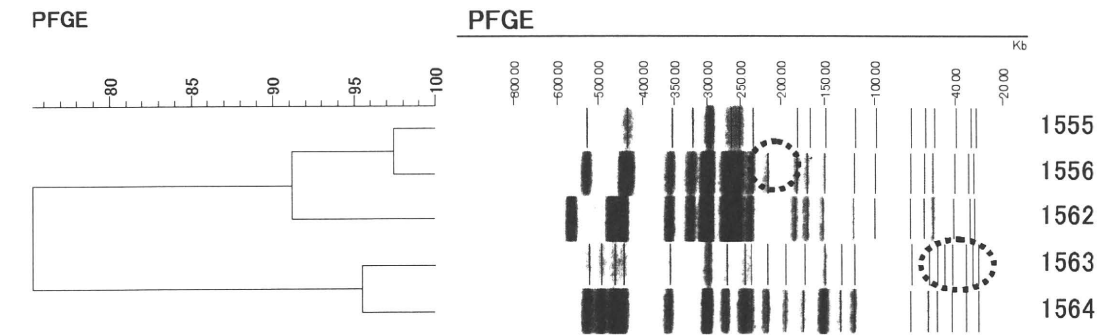
1) 中嶋 洋 他 (2009) : 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な

情報に関する研究 平成 20 年度総括・分担研究報告書, 116-166.

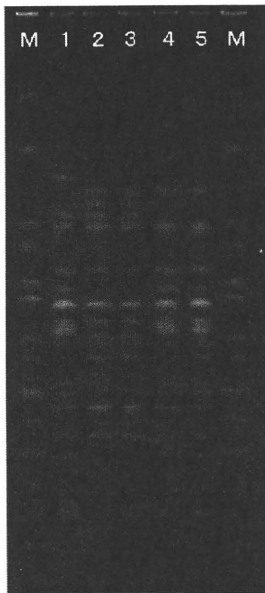
2) 中嶋 洋 他 (2009) : 広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究 平成 18-20 年度総合研究報告書, 335-346.

3) 中嶋 洋 他 (2010) : 食品由来感染症における分子疫学手法に関する研究 平成 21 年度総括・分担研究報告書, 87-139.

図1 精度管理菌株の PFGE 法による遺伝子解析結果

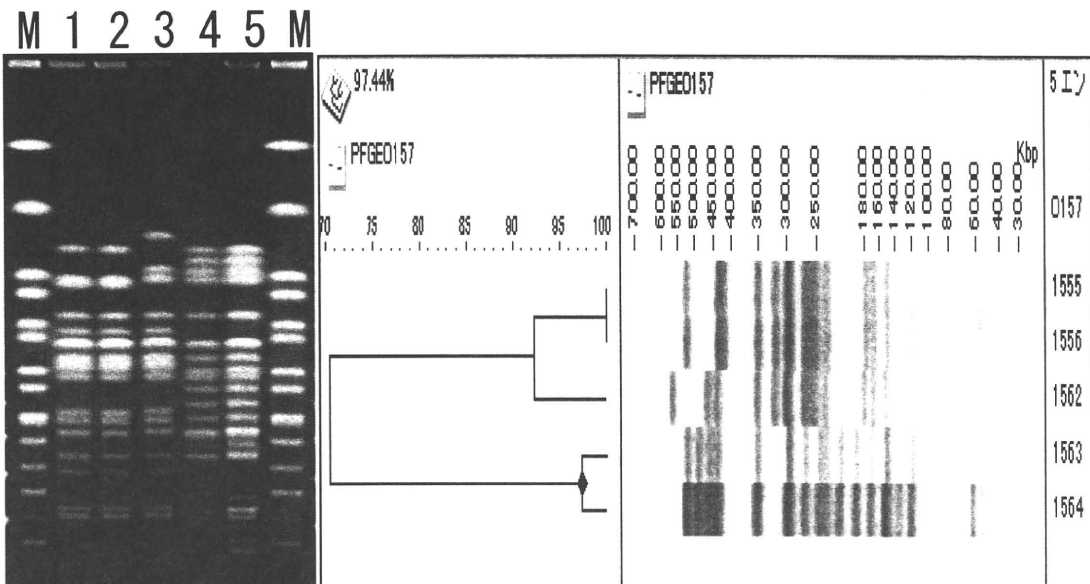


(A)



- 1 : 菌株 No 1562
- 2 : 菌株 No 1563
- 3 : 菌株 No 1564
- 4 : 菌株 No 1555
- 5 : 菌株 No 1556
- M : マーカー (Salmonella Braenderup H9812 株)

(B)



