

表 2-1 概要

初発患者発病年月日	1998年10月21日
原因となった施設	平塚市内の飲食店（弁当、軽食）
原因食品	サンドイッチ弁当（自家製マヨネーズである疑い）
原因食品の摂食場所	茅ヶ崎市内の A および B 幼稚園
摂食者数	652名
患者数	234名（入院患者6名）
病因物質	<i>S. Enteritidis</i>

表 2-2 発症状況

発症月日	10/21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	11/1	2	3 (日)
患者数 A幼稚園	7	4	5	7	10	8	10	8	4	3				
B幼稚園		7	12	14	16	30	22	16	19	16	5	3	2	1 (人)

表 2-3 患者の性別および年齢分布

年齢	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-	不明	総計
男	37	77	0	0	0	0	0	0	114
女	35	78	0	0	6	1	0	0	120

表 2-4 病因物質の検索結果

検査材料	検査数	結果
便（患者）	105名	53名から <i>S. Enteritidis</i> を検出
便（従業員）	3名	検出せず
食材	13件	検出せず
施設器具ふきとり材料	18件	検出せず

表 2-5 *S. Enteritidis* 分離株のファージ型と PFGE パターン

	分離月日	株数	ファージ型	PFGE パターン (<i>Bln I</i>)
A 幼稚園	11月2日	3	1	B1
	3日	4	1	B1
	4日	4	1	B1
	6日	1	1	B2

B 幼稚園	11月1日	3	1	B1
	2日	3	1	B1
	3日	3	1	B1 : 2株、B3 : 1株
	4日	3	1	B1
	6日	11	1	B1 : 9株、B3 : 1株、B4 : 1株

表 3-1 概要

初発患者発病年月日	1998年5月23日
原因となった施設	北海道N物産株式会社
原因食品	イクラ醤油漬け (腸管出血性大腸菌 O157 : H7 を検出)
原因食品の摂食場所	7 都府県 (神奈川県 5 市内の寿司店等)
患者数	49 名 (神奈川県内 10 名)
保菌者数	13 名 (神奈川県内 4 名)
病因物質	腸管出血性大腸菌 O157 : H7 (<i>stx1</i> 、 <i>stx2</i> 陽性)

表 3-2 患者、保菌者発生状況

発生場所	年齢	性別	喫食場所	喫食日	発症日
厚木市	4	男	小田原市C店	5月22日	5月24日
厚木市	3	女	厚木市B店	5月20日	5月23日
大和市	10	女	大和市A店	5月29日	6月1日
大和市	35	男	大和市A店	5月29日	保菌者
大和市	3	女	大和市A店	6月3日	6月9日
厚木市	11	男	厚木市B店	6月6日	6月11日
伊勢原市	73	女	伊勢原市D店	6月7日	6月15日
大和市	8	女	大和市A店	6月3日	保菌者
大和市	6	女	大和市A店	6月3日	保菌者
海老名市	9	女	綾瀬市E店	6月12日	6月16日
茅ヶ崎市	4	男	海老名市F店	6月14日	6月16日
茅ヶ崎市	55	女	海老名市F店	6月14日	保菌者
伊勢原市	3	女	伊勢原市G店	5月30日	6月4日
厚木市	7	男	東京都内	6月7日	6月10日

