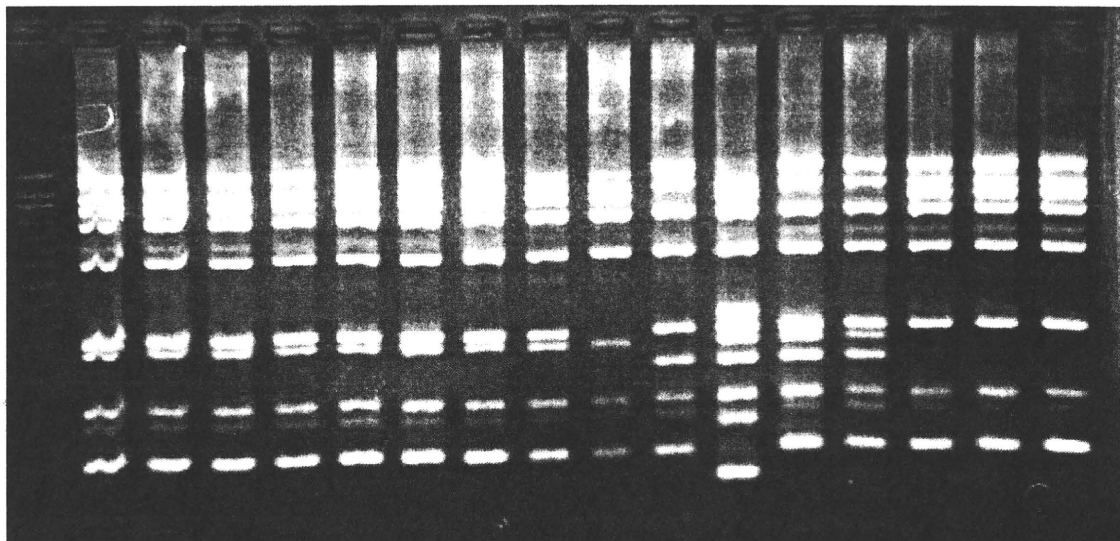


図-3 IS-printing 2nd primer set 泳動像-1(16 株のクレード 8 菌株、内 #はクレード 8 ではない)

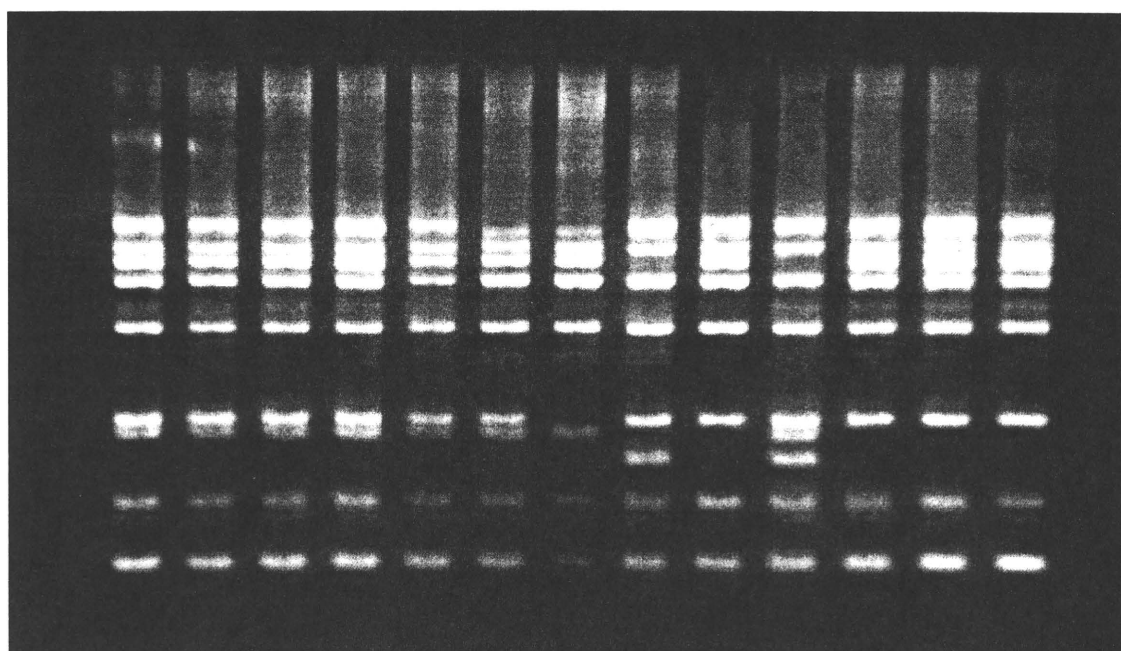
std 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 # 12 13 14 15 16



1:Tab-1 2:Tab-2 3:Tab-3 4:Tab-110 5:T98-42 6:T98-43 7:04Y15 8:04Y37
 9:04Y49 10:05Y59 #:clade8 でない株 12:07Y31 13:07Y32 14:09Y22
 15:10Y05 16:10Y25

図-4 IS-printing 2nd primer set 泳動像-2(泳動像-1 の代表株及びクレード 8 のNo.11 の泳動像)

std 1 4 5 6 7 8 9 10 11 12 14 15 16 PC



11:06Y28、他は上図(2nd primer set 泳動像-1)の菌株No.と同一株

表-2

1st set PCR結果

菌株No.	居住地・疫学	PFGE型	primer No.																備考			
			Size(bp)																			
			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	hlyA			
tab-1	田布施町	IIIbV'III	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
tab-2	田布施町	IIIbV'III	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
tab-3	田布施町	IIIbV'III	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
tab-110	田布施町	IIIbV'III	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
T-98-42	徳山市	IIIbV'III	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
T-98-43	徳山市	IIIbV'III	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
04Y15	山口市(小郡)	NDNDIII	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	105457	VT2
			1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			1				0			5			4			5						
04Y37	宇部市	IIIbVND	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	305457	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			3				0			5			4			5						
04Y49	山口市	IIIbV'III	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	305457	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			3				0			5			4			5						
05Y59	山口市	a831	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	145057	VT2
			1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	5	7
			1				4			5			0			5						
06Y28	宇部市	b502	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	305455	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	5	5
			3				0			5			4			5						
07Y31	岩国市	c57	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	345457	VT2
			1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			3				4			5			4			5						
07Y32	岩国市	c57	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	345457	VT2
			1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			3				4			5			4			5						
09Y22	宇部市	e227	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	305457	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			3				0			5			4			5						
10Y05	宇部市	f124	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	305447	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	5	7
			3				0			5			4			4						
10Y25	宇部市		1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	305457	VT2
			1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	5	7
			3				0			5			4			5						

熊本県分離株

同一パターン

熊本県分離株

同一パターン

表-3

菌株No.	2nd set PCR結果		primer No.																												コード	備考
	居住地・疫学	PFG型	Size(bp)																													
			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	stx1											
tab-1	田布施町	IIIbV'III	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
tab-2	田布施町	IIIbV'III	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
tab-3	田布施町	IIIbV'III	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
tab-110	田布施町	IIIbV'III	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
T-98-42	徳山市	IIIbV'III	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
T-98-43	徳山市	IIIbV'III	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
04Y15	山口市(小郡)	NDNDIII	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
04Y37	宇部市	IIIbVND	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	611642	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
04Y49	山口市	IIIbV'III	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	611442	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
05Y59	山口市	a831	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	311252	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
06Y28	宇部市	b502	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711242	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
07Y31	岩国市	c57	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	311652	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
07Y32	岩国市	c57	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	311652	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
09Y22	宇部市	e227	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711242	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
10Y05	宇部市	f124	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711242	VT2	熊本原分離株 同一パターン									
10Y25	宇部市		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	711242	VT2	熊本原分離株 同一パターン									

