

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による IS printing System 等
活用状況調査および情報共有に関する研究

研究分担者 鈴木匡弘、松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 山田和弘 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
北川恵美子、木村恵梨子 石川県保健環境センター
東方美保、岩崎理美 福井県衛生研究所
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
野田万希子 岐阜県保健環境研究所
田中保知、信田充弘 岐阜市衛生試験所
永井佑樹 三重県保健環境研究所
山本新也 豊橋市保健所衛生試験所
中根邦彦 岡崎市総合検査センター
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

過半数の地研で非特異バンドの誤判定または *hly* の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

平成 28 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

すべての地研から予定どおりの IS-printing 型が得られた。昨年度多く見られた *hly* の増幅不良は見られなかった。今年度の精度管理サンプルを昨年度使用した IS-printing 試薬のロットで試験したところ、*hly* の増幅が悪く、ロット間差によるものとみられた。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

平成 29 年度

1. IS-printing 精度管理

最も多く認められた誤りは検体①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエクストラバンドで 5 施設で 1-3 (+) と解釈していた。今回の検体は DNA 量が通常の倍量であったため、全体にバンドが太くスメアーとなり 4 検体でバンドの有無の確認が困難であった施設があった。また、*hlyA* のバンドが確認できなかった施設があった。これは試薬のロットによる増幅効率の違いが強く示唆された。今後、ブロック内の研修会等でフィードバックを行いたい。

2. 地域共有データベース

4 月から運用開始され、腸管出血性大腸菌シーズンをカバーすることができた。平成 29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（EHEC）は死亡に至ることもある腸管感染細菌として、公衆衛生上対策を必要とする主要な病原体の一つである。EHEC はいわゆる食中毒の原因菌であると共に、食品を介した diffuse outbreak 例も報告されている。diffuse outbreak は散発事例に紛れることが多く、発見が困難であるため、対策には迅速な分子疫学解析と、情報共有が重要となる。東海・北陸地方では従来情報共有が十分ではなく、diffuse outbreak の把握に問題があった。かつて分子疫学解析手法がパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）に限られていた時は、分子疫学情報を共有するためには、複雑な PFGE パターンの比較を行う必要があり、迅速な情報共有は事実上不可能であった。しかし近年 PCR による EHEC 0157 の分子疫学手法として IS-printing system 及び代表的な血清型の分子疫学解析手法として multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) が登場し、迅速性に加えデータベース化しやすい環境が整ってきた。そこで本研究では東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

各地研に PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況をアンケート調査した。調査項目としては実施の有無および実施頻度とした。

2. IS-printing 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 3 株からカラム精製した DNA（10 ng/μL）を送付し、解析結果を送付してもらった。その際、解析に使用したサーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、電気泳動条件についての調査を行った。なお、送付した 3 検体のうち、検体番号

①については 1-02 と 1-03 の間、及び 1-15 よりやや大きい位置に非特異バンドが検出される株であった（図 1）。

3. 地域共有データベース

各地研におけるデータ登録及びデータ閲覧の利便性を考慮し、クラウドデータベースサービスである kintone（サイボウズ、東京）を利用した IS-printing の情報共有システム構築を行った。登録情報としては施設名称、菌株の分離年月日、IS-printing の結果、及びその他の項目として非特異バンドを入力可能とした。データ登録は各地研が Excel ファイルに入力したデータを一括登録することとした（図 2A-F）。登録したデータは直ちに反映され、各ユーザーが確認可能となる。また、IS-printing の遺伝子型は視認性向上のため、8 桁毎に 10 進法に変換したコード番号を付与した。

平成 28 年度

1. IS-printing 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 5 株からカラム精製した DNA（20 ng/μL）を送付し、解析結果を送付してもらった。その際、解析に使用したサーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、電気泳動条件についての調査を行った。なお、送付した 5 検体のうち、検体番号①については 1-03 の上に非特異バンドが検出される株であった（図 1）。

2. 地域共有データベース

各地研におけるデータ登録及びデータ閲覧の利便性を考慮し、クラウドデータベースサービスである kintone（サイボウズ、東京）を利用した IS-printing の情報共有システム構築を行った。登録情報としては施設名称、菌株の分離年月日、IS-printing の結果、及びその他の項目として非特異バンドを入力可能とした。登録したデータは直ちに反映され、各ユーザーが確認可能となる。また、IS-printing の遺伝子型は視認性向上のため、8 桁毎に 10 進法に変換したコード番号を付与し、運用している。

