

表2 同一PFGE型におけるISコードと分離地域

PFGE型	IS グループ	ISコード		分離県(月)[関連事項]
		1st	2nd	
c293		317457	611757	岡山県(8月)[食品]
		317577	213757	岡山県(8月)
		317577	411757	山口県(1月)
c47		305457	001642	岡山県(7月)
	13	305457	611642	愛媛県(7月)[家族等]★
c536		717057	211557	岡山県(7、8月)
d111	33	717577	611657	広島県(8、9月)
d192	1	012057	214442	香川県[家族]★
d27	30	717557	611657	岡山県(10月)、山口県(7月)
d298	25	613577	610646	香川県[家族]★
d501	19	317557	611756	岡山県(7月)[家族等、食品]★
d833	2	012057	214443	山口県[家族]★
d92	30	717557	611657	山口県(7、8月)
e203	31	717575	611657	広島県(9月)[接触者]★
e219		717577	411457	岡山県(7月)
	32	717577	611457	岡山県(6、7月)
e225	7	117177	601757	山口県(7月)[接触者]★
e230	33	717577	611657	岡山県(7月)、山口県(8月)
e241 *	18	317175	611757	岡山県*(8月)★、山口県*(8月)★、愛媛県*(9月)★、 広島県(8・10月)、香川県
e265	20	317575	611757	岡山県(7月)
e266		615457	011656	岡山県(7月)
		615457	211656	岡山県(7月)
e267	26	703577	610657	山口県(8月)[焼肉店事例]★
e270	28	717057	231557	岡山県(7月)、広島県(7月)[接触者]★
		717057	233557	岡山県(7月)
e272		117175	601757	岡山県(8月)
		117175	701757	岡山県(8月)
e273	31	717575	611657	岡山県(7月)、広島県(10月)
e291	6	116575	201757	愛媛県(9月)[家族]★
e297	13	305457	611642	香川県[家族]★
e322	4	105357	711642	高知県(8月)
	5	105457	711642	香川県[家族]★
e328	8	144047	301443	山口県(8月)[家族]★
e417	9	201457	310242	広島県(3月)[家族]★
e419	29	717557	611653	広島県(6月)[接触者]★
e426	14	307555	611657	広島県(8月)
e503	27	707555	611653	徳島県(9月)[焼肉店事例等]★
e550	24	613575	610646	山口県(9月)[家族]★
e554	30	717557	611657	山口県(10月)
e626		317557	611757	愛媛県
	23	317577	611757	愛媛県(10月)
e721	3	016057	216443	岡山県(11月)[家族]★
e98	10	211555	710403	広島県(6月)[家族等]★
	12	215555	710403	山口県(6月)[家族]★
e99		145047	103443	山口県
		145047	303443	山口県

\*PFGE型(e241): 全国的レストランチェーンによる発生事例関連株  
★疫学的関連株のISコード及びPFGE型が一致(21グループ)

表3 牛関連検体の腸管出血性大腸菌検出状況

検体名	検体数	陽性検体数	検出率(%)	血清型別率(%)
牛直腸便	516	92	17.8	19.6 *
牛糞堆肥	24	0	0	0

\* :2検体重複

# マイクロチップ電気泳動法を用いた腸管出血性大腸菌O157のMLVA解析

研究協力者 岡山県環境保健センター 大島律子 石井 学

## 研究要旨

腸管出血性大腸菌感染症のより迅速な分子疫学的解析法として注目されている MLVA 法について、通常の PCR 反応のみで実施可能とするため、マイクロチップ電気泳動法による解析を行い、その有用性を検討した。県内で分離され、国立感染症研究所による MLVA 法の解析結果が判明している腸管出血性大腸菌O157:H7の17株を対象に実施した結果、マイクロチップ電気泳動法による MLVA 法は、解析に誤差が生じたプライマーがあったが、疫学情報と照合した総合的な解析を行うことで、同一検査施設における集団感染事例等の解析には、従来の PFGE 法よりも簡便で迅速な方法として役立つと思われた。

## 1 はじめに

腸管出血性大腸菌感染症のより迅速な分子疫学的解析法として、縦列反復塩基配列 (Variable-Number Tandem-Repeats 以下「反復配列」) を利用した Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA法) の有用性が検討されている。しかし、現在実施されている MLVA 法は、遺伝子の増幅に複数の蛍光色素を標識したプライマーを用い、解析にはキャピラリー電気泳動装置とソフトウェアを必要とするため、ルーチンワークとしては難点がある。今回、当センターにマイクロチップ電気泳動装置が導入されたのに伴い、通常の PCR 反応で日常的に解析できる方法を検討したので報告する。