表-4

菌株No.	居住地・疫学	PFGE型	IS-printing コード		
			1st set	2nd set	
tab-1	田布施町	ⅢbV'Ⅲ	305455	711642	
tab-2	田布施町	ⅢbV'Ⅲ	305455	711642	
tab-3	田布施町	ⅢbV'Ⅲ	305455	711642	
tab-110	田布施町	ⅢbV'Ⅲ	305455	711642	
T-98-42	徳山市	ⅢbV'Ⅲ	305455	711642	
T-98-43	徳山市	ⅢbV'Ⅲ	305455	711642	
04Y15	山口市(小郡)	NDNDⅢ	105457	711642	
04Y37	宇部市	ⅢbVND	305457	611642	
04Y49	山口市	ⅢbVⅢ	305457	611442	
05Y59	山口市	a831	145057	311252	
06Y28	宇部市	b502	305455	711242	
07Y31	岩国市	c57	345457	311652	熊本県分離株 同一パターン
07Y32	岩国市	c57	345457	311652	熊本県分離株 同一パターン
09Y22	宇部市	e227	305457	711242	
10Y05	宇部市	f124	305447	711242	
10Y25	宇部市	NT	305457	711242	

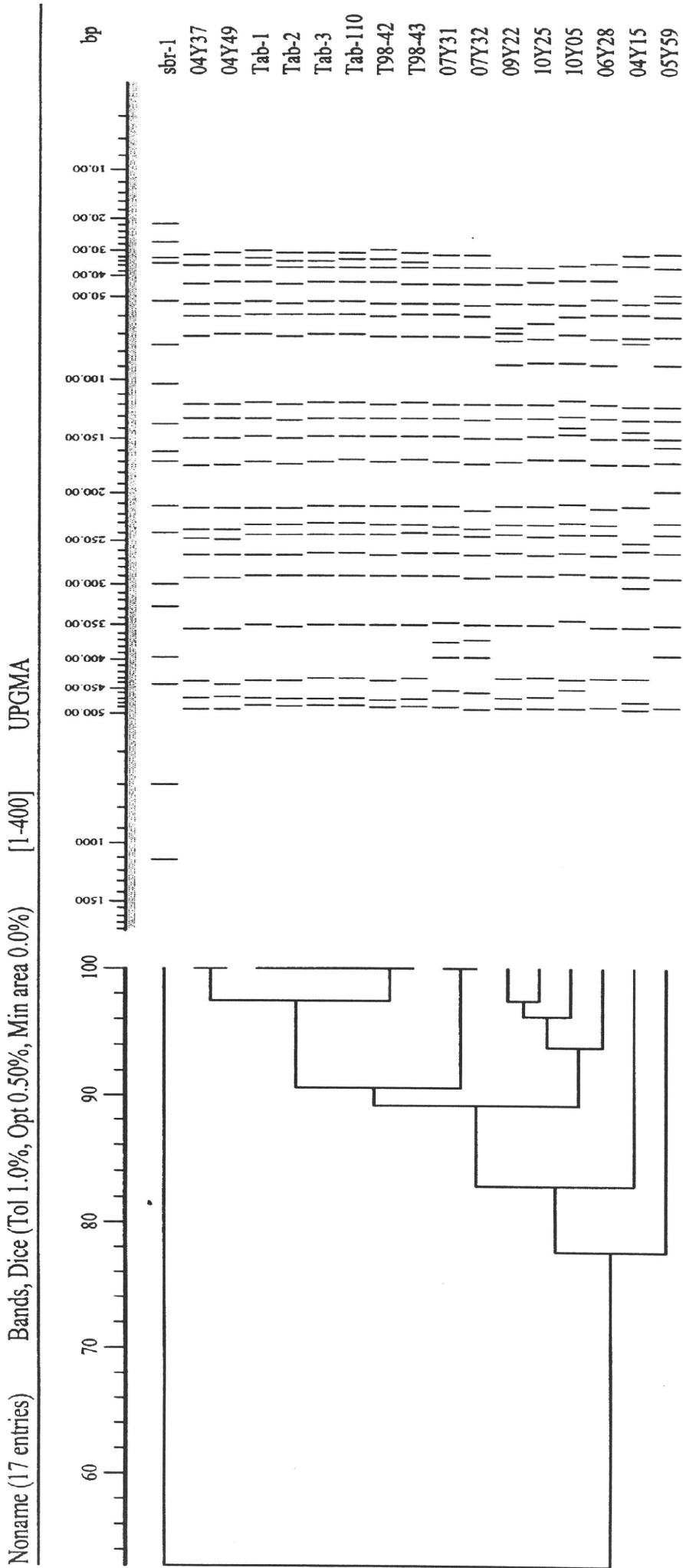


表-5

菌株No.	分離場所	PFGE型	IS-printingコード		Clade
			1st set	2nd set	
10Y38	山口市	NT	010057	214043	
10Y31	宇部市	NT	012057	214443	
10Y32	宇部市	NT	012057	214443	
10Y13	山陽小野田市	f122	012057	214443	
09Y04	山陽小野田市	d833	012057	214443	
09Y03	山陽小野田市	d833	012057	214443	
09Y02	山陽小野田市	d833	012057	214443	
08Y29	周南市	b423	012057	214443	
08Y02	周南市	b858	012057	214443	
10Y14	山口市	f122	012057	214443	
09Y05	山口市	e96	013057	214442	
08Y25	防府市	d350	055045	303043	
08Y11	宇部市	d177	057047	303443	
08Y21	下関市	c796	105057	303443	
10Y04	山口市	f121	114055	303643	
08Y14	下関市	d179	114057	303443	
08Y15	下関市	d180	114057	303443	
08Y24	防府市	d180	114057	303443	
10Y23	山口市	NT	114057	303443	
09Y21	宇部市	e228	115055	303443	
08Y06	山口市	d183	115057	703447	
09Y30	宇部市	e553	117175	601557	
09Y14	岩国市	e225	117177	601757	
09Y13	光市	e225	117177	601757	
10Y21	周防大島町	f112	117575	641757	
09Y01	岩国市	e101	135047	303447	
09Y27	下関市	e328	144047	301443	
09Y29	下関市	e328	144047	301443	
09Y19	下関市	e99	145047	103443	
09Y06	防府市	e99	145147	303443	
08Y13	下関市	d178	155047	303443	
10Y15	宇部市	f120	155047	343443	
10Y16	宇部市	f120	155047	343443	
10Y20	宇部市	f120	155047	343443	
10Y26	山口市	NT	215455	311656	
09Y09	防府市	e98	215555	710403	
09Y08	防府市	e98	215555	710403	
10Y05	宇部市	f124	305447	711242	Clade 8
09Y22	宇部市	e227	305457	711242	Clade 8
10Y25	宇部市	NT	305457	711242	Clade 8
08Y28	山口市	d547	311057	300457	
08Y16	下関市	d335	311555	710417	
08Y18	下関市	d352	311557	610253	
08Y20	下関市	d352	311557	610253	
10Y22	下関市	NT	311557	710413	
10Y28	下関市	NT	311557	710413	
10Y29	下関市	NT	311557	710413	
10Y30	下関市	NT	311557	710413	
10Y41	山口市	NT	313575	610657	
09Y28	山口市	e241	317175	611757	
08Y34	下関市	e6	317455	611757	
08Y22	山口市	c304	317557	611653	
09Y18	美祿市	d526	317557	611657	
10Y35	下関市	NT	317575	611257	
10Y36	下関市	NT	317575	611257	
10Y37	下関市	NT	317575	611257	
10Y17	下松市	f107	317577	651755	
08Y31	下関市	d693	351557	710413	
08Y32	下関市	d693	351557	710413	
08Y33	下関市	d693	351557	710413	
10Y09	山口市	f125	415457	311656	
09Y15	下関市	e229	517577	611657	
08Y17	下関市	b558	613177	210646	
09Y23	山口市	d482	613177	210646	
08Y12	宇部市	d175	613575	610646	
09Y31	宇部市	e550	613575	610646	
09Y32	宇部市	e550	613575	610646	
08Y05	山口市	d174	613575	610646	
08Y04	山口市	d173	613577	610646	
10Y10	山口市	f126	615457	311656	

