

KA4	KA5	1146	HK14	1331	1333	E2	T3	T7	T10	E1	1227	E7	1199	1208	T2	T5
O157:H7				O157:H7						O157:H7						
2		1,2	2	1,2						1,2						
b113	b664	b369	c562	c534	c535	a259	c187	a781	b879	a259	a259	b193	b330	b193	c192	b330
同一				同一						同一						
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	11	11	11	12	12	12	12	12	12	13	13	13	13	13	13	13

同一				同一						同一						
1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	8	11	8	11	11	8	11	11	9	8	8	8	8	8	8	8

1260	KA1	T9	KO1	1231	1245	HK8	1284	1321	T8	KA9	1135	1137	
O157:H7				O157:H7								O157:H7	
1,2				1,2		2		1,2				1,2	
c306	a85	a718	c45	b 277	341	c304	c312	c306	a718	c364	b374	b45	
同一				同一				同一				同一	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
13	13	13	13	14	14	14	14	14	14	14	15	15	

* : RPLA(+), PCR(-)小林プライマー
E:愛媛
KA:香川
T:徳島
KO:高知
HK:広島県
数字のみ:岡山

同一				同一				同一				
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
12	12	11	11	10	10	11	12	12	12	11	11	11

表3. 同じPFGE型を示した中四国分離株のIS printing パターンのバリエーション

1st set 結果

菌株No.	E8	1251	T12	T14	E2	E1	1227	E7	1208	1199	T5	1260	1321	T9	T8
血清型	O157:H-		O157:H7		O157:H7			O157:H7		O157:H7		O157:H7		O157:H7	
毒素型	1,2	1,2	2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
PFGE型	c177	c177	c120	c120	a259	a259	a259	b193	b193	b330	b330	c308	c308	a718	a718
Primer No	Size (bp)	近似		近似		近似		近似		近似		近似			
1-01	974	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1-02	839	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-03	742	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1-04	645	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-05	595	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	0	0
1-07	495	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1-08	442	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-09	405	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1-10	353	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-11	325	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	300	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ea	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	1	1	1	1	0	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
バンド数		9	9	7	7	12	13	13	13	13	13	13	14	13	14

2nd set 結果

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

*: RPLA(+), PCR(-)小林プライマー

E:愛媛

KA:香川

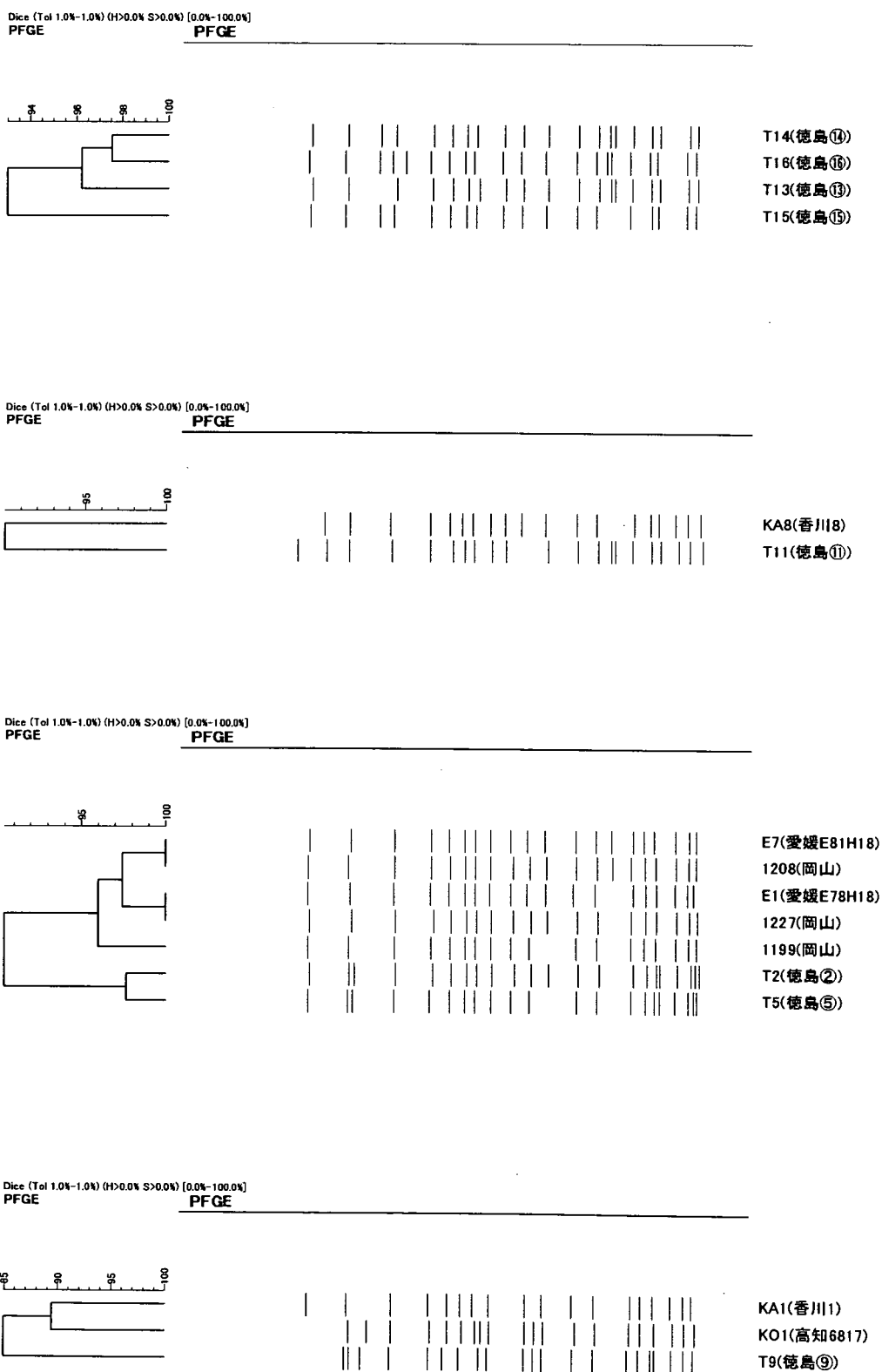
T:徳島

KO:高知

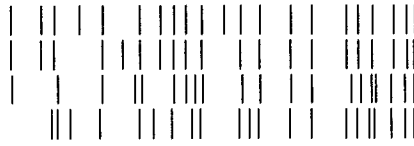
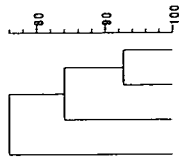
HK:広島県