（倫理面への配慮）

分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しない。データベース構築に当たっては患者情報を登録しない。

平成 29 年度

1. IS-PS 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 5 株からカラム精製した DNA (20 ng/μL)を送付し、解析結果を送付してもらった。その際、解析に使用したサーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、電気泳動条件等についての調査を行った。なお、送付した 5 検体のうち、検体番号①については 1-03 の上に非特異バンドが検出される株であった (図 1)。

2. 地域共有データベース

各地研におけるデータ登録及びデータ閲覧の利便性を考慮し、クラウドデータベースサービスである kintone (サイボウズ、東京) を利用した IS-PS の情報共有システム構築を行った。登録情報としては施設名称、菌株の分離年月日、IS-PS の結果、及びその他の項目として非特異バンドを入力可能とした。登録したデータは直ちに反映され、各ユーザーが確認可能となる。また、IS-PS の遺伝子型は視認性向上のため、8 桁毎に 10 進法に変換したコード番号を付与し、運用している。

(倫理面への配慮)

分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しない。データベース構築に当たっては患者情報を登録しない。

C. 研究結果

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

各地研における分子疫学解析の実施状況を表 1 に示す。PFGE については保健所で検査を実施している一地研を除き、全ての地研が outbreak 発生時のみ実施としていた。IS-printing については一地研を除き全ての地研が全て又は outbreak のみ実施すると回答していた。一方、MLVA は 2 施設が全株を解析していたが、他の 9 施設は実施しないと回答した。

2. IS-printing 精度管理

各地研における IS-printing system の解析結果は表 2 のとおりである。Set2 については全ての地研が正しい結果であった。一方 set1 については 3 地研のみ正しい回答が得られ、残る 7 地研については何らかの間違ひが見られた。間違ひの原因としては 1-02 と 1-03 の間の非特異バンド

を 1-03(+)と報告した地研が 3 カ所、hly を(-)と報告した地研が 4 カ所あった。hly を(-)と報告した地研においてもキット付属の std は全てのバンドがはっきりと確認できた。

各地研における使用機器を表 3 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られた。アガロースについては添付文書どおりとした地研が 7 カ所と最も多かった。

3. 地域共有データベース

データベースの運用は平成 27 年 10 月 1 日から開始した。運用に当たっては各地研におけるセキュリティポリシーの確認作業が必要となる場合があり、地研によって運用開始まで日数を要することがあった。平成 28 年 2 月 8 日現在、4 カ所の地研から 39 株の EHEC 0157 の IS-printing 情報が登録されている。データベースに登録された 39 株は 18 種類の IS-printing 型に分かれた。そのうち、6 種類の IS-printing 型では複数県からの分離が見られた。

平成 28 年度

1. IS-printing 精度管理

各地研における IS-printing system の解析結果は表 2 のとおりである。全ての地研が正しい結果であった。昨年度の精度管理で多々見られた hly(-)の報告は、今年度は見られなかった。しかし今年度配布した IS-printing サンプルを昨年度と同ロットの試薬で確認したところ、hly の増幅が悪かった。

各地研における使用機器を表 2 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られた。アガロースについては添付文書どおりとした地研が 7 カ所と最も多かった。

3. 地域共有データベース

平成 27 年 10 月 1 日から開始したデータベースの運用は平成 28 年 3 月 31 日で一旦停止し、平成 28 年 4 月 22 日から再開した。平成 29 年 2 月 20 日現在、5 つの地研から 125 株 (そのうち、75 株が平成 28 年度の分離株) の EHEC 0157 の IS-

printing 情報が登録されている。データベースに登録された平成 28 年度分離の 75 株は 27 種類の IS-printing 型に分かれた。そのうち、10 種類の IS-printing 型に分類された 41 株において、複数県からの同一 IS-printing 型株の分離が見られた (表 3)。

平成 29 年度

1. IS-PS 精度管理

各地研におけ IS-PS の解析結果は 5 検体全て正解が 3 施設、4 検体正解が 5 施設、1 検体正解、正解なしが各 1 施設であった。最も多く認められた誤りは検体①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエクストラバンドを 1-3 (+) と解釈したもので 4 検体正解の 4 施設を含む 5 施設で認められた。