菌株No.	分離場所	PFGE型	IS-printingコード		Clade
			1st set	2nd set	
09Y25	周南市	e267	703577	610657	
09Y26	平生町	e267	703577	610657	
10Y11	下関市	e245	713575	610657	
10Y12	下関市	f117	713575	610657	
10Y34	下関市	NT	713577	610657	
08Y01	下関市	d337	716577	611653	
08Y19	下関市	d28	717557	611655	
08Y23	宇部市	d200	717557	611657	
09Y24	宇部市	d92	717557	611657	
08Y08	下関市	d170	717557	611657	
08Y26	下関市	d28	717557	611657	
08Y10	下関市	d92	717557	611657	
09Y11	下関市	d27	717557	611657	
09Y10	下関市	d92	717557	611657	
08Y30	周南市	d690	717557	611657	
09Y34	防府市	e554	717557	611657	
09Y33	山口市	e554	717557	611657	
10Y06	山陽小野田市	f34	717577	611653	
10Y07	山陽小野田市	f34	717577	611653	
10Y08	山陽小野田市	f34	717577	611653	
09Y58	宇部市	f14	717577	611657	
10Y27	防府市	NT	717577	611657	
09Y20	山口市	e230	717577	611657	
08Y03	岩国市	d169	717557	611657	

*NT:検査していない

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)
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
— IS-printing System の精度管理 —

研究分担者	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	寺西泰司	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
	杉谷和加奈	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
	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
	濱田まどか	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 ¹ 、林 哲也 ^{1,2}	宮崎大学・医学部 ¹ 、フロンティア ²
	江藤良樹、市原祥子、	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 九州ブロック(12施設参加)では、1) IS-printing System(ISPS)の精度管理、2) 九州地区で分離された O157 菌株の ISPS による比較検討、3) 研修(新規遺伝子解析法: *Shigella sonnei* の multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)、4) 事例検討(1事例) を実施した。本稿では1) について以下報告する。

ISPS の九州ブロック12施設間の精度管理は、4株のDNAを参加施設に配布し、各施設で得られたISPS解析結果について検討した。その結果、精度管理に使用した4株のISPS型別は、4施設が期待される結果と異なっていた。原因は、PCRエラー、Extra bandによる誤判定および単純入力ミス(3項目)であった。

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マーカーの供給、常に良好な電気泳動、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分子疫学的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た¹⁾。現在、IS-printing System Ver. 2 として、東洋紡から市販されている。

九州ブロックではO157のDNAを九州地区各地方衛生研究所(以下、施設)に配布し、昨年度に引き続き ISPS 手技に関する精度管理を行った。

B. 研究方法

1. 精度管理に使用した菌株

4株(A、B、C、D)のO157は、ISPSにおいて36本全てのバンドが出るように選択した。また、AとDでは、2nd setの上から1本目と2本目の間にExtra band(多くの株で比較的良好に出現するバンド)が出現するものを選択した。

各施設への送付は、DNAの状態で行った。

2. 精度管理実施環境

各施設で精度管理に使用されたPCR装置、電気泳動装置、画像取り込み装置等の機器類は、表1のとおりであった。また、DNA抽出物の使用量、PCR産物の泳動量、サイズマーカーについては、表2に示した。

泳動時間は各施設でPCR産物の分離能を勘案した最適時間は、60分～120分であった。

3. 結果の判定

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、固有の番号とした。

C. 結果および考察

4株(A、B、CおよびD)から抽出したDNAをISPSにて解析した結果を図1に示した。また、配布したDNAの各施設の結果は、表3および図2～6のとおりであった。

12施設のうち4施設が期待される結果と異なっていた(表3)。結果の異なった原因については、以下のことが考えられた。

① PCR エラー

1st setの上から6番目(1-06)のバンドと2nd setの上から9番目(2-09)のバンド、*eae*と*hlyA*のバンドが極めて薄い、あるいは、ほとんど増幅しなかった施設が、1施設認められた(写真施設10)。

② Extra band による誤判定

今回の試料は、Extra bandを濃く出すために、濃い濃度のDNA試料を使用した。これにより、2nd setの上から1本目と2本目の間に出現するExtra bandが濃く現れる結果となった。これを、2nd setの1本目あるいは2本目のバンドと間違えて判定した施設が、試料Dで3施設あった(図2、写真施設3、5、11)。今回の試料では、試料Aと試料Dにこの問題のExtra bandが出現する。このExtra bandは、紛らわしいので注意が必要である。

③ 単純入力ミス

1施設で、試料Aの2nd setの2本目のバンドを3本目のバンドと間違えて判定されていた(写真施設3)。

D. まとめ

ISPSの精度管理は、昨年度良好な結果が得られたので、やや難易度の高い試料について実施した。その結果、2nd setのExtra bandの誤判定が3施設で見られた。誤判定を回避するためには、Standard DNAおよびTemplate MixでのPCR増幅産物との十分な確認作業が重要となる。

ISPSのPCR反応条件(アニーリング64℃)では、1st setの1-06、*eae*および*hlyA*のDNA増幅が見られず、さらに2nd setの2-09の増幅が弱

かった施設(施設10)があった。増幅が十分でない場合、誤判定にも繋がる可能性があるので、事前にPCR用陽性コントロール(Template Mix)のバンドが均等に出る条件を確保することが必要である。しかし、施設10で使用されたISPSのロットでは、PCR陽性コントロールとして添付されているTemplate Mixでは正常な増幅が認められず、Template Mixに不具合があったことが判明している。その後販売されているTemplate Mixは、既に改善されている。また、一部の施設では、Template Mixの凍結融解を繰り返すことによるDNAの劣化により、Template Mixが増幅されなかったと推察した施設もあり、試薬の管理についてもより注意を払う必要があることが分かった。

ISPS利用者が再現性のある結果を得るためには、PCRマシーンの検討および分子量判定方法の工夫、並びにISPSに含まれるprimerの改善が必要と考えられた。

ISPS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容易である。また、ISPS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。ただし、恒常的に正確な結果を得るためには、他の検査と同様に機器および試薬等の管理を厳しく行わなければならない。また、定期的にISPSの精度管理を実施することにより、細菌学的な疫学情報源としての

正確性が担保されるものと考えられる。

E. 研究発表

1) 江藤良樹、九州ブロックパルスネット研究協力者、堀川和美、寺嶋 淳、「腸管出血性大腸菌O157事例におけるIS-printingの応用」、第31回全国衛生微生物協議会(2010.5.25-26)。

2) 市原祥子、江藤良樹、濱崎光宏、村上光一、竹中重幸、小野塚大介、堀川和美、福岡県で分離された腸管出血性大腸菌O157のstx型について、第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会、(2010.7.22-23)。

3) 江藤良樹、市原祥子、堀川和美、長期継代培養によるPFGEとIS-printingのバンドパターン変化の比較、第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会、(2010.7.22-23)。

4) 江藤良樹、千々和勝己、堀川和美、筒井博之、腸管出血性大腸菌O157による集団発生事例におけるIS-printingの有用性、第69回日本公衆衛生学会、(2010.10.28-29)。

F. 文献

- 1) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, and Hayashi T.: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J Clin Microbiol. 2009, 47:2888-94.

