

1. 保育所における腸管出血性大腸菌 026 集団感染事例

PFGE 解析の結果、感染者 17 名から検出された腸管出血性大腸菌 026 について、制限酵素 Xba I による PFGE を実施したところ、17 株すべての泳動パターンが一致した。

2. 介護老人福祉施設食中毒事例

PFGE による解析結果、介護老人福祉施設 A および隣接施設 B の入所者の便から分離された菌株および保存食から分離された菌株 No. 3~11 の DNA 切断パターンは全て同一であった。

3. 仕出し弁当を原因とする 026 食中毒

施設 A, B の弁当喫食者から分離された 026 の PFGE パターンは同一であった。さらに弁当の「添え野菜」から検出された 026 とも PFGE パターンが一致した。

4. 散発下痢症患者由来サルモネラ属菌 (09:-:-) PFGE 解析

2011年にF県内で散発下痢症患者から検出されたサルモネラ属菌(09:-:-)20株のうち19株のPFGEパターンは類似していた(相同性85%)。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

Masakado Matsumoto, Masahiro Suzuki, Kaoru Hirose, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa, Masaaki Minami, Ichiro

Tatsuno, Akira Okamoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa. Variation in M protein production among *Streptococcus pyogenes* strains according to *emm* genotype. *Microbiol Immunol.* 2011; 55: 379-387.

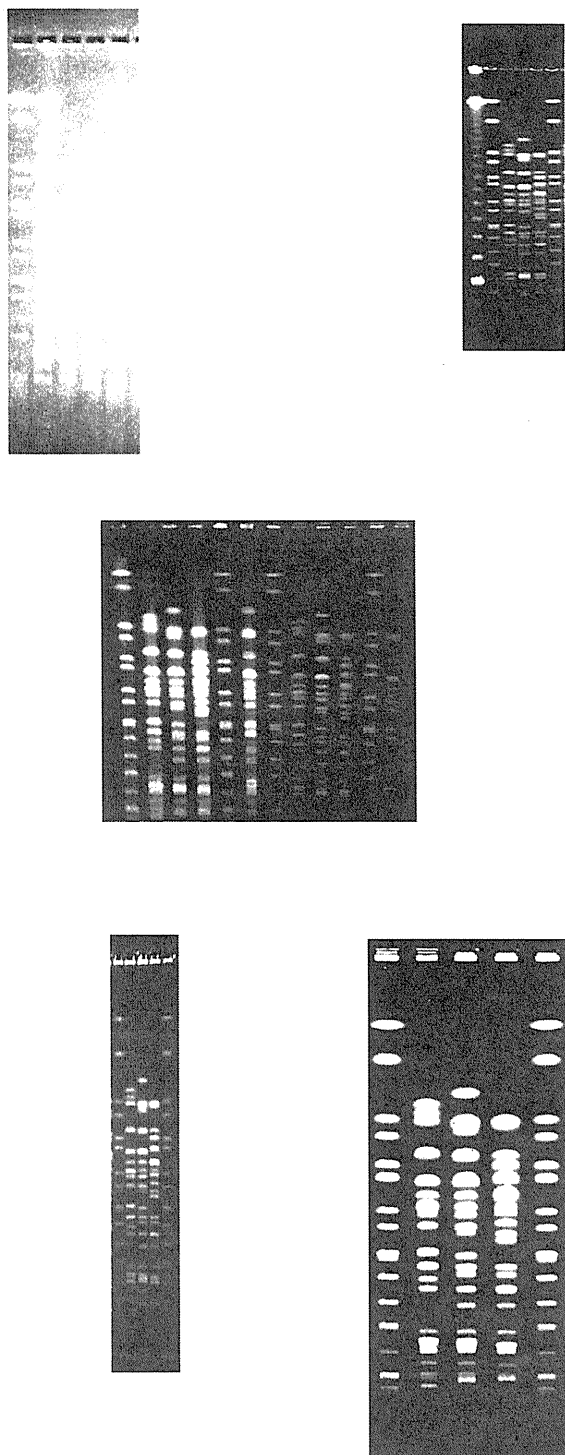
Masaaki Minami, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Nanako Hata, Naoki Wakiyama, Masakado Matsumoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa. Prevalence of a streptococcal inhibitor of a complement-mediated cell lysis-like gene (*sicG*) in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Curr Microbiol.* 2011; 62: 884-887

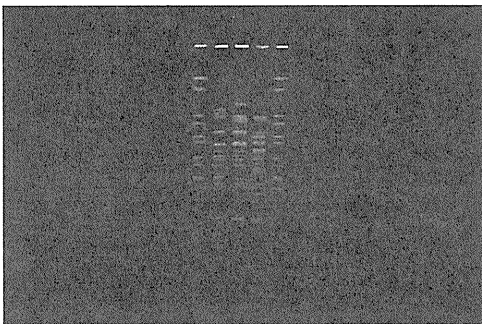
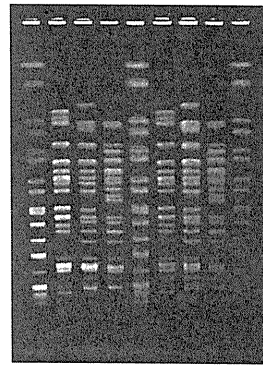
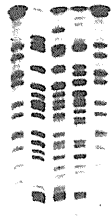
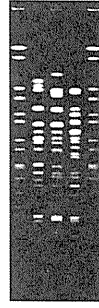
Masahiro Suzuki, Kazuhiro Yamada, Miki Nagao, Etsuko Aoki, Masakado Matsumoto, Tatsuya Hirayama, Satoshi Ichiyama, Yoshitsugu Yamamoto, Reiji Hiramatsu, Hiroaki Iinuma. Antimicrobial ointments and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1917-20.