## 2 材料および方法

県内で分離され、国立感染症研究所 (以下「感染研」と略す) が PulseNet Japan により PFGE 解析と MLVA 解析を実施し、結果が判明している腸管出血性大腸菌O157:H7の17株を用いた。MLVA 法は、9組のプライマーを用い<sup>1),2)</sup> (表 1)、PCR 反応は、GeneAmp

PCR System 9700 (Applied Biosystem) で行い<sup>3)</sup>、表 2 に示す反応液の組成および反応条件により実施した。増幅産物の電気泳動および解析には、DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA (島津製作所) (以下「MultiNA」) を使用した。増幅産物中の反復配列の繰り返し数 (リピート数  $n$ ) の算出は、「 $n = (\text{MultiNA 解析値} + \text{感染研実施値との誤差} - \text{基本増幅域}) \div \text{反復配列のサイズ}$ 」により算出した。

## 3 結果

MultiNA での各プライマーにおける増幅産物のサイズは、感染研が示したリピート数から算出した値と比較して 9~75bp の差が認められた。また、リピート数は、感染研の結果と 1~2 の違いが見られる Locus があったが、プライマー Locus 34、36 および 37 は全 17 株で一致した。

同じ PFGE 型を示すグループ内での MLVA 型は、感染研の結果と MultiNA の結果では、プライマー Locus 3、9、10、17、19 および 36 で双方とも、プラ

イマー-Locus25 でMultiNA のみに、リピート数1~8の違が見られた (表3)。

#### 4 考察

マイクロチップ電気泳動装置を用いたMLVA法は、通常のPCR反応から増幅産物をそのまま電気泳動でき、特別な解析ソフトも不要で非常に簡便であった。しかし、反復配列のサイズが6bp程度と小さいため、解析に誤差が生じてしまい、デジタルデータとしての全国規模のデータベース化には、さらなる検討が必要と思われた。一方で、同一検査施設における集団感染事例等の解析には、従来のPFGE法よりも迅速に結果が得られるため、有用と考えられた。ただし、今回、同一PFGE型グループ内でMLVA型に違いが認められたことから、反復配列のサイズから生じる誤差を考慮に入れ、疫学情報と照合した総合的な解析をする必要があると思われた。

#### 5 参考文献

- 1) Lindstedt BA et al, DNA fingerprinting of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA), *Ann Clin Microbiol Antimicrobiol.* 2, 1-7, (2003)
- 2) Keys C et al : Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing, *J Appl Microbiol*, 98, 928~940(2005)
- 3) 末永 朱美ら : 腸管出血性大腸菌O157:H7の分子疫学的解析法の検討 -MLVA とパルスネットのパターン比較- 広島市衛研年報 26, 45-58(2007)

表 1 供試プライマー

locus	Forward primer	Reverse primer	増幅 産物	
3	GGCCGGATGGAAACTATGCTATT	GCCGCTATTTTTAACCCTGACTA	464+6n	Lindstedt <sup>1)</sup>
9	ATCGCCTTCTCCTCCGTAATG	CTCCTCGCGCTCAGACAGTG	495+6n	Lindstedt <sup>1)</sup>
10	AGCCCGCAGTTGATACCTACG	GATGCCGGATGAAAATGATAAGTT	335+6n	Lindstedt <sup>1)</sup>
17	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGAC	GGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC	120+6n	Keys <sup>2)</sup>
19	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTG	GGGGCAGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC	272+6n	Keys <sup>2)</sup>
25	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACACGAC	110+6n	Keys <sup>2)</sup>
34	GACAAGGTTCTGGCGTGTACCAACGG	GTTACAACCTCACCTGCGAATTTTTTAAGTCCC	100+18n	Keys <sup>2)</sup>
36	ATGCGCGGTTAGCTACACGACA	TGAAAGCCACACCATGCGATAAT	255+7n	Lindstedt <sup>1)</sup>
37	GCCGCCCTTACATTACGCGGACATTC	GCAGGAGAACAACAAAACAGACAGTAATCAGAGCAGC	142+6n	Keys <sup>2)</sup>

