

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 20 年度分担研究報告

保育所における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例

研究分担者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	田口真澄	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	原田哲也	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

2008 年 7 月 30 日に 1 歳女児の腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の届出があり、患児が保育所へ通所していたことから、園児および職員の健康調査と検便を実施した。一時保育利用者を含む園児 13 人、園児の家族 2 人、職員 3 人から EHEC O157（VT2 産生）が分離されたが、疫学マーカー解析により分離株は同一起源であり、保育所内で感染が広がったことが示唆された。

A. 研究目的

2008 年 7-8 月に大阪府内の保育所で発生した EHEC O157 感染症について、実態調査のため園児や職員、家族などから分離された菌株の疫学マーカー解析を実施した。

スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤）についてセンシ・ディスク（BD）を用いた薬剤感受性試験を行った。

C. 研究結果

1. 事例の概要

2008 年 7 月 30 日に大阪府和泉保健所に和泉市内の医療機関より、7 月 24 日発症の 1 歳女児 A から EHEC O157（VT2 産生）が検出されたとの届出があった。A が和泉保健所管内の保育所へ通所していたことから、園児および職員の健康調査と関係者の検便を実施した。当初調査対象となったのは園児（A を含めて 24 人）および職員（8 人）で、7 月 19 日に 3 歳女児 2 人が下痢を呈しており、22 日から 8 月 5 日にかけて 0 歳から 3 歳の園児 14 人（A を含む）と職員 1 人が下痢、腹痛などを発症していた。8 月 6 日までに園児 7 人（A を含む）、

B. 研究方法

菌株は、医療機関および大阪府泉佐野保健所生活衛生室検査課で 18 人から分離された EHEC O157 26 株を使用した。遺伝子解析は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を用いた IS 型別と制限酵素 Xba I（ロシュ）を用いたパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法を実施した。また、12 薬剤（アンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ナリジクス酸、ホスホマイシン、シプロフロキサシン、セフトアキシム、セフボドキシム、

園児の家族 1 人、職員 3 人の計 11 人の感染が判明し、8 月 7 日から 22 日まで閉園することになった。さらに、8 月 8 日に別の医療機関から届出のあった 4 歳女児 B が 7 月 29 日のみ当該保育所の一時保育を利用していただことがわかり、調査対象を 7 月 19 日から 8 月 6 日に一時保育を利用した 33 人と同期間の臨時職員 3 人まで拡大した。その結果新たな感染者が明らかになり、8 月 15 日までに園児 10 人 (A を含む)、園児の家族 2 人、職員 3 人、一時保育利用者 3 人 (B とその弟を含む) の合計 18 人の EHEC 感染が確認された (表 1)。有症者の症状は比較的軽く、B は血便がみられたが、他の患者は水様性下痢であった。

2. 疫学マーカー解析

本事例で分離された EHEC はいずれも血清型 O157:H7、VT2 産生性で、薬剤感受性試験では 12 種類の薬剤に感受性を示した。1 人 1 株ずつ IS 型別と PFGE 法を実施したところ、IS 型は 17 人で同型 (O45047 303443) となったが 1 人 (C) は 1 本異なっていた (図 1)。PFGE は、園児 A を含む 13 人の泳動パターンは一致したが、4 人 (C, D, E, F) は 1 バンド、増菌培養で検出された園児 1 人 (G) は 2 バンド異なるパターンを示した (図 2)。この 5 人は複数のコロニーを釣菌し保存していたため、菌株を追加して解析した結果、全員 IS 型 O45047 303443 で PFGE 型は A と一致する株が確認された。PFGE 型、IS 型とも 2008 年に大阪府内で分離された他の EHEC O157 に同じパターンはみられなかった。

D. 考察

疫学マーカー解析の結果から、IS 型や PFGE パターンに多少の相違はみられたものの、本事例の分離株は同一であることが明らかになった。入手できた給食 18 検体、調理室のふきとり 7 検体の培養検査を実施したが、EHEC は分離されなかった。推定初発園児の発症前 1 週間にあたる 7 月 12 - 18 日の給食を調べることができなかったが、有症者の発症日にピークがないことから、給食が原因である可能性は低く、感染者から直接あるいは汚染された環境 (タオルやおもちゃなど) を介して感染が広がったと考えられた。当該保育所は一時保育利用者が多く、帰省シーズンに重なったことから、保護者への連絡や疫学調査の実施が難しく、調査対象者の検便実施に約 1 箇月を要した。したがって、1 日だけ一時保育を利用した姉弟や閉園中に実施した検便で陽性になった無症状保菌者についても、感染源が当該保育園であることを裏付けることができ、IS 型別や PFGE 法は非常に有用であった。特に IS 型別は簡便で、PFGE 法に比べ結果が早く判明することから、今後も利用されるべき方法であると考えられた。

菌株の提供にご協力いただいた医療機関、検査機関に感謝いたします。

E. 結論

保育所で EHEC O157 感染症が発生したため、分離株の疫学マーカー解析を実施し、分離株が同一であり、大阪府内で分離された他の EHEC O157 とは異なることを明らかにした。

F.健康危険情報

なし

長澤登美代、伊吹てるみ、濱石裕紀：保育所における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例—大阪府（2008 年），病原微生物検出情報（submitted）

G.研究発表

勢戸和子、田口真澄、原田哲也、川津健太郎、神吉政史、依田知子、井上清、柴田敏之、萩原粒子、山本サエコ、中田栄子、

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 調査対象者と調査結果

(2008年9月2日現在)

	調査対象者数	症状	検査実施数	EHEC陽性者数	
園児	24	有	14	8 *1	
		無	10	2	
職員	8	有	1	0	
		無	7	3	
園児（一時保育）	33	有	2	2 *2	
		無	31	1	
職員（臨時）	3	無	3	0	
家族・接触者	52	無	52	48	2
合計	120	有	17	17	10
		無	103	95	8
		計	120	112	18

