

施設 10

1st set	std	83	84	85	86	101	102	103	104	105	PC
974											
839											
742											
645											
595											
561											
495											
442											
405											
353											
325											
300											
269											
241											
211											
185											
171											
137											

std	83	84	85	86	101	102	103	104	105	PC	
982											
881											
801											
716											
647											
599											
555											
469											
440											
384											
358											
331											
301											
278											
240											
211											
181											
151											

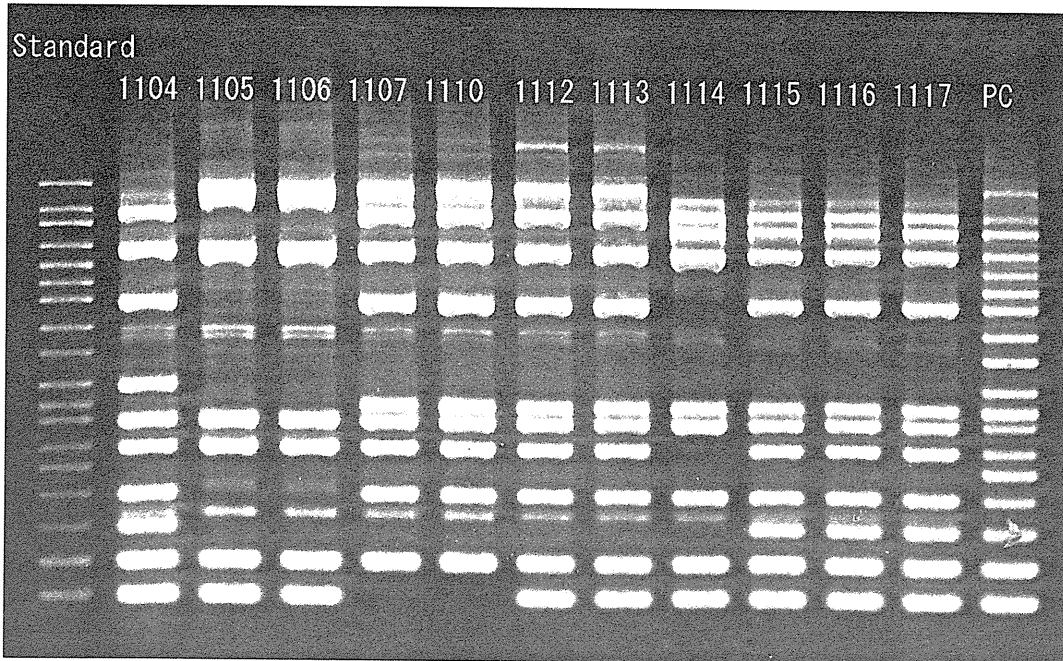
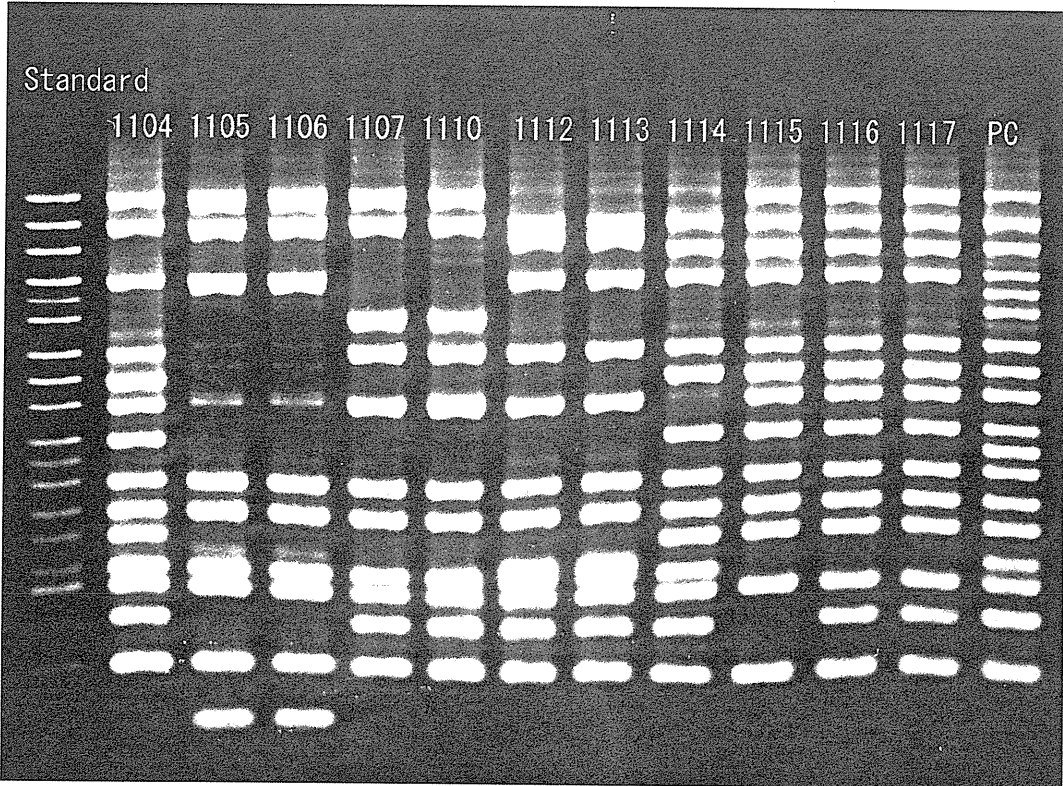
## 1st set