表 2 PCR 条件

		6 $\mu$ l/件	反 応		増幅条件
		$\mu$ l	初期変性	94°C 15min	
Ex Taq (5u/ul)		0.05	変 性	94°C 30sec	25 cycles
10 $\times$ buffer		0.60	アニーリング	63°C 90sec	
dNTP (2.5mM each)		0.25	伸張反応	72°C 90sec	
Primer	F	0.50	最終伸張反応	72°C 10min	
(10pmol/ul)	R	0.50			
milliQ		3.10			
DNA		1.00			
total		6.00			

表 3 各プライマーにおけるリピート数

Primer locus		3	9	10	17	19	25	34	36	37									
増幅産物のサイズ		464+6n	495+6n	335+6n	120+6n	272+6n	110+6n	100+18n	255+7n	142+6n									
菌株 No	PFGE 型	Multi	感染	Multi	感染	Multi	感染	Multi	感染	Multi	感染	Multi	感染						
		NA	研	NA	研	NA	研	NA	研	NA	研	NA	研						
1038	413	6	4	0	0	0	0	5	6	7	8	4	3	7	7	6	6	5	5
1090	413	5	4	0	0	0	0	5	5	9	9	4	3	7	7	5	5	5	5
1078	a230	13	13	13	12	14	14	7	7	6	6	5	4	9	9	7	7	7	7
1160	a259	13	13	15	16	19	19	6	7	3	4	6	5	9	9	10	10	6	6
1164	a259	13	13	16	16	20	20	7	7	4	4	6	5	9	9	10	10	6	6
1168	a259	13	13	16	17	20	20	7	7	4	4	6	5	9	9	11	11	6	6
1195	a259	13	13	16	16	20	21	7	7	4	4	6	5	9	9	10	10	6	6
1229	a259	13	13	16	17	18	19	7	7	4	4	5	5	9	9	10	10	6	6
1119	b6	16	17	13	12	27	28	4	4	7	7	5	5	7	7	7	7	6	6
1115	b9	17	18	13	11	13	13	8	8	6	6	5	4	9	9	9	9	8	8
1352	c293	12	12	12	12	33	31	7	7	5	5	6	5	10	10	5	5	6	6
1303	c47	15	14	15	15	4	4	3	3	7	7	5	5	7	7	5	5	7	7
1307	c47	15	16	14	14	4	4	4	3	7	7	6	5	7	7	5	5	7	7
1325	c47	7	6	14	15	4	4	4	3	7	7	5	5	7	7	5	5	7	7
1350	c47	15	16	14	13	6	4	4	3	7	7	6	5	7	7	5	5	7	7
1387	c47	19	21	14	14	5	4	4	3	7	7	6	5	7	7	5	5	7	7
1376	d148	10	9	12	12	38	39	8	8	6	6	5	4	10	10	5	5	6	6

## マイクロチップ電気泳動法を用いた腸管出血性大腸菌O157の IS-printing System の検討

研究協力者 岡山県環境保健センター 石井 学 大島律子

### 研究要旨

腸管出血性大腸菌O157のサブタイピング法である IS-printing System について、多検体をより迅速に解析するためにマイクロチップ電気泳動法を用い、従来のアガロースゲル電気泳動法と比較した。岡山県内で分離された腸管出血性大腸菌O157の57株を対象に比較検討した結果、マイクロチップ電気泳動法は、検査感度や迅速性・簡便性においては優れていたが、高分子量のバンド間の識別が難しい等の問題があり、更なる条件検討が必要と思われた。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の疫学解析における迅速解析法としてマルチプレックスPCRによる腸管出血性大腸菌O157サブタイピング法 IS-printing System があるが、多検体をより迅速に解析するために、マイクロチップ電気泳動法を実施しその有用性を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

平成21年度に、岡山県で分離された腸管出血性大腸菌O157の57株を対象とした。

#### 2. 検査方法

PCR反応は、IS-printing System(東洋紡)を用い、増幅産物の電気泳動は、アガロースゲル電気泳動法とマイクロチップ電気泳動法を実施して解析結果を比較した。

##### 1) アガロースゲル電気泳動法

試薬キット添付のプロトコールに準じて実施した。ゲルは、Mupid-exUのゲルトレイ大(130mm(W)×13mm(H)×122mm(L)26ウェルコーム)を用いて作成した。電気泳動は、3%濃度のNuSieve GTG : SeaKem GTG=2 : 1アガロースを用い、0.5×TBEバッファでサブマリン型電気泳動装置を使用して、120V3時間行った。解析は目視により行った。

##### 2) マイクロチップ電気泳動法

増幅産物の電気泳動には、DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA(島津製作所、以下「MultiNA」)を使用し、MultiNA用試薬として、DNA-1000試薬キット(100-1000bp測定用)を用いた。解析は、データ処理ソフト MultiNA Viewer により実施した。