数字のみ:岡山

図2. PFGEパターンのクラスター解析

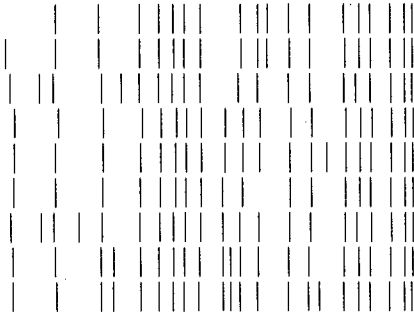
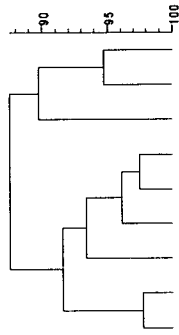


Dice (Tot 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE



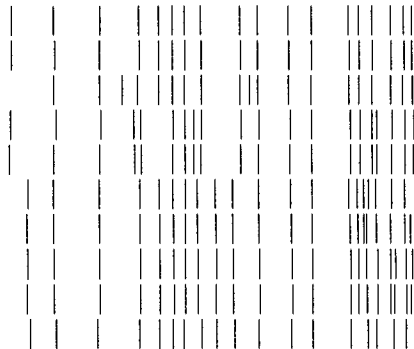
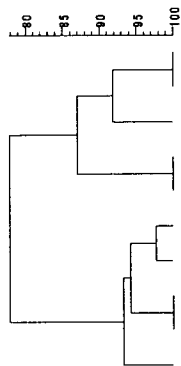
1321(岡山)
1284(岡山)
KA9(香川9)
T8(徳島⑧)

Dice (Tot 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE



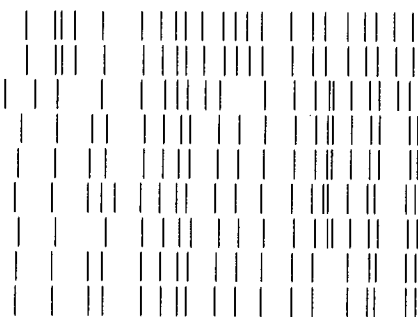
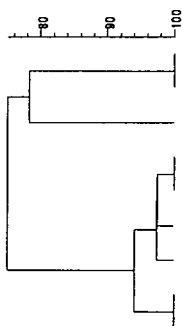
1135(岡山)
1137(岡山)
1284(岡山)
1227(岡山)
1208(岡山)
1199(岡山)
1321(岡山)
1331(岡山)
1333(岡山)

Dice (Tot 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE



KA1(香川1)
KA2(香川2)
KA3(香川3)
KA9(香川9)
KA10(香川10)
KA4(香川4)
KA5(香川5)
KA6(香川6)
KA7(香川7)
KA8(香川8)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) (0.0%-100.0%)
PFGE



T18(徳島⑧)
T19(徳島⑨)
T11(徳島⑩)
T12(徳島⑪)
T14(徳島⑫)
T16(徳島⑬)
T13(徳島⑭)
T15(徳島⑮)
T17(徳島⑯)

鳥取県で分離された腸管出血性大腸菌O157の分子疫学解析におけるIS Printing法の検討

研究協力者 鳥取県衛生環境研究所 上田 豊

研究要旨

マルチプレックスPCRを用いたIS Printing法の遺伝子型別能について検証試験を行った。対象菌株は当所で分離された腸管出血性大腸菌O157菌株のうちパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子型別で同一とされた5株を用いた。1stでは全菌株でバンドが一致し、スクリーニングとして有効である可能性が示された。しかし、陽性コントロールの安定、2ndでの試験結果の精度、バンドの密集による判定の困難さが課題として考えられた。

A. 研究目的

細菌の遺伝子型別法としてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による方法が一般に知られている。しかし、これは結果がでるまで3日ほどかかり、また手技も煩雑である。これらを解決する方法としてマルチプレックスPCRを用いたIS Printing法が開発された。

今回この方法が、当所でも遺伝子型別試験として十分に機能するものか検証することを目的としてこの研究を行った。

B. 研究方法

平成18年度当所で分離された腸管出血性大腸菌O157菌株のうちPFGEによる遺伝子型別試験(国立感染症研究所実施)で同一とされた5株を検討対象とした。5株のうち4株(県No1~4)は同一集団での発生であった。

この5株をIS Printingキット(東洋紡株式会社、福井県)を用いて、分析を実施した。

C. 研究結果

1stでは全株のバンドが一致した。2ndでは5株中4株がすべてのバンドが一致した。しかし、1株(県No1)では1本のバンド(stx1)が他の4株と異なり欠けていた。(表及び図1、図2)。また、テンプレート陽性コントロール及び泳動陽性コントロールは1st、2ndいずれでもバンドが不明瞭なものがしばしばみられた。

D. 考察

1stでは5菌株のバンドが完全に一致し、これを用いたスクリーニングが有効である可能性が示された。しかし、陽性コントロールではバンドの不明瞭なものがあり、陽性コントロールの安定が課題と考えられた。