学会発表

Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Kazuhiro Yamada, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa. Evaluation of a novel *Staphylococcus aureus* genotyping called phage open reading frame typing by detecting phage-derived open reading frames, Staphylococcal cassette chromosome *mec*, and genomic islets. *IUMS* 2011 2011.9.10.

図1 東海・北陸地方11施設のPFGE泳動図





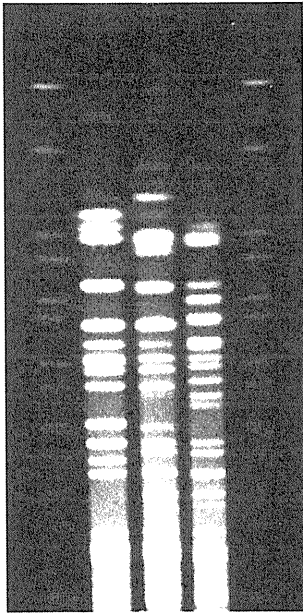


図2 IS printing system 精度管理で型別が正しく行われなかった3施設のエクセル結果シートと泳動図（施設AからC）

A

株 No.	1st set																eae	16	hlyA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	

2nd set

株 No.	2nd set																stx2	stx1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

B

株 No.	1st set																eae	16	hlyA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15				
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	

2nd set

株 No.	2nd set																stx2	stx1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1																		
2																		
3																		



1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

C

株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
3	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0

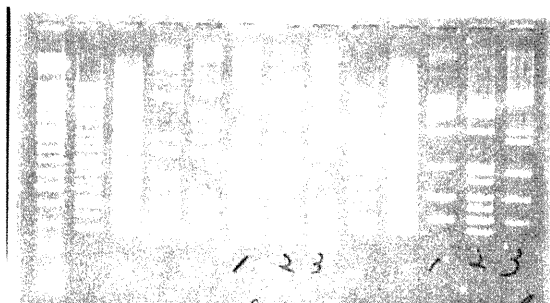
2nd set

株 No.	2nd set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

型別を誤った箇所は黄色マーカーで示した。

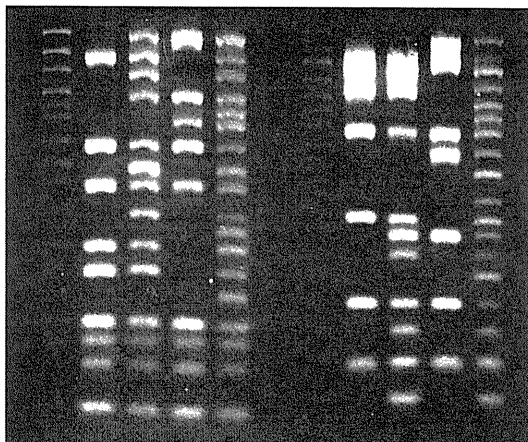
A 1st set

2nd set



B 1st set

2nd set



C

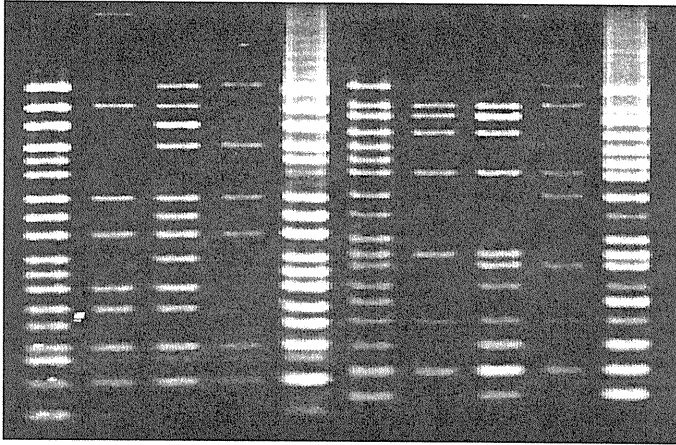


図3 IS printing system 精度管理で型別が正しく行われた8施設のエクセル結果シートと泳動図（施設DからK）

D

株 No.	1st set															eae	16	hlyA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.																16	stx2	stx1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

E

株 No.	1st set															eae	16	hlyA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.																16	stx2	stx1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0

2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

F

株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.	2nd set																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	

G

株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.	2nd set																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	

H

株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.	2nd set																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	

I

株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

J

株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

株 No.																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

K

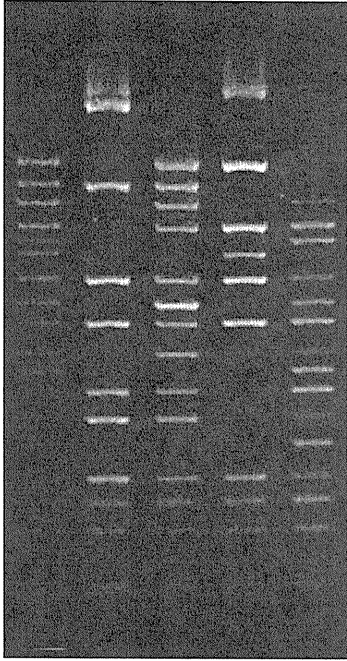
株 No.	1st set																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA
1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1