*1 Aを含む

*2 BとBの弟



図1 分離株のIS型別

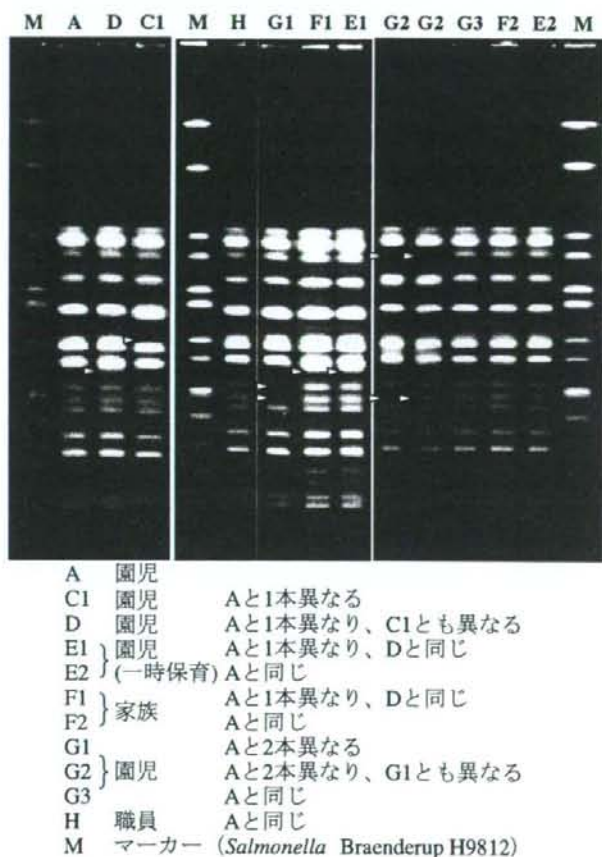


図2 分離株 PFGE パターン

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20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

研究分担者	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
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	蔵田 和正	広島市衛生研究所
	富永 潔	山口県環境保健センター
	宇佐美 実	徳島県保健環境センター
	久保 由美子	香川県環境保健研究センター
	青木 紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	平松 佐穂	高知県衛生研究所
	大畠 律子	岡山県環境保健センター

研究要旨

平成19年度に引き続いて、平成20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 System による検査法の検討を行った。また、パルスフィールドゲル電気泳動法の型別結果と比較して疫学解析を行い、遺伝子解析手法による疫学解析法の評価を行った。各県内で分離された菌株相互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ゲル電気泳動法が IS-printing System よりやや高いように思われたが、その逆の結果を得ることもあった。IS-printing System はパルスフィールドゲル電気泳動法に比べ迅速性・簡便性などに優れており、発生早期に疫学情報と合わせてスクリーニング的に使用することが、感染源究明や感染拡大防止に効果的であると思われた。両法は使用時期や検体数、疫学情報などを考慮して使用することにより、有用な疫学解析法になるものと考えられる。

一方、中四国地域でパルスフィールドゲル電気泳動法による精度管理を実施した。幾つかの県では人事移動により検査担当者が交代したにもかかわらず、総じて結果は概ね良好であった。

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、今日までに本菌による発生事例は増加し汚染は拡大している。さらに発達した物流により、離

れた地域で発生する 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の解析には、遺伝子解析手法を用いた疫学解析が有効である。従来から遺伝子による疫学解析に用いられているパル

スフィールドゲル電気泳動法(以下 PFGE 法)はやや煩雑で時間の掛かる検査法であるが、宮崎大学の林らが開発した PCR による IS-printing System は、簡便・迅速に菌株の遺伝子解析が行える方法として、平成18年度より本研究班で検討している。平成20年度も中四国地域で分離された EHEC 株について IS-printing System を用いて検査し、泳動法の改良や PFGE 法、MLVA 法の結果と比較して疫学解析法としての有用性を検討した。また、中四国国ブロックにおける PFGE 解析技術の確認と維持向上のため、PFGE の精度管理を実施した。

B. 研究方法

(1) 材料

平成20年4月～6月にかけて岡山県下で頻発した EHEC O157:H7, VT2 12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された EHEC 株について、IS-printing System、PFGE 法および MLVA 法により菌株相互の遺伝子解析を行った(中四国各県の詳細な報告は、各県の研究協力者により後述する)。また、岡山県で分離された EHEC O157:H7 VT2 4株、O91:H21 VT2 1株の計5株を用いて、中四国地域の PFGE 法による精度管理を実施した。

(2) 方法

IS-printing System は、TOYOBO 製のキット (Version 2) を用い、取扱説明書に従って実施した。岡山県では昨年度の検討結果からテンプレートを説明書に記載の方法で調製し、これをさらに 10 倍希釈して使用した。電気泳動はミュービッドおよび Pico-2(TAITEC 製)を使用して、プ

ライマーセット毎に判定が容易な泳動時間を検討した。結果は、バンドが検出された場合を「1」、検出されなかった場合は「0」と表記した。さらに各プライマーセット毎にスタンダードのテンプレートで増幅されるバンドの分子量の大きい物から3つずつに区切り、それぞれについて順に 1, 2, 4 ポイントを与え、検出されたバンドのポイントを足した数字を Api の同定コードに準じてコード化して表記した(表 1)。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。

PFGE 法による精度管理は中四国地域の8施設で実施し、泳動像とデンドログラムをメールで当センターに送ってもらい、すべての施設の結果を再度デンドログラムで解析し、比較検討した。

