

表1 Is printing 判定結果

1st

菌株No	上段: Primer No										下段: Size(bp)							
	101 974	102 839	103 742	104 645	105 595	106 561	107 495	108 442	109 405	110 353	111 325	112 300	113 269	114 241	115 211	eae 185	116 171	hlyA 137
1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
3	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
4	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	
5	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	
6	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	
7	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	

2nd

菌株No	上段: Primer No										下段: Size(bp)							
	201 987	202 861	203 801	204 710	205 642	206 599	207 555	208 499	209 449	210 394	211 358	212 331	213 301	214 278	215 240	216 211	stx2 181	stx1 151
1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
3	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
4	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+:バンド検出
-:バンド不検出

Campylobacter jejuni による2件の食中毒事例について

鳥取県衛生環境研究所 研究員 ©田中真弓 齋尾美春 上田豊 井田正己

1 はじめに

Campylobacter jejuni (C.j) は1982年に食品衛生法で厚生省に報告する食中毒事件票の「病因物質の種別」の中に加えられ、食中毒起因菌として指定され、年々増加の傾向にある。

2008年4月と5月、鳥取保健所管内で発生した *Campylobacter jejuni* による2事例の食中毒で牛生レバーとの関連が強く示唆されたので、その概要について報告する。

2 事例の概要

1) 事例1

2008年4月14日、鳥取市内の医療機関から東部生活環境局生活安全課に「家族2名が嘔吐、下痢、発熱の食中毒症状を訴えており、便からカンピロバクターが検出された。」との連絡があり調査が開始された。患者は4月12日に飲食店で牛生レバーを喫食しており一緒にいた家族も同様の症状を呈していた。また、同日同施設で牛生レバーを喫食していた別グループにも同様の症状の患者が見られ、7名中4名が発症していた。

当所で食中毒原因検査を行い2グループの患者便3検体のうち2検体からC.jを検出した。また、食品残品の牛生レバーからもC.jが検出された。

2) 事例2

2008年5月22日、鳥取市内の医療機関から東部生活環境局生活安全課に「5月16日に焼肉店で牛生レバーを食べた人が食中毒様症状を呈して受診した。」との通報があり調査が開始された。患者の共通食は焼肉店で提供された食事のみであった。この焼肉店で患者が発生した16日、17日、19日の喫食者は135名で患者数は13名であった。当所で食中毒原因検査を実施したところ、16日に喫食した患者の便6検体中4検体と鶏肉からC.jが検出された。なお、この鶏肉は患者が喫食したものとは違うロットの検体であった。

3 C.jの検査

供試菌株は、事例1で分離した患者便由来2株、牛生レバー由来1株、事例2で分離した患者便由来4株、鶏肉由来1株の計8株について実施した。

1) 遺伝子解析

分離した8株について制限酵素Sma Iを用いパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を実施した。泳動条件は電圧6V/cm、パルスタイム0.5~25.0秒、泳動時間20時間泳動温度14度で行った。

2) 薬剤感受性試験

供試薬剤は、ノルフロキサシン(NFLX)、オフロキサシン(OFLX)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、セファロチン(CET)、テトラサイクリン(TC)、エリスロマイシン(EM)の7剤を用いた。

4 結果

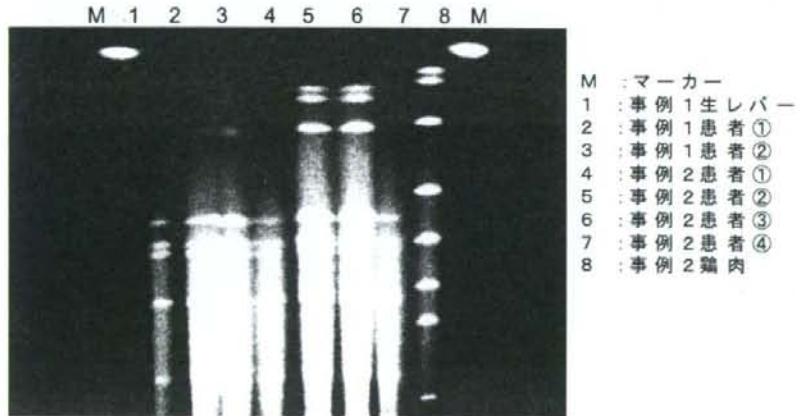
1) 遺伝子解析結果

事例1で分離した患者便由来2株、生レバー由来1株は同一の遺伝子型を示した。

事例2で分離した患者便由来4株は同一パターンを示したが鶏肉由来株と一致しなかった。また、事例2の患者便由来4株は事例1と同一遺伝子パターンを示した。

2) 薬剤感受性試験結果

試験に供した8株全てがセファロチン(CET)に耐性であった。事例2の鶏肉由来の1株はナリジクス酸(NA)にも耐性であった。フルオロキノロン系(CPFX)耐性のカンピロバクターが鶏肉や下痢症患者から検出され問題となっているが、今回の事例ではいずれのC.j株も感受性が認められた。



PFGE遺伝子解析結果

5 考 察

カンピロバクター食中毒の発生件数は、国立感染症情報センターの統計によると、平成19年は細菌性食中毒の30%を占めている。鳥取県でも平成20年になってから現在までに3件のC.jによる食中毒が発生しており年々増加の傾向を示している。