2nd set

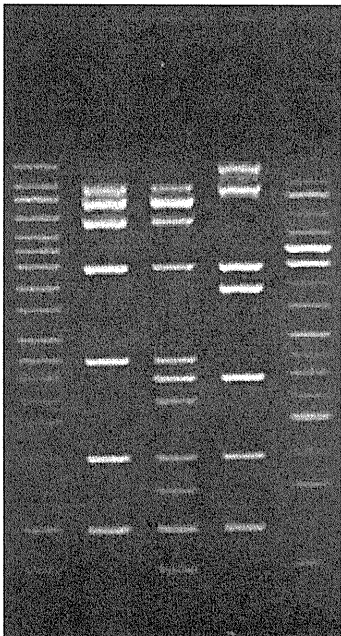
株 No.																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0

D

1st set



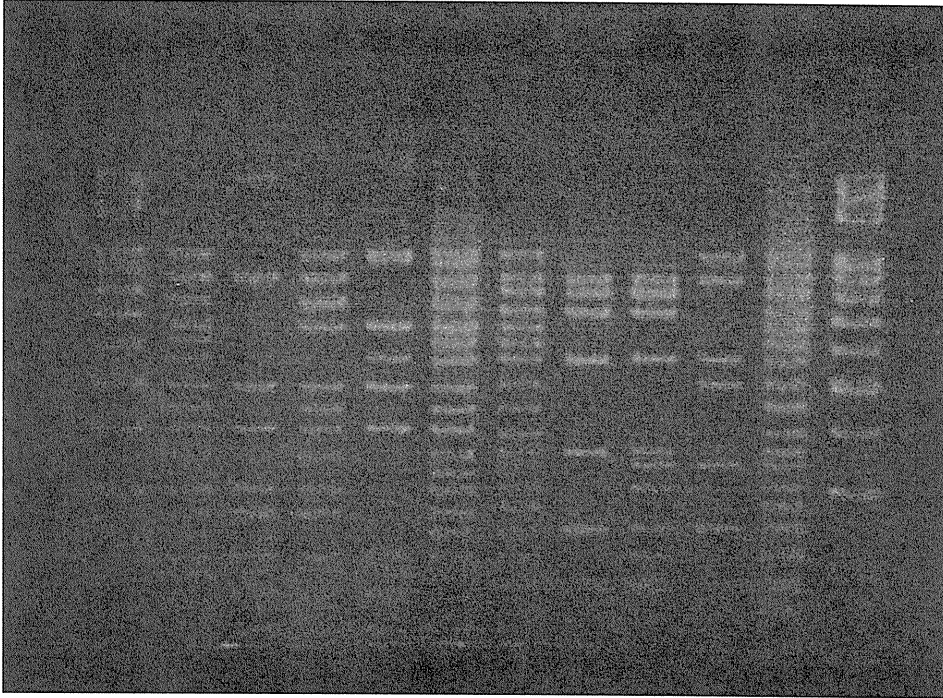
2nd set



E

1st set

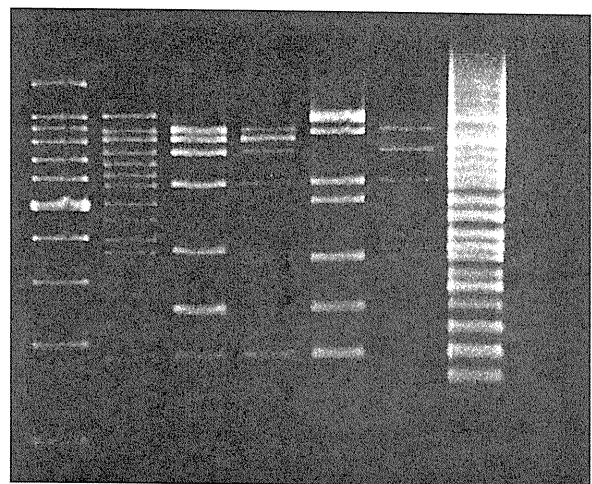
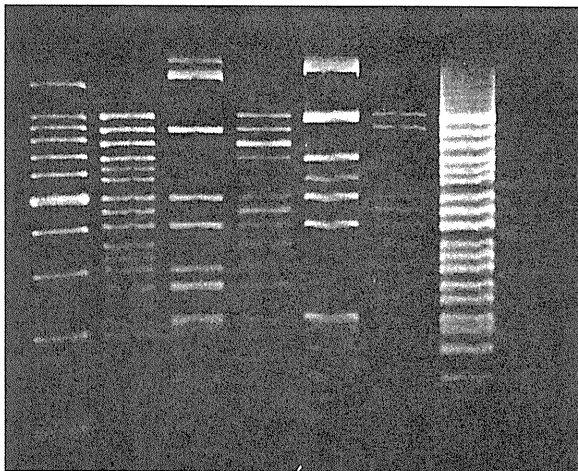
2nd set



