

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
平成 29-令和元年度 分担研究報告書食品由来が疑われる有症事案に係る調査（食中毒調査）の迅速化・高度化に関する研究  
分担課題 腸管出血性大腸菌 O111 に対する IS-printing 法の開発に関する研究研究分担者 大岡 唯祐（鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・講師）  
研究協力者 磯部 順子（富山県衛生研究所・上席専門員）  
木全 恵子（富山県衛生研究所・副主幹研究員）  
原田 哲也（大阪健康安全基盤研究所・主任研究員）  
若林 友騎（大阪健康安全基盤研究所・研究員）  
西嶋 駿弥（大阪健康安全基盤研究所・研究員）  
江藤 良樹（福岡県保健環境研究所・専門研究員）

## 研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、溶血性尿毒症症候群や脳症などの重症合併症を発症するリスクの高い感染症であり、多数の集団感染事例を含めて毎年 3,500-4,000 例の報告されている。これまで様々な行政対応がなされてきたものの、原因や感染経路等が判明しないケースも多数存在する。毎年報告される血清型は O157 が中心であり、次いで O26, O103, O111 などの報告数が多いが、それ以外の血清型も増加している。我々はこれまでに EHEC O157 ゲノムにおいて挿入配列 IS629 の局在が株間で多様である点を利用し、簡便迅速菌株識別システムとして、検査現場での利用も可能な O157 IS-printing 法を開発してきた。本研究では、そのシステムを応用して、EHEC O111 について IS-printing 法（O111 IS-P 法）を開発することを目指した。参照株である 11128 株の IS629 挿入部位を標的として O111 IS-P 法プロトタイプを作製し、600 株のドラフトゲノムデータを基に改良して最終的なプライマーセット（FS, RS ver.2 の 2 セット）を構築した。また、各標的領域の PCR 産物をプラスミドへクローニングし、PCR の陽性コントロール DNA として作製した。協力機関において、分離株および集団感染事例由来株を用いた検討を実施し、検査現場での実用化に向けた改良を行った。

## A. 研究目的

生死に関わる重症合併症を発症するリスクの高い EHEC による食中毒調査において、様々な集団感染事例を特定し、その原因を明確にすることで、様々な衛生規範、基準の作成、改訂につながってきた。しかしながら、EHEC 感染症の報告数は 3,500-4,000 例と依然として多数にのぼり、血清型も O157 が中心となるものの、O26, O103, O111 などの報告数も多く、また近年それ以外の血清型も増加しており、原因や感染経路等が判明しないケースが多数ある。EHEC 感染症の事例調査のために、これまで各種分子型別法が開発され、複数の方法を組み合わせて目的に応じて使い分けているが、中でも、解像度は低いものの極めて迅速に比較的容易なデータが得られるスクリーニング法である IS-printing 法（IS-P 法）と多検体処理が容易な高解像度解析法である MLVA 法との組み合わせが最も効果的とされて

いる。しかしながら、IS-P 法は O157 と O26 のみに適用可能であり、分離頻度の比較的高い O111 や O103 についてはまだ存在しない。

本研究では、O111 について、菌株識別解像度の高い IS-P 法を開発し、臨床検査の現場で安定した結果が得られるように反応系の最適化を行うことを最終目標とする。

## B. 研究方法

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム情報および平成 27-29 年度 感染症実用化研究事業「ゲノム解析に資する下痢原性細菌感染症サーベイランスの強化及びゲノム解析を利用した迅速診断法の開発に向けた研究（感染研・伊豫田淳代表）」で取得された O111 約 600 株のドラフトゲノム情報（イルミナ MiSeq データ）を利用し、以下の流れで行った。

## 1) O111:H- 11128 株の IS629 挿入部位（30 か所）

を標的とした O111 IS-P 法プロトタイプ作製

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株に関しては、IS629 挿入部位約 30 か所が既に同定されている。この株の IS 挿入部位を標的とし、O111 IS-P 法のプロトタイプを作製した。まず、IS629 の内部に共通な外向きの IS 内部プライマーを設計し、次に、各 IS 挿入部位の近傍領域に IS 内部プライマーと対をなす外側プライマーを設計した。その際、プライマー間の距離は 100 bp から 1 kbp の範囲内で、さらに標的ごとに PCR 増幅サイズが異なるように設計した (図 1)。この方法により O111 IS-P 法プロトタイプ (FS1-3, RS1-3 の 6 プライマーセット) を構築した。PCR には KOD-Multi&EPI (東洋紡) を用い、PCR 反応液の組成は計 15  $\mu$ l (template DNA 1 $\mu$ l、外部プライマーミックス[各 4.5 $\mu$ M] 1 $\mu$ l、IS629 内部プライマー[25  $\mu$ M] 1 $\mu$ l、2 x PCR buffer 7.5 $\mu$ l、MilliQ 水 4.2 $\mu$ l、KOD-Multi&EPI 酵素 0.3 $\mu$ l)、PCR プログラムは 94°C 2min、30 サイクル (98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 1 分)、電気泳動は 2% Agarose S (ニッポンジーン) in 0.5 x TBE バッファーを用い、PCR 反応液 1 $\mu$ l を泳動するという条件で実施した。

- 2) 全ゲノム系統樹を用いた O111 IS-P 法のための多様性解析株の選定および O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証

O111 約 600 株のドラフトゲノム情報 (イルミナ MiSeq データ) を基に高精度系統解析を行い、その中から系統の離れた 206 株を選定して実施した。得られた PCR 増幅バンドの有無 (有りを「1」、無しを「0」) をデジタル化し、Cluster ソフトを用いてバンド情報を基にしたデンドログラムを作成した。

- 3) 非特異増幅プライマーの同定

項目 2) で実施した PCR 結果判定に際し、目的サイズと明らかに異なるバンドが検出される株があった場合、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別 PCR を行って、どのプライマーに由来する非特異増幅バンドかを同定した。

- 4) O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度の低いプライマーの除去

O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度向上ならびに検査現場で対応可能なプライマーセット (2 プライマーセット) の最終構築のため、まず、プロトタイプにおいて識別解像度が低い IS629 挿入部位の同定を

試みた。項目 1) の解析結果から、PCR 陽性が①5 株未満、②180-190 株、③190 株以上という基準で該当領域を抽出し、必要に応じて該当プライマーを除去した。

- 5) 206 株の MiSeq データからの IS629 配列の網羅的抽出と IS629 挿入部位の推定

解析対象株 206 株の MiSeq リード配列に対して、挿入配列 IS629 を含むリードを blastn により検索した。そのうち、MiSeq ペアリードの一方のみ挿入配列 IS629 を含むリードを選別し、対となるリード配列を網羅的に抽出した。完全長配列が決定している O111:H-11128 株のゲノム配列を参照配列として、抽出した MiSeq リード配列を Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA) を用いてマッピングし、各株における IS629 の挿入部位を推定した (図 2)。

- 6) 菌株識別解像度向上に向けた新規 IS629 挿入部位の選定および挿入部位の詳細な配列解析

206 株のドラフトゲノム情報から新たに同定した IS629 挿入部位の中で、菌株識別解像度が低い系統を中心に解像度向上が見込まれる標的部位を選定した。推定 IS 挿入部位の前後 1 kbp 付近の配列を得られるように外部プライマーを設計し、IS 内部プライマーとの PCR およびシーケンシングにより配列を決定した。

- 7) O111 IS-P 法プロトタイプからのプライマー選別および改良

206 株を用いてプロトタイプの検定を行い、菌株識別解像度が高くなる標的領域を選定した FS, RS ver.1 (標的部位、計 24 か所) について、2 セットにすることで下がった菌株識別解像度を上げるため、項目 6) で選定した IS 挿入部位を標的部位としたプライマーを FS, RS プライマーセット (ver.2) に新たに追加した。

- 8) PCR および泳動条件の再至適化

PCR には KOD-Multi&EPI (東洋紡) を用い、PCR 反応液の組成は計 15  $\mu$ l (鋳型 DNA 1 $\mu$ l、外部プライマーミックス[各 5  $\mu$ M] 0.75  $\mu$ l、IS629 内部プライマー[50  $\mu$ M] 0.75  $\mu$ l、2 x PCR buffer 7.5 $\mu$ l、MilliQ 水 4.7  $\mu$ l、KOD-Multi&EPI 酵素 0.3 $\mu$ l)、PCR プログラムは 94°C 2min、30 サイクル (98°C 10 秒、58°C 30 秒、68°C 1 分) で PCR 機器として Biometra 社の T-professional を用いて行った。菌株からの