原因食品が判明したものでは鶏肉を中心とした肉類もしくは牛レバーなど内臓の生食によるものが大半であったと報告されている。厚生労働科学食品安全確保研究事業「食品製造の高度衛生管理に関する研究」で健康な牛の肝臓及び胆汁中のカンピロバクター汚染調査を行ったところ肝臓では11%が陽性であった。今回報告した2事例でも有症者は牛生レバーを喫食しており、事例1では残品の牛生レバーからもC.jが検出された。事例2では患者が喫食した牛生レバーの検査が行えなかったため原因食品が特定できなかったが、事例1の患者及び牛生レバーから検出されたC.jと遺伝子パターンが一致した。また、事例1と事例2の牛生レバーについて遡り調査を実施したところ、同一農家の存在があった。これらのことから、この二つの食中毒事例は同一生産農家の牛生レバーが原因であることが強く示唆された。

牛生レバーは本菌により汚染されている可能性も高く、比較的少ない菌量(100個程度)で感染が成立することから、生食での危険性を啓発する必要性を痛感した。

2事例とも営業者が加熱調理用牛生レバーを生食用として提供していた。営業者に対しても牛生レバーの生食はカンピロバクター食中毒の原因となる危険性が高いことを認識してもらい、営業者側へも啓発等の対策を図ることが急務であると思われた。

6 ま と め

- 1) 事例1では患者便由来2株と食品残品生レバー由来株から検出したC.jの遺伝子型が一致した。
- 2) 事例2では患者便由来4株のC.jの遺伝子型は一致したが鶏肉由来株とは不一致であった。
- 3) 事例1と事例2の患者由来C.j株は同一の遺伝子パターンを示した。
- 4) 患者は牛生レバー刺しを喫食していた。
- 5) 患者が喫食した牛生レバー刺しは同一生産農家の可能性が示唆された。

島根県内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 法の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所 黒崎守人

研究要旨

平成 19 年度及び 20 年度に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 のうち 11 株を用い、IS printing 法の有用性について検討を行った。

IS printing 法の識別能力は PFGE と同等あるいは若干劣るものの、疫学的関連のある菌株は概ね同じ IS パターンを示した。PFGE より迅速、簡便に実施できるので、有用なサブタイピング法であると思われる。ただし、同じ集団で異なる IS printing パターンを示す場合があったため、相同性の評価について今後検討が必要である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の分子疫学解析には一般的にパルスフィールドゲル電気泳動法が用いられているが、やや迅速さに欠ける。林らが開発した Multiplex PCR による IS printing 法は数時間で結果の判定ができ、手技も比較的簡便である。この方法が有用であるか検討することを目的とする。

B. 研究方法

1 供試菌株 (表 2)

平成 19 年度及び 20 年度に、当所で分離された腸管出血性大腸菌 O157 のうち 11 株を用いた。使用した菌株は、患者の家族である等の疫学的な関連及び PFGE タイプ (国立感染症研究所実施) から 3 つのグループに分けられる。

グループ A (菌株 No.1~5) は PFGE タイプ a259 が 4 株及びこれらと 1 本バンドが異なる 1 株の計 5 株で、内 3 株は同一家族からの分離株、他の 2 株はそれぞれ疫学的な関連が見あたらない患者からの分離株である。

グループ B (菌株 No.6~8) は、保育園児とその祖母及び園児の先生からの分離株

だが、PFGE タイプは 3 株とも異なる。

グループ C (菌株 No.9~11) は、同一家族からの分離株で、3 株とも PFGE タイプは c57 である。

2. 方法

IS printing System(東洋紡)の説明書に記載された方法に準じて実施したが、PCR 反応液は半量で行った。即ち、滅菌蒸留水 9 μ l, 1st または 2nd set Primer Mix 2.5 μ l, 2 \times IS printing Master Mix 12.5 μ l, Template DNA 1 μ l の計 25 μ l で行った。

電気泳動は、3%濃度の NuSieve 3:1 アガロースゲル、0.5 \times TBE バッファーを用い、サブマリン型電気泳動装置で 115V 120 分を行った。

また、IS printing の結果は、勢戸ら(平成 19 年度総括・分担研究報告書 p111)の方法に準じて表記した。即ち、表 1 に示すとおり各プライマーごとに図 1 のスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化した。

C. 研究結果及び考察 (表2、図1)

平成19年度の研究報告書では、バンドの密集により判定が困難な場合があると報告されていたため、電気泳動を120分行ったところバンドの密集はなく、判定は容易であった。

グループAでは、異なるPFGEタイプのNo.2,5が同じIS printingパターンを示した。一方、同じPFGEタイプのNo.1,3,4,5の4株がIS printingでは3パターンに分けられた。疫学的関連の見られるNo.1,2,3は全て異なるIS printingパターンを示し、疫学的関連の見られないNo.1と4, No.2と5がそれぞれ同じIS printingパターンになった。バンドの違いは1~3本であり、これらと同じグループとするのか違うグループとするのか結果の解釈が困難であった。