Primer No.	Size	83	84	85	86	101	102	103	104	105
1-01	974	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1-02	839	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1-03	742	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-07	495	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1-09	405	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1-10	353	1	1	1	1	0	0	1	0	0
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	300	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eae	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	0	0	0	0	1	1	1	1	1
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## 2nd set

Primer No.	Size	83	84	85	86	101	102	103	104	105
2-01	987	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-02	861	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	0	0	0	0	1	1	1	1	0
2-04	710	0	0	0	0	1	1	1	1	1
2-05	642	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-07	555	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2-08	499	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-09	449	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	394	1	1	1	1	1	1	0	1	0
2-11	358	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	1	1	1	1	1	1	0	1	1
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	1	1	1	1	1	1	0	1	0
stx2	181	0	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	1	1	1	1	1	1

施設 11



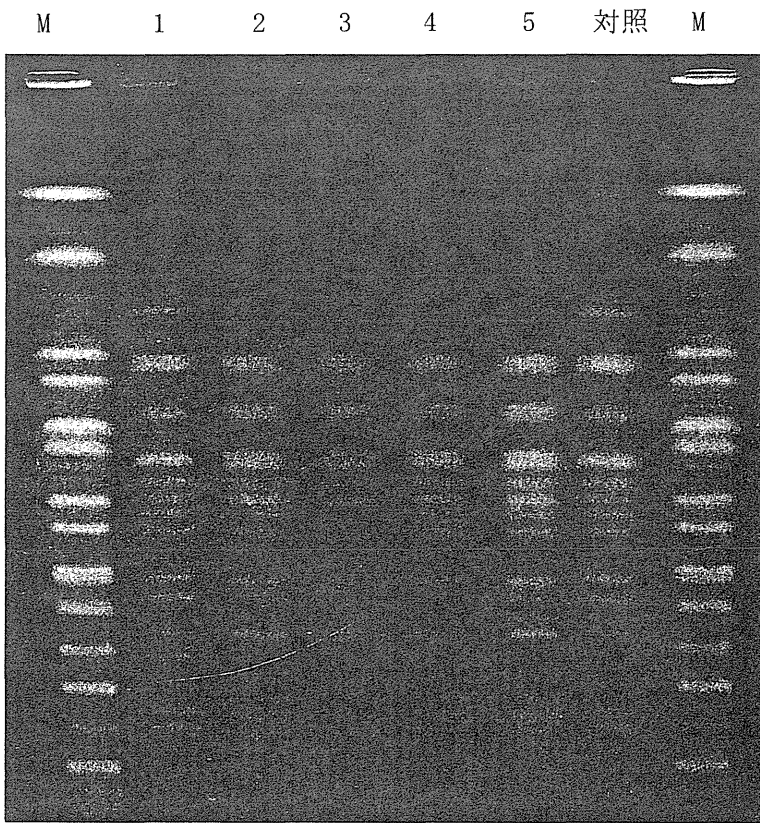
## 1st set

Primer No.	Size	1104	1105	1106	1107	1110	1112	1113	1114	1115	1116	1117
1-01	974	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
1-02	839	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-03	742	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1-04	645	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1-07	495	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1-08	442	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1-09	405	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1-10	353	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1-11	325	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
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
eae	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

## 2nd set

Primer No.	Size	1104	1105	1106	1107	1110	1112	1113	1114	1115	1116	1117
2-01	987	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2-02	861	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
2-04	710	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
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-07	555	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
2-08	499	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
2-09	449	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	394	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-11	358	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15	240	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
stx2	181	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

図2 PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査に用いた PFGE 泳動図  
1)



M : Size Marker (*Salmonella* Braenderup H9812)

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

2)