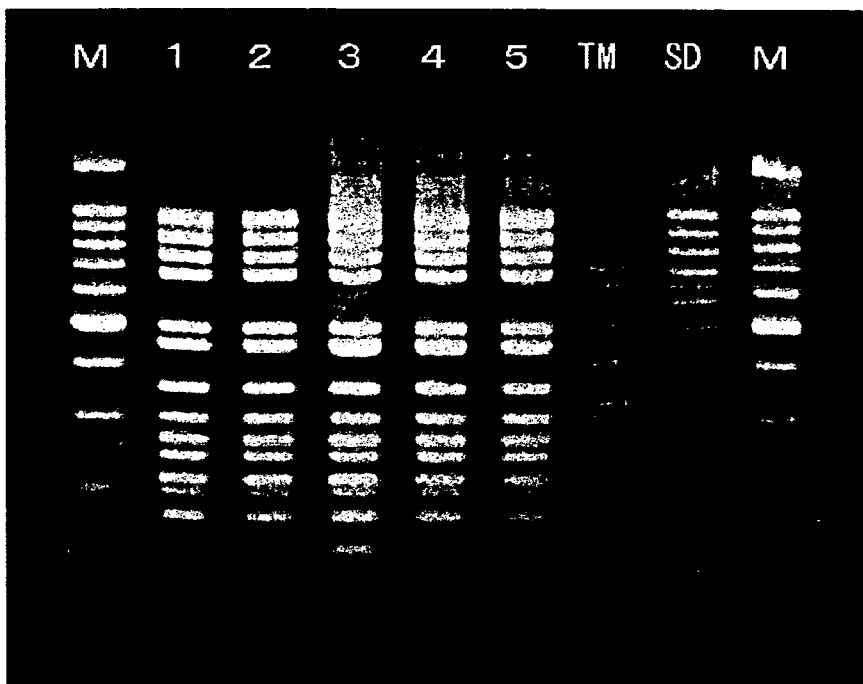
2ndでは1つの菌株で1本のバンドが欠けており、PFGEの型別とは異なるものとして判断された。しかし、この菌株は他の菌株と同一集団の1つであり、以前当所で行ったPCRでもstx1は検出されており、試験結果の精度に問題があると考えられた。また、2nd

ではサイズの大きいものは非常に密にバンドが並んでおり、判定が微妙なものが混在した。この密な配列による判定の困難さも今後この手法が普及する上で課題の1つと考えら

れた。

陽性コントロールのバンドの一部が不明瞭であることは、1st同様の課題と考えられた。

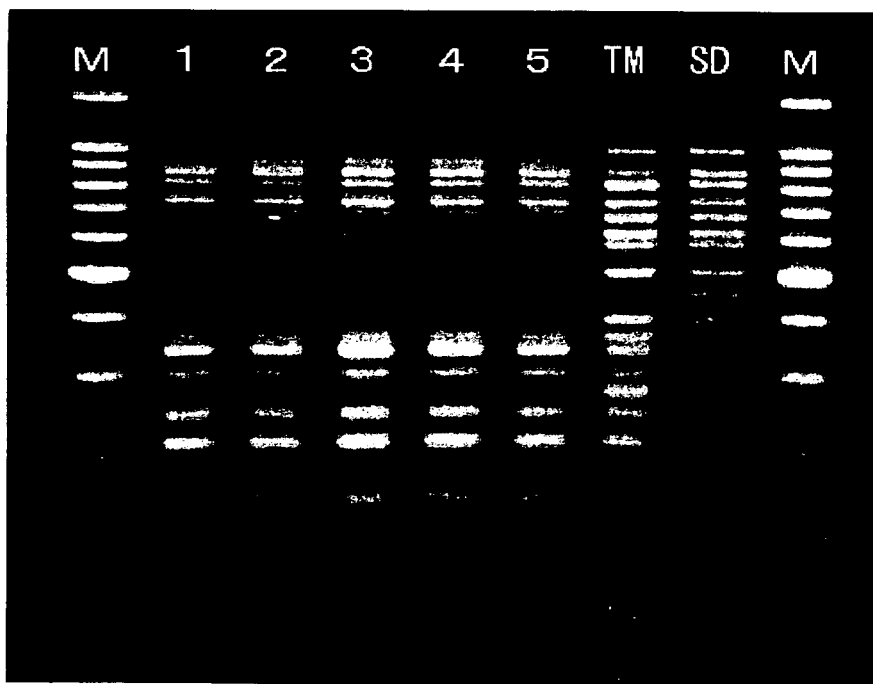
図1 1st 電気泳動写真



泳動写真

- M : マーカー
- 1 : 県 No 1
- 2 : 県 No 2
- 3 : 県 No 3
- 4 : 県 No 4
- 5 : 県 No 5
- TM : テンプレート
陽性コントロール
(テンプレートミックス)
- SD : 泳動
陽性コントロール
(スタンダードDNA)

図2 2nd 電気



- M : マーカー
 - 1 : 県 No 1
 - 2 : 県 No 2
 - 3 : 県 No 3
 - 4 : 県 No 4
 - 5 : 県 No 5
 - TM : テンプレート
陽性コントロール
(テンプレートミックス)
 - SD : 泳動
陽性コントロール
(スタンダードDNA)
- 腸管出血性大腸菌
O157 における

PFGE 解析法と IS-printing system 解析法の比較検討

研究協力者 広島県立総合技術研究所保健環境センター 大原祥子 竹田義弘

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の集団感染が疑われた事例株等を用いて PFGE 法と IS-printing System (IS 法) によるサブタイピングの比較検討を行った。その結果, IS 法は PFGE 法とほぼ同様な解析結果が得られたことから, PFGE 法と比べて簡便性・迅速性に優れたサブタイピング法と思われた。