### C. 研究結果及び考察

アガロースゲル電気泳動法による泳動像を図1に、マイクロチップ電気泳動法によるゲルイメージを図2に示した。

アガロースゲル電気泳動法では、1枚のゲルで、スタンダードおよび陽性コントロールを除く22検体の泳動ができたが、マイクロチップ電気泳動法では、PCRに用いた96穴プレートをそのままMultiNAにセットでき、スタンダードは別に泳動可能なため、一度のPCRで陽性コントロールを除く95検体を泳動できた。

電気泳動から解析にかかる時間は、アガロースゲル電気泳動法では、22検体においてゲルの作成から泳動、染色、解析までに約5時間が必要であった。一方、マイクロチップ電気泳動法では、95検体において試薬の調整等を含めて4時間以内で解析結果が得られた。

検査感度については、マイクロチップ電気泳動法はアガロースゲル電気泳動法よりも感度が高く、PCR後の検体をTEで15倍希釈しても十

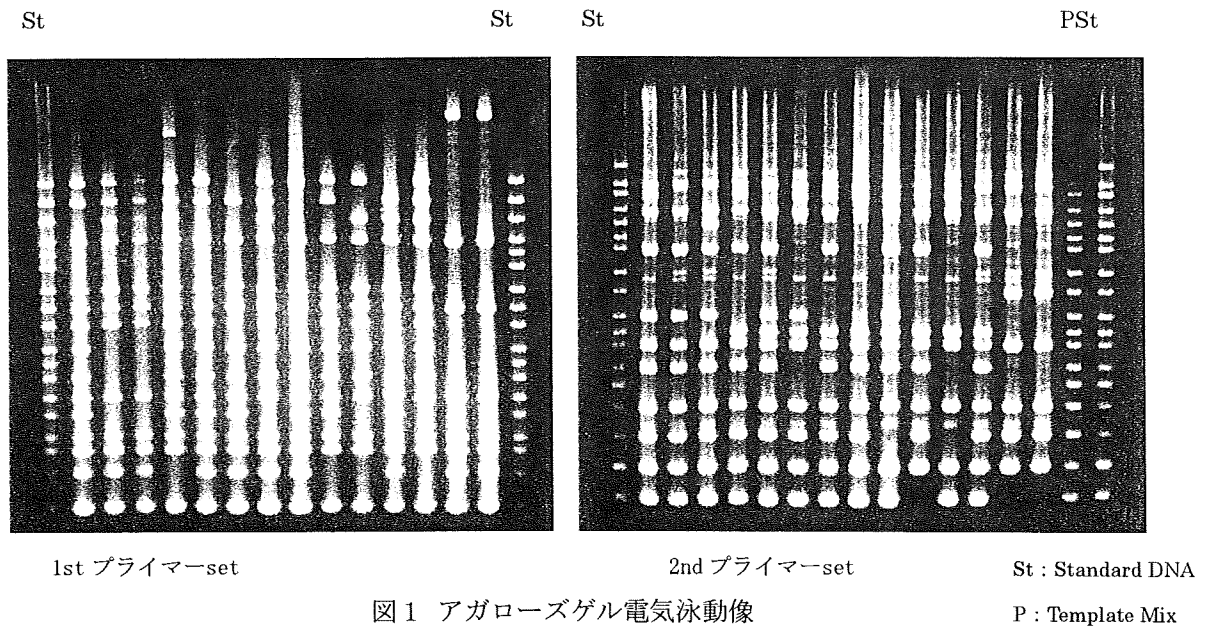
分にバンドが確認できた。

なお、今回の研究から、マイクロチップ電気泳動法による問題点として、以下の2点が挙げられた。①高分子量のバンドの分離が不十分となりやすく、特に2ndプライマーsetの2-02と2-03のバンドはスタンダードでも識別が困難であった。②検体ごとの泳動速度の差が生じやすく、アガロースゲル電気泳動法のような同時泳動ではないため、バンドの特定がやや困難であった。しかしながら、①については、MultiNA用試薬をDNA分離サイズレンジが100-2500bpのDNA-2500試薬キットを使用、②については、スタンダードとの比較をより精密に行うなどで改善が可能であると思われる。

#### D. 結論

岡山県で分離された腸管出血性大腸菌O157 57株について、IS-printing Systemを用い、多検体をより迅速かつ簡便に解析するため、マイクロチップ電気泳動法を実施し、従来のアガロースゲル電気泳動法と比較し、その有用性を検討した。