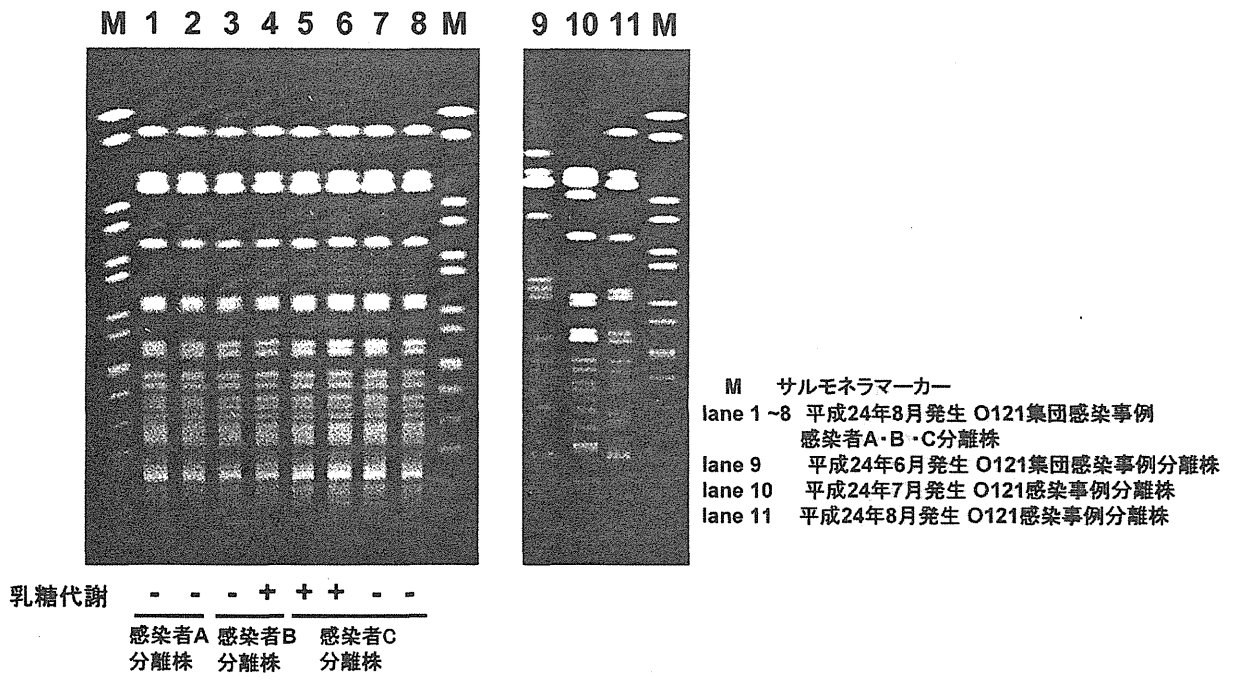
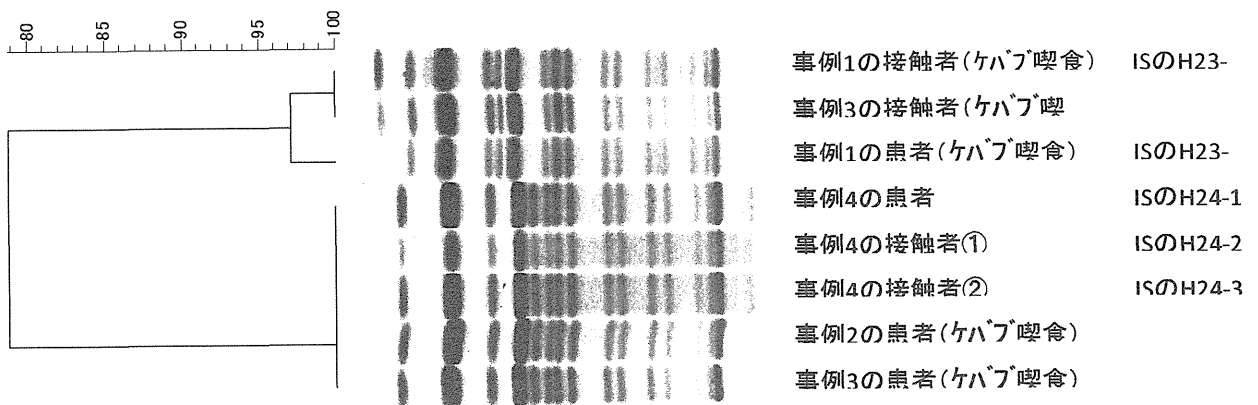


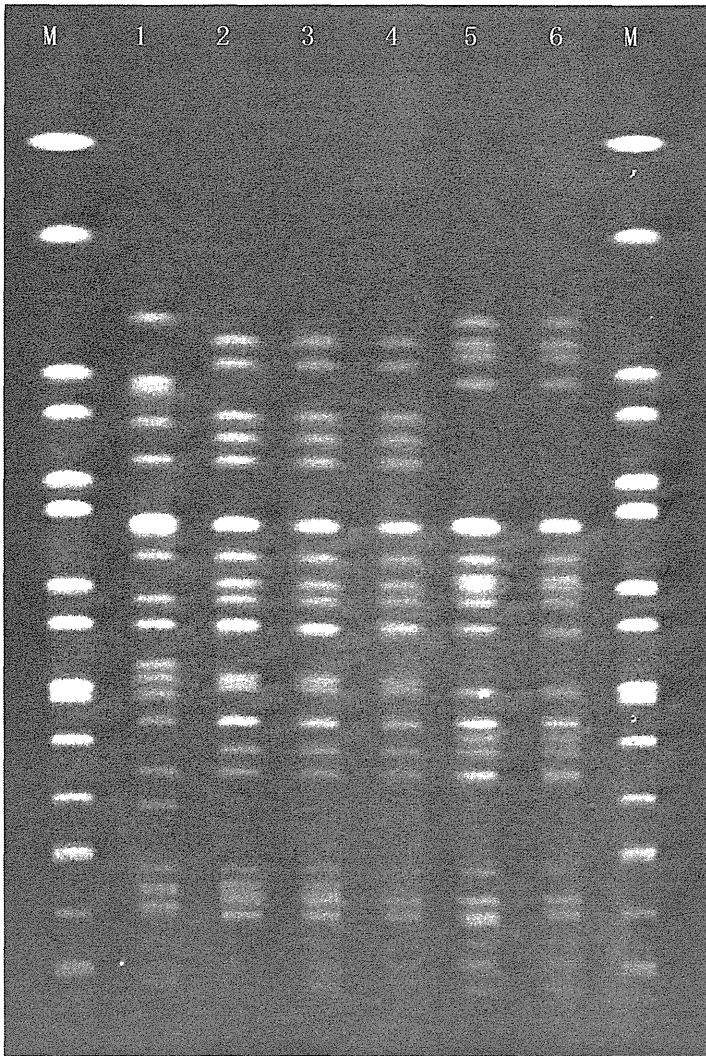
図 O121集団感染事例PFGE 泳動図

3)