No.2と5はstx2のバンドが欠けていた

ため、当所で使用しているプライマーで確認したところ、やはりstx2陰性であった。菌株の培養中あるいは保存中にstx2が欠落したものと思われる。

グループBでは、3株ともPFGEタイプは異なるが、疫学的な関連は見られ、IS printingパターンは全て同じであった。

グループCでは、3株ともPFGEタイプが同じで、疫学的な関連も見られており、IS printingパターンも同じであった。

グループA, B, C間では、IS printingパターンも明確に異なっていた。

以上より、識別能力はPFGEと同等あるいは若干劣るものの、疫学的関連のある菌株は概ね同じIS printingパターンを示しており、バンドの若干の違いについて相同性の評価ができれば、迅速、簡便に実施できるため、有用なサブタイピング法であると思われる。

表1 IS printingの増幅バンドサイズと判定のコード変換

1st set primer																		
primer No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	nae	1-16	hlyA
size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定例(菌株No.1)	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	6			1			3			5			7			7		

2nd set primer																		
primer No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定例(菌株No.1)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	6			1			0			6			4			6		

表2 供試菌株と IS printing の結果

グループ	No	PFGEタイプ(感染源)	分離年	備考	VT	IS printingコード											
						1st set					2nd set						
A	1	a259	H19	H市	1&2	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6
	2	c904(a259と1本異なる)	H19	1の母	1&2	2	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	4
	3	a259	H19	1の弟	1&2	6	1	3	5	7	5	6	1	0	6	4	6
	4	a259	H19	O町	1&2	6	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	6
	5	a259	H19	U町	1&2	2	1	3	5	7	7	6	1	0	6	4	4
B	6	d246	H20	U町	2	3	0	5	5	5	5	7	1	1	4	1	3
	7	d247(d246と2本異なる)	H20	6の祖母	2	3	0	5	5	5	5	7	1	1	4	1	3
	8	d248	H20	6の先生	2	3	0	5	5	5	5	7	1	1	4	1	3
C	9	c57	H20	U町	2	3	4	5	4	5	7	3	1	1	6	5	2
	10	c57	H20	9の父	2	3	4	5	4	5	7	3	1	1	6	5	2
	11	c57	H20	9の母	2	3	4	5	4	5	7	3	1	1	6	5	2

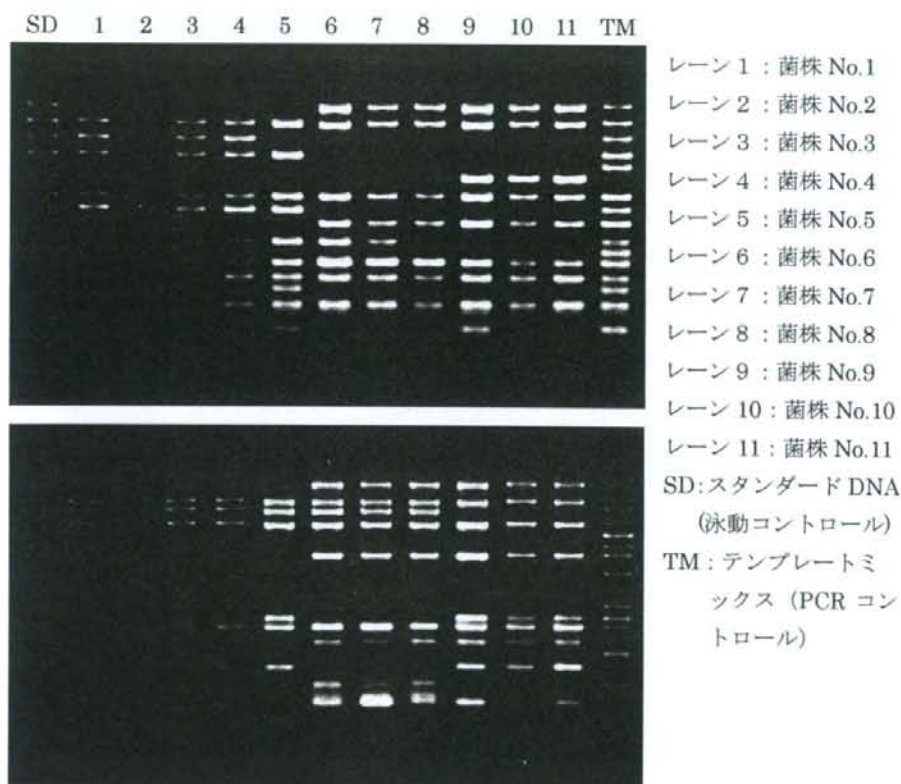


図1 IS printing の結果(上段: 1st set、下段: 2nd set)

PFGE 法と IS 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 桑山 勝 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と散発事例の株等を用いてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法と IS-printing system (IS) 法によるサブタイピングの比較検討を実施した。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。

1 研究目的

現在、EHEC 感染症の分子疫学的解析法として、PFGE 法が広く用いられているが、操作が煩雑なことおよび判定までに 3~4 日間を要することが難点である。そこで近年、細菌の株間における IS 領域の多型性に注目し、本領域を標的とした multi-plex PCR 法が開発された。本法の操作は通常の PCR 法とほぼ同様であること、また、判定までに要する時間が数時間であることから先に述べた PFGE 法の欠点を克服するものとして期待されている。この観点から、今回は本法を用いてその有用性を検討したので報告する。