マイクロチップ電気泳動法を用いたIS-printing Systemは、アガロースゲル電気泳動法に比べ、高感度で、多検体をより迅速・簡便に分析することができた。しかし、高分子量のバンドの分離が不十分で、検体ごとの泳動速度の差が生じやすい等の問題点が認められたため、更なる条件検討が必要であると考えられた。



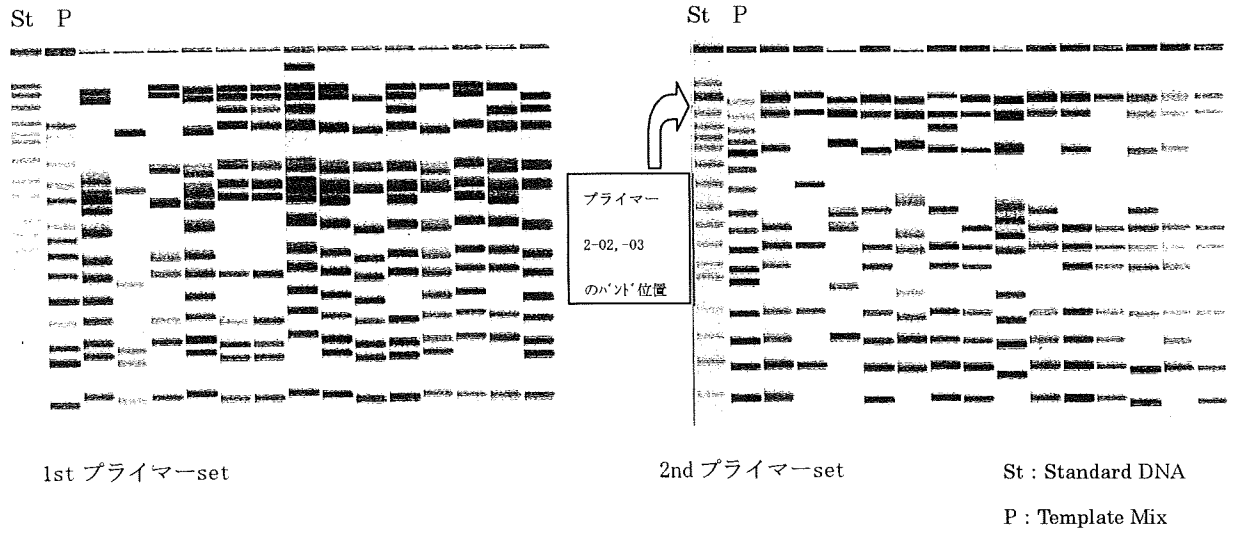


図2 マイクロチップ電気泳動法によるゲルイメージ



## IS printing 法を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析の有用性の検討

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

腸管出血性大腸菌 O157 感染症の発生に早期に対応可能な分子疫学解析のツールとして、IS printing 法が有用であるか検討を行った。

IS printing 法は、事例間ではそれぞれ異なるパターンを、事例内では同一のパターンを示し、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。

解析結果はデジタルデータであり簡単に比較ができるので、域内で結果を集約しメンバーならいつでも自由に閲覧できる情報ネットを構築できれば、感染源、感染経路究明と感染拡大防止に迅速に対応できる可能性がある。

### 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るため、腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) 感染症が発生した場合、感染源、感染経路の究明と感染拡大防止にタイムリーに役立つ可能性がある。

この方法での解析結果を中国・四国域内で比較することで、IS printing 法が O157 の広域での迅速な分子疫学解析として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 21 年中に島根県内で届け出のあった O157 4 株 (3 事例) を用いた。

#### 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。

電気泳動は、3%濃度の NuSieve GTG : SeaKem GTG=2:1 アガロース、0.5×TBE バッファーを用い、サブマリン型電気泳動

装置で 120V 100 分を行った。

また、IS printing の結果は、各プライマーセットごとに図 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 (以下 IS コード) して表記した。IS コードは岡山県環境保健センターに報告し、岡山県環境保健センターでは、中国・四国域内で発生した O157 の IS コードを集約、比較し、同一コードの O157 が分離されているかについて情報還元された。

### C. 研究結果及び考察 (表 2、図 1)

IS printing の電気泳動では TM (プレートミックス) のバンドが薄く、解析しづらかった。サンプルのバンドの濃さは十分であることから、TM の DNA 量が少ないものと思われた。