正解が 1 検体の施設では全体にバンドが太くスメアーとなり 4 検体でバンドの有無の確認が困難であった。正解なしの施設では 5 検体全てで *hlyA* のバンドが確認できなかった。

各施設における各施設における PCR 実施環境を表 1 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られた。アガロースについては添付文書どおりとした地研が 7 カ所と最も多かった。

2. 地域共有データベース

平成 27 年 10 月から開始したデータベースの運用は平成 29 年 3 月で一旦停止し、平成 29 年 4 月から再開した。平成 30 年 2 月 16 日現在、6 つの施設から 94 株の EHEC 0157 の IS-PS 情報が登録されている。

D. 考察

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

検査を実施していない一地研を除き、全ての地研で PFGE と IS-printing は実施可能であった。しかし、その多くは outbreak 発生時のみの検査であり、diffuse outbreak 対応するには日頃からデータを蓄積する必要があることから、各地研の協力が重要となる。一方 MLVA については、実施している施設は 2 施設のみであり、地域内

での情報共有は困難である。MLVA データについては今後も感染症研究所経由での情報共有が続くとみられる。

2. IS-printing 精度管理

非特異増幅が見られる菌株で、誤判定が頻発する実態が明らかとなった。誤判定した施設の多くは電気泳動に問題があり、電気泳動のガイドラインを提示する必要があると考えられた。非特異バンドの誤判定を防ぐには、非特異バンドが出現しやすい位置に関する情報提供が必要である。また今回 *hly* のバンドが薄く、“判定とした施設が多くあった。*Hly* については従来から増幅が悪いことがあるといわれていたが、PCR 環境の違いや、試薬のロット間差による増幅効率の違いに加え、精度管理用 DNA 調製に問題がないか総合的に判断する必要があると考えられた。

3. 地域共有データベース

運用が 10 月以降と、EHEC シーズン終盤以降のスタートとなったことから、今年度については試用版として位置づけられた。データベースには必要最小限度のデータしか登録しないこととしたため、セキュリティポリシー上の問題は無いと考えている。しかし、データを登録したのは 4 地研にとどまっており、今後、地区の集まりを利用して説明会を開くなど、利用法について啓蒙する必要があると考えられた。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないことから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

平成 28 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

検査を実施していない一地研を除き、全ての地研で PFGE と IS-printing は実施可能であった。しかし、およそ半数は outbreak 発生時のみの検査であった。diffuse outbreak 対応するには日頃からデータを蓄積する必要があることから、各地研の協力が重要となる。また、登録のタイミングが遅い傾向にあり、頻繁にデータ登録を行ってもらうことも今後の課題である。一方 MLVA については、実施している施設は 2 施設のみであり、地域内での情報共有は困難である。

MLVA データについては今後も感染症研究所経由での情報共有が続くとみられる。

2. IS-printing 精度管理

今年度の精度管理株は、比較的判定の容易なものを送ったこともあり、良好な結果を得た。また、各施設とも電気泳動の質が向上しており、良好な判定結果につながったと考えられる。*hly* のバンドが薄くなる問題は発生しなかったが、試薬のロット間差による増幅効率の違いが強く示唆された。

3. 地域共有データベース

4月から運用開始され、EHECシーズンをカバーすることができた。同一IS-printing型の株は頻繁に分離されており、県境をまたいだ感染事例存在の可能性が示唆されたが、原因調査には結びつかなかったようである。衛生研究所には実地調査の権限がないことも多く、容易に調査ができない実態があると考えられる。また、同一IS-printing型株が比較的多く見られることも問題であり、より菌株識別能力の高い方法による裏付けが必要と考えられる。同一IS-printingパターンの株が見つかった場合、可能な限り速やかにMLVAを行う体制を構築する必要があると考えられた。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

平成 29 年度

1. IS-PS 精度管理

最も多く認められた誤りは①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエクストラバンドで 5 施設で 1-3 (+) と解釈していた。このエクストラバンドは比較的頻繁に認められることからブロック内の情報共有をすすめる必要がある。

1 施設では全体にバンドが太くスメアーとなり 4 検体でバンドの有無の確認が困難であった。今回の検体は DNA 量が通常の倍量であったため、PCR 増幅量が多くなりバンドが太くなったと思われる。一部の施設では添加する検体量を半量にしたり、泳動する PCR 産物を希釈する等して良好な泳動図を作成していた。今後、当該施設には平成 30 年 3 月に開催される東海・北陸微生物部会でフィードバックを行いたい。

