

表 1

施設名	対象者	検便実施数	陽性者数
A 園	園児	31	7
	一時保育園児	25	0
	職員	5	0
	臨時職員	14	0
	家族	24	2
	(小計)	(99)	(9)
B 園	園児	5	0
B 乳児センター	園児	15	0
C 園	園児	126	3
	職員	10	0
	家族	37	6
	(小計)	(173)	(9)
計		292	18

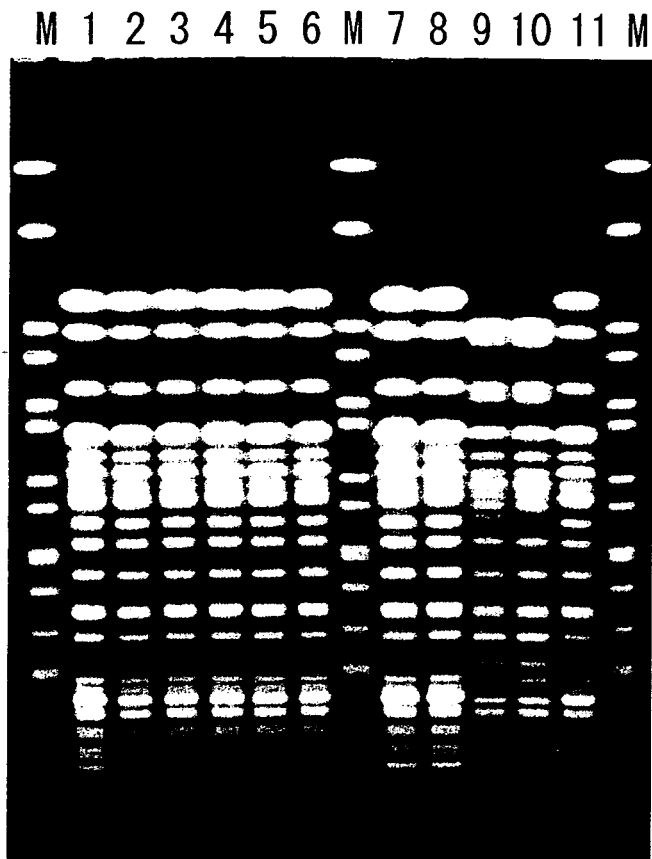


図1 A園およびC園関連株 PFGE

EHEC O157 (VT2) *Xba*I 処理。M：マーカー(*Salmonella* Braenderup H9812)、1～8 および 11：A園園児と家族、9～10：C園園児

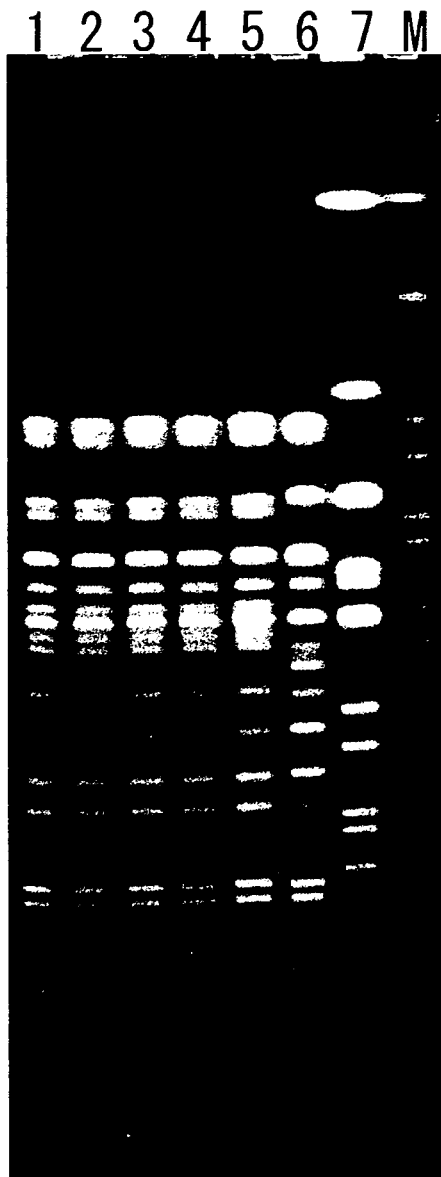


図2 C園関連株 PFGE

EHEC O157 (VT2) *Xba*I 処理。M : マーカー(*Salmonella* Braenderup H9812)、1  
 ~7 : C園園児と家族。7はC園園児、6はその姉。

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 19 年度分担研究報告

認可外保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例

協力研究者	下迫純子	堺市衛生研究所
	山内昌弘	堺市衛生研究所
	横田正春	堺市衛生研究所
	大中隆史	堺市衛生研究所
	田中智之	堺市衛生研究所

研究要旨

2006 年 10 月に、堺市内の同一認可外保育施設に通園している子供 3 名の細菌性赤痢の発生届が出された。届出患児以外にも発熱・下痢等の症状を呈する園児が数名いることが判明し、検便の結果、13 名（園児 10 名、保護者 3 名）から赤痢菌を分離した。13 菌株は、セフトキシム(CTX) など 6 薬剤に耐性を示し、Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生性であることが判明した。制限酵素 *Xba*I 処理によるパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を実施し、その結果、同一由来菌による集団感染であることを確認した。

A. 研究目的

2006 年 10 月、堺市内の認可外保育施設における細菌性赤痢の集団発生事例を経験した。その疫学的調査において、分離菌株の細菌学的性状および PFGE による DNA 相同性の検討を行った。さらに、分離菌株がセフトキシムに耐性を示したため、ESBL 産生性の確認<sup>1)</sup>を行った。