2 研究方法

(1) 材料

使用菌株は、広島県内で分離された EHEC O157 13 株 (平成 18 年 2 株、平成 19 年 7 株、平成 20 年 4 株) で、これらの菌株は感染研で全て PFGE による型別を実施済みのものである (表 1)。このうち、平成 18 年の 2 株は、散発事例ではあるが、全国的に検出された PFGE 型 a259 である。また、平成 19 年の菌株のうち、5 株は同一の集団感染事例で同一の PFGE 型 c210 で

ある。平成 19 年の残りの菌株と平成 20 年の菌株は、散発の事例で前述の菌株とは異なる PFGE 型である。

(2) 方法

IS 法は、IS printing System (TOYOBO 製) を用いて、取扱説明書に従って実施した。なお、テンプレートは最終濁度が OD0.5 程度になるように調整したものを使用した。また、PCR 増幅産物の電気泳動にはミュージッド 2 plus を用いて、100V 70 分間泳動を行った。検体と Standard DNA の各バンドとの相違を、平成 19 年度の本報告書に準じて IS コード化 (表 1) して解析を行った。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実施。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた) に従って実施した。

3 結果

IS 法を実施し、電気泳動パターン (図 1) から IS コード化 (表 3) した。また、PFGE 法の泳動パターンを図 2 に示した。

平成 18~20 年度に広島県で分離された 8 つの PFGE 型 13 株について IS 法を実施したところ、7 つのパターンに分かれた。PFGE 型が同じもの [a259 (検体番号 1 と 2)

および c210 (検体番号 4~8)]は IS 法でもそれぞれ同じパターンを示した。一方, PFGE 型が異なる c210 (検体番号 4~8) と c816 (検体番号 9) は IS 法では同じパターンを示した。

4 考察

今回使用した 8 つの PFGE 型の EHEC O157 13 株のうち, PFGE 型が同じものは IS 法でも同じパターンを示したが, PFGE 型 c210 と c816 は IS 法では区分されな

った。このことから, IS 法は詳細な解析を行う場合には PFGE 法に比べて遺伝子型の区分能が若干劣るように思われた。しかしながら, PFGE 法は操作が煩雑なことおよび判定までに 3~4 日間を要するのに対して, IS 法は非常に簡便で判定までに数時間しか必要としない。そのため, 集団発生や diffuse outbreak などの早期に行政対応が求められる場合には有用な方法であり, 用途に応じて IS 法と PFGE 法を使い分けるのが良いと考える。

表1. 使用菌株の概要

検体番号	発生前	集団/散発の別	症状	年齢	性別	PFGE 型別	感染研 No.
1	2006	散発	腹痛, 下痢, 血便	51	男	a259	61854
2	2006	散発	腹痛, 下痢, 血便	15	女	a259	61865
3	2007	散発	腹痛, 下痢, 血便	14	男	c12	70303
4	2007	集団	腹痛, 下痢, 血便	6	男	c210	71174
5	2007	集団	なし	63	男	c210	71175
6	2007	集団	なし	11	男	c210	71176
7	2007	集団	下痢	1	男	c210	71177
8	2007	集団	腹痛, 下痢	6	女	c210	71181
9	2007	散発	腹痛, 下痢	5	男	c816	80204
10	2008	散発	腹痛, 血便	28	男	d15	80563
11	2008	散発	腹痛, 嘔吐, 発熱, 下痢, 血便	20	男	a206	80930
12	2008	散発	腹痛, 血便	64	女	d112	80933
13	2008	散発	腹痛, 下痢, 発熱	11	女	d76	80935

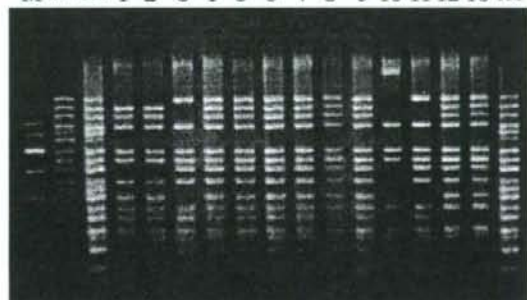
表2. IS-printing System Code

1st set primer																		
primer No.	1-011-021-03	1-041-051-06	1-071-081-09	1-101-111-12	1-131-141-15	ase 1-16 <i>hlyA</i>												
Size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	139
判定	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	8			1			5			5			9			9		
2nd set primer																		
primer No.	2-012-022-032	2-042-052-062	2-072-082-092	2-102-112-122	2-132-142-152	2-16 <i>stx2 stx1</i>												
Size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
判定	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	8			1			0			8			4			8		

表 3. IS 法電気泳動パターンによるコード化

検体番号	PFGE型	1st set primer						2nd set primer					
1	a259	8	1	5	5	9	9	8	1	0	8	4	8
2	a259	8	1	5	5	9	9	8	1	0	8	4	8
3	c12	1	1	9	1	9	9	8	0	1	9	5	9
4	c210	9	1	9	5	9	9	8	1	1	8	5	9
5	c210	9	1	9	5	9	9	8	1	1	8	5	9
6	c210	9	1	9	5	9	9	8	1	1	8	5	9
7	c210	9	1	9	5	9	9	8	1	1	8	5	9
8	c210	9	1	9	5	9	9	8	1	1	8	5	9
9	c816	9	1	9	5	9	9	8	1	1	8	5	9
10	d15	0	1	5	0	5	9	4	1	4	4	4	9
11	a206	1	1	9	1	9	9	8	0	1	9	4	9
12	d112	9	1	9	5	5	9	8	1	1	8	5	9
13	d76	9	1	9	5	5	9	8	1	1	8	5	5