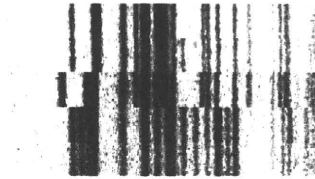
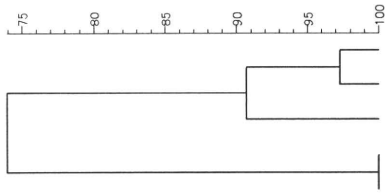
PFGE 法泳動像とデンドログラム



(C)

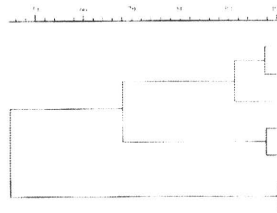
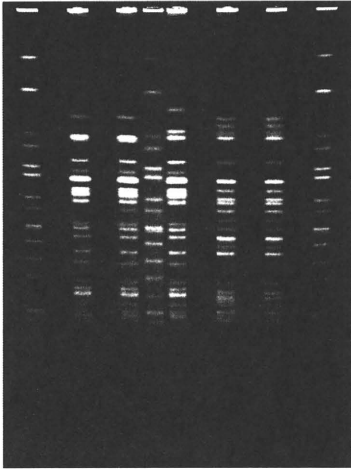
Dice (Tot 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
marker\_XbaI

marker\_XbaI



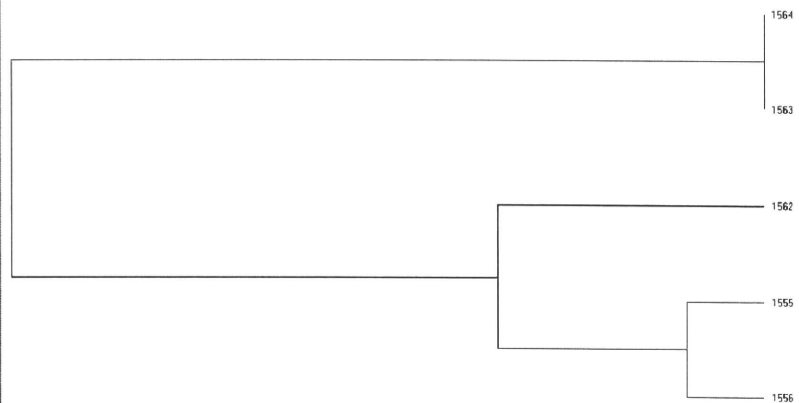
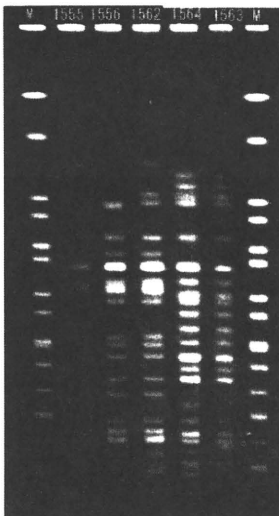
精度管理1	1555	VT1,2
精度管理2	1556	VT1,2
精度管理3	1562	VT1,2
精度管理4	1563	VT2
精度管理5	1564	VT2

(D)



1555
1556
1562
1563
1564
SBr
SBr

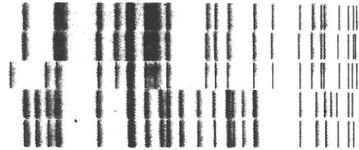
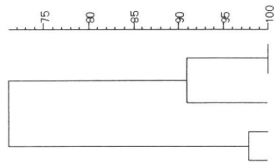
(E)



(F)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
EHEC

EHEC

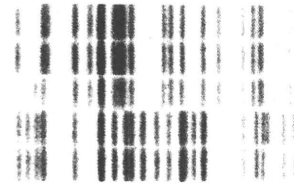
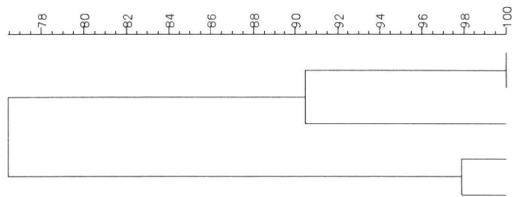


.1555精度管理2010  
.1556精度管理2010  
.1562精度管理2010  
.1563精度管理2010  
.1564精度管理2010

(G)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
O157

O157

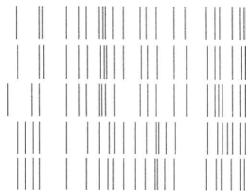
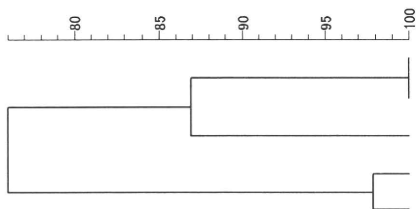