B. 研究方法

1. 検査材料

対象者 81 名（園児 29 名、職員 6 名、家族 46 名）の便、および調理室のふきとり等 11 検体を検査した。なお、保存食材はなかった。

2. 赤痢菌の分離・同定

分離培養は常法<sup>2)</sup>に従って行った。なお、医療機関分与菌株で薬剤耐性試験を行い、ABPC と TC に耐性を確認したため、増菌培養には TC 30  $\mu$ g/ml 加トリソイブrosを用い、

分離培地は SS 寒天培地・DHL 寒天培地および ABPC 10  $\mu$ g/ml・TC 30  $\mu$ g/ml を添加した SS 寒天培地・DHL 寒天培地の 4 種類を各検体に使用した。

分離菌株は、API20E（日本ビオメリュー）による生化学的性状試験、赤痢菌免疫血清（デンカ生研）による血清型別を行った。

赤痢菌の病原因子については、*invE*<sup>3)</sup>、*ipaH*（タカラバイオ）を PCR 法により検査した。

3. 薬剤感受性試験

感受性試験は、センシ・ディスク (BD BBL) を用い KB 法により実施した。供試薬剤は、アンピシリン (ABPC)、ストレプトマイシン (SM)、テトラサイクリン (TC)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (ST)、ホスホマイシン (FOM)、セフトキシム (CTX)、ナリジクス酸 (NA)、シプロフロキサシン (CPFX)、ノルフロキサシン (NFLX) の 12 剤である。

#### 4. PFGE 法

EHEC・PFGE 近畿パルスネット ニュープロトコールに準拠し、供試菌株を制限酵素 *Xba* I で 37°C、2 時間消化処理を行った。1% SeaKem Gold Agarose を用い、CHEF DR III (BIO-RAD) にて電気泳動を実施した。泳動条件は、電圧 6V/cm、14°C、スイッチタイム 2.2-54.2 秒で 19 時間とした。サイズマーカーは、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断断片を用いた。PFGE 像の解析には、Fingerprinting II (BIO-RAD) を使用した。

#### 5. ESBL 産生性の確認試験

$\beta$  ラクターマーゼ阻害効果のあるクラブラン酸(CVA)添加感受性ディスク (BD BBL) を併用したダブルディスク法<sup>1)</sup>により酵素活性阻害の有無を確認した。供試薬剤は CTX、CTX/CVA、CAZ (セフトジジム)、CAZ/CVA である。

### C. 研究結果

#### 1. 事例の概要

10 月 26 日、市内 A 医療機関から 3 歳男児の細菌性赤痢の発生届が出された。27 日には、B 医療機関から 3 歳男児、C 医療機関から 4 歳女児の発生届が出された。3 名とも市内の同一認可外保育施設に通園していたため、保健所が 10 月 13 日から 27 日までの園児の健康状況等の調査を行った。その結果、届出患児以外にも発熱・下痢等の症状を呈する園児が数名いることが判明した。便検査により、先の届出患児 3 名を含む 10 名の園児と、その保護者 3 名の合計 13 名から赤痢菌を検出した (表 1)。ふきとり等の 11 検体は全て陰性であった。赤痢菌陽性者の発症状況は図 1 に示す。22 日に園児のほとんどが発症しており、保健所が喫食調査の結果を統計学的解析で検討したところ、20 日の職員による手作りのわ

らびもちのみ有意差が認められた。給食等は当該保育施設で調理されていたが、食材は保存されていなかった。

陽性者全員を対象に、治療後の 2 度目の陰性確認は、12 月 6 日に行った。

#### 2. 分離菌株の同定

生化学的性状は API20E で *Shigella sonnei*、血清型別は *S. sonnei* I 相、PCR 法により *invE* (382bp) および *ipaH* (242bp) を検出した。

#### 3. 薬剤感受性試験

分離 13 菌株全て、ABPC・SM・TC・ST・CTX・NA の 6 剤に耐性を示した。

#### 4. PFGE 像の解析

分離 13 菌株のうち、No.7 の菌株は 2 本のバンドが異なっていた (図 2)。Fingerprinting II による解析の結果、No.7 の菌株は 97.44% の相同性を示し、他菌株は 100% の相同性を示した (図 3)。

#### 5. ESBL 産生性の確認試験

阻止円の直径は、CTX 10 mm・CTX/CVA 36 mm および CAZ 22 mm・CAZ/CVA 35 mm で両薬剤ともクラブラン酸添加ディスクの阻止円が 5 mm 以上拡大し、ESBL 産生性を確認した (図 4)。

### D. 考察

検便から分離した 13 菌株は、セフトキシム (CTX) など 6 薬剤に耐性を示し、Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) 産生性であることが判明した。

本事例では、給食等は当該保育施設で調理されていたが、保存食材がなく、施設のふき取り検体からは赤痢菌は分離されなかった。

また、当該職員を含め陽性者すべてに最近の海外渡航歴がなく、2 日程後に発症している保護者 3 名は、子供達からの二次感染と考えられた。さらに、この集団発生時期の前後に、堺市内及び他市から同様の薬剤耐性パターンを有す赤痢菌感染の報告事例はなかった。

以上の結果を総合して、感染経路・感染源の特定は不明であった。なお、他の陽性園児より6日前に発熱・下痢症状があった1才児は、下痢症状が治まっていないのに、欠席することなく預けられており、感染源である可能性も示唆されたが、保護者は発症日以前の家庭での喫食状況を覚えておらず、感染源となる汚染食材は確認することが出来なかった。また、3名の保護者はいずれも軽い症状であった。

赤痢菌は腸管出血性大腸菌と同様に、少量の菌により感染が成立し、二次感染による感染の拡大が起り易いと考えられる。さらに、*S. sonnei* では軽度の下痢、あるいは無症状病原体保有者で経過することも多いとされる。また、日本で発生している細菌性赤痢の大半は国外感染であり、国内感染については、国外感染者からの二次感染や汚染された輸入食品によることが推測されている。