表 1. 九州各施設の IS-printing System に使用した周辺機器

Lab.	PCR		DNA 添加量 (μ l)	電気泳動			画像取り込み	
	メーカー	型式		メーカー	型式	泳動時間	メーカー	型式
1	AB	GeneAmp9700	0.5	ADVANCE	Mupid-exU	75分	BIO-RAD	Gel Doc XR
2	AB	GeneAmp9700	1	ELCHROM SCIENTIFIC	SEA 2000	100分	Alpha Innotech	AlphaImager Mini
3	ASTEC	PC320	1	ADVANCE	Mupid	70分	BIO-RAD	Gel Doc 2000
4	AB	Veriti 200	1	ADVANCE	Mupid	70分	CANON	CanoSCAN LiDO200
5	BIO-RAD	Tetrad2	1	ADVANCE	Mupid- α	65分	BIO-RAD	Gel Doc XR
6	BIO-RAD	iCycler	1	ADVANCE	Mupid-exu	80分	ATTO	Printgraph typeCX
7	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid	120分	BIO-RAD	Gel Doc XR
8	AB	GeneAmp9700	0.1	ADVANCE	Mupid	70分	FUJIFILM	FinePix S9500
9	MJ Research	DNA engine TETRAD 2	1	ADVANCE	Mupid-ACE	60分	BIO RAD	GEL Doc XR+
10	AB	veriti	1	ADVANCE	Mupid	70分	TOYOBO	FAS-III
11	AB	GeneAmp9700	1	ADVANCE	Mupid-2 plus	70分	Biolmage	Gel Print INFINITY
12	AB	GeneAmp 2700	1	東洋紡	GelMate2000	90分	POLAROID	MP-4

表 2. 九州各施設の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

Lab.	泳動バッファー、TBE			泳動mixture 混合比(μ l) dye + amplicon	PCR産物 泳動量(μ l)	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	BIO-RAD	161-0733	$\times 0.5$	1+5	1	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
2	invitrogen	15581-044	$\times 0.5$	1+5	1	bms	BC-BRG10001	TOYOBO	RE-DYE
3	ナカライテスク	35432-41	$\times 0.5$	1+5	1	SIGMA	MBMA 100BP-S	TOYOBO	RE-DYE
4	日本ジーン	318-90041	$\times 0.5$	1+1	1	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
5	日本ジーン	318-90041	$\times 0.5$	1+5	5	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO	RE-DYE
6	BIO-RAD	161-0733	$\times 0.5$	1+5	5	BioLabs	N0467G	TOYOBO	RE-DYE
7	SIGMA	T4415-1I	$\times 0.5$	1+5	5	コスモバイオ	39881	TOYOBO	RE-DYE
8	ナカライテスク	35440-31	$\times 0.5$	1+5	5	TaKaRa	3407A	TaKaRa	$\times 6$ Loading Buffer
9	BIO-RAD	16-10733	$\times 0.5$	1st: 1+5, 2nd: 1+5(5倍希釈)	3			TOYOBO	RE-DYE
10	BIO-RAD	161-0733	$\times 0.5$	Dye1+5倍希釈したものを5	5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
11	TAKARA	T905	$\times 0.5$	1+5	1	TOYOBO	DNA-035	TOYOBO	RE-DYE
12	TaKaRa	T905	$\times 0.5$	1+5	1.25	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE

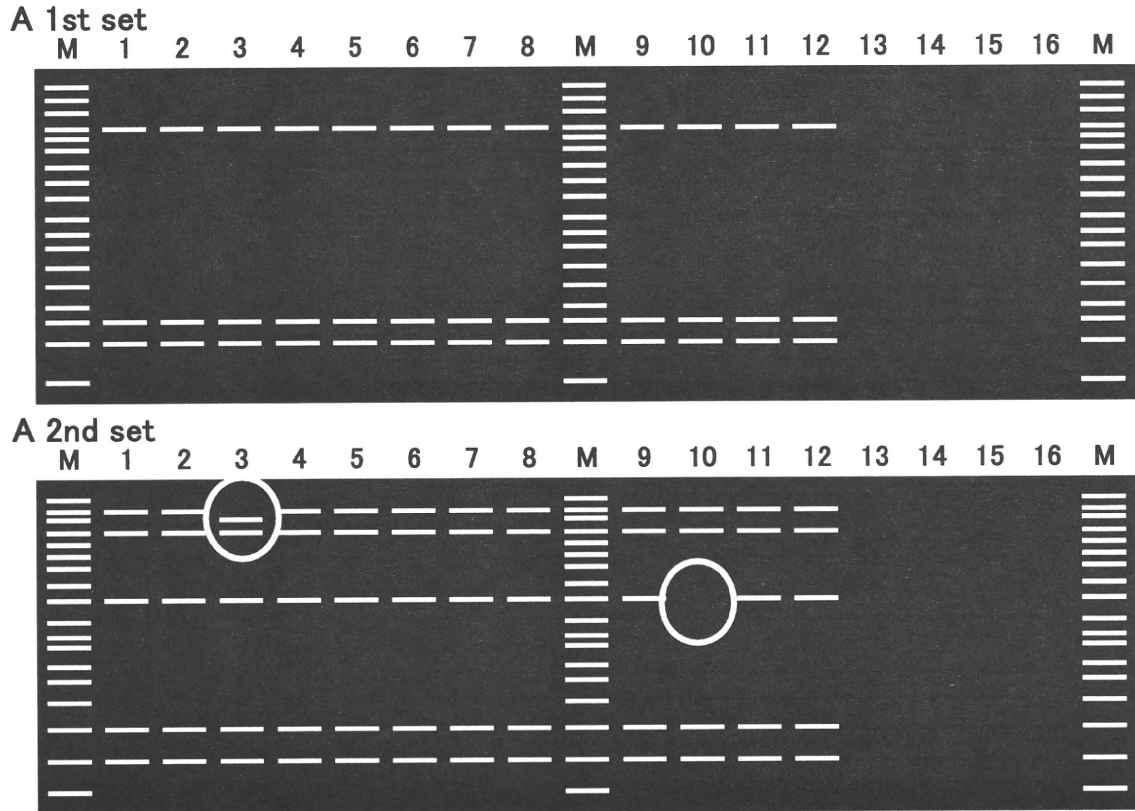


図3 精度管理株 A、各施設の結果

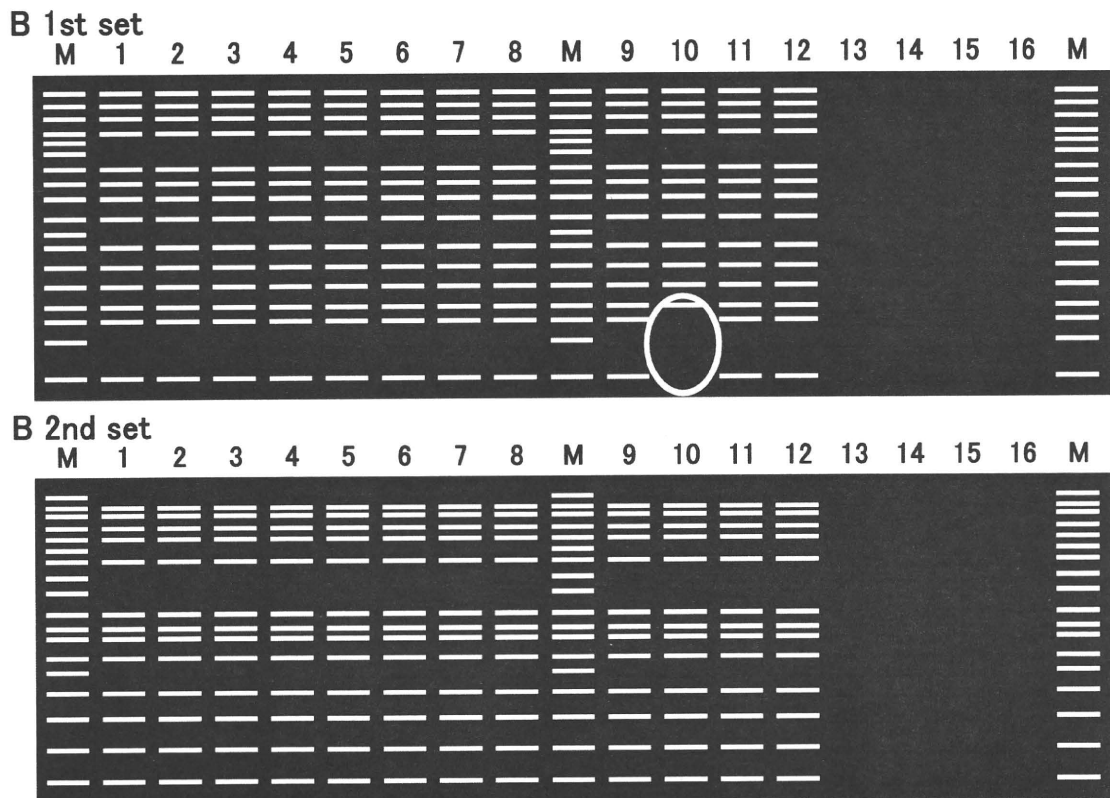


図4 精度管理株 B、各施設の結果

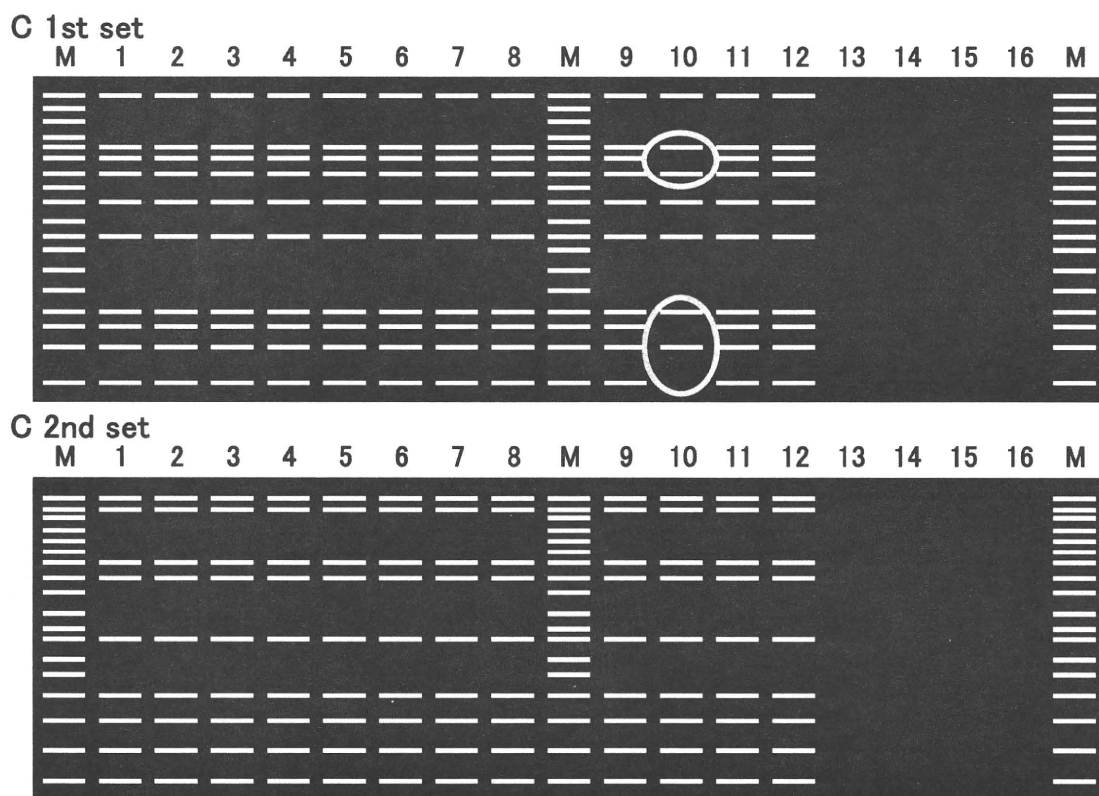


図5 精度管理株 C、各施設の結果

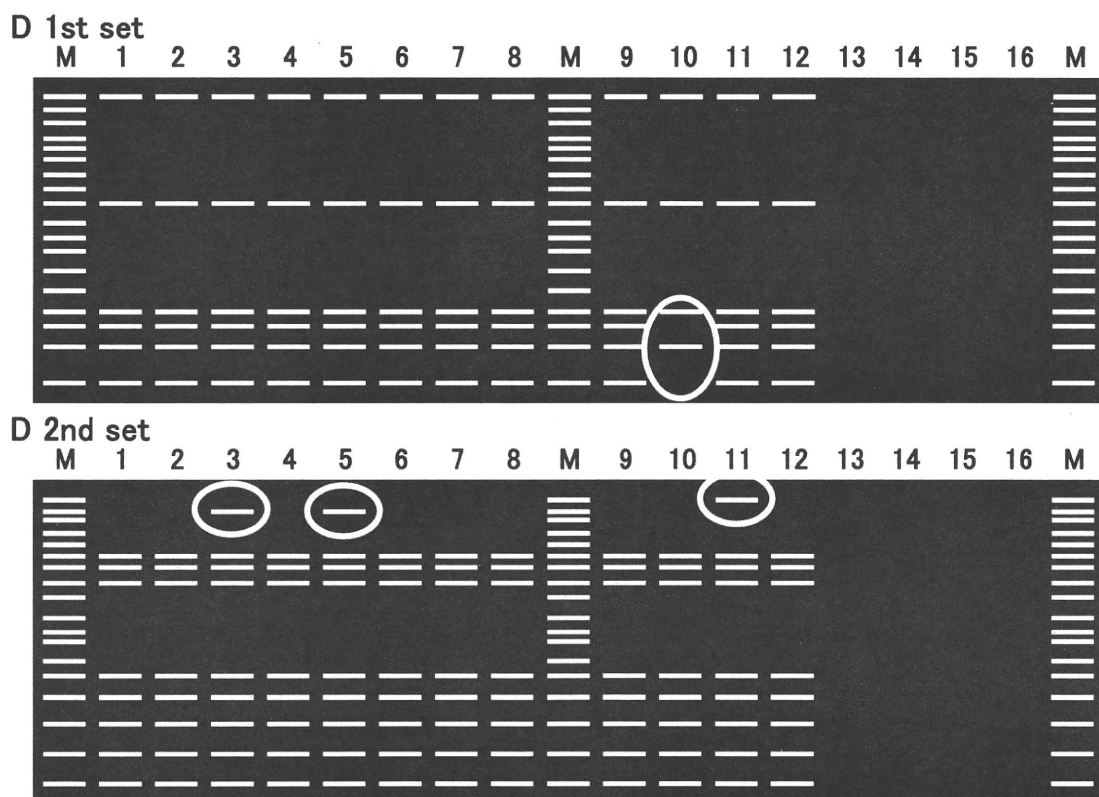


図6 精度管理株 D、各施設の結果