.No.1555  
.No.1556  
.No.1562  
.No.1563  
.No.1564

(H)

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
O157

O157

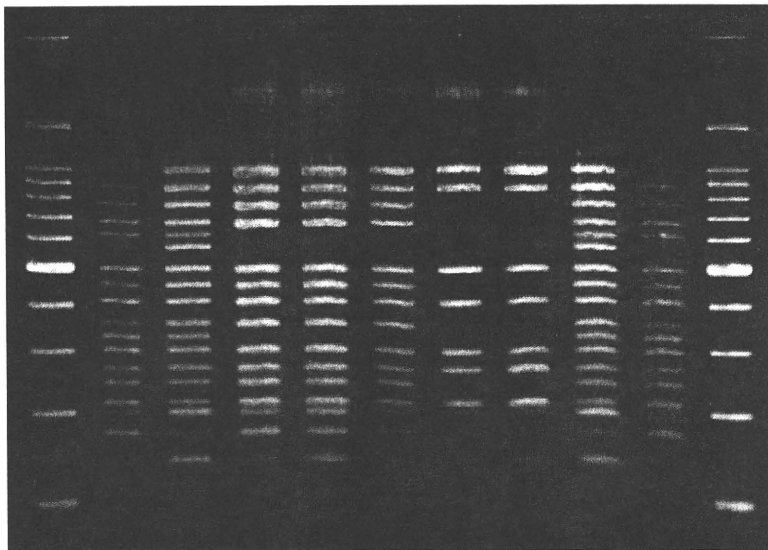


2010ハルスネット精度管理 1555  
2010ハルスネット精度管理 1556  
2010ハルスネット精度管理 1562  
2010ハルスネット精度管理 1563  
2010ハルスネット精度管理 1564

図2 精度管理菌株の IS-printing System による遺伝子解析結果

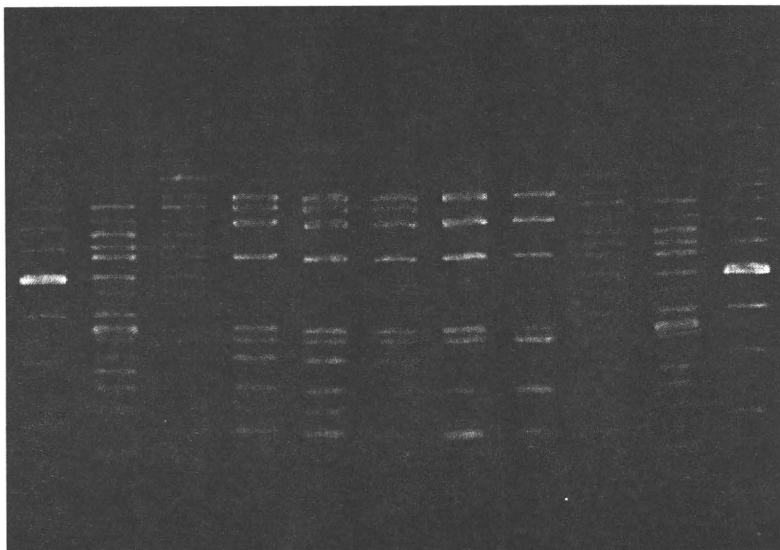
菌株 No	施設	1st primer code	2nd primer code	備考
1555	A	717577	737777	
1556	B~I		611657	
1562				
1563	A	305455	313777	*1 一部施設で code の換算ミス あり
1564	B~I		211642 *1	

