

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
平成 16 年度分担研究報告書

腸管出血性大腸菌 O157 による家族内感染事例の PFGE 解析  
－異なった PFGE 型が検出された 1 事例について－

協力研究者	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所	細菌課
	松根 渉	大阪府立公衆衛生研究所	細菌課
	塚本定三	大阪府立公衆衛生研究所	細菌課
分担研究者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所	細菌課

#### 研究要旨

2004 年 8 月に大阪府内の親類関係の 3 家族 11 人が焼肉店で会食をし、その後 5 人の腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 感染が判明した。初発患者以外の 4 人は無症状であり、感染の時期が不明であったため、PFGE 型別を行って感染源を推察した。5 人由来の 24 株は 4 つの PFGE 型に型別され、2 人からは複数の型が検出されたことなどから、人から人への二次感染ではなく、焼肉店で提供された、複数の型の EHEC O157 に汚染された食品の摂取が感染原因であったと考えられた。

#### A. 研究目的

2004 年 8 月に大阪府内の親類関係の 3 家族 11 人が焼肉店で会食をし、その後 5 人の EHEC O157 感染が判明した。そこで 5 人の感染源を解明する目的で、分離された菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）解析を行った。

事件の概要：8 歳の女兒が 2004 年 8 月 26 日に腹痛、27 日に下痢、血便、嘔気を呈したため 28 日に大阪府内の医療機関に入院した。29 日に採取した糞便から EHEC O157 を検出したとの報告が保健所にあり、喫食調査の結果 3 家族 11 人で 8 月 22 日に焼肉店で会食していた事がわかった。それらの家族の糞便検査で無症状の患者の兄（9 歳）、弟（4 歳）、祖父（71 歳）、いとこ（7 歳）から EHEC O157 が検出された。

#### B. 研究方法

初発患者（感染者 No.1）由来 1 株、兄（感染者 No.2）由来 5 株、弟（感染者 No.3）由来 5 株、祖父（感染者 No.4）由来 6 株、いとこ（感染者 No.5）由来 7 株の合計 24 株を供試菌株とした。

血清型別と生化学的性状の確認は常法にしたがって行い、毒素（Stx）型別は PCR 法と VTEC-RPLA キット（デンカ生研）で実施した。薬剤感受性試験は ABPC、SM、TC、KM、CP、ST、GM、NA、FOM、CTX、CPFEX、OFLX の 12 薬剤についてセンシティブディスク（BBL）を用いて KB 法で行った。

PFGE 法は供試菌株 DNA を制限酵素 *Xba*I または *Bln*I で 37°C 2 時間消化後、CHEF DRIII（Bio-Rad）を使用し、1%アガロースで電圧 6V/cm、スイッチタイム 22.2

-54.2 秒で 19 時間電気泳動を行った。

電気泳動像の解析には FingerprintingII バージョン 3 (Bio-Rad) を用い、比較の設定は類似係数 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%で行い、近似度 90%で型別を行った。

### C. 研究結果と考察

24 株の血清型はすべて O157:H7 であり、薬剤感受性試験もすべて感受性であった。Stx 型は感染者 No.1、2、3、5 では 1&2 型であったが、No.4 では 1&2 型と 2 型が同時に検出された (表 1)。

PFGE のパターンを FingerprintingII を用いて解析した結果は、*Xba*I の型別では、感染者 No.1、2、4 が Xa、No.2 と 5 が Xb、No.3 が Xc、No.4 の Stx2 型株が Xd と型別された。*Bln*I の型別では、No.1、2、4、5 が Ba、No.3 が Bb、No.4 の Stx2 型株が Bc と型別された (図 1、図 2、表 1)。

本事例では初発患者以外は無症状であり、感染の時期が不明であった。そして感染者 No.4 は No.1 の感染判明後 No.2 と No.3 を自宅に預かって世話をしており、二次感染の可能性が考えられた。しかし、PFGE 解析ですべての分離株が同じ型にならなかったことから二次感染ではなかったと考えられた。

すなわち、感染者 No.2 からは No.1 と同じ PFGE 型別 Xa・Ba 型菌株の他に No.5 と同じ Xb・Ba 型菌株が検出されており、感染者 No.2 と No.5 の共通食は 8 月 22 日の焼肉店の食事だけであったことから、両者の感染源は焼肉店の食事が考えられた。また、No.3 からは他の人と異なる型が検出さ

れたことと、No.4 から検出された Stx2 型の菌株は他の人から検出されなかったことから、人から人への二次感染ではなく、焼肉店で提供された、複数の型の EHEC O157:H7 に汚染された食品の摂取が感染原因であったと考えられた。

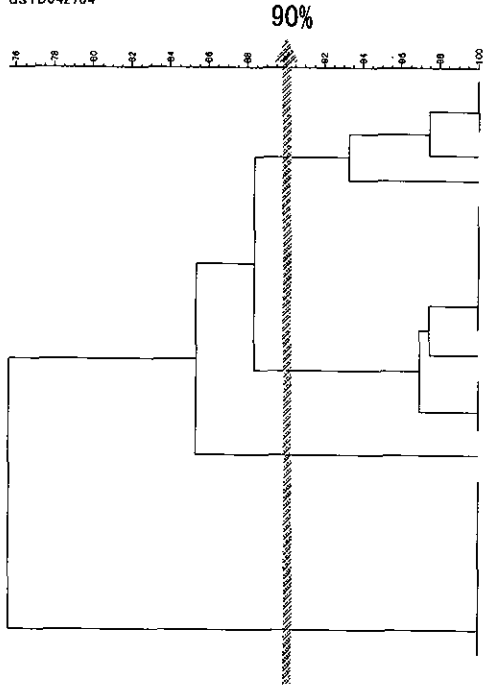
### D. 結論

PFGE 型別を行って家族内感染事例の感染源を推察した。接触者検便を実施した保健所の検査室で複数の EHEC O157 を分離し、当所で一人につき 5 株以上を解析に供することができたため、感染原因の推定が可能であった。本事例では原因食品の検査は行われなかったが、様々な型の菌で食品が汚染されていた場合、患者から分離される菌型は、食品中での分布を反映して様々な型になると予想されることから、複数株を分離して解析することが、原因究明に役立つと考えられる。

### E. 研究発表

なし

Dice (Tot 1.25-1.25) (H0 0.05 S>0.05) [0.05-1.00.05]  
 GSTD042704

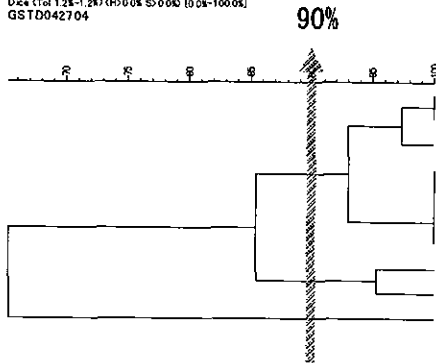


GSTD042704

菌株No	Stx	PFGE型
3-2	1&2	Xc
3-3	1&2	Xc
3-4	1&2	Xc
3-1	1&2	Xc
3-5	1&2	Xc
5-2	1&2	Xb
5-3	1&2	Xb
5-4	1&2	Xb
5-5	1&2	Xb
5-1	1&2	Xb
5-6	1&2	Xb
5-7	1&2	Xb
2-2	1&2	Xb
2-4	1&2	Xb
2-5	1&2	Xb
4-6	2	Xd
2-1	1&2	Xa
4-1	1&2	Xa
2-3	1&2	Xa
1	1&2	Xa
4-2	1&2	Xa
4-3	1&2	Xa
4-4	1&2	Xa
4-5	1&2	Xa

図1 24株のデンドログラム (制限酵素 *Xba*I)

Dice (Tot 1.25-1.25) (H0 0.05 S>0.05) [0.05-1.00.05]  
 GSTD042704



GSTD042704

菌株No	Stx	PFGE型
1	1&2	Ba
2-1	1&2	Ba
4-1	1&2	Ba
2-2	1&2	Ba
5-1	1&2	Ba
5-6	1&2	Ba
5-7	1&2	Ba
3-1	1&2	Bb
3-5	1&2	Bb
4-6	2	Bc

図2 10株のデンドログラム (制限酵素 *Bln*I)

表1 5人由来24株のStx型とPFGE型

感染者	性別	年齢	関係	発病日	検体採取日	菌株No.	Stx型	PFGE型	
								XbaI	BlnI
No.1	F	8	初発患者	8月26日	8月29日	1	1&2	Xa	Ba
No.2	M	9	1の兄	無症状	8月31日	2-1	1&2	Xa	Ba
						2-2		Xb	Ba
						2-3		Xa	実施せず
						2-4		Xb	実施せず
						2-5		Xb	実施せず
No.3	M	4	1の弟	無症状	8月31日	3-1	1&2	Xc	Bb
						3-2		Xc	実施せず
						3-3		Xc	実施せず
						3-4		Xc	実施せず
						3-5		Xc	Bb
No.4	M	71	1の祖父	無症状	9月4日	4-1	1&2	Xa	Ba
						4-2		Xa	実施せず
						4-3		Xa	実施せず
						4-4		Xa	実施せず
						4-5		Xa	実施せず
						4-6	2	Xd	Bc
No.5	F	7	1のいとこ	無症状	9月3日	5-1	1&2	Xb	Ba
						5-2		Xb	実施せず
						5-3		Xb	実施せず
						5-4		Xb	実施せず
						5-5		Xb	実施せず
					9月7日	5-6	1&2	Xb	Ba
					9月10日	5-7	1&2	Xb	Ba