4 株のパターンは 3 つの事例間で相違があり、それぞれの事例間では関連がないことが示唆された。家族内感染の③と④は同じパターンを示し、疫学情報と一致した。

ISコードを集約することで、他県で同一タイプのO157の発生があったかどうか比較的迅速に情報が得られた。しかし、それはISコードを報告した時点での情報であり、報告後に他県での情報が追加された場合にその情報は還元されない。また、疫学情報を含む場合があることから、タイプが一致しない場合情報は一切提供されず、一

致した場合でも還元された他県の情報は県名と発生月のみであった。感染源対策、感染拡大防止のためにはより詳細な疫学情報の共有化が必要であり、メンバーならいつでも自由に閲覧可能な情報ネットの構築が望まれる。また、個人情報との兼ね合いから、今後どのような情報を集約するか検討が必要である。

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	<i>eae</i>	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
判定例(菌株No.1)	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	3			0			7			5			5			5		

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	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
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	1	0	0	0	1	1	1	0	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			1			6			5			7		

表2 供試菌株と IS printing の結果

No	届出年月日	発生場所等	VT	IS printingコード												還元された情報
				1st set						2nd set						
①	2009/8/24	G市	1&2	3	0	7	5	5	5	6	1	1	6	5	7	8月広島県分離株と一致
②	2009/9/1	H市	1&2	3	5	7	1	7	5	6	1	1	7	5	7	中国・四国域内に一致する株はない
③	2009/9/28	M市	1&2	3	1	1	0	5	7	3	1	0	4	5	7	中国・四国域内に一致する株はない
④	2009/10/1	③の子	1&2	3	1	1	0	5	7	3	1	0	4	5	7	中国・四国域内に一致する株はない

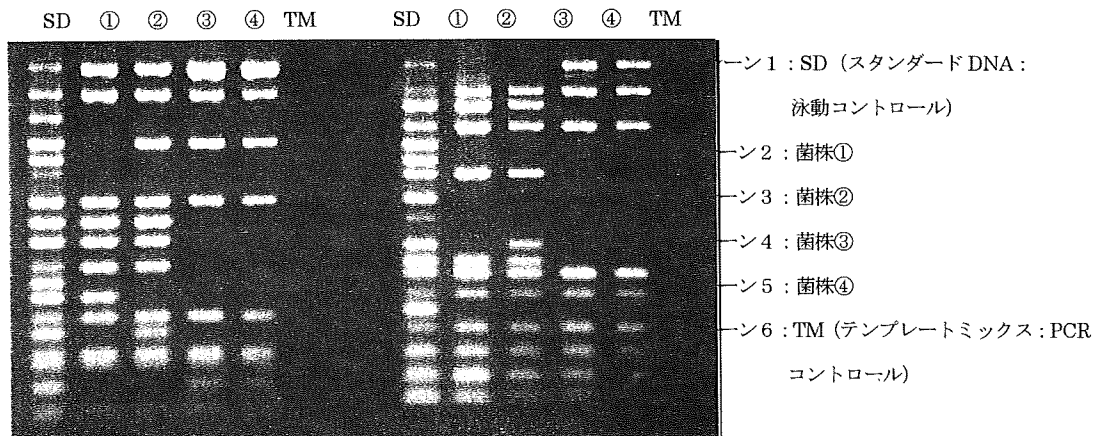


図1 IS printing の電気泳動像(左: 1st set、右: 2nd set)

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing 法,

## PFGE 法およびプラスミドプロファイルによる菌株間の識別についての検討

研究協力者 広島県立総合技術研究所 保健環境センター  
竹田 義弘 大原 祥子 桑山 勝

### 研究要旨

散发事例、家族内事例および接触者事例由来の O157:H7 について IS-printing 法、PFGE 法およびプラスミドプロファイルによる分子疫学解析を行い、それぞれの識別能力について検討した。その結果、菌株間の識別能力は PFGE 法が最も高く、次いで IS-printing 法 (PFGE 法に対する識別能力: 72.7%~80.0%)、プラスミドプロファイル (同: 50.0%~63.6%) の順であった。このうち IS-printing 法は、3 法の中で最も操作性が簡易であり、PCR の泳動パターンを数値化してコード化することで菌株間の遺伝子型の比較が簡単にできるため、疫学解析には有効な遺伝子型別法と思われる。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子型別解析法としてパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の有用性はすでに確立されているが、操作の煩雑性や解析時間などの問題点が指摘されている。そのためより簡便な方法として近年、IS-printing 法が開発され、O157 の新しい遺伝子型別法として注目されている。IS-printing 法は insertion sequence (IS) の分布に由来する領域をセットごとに増幅し、病原性関連遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *hlyA*) も同時に検出できるマルチプレックス PCR 法である。