鋳型 DNA 調整は、アルカリボイル法を用いた。電気泳動は 1.5-3.0 %の濃度で Agarose S (ニッポンジーン) in 0.5 x TBE バッファーおよび NuSieve™ 3:1 アガロース in 0.5 x TBE バッファーを用い泳動機器として MyRun を使用し、PCR 反応液 1 µl を泳動するという条件で実施した。

#### 9) PCR コントロール DNA の作製

項目 7) で作製した ver.2 プライマーセットに用いた各標的領域 (計 24 領域) について、各標的部位の外部プライマーと IS629 内部プライマーを用いて KOD-Multi&EPI 酵素で PCR 増幅し、PCR purification kit (Qiagen) で精製した。DNA Ligation Kit (Mighty Mix; Takara) を用いて T-vector pMD20 プラスミド (Takara) へクローニングし、コンピテントセル DH5 α (Takara) へ形質転換した。形質転換された株から各標的領域を含むプラスミドをそれぞれ QIAprep Spin Miniprep kit を (Qiagen) 用いて精製した。精製したプラスミド DNA を鋳型として当該プライマーペアによる PCR 増幅を行い、標的サイズの PCR 増幅産物が得られることを確認した。

#### 10) 協力機関へのプライマーセットおよびコントロール DNA の配布

項目 7) および項目 9) で作製した O111 IS-P 法プライマーセット (FS ver.2, RS ver.2 の 2 セット) と PCR コントロール DNA を協力機関である富山県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、福岡県保健環境研究所の 3 機関へ送付し、実際に分離株 (異なる事例由来株および集団感染事例由来株) を用いて、個々の機関が使用している PCR 機器や泳動機器を用いて検討し、機器の違いによる増幅効率や泳動像の差異を検証した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

### C. 研究結果

#### 1) O111 IS-P 法プロトタイプ作製の作製

プロトタイプ作製に際し、IS 挿入部位 30 か所のうち 5 か所については、IS 挿入部位前後 1kbp の配列がゲノム上に複数存在することから、非特異増幅を避ける目的で PCR の標的から除外した。また、2 か所の挿入部位に関しては F 領域が上記と同様の理由で標的から除外された。最終的に F セット、R セット

はそれぞれ 25 領域、27 領域を標的とし、それぞれを 3 組 (1<sup>st</sup>-, 2<sup>nd</sup>-, 3<sup>rd</sup>-F primer set, 1<sup>st</sup>-, 2<sup>nd</sup>-, 3<sup>rd</sup>-R primer set) に分けて計 6 PCR で判定出来る反応系とした。プライマー長は 19-21 bp、T<sub>m</sub> 値は 58~62°C になるよう設計した。PCR 条件の至適化の判定には、11128 株の精製ゲノム DNA を鋳型として使用し、PCR・泳動ともに良好な結果が得られた (図 3)。

#### 2) O111 IS-P 法プロトタイプによる菌株識別解像度の検証

系統の離れた O111 206 株について、IS-P 法プロトタイプ 6 プライマーセットを用いた PCR を実施した。その結果、各プライマーセットにより泳動パターンに違いが見られることが分かった (図 4: FS1 セットの泳動例)。6 セットの PCR により得られたバンドパターンを基に cluster ソフトでデンドログラムを作成した (図 5)。その結果、206 株が 149 パターンに分かれること、同じバンドパターンを示す株が 2 株 (23 タイプ)、3 株 (7 タイプ)、4 株以上 (5 タイプ) 検出されること、また、計 52 領域の標的に対して検出バンドの本数が 15 本未満の株が 19 株存在することなどが明らかとなった。

#### 3) 非特異増幅プライマーの同定

図 6 の例に示すように、FS1-3 および RS1-3 のプライマーセットによるマルチブックス PCR 結果を検証する際、増幅されたバンドの中に目的サイズと明らかに異なるものが見られる株が複数検出された。これらの株について、各プライマーセットに含まれる外側プライマーの個別 PCR を行うことで、その非特異増幅バンドがどのプライマーに由来するかを同定した。この解析により、計 8 個の外側プライマーをプロトタイプから削除した。

#### 4) O111 IS-P 法プロトタイプからの菌株識別解像度の低いプライマーの除去

項目 2) の解析結果から、PCR 陽性が 5 株未満であった部位を 9 か所、180-190 株で PCR 陽性であった部位を 8 か所、190 株以上で PCR 陽性であった部位を 2 か所同定した。この結果を基に、同定した計 19 か所のうち、190 株以上で PCR 陽性であった 1 か所を除く 18 か所について標的候補から削除した。なお、190 株以上で陽性となった 1 か所については、PCR の陽性コントロールとして採用した。

項目 2)、項目 3) の過程を経てプロトタイ

プから採用されたプライマーセットでは、206株が108パターンに分かれ、菌株識別解像度が極端に下がる系統も見られた(図7)。

5) 206株におけるIS629挿入部位の網羅的抽出  
O111株206株のMiSeqリードを参照株へのマッピングした結果、IS629が挿入されていると推定され、菌株識別解像度の向上に有効と考えられる領域を約70か所同定した。この中には、参照株に存在する部位含まれており、新規IS629挿入部位としては約40か所同定された。

6) 菌株識別解像度向上に向けた新規IS629挿入部位の検討  
206株のドラフトゲノム情報から新たに同定したIS629挿入部位について、項目3)、4)で選別したプライマーセットの結果から得られたデンドログラム(図8)の結果にその有無をプロットした結果、菌株識別解像度が図5のように164パターンへと向上した。また、この中で菌株識別解像度の特に低い系統に存在する新規IS挿入部位を4か所選定した。

7) O111 IS-P法プロトタイプからのプライマー選別および改良

FS ver.1プライマーセットにおいて用いた12か所の標的IS挿入部位のうち2か所については、PCR増幅サイズが類似しているため、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。RS ver.1プライマーセットにおいても同様、PCR増幅サイズが類似しているものについては、増幅サイズが異なるようにプライマーを再設計した。また、2か所については、その利用により菌株識別解像度に影響が少ないため、プライマーセットから除いた。

項目6)で選定した206株のドラフトゲノム配列データから同定した菌株識別解像度の向上に繋がる4領域について、ver.1プライマーセットにおいて除去したプライマーのPCR増幅バンドサイズと入れ替える形で新たに4領域を検出可能なプライマーを設計し、それらを加えたものをFS、RS ver.2プライマーセットとした。また、この2プライマーセットを用いて系統の離れた206株について解析を行った結果、113パターンに分かれる(図9)ことを確認した。

8) PCRおよび泳動条件の再最適化

項目7)でプライマーの入れ替えを行ったことにより、PCRおよびPCR増幅産物の電気泳動の条件を再検討した。PCR条件については、前年度に構築した最適条件で問題なく機能したが、電気泳動条件については、1.5-3.0%のゲル濃度で検討を行い、MyRunによる電気泳動では1.5%で最も明確な泳動像が得られることが明らかとなった(図10)。

9) PCRコントロールDNAの作製

項目1)で作製したFS ver.2、RS ver.2プライマーセットに含まれる計24か所のIS629挿入部位について、クローニングベクターpMD20へクローニング、精製した。標的部位のうち1か所は形質転換株の増殖効率が悪かったため、大量培養しPlasmid Midi kit (Qiagen)を用いて精製した。クローニング成否の確認は、各精製プラスミドについて標的部位を増幅したプライマーを用いて行ったが、いずれも単一バンドのみ検出されたことから、FS ver.2およびRS ver.2のそれぞれの鋳型DNAとなるよう、各精製プラスミドを各20ng/μlになるよう混合した。

10) 協力機関におけるプライマーセットおよびコントロールDNAの検討

FS ver.2およびRS ver.2プライマーセットを用い、協力3機関(A、B、C)において、臨床分離株とPCRコントロールDNAを用いたPCRおよび泳動に関する検討を実施した。  
**機関A**：散発事例由来株10株および3つの集団感染事例由来株(事例①6株、事例②6株、事例③6株)の計28株(表3)を用いて検討した。Mupidを用いた泳動では、3%ゲルでバンドの識別が容易であることが分かった。PCRコントロールDNAの結果から、FS ver.2では4F(644bp)と5F(620bp)、RS ver.2では1NR(986bp)と2NR(887bp)のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2では5R(637bp)と9R(306bp)の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、全ての株で異なるバンドパターンが得られた(図11a)。また、集団感染由来株では3事例ともに同一バンドが検出された(図11b)。  
**機関B**：散発事例由来株12株および集団感染事例由来3株の計15株(表4)を用いて検討した。PCRコントロールDNAの結果から、FS ver.2では4F(644bp)と5F(620bp)、RS ver.2では1NR(986bp)と2NR(887bp)のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果で