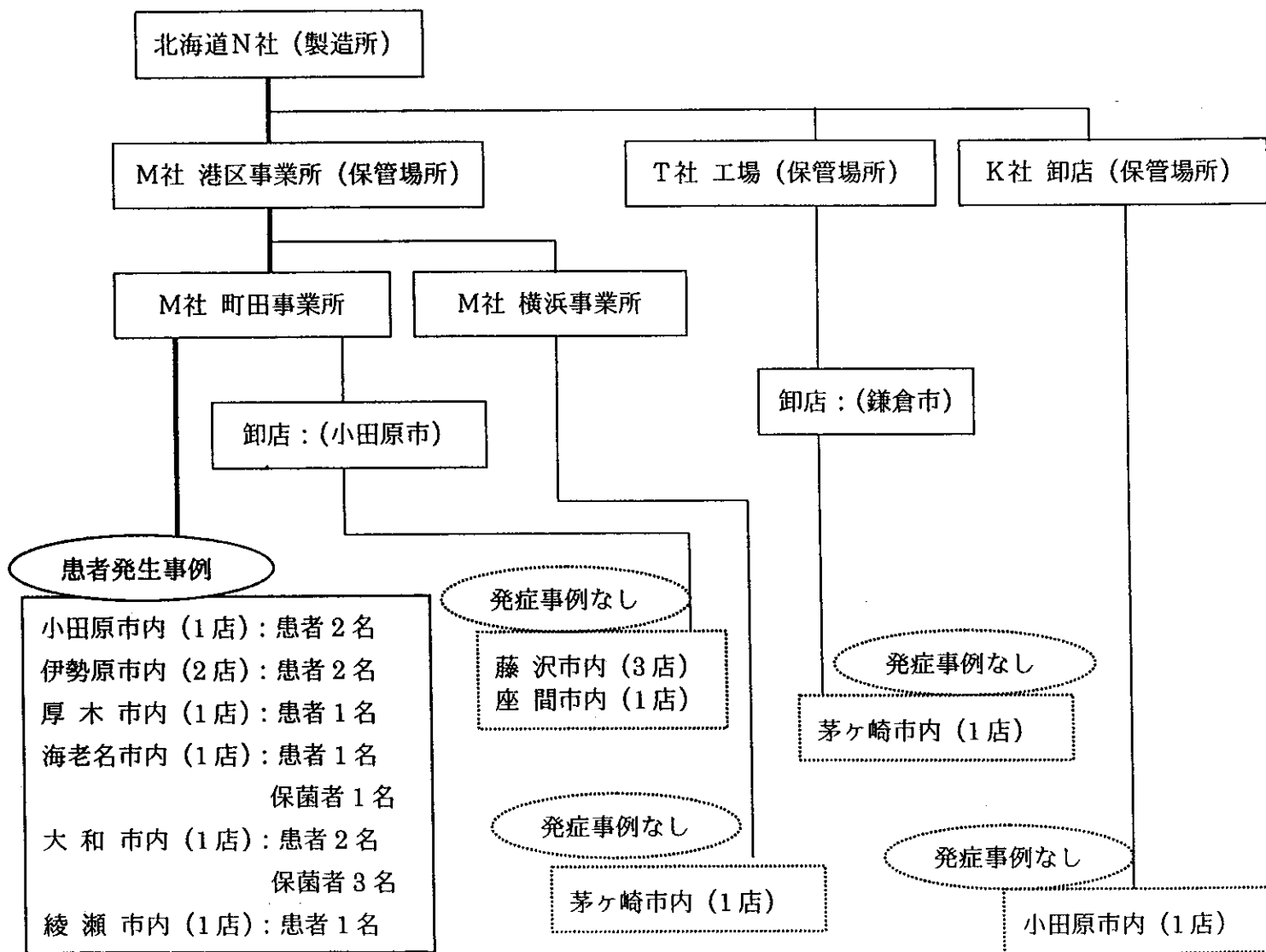
表 3-3 O157 検査成績

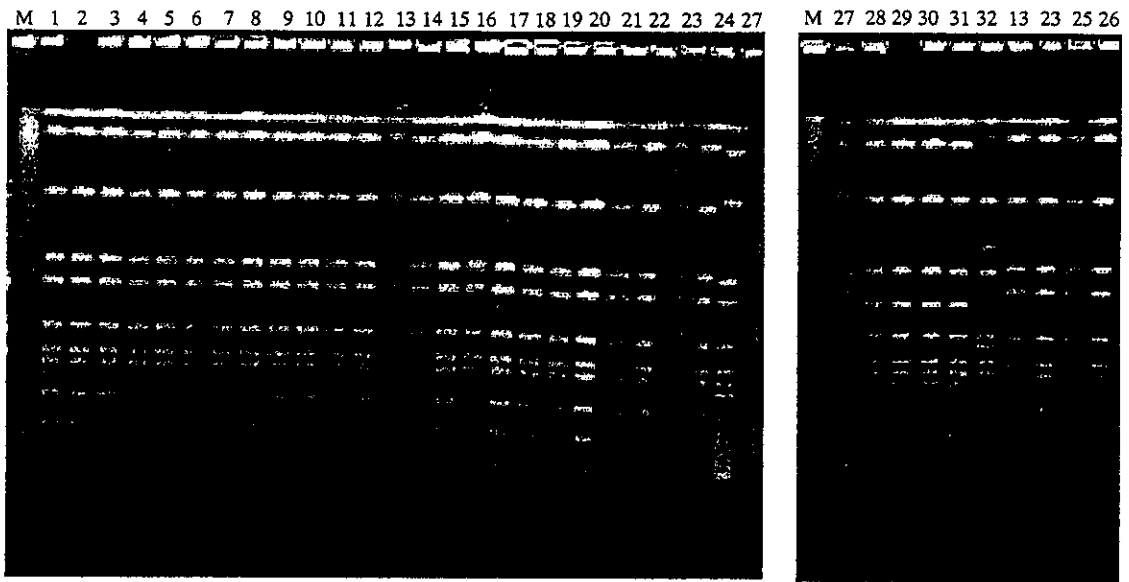
検査材料	検査数	結果
患者および保菌者由来菌株		大腸菌 O157 : H7 (<i>stx1</i> 、 <i>stx2</i>)
便 (寿司店等の従業員)	47	検出せず
N社製イクラ (ロットA)	53	28 検体から大腸菌 O157 : H7 (<i>stx1</i> 、 <i>stx2</i>) 検出
N社製イクラ (ロットA以外)	5	検出せず
N社以外のイクラ	39	検出せず
寿司店等のその他の食材	34	検出せず
施設のふきとり材料	64	検出せず