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

平成 16 年度分担研究報告書

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究

分担研究者	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
研究協力者	榊美代子 妹尾正登	広島県保健環境センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	角森よしえ	島根県保健環境科学研究所
	最首信和	鳥取県衛生環境研究所
	吉田紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
	絹田美苗 谷脇 妙	高知県衛生研究所
	谷 好史	徳島県保健環境センター
	河本秀一 古田喜美	広島市衛生研究所

研究要旨

食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究の一環として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）の標準化と PFGE により解析された画像を基盤とした分散型情報システム（パスネット）構築のため、昨年度に引続き、検査施設間における PFGE 技術の精度管理を行った。精度管理には中・四国地区の地方衛生研究所(地研) 9 施設が参加し、PFGE タイプの異なる腸管出血性大腸菌 O157 (O157) 4 株を供試菌株として、新しいのプロトコールによる PFGE を実施した。さらに、異なった 2 つの集菌方法による PFGE 画像の影響についても比較・検討を加えた。

精度管理の結果、概ね良好な画像が得られたが、3 施設の作成した画像の一部に不鮮明な個所が認められた。また、画像解析ソフトによるクラスター解析で施設間の差異を確認したところ、O157 の 4 株はそれぞれ異なるクラスターを形成（近以性 55～100%）したが、不鮮明な画像のクラスターは低い値（近以性 55%）であった。今後、良好な画像を得るため、PFGE の技術的問題点の改善が必要と思われた。

A. 研究目的

平成 12 年度から中・四国地区の各地研がパスネット構築の基礎的資料を得るため、PFGE 解析の有効性と技術的問題点について共同研究を行ってきた。その結果、PFGE 解析は細菌性食中毒や感染症の疫学調査に有効な手段となることが明らかとなった反面、パスネットを構築し円滑に運用するには、

PFGE の標準化と精度管理の必要性が示唆された。今回の精度管理では、昨年度に引続き、中・四国地区の各地研が米国 CDC のプロトコールをもとに感染研が新たに作成した PFGE のプロトコール(感染研ニュープロトコール)により、O157 について PFGE を行い、技術的問題点を指摘・改善していくことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 参加施設

広島県保健環境センター、岡山県環境保健センター、島根県保健環境科学研究所、鳥取県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研究所、香川県環境保健研究センター、高知県衛生研究所、徳島県保健環境センター、広島市衛生研究所

### 2. 供試菌株

供試菌株として国立感染症研究所から分与を受けた腸管出血性大腸菌 O157:H7 の 4 株を使用した。

腸管出血性大腸菌 O157:H7

- ・菌株番号 1 (感染研番号 021533 II a II a I)
- ・菌株番号 2 (感染研番号 020095 III a ND III)
- ・菌株番号 3 (感染研番号 020021 VII ND III)
- ・菌株番号 4 (感染研番号 020049 Va ND ND)

### 3. PFGE

方法は感染研ニュープロトコールに準拠した。詳細は次のとおりである。

#### 1) 菌株の菌量調整とアガロースブロック包埋

菌株は 2 通りの集菌方法を試み、比較した。ブイヨンからの集菌方法としてトリプトソイブイヨン 3ml に 35~37°C、16~18 時間静置培養した菌液 200  $\mu$ l を 1.5ml のマイクロチューブに移し、12,000rpm で 2 分間遠心した。遠心後、上清を除去、沈渣に滅菌蒸留水 200  $\mu$ l を加え、懸濁した。この懸濁液にプレート法と同様、200  $\mu$ l の 1% Seakem Gold Agarose を加え、その混合液を plug mold で固化させた (ブイヨン法)。一方、プレートからの集菌方法として、35~37°C で 16~18 時間培養したトリプトソイ寒天平板上の菌苔をプラスチックエーゼでかき取り、滅菌蒸留水に懸濁後 OD を 0.5 (610nm) に調整した。分光光度計が使用できない施設はマファーランドの濁度計を目安に調整した。(OD0.5 はマファーランド 5 に相当することを予め確認

した。) この懸濁液 200  $\mu$ l に等量の 1% Seakem Gold Agarose (Cambrex) を加えて混ぜ、その混合液を Sample Plug Caster、0.7mm (Bio-Rad) へ流し込み、室温で 10~15 分間 (4°C で 5 分間) 固化させた (プレート法)。

#### 2) 菌体処理 (Proteinase K)

固まったプラグを 1 mg/ml Proteinase K, (Roche) 1% N-Lauroylsarcosine (Sigma) in 0.5M EDTA, pH8.0 溶液 1 ml の入ったチューブに移し、50°C で 2 時間、振盪培養した。

#### 3) 制限酵素処理 (前処理)

アガロースブロックを取り出し、泳動時用の大きさ (4 mm  $\times$  4 mm) にカットした。この断片を 4 mM Pefabloc SC (AEBSF) (Roche) in TE 1 ml の入ったマイクロチューブに移し、50°C で 20 分間の洗浄を 2 回行った。さらに、バッファーを TE (1 ml/sample) に替え、氷上で 20 分以上平衡化した。

#### 4) 制限酵素処理 (バッファーによる平衡化)

TE buffer を抜き取り、酵素処理のための H buffer (200  $\mu$ l/sample) 加え、氷上で 20 分間培養した。

#### 5) 制限酵素処理 (消化反応)

100  $\mu$ l の制限酵素 *Xba* I (Roche) を含むバッファー (30 units/sample) に置き換え、37°C で一昼夜、振盪培養を行った。酵素処理の終わったサンプルには、0.5 倍の TBE buffer を 400  $\mu$ l 加え反応を停止した。

#### 6) コムへの貼り付け

プラグをコムの泳動方向面に静置、5~10 分間乾燥させた後、ゲル作製台にセットし、55~60°C に保温した 1% SeaKem Gold Agarose (0.5 倍の TBE buffer で溶解) 100ml を流し込み、泳動用アガロースゲルを作製した。

#### 7) 泳動槽の設定・泳動条件

予め 4°C に保存しておいた 0.5 倍の TBE buffer 2 リットルを水平に設定した泳動槽に

加えた後、泳動用ゲルを泳動槽に配置した。泳動条件は、6.0V/cm、2.2-54.2 s、19 時間、バッファー温度は 14°C に設定した。

#### 8) ゲルの染色・写真撮影

泳動後のゲルを 0.2 μg/ml Ethidium bromide 水溶液で 30 分間染色、染色後、蒸留水で 30 分間脱色し、Transilluminator 上でポラロイドカメラにて撮影した（1 施設は CCD カメラで撮影）。

#### 4. 画像解析

各施設で写真撮影された画像を電子メールまたは郵送で愛媛県立衛生環境研究所に集め画像解析ソフト（Fingerprinting II、Bio-Rad）を用いてクラスター解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 各施設の PFGE 画像の比較

今回、9 施設（A～I 施設）が統一方法で作製した O157 の PFGE 画像（図 1～9）は概ね良好で、画像を比較することができた。しかし、3 施設（A、D、F 施設）の作成した画像の一部に不鮮明な個所が認められた。A 施設の画像はスメアー状でバンドが薄く、バンドの存在を認識し難く、泳動の流れも不規則であった。これは菌体の処理法の不具合、泳動の不良によるものと推察された。D および F 施設の画像では、泳動されたバンドが存在しているにもかかわらず、画像全体が黒くなり、バンドが認識し難い状態であった。これは写真撮影時の技術的な問題によるものと思われる。一方、画像を CCD カメラで撮影した H 施設の画像（図 8）は他施設の画像と比べ粗く感じられた。

#### 2. 各施設間の画像解析

画像をもとに画像解析ソフトでデンドログラム（図 10、図 11）を作成し、各施設間の差異を確認した結果、同一菌株は同じクラスターを形成し、その類似度は概ね 100～95%

であった。集菌方法を異にした場合でも同様な傾向を示し、鮮明な画像が作成できた施設間での差異は小さい値であった。しかし、前述した A、D、F 施設の不明瞭な画像では類似度が 55%、80%、90% と同一のクラスターからの差異が見られた。

#### 3. 集菌方法の違いによる画像の比較

2 種類の集菌方法で行った PFGE の画像を比較したところ、各施設とも比較的高い類似度（95～100%）で、同様なクラスターを示し、集菌方法の違いによる画像の差異見られなかった。しかし、A、F 施設の一部の菌株では 85%、90% と解析結果に差異が生じる傾向を示した。（図 12～19）