あった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3 株が同じバンドパターンであったが残り異なるパターンとなった (図 13a)。また、集団感染由来株では 3 事例ともに同一バンドが検出された (図 12a)。また、Mupid を用いた泳動では 3%ゲルでバンドの識別が容易であった (図 12a, b)。

**機関 C:** 散発事例由来株 21 株および 8 つの集団感染事例由来株 (8 事例, 計 25 株) の計 46 株 (表 5) を用いて検討した。PCR コントロール DNA の結果から、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいという結果であった。また、RS ver.2 では 5R (637bp) と 9R (306bp) の増幅効率が悪かった。散発事例由来株では、3 組計 8 株が同じバンドパターンを示し、バンドが検出されない株も 2 株 (O111 であることを確認済み) 存在した (図 13a, 表 4)。また、集団感染由来株では 8 事例ともに同一バンドが検出された (図 13b, 表 4)。また、Mupid-exU (Mupid) を用いた泳動では 1.5%で良好な結果が得られた。

**マイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いた機関 B による検討:** 通常のゲル電気泳動と同様、FS ver.2 では 4F (644bp) と 5F (620bp)、RS ver.2 では 1NR (986bp) と 2NR (887bp)、6R (502bp) と 7R (475bp) のバンドがそれぞれ判別しにくいことが明らかになった (図 14)。しかしながら、RS ver.2 の 6R (502bp) と 7R (475bp) については、菌株により判別できる場合もあり、株間で IS 挿入部位に多様性がある可能性が示唆された (図 15)。

#### D. 考察

本研究では O111 IS-P 法の開発のため、①全ゲノム解析株 11128 株の IS629 挿入部位 (30 か所) を基にしたプロトタイプ (FS1-3, RS1-3 の 6 セット) の構築、②206 株によるプロトタイプの有用性検討、③2 プライマーセット (FS ver.1, RS ver.1 の 2 セット) への選定、④206 株から同定した IS 挿入部位の新規標的部位としての追加 (FS ver.2, RS ver.2 の 2 セット)、⑤PCR および電気泳動条件の至適化、⑥協力機関による試用という 6 つの段階に分けて研究を実施し、本法の検査現場で実用化を目指した。最終的に構築した 2 セットにしたことで、206 株を 113 パターンに分類するという解像度にとどまったが、

協力機関での検討により、少なくとも集団感染事例の同定ツールとしては十分に機能することが証明された。しかしながら、系統が近いと思われる株での菌株識別解像度を上げることができなかった点、また、分離数は少ないものの、系統関係が遠い小集団については、解像度を十分に上げることが出来なかった。また、PCR や電気泳動など各機関で使用されている機器により結果が変わることも明らかとなり、本法の実用化にはさらなる改良が必要である可能性が示唆された。

#### E. 結論

本研究により、O111 IS-P 法として、2 チューブによる PCR で EHEC O111 の集団感染を容易に同定することが可能な、また、菌株識別解像度もある程度高い検出系を構築することができた。しかしながら、使用する機器によって結果が異なることもあり、EHEC O157 で実用化されている O157 IS-printing system のように各施設で均一な結果が得られるようなシステムにするためには、さらなる改良と至適化を行う必要がある。

#### F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

大岡唯祐、李謙一、桂啓介、伊豫田淳、藺牟田直子、林哲也、大西真、西順一郎：腸管出血性大腸菌 O111 用 IS-printing system の開発、第 22 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2018 年 11 月 8-9 日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



表 1 FS ver.2, RS ver.2 プライマー情報

FS ver.2

	primer name	primer_F	length	Tm	product size	
IS629 outside primer F	1NF	TAG	G	19	60	896
	2NF	GAG	AG	20	60	803
	3F	GCG	G	19	58	711
	4F	CTG	GAG	20	62	644
	5F	ACG	C	19	62	620
	6F	CCG	G	19	58	531
	7F	GCG	C	19	58	485
	8F	GCG	TG	20	62	387
	9F	ATG	C	19	62	312
	10F	GAG	TG	21	60	272
	11F	GCG	C	21	60	234
	12F	GAG	GCC	21	62	201
IS629 inside primer R	IS629IN-R2	CTCAGGGAGTTTAGTCTCCAGG	22	66	-	

RS ver.2

	primer name	primer_R	length	Tm	product size	
IS629 outside primer R	1NR	GTC	C	19	62	986
	2NR	CCG	CAAG	22	60	887
	3R	TCC	A	19	58	776
	4R	CAG	CA	20	60	711
	5R	ATG	GC	20	58	637
	6R	GAG	CA	19	58	502
	7R	ACG	C	19	62	475
	8R	GAG	AC	19	62	364
	9R	TCC	CG	19	62	306
	10R	GAG	GC	19	60	274
	11R	CAG	G	19	58	236
	12R	CAG	A	20	60	198
IS629 inside primer F	IS629IN-F3	TCTGGCAGCCTGAGTTCACAG	22	66	-	

※NF, NR : Ver.2 で新たに追加した標的部位に対するプライマー

※プライマー配列については未発表データのため非公開

表 2 使用した PCR および電気泳動機器

	PCR機器	泳動機器
機関A	TaKaRa TP650 PCR Thermal Cycler Dice Standard	Mupid
機関B	TaKaRa TP350 PCR Thermal Cycler Dice Touch	Mupid
機関C	Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler	Mupid-exU(Mupid)
鹿児島大	Biometra T-professional	MyRun

表3 機関Aの解析株情報

No.	菌株名	分離年	O	H	
S1	1581	1998	111	NM	
S2	2151	2002	111	NM	
S3	2320	2004	111	NM	
S4	2429	2005	111	28	
S5	3002	2008	111	NM	
S6	3041	2009	111	NM	
S7	3111	2010	111	NM	
S8	3497	2013	111	NM	
S9	3703	2015	111	NM	
S10	3713	2015	111	NM	
集団感染事例①	O1	1853	2000	111	NM
	O2	1882		111	NM
	O3	1883		111	NM
	O4	1884		111	NM
	O5	1885		111	NM
	O6	1886		111	NM
集団感染事例②	O7	2695	2006	111	NM
	O8	2701		111	NM
	O9	2702		111	NM
	O10	2703		111	NM
	O11	2704		111	NM
	O12	2705		111	NM
集団感染事例③	O13	3188	2011	111	NM
	O14	3190		111	NM
	O15	3192		111	NM
	O16	3195		111	NM
	O17	3196		111	NM
	O18	3197		111	NM

表4 機関Bの解析株情報 ●：同じバンドパターン

	菌株番号	分離年	O抗原型	H抗原型	Stx;RPLA	備考
	PV221	1997	111	NM[8]	1	
	11H461	1999	111	NM[8]	1	
散発事例株	● 13H38	2001	111	UT[8]	1+2	
	14H163	2002	111	NM[8]	1+2	
	PV06-50	2006	111	NM[8]	1+2	
	PV07-37	2007	111	NM[8]	1	
	● PV07-55	2007	111	8	1	
	PV07-157	2007	111	UT[8]	1+2	
	● PV08-103	2008	111	NM[8]	1+2	
	PV12-41	2012	111	NM	1	
	PV13-59	2013	111	NM	1	
	PV14-37	2014	111	NM	1	
集団感染事例	PV15-30	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
	PV15-31	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族
	PV15-32	2015	111	NM	1+2	PV15-30-32は家族





図1 O111 IS-P 法の模式図. IS 内部に外側へ向けて設計した IS 内部プライマーと対になるように外側プライマーを設計することで、IS の前後に F セット、R セットを設計する。