他の 1 施設では *hlyA* のバンドが確認できなかった。*hlyA* 増幅不良はこれまで多々指摘されていた。また、他施設でも *hlyA* バンドが薄いので試薬のロットによる増幅効率の違いが強く示唆された。

2. 地域共有データベース

4月から運用開始され、EHECシーズンをカバーすることができた。平成 29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないメリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

E. 結論

平成 27 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

過半数の地研で非特異バンドの誤判定または *hly* の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

平成 28 年度

1. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

全ての施設で良好な結果が得られた。精度管理を通じて技術水準を保つことが重要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法などに課題が残る。

平成 29 年度

1. IS-PS 精度管理

エクストラバンド、*hlyA* 増幅不良等の認識、適切な泳動図を得るための知識を得るために継続的な精度管理が重要である。

2. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-PS の情報共有を試みた。データベースの活用法などに課題が残る。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

1. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門ら 志賀毒素産生性大腸菌 PCR-based ORF Typing (STEC-POT) 法の開発 第 19 回腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症研究会 平成 27 年 7 月 9 日～10 日 東京都

平成 27 年度

表 1 腸管出血性大腸菌分子疫学解析実施状況

施設名	PFGE	IS-printing	MLVA	備考
1	集団のみ	集団のみ	実施せず	
2	集団のみ	一部実施	全株実施	IS-printing は研究班依頼分のみ
3	集団のみ	全株実施	実施せず	
愛知県衛生研究所	集団のみ	全株実施	実施せず	IS-printing は研究として実施
4	集団のみ	集団のみ	実施せず	今年度は解析実績無し
5	集団のみ	全株実施	全株実施	
6	集団のみ	集団のみ	実施せず	今年度は解析実績無し
7	実施せず	実施せず	実施せず	
8	集団のみ	一部実施	実施せず	IS-printing は研究班依頼分のみ
9	集団のみ	集団のみ	実施せず	今年度は解析実績無し
10	集団のみ	集団のみ	実施せず	今年度は解析実績無し

表 2 IS-printing 精度管理結果

施設名	検体 1		検体 2		検体 3		判定エラーの推定原因
	Set1	Set2	Set1	Set2	Set1	Set2	
A	○	○	○	○	○	○	
B	○	○	○	○	○	○	
C	#1	○	1-02 (-)	○	○	○	電気泳動時のアプライ量過多疑い
D	#1	○	○	○	○	○	電気泳動距離不足
E	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	
F	#1	○	○	○	○	○	電気泳動距離不足
G	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	
H	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	
I	○	○	○	○	○	○	
J	hly(-)	○	hly(-)	○	hly(-)	○	