以上から、本事例の疫学的調査では、施設内と職員、園児および家族のみ対象としていたが、国内発生の場合は、二次感染による感染拡大の可能性が強いことを考慮して、感染源追求には広域な調査が必要と思われた。

ESBL産生菌は、1983年に第三世代セフェム系薬剤に耐性を示した *Klebsiella pneumoniae* の報告が初めてであり、その後世界的に臨床材料から分離されるようになり問題視されている。ESBL産生性が *E. coli* など腸内細菌科の他菌種に拡大<sup>4)</sup>しているなか、*Shigella* 属における報告<sup>5)</sup> はまだまれである。ESBL産生性赤痢菌の国内での報告は、2006年8月に中国出張の帰国者から *S. sonnei* が分離された報告<sup>6)</sup> がある。海外渡航歴の無い国内発生では、本報告が初めての事例と考えられる。

今後も同様の感染事例が起こる可能性があり、赤痢菌の薬剤耐性の獲得状況に注意を払

う必要があると考える。

## E. 結論

今回の *S. sonnei* による集団感染事例は、PFGE 像の解析から、同一由来菌株による感染であることが確認できた。

6剤耐性を示す多剤耐性菌であり、ESBL産生性を確認した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 下迫純子, 山内昌弘, 横田正春, 大中隆史, 田中智之, 藤井史敏, 松本恵美子, 柴田仙子, 福田雅一: 保育施設における ESBL 産生性細菌性赤痢の集団発生事例—堺市, 病原微生物検出情報, 28: 45-46, 2007
- 2) Shimosako, J., Onaka, T., Yamanouchi, M., Yokota, M., Nakamura, T., Fujii, F., Matsumoto, E., Shibata, H., Fukuda, M., Tanaka, T.: An Outbreak of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Shigella sonnei* at a Day Care Nursery in Sakai City, 2006., Jpn. J. Infect. Dis., 60: 408-409, 2007.

### 2. 学会発表

- 1) 下迫純子, 横田正春, 大中隆史, 田中智之, 柴田仙子: 保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例, 第50回日本感染症学会 中日本地方会学術集会(2007年10月, 神戸市)
- 2) 下迫純子, 山内昌弘, 横田正春, 大中隆史, 田中智之, 藤井史敏, 松本恵美子, 柴田仙子, 福田雅一: 保育施設における ESBL 産生細菌性赤痢の集団発生事例, 第34回地方衛生研究所全国協議会 近畿支部細菌部会研究会

(2007年11月, 和歌山市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

- 1) 木村聡一郎, 石井良和:  $\beta$ -ラクタマーゼの分類とその検査法, *Medical Technology*, 34: 1261-1267, 2006
- 2) 渡辺治雄, 厚生労働省監修: 1. 赤痢菌, 食品衛生検査指針, 微生物編: 307-315, 2004
- 3) 伊藤健一郎, 渡辺治雄, 他: 赤痢菌遺伝子

の解析と PCR による迅速診断法, *日本臨床*, 50: 368-372, 1992

4) 国立感染症研究所編: 国内で検出される ESBL の分離頻度, *病原微生物検出情報*, 20: 227, 1999

5) Kim S, Kim J, Kang Y, Park Y, Lee B : Occurrence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamases in members of the genus *Shigella* in the Republic of Korea, *J Clin Microbiol*, 42: 5264-5269, 2004

6) 石川恵子, 宮崎哲朗: 海外旅行下痢症患者より分離された CTX-M 型  $\beta$ -lactamase 産生 *S. sonnei*, *病原微生物情報*, 27: 264-265, 2006

表1 分離菌株

菌株No.	発症日	受付日	性別	年齢	備考
1	10.21	10.22	M	3	園児
2	10.22	10.23	M	3	園児
3	10.22	10.23	F	4	園児
4	10.23	10.27	M	5	園児
5	10.21	10.27	F	1	園児
6	10.22	10.27	F	4	園児
7	10.22	10.27	M	3	園児
8	10.22	10.27	M	3	園児
9	10.21	10.27	M	3	園児
10	10.25	10.29	F	30	保護者
11	10.16	10.29	M	1	園児
12	10.28	11.5	M	31	保護者
13	10.25	11.6	F	24	保護者