C. 研究結果

平成 20 年 4 月～6 月に岡山県で頻発した EHEC O157:H7 VT2 12 株を用いて IS-printing System を実施した。同時に昨年度実施した結果に基づいて、泳動法の改良を行い、図 1～4 に示した。即ち、キットに添付されている 6X Loading Dye に代えて、市販のキシレンシアノールと BPB を含む Loading buffer を用いた結果、キシレンシアノールは長時間の泳動でもゲル内に止まり泳動状況の良い指標となった。泳動時間は、1st set primer の PCR 産物がミュービッドでは 80 分間、ミュービッドよりゲルが長い Pico-2 は 120 分間、2nd set primer の場合は、ミュービッドで 80 分間、Pico-2 は 135 分

間行った結果、良好な結果を得た。Pico-2の泳動像はゲル長が長いため泳動時間を増やすことで各バンド間の分離がミューピッドより良くなり、特に2nd set primerによる分子量の大きいバンド間の解像度が良くなり泳動パターンが確認しやすかった。

IS-printing Systemの結果は、表1に示した。

IS-printing Systemにより3種類のコードパターン(305457- 611642、012057- 214443、717557- 611653)に区別された。このうち同一家族由来株(No. 1349, 1350, 1351; No. 1355, 1356; No. 1361, 1358; No. 1360, 1363)は同じコードパターンを示した。No. 1349, 1350, 1351以外の株は2つのIS-printing Systemコードパターンを示したが、それぞれのコードパターンはPFGE型により更に細分された。このうち、No. 1355, 1356, 1361, 1358, 1360, 1363は、IS-printing Systemの泳動像中に表れた非特異的な高分子量のバンドを含めたバンドパターンで解析すると、疫学的に関連のある同一家族由来株(No. 1355,1356 ; No. 1361,1358 ; No. 1360,1363)は同じバンドパターンを示し、No. 1355と1356およびNo. 1360と1363はPFGE型別結果と同様に識別可能となった。一方、No. 1361と1358は同一家族由来株であるがPFGE型が異なっており、むしろIS-printing Systemコードパターンの方がPFGE型よりも疫学情報と一致した結果であった。

中四国地域で分離された菌株のうち、8つの地方衛生研究所の報告にある125株について、IS-printing Systemコードパターン毎およびPFGE型毎にまとめて比較した結果は、表3と表4に示した。

IS-printing Systemコードパターン毎にまとめると、97株、27組では複数の株が同一コードパターンを示し、同時に同じPFGE型であったものが11組(40.7%)で、これらは全て同一県内で分離された株同士であった。同一のIS-printing Systemコードパターンを示した株でPFGE型が異なったものは16組(59.3%)で、このうち9組(56.3%)は同一県内で分離された株、7組(43.8%)は複数県で分離された株であった。

また、PFGE型毎にまとめると、77株、23組は複数の株が同一のPFGE型を示し、同時に同一のIS-printing Systemコードパターンであったものが15組(65.2%)で、これらは全て同一県内で分離された株同士であった。同一のPFGE型を示した株でIS-printing Systemコードパターンが異なったものは8組(34.8%)で、このうち2組(25.0%)は同一県内で分離された株、6組(75.0%)は複数県で分離された株であった。

これらのことから、PFGE型別の方がIS-printing Systemコードパターンよりバリエーションが多く、識別能力は高かったが、両法ともいくつかの同じ型あるいはパターンが他法では複数のパターンあるいは型に分かれた。

中四国地域で実施したPFGE法による精度管理結果は、図5、6および7に示した。泳動像では、菌株No.1312の350kbあたりのバンドがA、B、C、E、Fの施設で薄く、菌株No.1355の660kbあたりのバンドはD施設のみが薄かった。これらのバンドは場合によってはバンドと認識しがたいものであった。送付した5株について各施設毎にデンドログラムを作成した結果、ほぼ同様の系統樹を示したが、菌株ごとに各施設間で比較

すると、菌株 No.1355 のみ C 施設が他施設に比べ若干異なっており約 5%の差が見られたが、全体としては概ね良好な結果であった。

D. 考察

現在、PFGE 法は遺伝子解析による疫学解析法として日常的に行われており、詳細な解析が行える反面、操作が比較的煩雑で結果が出るまで数日掛ることなどから、より簡便で迅速な方法として平成 18 年度から継続して IS-printing System の検討を行っている。その結果、IS-printing System は迅速・簡便で疫学情報と一致した結果を提供する遺伝子解析ツールであることが示された。本法は PCR 法であるため、だれでも比較的簡単に利用することができ、同時に検査対象菌の *eae*, *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。しかし、何らかの原因で *stx2* 遺伝子の脱落によるものと思われる、バンドの増幅が見られなかったケースが報告されていることから、長期間保存していた菌株を使用して IS-printing System による検査を実施する場合は、注意が必要である。

PFGE 型別との疫学解析能力の比較では、同じ IS-printing System コードパターンの株が PFGE 法では異なった型になる場合が、反対に同じ PFGE 型の菌株が IS-printing System コードパターンの異なっている場合より多く、PFGE 法は IS-printing System に比べ、概ねより詳細な疫学解析が可能と思われた。ただ、同じ IS-printing System コードパターンを示す同一家族由来株が、ヒトヒト感染間の変異によるものと思われる異な

った PFGE 型を示す場合がある。この場合は詳細な PFGE 型よりもむしろ IS-printing System コードパターンの方が、疫学情報と一致する。これらは PFGE 型やコード化による数字で違いを判別しやすくしているが、基本的には目視による PFGE パターンや IS-printing の泳動パターンの比較と疫学情報に基づいた解析が重要であり、使用時期や使用目的によって使い分けることが有効と考える。IS-printing System は事例発生初期にスクリーニング的に使用することが、迅速に疫学情報を提供する手段として有用であると思われた。