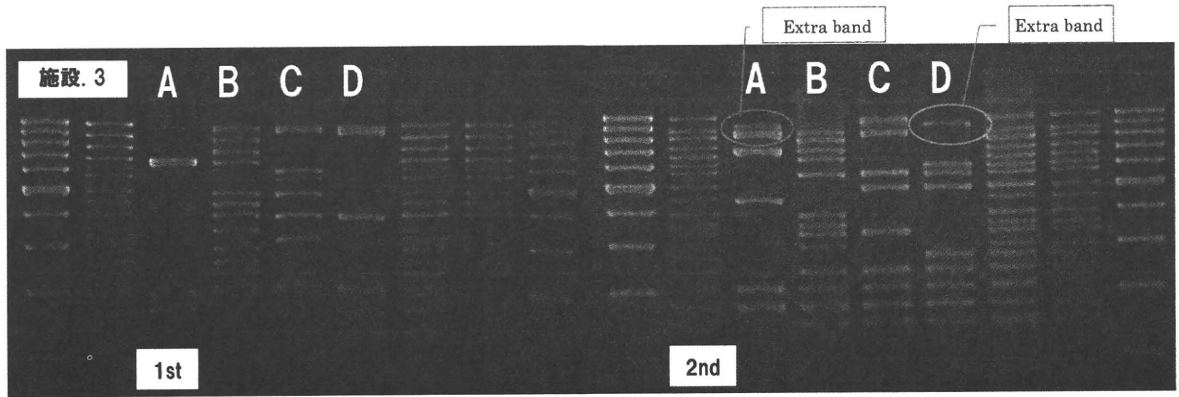


写真 施設.3

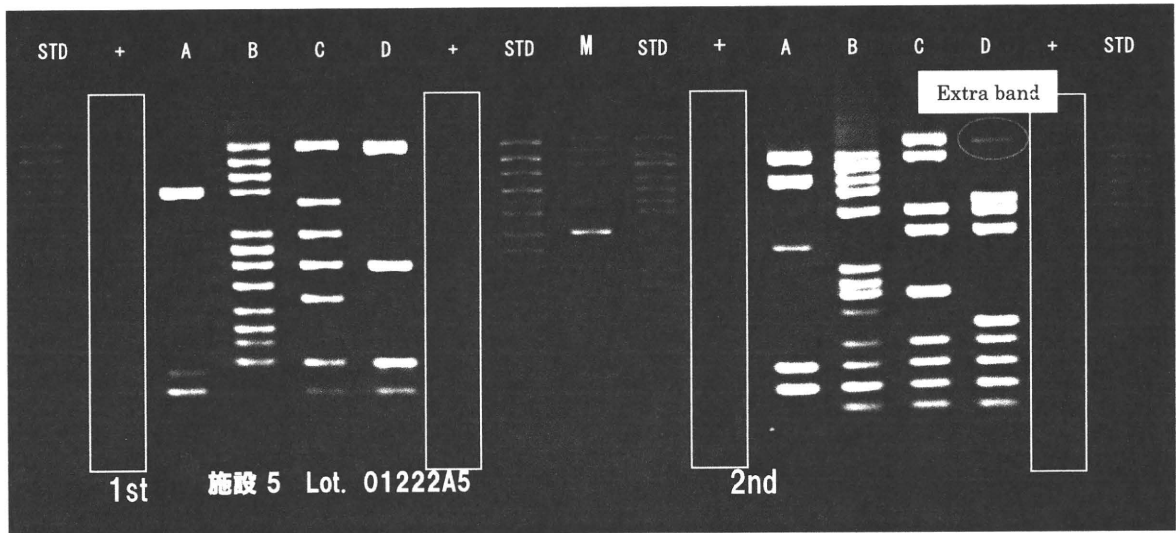


写真 施設 5 (1st および 2nd PCR 陽性コントロール、Template Mix が増幅されていない)

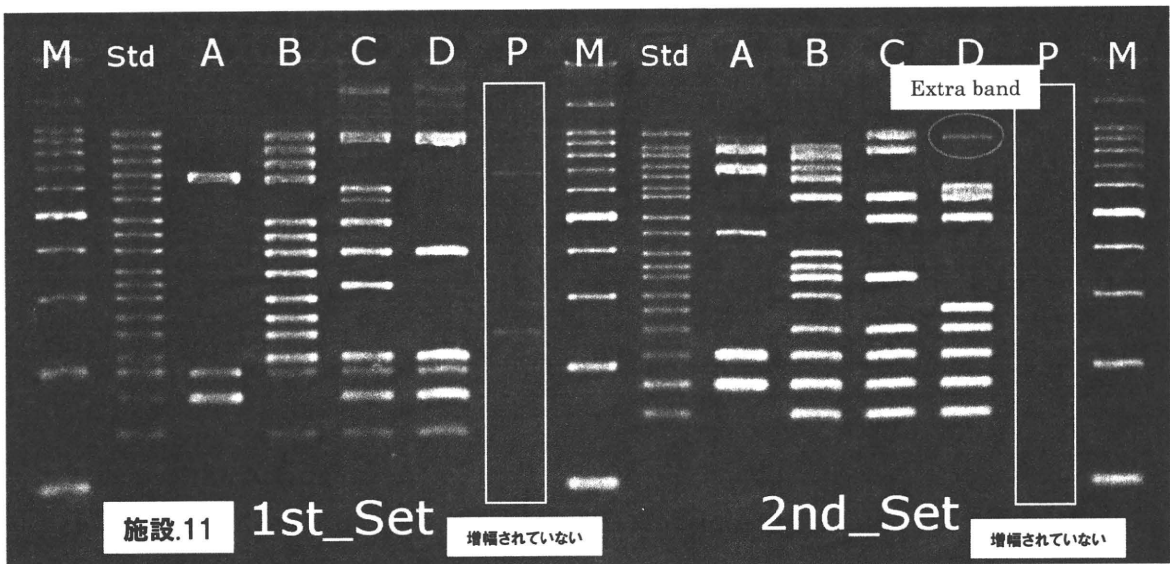
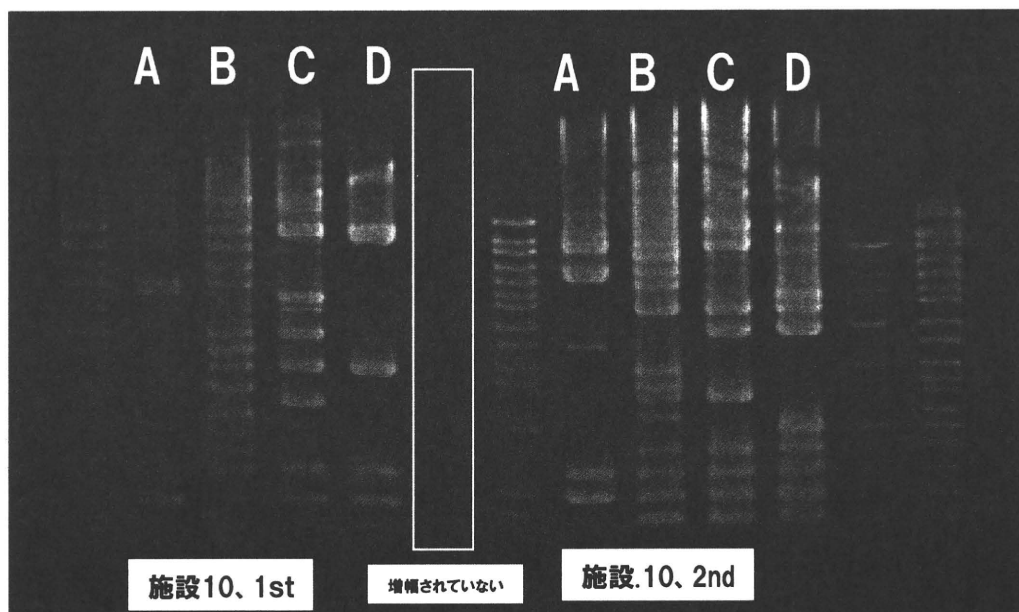