F

1st set

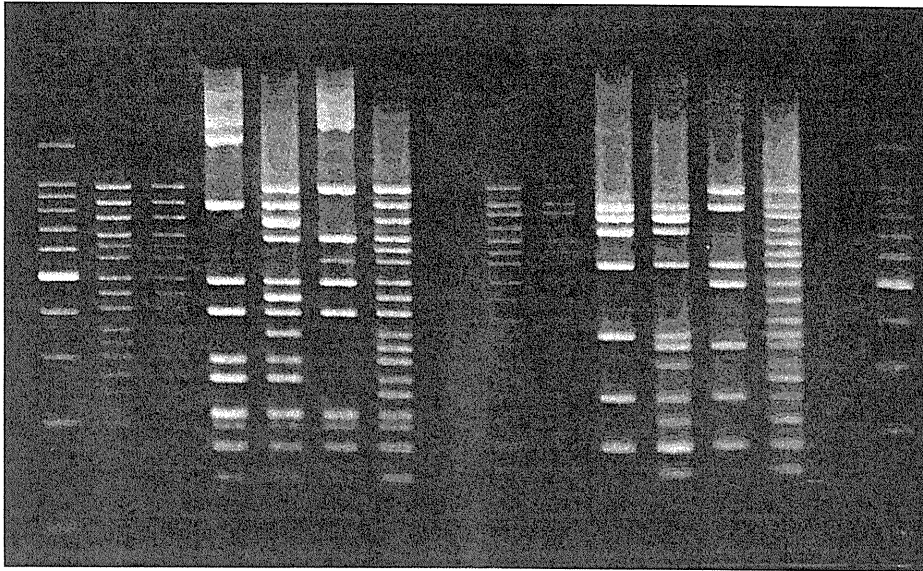
2nd set



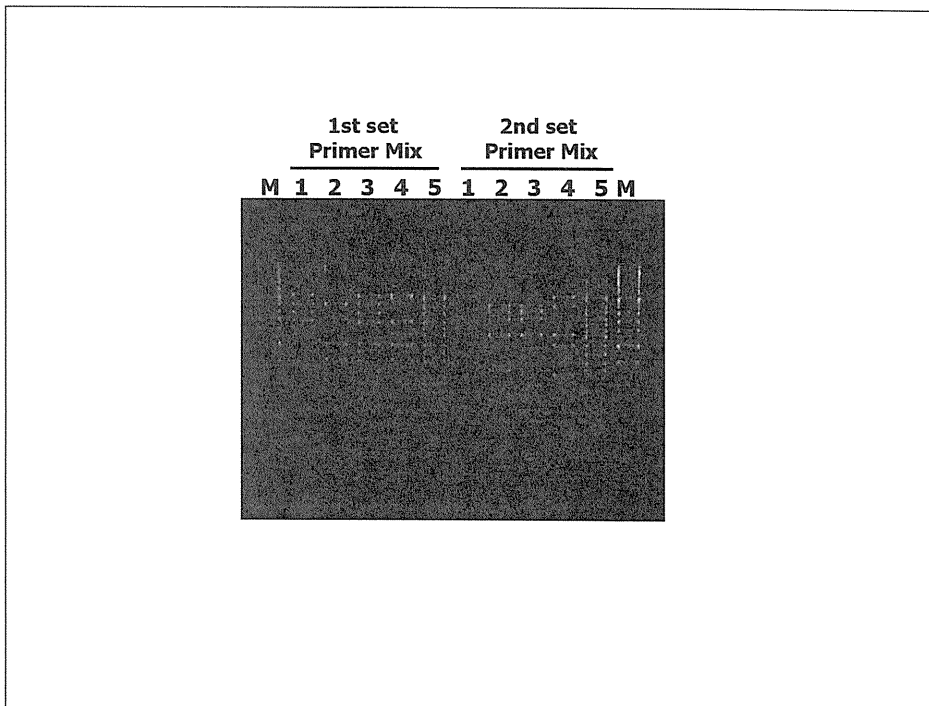
G

1st set

2nd set



H

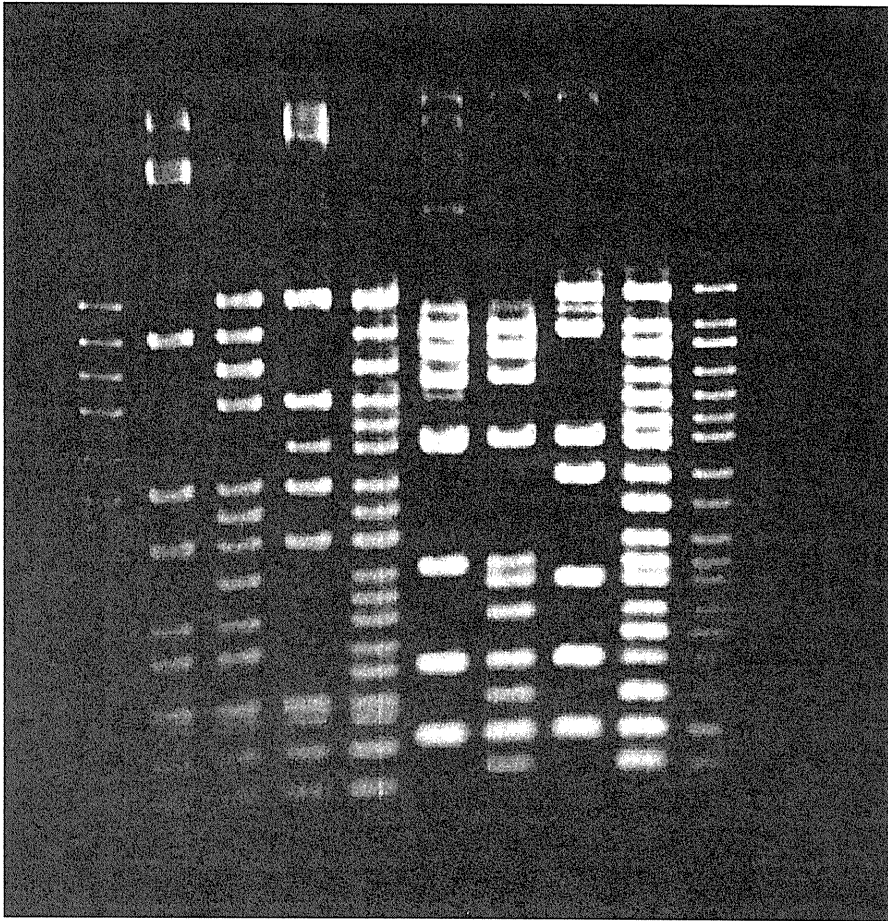




I

1st set