A. 研究目的

今回, IS (Insertion sequence) の分布を利用したマルチプレックス PCR による EHEC O157 サブタイピング法の有用性について PFGE 法と比較検討した。

B. 供試菌株および方法

1. 供試菌株には, ①2007 年 2 月に分離された PFGE Type b423, 6 株およびそれらと 3 バンド異なる c17, 1 株, ②同年 7 月に分離された PFGE Type c304, 6 株および c562, 1 株の計 14 株を用いた。このうち b423 および c304 は集団感染が疑われた事例株, c17 および c562 はそれらの事例と同じベロ毒素型で発生時期・地域が類似した事例株である。また, PFGE Type は国立感染症研究所から還元された Pulse Net No. を示す。

2. IS 法は IS-printing System キット (東洋紡績) を用いて実施した。

C. 研究結果

1. PFGE 法で 4 Type に分類された事例株は, IS 法では 3 パターンに分類された。

2. 集団感染が疑われた PFGE Type が同じ株は, IS 法でもすべて同じパターンを示した。

3. PFGE Type が異なる株のうち, ①の b423 および c17 は IS 法では同じパターンを示し

たが, ②の c304 および c562 はパターンが異なった。

4. ①の b423 および c17 には 1st set Primer で約 220bp に Standard DNA バンド (M) と一致しないエキストラバンドが認められた。

D. 考 察

IS 法は PFGE Type が同じか, PFGE パターンが類似した株では同一パターンを示したことから, IS 法の解析能は PFGE 法とほぼ同程度と考えられた。また, IS 法は PFGE 法と比べて簡便性・迅速性に優れており, EHEC O157 の集団感染発生時において有用なサブタイピング法と思われた。

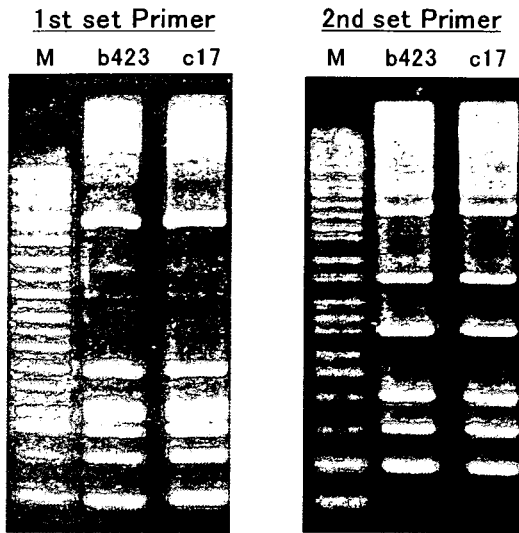


図1 供試菌株①の IS 法パターン

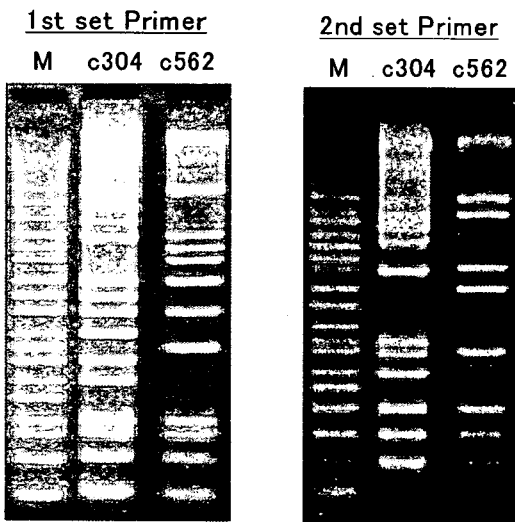


図2 供試菌株②の IS 法パターン

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-printing system の検討

研究協力者 広島市衛生研究所

末永 朱美 国寄 勝也 毛利 好江 蔵田 和正

石村 勝之 伊藤 文明 笠間 良雄 吉岡 嘉暁

研究要旨

広島市で分離された感染研 Type No.a259 を主とした腸管出血性大腸菌 O157 10 株と a259 株を分離した同一患者の菌株と糞便から複数分離した菌株各 4 株計 18 株を用いて、IS-printing system の検討を行った。その結果、再現性も良く、PFGE 法による解析と同等の識別能があることが示唆された。しかし、泳動条件、解析方法などでいくつかの課題も認められた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学的解析法として、現在制限酵素による DNA 切断パターンの比較によるパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) が広く用いられているが、操作が煩雑であり、解析に 3 日を要する。そこで近年、IS 構造多形性を示すゲノム領域を標的とし、数時間で結果判定ができるマルチプレックス PCR 法による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法 IS printing System が開発された。この IS-printing system を用いて、その有用性を検討した。

B. 研究方法

1 供試菌株

2006 年度に当所で分離され感染研にて PFGE Type No.(TN)a259 と分類された菌株 4 株、同じく 2007 年度に分離された TN a259 4 株、2006 年度に分離された TN b129 1 株、2007 年度に分離された TN c73 1 株、計 10 株を用いた (表1)。これをグループ A とする。

また、2007 年度に広島市内で発生した腸管出

血性大腸菌 O157 感染事例の患者から分離した菌株からの再分離コロニー 4 株および糞便から分離した 4 株、計 8 株を用いた (表 2)。これをグループ B とする。