○ 想定どおりの結果を報告

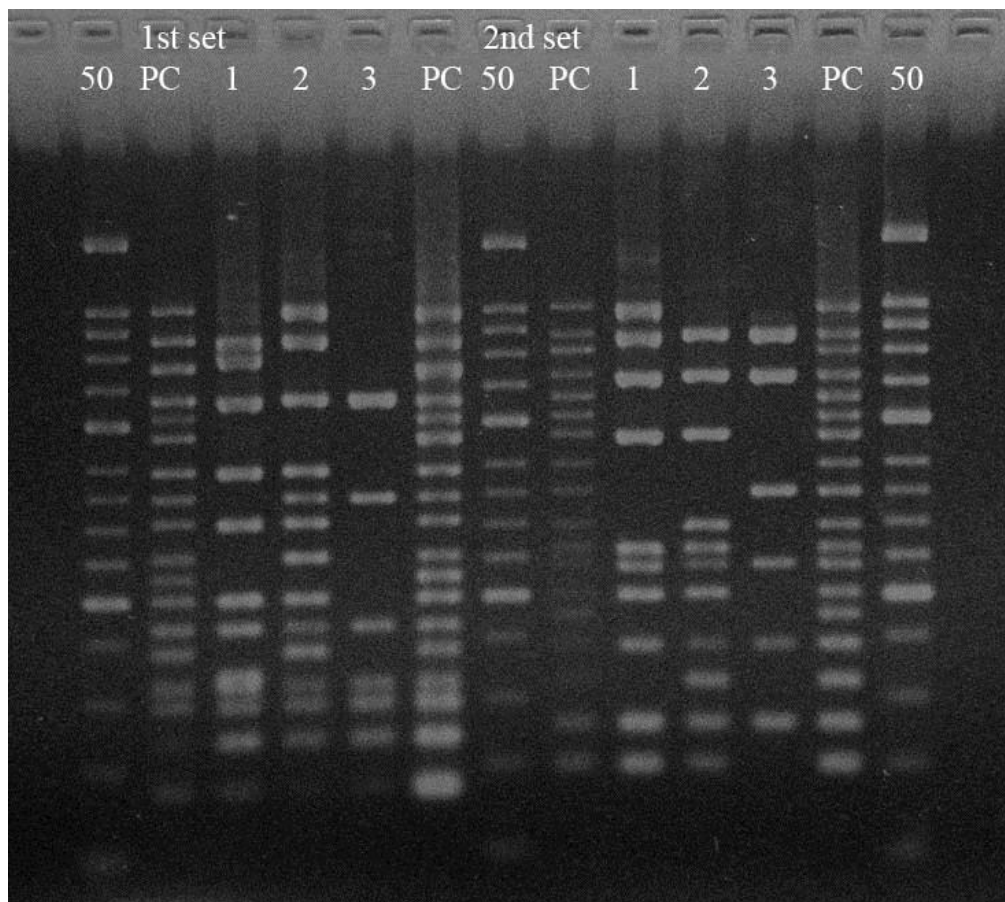
#1-02 と 1-03 の間の非特異バンドを 1-03(+) と報告

表 3 各施設における PCR 実施環境

施設	サーマルサイクラー	電気泳動装置	備考
愛知	9700/TP650/GA	Mupid exu 100V 70 min	テンプレート作成は 5% Chelex 100
A	TP600/TP650	Mupid 100V 135 min	
B	9700	Mupid-3 100V 120 min	
C	Takara MP	BioRad subcell GT 100V 60 min	
D	2720	Mupid-21 100V 45 min	NuSieve 3:1 Agarose 使用
E	C1000 touch	i-Mupid J 100V 60 min	3% Agarose HC (関東化学)使用
F	9700	BioRad sbcell GT 100V 65 min	
G	TP600/TP650 ?	CosmoBio MyRun 100V 110 min	Seakem GTG を Seakem Gold に変更
H	Veriti	電気泳動装置記載なし 100V 60 min	
I	Veriti	Mupid 100V 70 min	
J	Veriti	Mupid exu 100V 70 min	

9700 : GeneAmp PCR System 9700、TP600/TP650 :Takara TP600/TP650、GA : ASTEC Gene Atlas 322、
 2720 : Applied Biosystems 2720、MP : TaKaRa PCR Thermal Cycler MP、C1000 touch : BioRad C1000
 touch、Veriti : Applied Biosystems Veriti

図1 IS-printing 精度管理用に送付した 3 株の IS-printing パターン



50 : 50 bp ラダーマーカー、PC : ポジティブコントロール、1-3 : 検体

図 2 クラウドデータベース kintone へのデータ入力方法

A. Login 画面



B. Kintone をクリック



E. データのインポート実行



F. ログアウト



平成 28 年度

表 1 1	集団のみ	集団のみ	実施せず	
2	集団のみ	全株実施	行政依頼のみ	IS-printing は研究班依頼分のみ
3	一部実施	全株実施	実施せず	
愛知県衛生研究所	集団のみ	全株実施	実施せず	IS-printing は研究として実施
4	一部実施	一部実施	実施せず	今年度は解析実績無し
5	集団のみ	全株実施	全株実施	
6	全株実施	全株実施	実施せず	
7	実施せず	実施せず	実施せず	
8	一部実施	一部実施	実施せず	IS-printing は研究班依頼分のみ
9	一部実施	一部実施	実施せず	
10	実施せず	実施せず	実施せず	