図1 発症状況

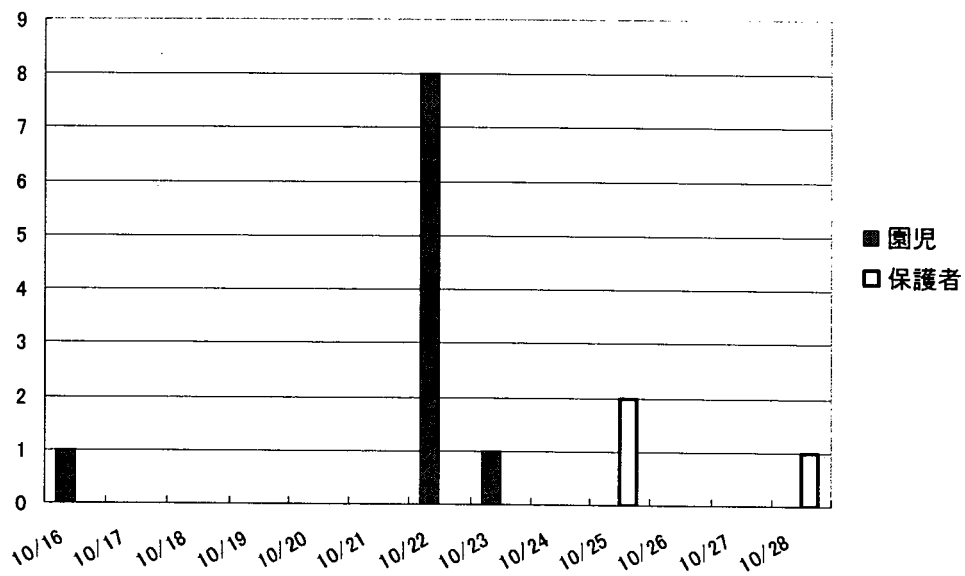
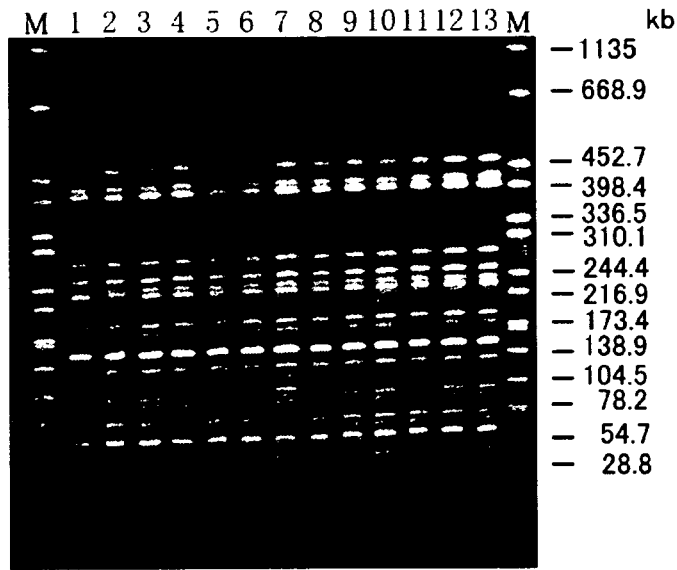




図2 分離株の PFGE 像 (*Xba*I 処理)



菌株 No. 1~13

M : 分子量マーカー (*S. Braenderup* H9812/*Xba*I 処理)

図3 分離株のデンドログラム

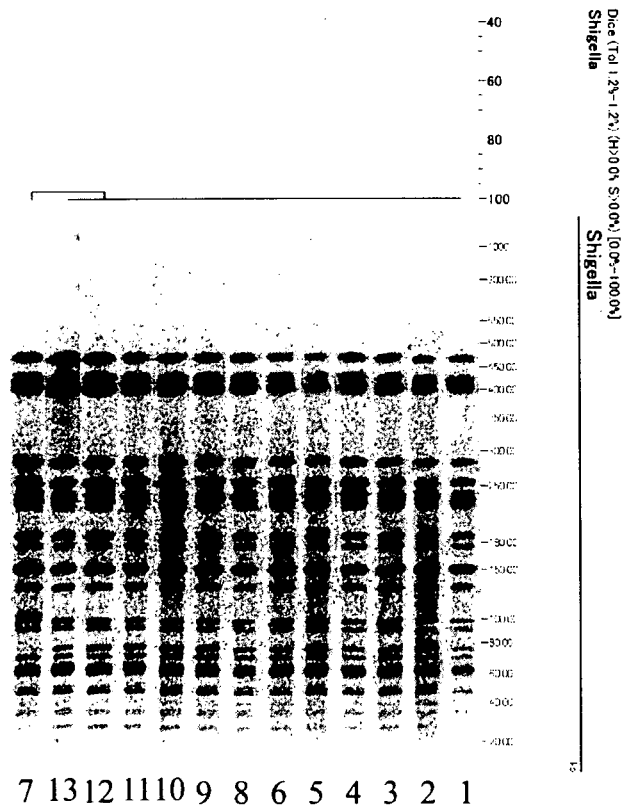
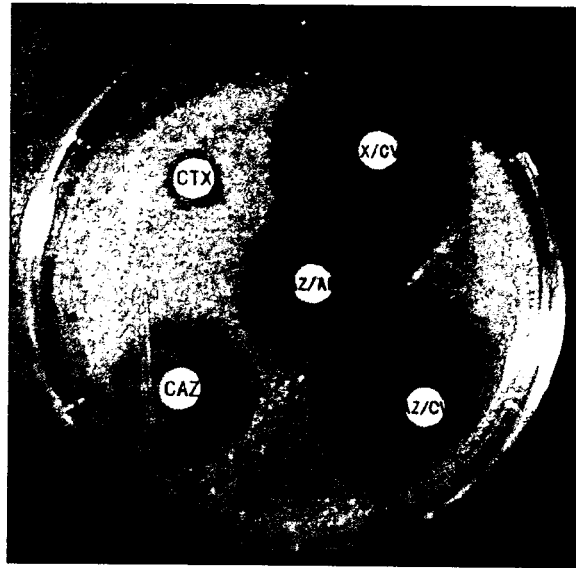


図4 ESBL 産生性の確認試験 (ダブルディスク法)



# 厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 平成 19 年度分担研究報告書

### グラム陰性菌からの非酵素法による DNA 抽出

協力研究者 西海弘城 兵庫県立健康環境科学研究所

#### 研究要旨

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)用の DNA を調整するには、通常、溶菌酵素やタンパク分解酵素などの酵素類が使われる。今回、グラム陰性菌について、酵素類を用いない DNA 抽出法(非酵素法)の適用の可否を検討した。その結果、この方法は、大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌及び腸炎ビブリオに適用可能であることが確認された。この方法は、簡便かつ経済的にこれらの菌から PFGE 用の DNA を調整することが可能であった。