一方、PFGE 法による精度管理では、実施した 8 施設の結果は概ね一致し良好な結果であった。ただ、各地研でデンドログラムを作成すると、薄いバンド等の認識に個人差が出るのが危惧されたため、菌株の PFGE パターンを比較する際は、泳動像のみをやり取りして各施設で独自にデンドログラムを作成し、解析すべきであると考えた。

E. 結論

疫学指標としてより詳細なデータを提供できる PFGE 法に比べて簡便・迅速な IS-printing System は、事例発生初期にスクリーニング的に使用することが有用と思われた。これにより、いち早い行政的対応が可能になると考える。PCR 法に基づいた IS-printing System は、特に PFGE の機器を持たない検査施設では、強力な疫学解析法として役立つものと考えた。

F. 研究発表

なし

表1 IS printing systemによる増幅バンドサイズとコード化のためのポイント

1st set 結果

菌株No.		コード化のための point
PFGE型		
Primer No	Size (bp)	
1-01	974	1
1-02	839	2
1-03	742	4
1-04	645	1
1-05	595	2
1-06	561	4
1-07	495	1
1-08	442	2
1-09	405	4
1-10	353	1
1-11	325	2
1-12	300	4
1-13	269	1
1-14	241	2
1-15	211	4
eae	185	1
1-16	171	2
hlyA	137	4

2nd set 結果

菌株No.		コード化のための point
PFGE型		
Primer No	Size (bp)	
2-01	987	1
2-02	861	2
2-03	801	4
2-04	710	1
2-05	642	2
2-06	599	4
2-07	555	1
2-08	499	2
2-09	449	4
2-10	394	1
2-11	358	2
2-12	331	4
2-13	301	1
2-14	278	2
2-15	240	4
2-16	211	1
stx2	181	2
stx1	151	4

(1st set primer)

STD 1349 1350 1351 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 PTC

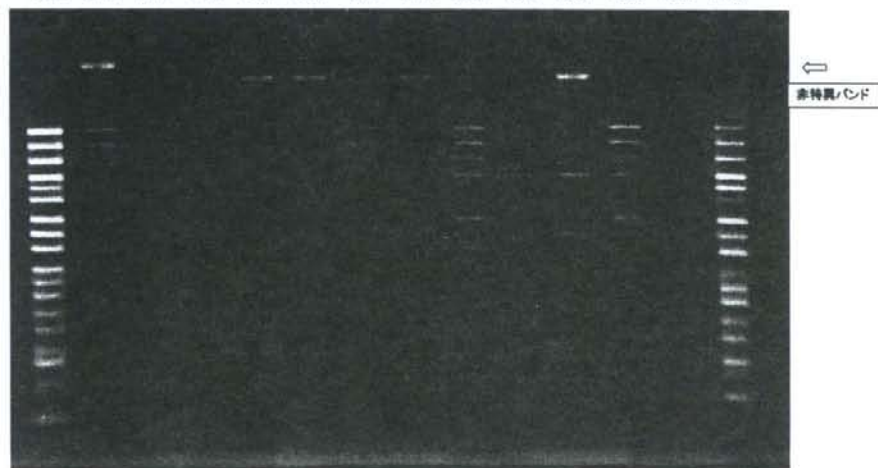


図1 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [ミューベッド 80分間泳動]

(1st set primer)

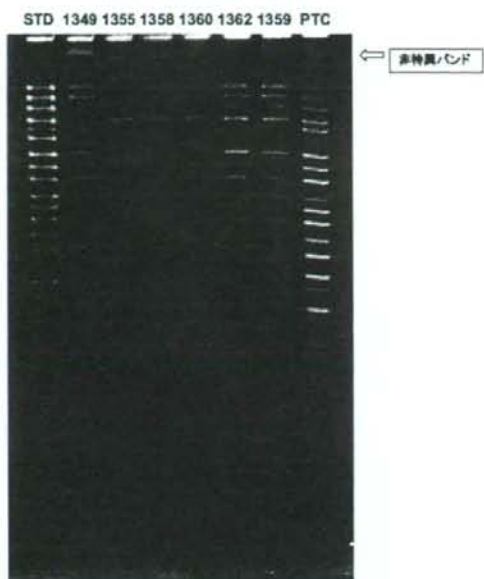


図2 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [TAITEC Pico-2 120分間泳動]

(2nd set primer)

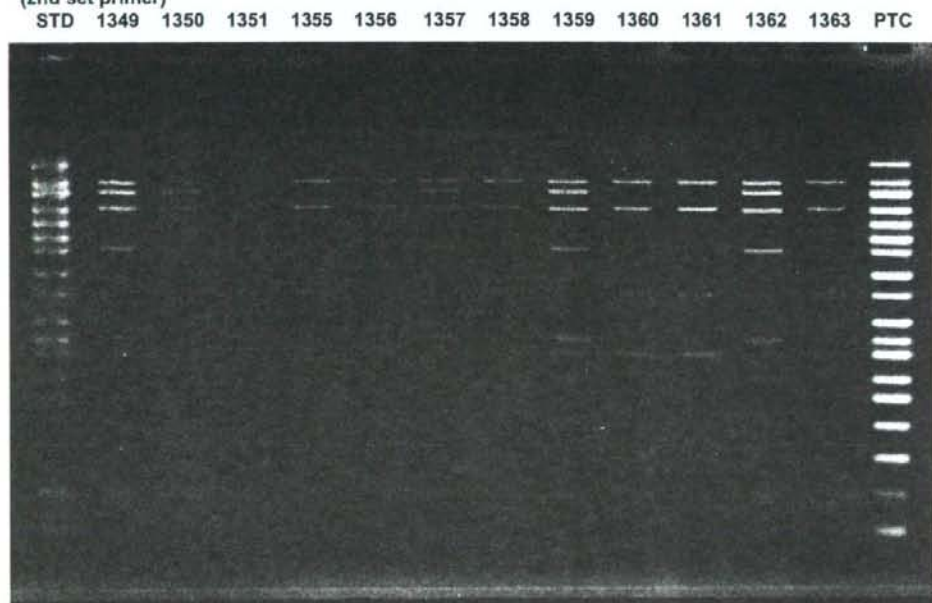


図3 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [ムービーポッド 80分間泳動]