M T St 1555 1556 1562 1563 1564 St T M



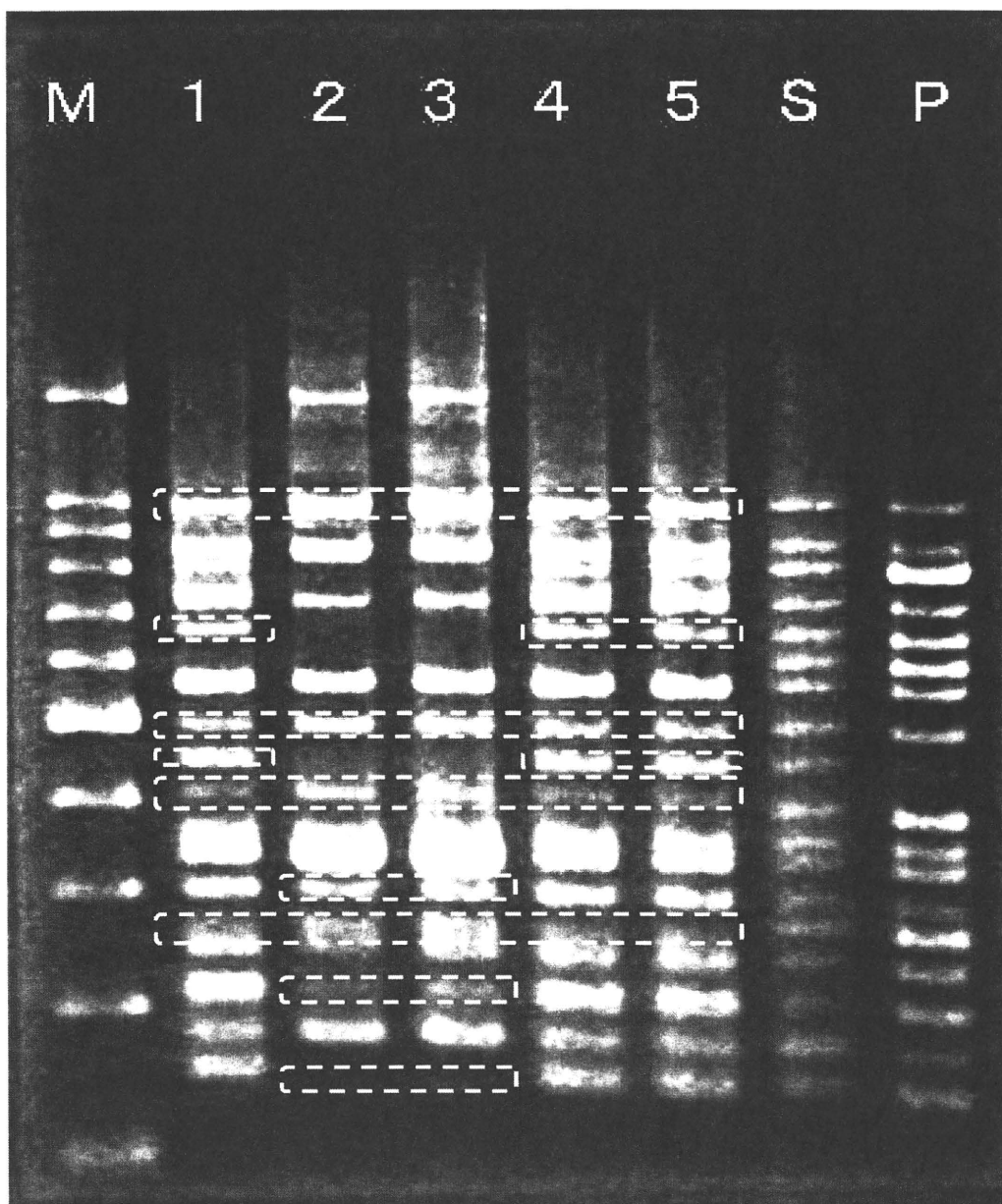
1st set Primer

M T St 1555 1556 1562 1563 1564 St T M



2nd set Primer

図3 A施設の 2nd set Primer Mix による増幅バンドの泳動像



M:100bp ladder

1:1562

2:1563

3:1564

4:1555

5:1556

S:Standard DNA

P:Template Mix

## 同一飲食店利用者における腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 感染症の続発事例について

研究協力者 岡山県環境保健センター

大島律子、石井 学

### 研究要旨

平成 22 年 9 月～10 月にかけて、岡山県内の飲食店 D 店の利用者およびその家族が相次いで腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 に感染したため、患者等分離株の分子疫学解析を実施した。8 名から分離された株は、PFGE 法および IS-printing system により 3 つの型に分類され、各型の検出時期は D 店での喫食時期と相関があった。従って、今回の続発事例は、単一ではなく複数の腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 による感染が D 店を介して発生したものと推察された。

#### A. 研究目的

同一飲食店の利用者に発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 感染症の感染源および感染実態を究明するため、患者等分離株の分子疫学解析を実施した。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

平成 22 年 9 月～10 月に飲食店 D 店を利用した患者およびその家族の計 8 名から分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 を対象とした。

##### 2. 遺伝子解析

##### (1) PFGE 法

制限酵素 *Xba*I を用い、感染研ニューブプロトコールに従って実施した。

##### (2) IS-printing system

IS-printing System(東洋紡)を用い、添付説明書に従って実施し、結果はコード化して解析に用いた。

#### C. 研究結果

PFGE 法の結果、8 株はスメア状の 4 株を含めて 3 つの型に分類された(表 type①～③)。また、IS-printing system による分析

結果でも 3 型に分類され、PFGE 法による分類結果と一致した。(表)