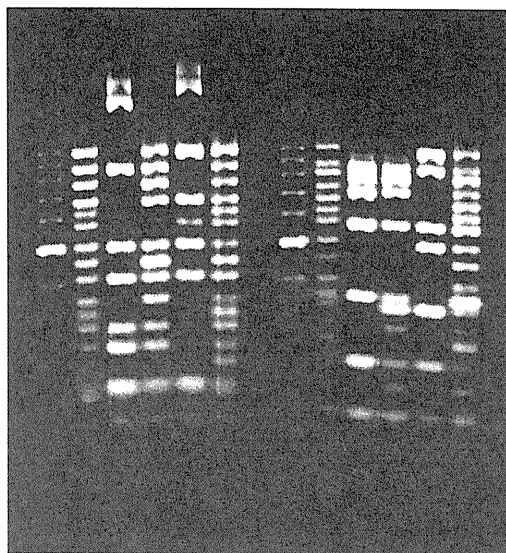
2nd set



J

1st set

2nd set





K

1st set

2nd set

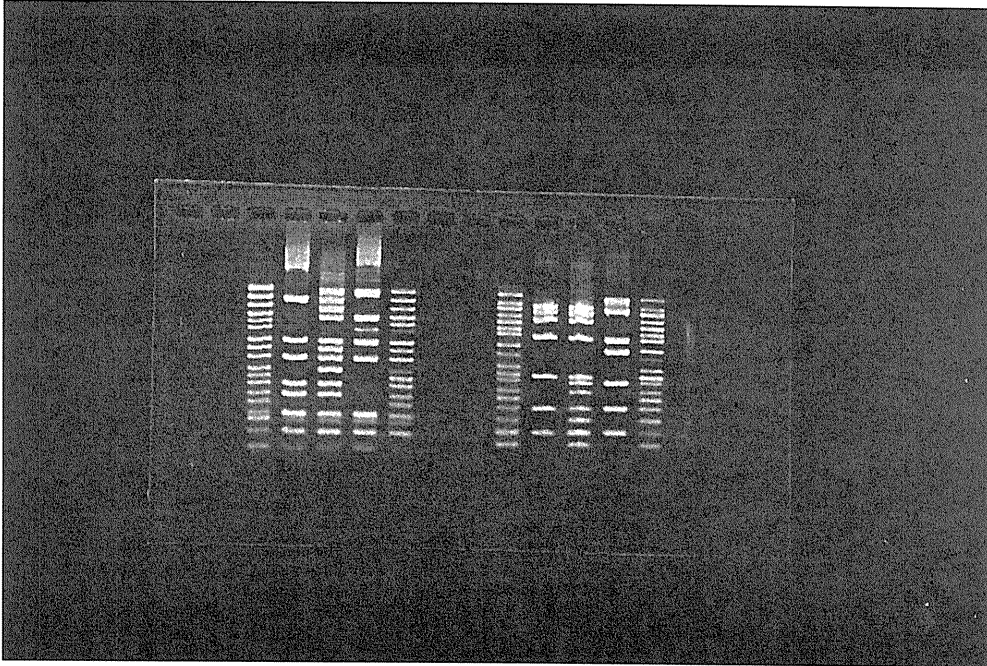
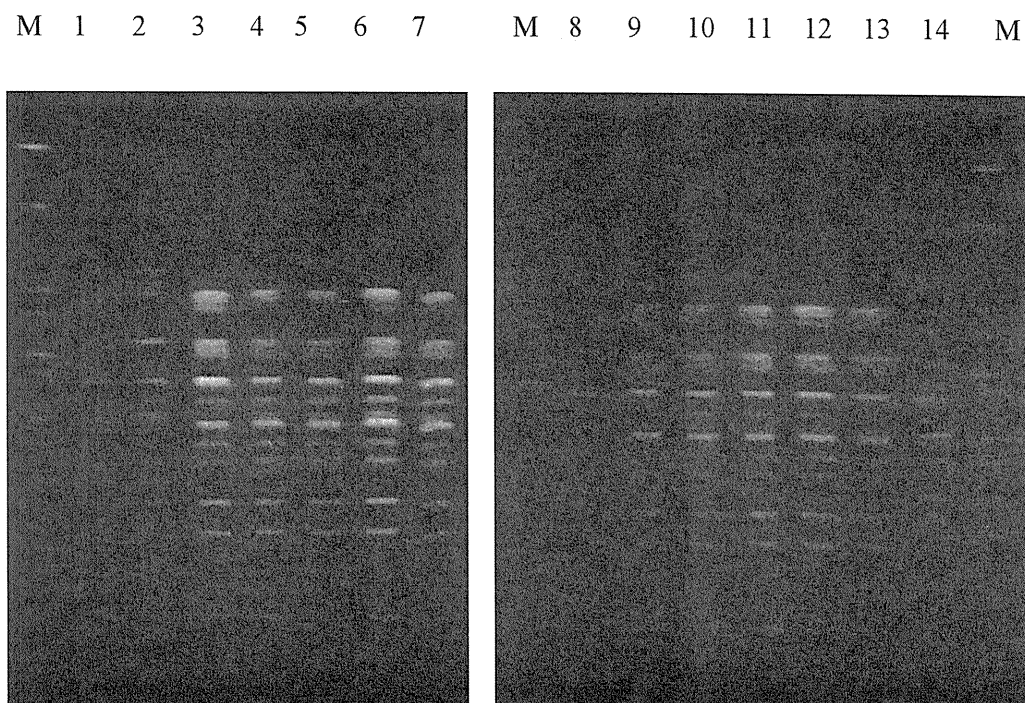