表 3-4 O157 分離株のファージ型と PFGE パターン

由来	株数	ファージ型	PFGE パターン (<i>Xba</i> I)
イクラ	84	14	パターン A : 82 株、パターン B : 2 株
患者	8	14	パターン A : 7 株、パターン B : 1 株

表 3-5 イクラ流通経路

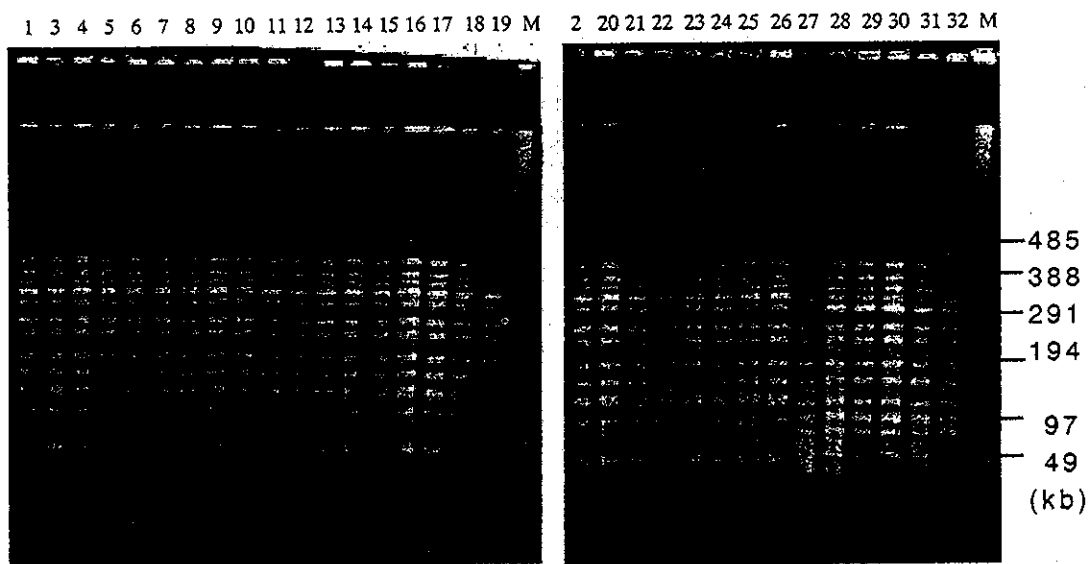




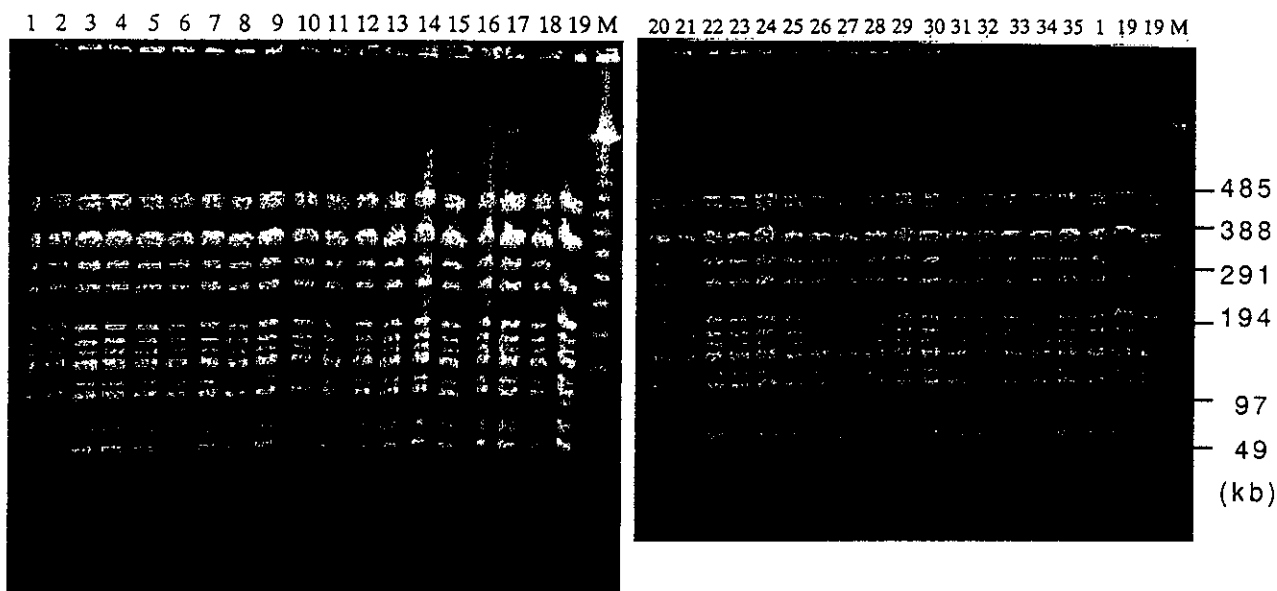
*Salmonella infantis*分離株のBln I切断パターン

レーン	由来	レーン	由来
1	食品	17	患者
2	拭き取り	18	患者
3	拭き取り	19	患者
4	患者	20	患者
5	患者	21	患者
6	患者	22	原因施設従業員(2回目)
7	原因施設従業員	23	原因施設従業員(2回目)
8	原因施設従業員	24	原因施設従業員(2回目)
9	原因施設従業員	25	原因施設従業員(2回目)
10	原因施設従業員	26	原因施設従業員(2回目)
11	患者	27	} その他の事例
12	患者	28	
13	患者	29	
14	患者	30	
15	原因施設関係者	31	
16	患者	32	

図 1-1 *Salmonella infantis* の PFGE パターン



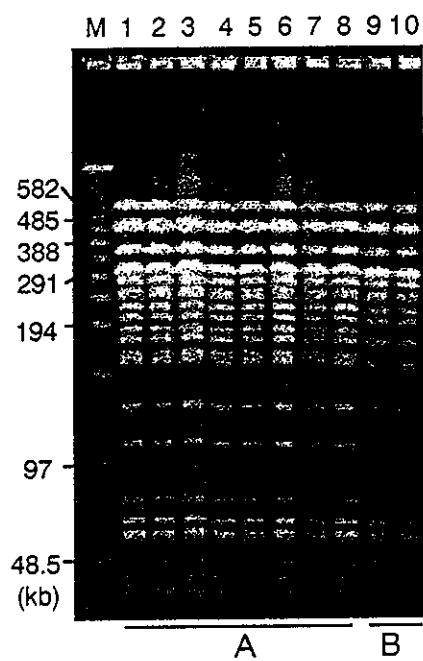
Salmonella Infantis分離株のXbaI切断パターン



Salmonella Enteritidis 分離株の *Bln* I 切断パターン
M: 分子量マーカー

レーン	菌株番号	施設	分離日	PFGEパターン	レーン	菌株番号	施設	分離日	PFGEパターン