### D. 考察

現在、中・四国地区の 10 地研では感染研ニュープロトコールに準拠して PFGE を実施しているが、パルスネットを構築し、diffuse outbreak の早期発見に成果を上げるには各施設の検査技術の維持が必要であり、精度管理は不可欠である。今年度は昨年度不参加の 2 施設（D 施設、F 施設）も精度管理に加わった。精度管理の結果、各施設間で比較しうる画像が得られたため、中・四国地区の地研では新しいプロトコールによる PFGE 技術が概ね取得されたと考えられる。しかし、3 施設の作成した画像の一部に不鮮明な個所が認められ、クラスター解析で施設間の差異を生ずる原因となった。A 施設ではその画像から試料の作製課程の再確認と泳動条件の改善等が必要と思われた。また、D 施設、F 施設の画像はコントラストが低く、分子量の小さなバンドが認識されない傾向が見られた。これは写真撮影時の技術的な問題によるものと思われたが、今回の精度管理では写真撮影時の統一した条件を示していない。今後、写真撮影時にはコントラストの高い鮮明な画像

が得られるように撮影技術の標準化が必要と考える。

一方、集菌方法の違いによる画像の比較では、画像に大きな差異は見られなかった。昨年度の精度管理ではプレートからの集菌方法では、菌量を客観的な方法で測定しなかったため、ブイヨンからの集菌方法に比べ濃度が濃くなる傾向が見られ、解析画像に影響する要因となった。今回、プレートから集菌した懸濁液の濃度をODで一定に調整することで、この点を改善することができた。

#### E. 結論

中・四国地区の9地研で、感染感染研ニュープロトコールによるPFGEを行い、精度管理を実施したところ、概ね良好なPFGE画像を得ることができた。しかし、パルスネットを構築するためには、いくつかの技術的問題点も認められた。今後、これらの問題点の改善と更なるPFGE解析手法の標準化を推進し、各施設のPFGE技術を向上することが必要と思われた。