(2nd set primer)

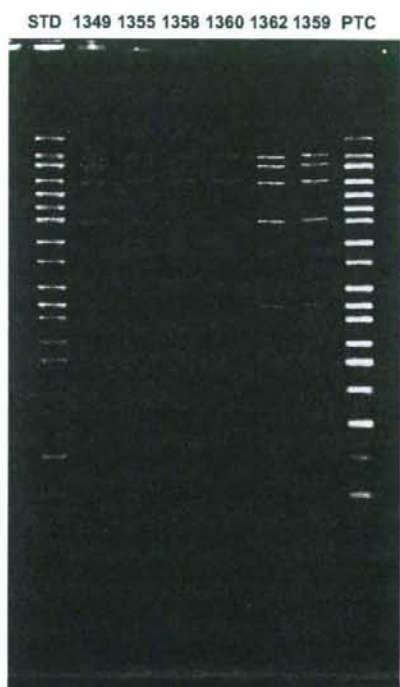


図4 岡山県で多発したO157:H7 STX2 ヒト由来株のIS printing [TAITEC Pico-2 135分間泳動]

表2 岡山県で多発したO157:H7 STX2ヒト由来株のIS printing systemコード/パターンとPFGE型の比較(2008.4~2008.6)

1st set 結果

菌株No.	1349	1350	1351	1355	1356	1361	1358	1360	1363	1357	1362	1359											
PFGE型	c47			d412			d413	d411		d78		d418											
Primer No	Size (bp)	+(大きい非特異バンドあり)			+(大きい非特異バンドあり)			-(非特異バンドなし)															
1-01	974	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1										
1-02	839	1	3	1	3	1	3	0	0	0	0	0	1	7	1	7							
1-03	742	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1							
1-04	845	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1							
1-05	595	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1						
1-06	561	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
1-07	495	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1						
1-08	442	0	5	0	5	0	5	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	7	1	7		
1-09	405	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
1-10	353	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
1-11	325	0	4	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0	5
1-12	300	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	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	1	1	1	1	1	1	1
1-14	241	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
1-15	211	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ean	185	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1-16	171	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7	1	7
hlyA	137	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

[家族] [家族] [家族] [家族]

2nd set 結果

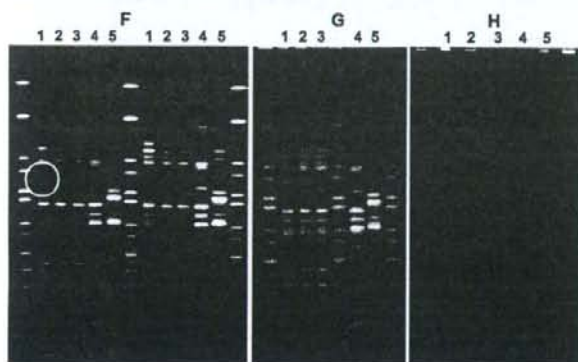
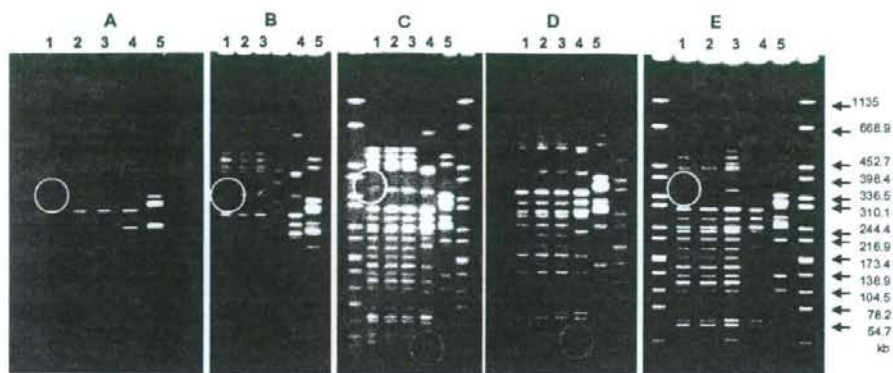
2-01	987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-02	861	1	6	1	6	1	6	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	6	1	6	1	6
2-03	801	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2-04	710	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-05	642	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
2-06	599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-07	555	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2-08	499	0	1	0	1	0	1	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	1	0	1	0	1
2-09	449	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
2-10	394	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-11	358	1	6	1	6	1	6	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	1	6	1	6
2-12	331	1	1	1	1	1	1	1	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	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
2-14	278	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4	0	5	0	5	0	5
2-15	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2-16	211	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
stx2	181	1	2	1	2	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
stx1	151	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表3 同一IS printing system コードパターンに対するPFGE型のバリエーション