#### A. 研究目的

細菌から染色体 DNA を抽出するために、通常は溶菌酵素やタンパク分解酵素などの酵素類が使われるが、より簡便かつ経済的にパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)用の DNA を調整する非酵素法が、報告されている。今回、当所に搬入される機会の多い出血性大腸菌 O157、赤痢菌、サルモネラ及び腸炎ビブリオについて、非酵素法による DNA 調整の可否を検討したので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 使用菌株

兵庫県下で患者から分離された *Escherichia coli* O157:H7、*Sigella sonnei*、*Salmonella* Enteritidis、*Vibrio parahaemolyticus* O3 : K 6 を試験に供した。

##### 2. 酵素法による DNA 抽出法

DNA の抽出は PFGE New Protocol-Kinki の方法に従った。すなわち菌液を遠心し集菌後、蒸留水に再懸濁し、等量の 1% アガ

ロースを加え、固化させた。固化させたアガロースブロックを 1% N-Lauroylsarcosine 及び 1mg/mL proteinase K を含む 0.5M EDTA(pH 8.0)に入れ、50°C で一晩溶菌した。溶菌後、4mM Pefabloc SC を含む TE buffer(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0) にブロックを移し 50°C 20 分間保温を二度繰り返し proteinase K を失活した。次に TE buffer にブロックを移し氷上で 20 分間平衡化した。

##### 3. 非酵素法による DNA 抽出法

菌をアガロースブロックに包埋するところまでは、酵素法による DNA 抽出と同様に行った。菌を包埋したブロックを 5M 尿素、1% Triton X-100 を含む 0.1M EDTA(pH 8.0) 1mL に入れ、50°C で一晩溶菌した。溶菌後、TE buffer で 2 回洗浄し、新しい TE buffer 置換後、氷上で 20 分間平衡化した。

##### 4. 制限酵素による染色体 DNA の切断

ブロックを制限酵素 buffer に移し氷上で 30 分間平衡化した後、*E. coli* O157:H7、*S. sonnei* 及び *S. Enteritidis* については 30U の

*Xba* I, *V. parahaemolyticus* O3 : K6 については 30U の *Not* I で 37℃、2 時間処理した。

#### 5. PFGE

電気泳動は、0.5×TBE buffer、1%アガロースゲル、電圧 6V/cm、パルスタイム 2.2-54.2 秒、泳動時間 19 時間で CHEF DR II (BIO-RAD) を用いて行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、切断パターンを比較した。

#### C. 研究結果

今回、尿素を用いる非酵素法による DNA 抽出法が、当所に搬入される機会の多い出血性大腸菌 O157、赤痢菌、サルモネラ及び腸炎ビブリオにおける PFGE に適用可能か否か、酵素を用いた DNA 抽出法と比較して検討を行った。結果は図 1 に示した通りである。

大腸菌では約 30~600 kbp にかけて 20 本のバンドがみられた。バンドに多少の濃淡はあるが、いずれの抽出法を用いても明瞭であり、抽出方法による PFGE パターンの差は認められなかった。また、赤痢菌では約 30~500 kbp の間に 20 本のバンド、サルモネラでは約 30~1000 kbp の間に 13 本のバンド、腸炎ビブリオでは約 30~1000 kbp の間に 18 本のバンドがあり、いずれの抽出法においても大腸菌と同様に多少の濃淡はあるが、バンドは明瞭であり、泳動位置はすべて一致した。

#### D. 考察

今回、出血性大腸菌 O157、赤痢菌、サルモネラ及び腸炎ビブリオについて、界面活性剤と尿素を含む EDTA バッファーを用いたシンプルな非酵素法により DNA 抽出を

行い、従来の酵素法と同等の良好な結果が得られた。

今回試みた非酵素法は、タンパク分解酵素の代わりに尿素によって蛋白質を可溶化し、DNA を抽出する方法である。尿素はタンパク変性剤の一つであり、水の網目構造の破壊、蛋白質分子内の側鎖間やペプチド結合間の水素結合の破壊及び蛋白質分子内の疎水結合の破壊が複合的に働くことにより蛋白質を可溶化、変性させる。

酵素法ではタンパク質をプロテアーゼで分解するが、その後にプロテアーゼが残存していると制限酵素による DNA 切断の過程で制限酵素が分解されてしまうため、DNA が切断されない。そのため、プロテアーゼインヒビターによるプロテアーゼの不活化が必要となる。しかし、尿素及び界面活性剤によりタンパクを可溶化し除去する非酵素法の場合、ブロックの洗浄のみで尿素や界面活性剤は除去されるため、プロテアーゼインヒビターによるプロテアーゼの不活化操作を省くことができる。また、*proteinase K* や *PefablocSC* といった高価な試薬も必要としないため非常に経済的である。

#### E. 結論

グラム陰性細菌について、PFGE のためにタンパク分解酵素の代わりに高濃度の尿素を用いて染色体 DNA を抽出する非酵素法の可否を検討した。この方法は、大腸菌、赤痢菌、サルモネラ菌及び腸炎ビブリオに適用可能だった。我々の非酵素法は *proteinase K* の不活化操作を省略でき、*proteinase K* やプロテアーゼインヒビターである *PefablocSC* といった高価な試薬を必要とせず、複雑な組成のバッファーを必要と

しないという点で優れていた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

西海弘城、山岡政興：パルスフィールドゲル電気泳動のためのグラム陰性菌からの非酵素法による DNA 抽出、兵庫県立健康環境科学研究センター紀要(in press)、(2008 年)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