#### F. 研究発表

なし



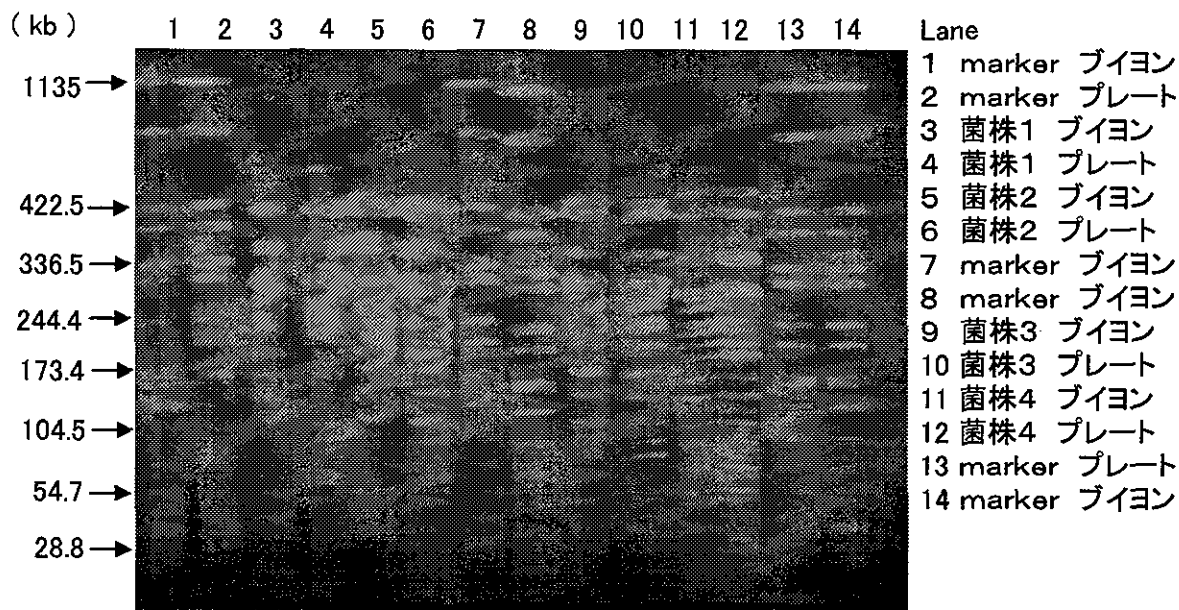


図 1 A施設のPFGE画像

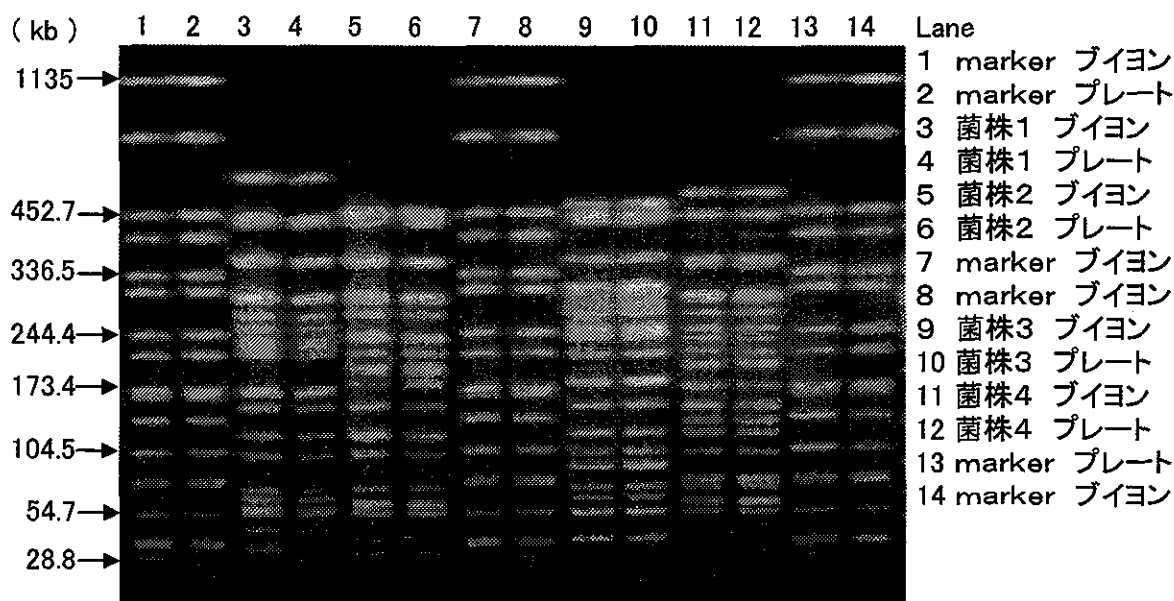


図 2 B施設のPFGE画像

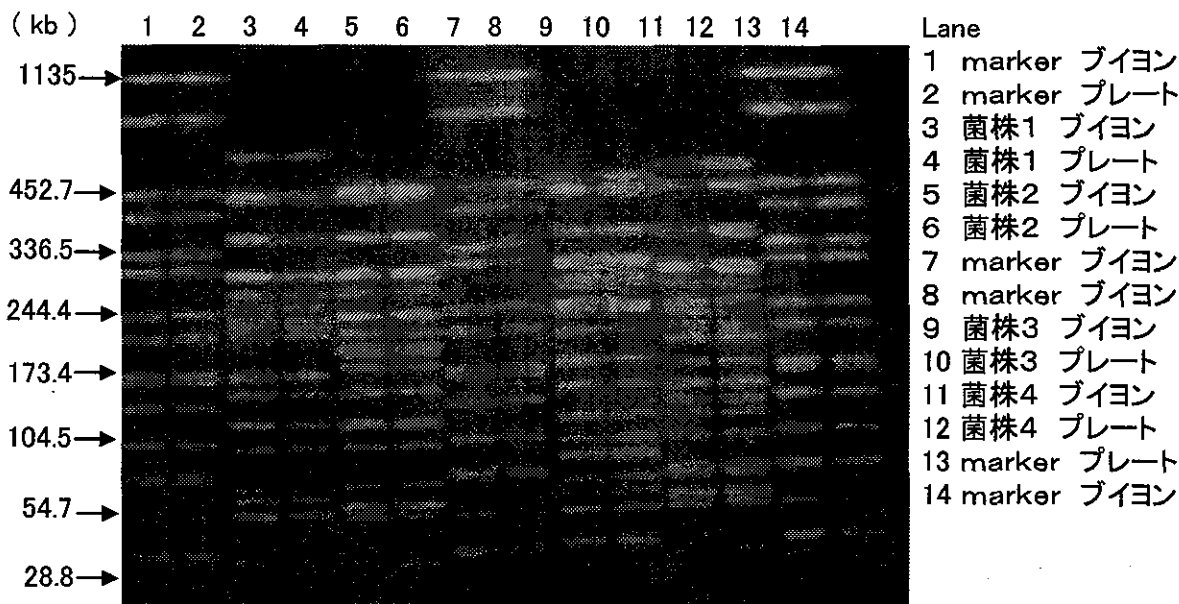


図 3 C施設のPFGE画像

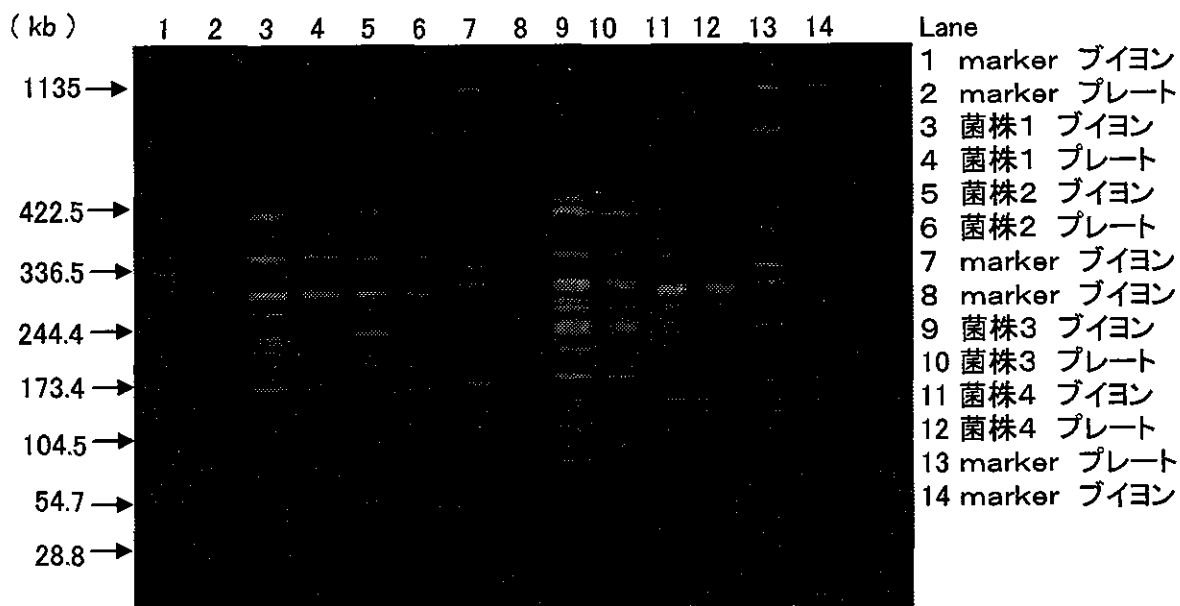


図4 D施設のPFGE画像

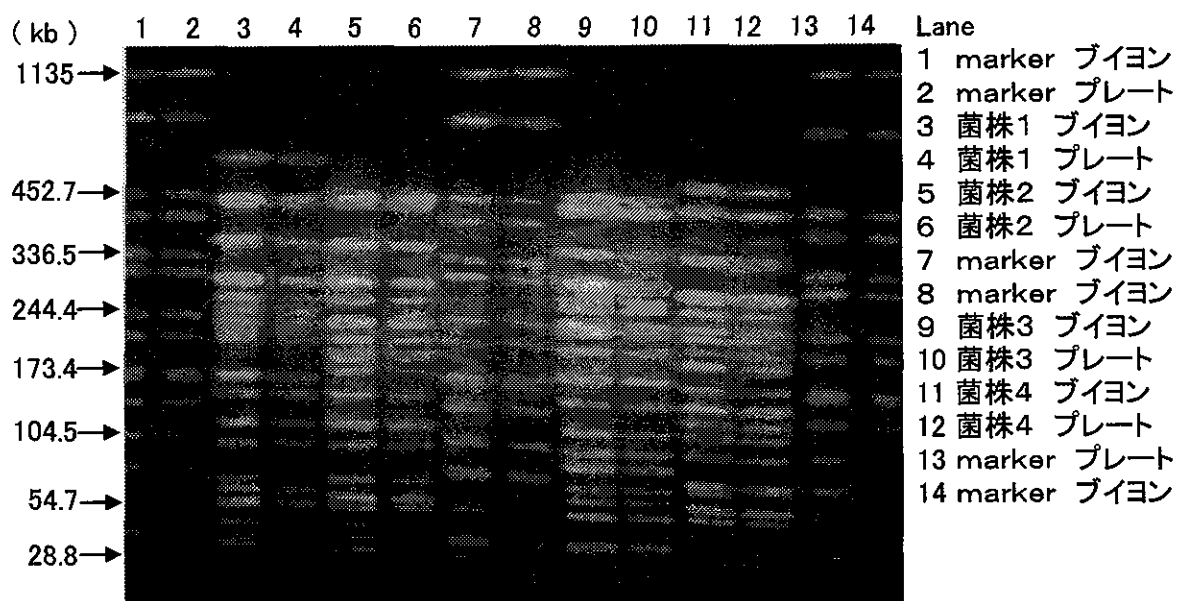


図5 E施設のPFGE画像

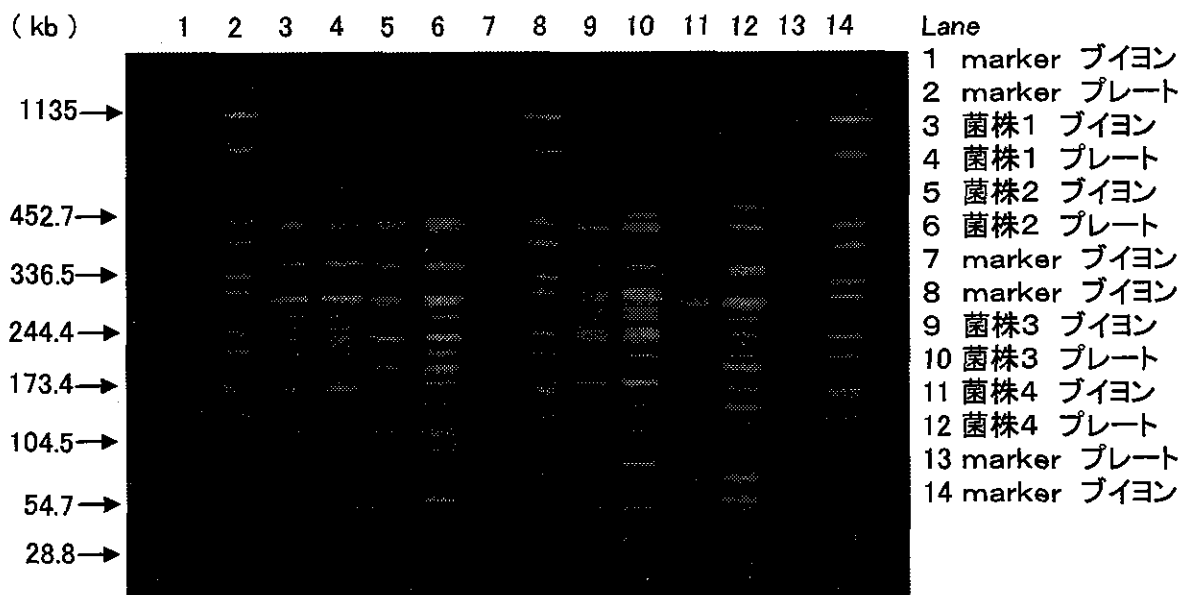


図6 F施設のPFGE画像

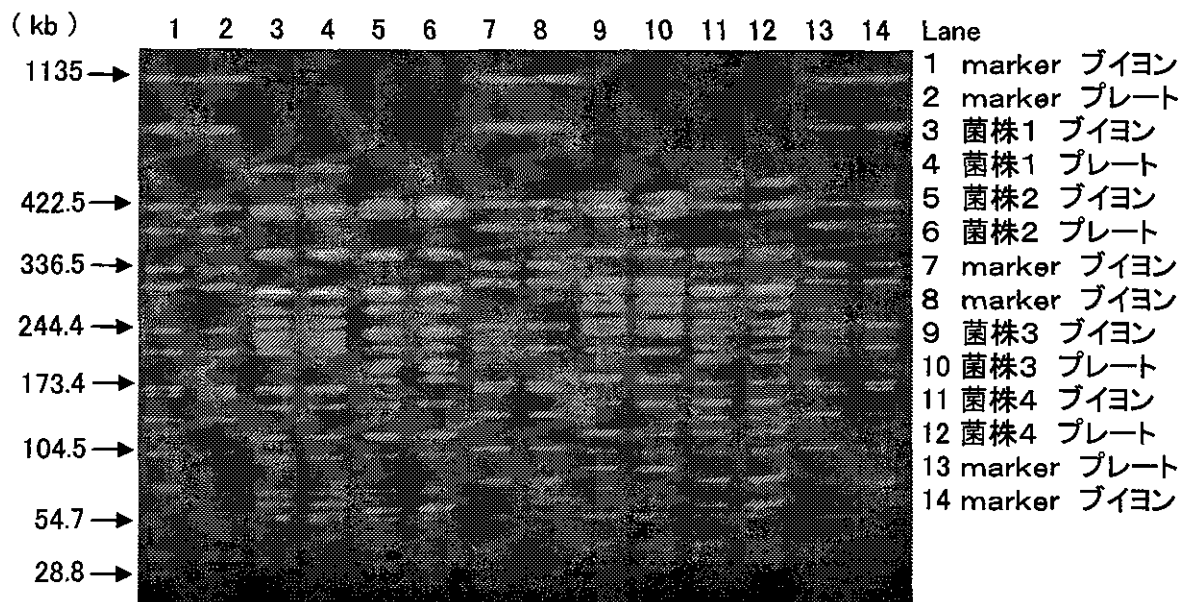


図 7 G施設のPFGE画像

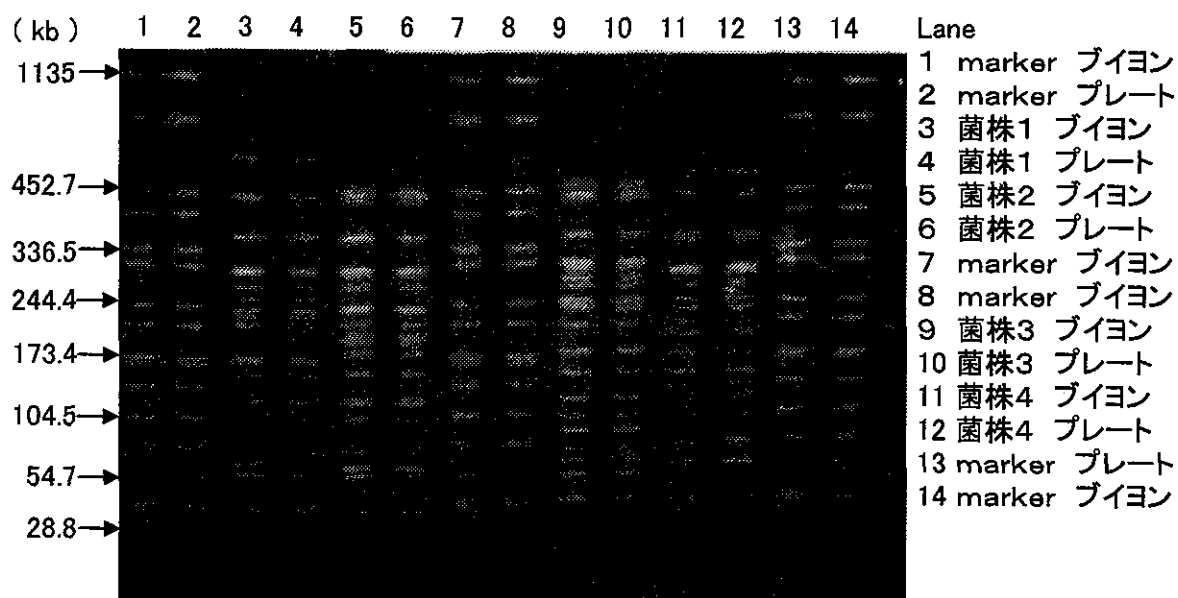


図 8 H施設のPFGE画像

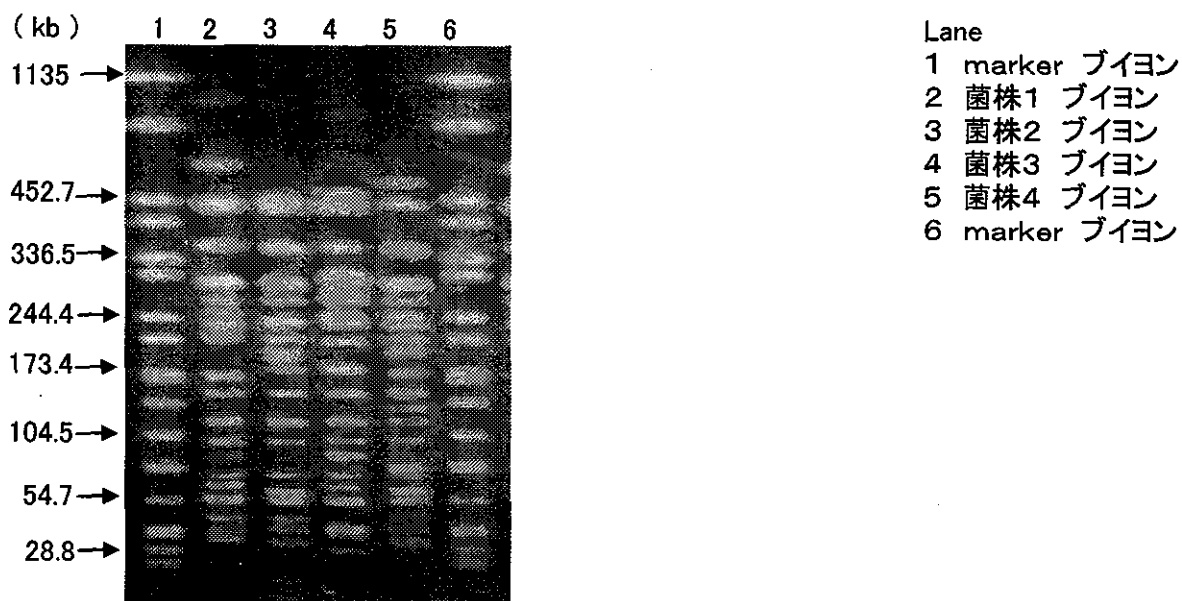