表 2 各施設における PCR 実施環境

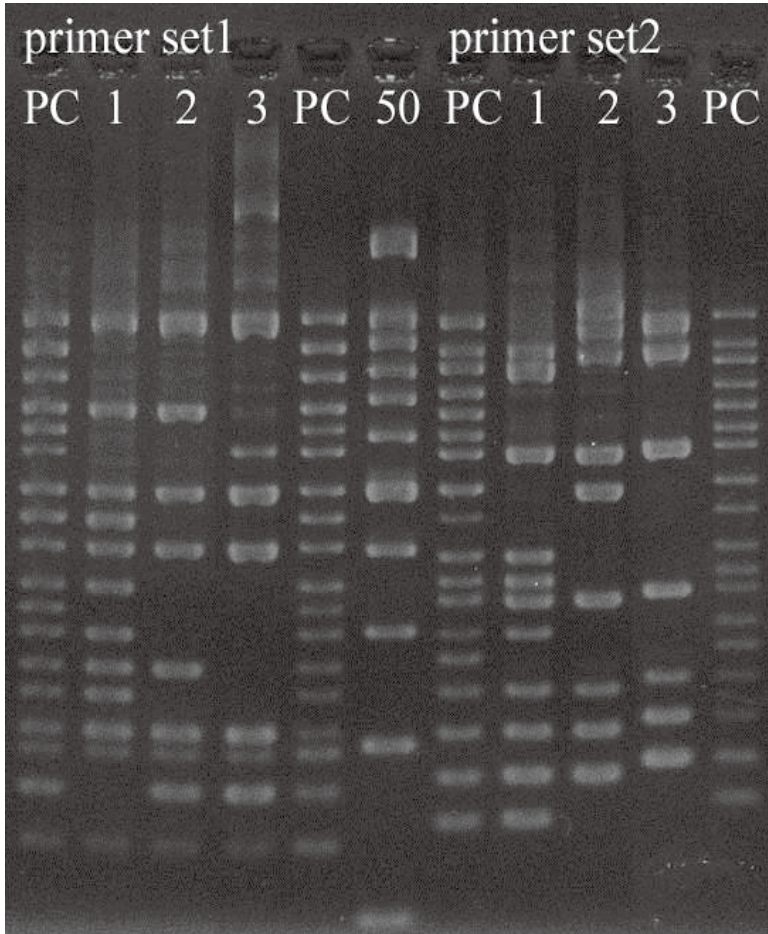
施設	サーマルサイクラー	電気泳動装置	備考
愛知	9700/TP650/GA	Mupid exU 100V 70 min	
A	TP600/TP650	Mupid 100V 135 min	テンプレート作成は 5% Chelex 100
B	Veriti	Mupid exU 100V 75 min	テンプレート作成は 5% Chelex 100
C	Takara MP	iMyRUN 135V 110min	
D	2720	iMyRUN 100V 150min	NuSieve 3:1 Agarose 使用
E	C1000 touch	Mupid 100V 60 min	3% Agarose HC (関東化学)使用
F	9700	BioRad sbcell GT 100V 65 min	NuSieve 3:1 Agarose 使用
G	Veriti	CosmoBio MyRun 100V 110 min	NuSieve 3:1、カラム抽出 DNA 使用
H	Veriti	Mupid exU 100V 60 min	
I	Veriti	Mupid 100V 70 min	
J	Veriti	Mupid exU 100V 70 min	

9700 : GeneAmp PCR System 9700、TP600/TP650 :Takara TP600/TP650、GA : ASTEC Gene Atlas 322、
 2720 : Applied Biosystems 2720、MP : TaKaRa PCR Thermal Cycler MP、C1000 touch : BioRad C1000
 touch、Veriti : Applied Biosystems Veriti

表 3 複数県から検出された IS-printing パターン

IS-printing パターン	合計	A	B	C	D	E
110100111101111111-010100100111101111	7				5	2
111100111101111101-011100100011101111	6	4	1		1	
000100111101111111-011100100111001111	6	1			4	1
110100111101111101-010100100111101111	5			1	4	
010100101001101111-110100100011101011	5		1	3	1	
110100111101111111-010100100111101011	4		2	1	1	
111100111101101101-011100100011101111	2		1		1	
111100111101101111-011100100011101111	2		1		1	
111100111101111111-011100100011101111	2	1	1			
110001001001101101-110100100011101010	2	1	1			