2 方法

IS-printing system (東洋紡) のキットを用いて添付書類の記載条件で PCR を実施した。なお、テンプレートは「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」平成 18 年度総括・分担研究報告書の報告に基づいて作製した。ミューラーヒントン寒天培地上で 1~2 mm のコロニーをかきとり、50 μ l の 25mM NaOH 水溶液に懸濁後、95°C で 5 分間加熱し、4 μ l の 1M Tris-HCl 水溶液を加えて中和し、12000rpm、5 分間遠心したその上清を用いた。電気泳動のゲルは NuSieve GTG:SeaKem GTG=2:1 を 3% 濃度で作製し、泳動 Buffer は 0.5 \times TBE を用いて約 1 時間泳動した。クラスター解析は Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いてバンドを目視で補正後、類似係数を実験により取得しデンドログラムタイプは UPGMA 法で解析した。

C. 研究結果と考察

グループ A について、TN a259 の株は8株とも同じパターンを示した。1st セットでは primer No.2,3,4,7,8,10,12,13,14,15,16 と eae, hlyA の 13 本のバンドが、2nd セットでは primer No.2,3,4,11,12,15 と stx1,2 の 8 本のバンドが確認された。TN b129 (6023) は 1st セットでは primer No. 1,2,4,7,8,9,10,12,13,14,15 と eae, hlyA の 13 本のバンドが、2nd セットでは primer No.2,3,4,7,10,11,12,13,15,16 と stx1,2 の 12 本のバンドが確認された。TN c73 (7003) は 1st セットでは primer No.2,6,7,9,13,15,16 と eae, hlyA の 9 本のバンドが、2nd セットでは primer No.1,2,4,7,12,15 と stx2 の 7 本のバンドが確認された。1kbp 以上の位置にスメア状のバンドがあった他にエキストラバンドは確認されなかった(図1)。この泳動写真をスキャナーで取り込み、Fingerprinting II (Bio-Rad) にてクラスター解析を行った結果を図3に示す。検出バンドの太さにより映像の取り込みがうまくいかず、同一とみなされないバンドがあり、TN a259 の 8 株のうち 6021 のみ 96.3% の相同性であったが、他 7 株は 100% の相同性であった。TN b129, c73 においては PFGE とほぼ同様にクラスタリングされた。

TN a259 株を分離した患者の菌株および糞便から再度分離したグループ B については、全て同じ位置にバンドが確認でき、本法の再現性が認められた。バンドは 1st セットでは primer No.2,3,4,7,8,10,12,13,14,15,16 と eae, hlyA の 13 本、2nd セットでは primer No.2,3,4,11,12,15 と stx1,2 の 8 本であった(図2)。

テンプレートの作製に関しては、直径 1mm～

2mm のコロニーから作成したが、最終的な増幅産物量は一定ではなくバンドの濃さにばらつきがあり、さらにどの条件が影響を与えているのか明確ではないが、バンドのゆがみが激しく、判定が難しいものがあった。また standard template DNA は PCR サイクル数が 20 サイクルでは供試検体に比べて明らかにバンドが薄かった。特に Primer No.1-06, hlyA, 2-09, 2-13, 2-14, 2-15, stx2 のバンドが薄かったことから、template DNA 濃度の検討が必要と思われる。泳動時間は 60～70 分で loading buffer が流れきってから 5～10 分後が最も泳動距離が長くバンドの分離も良かったが、バンド自体が流れてしまう可能性も高いため、loading buffer の検討が必要と思われた。

解析方法は昨年度の報告書を見る限り統一されておらず、独自の方法で行っているが、バンドがある場合を1、無い場合を0、判定困難を2として数値表記し excel 形式でまとめる、という方法で統一していくためにも統計学的に妥当かつ簡便な解析方法を検討する必要がある。Fingerprinting II (Bio Rad)での解析はバンドのあるなしを画像で判断するため、泳動像が鮮明であることが要求される。今回はバンドの濃さによる泳動像のばらつきが画像に影響し、見た目のバンドの判断(表3、4)と Fingerprinting II (Bio Rad)のバンドの判断が一致していない例があった。また今回は特に見られなかったが、エキストラバンドの扱いなども解析に影響を与えるので統一した見解が必要と思われる。

D 結論

TN a259 と分類された 8 株と、同一の患者の糞便

またはコロニーから分離された8株は同一のバンドパターンが再現性良く得られ、他のTNのものは異なるバンドパターンを形成した。PCR 法を用い、キット化されている IS-printing system は、迅速性、簡便性という点で大変優れており、今後広域の疫