PFGE結果(Xba I 処理)



4)



レーン	菌 株	備 考
M	Salmonella Braenderup H9812	マーカー
1	E. coli O157	散发事例 (24.3 分離)
2	E. coli O157	集団 1 (24.8 分離) 病院より分与
3	E. coli O157	集団 1 (24.8 分離) No. 2 接触者
4	E. coli O157	散发事例 (24.9 分離)
5	E. coli O157	集団 2 (24.9 分離) 病院より分与
6	E. coli O157	集団 2 (24.10 分離) No. 5 接触者

レーン 1 (No. 1) は VT1、VT2 陽性

レーン 2 (No. 2) ~レーン 6 (No. 6) はすべて VT2 陽性

実施条件

Plug 調製、電気泳動	SeaKem Gold Agarose(1%)
溶菌処理	1%N-Lauroyl sarcosine に ProteinaseK を最終濃度 1mg/ml となるよう添加し、50°C、48hr (時々転倒混和)
Inhibitor 処理	CompleteMini 1 tablet/10ml ofTE 500 $\mu$ l/tube、50°C、20min
制限酵素処理	<i>Xba</i> I (TaKaRa) 、30Unit/tube、Buffer:M+BSA、200 $\mu$ l/tube、37°C、20 h r
PFGE	6V/cm、2.2-54.2 s、20hr
PFGE buffer	0.5×TBE、2L
染色	SYBR Safe DNA gel stain in 0.5×TBE (invitrogen)



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 24 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおける病原体解析手法の高度化による  
効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究

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
	横山北斗	姫路市環境衛生研究所
	田辺純子、松井恵梨子	奈良県保健環境研究センター
	金澤祐子、廣岡真理子	和歌山市衛生研究所
	中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
	田口真澄、河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
	原田哲也	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の遺伝子型別法である 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、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。IS 法の精度管理は 10 施設で実施したが、*eae* や *hlyA* といった増幅されるべきバンドが陰性と判定された施設があり、PCR 反応の成否が重要であることを再認識する結果となった。また、一部の株で「バンドあり」を非特異バンドと判定した施設が 2 箇所あり、泳動量の影響が考えられたが、さらなる検証が必要である。PFGE 法は、11 施設から提出された電気泳動画像について 3 人がデンドログラムを作成した。コントラストが不明瞭な画像ではバンド認識が難しく、近似度が低くなる傾向がみられた。近畿 IS データベースの 2012 年 3 月 1 日現在の登録数は 1,769 株で、2012 年分離株は 184 株登録された。このうち 10 株以上登録されたタイプは 2 タイプで、大きく流行したタイプは見られなかった。Multilocus

variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法については、O157 だけでなく O111 や O26 の遺伝子型別も可能な Izumiya らの方法（新規 MLVA 法）に変更し、共通の疫学指標として実施できるかどうか検討した。新規 MLVA 法では、2 組の Multiplex PCR で増幅産物が十分に得られない locus があり、テンプレート調整法や PCR 条件等についてさらに検討が必要であると考えられた。

#### A. 研究目的

食中毒発生時には、行政対応の科学的根拠として患者や従業員、推定原因食品等から分離された病原体を詳細に比較し、同一性を判定することが求められる。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、IS-printing System (IS) 法やパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 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実施し、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。また、MLVA 法については、O157 に加えて O111 および O26 の遺伝子型別も可能な Izumiya らの方法（新規 MLVA 法）を新しく導入し、従来法を実施していた 4 施設で検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には 2012 年に大阪府で分離された EHEC O157 5 株（菌株 1～5）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。

新規 MLVA 法の検討には、すでに国立感染症研究所（感染研）で解析された大阪府分離株 2 株 (O111:H8, O157:H7) を使用し、ボイル法で調整したテンプレートを研究協力者に配布した。

##### 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の有無を判定した。電気泳動は、8 施設で 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、1 施設は自動電気泳動装置 QIAxcel（QIAGEN）を、1 施設はアガロースゲル電気泳動とマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA（島津製作所）を併用した。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。

##### 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、「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」として随時大阪府立公衆衛生研究所（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。

#### 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 O157 精度管理株の PFGE 画像は、11 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 3 人の解析者に送付した。

2 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、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% または 1.5% でデンドログラムを作成した。

#### 6. 新規 MLVA 法

Izumiya らの方法 (Microbiol. Immunol. 2010) に準じて実施した。プライマー (Applied Biosystems) は公衛研で購入したものを 3 施設に送付し、Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて表 2 に示した 2 組の PCR 反応を実施した。PCR 産物は滅菌水で 100~200 倍に希釈し、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer でフラグメント解析を行って、locus ごとの増幅サイズ (bp) を測定した。分子量マーカーには GeneScan 600LIZ (Applied Biosystems) を使用した。なお、Multiplex PCR で増幅がみられない locus については、単独プライマーによる PCR 反応も実施した。