1	2499	B幼稚園	11/1	B1	21	2519	B幼稚園	11/2	B1
2	2500	B幼稚園	11/1	B1	22	2520	A幼稚園	11/2	B1
3	2501	B幼稚園	11/2	B1	23	2521	A幼稚園	11/4	B1
4	2502	B幼稚園	11/1	B1	24	2522	A幼稚園	11/4	B1
5	2503	A幼稚園	11/2	B1	25	2523	A幼稚園	11/3	B1
6	2504	A幼稚園	11/2	B1	26	2524	A幼稚園	11/3	B1
7	2505	A幼稚園	11/4	B1	27	2525	B幼稚園	11/3	B1
8	2506	A幼稚園	11/2	B1	28	2526	B幼稚園	11/3	B3
9	2507	A幼稚園	11/3	B1	29	2527	B幼稚園	11/6	B1
10	2508	A幼稚園	11/3	B1	30	2528	B幼稚園	11/6	B1
11	2509	B幼稚園	11/4	B1	31	2529	B幼稚園	11/6	B1
12	2510	B幼稚園	11/4	B1	32	2530	B幼稚園	11/6	B1
13	2511	B幼稚園	11/4	B1	33	2531	B幼稚園	11/6	B1
14	2512	B幼稚園	11/3	B1	34	2532	B幼稚園	11/6	B3
15	2513	B幼稚園	11/4	B1	35	2533	B幼稚園	11/6	B4
16	2514	B幼稚園	11/6	B1					
17	2515	B幼稚園	11/6	B1					
18	2516	B幼稚園	11/6	B1					
19	2517	A幼稚園	11/6	B2					
20	2518	B幼稚園	11/2	B1					