学解析において有力な手段となることが期待される。ただし、そのためにも泳動条件や解析方法を検討し標準化を図る必要があると思われた。

F 研究発表
なし

図 1

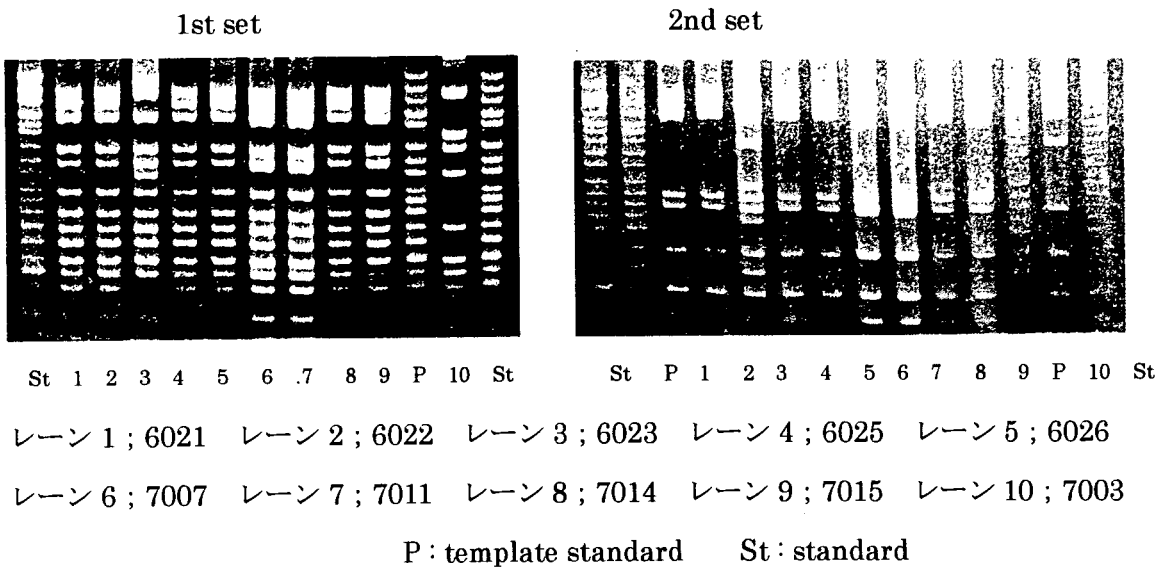


図 2

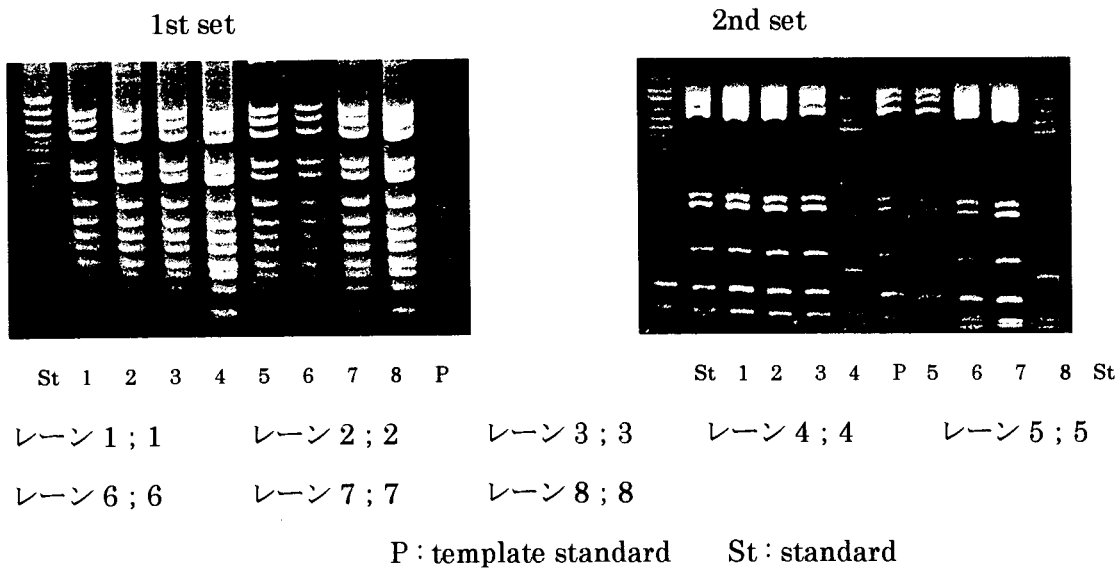


図3 IS-printingによる解析結果

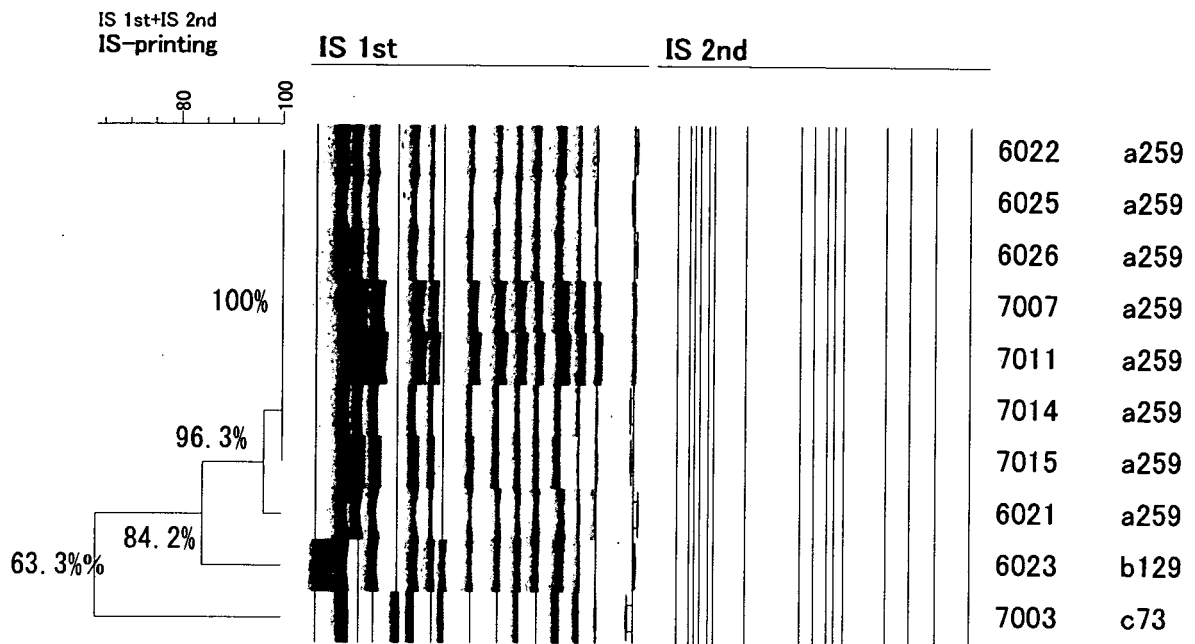


表1 供試菌株

菌株番号	感染研 Pt	血清型	VT type
6021	a259	O157 : H7	VT1+VT2
6022			
6025			
6026			
7007			
7011			
7014			
7015	b129		
6023			
7003	c73		VT2