図 4

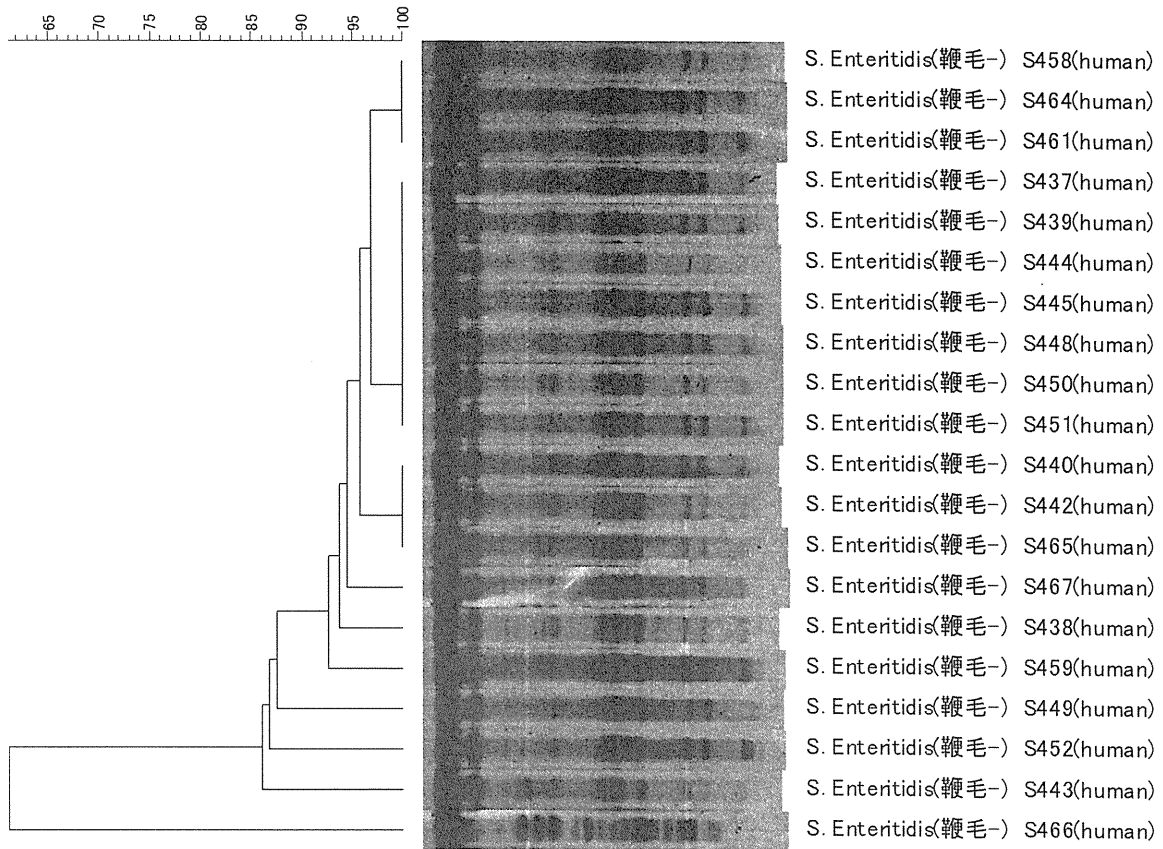


M : Size Marker (*Salmonella* Braenderup)

制限酵素 : *Xba* I、泳動条件 : 6V/cm (200V) 2.2-54.2sec 19hr

菌株 No.	泳動図 No.	菌株由来	備考	
1	1,14	患者糞便	平成 23 年 4 月に発生した家族内発生事例	
2	2,8	患者糞便	直近(平成 23 年 9 月)に発生した散発事例	
3	3	患者糞便	食中毒事例	
4	4,9	患者糞便		介護老人福祉施設 A 入所者
5	5	患者糞便		隣接施設 B 入所者
6	6	患者糞便		隣接施設 B 入所者
7	7	患者糞便		隣接施設 B 入所者
8	10	食品		保存食 (大根おろしと大葉の和え物)
9	11	患者糞便		隣接施設 B 入所者
10	12	患者糞便		隣接施設 B 入所者
11	13	患者糞便		隣接施設 B 入所者