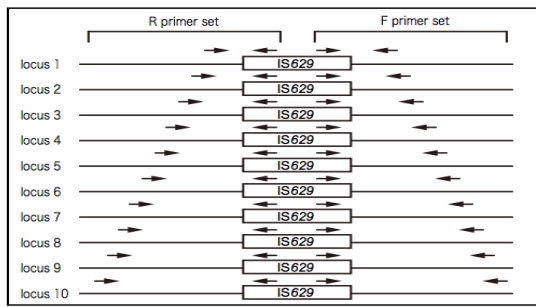


図2 マッピングによる IS629 挿入部位の推定. 参照株へのリードマッピングの結果から、解析対象株に IS 挿入があるかどうかを推定できる。

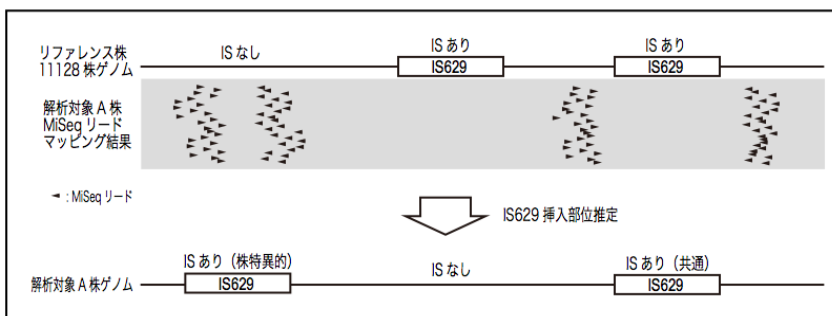
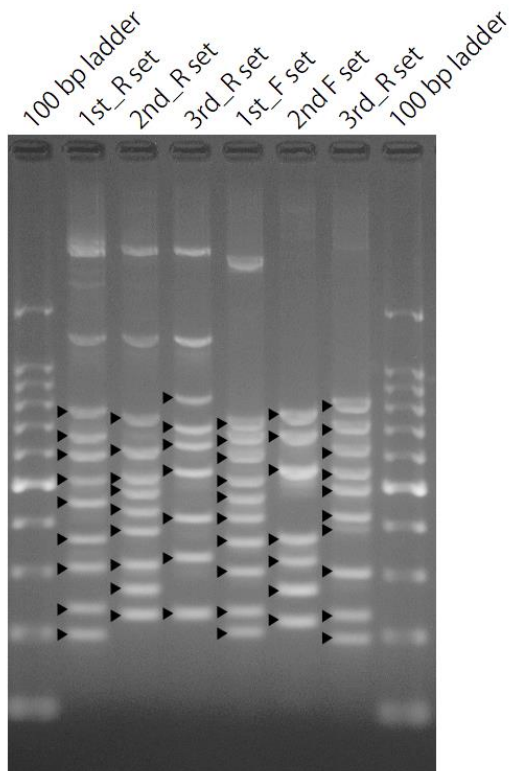


図3 O111 IS-P 法プロトタイプに至適条件および PCR 産物泳動結果. 至適条件で PCR を行った結果、参照株 11128 株 DNA を用いた場合、F セット (計 27 本)、R セット (計 25 本) がバンドはほぼ均一に検出されており、PCR 増幅サイズの識別も可能である。



【PCR反応液】[15  $\mu$ l scale]

Template DNA	1
Primer outside mix (4.5 $\mu$ M each)	1
Primer IS629Inside (25pM)	1
2x PCR buffer	7.5
D.W.	4.2
KOD-Multi-&EPI	0.3
Total	15

\* primer final conc.: 0.3 $\mu$ M

【PCRプログラム】3 step

1. 94 $^{\circ}$ C 2 min
2. 98 $^{\circ}$ C 10 sec step 2-4: 25 cycles
3. 58 $^{\circ}$ C 30 sec
4. 68 $^{\circ}$ C 1 min

【電気泳動】

2% Agarose S in 0.5 x TBE  
Marker: 100 bp ladder

▶: 陽性バンド  
(F set 計 27 本, R set 計 25 本)

図4 O111 IS-P 法プロトタイプによる 206 株の PCR・電気泳動結果の例 (FS1 プライマーセット)。  
 206 株で異なるバンドパターンが得られているが、全くバンドが検出されない株やほぼ全株で検出されているバンドがある。

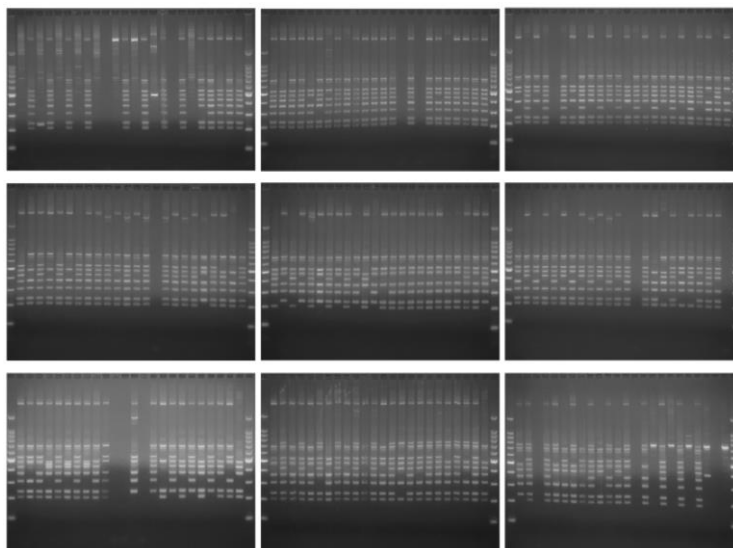


図5 O111 IS-P 法プロトタイプ 6 プライマーセットによる PCR 結果のデンドログラム  
 FS1-3 および RS1-3 の 6 プライマーセットによる結果から、149 パターンに分類されたが、複数株が同じパターンを示す場合なども見られた。

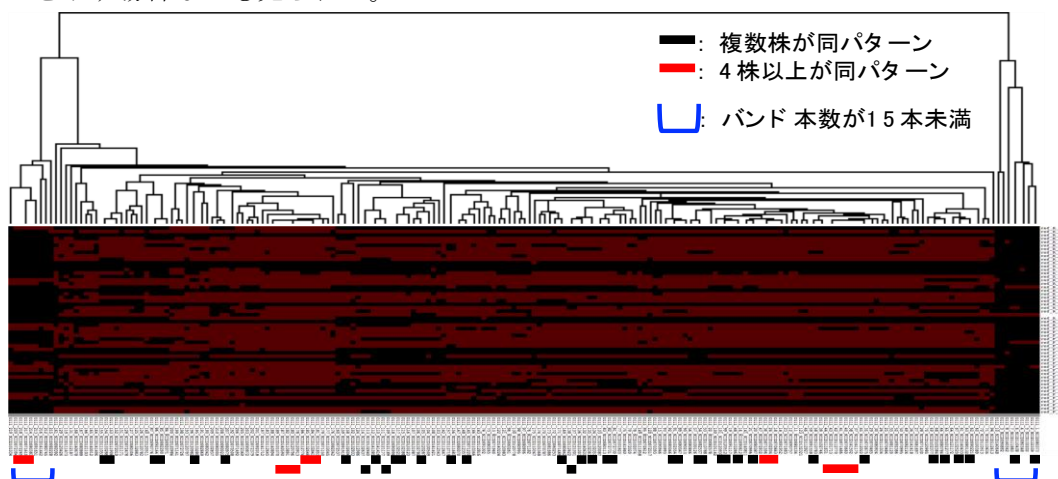


図6 非特異増幅によるバンド検出とその原因プライマーの同定の例 (FS2 セット、NIID072394 株)  
 NIID072394 株 (および NIID101034 株) で見られた非特異増幅バンド (赤矢印) について個別 PCR による検証の結果、F2 プライマーにより該当バンドが検出されることが判明した。