表2 供試コロニー

分離コロニー 番号	由来
1	7007の菌 株
2	
3	
4	
5	7007の糞 便
6	
7	
8	

表3 1st set 判定結果

Primer NO.	6021	6022	6025	6026	7007	7011	7014	7015	7003	6023
1-01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1-02	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-03	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1-04	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-06	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1-07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-08	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-09	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1-10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-12	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-14	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1-15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
eae	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
hlyA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

表 4 2nd set 判定結果

Primer NO.	6021	6022	6025	6026	7007	7011	7014	7015	7003	6023
2-01	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2-02	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-03	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2-04	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-07	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
2-08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-11	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
2-12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
stx2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1

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

～同一患者内における PFGE パターン変化の有無～

研究協力者 広島市衛生研究所

蔵田 和正 国寄 勝也 末永 朱美 毛利好江

石村 勝之 伊藤 文明 笠間 良雄 吉岡嘉暁

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染事例の一患者内における PFGE パターンの変化の有無を検討することを目的とし、1 人の患者の糞便および菌株からの複数コロニー(20 コロニー)に対して、PFGE 解析を行った。その結果、1 コロニーのみ PFGE パターンの変化が認められたが、その変化は 1 バンドのみであり、大きな変化ではなかった。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症事例において、分離菌株間の遺伝子型を比較し、同一由来の可能性を検討する目的でパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による疫学解析が行われているが、通常、その解析は、患者 1 人に対し 1 コロニーを用いて行っている。しかし、一患者に対して複数コロニーを用いた場合、PFGE パターンに違いがある可能性もある¹⁾。そこで、今回、一患者内における PFGE パターン変化の有無の程度を検討することを目的とし、1 人の患者の複数コロニーに対して解析を行うと同時に検査者の PFGE 手技の安定性の確認を行った。

B. 研究方法

1. 供試検体

2007 年に広島市内で発生した腸管出血性大腸菌 O157 感染事例の患者から分離した菌株からの再分離 6 コロニーおよび糞便から分離した 14 コロニーの計 20 コロニーを用いた(表.1)。

2. 検査方法

(i) PFGE 法

国立感染研究所が示したニュープロトコールに準じて行った。

(ii) 解析法

画像解析ソフト(Fingerprinting II, Bio-Rad)によりデンドログラム(系統樹)を作成し解析を行った。

C. 研究結果と考察

1. 菌株の再分離コロニーにおける PFGE パターン

D.Sより分離した菌株を再分離した 5 コロニーは、全て同一の PFGE パターンを示した(Fig.1,2)。

2. 糞便の分離コロニーにおける PFGE パターン (i) 事例ア

D.Sの糞便由来の 4 コロニー(No.7 以外)は、同一の PFGE パターンを示した。1 コロニー(No.7)は他のコロニーよりバンドが 1 本少なかった(図 1,2)。

D.Yの糞便由来の 5 コロニーは同一の PFGE パターンを示した。D.Sの 4 コロニー(No.7 以外)とも、同じパターンを示した(図 1,2)。

(ii) 事例イ

S.Tの糞便から分離した 4 コロニーは、同一の PFGE パターンを示した(図 1,2)。

3. D.Sの糞便由来株(No.7)の PFGE パターンが変化した原因およびその評価

(i) 原因

No.7は、他の株と 1 バンドのみ異なっていることから、遺伝子変異による制限酵素認識部位の追加または消失により、1 バンド不足したパターンが派生したと考えられる。

(ii) パターン変化の評価

Tenoverら²⁾によって提唱されている「PFGE バンド解釈の基準」によると、3 バンド以内の違いの菌株は、ほぼ確実に同じ由来とされており、Fingerprinting IIによる解析においても 95.3%と高い相同性を示した。

4. PFGE 検査手技の確認

上記の結果から、PFGE 検査手技は良好に実施されていると考えられた。

D. 結論

今回、腸管出血性 O157:7 感染事例の同一患者内における PFGE パターンの変化の有無を確認することを目的とし、1 人の患者の複数コロニーに対して、PFGE 解析を試みた。その結果、同一患者内における PFGE パターンの変化が確認されたが、パターンは疫学的分類に影響するような大きな変化ではなかった。

感染研などが行った複数の実験的検討報告²⁾によっても、制限酵素認識部位の変異により、比較的短期間の間でも PFGE パターンの変化が確認されたが、大きなパターン変化は認められていない。これらのことから、1 人の患者に対して複数のコロニーを釣菌して EHEC であることを同定する必要はあるが、費用面や煩雑な操作を必要とす

る PFGE 解析では、解析に供する株数については、原則として、代表株 1 株で解析を行うことが現実的と考えられた。その上で、発生状況や患者情報等の疫学情報と併せて総合的に判断していくことが妥当と考えられる。

F. 研究発表
なし

G. 参考文献

- 1) Tenover, F.C., Arbert, R.D., Goering, R.V. et al. (1995): J. Clin. Microbiol. 33, 2233-2239.
- 2) Atsushi Iguchi, Ro Osawa, Junichi Kawano et al. (2002): J. Clin. Microbiol. 40, 3079-3081.

表1. 供試検体の疫学情報

No.	事例	氏名	由来	血清型	VT. type	感染研Pt. *)			
1	ア	D. S (D. Yの弟)	菌株	a1-1	0157:H7	VT1+2	a259		
2				a1-2					
3				a1-3					
4				a1-4					
5				a1-5					
6			糞便	a3-1			0157:H7	VT1+2	a259
7				a3-2					
8				a3-3					
9				a3-4					
10				a3-5					
11		D. Y	糞便	a7-1	0157:H7	VT1+2	a259		
12				a7-2					
13				a7-3					
14				a7-4					
15				a7-5					
16	イ	S. T	糞便	0157:H7	VT2	b423			
17							x3-1		
18							x3-2		
19							x3-3		
20		菌株	x4	0157:H7	VT2	b423			

*) 感染研Pt.: 国立感染症研究所がPFGE解析を行い、その結果に付けられたPFGEパターン"№".