図5 散発下痢症患者由来サルモネラ属菌 PFGE



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 23 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおける腸管出血性大腸菌感染症の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	河野智美、福島敬介	滋賀県衛生科学センター
	浅井紀夫、杉浦伸明	京都府保健環境研究所
	木澤正人	京都市衛生環境研究所
	小笠原準、中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	下迫純子	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、宮本園子	神戸市環境保健研究所
	川西伸也	姫路市環境衛生研究所
	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（EHEC）の型別法である IS-printing System（IS）法とパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法について、信頼性確保のため精度管理を実施するとともに、EHEC O157 の流行菌型を迅速に探知できるよう近畿 IS データベースの充実と活用をはかった。EHEC O157 を用いた IS 法の精度管理は良好な結果が得られたが、EHEC O26 を用いた PFGE 法ではサイズの近いバンドが多く、画像や解析者によってバンド認識のばらつきが大きい結果となった。近畿 IS データベースは、入力項目の追加や絞り込み検索を可能にしたバージョン 2 に改良し、2012 年 2 月 3 日現在の登録数は 1,550 株である。2011 年 7 月～8 月には同一 IS 型を示す株が多発し、各施設に注意喚起と情報提供を呼びかけた。感染源の解明には至らなかったが、PFGE 法の結果からも diffuse outbreak であったと考えられた。Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法については、使用するサイズマーカーが測定値に大きく影響を与えることが明らかになり、施設間で共通の手法として使用するためには、試薬や反応条件の統一が不可欠であると考えられた。

## A. 研究目的

食中毒や食品由来感染症が発生した際に、患者や従業員、推定原因食品等から分離された病原体を詳細に比較することは、行政対応の科学的根拠として必須の課題となっている。近畿ブロックの地方衛生研究所では、散発感染事例が多く夏季に発生が集中する腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症について、パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法や IS-printing System（IS）法、Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法を用いて事例間の関連性を鑑別している。本研究では、これらの分子疫学手法について、IS 法と PFGE 法は信頼性確保のため精度管理を、MLVA 法は標準化に向けての検討を実施するとともに、EHEC O157 の流行菌型を迅速に探知できるよう近畿 IS データベースの充実と活用をはかった。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

IS 法の精度管理には 2011 年に大阪府で分離された EHEC O157 5 株（菌株 1～5）を、PFGE 法の精度管理には 2008～2011 年に大阪府で分離された EHEC O26 5 株（菌株 6～10）を用い、トリプトソイ寒天培地（TSA）1ml を分注したマイクロチューブ（輸送培地）に接種して研究協力者に配布した（表 1）。また、近畿 IS データベースには各施設で分離、収集した EHEC O157 を使用した。

MLVA 法の検討には、大阪府内で 2005 年から 2008 年に分離された 8 株の EHEC O157（No.1～8）について公衛研でテンプレート

を調整し、3 施設の研究協力者（施設 X、Y および Z）に配布した。

### 2. IS 法

IS 法は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を使用し、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、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、1 施設は自動電気泳動装置 QIAxcel（QIAGEN）を使用した。

### 3. 近畿 IS データベース

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。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。特定の IS 型の流行が疑われる場合には、各施設に情報提供を呼びかけた。また、2 月 3 日現在の登録株について、BioNumerics ver. 6.1（Applied Maths）を用いて Minimum Spanning Tree（MST）を作成した。

### 4. データベース登録株の clade 解析

伊豫田のプライマー（未発表）を用いた

MAMA-PCR 法により、clade 8 に特徴的な Sakai 株の ORF; ECs2357 の 539 番目の塩基置換 (C から A) を検出した。clade 8 以外の株については、non-8 と判定した。

#### 4. PFGE 法

平成 15 年度から使用している「PFGE New Protocol-Kinki」に従って *Xba* I で切断した。電気泳動時間は 19 時間を目安として、各施設の電気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。サイズマーカーには、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断を使用し、Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できる泳動像を条件とした。

#### 5. PFGE 画像の解析

EHEC O26 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た。

3 施設では Fingerprinting II ver. 3 (Bio-Rad) を、1 施設では BioNumerics ver. 6.1 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。

#### 6. MLVA 法

プライマー (インビトロジェン) は公衛

研で購入したものを 3 施設に配布し、サイズマーカーは GeneFlo 625 (GeneFlo、コスモバイオ) に統一して、施設 X と施設 Z には公衛研から配布し、施設 Y では別ロットの製品を使用した。これらの試薬を用い、国立感染症研究所 MLVA プロトコール (細菌第一部 2008 年 7 月現在) に準じて MLVA を実施した。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、または、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。また、施設 X では、異なるサイズマーカーである GeneScan 600 LIZ (LIZ、Applied Biosystems) を用いた測定を並行して行い、その測定値を GeneFlo と比較した。

#### C. 研究結果

##### 1. IS 法の精度管理

配布した精度管理株は、菌株 2 を除く 4 株で非特異バンドの増幅が見られた (図 1)。このうち菌株 1 のセット 1 では 1-03 プライマーおよび 1-15 プライマーの増幅サイズに、菌株 3 のセット 2 では 2-07 プライマーの増幅サイズに近い大きさであったが、いずれの施設でも正しく判定されており、4 株の判定は 10 施設で一致していた。菌株 3 については、施設 5 で 1-hlyA が陰性と判定されたが、他の 4 株に比べて菌株 3 の電気泳動像が薄かったことから、template 量を変更して再実施したところ、陽性に判定された。

##### 2. 近畿 IS データベース

データベースは、1) 「clade 解析」と「PFGE

感染研番号」を独立した項目として入力する、2) 照合結果を日付等でさらに絞り込む、3) GoogleEarth 用にデータを書き出す、4) SplitsTree 用にデータを書き出す、の4点を可能にしたバージョンアップ版を6月に配布した(図2)。

2月3日現在の登録数は1,550株で、304タイプのIS型に区別された。2011年分離株は283株の登録があり、ISコードは89タイプに型別された。登録数10株以上は5タイプあり、ISコード「118141 114763」(タイプA、図1菌株2のパターン)は45株、ISコード「249727 116975」(タイプB)は39株で、この2タイプで約30%を占めた(表2)。