M SD TM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 TM



1st set primer PCR

M : 100bp DNA ラダー

TM : 陽性コントロール
(template mix)

SD : 陽性コントロール
(standard mix)

1~13 : 検体番号



2nd set primer PCR

図 1. IS 法電気泳動パターン

	検体番号	PFGE 型別
	1	a259
	2	a259
	3	c12
	4	c210
	5	c210
	6	c210
	7	c210
	8	c210
	9	c816
	10	d15
	11	a206
	12	d112
	13	d76

図 2. PFGE 法切断パターン

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における PFGE 法と
IS-printing 法および MLVA 法の有効性比較

研究協力者 広島市衛生研究所

末永 朱美 田中 寛子 蔵田 和正 花木 陽子
毛利 好江 石村 勝之 池田 義文 笠間 良雄
吉岡 嘉暁

研究要旨

2008 年度に広島市で発生した集団感染事例を含む 12 事例から分離された腸管出血性大腸菌 O157 24 株について MLVA 法、IS-printing 法により解析し、その結果を国立感染症研究所（以下、感染研）で実施した PFGE の型と比較した。

供試 24 株は、PFGE 型では 13 タイプに型別されたが、1 バンド違いのタイプを同一型とすると 11 型に分類された。一方、IS-printing 法では 11 タイプに型別され、MLVA 法では 18 タイプに型別されたが、同時に 3 loci 以上で繰り返し回数が違う場合を異なる型として分類すると、11 型に分類され、3 法で一致した結果であった。

IS-printing 法および MLVA 法は、簡易・迅速に行える疫学解析手法として有用と考えられたが、解析方法の統一や解析結果の解釈基準の設定等の課題があり、今後さらに検討が必要である。また、IS-printing 法および MLVA 法は、PFGE 法とは異なる原理を用いた手法であることから、解析目的によっては 3 方法を組み合わせて行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

広島市域で分離された腸管出血性大腸菌 O157 について IS-printing 法、Multi-Locus Tandem-Repeat Variable Number Analysis (以下、MLVA) 法を実施し、それぞれの分子疫学的解析法としての有用性をパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法と比較検討する。

B. 研究方法

1 材料

2008 年 4 月から 10 月までに広島市で発生した、集団感染事例（事例 B）を含む 12 事例から分離された腸管出血性大腸菌

O157 24 株 (O157:H7 VT1,2 ; 14 株、O157:H7 VT2 ; 10 株) について解析を行った。

2 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従い実施した。また結果は、昨年度の近畿ブロックの報告にならってプライマーごとに増幅ありを「1」、なしを「0」と判定し、各セットとも増幅サイズの大きいバンドから順に 3 バンドごとに割り当てた「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、1st、2nd の順に並べて 12 桁で表わして IS コードとした。

(2) MLVA 法

MLVA 法は、感染研が使用している 9 組の primer²⁾を用いて、9 loci (K25,K3,K34,K9,K17,K19,K36,K37,K10)における VNT R 領域の繰り返し回数 (以下、RN) を測定した。測定可能な PCR 産物が得られない場合は、配列が確認できない "null allele" として表中の RN の記載は 0 とした。Fragment size marker は GeneFlo 625 TAMRA labeled(CHIMERx 社)を使用し、解析には 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems 社)及び GeneScan Analysis Software(Applied Biosystems 社)を用いて行った。

MLVA 型は同時に 3 loci 以上で RN が異なる場合に違う型とし、その中で 1 locus で RN が異なるもの (いわゆる Single Locus Variant、(以下、SLV)) はその型に枝番を付けて区別した。

(3) PFGE 法

PFGE 型は、感染研での実施結果を用いた。

C. 結果

1 IS-printing 法

IS-printing 法の 1st set では 7~14 本のバンドを検出した。2nd set では 7~12 本のバンドを検出した。

IS コードは 11 タイプに分類され、同一事例で分離された菌株は同一の IS コードを示した (表の No.2~10,16~18,20~21,23~24)。

集団感染事例 B において、PFGE 型では他の 7 株と比較して 1 バンド異なる "one band differ." であった 2 株 (No.6,7) も IS コードは同一であった。

事例 E と事例 F は同時期に発生し、年齢、

生活地域などに関連がみられない散発事例であったが、同一の IS コードを示した (No.13,14)。これらの PFGE 型は "one band differ." の型であった。

2 MLVA 解析

MLVA 法では、9 loci 全体の RN の違いにより 18 のタイプに区別された。異なる事例から分離された菌株は、異なる MLVA タイプとして区別された。

最も識別能が高い locus は K10 で、11 種の RN がみられた。最も識別能が低い locus は K34 で 4 種の RN がみられた。K9、K10 では、null allele の株が認められた (No.11,16~18)。同一事例内で variant が見られたのは K25、K9、K36、K37、K10 の 5 loci であった。

集団事例 B の 9 株中 6 株は、同一の B-1 型であった。RN が異なった 3 株の内訳は K10 で RN2 違いの B-2 型 1 株 (No.8)、K36 で RN1 違いの B-3 型 2 株 (No.9,10) であった。