我々はこれまで、県内で発生した集団感染事例や集団感染が疑われた事例等由来株について IS-printing 法の解析力、迅速性および PFGE 法との相関性について検討してきた。本研究では散发事例、家族内事例および接触者事例由来株について IS-printing 法、PFGE 法およびプラスミドプロファイルによる分子疫学解析を行い、それぞれの識別能力について検討したので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

2009 年 3 月から 10 月に県内の O157 感染者の糞便から分離された O157:H7 (VT2) 14 株, O157:H7 (VT1,2) 17 株の合計 31 株について解析した。表 1 に各菌株の概要を示した。

#### 2. 菌株の性状検査

菌株は同定キットの ID テスト EB20 (ニッスイ) を用いて 20 項目の生化学的性状を検査した。また、センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いてシプロフロキサシン (CPF) とホスホマイシン (FOM) の薬剤感受性試験を行うと共に、その MIC 値を、Etest (シスメックス・バイオメリュー) を用いて測定した。

#### 3. 分子疫学解析

##### (1) IS-printing 法

IS-printing System (東洋紡) を用いて、説明書に従ってテンプレートを作成し、各セット (1st set, 2nd set) の PCR を実施した。電気泳動は、3% アガロースゲル

(NuSieve GTG : SeaKem GTG=2 : 1) と 0.5×TBE Buffer で行い、同時に泳動した各セットの Standard DNA バンド (18 本) と比較してバンドの有無を判定した。各セットのバンドごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定し、近畿ブロックのコード化に従って、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、1st set, 2nd set の順に 12 桁の IS コードを求めた<sup>1)</sup>。表 1 にその変換例を示した。

## (2) PFGE 法

国立感染症研究所に菌株を送付して解析を依頼した。

## (3) プラスミドプロファイル

プラスミドは Kado ら<sup>2)</sup> の方法で抽出した。菌株を LB 培地で 35°C, 18 時間振とう培養し、その培養液をマイクロチューブに 1.2mL 分取して 12,000 rpm, 5 分間遠心し、上清を取り除いた。菌体は TE Buffer 100 μL に溶解し、lysing solution (3%SDS, 50mM Tris, 2N NaOH) 200 μL を加え、60°C の水浴で 30~40 分間溶菌した。溶菌液にフェノール : クロロホルム (1 : 1) 混液 300 μL を加えて混和した後、15,000 rpm, 20 分間遠心した。上層の 15 μL を TAE Buffer で調製した 0.7% アガロースゲル (コーム幅 6mm) で電気泳動した。写真撮影したプラスミドの泳動像は TIFF ファイルにデーター化し Fingerprinting II (BIO-RAD) でパターン分類を行った。

## C. 研究結果

### 1. 供試菌株の性状

菌株は、すべて同一の生化学的性状 (ID テストコード 0151453) を示し、菌株間の差異は認められなかった。また、薬剤感受性試験では、CPFX と FOM にはすべて感

受性を示し、菌株間に有意な感受性差は認められなかった。その MIC は、それぞれ 0.08~0.94 μg/mL, 0.25~16 μg/mL の範囲にあった。

## 2. IS-printing 法, PFGE 法およびプラスミドプロファイルの識別能力の比較

各解析法で型別した菌株の分類を表 3 に示した。また、プラスミドの型別泳動像を図 1 に示した。

O157:H7(VT2) 14 株は、PFGE 法では 10 タイプ、IS-printing 法では 8 タイプに型別された。また、プラスミドはすべての菌株が保有し 5 タイプに型別された。同様に O157:H7(VT1,2) 17 株は、PFGE 法では 11 タイプ、IS-printing 法では 8 タイプに型別された。また、プラスミドは、すべての菌株が保有し 7 タイプに型別された。その結果、プラスミドプロファイルは PFGE 法に対して 50.0%~63.6% の識別能力が認められた。特に、プラスミドを 1 個 (a 型) 保有する菌株では、多くの IS コードと PFGE 型に型別され、菌株間の識別能力は低かった。しかし、複数のプラスミドを保有する菌株では、1 タイプの IS コードと PFGE 型に分類されるものが多かった。また、家族内事例 (No.1, 2 : No.4, 5) や接触者事例 (No.No.6, 7 : No.16, 17 : No.28, 29) では、各事例内のプラスミド型は一致し、よく関連していた。一方、IS-printing 法は PFGE 法に対して 72.7%~80.0% の高い識別能力が認められた。しかし、IS コードが「311557-710413」には 3 タイプの PFGE 型 (e416, e423, e424), 「717575-611657」には 2 タイプの PFGE 型 (e203, e273), 「717577-611657」には 3 タイプの PFGE 型 (d111, e430, e431) が認められ、この 3 タイプの IS コードには複数の