写真 施設 11 (1st および 2nd PCR 陽性コントロール、Template Mix が増幅されていない)



1/5
泳動

1/5
泳動

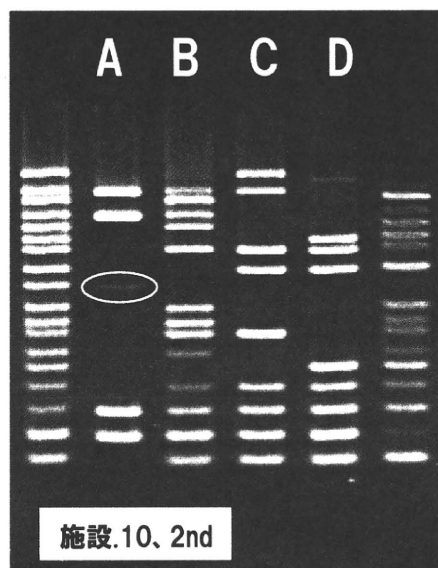
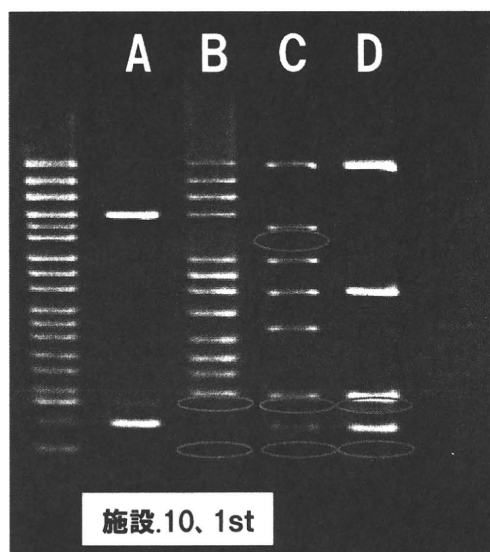


写真 施設 10 (1st PCR 陽性コントロール、Template Mix が増幅されていない)

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)
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
— 九州地区で分離された O157 菌株の IS-printing System による比較検討 —

江藤良樹、市原祥子、小野塚大介、堀川和美(福岡県保健環境研究所)、麻生嶋七美(福岡市保健環境研究所)、寺西泰司(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)、杉谷和加奈(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)、吉野修司(宮崎県衛生環境研究所)、濱田まどか(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)

研究要旨 九州地区の各地方衛生研究所にて IS-printing system (ISPS)を用いて、遺伝子解析した結果情報をリアルタイムに共有することを目的として、特定のウェブサーバーに共有データベースを設置し、運用を開始した。今年度データベースに登録された ISPS の遺伝子型と、その菌株の分離日などの疫学情報を元に解析し、相互の関連性についての検討を試みた。

A. 研究目的

IS-printing system(ISPS)は、腸管出血性大腸菌 O157 ゲノムの Insertion sequence(IS)による構造多型を利用することによって、菌の識別が可能な手法である¹⁾。この手法は、PCR ベースであるため高価な機材を必要とせず、かつ、単純・迅速に結果を得ることができる。また、標的遺伝子座への IS の挿入をバンドの有無で判定するため数値化が容易である。そこで、これらの利点を生かし、九州地区の各地方衛生研究所(以下、施設 1~11)の ISPS による遺伝子型の情報をリアルタイムに共有することを目的として、今年度、当所のウェブサーバーに共有データベースを設置し運用を行ってきた。今回は、データベースに登録された ISPS の遺伝子型と、その菌株の分離日などの疫学情報を元に解析を行った。

B. 研究方法

ISPS は IS-printing system(東洋紡)を用いて各施設において実施した。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)で判定した後に、指定の Excel ファイルにて 10 進数に変換した。その後、当所に設置した会員制の共有データベースに、ISPS の遺伝子型と共に菌株名、分離日、発症日などの疫学情報とともに登録した。今年度の登録株数は 280 株分であった。

解析には、BioNumerics v6.1(Applied Maths)を用いて、Minimum Spanning Tree(MST)を構築した。また、複数の施設で ISPS の遺伝子型が一致した株については、菌株の分離日、発症日、備考を参考に関連の有無を精査した。

C. 結果および考察

280 株の ISPS による遺伝子型(IS type)は、72 つに分けられた(図 1)。このうち、20 の IS type は、複数の施設から報告された。これら 20 の IS type の分離株の登録された情報(分離日・発症日・備考など)を元に、関連性を精査した。

IS type 1 は、7月下旬から8月下旬に、九州北部の 5 県 5 施設(施設 1、施設 2、施設 7、施設 8、施設 9)の管轄する地区にて分離された(図 1、2)。焼肉、ステーキ、生レバー、ユッケなどの牛肉関連食品の喫食歴のある患者が多数見られた。IS type 2 は、7月中旬から8月初旬にかけて九州北部の 3 県 5 施設の管轄する地区(施設 10、施設 1、施設 2、施設 3、施設 9)にて分離され(図 1、3)、続いて 10 月初旬に施設 1 管内で 5 株、施設 5 管内で 1 株が分離された。IS type 3、IS type 4 は施設 1 管内の保育園で発生した 2 事例から分離された株が主であった。IS type 3 は 3 県 4 施設の株であるが、分離日が離れている為、関連性は見いだせなかった。一方、IS type 4 は保育園事例の初発と同じ時期に 4 県 4 施設の管轄する地区(施設 8、施設 4、施設 1、施設 3)にて分離されていることが分かった(図 4)。IS type 5 は、9月下旬から10月中旬にかけて、1 県 2 施設(施設 1、施設 2)の管内の患者から分離された。患者の多くは、生レバー・生センマイ・焼肉を喫食していた。また、施設 1 管内の患者の多くは、共通の店舗(焼肉店)を利用して