PFGE の type 別に検出時期を見ると、type①の株は 9 月上旬に D 店で喫食した患者およびその家族から分離された株、以下同様に type②は 9 月下旬に、type③は 10 月上旬に分離された株であった。

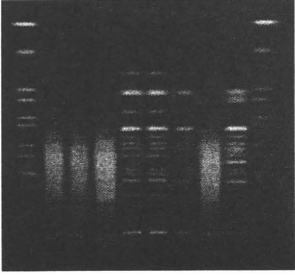
#### D 考 察

8 名の患者から分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 が type①～③の 3 型に分類され、その検出時期は D 店の利用時期と相関が認められた。これらのことから、今回の続発事例は、3 種類の腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 による感染が D 店を介して発生したものと推察された。

#### E 結 論

今回の腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 による続発事例は、同一飲食店を介した 3 種類の腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 による感染事例であると推察された。

表 遺伝子解析結果

検体 No.	PFGE 法	IS-printing system	患者 居住地	D 店での 喫食日	備 考	
53	M 53 55 56 57 59 58 54 61 M	217557-611747	O 市	2010/9/14		
54		217557-611747	S 市	2010/9/12		
55		217557-611747	S 市		No.54 の家族	
56		217557-611747	S 市		No.54 の家族	
57		717557-611657	S 市	2010/9/26		
58		Type①: 53,54,55,56	717557-611657	O 市	2010/9/26	
59		Type②: 57,58,59	717557-611657	S 市		No.57 の家族
61		Type③: 61	613577-610646	K 市	2010/10/13	

## 腸管出血性大腸菌O157の IS-printing System を用いた分子疫学解析

研究協力者 岡山県環境保健センター

石井 学 大島律子

### 研究要旨

平成 22 年度に岡山県内で分離された腸管出血性大腸菌O157 株 31 株について、IS-printing System を用いて分子疫学解析を行なった結果 16 のパターンに分類され、疫学的な関連が見られた菌株は同じパターンを示した。また、多検体を同時に解析する手法として、昨年が続いてマイクロチップ電気泳動法の適用の可能性について検討した。マイクロチップ電気泳動法は少数の増幅バンドの解析には適しているが、多数の増幅バンドの解析や増幅バンドのサイズが接近している場合は、増幅バンドのサイズを正確に判定できないため、IS-printing System に適用することは難しいと思われた。

#### A. 研究目的

岡山県内で分離された腸管出血性大腸菌 O 157 の疫学解析に IS-printing System を用い、その有用性を検討した。また、昨年引き続き、従来のアガロースゲル電気泳動法に代わる多検体解析手法として、マイクロチップ電気泳動法の検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

平成 22 年度に岡山県で分離された腸管出血性大腸菌O157 株について、患者等由来株 30 株と食肉由来株 1 株を用いた。

##### 2. 検査方法

##### 1) 腸管出血性大腸菌O157 の分子疫学解析

IS-printing System の試薬キットを使用して、キットに添付されたプロトコールに準じて実施した。

増幅産物の電気泳動は、1.2%アガロースゲル(ゲルサイズ：縦 122mm 横 131mm ウェル幅 2mm ウェル数 26)を用いて実施した。

##### 2) マイクロチップ電気泳動法の検討

マイクロチップ電気泳動は、島津製作所製 MCE-202 MultiNA(以下、MultiNA)を用い、試薬キットは DNA-1000 及び DNA-2500 を使用して、添付のプロトコールに準じて実施した。IS-printing System で増幅された Template Mix 及び菌株の増幅産物(それぞれ 3 倍および 10 倍希釈して使用)と、Standard DNA の 3 倍希釈液を電気泳動に使用した。菌株は、31 株中 2 種のプライマー set のいずれにおいても増幅バンドの数が最大(1st set code:717577 , 2nd set code:611657)であった 1 株を用いた。

## C. 研究結果及び考察

### 1) 腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析

IS-printing System を使用して増幅されたバンドのアガロースゲル電気泳動法による泳動像の一部を図 1 に、泳動像から得られたコードの解析結果を表 1 に示した。その結果、31 株は 16 のパターンに分類された。