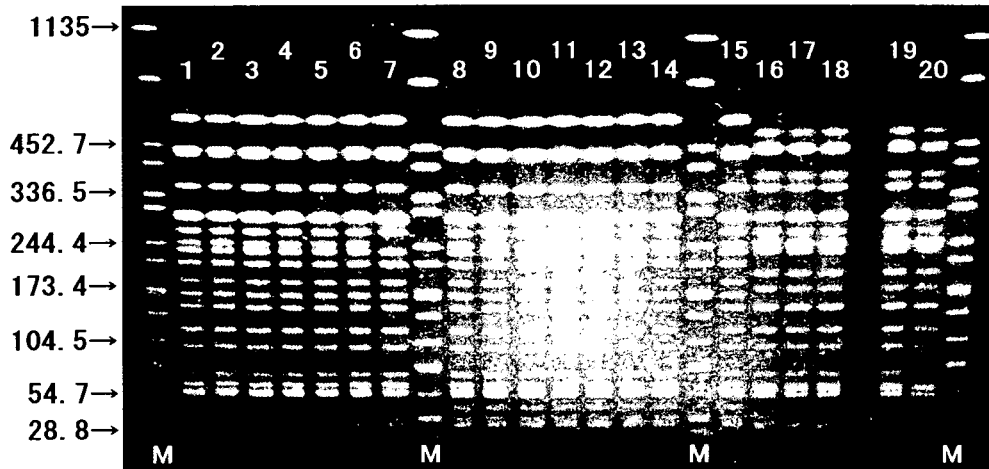


図1. PFGE泳動画像

※ 図中の'No.1~20'は、Table.1の'No.1~20'に対応。
'M'は、マーカー(*S. Braenderup*)。

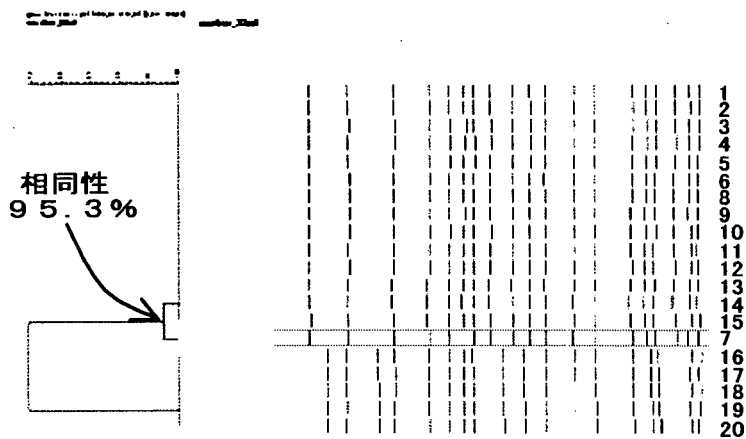


図2. デンドログラム

※ 図中の'No.1~20'は、Table.1の'No.1~20'に対応。

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-printing 法の検討

研究協力者 徳島県保健環境センター 下野生世 澤田千恵子

研究要旨

徳島県内の患者及びその家族等から分離された腸管出血性大腸菌O15719株を用いて PFGE 法と IS-Printing 法を実施し、その結果を比較検討した。これら19株はPFGE法では13タイプに、IS-printing 法では12タイプに分類された。なお、19株は疫学関連性では10グループと推定されることから、IS-printing 法は PFGE 法と比較して、解析能力にやや差があるものの疫学解析には十分有効であると考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析法である PFGE 法の代替法として、操作がより簡便であり、より短時間で判定が可能な IS-printing 法について検討を行った。

B. 研究方法

1 供試菌株

平成18年～19年に徳島県内で発生した患者及びその家族等から分離された菌株19株(VT1&2型:10株, VT2型:9株)を使用した。

2 検査方法

1) IS-printing 法

IS-printing System (東洋紡)を用い、添付のプロトコールに準じて実施した。なお、サンプルの調整は推奨法であるアルカリ溶解法で行い、3%アガロースゲル作成には NuSieveGTG:SeaKem GTG=2:1、泳動 buffer には 0.5×TBE を使用し、Mupid-21 (コスモ・バイオ株式会社)にて泳動を実施、青色色素がゲル末端に到達した時点で泳動を中止した。

2) PFGE法

国立感染症研究所に送付し実施したが、当所でも感染研ニュープロトコールに基づき実施した。

C. 結果及び考察

IS-printingの泳動画像及びPFGE画像は、図1のとおりである。1st set Primer Mix, 2nd set Primer Mix の各プライマーに対する増幅産物の有無を肉眼で判定し、バンドの有る場合を1、無い場合を0と表記した(表1, 2)。またその結果をパターン化し、PFGE 型別と比較した(表3)。

PFGE 型別が同一であり、疫学関連性があると考えられる2株(No.⑧, ⑨)については、IS-printing では異なるタイプを示した。また、疫学関連性があると推定されるが、PFGE 型別では4タイプに分類された6株(No.⑫～⑰)については、IS-printing では stx2(181bp)領域欠損株1株を除き、同一タイプに分類された。しかし、同一タイプと判定した5株についても、2nd IS-printing の primer No.2-09 (449bp)領域においてバンドの濃淡が認められた。19株はPFGE法では13タイプに、IS-printing 法では12タイプに分類され、疫学関連性では10グループと推定されることから、今回実施した方法による IS-printing 法は PFGE 法と比較して、解析能力はやや差があるものの疫学解析には十分有効であると考えられた。