### C. 研究結果

#### 1. IS 法の精度管理

精度管理に参加した 10 施設のうち 8 施設では同じ泳動パターンが得られたが (図 1)、施設 5 では菌株 2 について 1-01 の増幅を、施設 10 では菌株 1 について 2-09 の増幅を、サイズの近い非特異バンドと判定していた (図 2a、2b)。残りの 2 施設では、1-eae あるいは 1-hlyA の増幅が見られない株があった。このうち施設 6 は、キットに添付の Template Mix では増幅されていたことから、被検株のテンプレート作製をやり直したところ改善されたが、施設 2 では Template Mix の増幅も悪く、再試験でも安定した結果が得られなかった。菌株 3 は 1-03 および 1-15 付近に非特異バンドが増幅されたが、いずれの施設でも正しく判定されていた (図 1)。

施設 11 では、分離サイズレンジの異なる

2種類のキットを用いて MultiNA による解析を行った。施設 5 の QIAxcel によるゲルイメージに比べサンプルごとのばらつきが大きい傾向があったが、セット 1 は 100 から 1000bp 用の DNA-1000 キットでも 100 から 2500bp 用の DNA-2500 でも判定は可能であった (図 3a)。セット 2 は 2-02 (861bp) と 2-03 (801bp) のバンド間隔が狭く、DNA-2500 キットでは Standard Mix と Template Mix で区別できたものの精度管理株では判定できず、DNA-1000 キットではいずれのサンプルでも全く区別できなかった (図 3b)。

## 2. 近畿 IS データベース

3月1日現在の登録数は1,769株で、2012年に分離された184株は、IS法で80タイプに型別された。10株以上登録されたタイプは、「216959 84459」(タイプA)と「249727 116975」(タイプB)の2タイプで、それぞれ6施設から14株と7施設から18株が登録された(表3)。タイプAと1本異なる「216959 84463」も5施設から9株登録された。

タイプAについては、2株を除いて分離時期が6月下旬から7月中旬に集中しており、7月27日に各施設へ情報提供を呼びかけたが、共通のエピソードはなかった。タイプBは、1年を通して分離されており、情報収集の対象としなかった。

このほか、北海道や岡山県など近畿以外の地域で分離された菌株について、感染研から照合依頼を受け、同一株の有無を回答した。

大阪府では、8月28日および29日に届出のあったO157感染者(夫婦)が7月18日から約1か月間北海道旅行をしていたことから、白菜切り漬け食中毒との関連性が疑われた。IS型が全く異なっていたこと、発症日が8月17日、19日と遅いことから、感染源は異なると判断されたが、その後感染研 PFGE タイプも異なることが確認された。

## 3. EHEC O157 の PFGE 精度管理

11施設から電送されたPFGE画像の中にはレーンが若干歪んだ画像やバックグラウンドが白味を帯びた画像があり、コントラストは様々であった(図4)。

B解析者が作成したデンドログラムは、菌株ごとにクラスターを作っており、91.0～96.7%と高い近似度を示した(表4, 図6)。A解析者でも菌株ごとにクラスターを作り、菌株3、4、5の近似度は92.2～96.1%であったが、菌株1と2は施設12の認識バンド数が少なく、近似度も低い値となった(表4, 図5)。C解析者は、トレランス1.2%では菌株ごとのクラスターにならなかったため、1.5%に変更してデンドログラムを作成したが、菌株4については施設12の画像が他施設の画像と同じクラスターにならなかった。しかし、残りの10画像の近似度は94.5%と高く、菌株2、3、5も近似度96%以上のクラスターを作った(表4, 図7)。

## 4. 新規 MLVA 法の検討

参加した4施設のうち、すべてのlocusで感染研測定値にほぼ一致する解析結果が得られたのは施設Aのみで、残りの3施設で

は Multiplex PCR 法では十分は増幅産物が得られない locus が複数みられ、単独プライマーによる PCR が必要であった(表5)。また、施設 A でも、T1 の locus O157-9、T2 の locus O157-34、EH111-11、O157-10 については、他に比べて増幅産物が少ない結果であった。

#### D. 考察

近畿ブロックでは、2009 年から EHEC O157 の遺伝子型別法として IS 法を取り入れ、近畿 IS データベースを運用するとともに毎年精度管理を実施している。これまでに、O157:HNM でしばしば 1-03 と間違いやすい非特異バンドが増幅されることや Template Mix で 1-06 の増幅が弱いことなど、いくつかの注意点を明らかにしてきたが、今年度は、1-eae や 1-hlyA が陰性と判定された施設があり、精度管理の必要性を再認識する結果であった。1-hly 陰性株は、近畿 IS データベースに 23 株登録されているが、1-eae 陰性株はヒト由来株にはみられない。IS 法の試薬はキット化されているが、手技や PCR 反応の成否を確認するため、Template Mix で 18 本のバンドが増幅されることに加え、被検株では 1-eae や 1-hlyA の増幅に注意を払うべきである。また、電気泳動については、わずかな移動度の違いで「増幅あり」と「非特異バンド」とに判断が分かれた株があった。泳動量によってバンドの移動度に差が出たものと考えられたが、単独プライマーを用いて確認する必要があると考えられた。