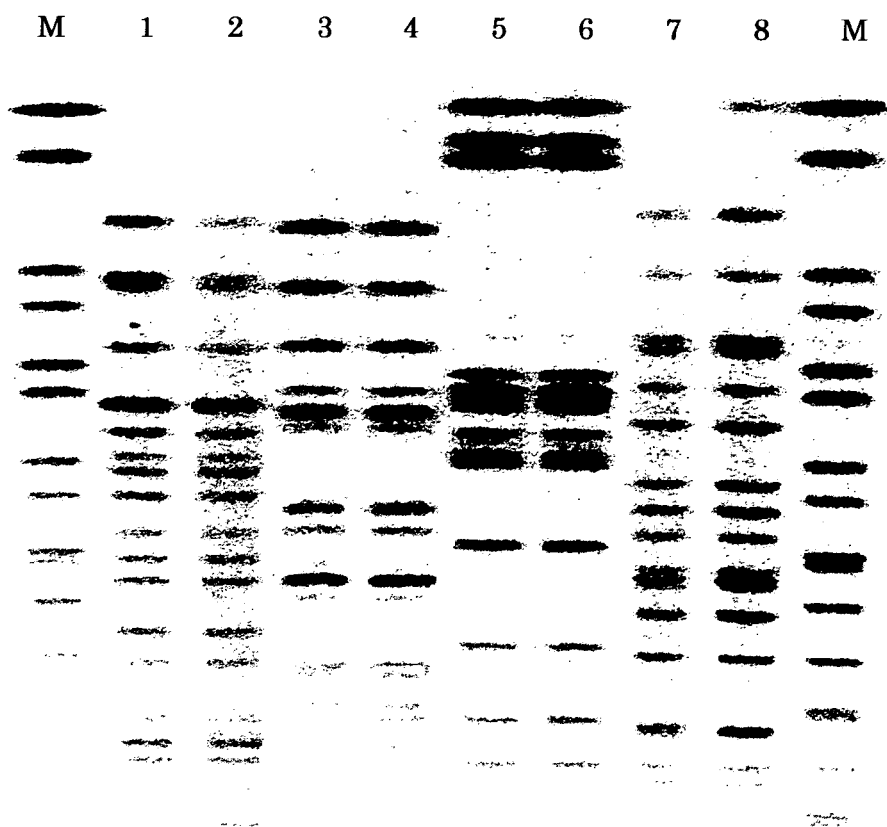


図 1. 酵素法及び非酵素法による DNA 抽出法の比較

1, 3, 5, 7: 酵素法による DNA 抽出

2, 4, 6, 8: 非酵素法による DNA 抽出

1, 2: *E. coli*, 3, 4: *S. sonnei*, 5, 6: *S. Enteritidis*, 7, 8: *V. parahaemolyticus*,

M: *Salmonella* Braenderup *Xba* I 切断物

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19年度分担研究報告書

広域における食品由来感染症を迅速に探知するために必要な情報に関する研究

分担研究者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	上田 豊	鳥取県衛生環境研究所
	竹田 義弘、大原祥子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	石村 勝之、伊藤文明	広島市衛生研究所
	澤田千恵子、下野生世	徳島県保健環境センター
	砂原 千寿子	香川県環境保健研究センター
	吉田 紀美	愛媛県立衛生環境研究所
	松本 紀子	高知県衛生研究所
	大島 律子	岡山県環境保健センター

研究要旨

平成18年度から19年度に中四国地域で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株を用いて IS printing 法による検査法の検討を行った。同時にパルスフィールド電気泳動法の型別結果を併せて疫学解析を行い、菌の遺伝子による疫学解析ツールとして両法の評価を行った。各県で分離された菌株間および中四国地域で分離された菌株相互の遺伝子解析を実施した結果、解析能力はパルスフィールド電気泳動法が IS printing 法より概ね高く、IS printing 法は迅速性・簡便性などの点からスクリーニング的な使用が効果的であると思われる。どちらの方法も一長一短があるため、散发事例や集団発生・diffuse outbreak 発生時の疫学解析には、目的に応じた選択使用が有効であると考えられる。

A.研究目的

平成8年の腸管出血性大腸菌(以下 EHEC)による全国的な集団発生以来、本菌による発生事例は毎年増加しており、またすでに本菌による汚染は広範囲に拡大している。物流が発達した現在では diffuse outbreak の発生頻度も増え、遠隔地域で分離された菌株間の関連性についても、疫学解析が必要となっている。従来から遺伝子による疫学解析に用いられているパルスフィールド電気泳動法(以下 PFGE 法)はやや煩雑で時間の掛かる検査法であるが、林らが

開発した PCR による IS printing 法は、簡便・迅速に菌株の遺伝子解析が行える方法として、昨年度より本研究班で検討されている。今回我々は、中四国地域で分離された EHEC 株を用いて IS printing 法を行い、PFGE 法と比較して疫学解析を行い、その有用性を検討した。

B.研究方法

(1)材料

平成18年から19年に岡山県下で分離された EHEC68 株(O157:H7 VT1,2 ; 56

株、O157:H7 VT2; 11 株、O157:H-VT1,2; 1 株)を用いて検査を行った。さらに、中四国地域の各県で分離・検査された EHEC 株について、IS printing 法および PFGE 法の結果を用いて菌株相互の疫学解析を行った。

## (2)方法

IS printing 法は、IS printing System (Version 2) (TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。なお、テンプレートは説明書に記載の方法と、これをさらに 10 倍希釈したものを使用した。また、泳動時間はミュールピッドを使用して、100 分間行った。PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、泳動像を画像解析ソフト (Fingerprinting II、Bio-Rad)で解析した。

## C.研究結果

ISprinting 法を実施した結果は、図1に示した。

泳動槽にミュールピッドを用い、キットの取扱説明書に従って添付の青色色素をアガロースゲルの先端付近まで泳動した場合(図の上段)、泳動時間が短いために増幅されたバンド間の距離が詰まり、特に 2nd プライマーによる PCR では分子量の大きいバンドの本数が判別できなかった。また、テンプレートの濃度が濃いためにスメアーになり、一層判別が困難であった。そこで説明書どおりに調製したテンプレートを滅菌水でさらに 2 倍希釈し、これをテンプレートとして使用した。PCR を実施後、泳動時間を 100 分間に延長して泳動した結果(図の下段)、良好な泳動像が