IS コード		PFGE型	県名・No	バリエーション数	IS コード		PFGE型	県名・No	バリエーション数
1st set	2nd set				1st set	2nd set			
000445	000026	d256	徳島3			611755	d17	愛媛7	
012057	214443	d412	岡山2		317577	611756	d73	愛媛12	
		d413	岡山3				d78	愛媛13	
		d411	岡山4				d77	愛媛14	
		d918	広島市11				d148	愛媛20	
		b856	山口2				d146	愛媛21	
		b423	山口29				d145	愛媛22	
215443	d354	香川10				d146	徳島2		
015059	414449	d15	広島県10				d17	愛媛1	
055045	303043	d350	山口25				d17	愛媛10	
055047	303443	d177	山口11				d17	愛媛2	
105057	303443	c796	山口21				d17	愛媛3	
114057	303443	d179	山口14		611757	611757	d17	愛媛4	
		d180	山口15				d17	愛媛5	
		d180	山口24				d17	愛媛6	
115057	303447	d183	山口6				d17	愛媛8	
	603443	d229	広島市23			650757	c293	香川5	
117177	601747	d206	広島市2		345457	311652	d154	広島市13	
		d206	広島市3				d523	広島市14	
		d206	広島市4				d57	鳥根9	
		d206	広島市5				d57	鳥根10	
		d77	広島市6				d57	鳥根11	
		d77	広島市7				d893	山口31	
		d206	広島市8				d893	山口32	
		d206	広島市9				d893	山口33	
		d206	広島市10				c148	香川1	
		d206	香川9				c148	香川2	
117575	611755	d138	香川9		516477	611757	c148	香川3	
119199	801949	a206	広島県11				c148	香川4	
	801959	c12	広島県3		517557	611653	d76	広島市1	
155047	303443	d178	山口13		555047	303442	d440	徳島7	
213577	610644	e904	鳥根2		613177	210646	b558	山口17	
		a259	鳥根5				a259	鳥根3	
215455	605243	d913	広島市16		613575	610646	d174	山口5	
		d913	広島市17				d175	山口12	
		d913	広島市18				d380	鳥根1	
301457	610642	d259	徳島5		613577	610646	d259	鳥根4	
		d259	徳島6				d173	山口4	
305057	311457	d277	愛媛17		615055	311456	d71	愛媛11	
		d278	愛媛18		716577	611653	d337	山口1	
305457	611642	d70	愛媛24		717557	611653	d76	岡山5	
		d70	岡山1				d418	岡山6	
	d70	徳島4	d28				山口19		
	d70	愛媛15	d526				広島市15		
305555	711413	d246	鳥根6		611655	611657	d169	山口3	
		d247	鳥根7				d170	山口8	
		d248	鳥根8				d92	山口10	
311057	300457	d547	山口28				d200	山口23	
311555	710417	d335	山口16				d28	山口26	
311657	610253	d335	山口18		717577	611757	d690	山口30	
		d335	山口20				d865	愛媛19	
	d335	広島市20	d865				愛媛23		
	710413	d335	広島市21		815599	810848	d865	広島県1	
315577	611757	d17	愛媛9				d865	広島県2	
317175	211757	d125	徳島1		919559	811855	d76	広島県13	
317177	611557	b325	広島市22			811859	d112	広島県12	
317557	611653	c304	山口22		919599	811859	c210	広島県4	
		650653	広島市12				c210	広島県5	
		211757	広島市19				c210	広島県6	
317575	611757	d359	香川6				c210	広島県7	
		d138	香川7		c210	広島県8			
		d138	香川8		c816	広島県9			

表4 同一PFGE型に対するIS printing system コードパターンのバリエーション

PFGE型	IS コード		県名・No	バリエーション数	PFGE型	IS コード		県名・No	バリエーション数
	1st set	2nd set				1st set	2nd set		
a206	117177	601747	広島市2		d170	717557	611657	山口8	
	117177	601747	広島市3		d173	613577	610646	山口4	
	117177	601747	広島市4		d174	613575	610646	山口5	
	117177	601747	広島市5		d175	613575	610646	山口12	
	117177	601747	広島市8		d177	055047	303443	山口11	
	117177	601747	広島市9		d178	155047	303443	山口13	
	117177	601747	広島市10		d179	114057	303443	山口14	
	119199	801949	広島県11		d180	114057	303443	山口15	
	213577	610644	島根5			114057	303443	山口24	
	613575	610646	島根3		d183	115057	303447	山口6	
a259	613577	610646	島根1	d200	717557	611657	山口23		
	613577	610646	島根4	d224	305457	711242	愛媛15		
	815599	810848	広島県1		305457	711242	愛媛16		
	815599	810848	広島県2	d246	305555	711413	島根6		
	b325	317177	611557	広島市22	d247	305555	711413		島根7
	b423	012057	214443	山口29	d248	305555	711413		島根8
b558	613177	210646	山口17	d256	000445	000026	徳島3		
b858	012057	214443	山口2	d259	301457	610642	徳島5		
c12	119199	801959	広島県3		301457	610642	徳島6		
c146	516477	611757	香川1	d277	305057	311457	愛媛17		
	516477	611757	香川2	d278	305057	311457	愛媛18		
	516477	611757	香川3	d28	717557	611655	山口19		
	516477	611757	香川4		717557	611657	山口26		
c210	919599	811859	広島県4	d335	311555	710417	山口16		
	919599	811859	広島県5	d337	716577	611653	山口17		
	919599	811859	広島県6	d344	311557	710413	広島市20		
	919599	811859	広島県7		311557	710413	広島市21		
c293	919599	811859	広島県8	d350	055045	303043	山口25		
	c293	317577	611757	香川5	d352	311557	610253		山口18
c304	317577	611653	山口22		311557	610253	山口20		
	317577	650653	広島市12	d354	012057	215443	香川10		
c405	717577	611757	愛媛19	d359	317575	611757	香川6		
	717577	611757	愛媛23	d411	012057	214443	岡山4		
c47	305457	611642	岡山1	d412	012057	214443	岡山2		
	305457	611642	徳島4	d413	012057	214443	岡山3		
c57	345457	311652	島根9	d418	717557	611653	岡山6		
	345457	311652	島根10	d440	055047	303442	徳島7		
	345457	311652	島根11		215455	605243	広島市16		
c796	105057	303443	山口21	d513	215455	605243	広島市17		
c816	919599	811859	広島県9		215455	605243	広島市18		
c904	213577	610644	島根2	d516	012057	214443	広島市11		
d112	919559	811859	広島県12	d523	317577	650757	広島市14		
d125	317175	211757	徳島1	d524	317575	211757	広島市19		
d138	317575	611755	香川9	d526	717557	611657	広島市15		
	317575	611757	香川7	d529	115057	603443	広島市23		
	317575	611757	香川8		115057	603443	広島市24		
	317577	611756	愛媛20	d547	311057	300457	山口28		
d148	317577	611756	愛媛21	d690	717557	611657	山口30		
	317577	611756	愛媛22		351557	710413	山口31		
	317577	611756	徳島2	d693	351557	710413	山口32		
d15	015059	414449	広島県10		351557	710413	山口33		
d154	317577	650757	広島市13	d70	305457	611642	愛媛24		
d169	717557	611657	山口3	d71	615055	311456	愛媛11		
d17	315577	611757	愛媛9		d73	317577	611756		愛媛12
	317577	611756	愛媛7			317577	611756		愛媛13
	317577	611757	愛媛1			317577	611756		愛媛14
	317577	611757	愛媛10		d76	617557	611653		広島市1
	317577	611757	愛媛2			717557	611653		岡山5
	317577	611757	愛媛3			918559	811655		広島県13
	317577	611757	愛媛4		d77	117177	601747		広島市6
	317577	611757	愛媛5			117177	601747		広島市7
	317577	611757	愛媛6		d92	717557	611657		山口10
	317577	611757	愛媛8						