施設 5 では、IS 法導入時から QIAxcel を用いてバンドの有無を判定しているが、施

設 11 の実施結果を見る限りでは、MultiNA による判定は難しいと言える。セット 1、セット 2 とともに、DNA-2500 キット使用時にはアガロース電気泳動と同様のゲルイメージが得られるが、被検株で 2-02 と 2-03 を明瞭に区別することが課題である。ユーザー側では泳動サンプルの希釈など検討項目が限られるため、メーカーの協力を得たい。

生食用食肉(牛肉)の規格基準設定や牛生レバー提供禁止をうけて、今年度は EHEC 感染症届出数が減少し、近畿 IS データベースへの登録数もこれまでで最も少なかった。昨年は登録数 10 株を越える IS コードが 5 タイプあり、このうち 2 タイプは 40 株以上分離されていたが、今年度は 10 株以上登録された IS コードは 2 タイプのみであった。しかし、タイプ A は 6 月下旬から 7 月中旬に集中しており、後日判明した感染研 PFGE タイプも 18 株中 14 株が e807 であったことから、共通の感染源の存在があったと推察される。一方、今年最も多い 18 株が登録されたタイプ B は、2009 年から毎年 14 株、30 株、52 株の登録があり、分離時期も長い。感染研 PFGE タイプが一致する株も含まれるが、IS 法のみで関連性を推測することのできないタイプであると考えられる。

近畿 IS データベースの課題は、各施設で迅速に分離株を収集し IS 法を実施して登録することである。引き続き行政の理解と協力が得られるよう、効果的な情報還元を目指す。近畿ブロック以外の地域で発生した事例についての照合依頼に回答するだけでなく、積極的に他地域事例の情報を入手して、関連性の判断に活用できることも強調

していきたい。

PFGE 法については、施設 12 で全体的に画像のコントラストが弱く、認識バンド数が少ない場合や 1135Kb (サイズマーカーの Band 1) 付近にバンド認識された場合には、近似度の低下につながった。施設 9 では菌株 4 で未消化と考えられるバンドが見られたが、バンドが薄いことから、目視判定の場合は区別がつくと考えられた。

毎年精度管理に参加している施設であっても実施者が変わる場合があり、電気泳動装置の点検も兼ねて精度管理の実施は継続する必要がある。プロトコールは標準化されているが、電気泳動装置の水平を保つなど細かい点についてもノウハウを共有していきたい。

EHEC O157 の遺伝子型別は、IS 法でスクリーニングを行い、関連性が疑われる場合は PFGE 法を実施しているが、O111 や O26 の場合は PFGE 法に頼らざるを得ない。この点を解消するため、新規 MLVA 法の導入を試み、検討課題が明らかになった。まず、Multiplex PCR ですべての locus が安定して増幅されるようプロトコールを確立することが重要である。増幅サイズの大きい locus では増幅されにくい傾向があり、プレート濃度や温度制御のわずかな違いが影響を与えていると推察される。プレート調整法や保存法とともに、PCR 条件についても検討が必要である。また、O 抗原型によっては増幅されない locus もあり、被検株によって locus を選択することも一案である。O26 を解析するため、Izumiya らの方法から 7 つの locus を選んで Multiplex PCR を実施

し良好な結果を得たとの報告 (獣医学術学会年次大会, 2013 年 2 月, 大阪市) もあり、O111 や O157 についても同様の検討を行いたい。

## E. 結論

IS 法は、EHEC O157 の遺伝子型別スクリーニング法として地方衛生研究所等で実施される機会が増えている。試薬はキット化されているが、成績の信頼性を確保するためにも精度管理は重要である。また、近畿 IS データベースの運用には迅速な菌株収集が不可欠であり、行政の理解と協力が得られるような情報発信が求められる。

PFGE 法については、精度管理の実施を通してプロトコールに書かれていない細かいノウハウを共有する必要があると考えられた。

新規 MLVA 法については、すべての locus で安定して増幅される Multiplex PCR 法を確立することが課題であると考えられた。O 抗原型によって実施する locus を選択する方法も検討する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 誌上発表

1) Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. *Jpn. J. Infect.*

Dis. 65: 555-557, 2012.

- 2) Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TAT, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T: Clinical Significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 488-492, 2012.
- 3) 勢戸和子: O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性. *FFI ジャーナル* 217:67-75, 2012.
- 4) 勢戸和子, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断. *小児科臨床* 65: 2583-2587, 2012.