図 9 I施設のPFGE画像

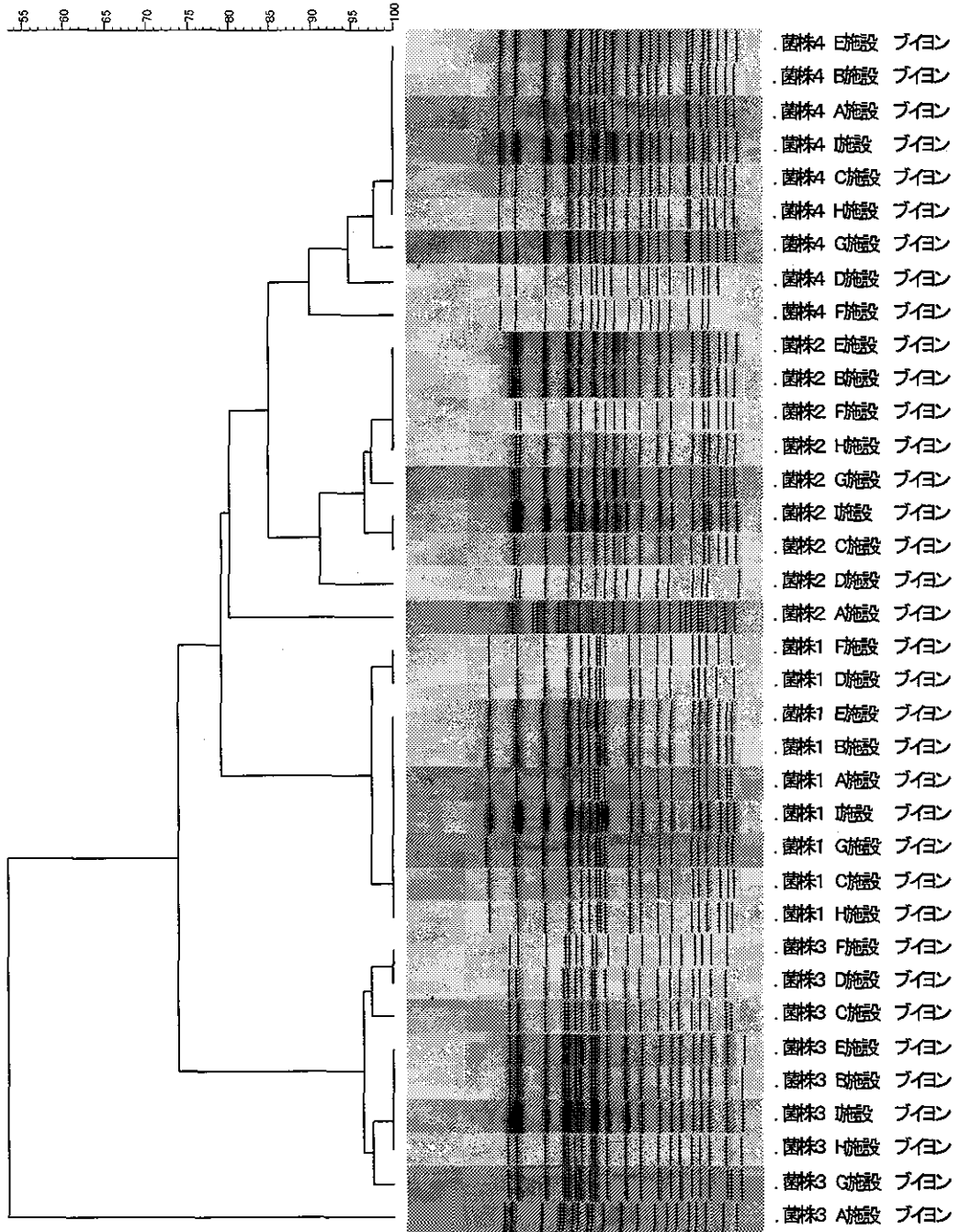


図 10 各施設間の O157 (プイオン) デンドログラム

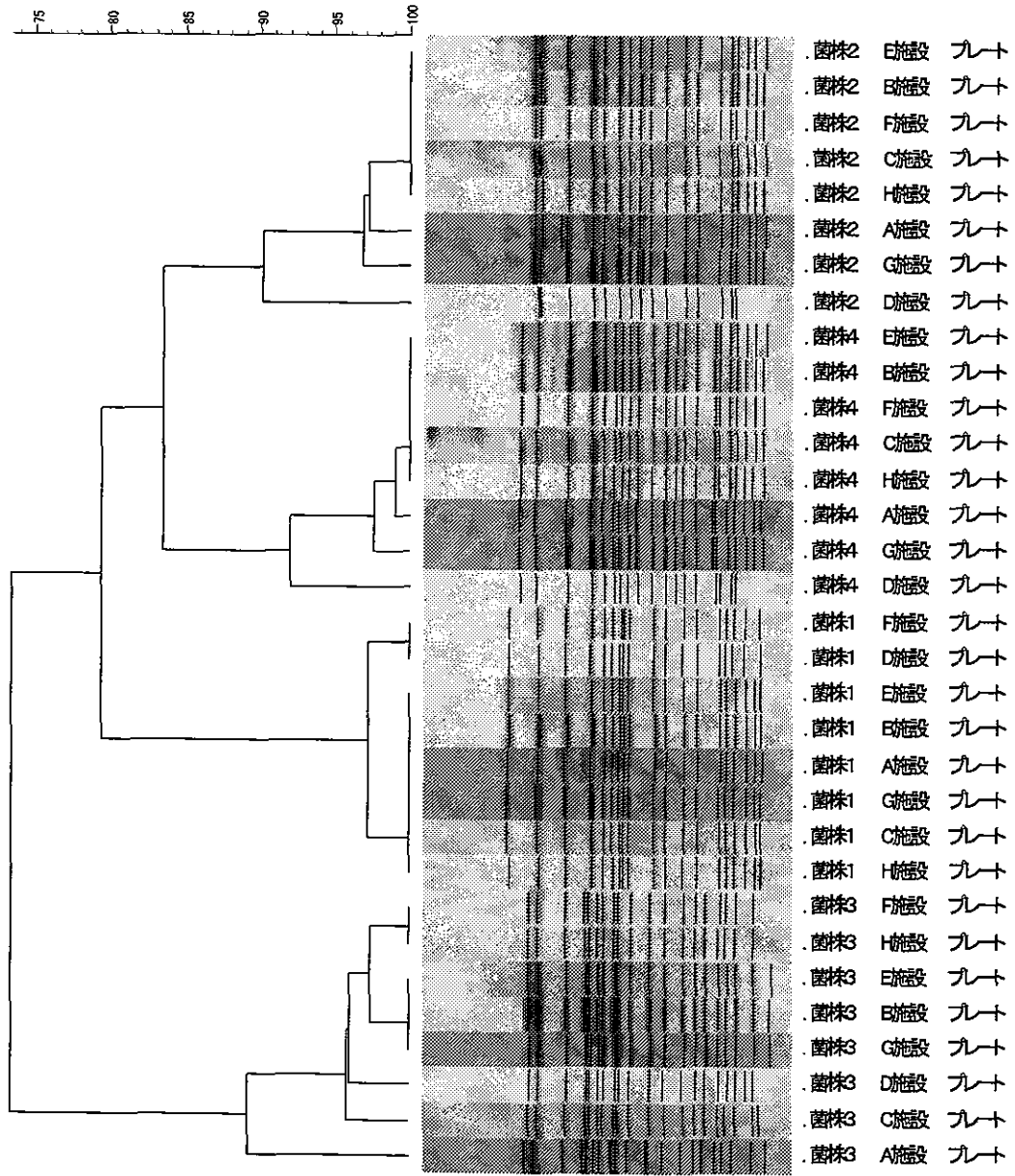


図 11 各施設間の O157 (プレート) デンドログラム

Dice (Tot 128-1 2%) (→0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
FPI

FPI

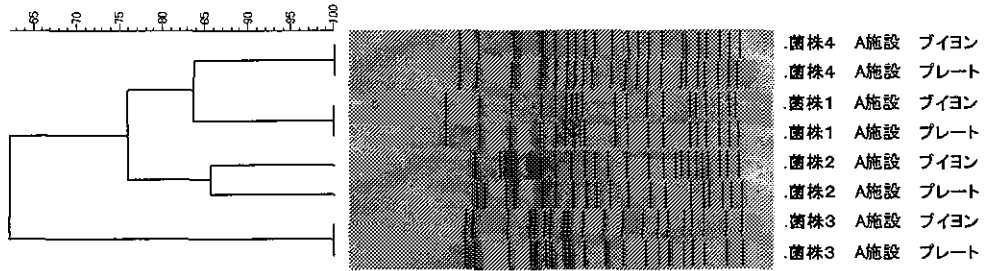


図 12 A施設のデンドログラム

Dice (Tot 128-1 2%) (→0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
FPI

FPI

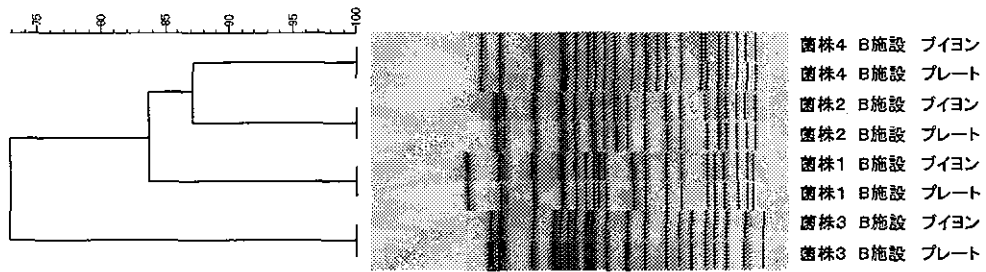


図 13 B施設のデンドログラム

Dice (Tot 128-1 2%) (→0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