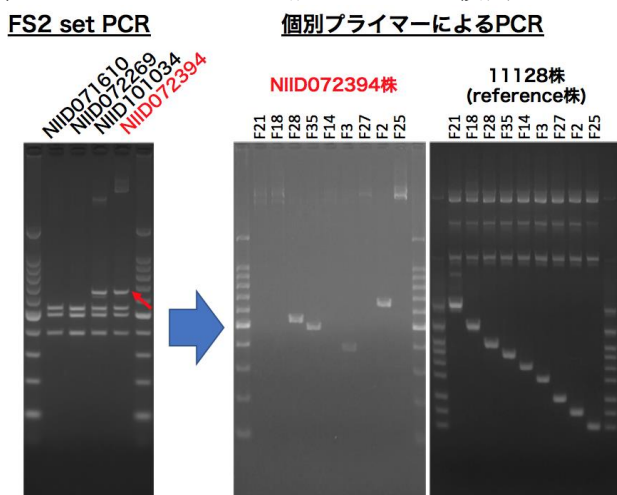


図7 PCR増幅効率が低い、非特異増幅があるプライマーを除去した後の菌株識別解像度。

項目2),3)で該当するプライマーを除去した結果、菌株識別解像度が108パターンに下がり、特に解像度が下がる系統が4グループ検出された。

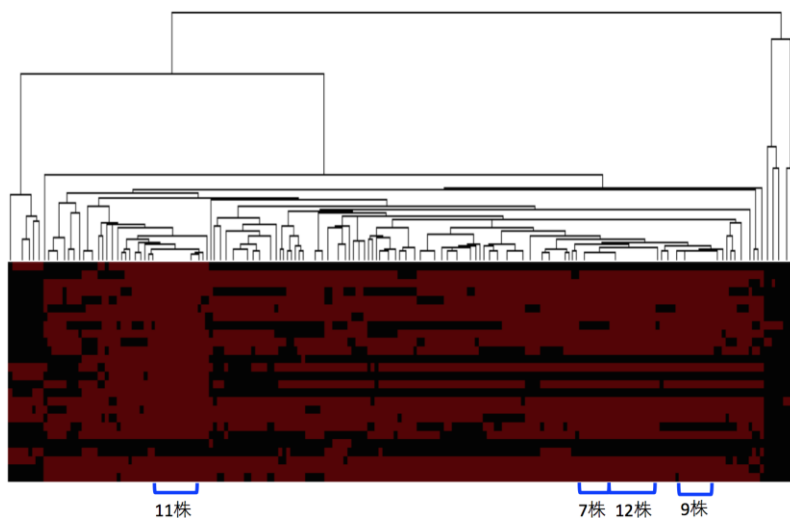


図8 新規IS629挿入部位(29か所)の情報追加による菌株識別解像度の向上

図4のデータに新規IS629挿入部位(計29か所)の情報を追加することにより、108パターンであった菌株識別解像度が164パターンにまで向上した。

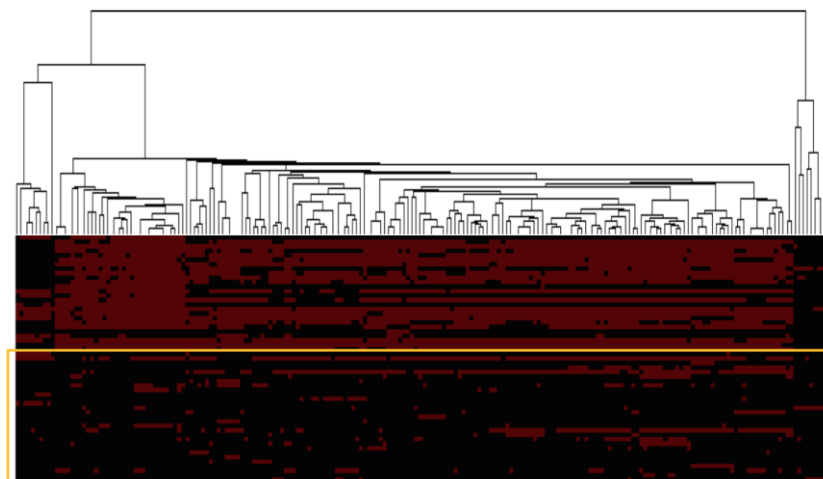


図9 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる 206 株による PCR 結果のデンドログラム  
 206 株 2 プライマーセットによる結果から、113 パターンに分類された。

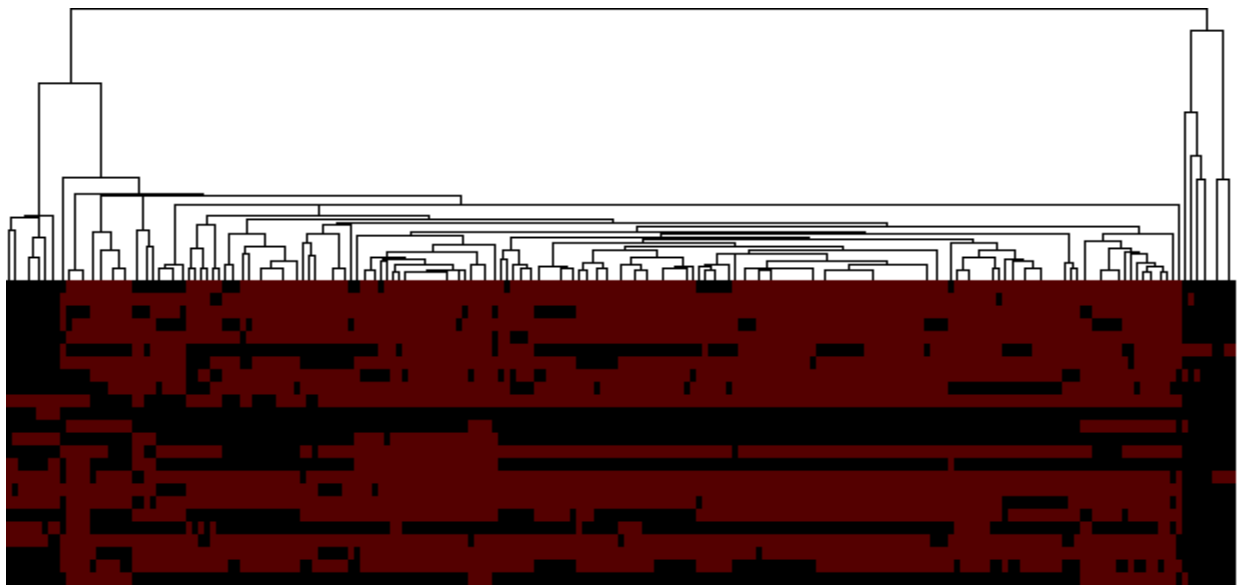
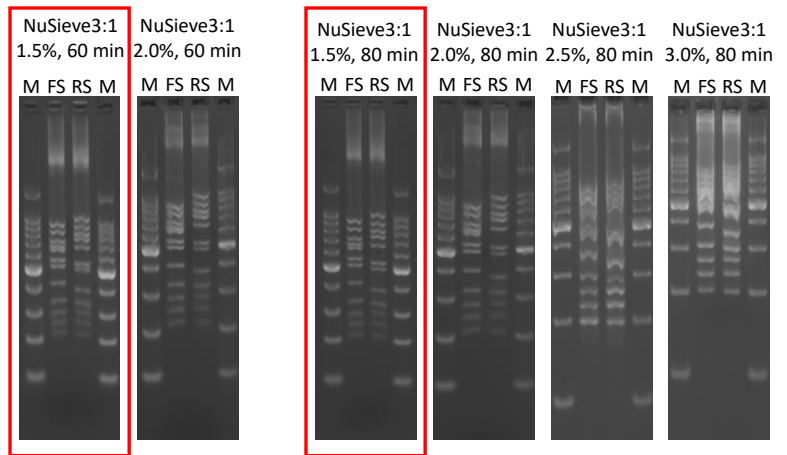


図10 FS ver.2, RS ver.2 プライマーセットによる PCR および泳動条件の検討

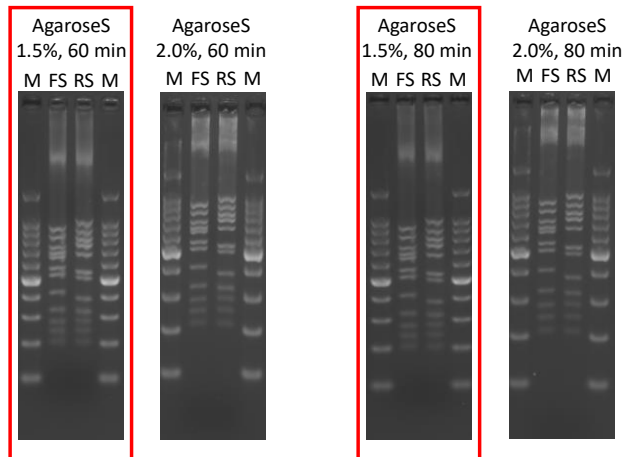
PCR 条件は昨年度と同様であり、全てのバンド (各 12 本) が検出された。また、MyRun による泳動結果から、NuSieve 3:1 および Agarose S のどちらにおいても、1.5%ゲルにおいてバンドの識別が容易であった。

NuSieve 3:1 (in 0.5 x TBE)

Marker (M): 100bp ladder



NipponGene Agarose S (in 0.5 x TBE)