## 2.学会発表

- 1) 勢戸和子: 近畿ブロックISデータベースを用いたEHEC O157の流行株の探知, 衛生微生物技術協議会第33回研究会 (2012年7月, 横浜)
- 2) 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也: 大阪府における STEC 感染症への抗菌薬治療の現状, 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2012年7月, 秋田)

## H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 IS-printing System および PFGE の精度管理に使用した株

菌株番号	菌種(毒素型)	分離年	感染研PFGE型
1	EHEC O157:H7 (VT2)	2012	h5
2	EHEC O157:H7 (VT2)	2012	h138
3	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2012	f177
4	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2012	h153
5	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2012	h251

表 2 MLVA の Locus とプライマー濃度

Reaction 1					Reaction 2				
Locus	プライマー	プライマー濃度(μM)	Repeat unit (bp)	Off set (bp)	Locus	プライマー	プライマー濃度(μM)	Repeat unit (bp)	Off set (bp)
O157-3	O157-3F	0.04	6	323	O157-10	O157-10F	0.04	6	350
	O157-3R	0.04				O157-10R	0.08		
O157-9	O157-9F	0.04	6	465	O157-17	O157-17F	0.04	6	121
	O157-9R1	0.08				O157-17R	0.04		
	O157-9R	0.08			O157-19	O157-19F	0.04	6	273
O157-25	O157-25F	0.04	6	110	O157-19	O157-19R	0.04	6	84
	O157-25R	0.04				O157-37	O157-37F		
O157-34	O157-34F	0.04	18	141	O157-37	O157-37R	0.04	6	102
	O157-34R	0.08				O157-36	O157-36F		
	EH157-12	EH157-12F			0.04	9	314	EH26-7	EH26-7F
EH157-12R		0.04	EH26-7R	0.08					
EH111-11	EH111-11F	0.04	6	422	EH111-14	EH111-14F	0.04	7	154
	EH111-11R	0.04				EH111-14R	0.04		
EH111-8	EH111-8F	0.04	9	163	EHC-6	EHC-6F	0.04	9	387
	EH111-8R	0.04				EHC-6R	0.04		
EHC-1	EHC-1F	0.04	6	75	EHC-6	EHC-6F	0.04	9	387
	EHC-1R	0.04				EHC-6R	0.04		
EHC-2	EHC-2F	0.04	6	214	EHC-6	EHC-6F	0.04	9	387
	EHC-2R	0.04				EHC-6R	0.04		
EHC-5	EHC-5F	0.04	6	109	EHC-6	EHC-6F	0.04	9	387
	EHC-5R	0.04				EHC-6R	0.04		



表 3 2012 年分離株の主な IS コード

タイプ	ISコード	登録数	分離時期	登録 施設数	備考
A	216959 84459	14	6~7月, 10月	6	2つの家族事例を含む
	216959 84463	9	7~10月	5	1つの家族事例を含む
B	249727 116975	18	1月, 4月, 6~9月, 12月	7	1つの家族事例を含む

表 4 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像解析結果

菌株番号	解析者	近似度(%)	100%一致画像数 <sup>a)</sup>	認識バンド数
1	A	73.8	6 (17), 2 (17), 2 (18)	11, 17, 18
	B	93.6	8 (17), 2 (18)	17, 18
	C	82.4	3 (19), 2 (17), 2 (18)	17, 18, 19
2	A	83.6	7 (19), 2 (20)	18, 19, 20
	B	94.8	6 (19), 2 (19)	19, 20, 21
	C	96.5	5 (21)	21, 22, 23
3	A	96.1	5 (18), 4 (19)	18, 19, 20
	B	96.2	4 (18), 4 (19), 2 (19)	18, 19, 20
	C	96.8	8 (19)	18, 19, 20
4	A	92.7	4 (20), 2 (19), 2 (20)	18, 19, 20, 21
	B	91.0	6 (19), 2 (20)	18, 19, 20, 21
	C	94.5 <sup>b)</sup>	5 (20), 3 (21)	20, 21, 22
5	A	92.2	9 (19)	18, 19
	B	96.7	7 (19), 2 (18)	18, 19, 20
	C	97.0	8 (20)	19, 20, 21