### 2) マイクロチップ電気泳動法の検討

マイクロチップ電気泳動法による泳動像(ゲルイメージ)を図 2 に、エレクトロフェログラム(増幅バンドの濃度と分子量のグラフ)を図 3、図 4 に示した。

DNA-1000 キットを用いた場合、低分子量側の増幅バンドの分離と分子量の判定は良好であったが、500bp 以上の増幅バンドについては分離および分子量とも判定が困難であった。特に Standard DNA の 2nd プライマー set により増幅された 2-02 と 2-03 のバンドは、分離が不十分であった。DNA-2500 キットの場合は逆に、高分子量側の分離と分子量の判定は良好であったが低分子量側では分離が悪く、Template Mix の 2nd プライマー set により増幅された 2-13 と 2-14 のバンドは、分離が不十分だった。

また、DNA 量が多い場合は、増幅バンドの分離や誤差が悪化する傾向が見られた。マイクロチップ電気泳動による解析は

目的とする増幅バンドが少数の場合は多検体を迅速に解析できる有用な方法であるが、多数の増幅バンドの解析やバンドサイズが接近している場合には、正確な増幅バンドのサイズを判定できないため、IS-printing System により増幅されたバンドの解析に使用することは難しいと思われた。

## D. 結論



1. 岡山県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 31 株の IS-printing System による分子疫学解析を行なった。

2. IS-printing System により 16 のパターンに分類され、疫学調査によって感染源が同一と推定される検体ではコードが一致し、PFGE 法の結果とも一致した。

3. IS-printing System による増幅バンドの検出法として、マイクロチップ電気泳動法を検討した。

4. マイクロチップ電気泳動法は、IS-printing System のように増幅バンドが増幅される場合や増幅バンド間の分子量の差が小さい場合には、判定が困難であることが示された。