【PCR反応液】 15 $\mu$ l scale

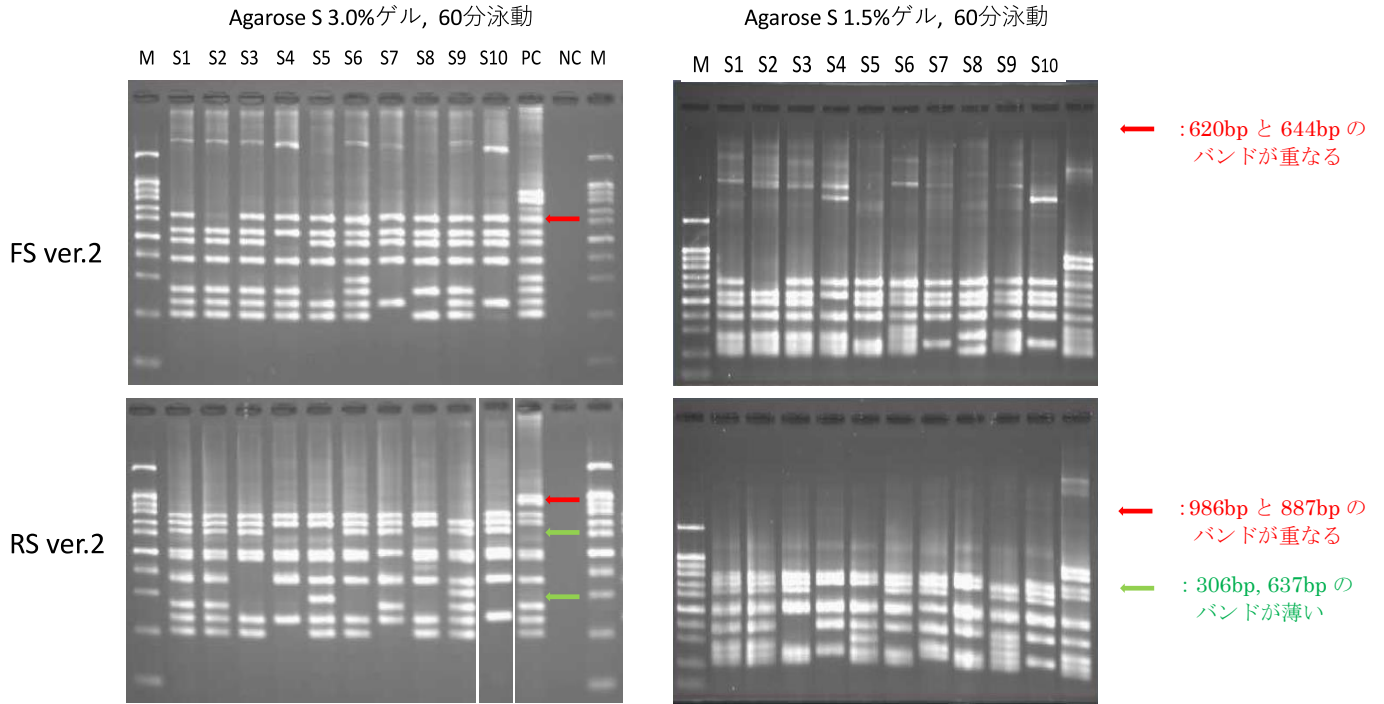
template DNA (positive control DNA)	1
primer F or R mix (各5 $\mu$ M)	0.75
primer IS629Inside R or F (各50 $\mu$ M)	0.75
2 x PCR buffer	7.5
D.W.	4.7
KOD-Multi&EPI	0.3
total	15

- 【PCR program】 3 step
- 94 $^{\circ}$ C 2 min
  - 98 $^{\circ}$ C 10 sec
  - 58 $^{\circ}$ C 30 sec
  - 68 $^{\circ}$ C 1 min [step2-4: 25 cycles]
- ※PCR機器: T-professional (Biometra)

- 【電気泳動】 濃度1.5-3.0% in 0.5xTBE
- ゲル: 1. NuSieve 3:1 (Lonza)  
 2. Agarose S (Nippon Gene)
- Marker: 100 bp ladder
- ※泳動機器: MyRun

**図 11 機関AのPCRおよび泳動結果**

a) 散发事例株（10株）での ver.2 プライマーセットの検討：10株のデータから同じバンドパターンを示す株は見られなかった。また、ゲル濃度の比較から、Mupid を用いた場合、3%ゲルの解像度が比較的高いことが明らかとなった。



PCR機器: Takara Dice PT650  
泳動機器: Mupid

b) 集団感染事例由来株（3事例、各6株）での ver.2 プライマーセットの検討：3事例全てで集団感染事例株では同じバンドパターンを示した。

Agarose S 1.5%ゲル, 60分泳動

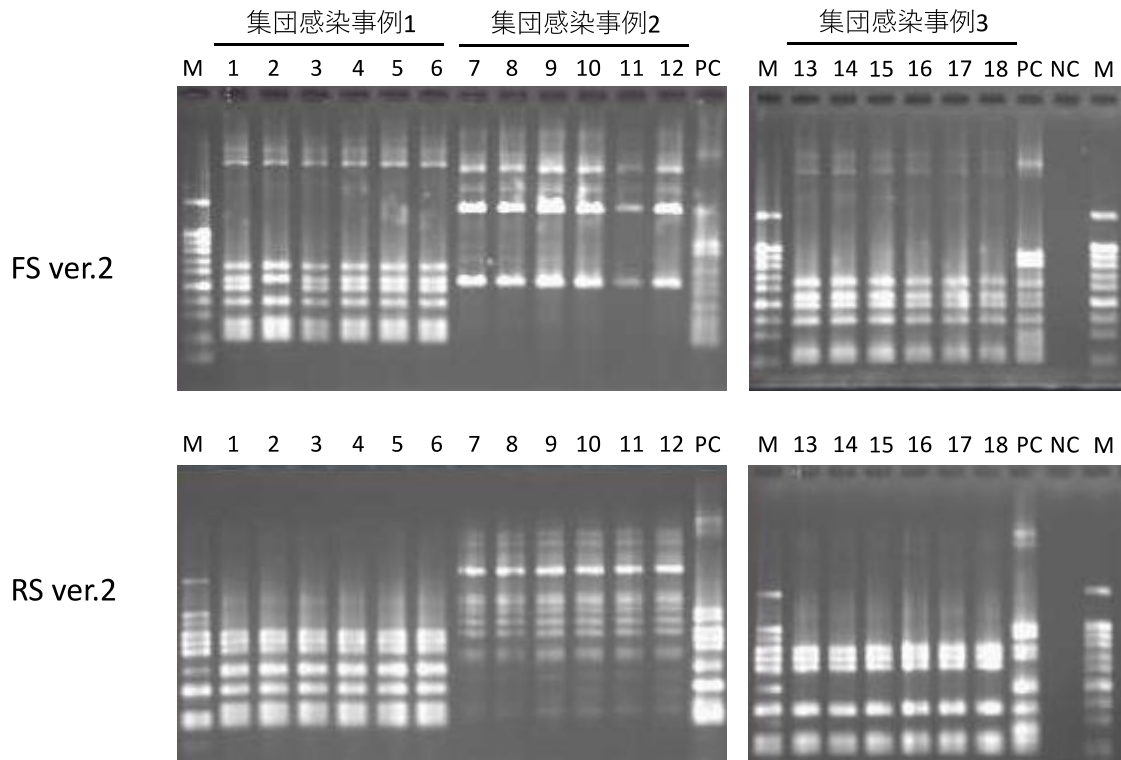
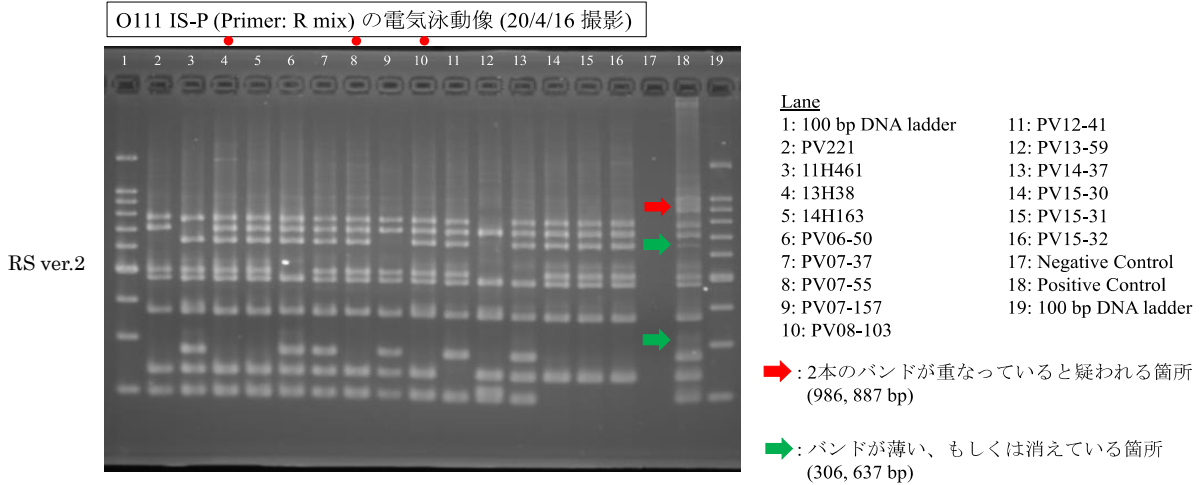
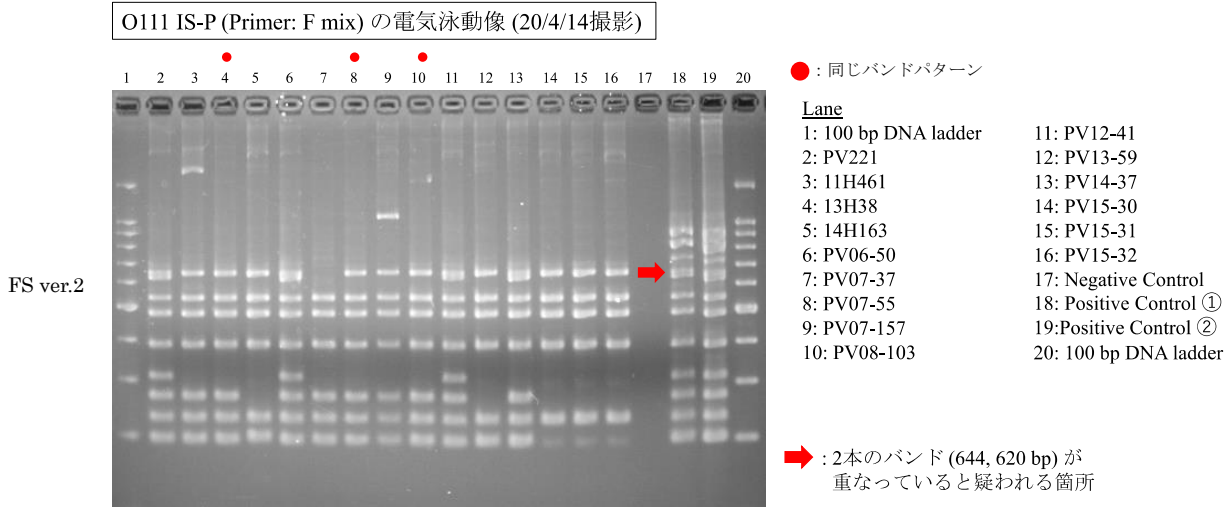