No.1312 の 350kb あたりのバンドが、
A、B、C、E、Fで薄い

○ No.1355 の 660kb あたりのバンドが D
のみ薄く、バンドと認識出来にくい

○ 各地検でデンドログラムを作成すると、薄
いバンド等の認識に個人差が出てしまう

レーン1	No.1312	O157:H7	VT2	c540
2	1325	"	"	c47
3	1349	"	"	c47
4	1355	"	"	d412
5	1372	O91:H21	VT2	

図5 2008パルスネット中四国ブロック画像

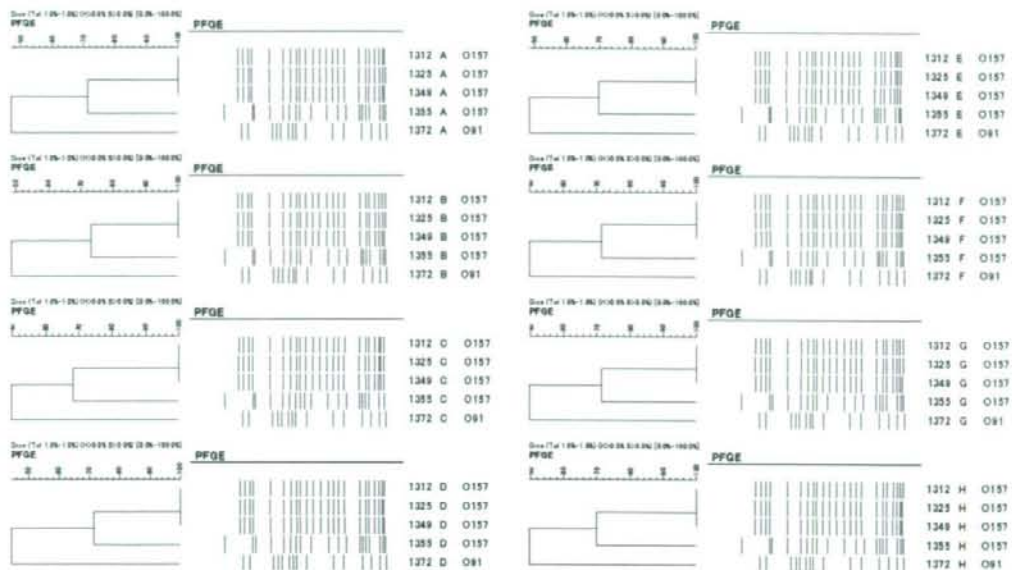


図6 各機関のPFGEによる系統樹

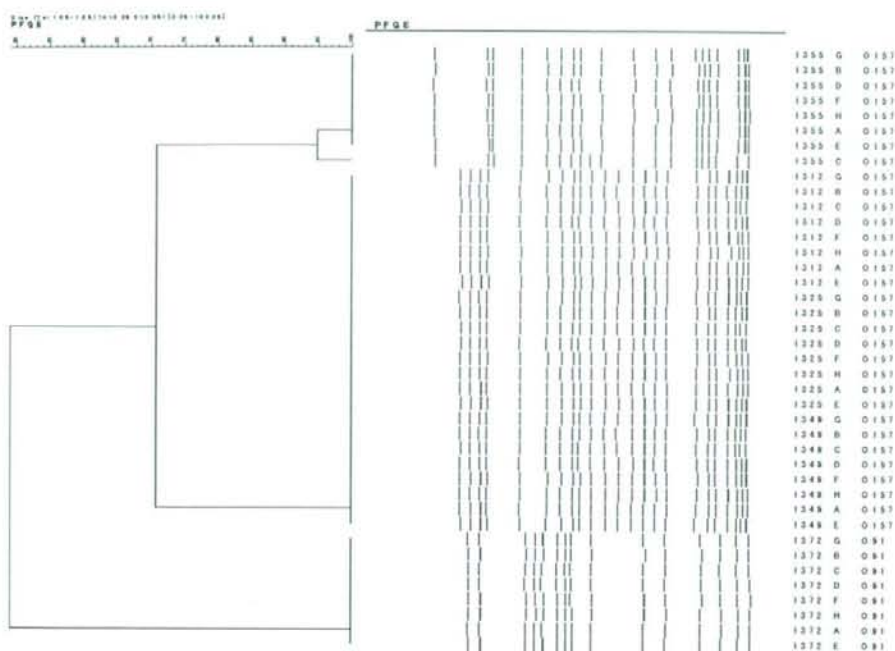


図7 全機関のPFGEによる系統樹

IS Printing 法の有効性についての検討

鳥取県生活環境部衛生環境研究所

上田 豊

1 目的

腸管出血性大腸菌の遺伝子解析には、制限酵素によって遺伝子を切断するパルスフィールド法が広く普及し、そのデータ、技術が蓄積されている。しかし、この方法は、処理が煩雑で、3日以上時間を要する点が課題として挙げられている。

IS-printing 法は、腸管出血性大腸菌 O157 の多型性を示すゲノム領域を標的としたマルチプレックス PCR 法であり、新しく開発されたタイピング法である。しかし、その評価はまだ定まっておらず、今回 IS Printing 法が当所設備でも疫学解析手法として有効に機能するものなのか、またどの菌株でも有効なのかを検証することを目的として、この調査を行った。

2 方法

今年県内で分離された7株を用いて、IS Printing 法による遺伝子解析を行った。そのうち3株(菌株No. 4, 5, 6)は集団発生事例のものを用いた。また、同じ菌株についてパルスフィールド法による遺伝子解析も行い比較した。

IS Printing法は、IS-printing System (東洋紡) のキットを用いて説明書の方法に従って実施した。パルスフィールド法は、制限酵素Xba I を用いて国立感染症研究所作成のマニュアルに従って実施した。

3 結果

IS Printing 法では散发事例では、すべて遺伝子型が不一致となり、集団発生事例では、すべて一致した(図1、表1)。しかし、陽性コントロールはプライマーNo. 6についてバンドが確認できず、プライマーの eae, hlyA ではバンドの増幅が弱かった。また、2nd ではプライマーNo. 9ではバンドが確認できなかった。試験菌株でもこれらのプライマーについてのバンドは不明瞭なものがしばしばみられた。