図 2-1 *Salmonella* Enteritidis の PFGE パターン



レーン1および10、イクラ由来株；レーン2～9、患者由来株。
 レーン下のAおよびBはパターン名を示す。

図3-1 腸管出血性大腸菌O157のPFGEパターン

分担研究報告書

腸管出血性大腸菌0157:H7のAFLP法を用いたDNA型別に関する研究

分担研究者：渡邊 治雄 国立感染症研究所・細菌部
(協力研究者：伊豫田 淳 国立感染症研究所・細菌部)

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (EHEC)0157:H7の高精度なDNA型別法を確立する目的で、近年種々の生物において DNA 型別に成果を上げている AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)法を試みた。Perkin Elmer Applied Biosystems社の AFLP Microbial Fingerprintingキットを用いて、EHEC 0157のDNA型別に最も適すると考えられるプライマーの組み合わせを検討した後、1996年に日本各地で単離された菌株を解析し、PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) で得られた結果と比較した。その結果、PFGEによって型別された6つのタイプ (タイプ I -VI) のうち、5つ (タイプ I-V) がAFLPによって型別可能であることが判明した。PFGEタイプIのサブタイプ Ia, Ib, Icは、AFLPによって型別可能なものとそうでないものが存在する一方、PFGEでは同一のサブタイプに分類されるが、AFLPでは独立した型に分類される例が存在した。PFGEタイプIIのサブタイプIIa, IId, IIjについては、AFLPにおいても、いずれも異なる型に分類されることが判明した。以上の結果は、PFGEによる解析結果がAFLPによっても同程度に確認できることを示しており、PFGEよりも詳細な型別が可能であった例が存在したことは、AFLPを用いたEHEC0157のより詳細なDNA型別の可能性を示すものと考えられる。

A. 研究目的

我々の研究グループでは、1996年以來の腸管出血性大腸菌 (EHEC)0157の発生事例に対して、PFGEを用いたDNA型別によって菌株相互間の相同性について解析を行ってきた。PFGEは0157のDNA型別に優れた解析能力を持つことから多くの実験室で用いられているが、実験室間での標準化が難しく、異なるゲル上で得られた結果を相互比較するのは非常に困難である。そこで本研究では、迅速かつ標準化が容易なDNA型別法を開発する目的で、近年細菌を含めた種々の生物においてDNA型別の解析に成果を上げているAFLP法を0157のDNA型別に応用し、その有用性について検討することにした。

B. 研究方法

AFLP法は次の4ステップ、すなわち、1) 2種類の制限酵素 (本研究では*EcoRI*と*MseI*) によるゲノムDNAの切断、2) 制限酵素切断部位に相補的なプライマーを用いたPCR反応、3) 2)で得られたPCR産物に対して、制限酵素切断部位に相補的なプライマーの3'末端側に塩基を付加したプライマー (1塩基から3塩基まで：*EcoRI*+NNN / *MseI*+NNN) を用いた選択的PCR反応、4) 得られたPCR産物のサイズ解析、からなる。本研究では、Perkin Elmer Applied Biosystems社のAFLP Microbial Fingerprintingキットを用い、PCR産物のサイズの解析には、同社の377DNAシーク

エンサーを用いた。腸管出血性大腸菌0157のDNA型別に最も適すると考えられるプライマーの組み合わせをキットに含まれるプライマーセットの中から検討した後、1996年に日本各地で単離された菌株（計46株、表1）について解析を行い、PFGE（Pulsed-Field Gel Electrophoresis）による解析結果と比較することで、その有用性について検討した。

C. 研究結果

1. 解析に用いるプライマーセットの選定

1996年に単離された0157株のうち、同じ集団発生から単離され、PFGE型が同じであった2つの菌株と、異なる集団発生から単離され、これら2つのの株とは異なるPFGEのパターンを持つ1株（計3株）を用い、解析に最も適するプライマーの選定を行った。AFLPによる解析で、同じ集団発生から単離された2つの菌株間では同じパターンを示し、異なる集団発生から得られた1つの菌株とは異なるパターンを示すプライマーを選択したところ、*EcoRI*+A / *MseI*+Cのプライマーセットが解析に最も適していることが判明した。