図 12 機関 B の PCR および泳動結果

- a) 散发事例株 12 株のうち、3 株が同じバンドパターンを示した。また、集団感染由来株 (3 株) は同じバンドパターンを示した。



アガロース  
3%(NuSieveGTG:SeaKemGTG=2:1)  
泳動条件  
50V 45min + 100V 45min  
露光時間  
15s(FluorChem Q system使用)

泳動量  
Test sample 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)  
PC plasmid mix 1 μL+6x Loading Dye 3 μL (4 μLを泳動)  
100bp Ladder 3 μL

- b) 1.5%アガロースを用いた泳動結果 : 3%と同条件の泳動では 500bp 以下のバンドが流れきってしまった。

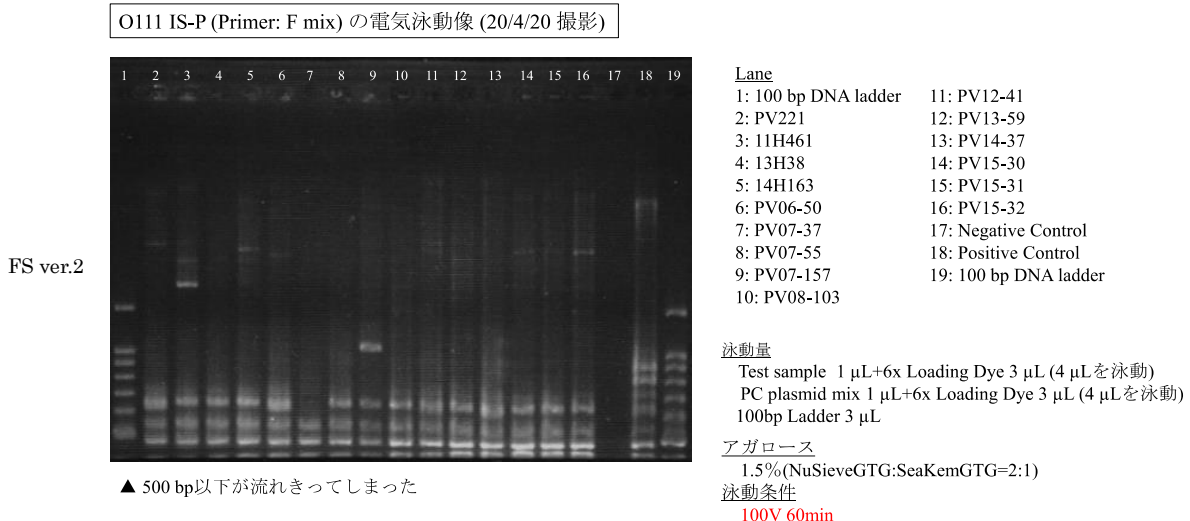
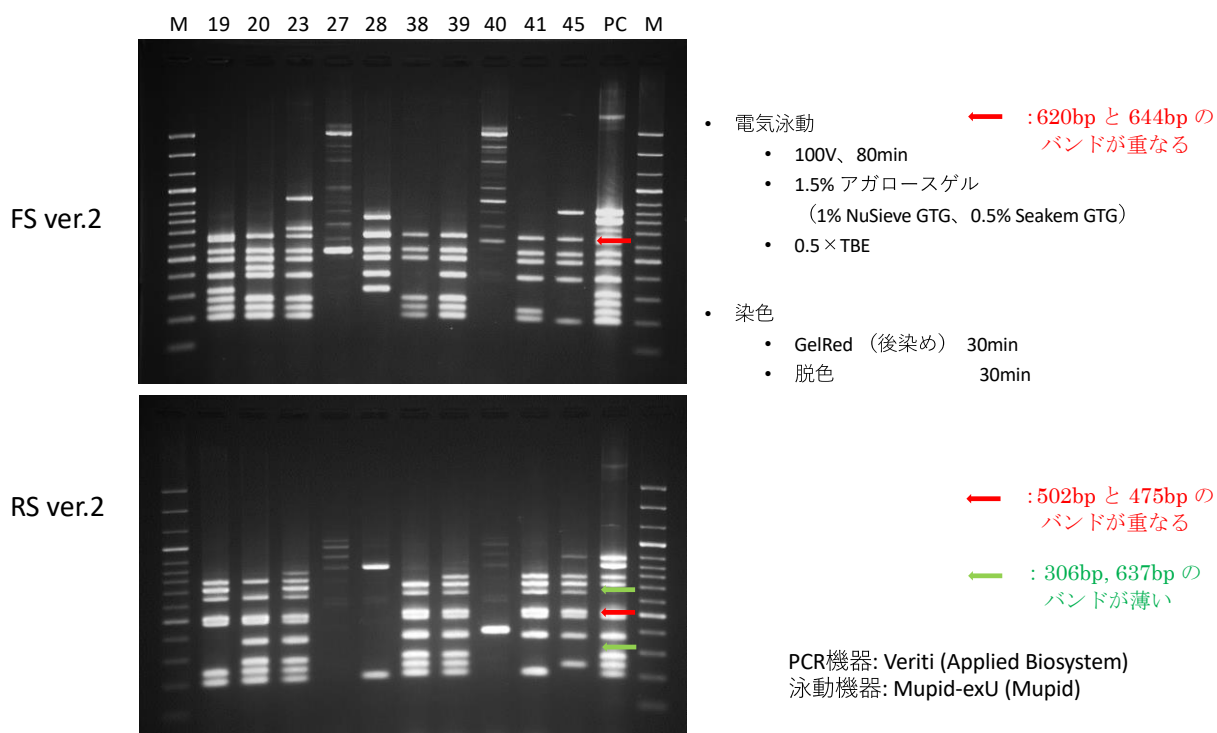