図1 IS-printing 精度管理用に送付した3株の IS-printing パターン



50 : 50 bp ラダーマーカー、PC : ポジティブコントロール、1-3 : 検体

平成 29 年度

図 1 精度管理に用いた IS-PS 泳動図



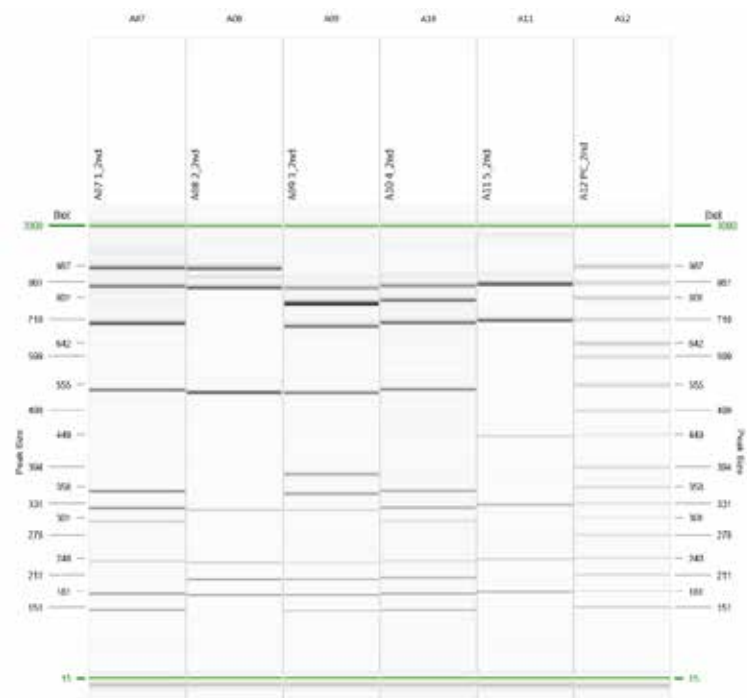


表1 各施設におけるPCR実施環境

	A	B	C	D	E
施設					
サンプル作成方法	5%ベックスで熱抽出	アノカ熱抽出(30ml Nuc12)に移	添付文書どおり	添付文書検査法「アノカ溶解法」	添付文書どおり
サーマルサイクラー機種名	Veriti	T100 サーマルサイクラー(ハイオ-フラット)	Applied Biosystems Veriti	2720 Thermal cycler (AB)	PCRシステムProflex
IS-pyriming PCR反応ボリューム	20μL	20μL	50μL	50μL	50μL
アノカ入の経路及び濃度	3% Nusieve GTG Seekem GTG=2:1	3% Agense KANTO HC in 0.5×TBE	3% Nusieve GTG Seekem GTG=2:1	3% Nusieve GTG Seekem GTG=2:1	3% アノカ入(Nusieve GTG Seekem GTG=2:1)
電圧変動の種類	Mupid ミニゲル泳動槽	+Mupid ミニゲル泳動槽(コストモハバ)	Mupid-exu	Mupid-21 ミニゲル泳動槽(コストモハバ)	コストモハバ機 - MyRun II
電圧変動停止時間	50V 50min, 100V 60min	100V 60分前後(10Vの泳動状況で変動)	100V 70分	100V 75min	135V 135分
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE	0.5×TBE
その他		TakaraのDx2型を使用			
施設	F	G	H	I	J
サンプル作成方法	送付されたサンプルをそのままサンプルブロックから熱抽出法によりサンプルDNAを		添付文書通り	添付文書どおり	
サーマルサイクラー機種名	Applied Biosystems Veriti 200	BIO-RAD C1000 Thermal Cycler	Applied Biosystem Veriti	PCRシステムProflex	Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycler
IS-pyriming PCR反応ボリューム	50μL	25μL	添付文書通り	50μL	20μL
アノカ入の経路及び濃度	Nusieve GTG Seekem GTG=2:1 3%	Nusieve 31 Agense, 3%	添付文書通り	3% アノカ入(Nusieve GTG Seekem GTG=2:1)	Nusieve 31 アノカ入 3%
電圧変動の種類	Mupid	BIO-RAD MINI-SUB CELL GT	ADVANCE Mupid-exu	コストモハバ機 - MyRun II	CosmoBio MyRun
電圧変動停止時間	100V 75分	100V 40分	100V 40分	135V 135分	100V 20min
泳動バッファー	0.5×TBE	0.5×TBE	添付文書通り	0.5×TBE	0.5×TBE Buffer
その他					サンプルはほぼサンプル皿にて泳動