FPI

FPI

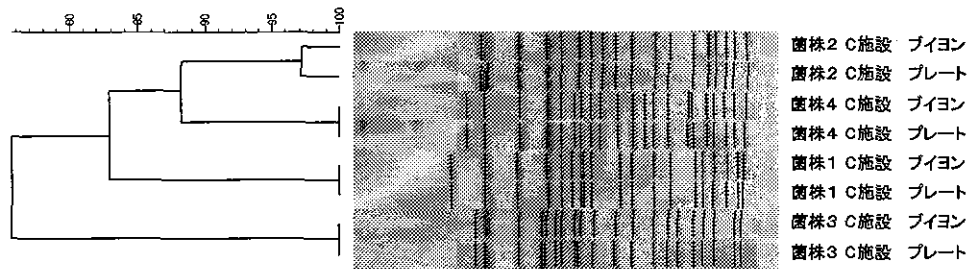


図 14 C施設のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%~12%) (F=0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
FPI

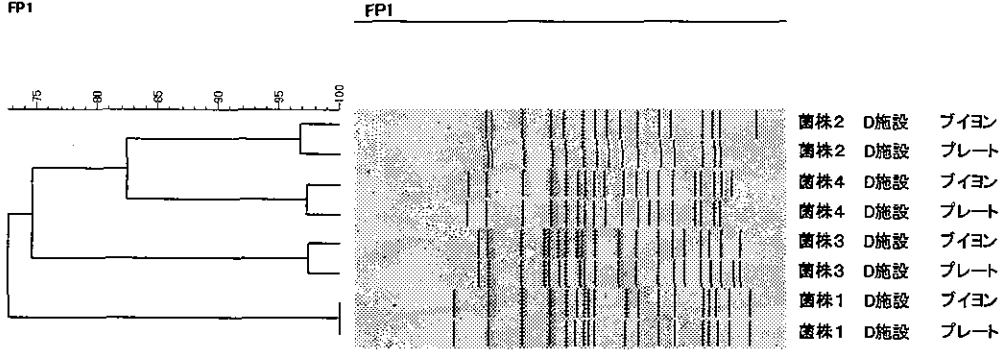


図 15 D 施設のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%~1.2%) (F=0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
FPI

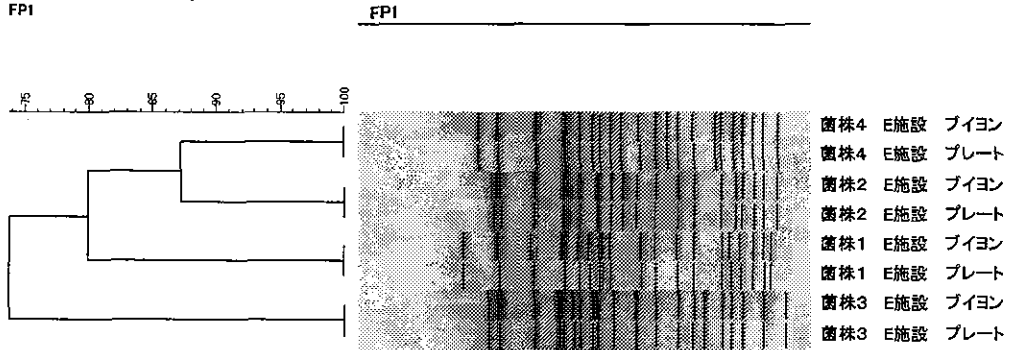


図 16 E 施設のデンドログラム

Dice (Tot 1.2%~12%) (F=0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
FPI