得られて判別が可能になった。

平成 18 年度～19 年度に岡山県で分離された 68 株について IS printing 法を実施し、得られた結果を増幅バンドの有無により解析した。即ち、検出されたバンドを「1」、検出されなかった場合は「0」として表を作成し、検出バンドの本数とパターン(以下 IS printing パターン: 1st-本数 : 2nd-本数と表記)を PFGE 型と比較した(表1)。

PFGE 型の異なる菌株が同じ IS printing パターンを示したグループは O157:H7 VT1,2 の菌株で 4 グループあり、それぞれの IS printing パターンに属する PFGE 型は 2～3 種類で、1st-13:2nd-8 (a259,b193,b330)、1st-15: 2nd-11 (b374,b45)、1st-14: 2nd-12 (c306,c312)、1st-12: 2nd-11 (c5341,c535)であった。他の血清型あるいは毒素型の株では、すべて同じ PFGE 型の株が同一の IS printing パターンを示した。

中四国地域で分離された EHEC 株のうち、後述の報告(各県の担当者により報告)に使用した菌株および岡山県で分離された菌株の一部を用いて、IS printing パターンと PFGE 型を比較した(表2)。

同じ IS printing パターンを示したグループは 10 グループあり、1st-6 : 2nd-8 (b423,c17)、1st-7:2nd-7(c120,c121,c122,c184)、1st-8 : 2nd-8 (c674,c26)、1st-9 : 2nd-9(c177)、1st-11 : 2nd-8 (b113,b664)、1st-12:2nd-11 (c534,c535)、1st-13:2nd-8 (a259,b193,b330)、1st-13:2nd-11 (a718,c45)、1st-14:2nd-12 (c312,c306,a718)、1st-15 : 2nd-11 (b374,b45)で、各グループには 1～4 種類の PFGE 型の菌株が含まれていた。このうちの 1st-6 : 2nd-8 (b423,c17)を除いて、同じ IS printing パターンを示した 9 グループについて、IS



printing パターンが近似した菌株 2 株(KA1 および KA9)を加え、グループ内の菌株の PFGE パターンによるクラスター解析を行った(図 2)。その結果、7 グループでは 90%以上の相同性が見られ、他の 2 グループの相同性は 85%以上と 76%以上であった。各グループの同じ県内から分離された菌株相互の相同性は 92%以上あり、他県で分離された菌株との相同性は、76%~90.5%であった。特に徳島県で分離された菌株と他県で分離された菌株との相同性が低いグループ(1st-13:2nd-8 (a259,b193,b330))があり、また IS printing パターンが 1st-13:2nd-11 (a718,c45)の 2 株と近似した KA1(a85)、および 1st-14:2nd-12 (c312,c306, a718)の 3 株と近似した KA9(c364)のグループは、それぞれの IS printing パターンに近似した香川県の株との相同性(各 89.5%と 84%)が、徳島県の株との相同性(各 85%と 76%)よりも高かった。

一方、同じ PFGE 型の菌株を集めると 7 グループに分類され、各グループ毎に IS printing パターンを比較した(表 3)。

4 グループでは IS printing パターンが異なっていたが、それらの IS printing パターンは増幅バンド 1 本の違いで近似していた。

#### D. 考察

現在、分離菌の遺伝子を用いた疫学解析には PFGE 法が頻繁に利用されているが、煩雑で結果が出るまで時間が掛ることなどから、簡便・迅速でより詳細な解析が可能な代替法の開発が望まれている。IS printing 法による遺伝子解析は、PCR 法で複数のプライマーを用いて遺伝子の一部を増幅し、増幅されたバンドの大きさと本数を疫学指標と

して解析する方法である。同時に *aeae*、*hlyA*、*stx1,2* の各遺伝子の保有も確認できるため、より多くの疫学指標を提供することができる。今回、IS printing 法と従来の PFGE 法を用いて、中四国地域で分離された EHEC 株の遺伝子解析を実施し、疫学解析の指標として両検査法の有用性を比較検討した。IS printing 法では、PCR 後の電気泳動にミュールピッドを使用している施設が多く、キットの説明書どおりに泳動した場合、特に 2nd プライマーによる増幅で分子量の大きいバンド同士の間隔が詰まり、識別が困難であった。このため泳動時間を延長して約 100 分間泳動すると、これらのバンドの間隔は広がり十分判別可能になったが、泳動途中に指標となる添付の青色色素がゲル中に流れ出して、目視による泳動状況の確認は困難になった。したがって、電気泳動にミュールピッドを使用するときは、キットに添付された色素以外の loading buffer を使用して、泳動状況が目視できるように改良する必要がある。

IS printing 法と PFGE 法の結果を比較すると、1~4 種類の PFGE 型の菌株が同じ IS printing パターンを示した。一方、同じ PFGE 型の菌株によ IS printing パターンは概ね一致しており、異なる場合でもバンド 1 本の違いで近似しており、PFGE 型は IS printing パターンに比べ、より詳細な疫学指標を提供することが示された。同一 IS printing パターンで異なる PFGE 型の菌株について PFGE パターンのクラスター解析を行った結果、多くの場合同一県内で分離された菌株相互の相同性が他県で分離された菌株との相同性より高く、疫学的により関連があることが伺える。しかし一部の株では他県で分離された菌株との相同性の方が高