 : DNA-1000 で分離不十分  
 : DNA-2500 で分離不十分

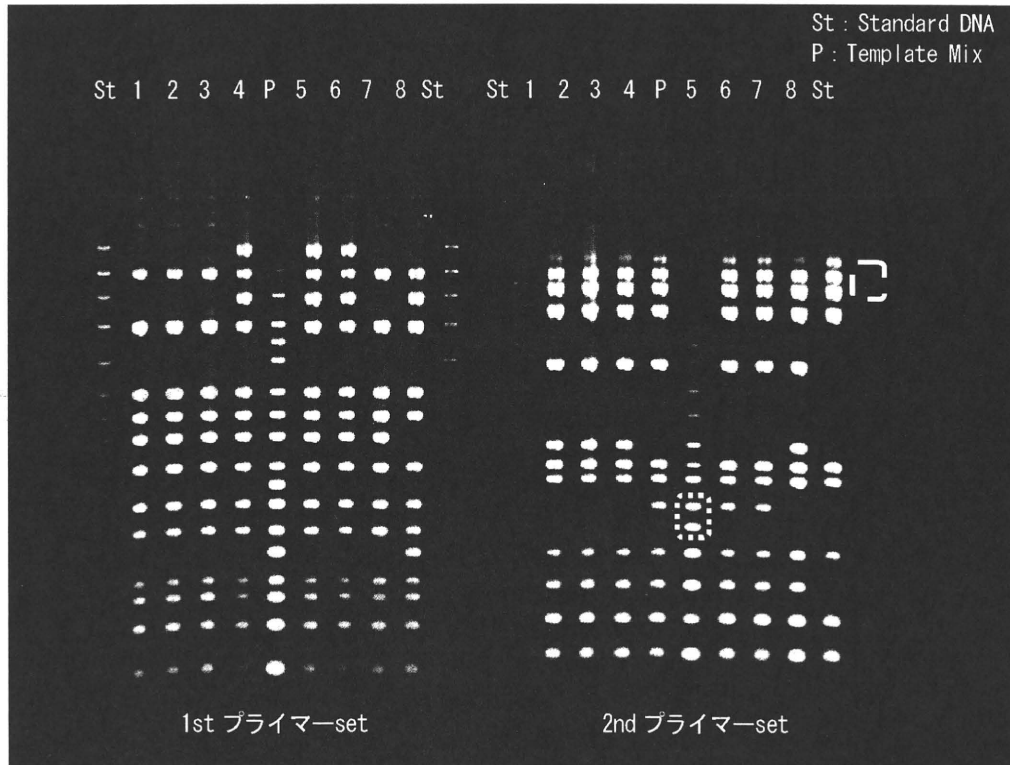


図1 IS-printing System アガロースゲル電気泳動像

表1 IS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌O157 31株の解析結果

1st プライマー-set コード	2nd プライマー-set コード	菌株数
0 1 2 0 5 7	2 1 4 4 4 2	1
1 1 7 1 7 5	6 0 1 7 5 7	1
2 0 7 5 7 7	6 1 1 6 4 3	1
2 1 7 5 5 7	6 1 1 7 4 7	5
3 0 5 4 5 5	2 1 1 6 4 2	2
3 1 7 0 5 5	2 3 1 4 5 3	1
3 1 7 5 5 7	6 1 1 7 5 6	2
3 1 7 5 7 7	2 1 1 7 5 6	2
3 1 7 5 7 7	6 1 1 6 5 7	1
3 4 5 4 5 7	3 1 1 6 5 2	1
6 1 3 5 7 7	6 1 0 6 4 6	2
6 1 5 4 5 7	3 1 1 6 5 6	1
7 1 3 5 7 7	2 3 1 7 5 7	1
7 1 7 5 5 7	6 1 1 6 5 3	2
7 1 7 5 5 7	6 1 1 6 5 7	3
7 1 7 5 7 7	6 1 1 6 5 7	5

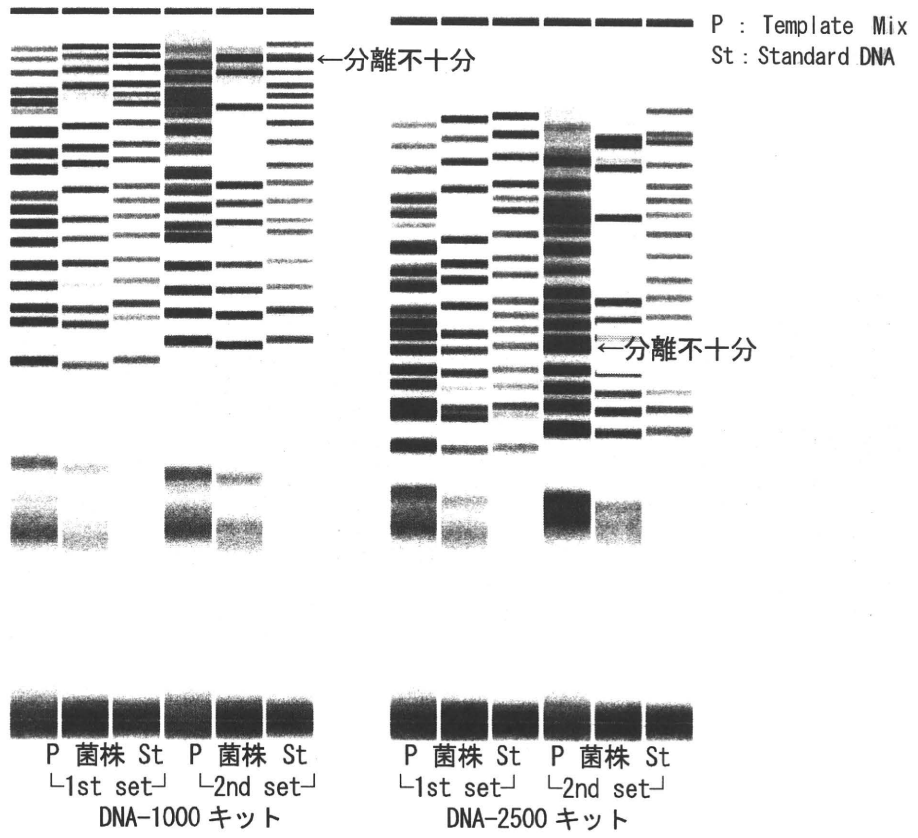
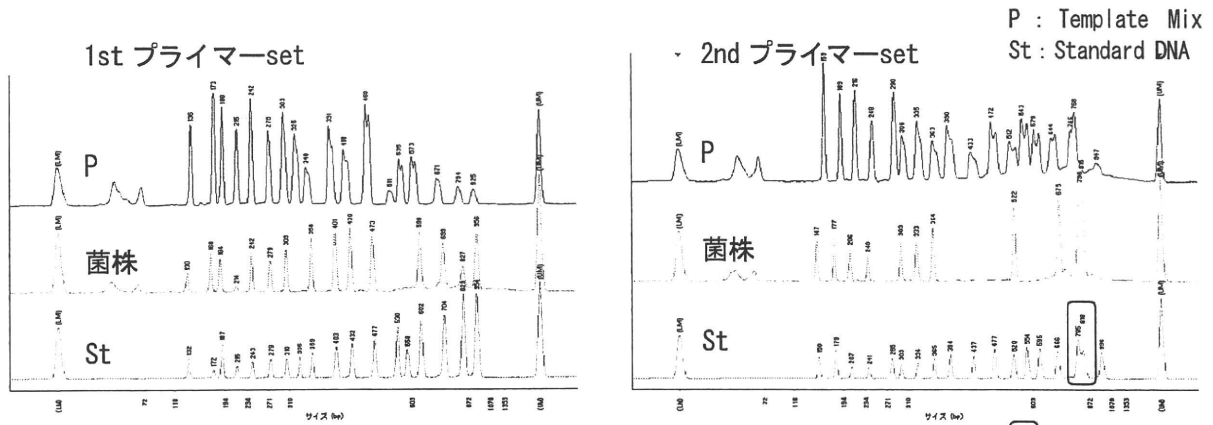
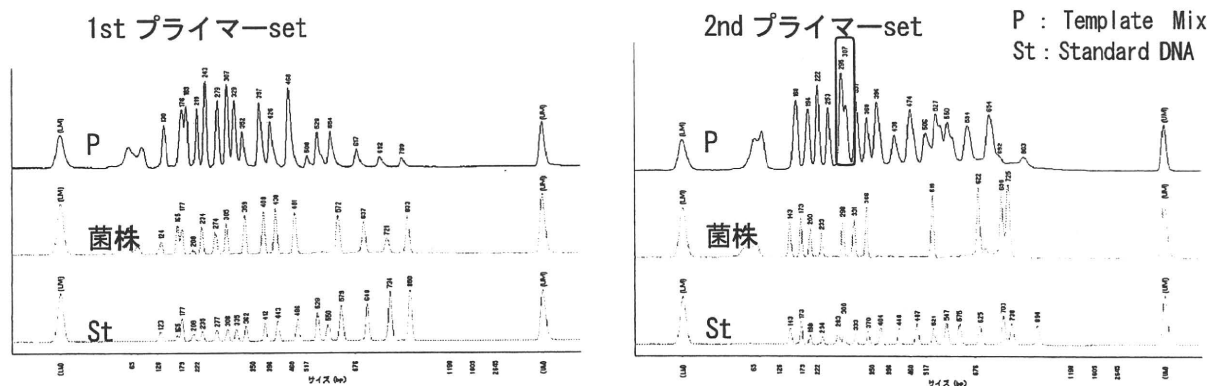