IS-printing 法で同一コードであった事例 E、F の菌株は K10 で 1RN 違いの SLV であった (No.13,14)。

D. 考察

今回の解析では、PFGE 法、MLVA 法、IS-printing 法のうち、IS-printing 法が最もおおまかに分類され、事例との関連が一致している。逆に MLVA は最も細かく分類され同一事例内でも異なる型がみられたが、SLV を同一型とすると IS-printing 法による分類とよく一致した。今回の菌株の結果では、PFGE 法と MLVA 法、および IS-printing 法の分類結果はほぼ一致しており、その簡便さから IS-printing 法は有用

な解析方法のひとつとなると考えられた。

しかし一方で、昨年度の近畿ブロックの研究報告から、「012057 214443」「717575 611657」「717577 611657」の IS コードを示す菌株は、5 タイプ以上の PFGE 型の株が存在することが報告されており、今回散发事例 C において「012057 214443」と同じ IS コードを持つ株(No.11)が分離された。

このような分離菌株の評価に関しては、より詳細な広域疫学調査情報を得るとともに、PFGE 法などの他の分子疫学的解析を行って菌株間の関係を総合的に評価していくことが必要と考えられた。

MLVA 法では、これまでの報告からも、K9、10 の RN はバリエーションが多く、また比較的高頻度に変異が起こることが知られている。逆に K25、34 では配列の保存性が高い。今回の解析結果でも供試株数は少ないが同様の傾向がみられる。このように変異の頻度が locus により異なるので、同じ SLV であってもその意味付けを同等に評価することには課題を残しており、得られた RN の評価方法について locus ごとに今後検討していく必要があると思われた。

E. 結論

IS-printing 法は、簡便性と結果の比較のしやすさから、簡易に行える疫学解析の手法として今後も検討を行っていくべきと考えられる。

MLVA 法は、PFGE 法に比較すると IS-printing 法と同様に簡便ではあるが、現在はその解析方法が統一されておらず、SLV 等の結果の評価方法も定まっていないことから、locus ごとの variant の起こりやすさを考慮した解析方法の検討が必要であ

る。

IS-printing 法、MLVA 法および PFGE 法は異なる原理を用いた解析手法であり、それぞれのクラスタリングの結果が常に一致するとは限らない。従って、事例によっては、これらの 3 方法を適宜併用し、疫学的検討を行うことも有効であると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Hyytia-Trees, E., Smole, S. C., Field, S. P. A., et al. (2006): Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne pathog. dis.*, 3, 118-131

表 広島市で2008年度分離された腸管出血性大腸菌 O157の解析結果

菌株No.	事件記号	VT型	PFGE 型	ISコード*	MLVA型	MLVA RN									
						K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	
1	A	2	d76	517557 611653	A	5	14	9	13	5	6	5	7	36	
2	B	1,2	a206	117177 601747	B-1	6	12	9	15	7	7	8	7	30	
3		1,2	a206	117177 601747	B-1	6	12	9	15	7	7	8	7	30	
4		1,2	a206	117177 601747	B-1	6	12	9	15	7	7	8	7	30	
5		1,2	a206	117177 601747	B-1	6	12	9	15	7	7	8	7	30	
6		1,2	d77* ¹	117177 601747	B-1	6	12	9	15	7	7	8	7	30	
7		1,2	d77* ¹	117177 601747	B-1	6	12	9	15	7	7	8	7	30	
8		1,2	a206	117177 601747	B-2	6	12	9	15	7	7	8	7	32	
9		1,2	a206	117177 601747	B-3	6	12	9	15	7	7	7	7	30	
10		1,2	a206	117177 601747	B-3	6	12	9	15	7	7	7	7	30	
11		C	2	d516	012057 214443	C	4	5	7	0* ³	5	8	6	5	0* ³
12	D	2	c304	317557 650653	D	5	15	9	13	7	6	4	7	30	
13	E	1,2	d154	317577 650757	E-1	3	10	10	11	8	6	6	6	29	
14	F	1,2	d523* ²	317577 650757	E-2	3	10	10	11	8	6	6	6	28	
15	G	1,2	d526	717557 611657	G	5	12	9	11	12	6	11	7	27	
16	H	2	d513	215455 605243	H-1	4	10	7	0* ³	3	6	4	10	50	
17		2	d513	215455 605243	H-2	4	10	7	0* ³	3	6	4	11	50	
18		2	d513	215455 605243	H-3	3	10	7	0* ³	3	6	4	10	50	
19	I	1,2	d524	317575 211757	I	9	9	10	11	12	10	6	11	29	
20	J	2	d344	311557 710413	J-1	4	8	8	14	5	7	9	6	14	
21		2	d344	311557 710413	J-2	5	8	8	14	5	7	9	6	14	
22	K	1,2	b325	317177 611557	K	5	9	10	11	7	6	6	6	46	
23	L	2	d529	115057 603443	L-1	4	7	7	18	3	5	9	12	51	
24		2	d529	115057 603443	L-2	4	7	7	17	3	5	9	12	51	

*1: one band difference from a206

*3: 0; null allele

*2: one band difference from d154

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 山口県環境保健センター 富永 潔 野村恭晴 伊藤恵美

研究要旨

平成 20 年度に山口県内で発生した患者およびその接触者から分離された腸管出血性大腸菌 O157 菌株 30 株について、IS 構造多形性を示すゲノム領域を標的とした multiplex PCR 法である IS-printing 法による型別を行い、PFGE 法との比較により、その有用性を検討した。