タイプAとタイプBについては、大阪府でEHEC感染者数が急増した第30週(7月25日～31日)と第31週(8月1日～7日)の分離株に多くみられたことから、8月26日の更新レファレンスデータ送付時に、速やかなデータベース登録と同タイプの分離株についての情報提供を呼びかけた。9月13日までに、タイプAは4施設で28株分離され、PFGEを実施した3施設の画像で泳動パターンが一致していること、タイプBは5施設で25株分離され、2施設で実施した一部の株のPFGEパターンは一致していることが判明した。その後、タイプAは8施設、タイプBは10施設から登録されたが、タイプBが1月から12月と長期間にわたって分離されていたのに比べ、タイプAは第31週をピークに第30～34週に集中していた(図3)。

### 3. データベース登録株の clade 解析

2月3日までに clade 解析を実施した1,438株のうち clade 8 は116株で、そのISコードは32タイプに分かれた。clade 解析未実施株3株がクレード8と同じISコードを示したが、non-8と判定された株で clade 8と同じISコードを示す株はみられず、MSTでも限局した分布を示した(図4)。

### 4. EHEC O26 の PFGE 精度管理

配布したEHEC O26はXba I切断で概ね20本以上に切断され、特に200～300kbと76kb以下に多数のバンドが認められた(図5)。10施設から電送されたPFGE画像の中には、バンドが太く200～300kbのバンドが近接したものや、バンドが薄いあるいは不鮮明な画像があり、目視でのバンド認識の補正が困難であった。

施設11では、輸送培地からトリプチケースソイブロス(TSB)に接種した後、TSA平板で再分離したコロニーを前培養して作製したゲルブロック(図5、6a～10a)と、TSBに継代培養して作製したゲルブロック(図5、6b～10b)の二種類を同時に泳動した。再分離の有無で泳動パターンは異なり、特に菌株7では5本以上異なっていた。そこで、施設11はどちらの泳動パターンも画像解析に加え、10施設の11画像についてデンドログラムを作成した(図6～9)。

4人の解析者のうちB解析者とC解析者の作成したデンドログラムでは、菌株ごとにクラスターをつくり、菌株ごとの近似度はB解析者で84.3～90.6%、C解析者で87.1～95.5%であった(表3、図7、図8)。A解析者のデンドログラムは、施設2の菌株8

と菌株 9 が大きく離れる結果となったが、その他の画像については菌株ごとに近似度 84.9～91.2%のクラスターをつくった(表 3、図 6)。D 解析者は、菌株 6、菌株 8 および菌株 9 で施設 1 を除く 10 画像が近似度 87.4～92.3%のクラスターを、菌株 7 と菌株 10 は施設 1 と施設 4 を除く 9 画像で約 90%の近似度を示すクラスターをつくった(表 3、図 9)。

### 5. MLVA 法の施設間差

4 施設で測定された増幅サイズを比較したところ、Reaction 2 の Locus 36 で施設 X による菌株 No.8 の測定値が 142.9bp となり、他の 3 施設の平均値である 171.2bp よりも極端に低い値を示した(図 10)。それ以外にも若干の施設間差はあり、施設 Z の測定値が、Reaction 1 の Locus 9 では 1.7～2.6bp、Reaction 2 の Locus 19 では 1.1～2.4bp、すべての株で大きい値を示した。他方、Reaction 2 の Locus 17 では、公衛研の測定値が他の 3 施設の平均値と比較し、すべての株で 1.5～1.7bp 小さかった。その他の Locus では、4 施設でほぼ一致した値が得られた。

施設 X による 2 つのサイズマーカーを用いた測定結果を表 4 に示した。前述の菌株 No.8 の Locus 36 を除くすべてで、LIZ の測定値が GeneFlo の測定値に比べ小さい値を示した。この測定値の差は、増幅産物の分子量が 220bp 以下の Locus 25、17、36、37 では 4bp 程度であったが、増幅産物が大きくなるに従い測定値差も大きくなる傾向がみられた。Locus 10 以外の Locus では、サイズマーカーによる測定値差は供試菌株間で

2bp 以内のばらつきであったが、Locus 10 では菌株 No. 5～8 は 6bp 程度の差であったのに対し、菌株 No. 2～4 は約 12bp の差がみられた。

### D. 考察

IS 法は試薬がキット化されているが、昨年度は試薬に添付された Standard DNA や Template Mix の品質にロット差があり、結果に影響がみられた。そこで、今年度は前もって良好な結果が得られることを確認した同一のロット (Lot. 1201A) を使用して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 1) を選択したが、誤判定はなく、PCR 反応、電気泳動、増幅バンドの判定のいずれの段階も各施設で正確に実施されていると考えられた。施設 3 で菌株 3 の 1-hlyA の増幅が陰性と判定された点については、template 量が少なかったためと考えられたが、この遺伝子はプラスミド上に存在することから、精度管理株の郵送や培養が何らかの影響を与えた可能性もある。他施設では、1-hlyA を含む一部のバンドで Template Mix の増幅が悪く、アニーリング温度を下げることで改善されたことがあり、使用する遺伝子増幅装置に適した増幅条件を検討することも課題である。

近畿 IS データベースについては、IS コード「118141 114763」のタイプ A と「249727 116975」のタイプ B が 2011 年の近畿流行タイプと考えられた。特にタイプ A は第 30～34 週にだけ分離され、45 株中 27 株が第 31 週に集中していた。各施設との情報共有を