a) カッコ内は認識バンド数

b) 施設12以外の10画像の近似度

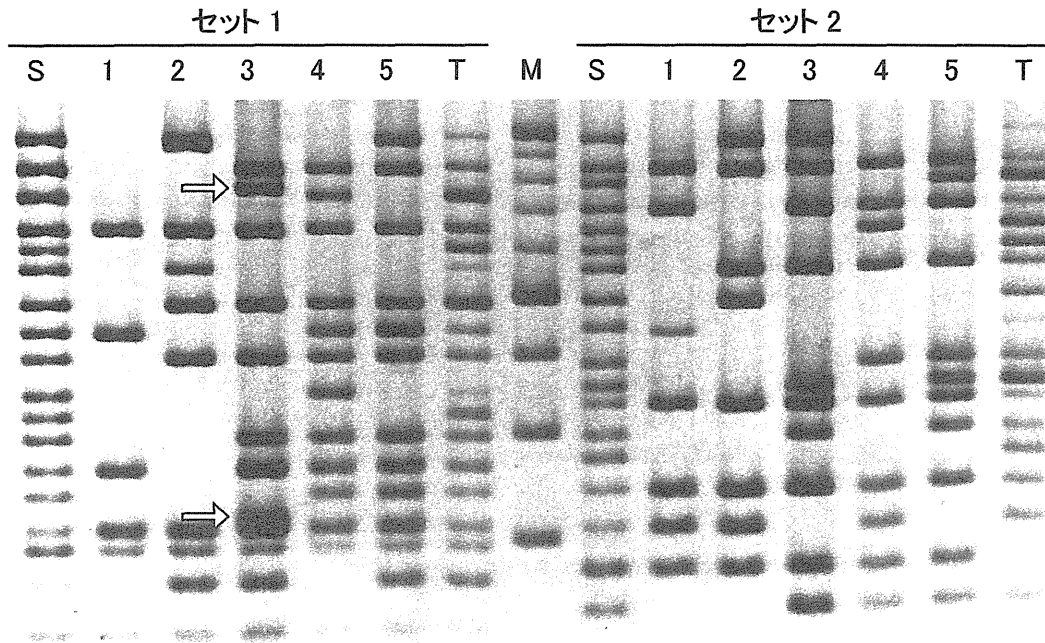
表 5 新規 MLVA 法の検討結果

Locus	T1(O111:H8)					T2(O157:H7)				
	参考値 <sup>a)</sup>	施設A	施設B	施設C	施設D	参考値	施設A	施設B	施設C	施設D
Reaction 1 O157-3	-	-	-	-	-	362.85	○	○	○	○
O157-9	520.83	○	-	-	-	520.34	○	-	○	○
O157-25	121.43	○	○	○	○	138.51	○	○	○	○
O157-34	189.96	○	○	○	○	297.94	○	-	-	-
EH157-12	329.19	○	○	○	○	320.5	○	○	○	○
EH111-11	433.51	○	○	○	○	428.92	○	-	-	○
EH111-8	252.65	○	○	-	○	170.73	○	○	○	-
EHC-1	111.66	○	○	○	○	106.6	○	○	○	○
EHC-2	229.06	○	○	○	○	240.61	○	○	○	○
EHC-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reaction 2 O157-10	-	-	-	-	-	530.36	○	○	-	-
O157-17	-	-	-	-	-	136.61	○	○	○	○
O157-19	279.11	○	○	○	○	298.86	○	○	○	○
O157-37	117.28	○	○	○	○	117.49	○	○	○	○
O157-36	-	-	-	-	-	140.62	○	○	○	○
EH26-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EH111-14	156.1	○	○	○	○	-	-	-	-	-
EHC-6	410.14	○	○	○	○	-	-	-	-	-

a) 感染研で実施された際の実測値

○: 参考値と同程度のサイズに増幅あり, -: 増幅されない

a) 電気泳動画像



M: 100bp ladder, S: Standard DNA, 1~5: 精度管理株, T: Template Mix, 矢印: 非特異バンド

b) 判定

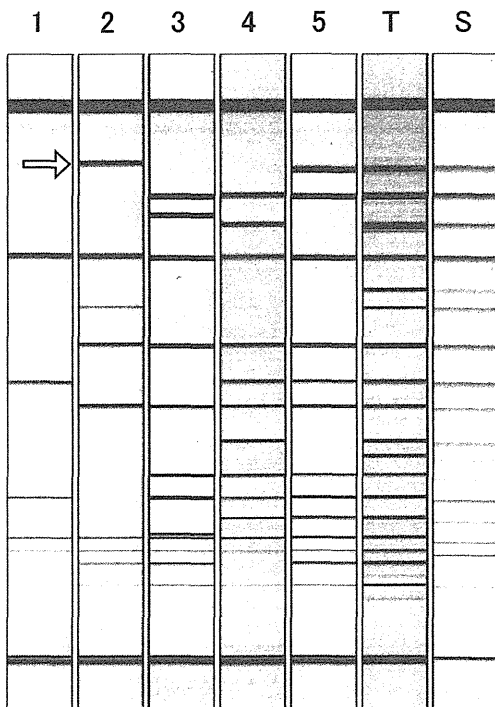
菌株	セット1 判定 <sup>a)</sup>																セット2 判定																									
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	800, 220	HYA	備考 <sup>b)</sup>	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	800, 220	HYA	備考 <sup>b)</sup>				
1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1				0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0			
2	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1				1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0			
3	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	800, 220			1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1			
4	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1				0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1			
5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1				0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1				

a) 1: 増幅あり、0: 増幅なし  
b) 非特異バンドの増幅サイズ

図1 EHEC O157 精度管理株の IS-printing System 実施例(施設 9)

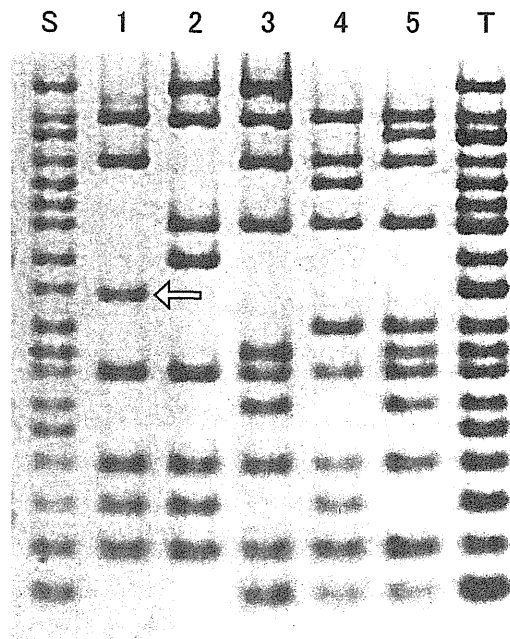
a) 施設 5

セット 1



b) 施設 10

セット 2



S: Standard DNA, 1~5: 精度管理株, T: Template Mix, 矢印: 非特異バンドと判定

図 2 判定の異なった施設の IS-printing System 電気泳動画像