図 13 機関 C による PCR および泳動結果

a) PCR 結果の一部：1.5%ゲルで良好な泳動結果が得られた。



b) 集団感染由来株（事例②, 事例⑤）の結果

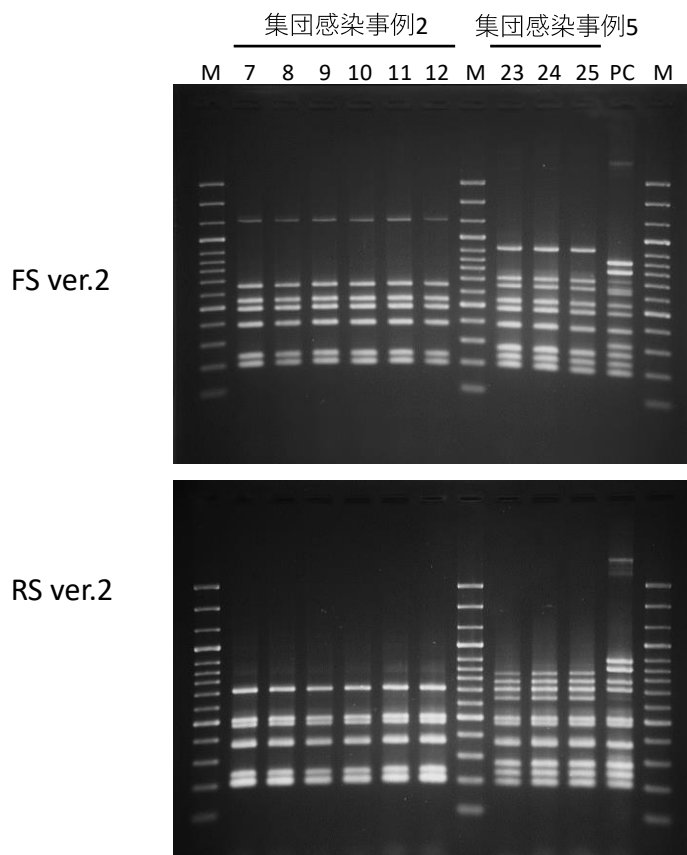


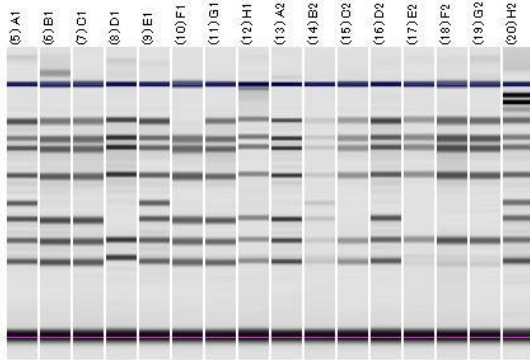


図 14 機関 B による MultiNA を用いた解析結果 1

O111 IS-printing system FS ver.2

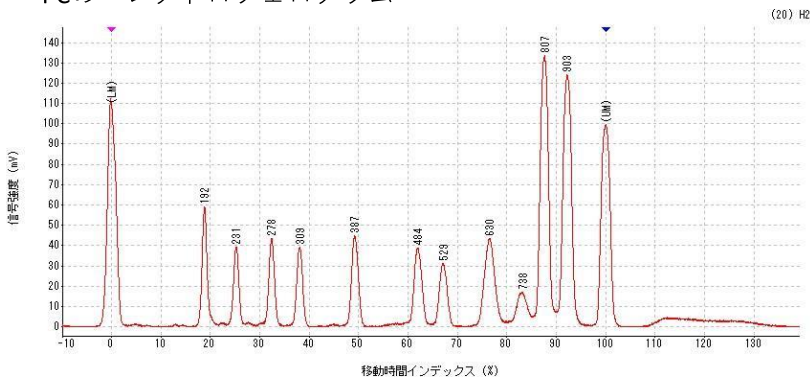
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- |              |              |
|--------------|--------------|
| A1: PV221    | A2: PV08-103 |
| B1: 11H461   | B2: PV12-41  |
| C1: 13H38    | C2: PV13-59  |
| D1: 14H163   | D2: PV14-37  |
| E1: PV06-50  | E2: PV15-30  |
| F1: PV07-37  | F2: PV15-31  |
| G1: PV07-55  | G2: PV15-32  |
| H1: PV07-157 | H2: PC       |

PCのエレクトロフェログラム

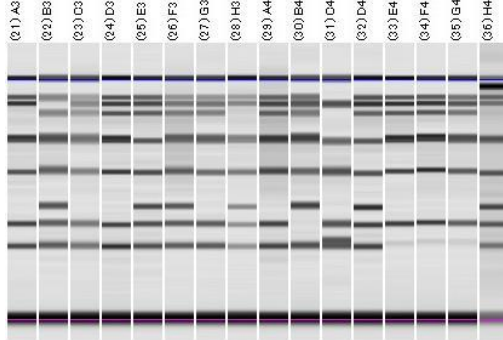


・ 644 bp と 620 bp のピークが重なっている

O111 IS-printing system RS ver.2

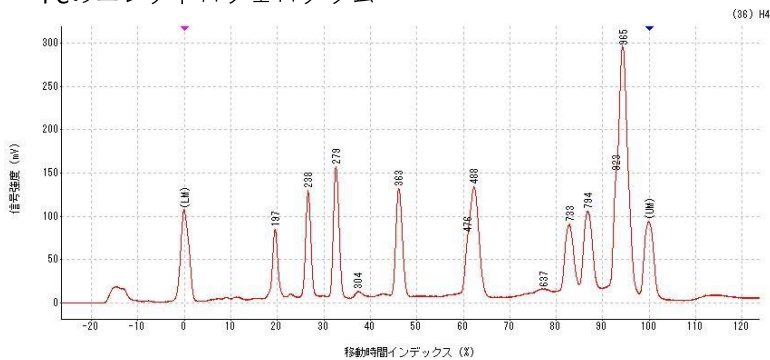
MultiNA DNA 1000 kit

ゲルイメージ



- |              |              |
|--------------|--------------|
| A3: PV221    | A4: PV08-103 |
| B3: 11H461   | B4: PV12-41  |
| C3: 13H38    | C4: PV13-59  |
| D3: 14H163   | D4: PV14-37  |
| E3: PV06-50  | E4: PV15-30  |
| F3: PV07-37  | F4: PV15-31  |
| G3: PV07-55  | G4: PV15-32  |
| H3: PV07-157 | H4: PC       |

PCのエレクトロフェログラム



・ 986 bp と 887 bp、502 bp と 475 bp のピークが重なっている

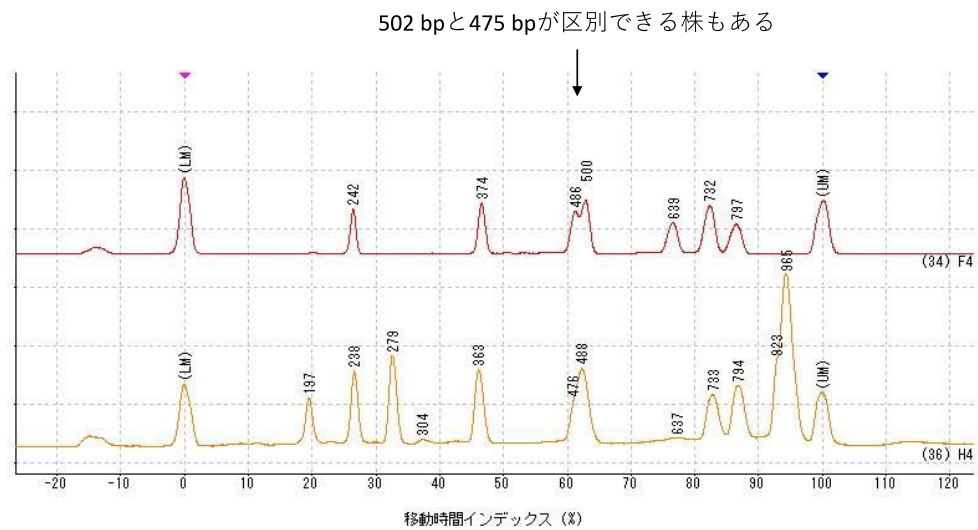
・ 637 bp と 306 bp のピーク弱い

# 図 15 機関 B による MultiNA を用いた解析結果 2

O111 IS-printing system RS ver.2

MultiNA DNA 1000 kit

PV15-31 (R mix)のエレクトロフェログラム



上段 F4: PV15-31

下段 H4: PC