その結果、IS-printing 法は PFGE 法に比べて解析能力はやや劣るものの、PFGE 型が同じ菌株のみならず、PFGE 型は異なるが疫学的に同一起源と考えられる菌株においても同一プロファイルを示したこと、また本法がきわめて操作が簡便であること、結果判定が即日可能であること等を考慮すれば、県内の腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析に十分有用な方法であろうと考えられた。

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 法に代わる方法として、IS 構造多形性を示すゲノム領域を標的とした multiplex PCR 法による IS-printing 法について、平成 20 年度に県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 を用いてその有用性を検討した。

B. 研究方法

- 1 供試菌株:平成 20 年度に山口県内で発生した患者およびその接触者から分離された菌株 30 株を用いた(VT1:2,VT2:15,VT1+2:13)[表 1]
- 2 菌株からの DNA 抽出方法:DEPC 水 200 μ l に被検菌株を MacFarland 6 の濃度に浮遊させ、QIAamp DNA Blood mini kit(50)[Qiagen]を用いプロトコールにしたがって実施した。抽出した DNA は、IS-printing 法実施まで -20°C で保存した。
- 3 IS-printing 法:市販キット IS-printing system(東洋紡)を用い、示されているプロトコールに準拠して実施した。泳動は NuSieve GTG(タカラバイオ)と Seakem GTG(タカラバイオ)を 2:1 の割合に混合して作製した 3%アガロースを用い、泳動用 Buffer は $\times 0.5\text{TBE}$ を使用して、サンプル 5 μ l とトラッキングダイ 2 μ l を混合した 7 μ l を well に注入し、ミュールピッド 2pluse(タカラバイオ)で 100V70 分間泳動した。泳動終了後、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーターで観察した。解析は、1st set, 2nd set とともに陽性コントロールに含まれる 18 本のバンドの増幅の有無を調べ、有りの場合は 1、無しの場合は 0 をカウントして 18 桁の数字の列を作成し、それを始めから 3 つずつ区切り 6 グループとし、1 グループの 3 つの数字について順に 1、2、4 の数値を与え、元

の数字が1ならそれに与えた数値をカウントし、0ならカウントせずとして、それぞれのグループごとに合計の数値をもとめ、他の5グループについても同様な計算を行い6桁の数値を算出し、IS-printing法のプロファイルとした。これをすべての株について実施するとともに、PFGE型との相関を調べた。

4 PFGE法:国立感染症研究所に菌株を送付し実施を依頼した。

C. 結果および考察

PFGEが実施された30株のPFGE型、IS-printing法の1stおよび2ndプロファイル、VT型を表2に示す。また、そのデータをPFGEパターンを第1のキー、IS-printing1stプロファイルを第2のキー、IS-printing2ndプロファイルを第3のキーとしてソートした表を表3に示す。

30株のうち同一のPFGE型と判定された菌株は4パターン9株にすぎなかった(①d180:菌株No.08Y15と08Y24、②d28:菌株No.08Y19と08Y26、③d352:菌株No.08Y18と08Y20、④d693:菌株No.08Y31と08Y32と08Y33)。それらのIS-printingプロファイルを見ると、①d180は114057/303443、③d352は311557/610253、④d693は351557/710413でそれぞれの株のプロファイルは完全に一致していた。しかし②d28は08Y19が717557/611655であったのに対して、08Y26は717557/611657と1バンド異なっていた。これは前者のVT型がVT1で後者のそれはVT1+2と、両菌株のVT型が異なることに由来しており、そのような場合IS-printingでは異なる型と判定された。菌株の疫学的情報をみると08Y19と08Y26の患者は兄弟であり、したがって菌株の起源は非常に近縁と考えられたが、VT型が異なる菌株のPFGEパターンが同一になることは非常に稀であると推察され、このような場合はIS-printingで同一プロファイルが得られないのはやむを得ないと考えられた(図1に上記4事例のIS-printing泳動像を示す)。この4パターン9株のうち①において、08Y15は下関市で7月30日に発症した小児由来08Y14の母親で、発症は小児より早く7月26日であるが、家族内感染と考えられることから08Y14と同一PFGE型となることが推察されたが、結果は異なっていた。しかし同一PFGE型である08Y24は、全く異なる地域である防府市において、交流のない88歳の女性から分離されており、しかも下関の分離例より10日遅い8月5日に発症していた。しかし、PFGE型が同一でIS-printingプロファイルも同一であったことから、何らかの共通感染源の存在が示唆され、県内の広域にわたるEHEC感染症発生の探知にIS-printingが有用であった一例であると推察された。