図2 IS-printing System マイクロチップ電気泳動ゲルイメージ



□ : 分離不十分

図3 DNA-1000 キットにおけるマイクロチップ電気泳動エレクトロフェログラム



□ : 分離不十分

図4 DNA-2500 キットにおけるマイクロチップ電気泳動エレクトロフェログラム

# 島根県における IS printing 法による腸管出血性大腸菌 O157 の 分子疫学解析の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所  
黒崎 守人

## 研究要旨

平成 22 年度中に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) 16 株について、IS printing 法による分子疫学解析を行った。

IS printing 法による解析結果は PFGE 法による結果と一致し、各事例内ではほぼ同一の IS コードが得られ事例間では概ね異なる IS コードが得られた。3 事例については事例間で同一の IS コードとなったが、疫学的な関連は見いだせなかった。IS printing 法は迅速、簡便に実施できるので、有用なサブタイピング法である。

IS printing 法による解析結果はデジタルデータであり簡単に比較ができるので、広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する上でも有用であると思われる。

## A. 研究目的

O157 感染症の発生時に IS printing 法を用いた分子疫学解析を行い、解析のツールとして有用であるか検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株 (表 2)

平成 22 年度中に島根県内で届出のあった O157 16 株 (9 事例) を用いた。

### 2. 方法

#### (1) IS printing 法

IS printing System(東洋紡)の説明書に記載された方法に準じて実施した。

電気泳動は、3%濃度の NuSieve GTG : SeaKem GTG=2 : 1 アガロース、0.5×TBE バッファーを用い、サブマリン型電気泳動装置で 120V 100 分を行った。

IS printing の結果は、各プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、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、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化 (以下 IS コード) した (表 1)。

また、電気泳動像および IS コードを県庁の感染症主管課に報告した。

#### (2) パルスフィールドゲル電気泳動 (以下 PFGE) 法

国立感染症研究所 (以下感染研) に菌株を送付し解析を依頼した。

## C. 研究結果 (表 2、図 1~5)

島根県における平成 22 年度の O157 感染症の発生は、発生時期により 5 月 18 日届出から 7 月 24 日届出までの 9 件 (5 事例) と 9 月 24 日届出から 10 月 26 日届出までの 7 件 (4 事例) に分けられた。事例 1 から 5 および事例 7 では事例間では異なった IS コードを示し、事例内で複数の患者等があった場合は全て同一であり、疫学情報と一致した。

感染研の PFGE 法による解析でも同様の結果であり、事例 1 の菌株は平成 22 年