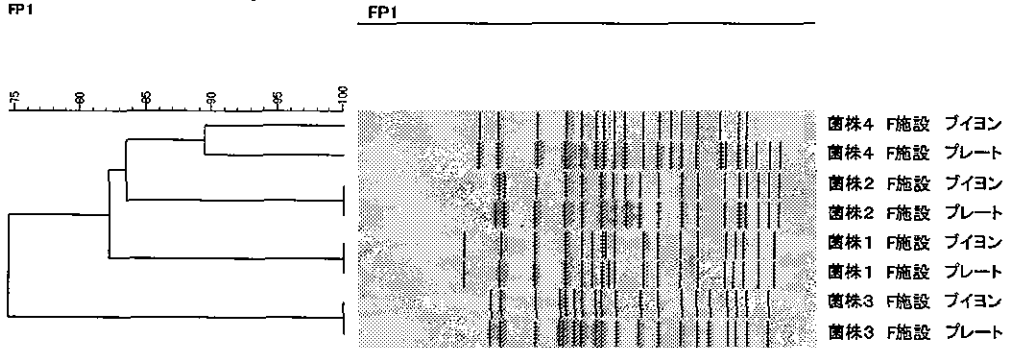


図 17 F 施設のデンドログラム

Disc (Tot: 1.2%~1.2%) (H: 0.0% S: 0.0%) [0.0%~100.0%]  
FP1

FP1

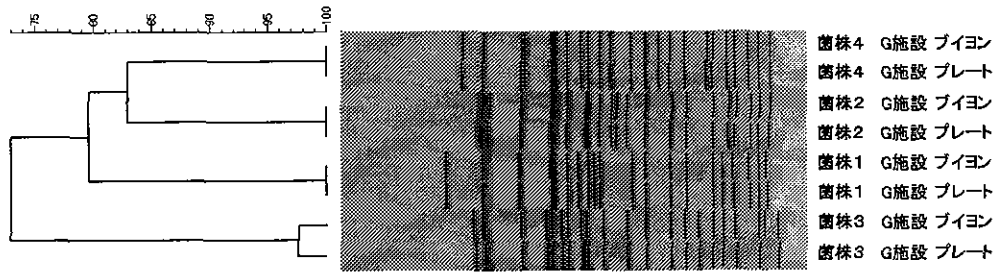


図 18 G 施設のデンドログラム

Disc (Tot: 1.2%~1.2%) (H: 0.0% S: 0.0%) [0.0%~100.0%]  
FP1

FP1

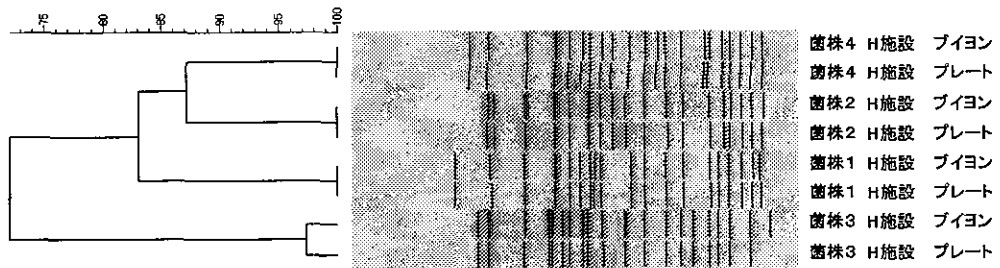


図 19 H 施設のデンドログラム



# ND, II a, ND 型腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例由来株の 分子疫学的解析法の検討

広島市衛生研究所

古田喜美 下村 佳 河本秀一

## 研究要旨

腸管出血性大腸菌(STEC)感染事例のより精度の高い分子疫学的解析方法を確立するために、2004年7月中旬から8月中旬にかけて、広島市(7事例)、岡山県(15事例)、山口県(1事例)、および徳島県(3事例)で発生したND, II a, ND型によるSTEC O157:H7感染症、計26事例から分離した27株について *Xba*I によるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)に加え、*Bln*I による PFGE、薬剤感受性試験、Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) による解析を行った。*Xba*I による PFGE 解析では2種類のクラスタに分類されたが、すべての株の相似度は95.5%と高い値を示した。*Bln*I では3種類のクラスタに分類され、岡山県の3株は他の株と比較し84.3%の低い相似度を示した。薬剤感受性試験では供試12薬剤に対しすべて感受性を示した。MLVAでは、解析可能な波形ピークを用いてFinger printing IIで系統樹解析を行った結果、6種類のクラスタに分類された。*Xba*I および *Bln*I による PFGE と MLVA による分類の結果、供試株は13種類に分類された。以上の結果から、*Xba*I による PFGE 解析で同じND, II a, ND型を示すSTECは、*Bln*I による PFGE および MLVA を併用することで、より詳細に分類することが可能であることが示された。

## A. 研究目的

広域食中毒事例等の迅速対応を目的とし、各地方衛生研究所(地研)の分離菌株を国立感染症研究所(感染研)に収集してPFGE解析するシステム(パルスネット)の構築が進み、自治体をまたぐ分散型集団事例(diffuse outbreak)の把握に効果をあげている。

一方、パルスネットにおけるPFGE解析は *Xba*I の1種類の制限酵素の切断パターンの比較により遺伝子型分類が行われている。本法では全国の多くの分離株の大まかな分類には有用であるが、同じ遺伝子型に分類される株において泳動パターンに違いが認められることがあるとともに、より詳細な疫学解析を行うためには本法のみの解析では不十分であることが指摘されている。そのため、同じ遺伝子型のSTECをさらに細かく分類し、精度の高い疫学調査を可能とするためには、他の疫学マーカーの併用が

不可欠である。

一方近年、DNA多型解析法の1つとして縦列反復塩基配列を利用したMultilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)は、有用であることが報告された。PFGE解析に加えて、この解析法を併用すれば、菌株間の相同性をより詳細に検討することが期待できる。

そこで、2004年7月中旬から8月下旬にかけて中国・四国地域で発生したND, II a, ND型、STEC O157:H7感染事例での広島県内7事例8株と岡山県内15事例15株、山口県内1事例1株、および徳島県内3事例3株を収集し、これらの事例からの分離株の相同性を検証することにより、*Bln*I による PFGE 解析、薬剤感受性試験および MLVA 解析の疫学マーカーとしての有用性を検討した。

## B. 研究方法

供試菌株は、2004年7月中旬から8月下旬に発生した広島市内の散発事例8件8株、岡山県内15事例15株、山口県内1事例1株、徳島県内3事例3株の計26事例27株のO157:H7(*stx1, stx2*)を用いた(表1)。

PFGEは、感染研の示したPFGE New Protocol(以下、新PFGE法)に準じて実施した。即ち、トリプトソイブロス(TSB)で37°C、1夜静置培養した菌液200 $\mu$ lを12,000rpm、5分間遠沈後、沈渣を滅菌蒸留水200 $\mu$ lに懸濁し、等量の1% Seakem®Gold agaroseを加え、サンプルプラグキャストを用いて厚み0.7mmのプラグを調製した。1%N-lauroylsarcosine加1mg/ml proteinase K処理は50°Cで4~6時間、4mM Pefabloc SC加TEでの洗浄は50°Cで30分間2回、TE洗浄は氷上で30分間1回とした。制限酵素処理は*Xba*Iで30units/sample、*Bln*Iで30units/sampleとし37°C、18~20時間処理した。泳動装置はGenePath system(Bio-Rad)を使用し、ゲルは1% Seakem®Gold agarose、泳動バッファーは0.5 $\times$ TBEを用いた。電圧6.0V/cm、パルスタイム2.2-54.2s(linear ramp)、水温12°Cの条件で19時間泳動後、0.5 $\mu$ g/ml ethidium bromideで染色して写真撮影した。PFGE画像は画像解析ソフトFingerprinting II(Bio-Rad)を用いて解析した。

薬剤感受性試験はSM、KM、TC、ABPC、NA、CP、CIP、CTX、SXT、TMP、GM、FOMの12薬剤についてセンシディスク(BBL)を用いてNational Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)法に準拠し、1濃度ディスク法で行った。