一方、IS-printingプロファイルが同一でPFGE型が異なった菌株は

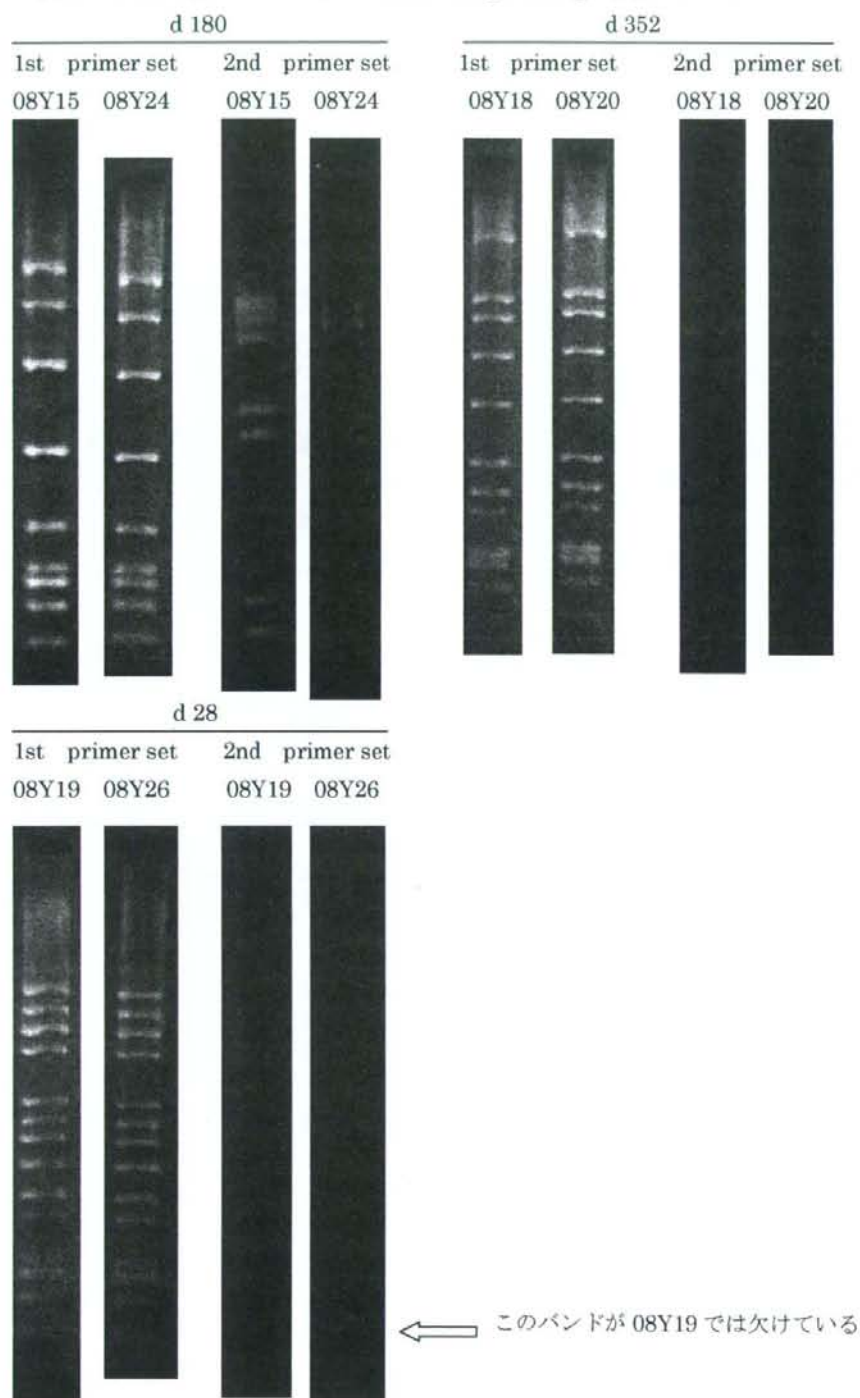
- ① 717557/611657が08Y03(d169:岩国市5月19日分離)と08Y08(d170:下関市7月5日分離)と08Y10(d92:下関市、7月28日分離)と08Y23(d200:山陽小野田市8月28日分離)と08Y30(d690:周南市、12月10日分離)で、VT型はすべてVT1+2であった。なおこのプロファイルは、VT型が異なるにもかかわらずPFGE型が一致した例として上述した08Y26(d28)と同一のプロファイルであった。

- ② 613575/610646 が 08Y05(d174:山口市 5月 29日分離)と 08Y12(d175:宇部市 7月 29日分離)で、VT型は VT1+2 であった。
- ③ 114057/303443 が、08Y14(d179:下関市 8月 2日分離)で、PFGE型が一致した例として上述した 08Y15/08Y24(d180)と同一プロファイルで、VT型も同一の VT2 であった。
- ④ 012057/214443 が、08Y02(b858:周南市、4月 6日分離)と 08Y29(b428:周南市、11月 9日分離)で、VT型は VT2 であった。

①～④のように、PFGE型が異なるが IS-printing のプロファイルが同一の菌株が多く認められたことは、IS-printing よりも PFGE のほうが解析能力に優れることを示唆している。

以上の結果から、IS-printing 法は解析能力は PFGE 法に及ばないものの、PFGE 同一パターン株では、VT型が異なる 1 事例以外は同一プロファイルを示したこと、患者由来株と家族内における二次感染患者由来株などの類似性の高い菌株は、PFGE型は異なるものの IS-printing プロファイルは同一プロファイルを示したことから、操作の簡便性と結果判定が即日可能であることを考えれば、県内の腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析に有用であろうと考えられた。

図1 PFGE 同一パターン4事例の IS-printing 泳動パターン



1st primer set			2nd primer set		
08Y31	08Y32	08Y33	08Y31	08Y32	08Y33