試験に要した時間は、1st, 2nd 合わせて1日であった。

パルスフィールド法でも、散发事例ではすべて遺伝子型が不一致となり、集団発生事例では1株で1本バンドが異なっていた他は、すべて一致した(図1)。また、要した時間は3日であった。

4 考察

散発事例では、IS Printing 法、パルスフィールド法いずれも、すべて異なるバンドパターンを示し、疫学情報と一致するものであった。逆に集団発生事例では、IS Printing 法はすべて同一のバンドパターンを示した。パルスフィールド法では1件でバンドが1本異なっていたが、同法の場合1本の差は同一クラスターと考えられるため、IS Printing 法、パルスフィールド法共に疫学情報と一致したものであった。集団発生事例については、昨年度も当所で行っているが、疫学情報と一致したことは昨年度と同様であった。以上から IS Printing 法は、当所の設備、菌株でみる限りでは、遺伝子識別能力において疫学情報と一致するものであり、パルスフィールド法に比較して差異はないものと考えられた。

迅速性については、IS Printing 法は、1日あれば結果が出せるため、3日かかるパルスフィールド法に比較し、優位であると考えられた。

また、簡便性においても、IS Printing 法がPCRの1種でありキット化されているため、パルスフィールド法に比べ、手技の煩雑さは、かなり軽減している。

一方、陽性コントロールあるいは試験菌株で特定のプライマーについてのバンドが認められない、あるいは不明瞭なものがみられた。これらは昨年度と同様の傾向であった。このようにバンドの不明瞭なものが混在すると、非特異的バンドと混同し判定しづらいため、改善が必要であると考えられる。

ローディングバッファーについても、色素がゲルの端まで移動しても遺伝子の泳動はまだ不十分であり、ローディングバッファーの改善が必要と考えられた。

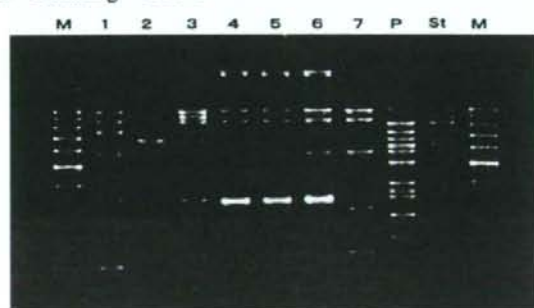
以上のことから、IS Printing 法は、その迅速性、簡便性において優れており、また、識別能力においてもパルスフィールド法と差がないことから、有用と考えられるが、この方法がより普及するためには、一部のプライマーについてみられるバンドの不明瞭さの改善、ローディングバッファーの改善が必要と考えられた。

図1 電気泳動像

IS Printing 1 s t

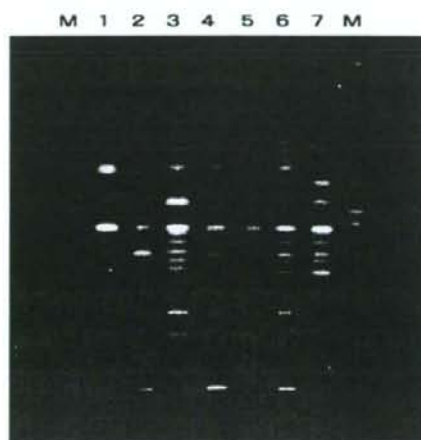


IS Printing 2 n d



M : マーカー
P : ポジティブコントロール
St : スタンダードDNA

PFGE



M : マーカー