MLVAは、Bjorn-Arne Lindstedtらの方法<sup>1)</sup>に従った。すなわちO157:H7の染色体上に存在する6種類のVariable-Number Tandem

repeats(VNTRs)とプラスミド上に存在する1種類のVNTRsを増幅させるプライマーを用いて行った。プライマーセットは表2に示したとおり、Vhec1~7の7種類で、蛍光色素の6FAMをそれぞれのフォワードプライマーの5'側に標識したものを用いた。菌液を10分間煮沸溶菌させ、12,000rpm、5分間遠沈した上清をテンプレートとした。PCR条件は表3に示した。泳動前の変性反応は、Vhec1~7の各PCR産物3 $\mu$ lを1本のチューブで混合し、ホルムアミドを8 $\mu$ l加えGeneAmp2400-R(Perkin Elmer)で94°C、5分間変性を行い、その後速やかに氷上にて不可逆固定を10分間行った。この変性DNA液にGeneScan用サイズマーカーのGS-500-TAMRAを3 $\mu$ l加えて、ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)で60°C、50分間の電気泳動を行い、GeneScan Analysis Softwareで解析を行った。デンドログラムはFingerprinting IIで作成した。

## C. 研究結果

### 1 PFGE解析

供試27株は*Xba*Iによる解析によりクラスタA、Bに大きく分類された(図1)。両者の相似度は95.5%であり、そのPFGEパターンは1または2本程度のバンドにより目視的に違いが認められたが、互いに区別することは極めて困難であった。クラスタAに分類された7株はさらにA1とA2に分類され、A1とA2との相似度は97.1%、各クラスタ内の株はそれぞれ100%の相似度を示した。A1には広島市4事例、A2には広島市2事例、岡山1事例の株が含まれた。クラスタBに分類された20株はさらにB1とB2に分類され、B1とB2の相似度は97.4%であった。B1の19株のうち18株(広島2事例、岡山12事例、山口1事例、徳島3事例)は100%

の相似度を示し、他の 1 株(岡山事例 No.11)とは 99.4%の相似度であった。B2 には岡山県の 1 株(事例 No.18)のみが分類された。

*BlnI* による解析では、C から E の 3 種類のクラスタに大きく分類された(図 2)。クラスタ E と C、D とは 84.3%と低い相似度を示し、C と D との相似度は 92.3%であった。クラスタ C は C1 から C5 の 5 種類に分類された。C1 と C2 から C5 との相似度は 97.1%~92.7%であった。C1 に分類された 9 株(広島 6 事例 7 株、岡山 1 事例、徳島 1 事例)は 100%の相似度を示した。クラスタ D は D1 から D3 の 3 種類に分類され、D1 と D2、D3 との相似度はそれぞれ 97.1%、97.2%であった。D1 に分類された 9 株(岡山 8 事例、徳島 1 事例)は 100%の相似度を示した。クラスタ E には岡山県の 3 株が分類され、そのうちの 2 株(事例 9、10)は 100%の相似度を示した。

## 2 薬剤感受性試験

表 4 に 27 株についての 12 薬剤の感受性試験結果を示した。全供試株はすべての薬剤に感受性であった。

## 3 MLVA 解析結果

MLVA の解析の結果、供試 27 株は様々な波形パターンを示した。その代表的なパターンを図 3 に示した。比較的安定した波形パターンを示した DNA サイズが約 170bp から 650bp の間にみられた主要なピークについて、各株間の異同性を比較した結果、供試 27 株は 20 の異なる波形パターンに分類された。本結果を Finger Print II で解析するために、それらのピークを PFGE と同様な泳動バンドとしての模式図を作製し(図 4)、系統樹解析を行った(図 5)。その結果、MLVA パターンは 6 種類の大きなクラスタに分類された。クラスタ I には岡山県の 10 株、II には広島市 3 株、山口県 1 株、III には岡山県

4 株、徳島県 1 株、IV には徳島県 2 株、V には広島市 3 株、岡山県 1 株、VI には広島市 2 株が分類された。各クラスタ間の相似度は VI と I ~ V が 72.1%、V と I ~ IV が 75.7%、IV と I ~ III が 78.6%、III と I、II が 83.1%、I と II が 90.4%であった。

## 4 PFGE および MLVA による分離株の分類

*XbaI*、*BlnI* による PFGE 解析および MLVA 解析の結果、供試 27 株は 13 種類に分類された(表 5)。

## D. 考察

国内各地で発生した STEC 感染症の分離菌株を感染研に収集し、PFGE 解析を行うシステム『パルスネット』が稼働し、diffuse outbreak の把握に効果をあげている。2004 年 7 月から 9 月初旬にかけて日本各地(愛知、石川、大阪、岡山、鹿児島、群馬、埼玉、東京、徳島、富山、兵庫、広島、福岡、三重、山口)で ND, II a, ND 型パターンを示す O157:H7(*stx1*, *stx2*)感染症が発生し、広島市内でも散発的に 7 事例の ND, II a, ND 型 STEC 感染症が発生した。患者は外食を多くする家庭で発生する傾向がみられたが、広島市内の各事例間の因果関係は不明であった。

これらの ND, II a, ND 型 O157:H7 による事例の疫学的関連性について、より詳細な情報を得るため、この期間に中国・四国地区の地研で分離した ND, II a, ND 型 O157:H7(*stx1*, *stx2*) 26 事例 27 株について、PFGE 解析とともに薬剤感受性試験、MLVA を加えた疫学的解析を行った。

PFGE 解析によるデンドログラムでは、*XbaI* においては、各地研で分離した ND, II a, ND 型 O157:H7 株は、95.5%の相似度を示し、バンドの多少のゆらぎがみられたものの、ほぼ同じパターンであると考えられた。

一方 *BlnI* においては、3 つのクラスタが存

在していたが、広島市内で発生した 7 事例の 8 株すべてが相似度 92.7% のクラスター C 内にあった。同クラスター内には、ほかに徳島県内事例 2 株(事例 25、26)と岡山県内事例 3 株(事例 18、19、22)も存在していた。相似度 95.2% のクラスター D に含まれるのは、岡山県内散発事例 9 事例 9 株(事例 8,11~17,20,21)と徳島県内 1 事例 1 株(事例 24)と山口県内 1 事例 1 株(事例 23)であり、岡山県内発生事例に偏っていた。相似度 97.5% のクラスター E に含まれるのは岡山県内散発 3 事例 3 株(事例 9,10,14)のみであった。クラスター C および D は相似度 92.3% で比較的高い相似性を示しておりほぼ同一グループの株であると考えられたが、クラスター E は、クラスター C および D と異なり、84.3% と低い相似度となり異なるグループの株であると考えられた。このことから、岡山県内の 3 株(事例 9,10,14)を除いて ND, II a, ND 型 24 株は近縁な株であると考えられるが、広島市内散発事例株と岡山県内散発事例株とは、若干パターンが異なった株であることが示された。一方、徳島県散発事例分離株は、広島市内散発事例分離株群と岡山県内散発事例分離株群の 2 つのクラスター群に存在し、発生日から考えると、徳島・広島と徳島・岡山の物流ルートで、一連の diffuse outbreak の可能性を示唆したが、それぞれの物流ルートでの因果関係を示す情報はなかった。今回の ND, II a, ND 株では、*Xba*I に比べ、*Bln*I による解析の方が、株間の異同をより詳細に解析することができた。

薬剤感受性試験は、全ての株が感受性を示したために、疫学的解析に活用することができなかった。

近年 MLVA の分子疫学的解析手法としての有用性が報告されていることから、本方法を用いて予備的な検討を行った。その結果、得られ

たチャートの波形のピークは大小様々でノイズと目的とするピークとの区別が困難なピークもみられたが、比較的安定した波形パターンを示した DNA サイズが約 170bp から 650bp の間にみられた主要なピークについて各株間の異同性を比較することが可能であった。その結果、供試 27 株は 20 種類の異なる波形パターンに分類され、その結果を Finger Printing II で PFGE と同様の解析を行った結果、波形パターンは 6 種類の大きなクラスターに分類することができた。このことから、MLVA 解析が STEC の分子疫学的解析手法の一つとして有効な方法のひとつとなる可能性が示唆された。一方、今回の解析は予備的な実験であり、結果の再現性、ノイズと目的とするピークとの区別など、詳細な点についての検討はできなかった。それらについて今後詳細に検討する必要があるとともに、他の多くの事例について本法で検討を行いデータを蓄積することが重要であると思われる。

この結果を地域別にみると、岡山県内散発事例 8 および 11 の分離株は、徳島県散発事例 24 分離株と遺伝子的に一致し、同一由来を示唆した。また、山口県内散発事例 23 の分離株及び徳島県内散発事例 25 および 26 の分離株は、広島市および岡山県の ND, II a, ND 株とは近縁ではあるが、遺伝子的に異なる株であったと考えられた。さらに、広島市および岡山県内散発事例分離株も遺伝子的に異なる複数グループに分類することができた。

今回検討した ND, II a, ND 株の解析結果から、PFGE 解析において、同一 PFGE 型を示す分離株について、原理の異なる MLVA 法を用いることで、遺伝子的類似性の差異がより明確となり、詳細な分子疫学的解析が可能となることが示唆され、MLVA 法の有効性についてさらに検討が必要であると考えられた。