いたが、施設 2 の患者が同店舗を使用していたか確認できなかった。IS type 6 は、8月中旬から下旬にかけて 2 県 3 施設管内の患者より株が分離されていたが、その他の情報から関連性を見いだすことは出来なかった。IS type 7 のうち、1 県 2 施設の管内で 6 月中旬に株が分離された患者(各施設 1 名ずつ)は、いずれも生レバーを喫食していた。喫食日が一日違いであることから、食肉の関連があったのではないかと推測された。その他、17 の IS type が複数の施設から登録されたが、菌株の分離日が異なり、共通の感染源を疑うような情報は無かった。

今年度、データベースに登録された情報からは、異なる施設から登録された株の分離日からは関連性を疑う株はあるものの、感染源(流通経路と含め)を特定することはできなかった。今後、登録情報の追加などを検討し、さらにデータの蓄積を行い、引き続き解析を続けていく予定である。

D. 文献

- 1) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, and Hayashi T.: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J Clin Microbiol. 2009, 47: 2888-94.

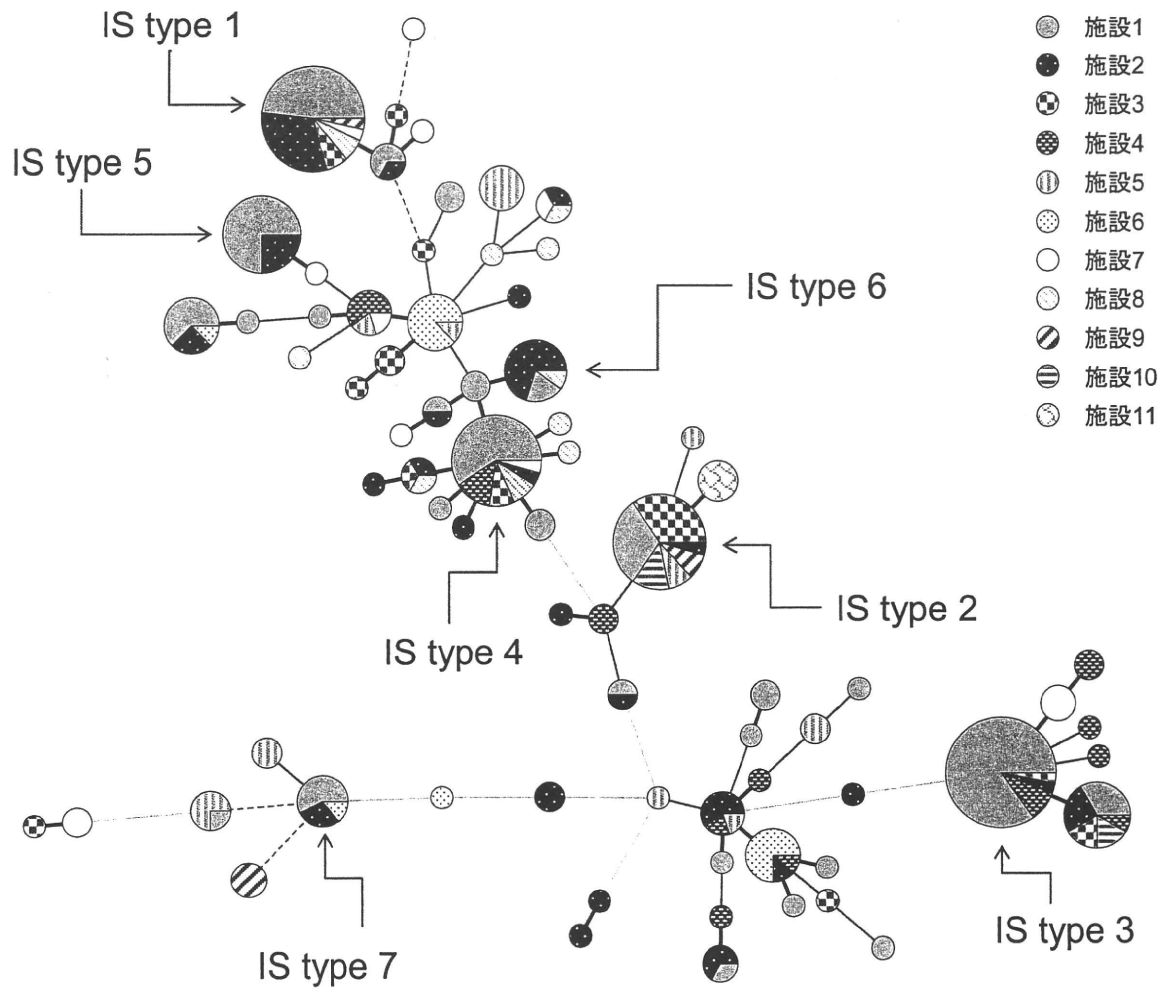


図1 九州各地研の IS-printing System の遺伝子型による Minimum Spanning Tree

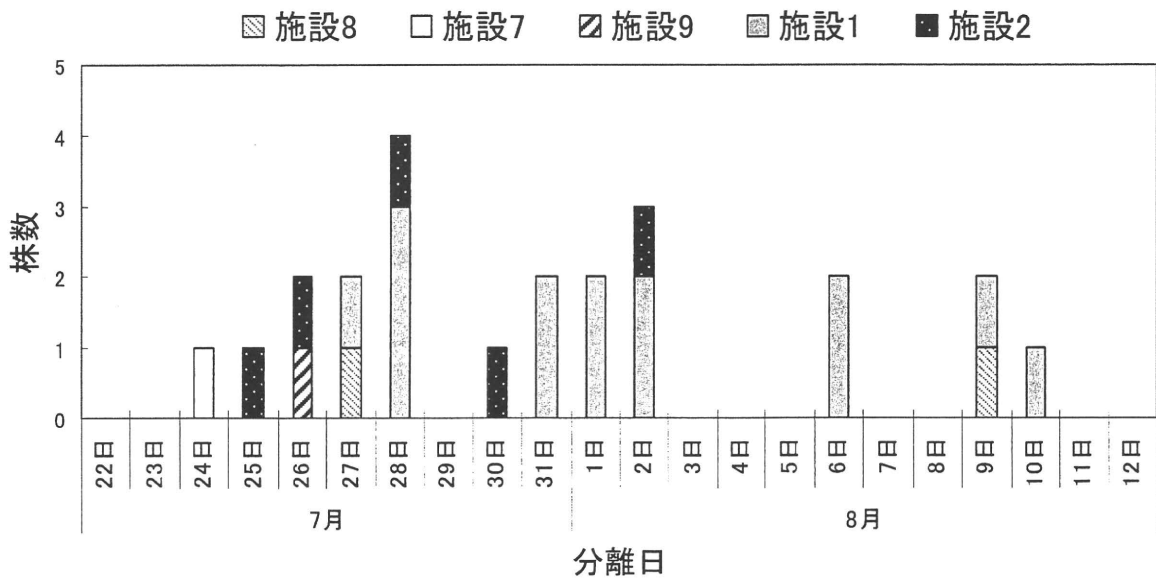


図2 各施設から報告された IS type 1 の菌株の分離日