2. EHEC 0157株の解析

1. で得られたプライマーセットを用いて、表1に示した菌株を解析した。AFLPの反応によって総計58-62本のPCR産物が得られた。このうち、多型性を示したバンド（共通に存在しないもの）は10本で、その有無を表2にまとめた。PFGEによる解析で型別されたタイプI-VIのうち、タイプIからVまでがAFLPによっても解析可能であることが判明した。PFGEによる解析でわずかな違いを示したタイプIのサブタイプIa, Ib, Icについては、AFLPでは区別できないものがある一方で、PFGEサブタイプIbについては、AFLPによってさらに2つに型別可能なことが判明した。また、PFGEタイプIIのサブタイプIIa, IIc, IIjは、いずれもAFLPによって同様に型別可能であることが判明した。

3. 0157以外の血清型を持つEHEC株の解析

0157以外の血清型を持つEHEC株のうち、026:H11を2株、0114:H19と0119:NT (Non typable)それぞれ1株をAFLPによって解析した（表3）。その結果、異なる血清型間では多型性が大きいことが判明した一方で、026:H11株間では、0157:H7株間での場合と同様に、多型性は低いことが判明した。

D. 考察

本研究から、AFLPによってPFGEと同程度のDNA型別が可能であることが判明した。本キットを用いたAFLPでは、PCR産物のサイズはDNAオートシーケンサーで解析できることから、解析結果を標準化することは容易である。しかし、解析に要する時間は現在のところPFGEとほとんど変わらないため、今後解析時間を短縮するためのプロトコルの改善が必要である。また、本研究で用いたプライマーセットでは、同じ血清型間では多型度が低いため、今後より解析能のあるプライマーセット（用いる制限酵素の選択）の開発が望まれる。

E. 結論

AFLP法はEHEC 0157:H7のDNA型別に関してPFGE法と同程度の解析能を有することが判明した。今後、解析に適したプライマーの開発が進めば、実験室間で標準化が可能な高精度なDNA型別法として用いられることが期待される。

表 1. AFLP and PFGE subtype of EHEC O157:H7 isolates

Origin	Date	No. ^a	PFGE	AFLP
Human isolates				
Hiroshima	Jun-1996	2	Ia	A
Fukuoka	Jun-1996	1	Ia	A
Gifu	Jun-1996	2	Ib	A
Okayama (Oku)	May-1996	2	Ic	A
Okayama (Niimi)	Jun-1996	2	Ib	A
Aichi	Jun-1996	1	Ib	A
Osaka (Kawachinagano)	Jun-1996	2	Ib	B
Osaka (Sakai)	Jul-1996	4	IIa	C
Wakayama (Hashimoto)	Jul-1996	2	IIa	C
Wakayama (Gobo I)	Jul-1996	2	IIa	C
Wakayama (Gobo II)	Aug-1996	1	IIa	C
Wakayama (Kushimoto)	Jul-1996	2	IIa	C
Kyoto ^b	Jul-1996	1	IIa	C
Tokyo	Jun-1996	3	IIId	D
Iwate	Sep-1996	5	IIj	E
Gunma	Jun-1996	2	IV	F
Saga	Apr-1996	2	IV	F
Hokkaido	Aug-1996	3	VI	F
Kanagawa ^b	Jun-1996	1	V	G
Non-human isolates				
Kanagawa		3	V	G
Okinawa		3	IIIb	H

^a, Number of isolates tested in this study

^b, Sporadic case

表 2. Pattern of the polymorphic band observed among AFLP subtype ^a

Polymorphic band(bp)	AFLP subtype (total bands appeared)							
	A(61)	B(61)	C(62)	D(60)	E(62)	F(58)	G(59)	H(59)
47	+	+	+	+	+	-	-	-
71	-	-	+	-	+	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	+	-
79	-	-	-	-	-	-	-	+
135	+	+	+	+	+	+	+	+
147	+	+	+	+	+	-	-	-
174	+	-	-	-	-	+	+	-
177	-	+	+	+	-	-	-	+
399	-	-	-	-	+	-	-	-
449	+	+	+	-	+	-	-	-

^a,The symbol + and - indicate presence and absence of each polymorphic band, respectively.