い例もあり、広域に流通した食材や食品を介した感染の可能性が考えられた。また、徳島県から分離された菌株の一部は、同じ IS printing パターンを示す 3 つのグループで他県の菌株に比べて最も相同性が低く(76%~90.5%)、特徴的な菌であることが示された。

#### E. 結論

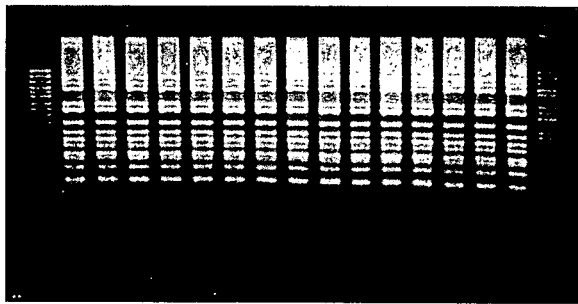
これらのことから、疫学指標としては PFGE 法が IS printing 法に比べてより詳細なデータを提供できるものと思われた。しかしながら、集団発生や diffuse outbreak が疑われる場

合には、早期に行政対応が求められるため、迅速・簡便に疫学解析が可能な IS printing 法によるスクリーニングは有効であり、目的と用途により検査法を使い分けて、いち早く行政的な対応を可能にすることが肝心であると考え。今後はさらに多くの菌株を使用して IS printing 法を行い、実際の事例に使用可能なスクリーニング法としての有用性を、継続して検討していく必要があると考える。

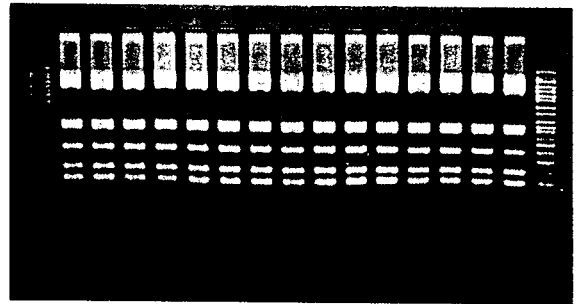
#### F. 研究発表

なし

#### IS printing 泳動時間50分、テンプレート濃度一濃い

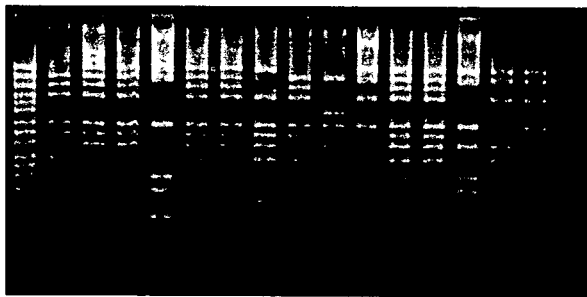


1st

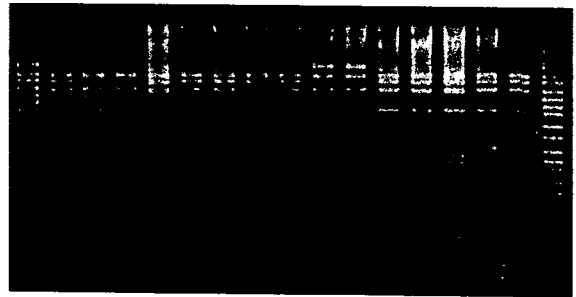


2nd

#### IS printing 泳動時間1時間50分、テンプレート濃度一倍希釈



1st



2nd

図 1. IS printing 法の条件の検討

ミューピッド使用

表1. 岡山県で分離されたO157株のPFGE型、IS printingパターンの比較(2006～2007年)

血清型	毒素型	PFGE型	株数	ISパターン			
				1st(バンド数)	2nd(バンド数)	株間の比較	他のPFGE型との比較
O157:H7	1,2	a259	27	13	8	同一	
		b193	1	13	8		a259と同一
		b330	4	13	8	同一	a259と同一
		b374	1	15	11		
		b45	2	15	11	同一	b374と同一
		c306	4	14	12	1株のみ1本相異	
		c312	4	14	12	同一	c306と同一
		c534	5	12	11	同一	
		c535	1	12	11		c534と同一
		b277	4	14	10	同一	
	b369	3	11	11	同一		
	2	b6	4	9	7	同一	
		c47	4	10	8	同一	
		c73	1	9	7		b6と異なる
		341	2	14	10	同一	b277と1st,2ndとも2本異なる
c177		1	9	9			
O157:H-	1,2	c177	1	9	9		
	計		68				

表2. 中四国分離株のIS printing パターンによるPFGE型のバリエーション(2006~2007年)

1st set 結果

菌株No.	HK1	HK7	T12	T13	T14	T15	T16	KA8	T11	E8	1251	1119	1248	T18	1303	T1
血清型	O157:H7		O157:H7					O157:H7		O157:H-		O157:H7			O157:H7	
毒素型	2		2					2		1,2		2			2, 1,2	
PFGE型	b423	c17	c120	c121	c120	c122	c184	c674	c26	c177	c177	b6	c73	c345	c47	c123
Primer No	Size (bp)	同一		同一				同一		同一						
1-01	974	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
1-02	839	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
1-03	742	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
1-05	595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1-07	495	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1-08	442	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1-09	405	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
1-10	353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1-13	289	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-14	241	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eeae	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
バンド数		6	6	7	7	7	7	7	8	8	9	9	9	9	9	10

2nd set 結果

Primer No	Size (bp)	同一		同一				同一								
2-01	987	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
2-02	861	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	801	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
2-04	710	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1
2-05	642	1	1	0	0	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	0	0	0	0
2-07	555	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
2-08	499	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
2-09	449	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-11	358	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	301	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
2-14	278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
stx2	181	1	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
バンド数		8	8	6	7	7	7	7	8	8	9	9	7	7	6	8