PFGE 型が存在した。

#### D. 考 察

散発事例、家族内事例および接触者事例由来 O157:H7 株について IS-printing 法、PFGE 法およびプラスミドプロファイルによる識別能力を比較したところ、PFGE 法が最も細かく型別し、菌株間の識別能力が高かった。

プラスミドプロファイルは PFGE 法と比べて 50.0%~63.6%の識別能力しか認められなかったが、家族内事例や接触者事例など、菌株間の関連性が示唆される事例では、プラスミド型は一致し、よく相関していた。また、PFGE 解析に使用する解析ソフト (Fingerprinting II : BIO-RAD) を用いるとプラスミド型の分類も簡単にできることから、集団感染や家族内感染等が疑われる事例においては有効と思われる。しかし、プラスミドを保有していなければ型別できないことや、菌株の保存状況によってはプラスミドが脱落することがあるため、菌株の分離後はできるだけ早く解析することが必要である。

IS-printing 法は 3 法の中で最も操作性が簡易であり、PFGE 法に対して 72.7%~80.0%の識別能力があるため、菌株間の相同性のスクリーニングには適していた。特に、PCR の泳動パターンを数値化してコード化することで、過去の事例や異なる施設で分離された菌株との比較も簡単にできるため、広域的な疫学解析には有効であった。しかし、一部の IS コードには 5 タイプ以上の PFGE 型が存在することが指摘されているように<sup>1)</sup>、その対象コードと同じ「717575-611657」と「717577-611657」には複数の PFGE 型が認められた。また、今回の解析では、IS コードが「311557-

710413」にも複数の PFGE 型が認められ、前述の IS コードと同様に多くの PFGE 型が存在することが示唆された。

#### E. 結 論

- (1) 散発事例等由来 O157:H7 株を対象とした IS-printing 法、PFGE 法およびプラスミドプロファイルによる分子疫学解析では、PFGE 法が最も菌株間の識別能力が高かった。
- (2) プラスミドプロファイルは、集団感染や家族内感染等が疑われる事例においては有効な解析法と思われた。
- (3) IS-printing 法は、識別能力は高かったが、一部の IS コードには複数の PFGE 型が認められた。しかし、IS-printing 法は操作性が簡易であり、1 日で解析結果が得られることからスクリーニング検査には適していた。また、PCR の泳動パターンを数値化してコード化することで菌株間の遺伝子型の比較が容易にできるため、疫学解析には有効な遺伝子型別法と思われる。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 参考文献

- 1) 勢戸和子, 河野智美 他 (2008) : 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 19 年度総括・分担研究報告書, 101-128.
- 2) Kado C.I., Liu S.T. (1981) : J.Bacteriol., 145, 1365-1373.

表 1 供試菌株の概要

(1) O157:H7(VT2)株					(2) O157:H7(VT1,2)株				
菌株 No.	分離月	血清型	VT1,2	備考	菌株 No.	分離月	血清型	VT1,2	備考
1	3	O157:H7	- +	家族内	15	6	O157:H7	+ +	散発
2	3	O157:H7	- +	No.1の家族	16	7	O157:H7	+ +	散発
3	6	O157:H7	- +	散発	17	7	O157:H7	+ +	No.16の接触者
4	6	O157:H7	- +	家族内	18	8	O157:H7	+ +	散発
5	6	O157:H7	- +	No.4の家族	19	8	O157:H7	+ +	散発
6	6	O157:H7	- +	散発	20	8	O157:H7	+ +	散発
7	6	O157:H7	- +	No.6の接触者	21	8	O157:H7	+ +	散発
8	7	O157:H7	- +	散発	22	8	O157:H7	+ +	散発
9	8	O157:H7	- +	散発	23	8	O157:H7	+ +	散発
10	8	O157:H7	- +	散発	24	8	O157:H7	+ +	散発
11	8	O157:H7	- +	散発	25	8	O157:H7	+ +	散発
12	8	O157:H7	- +	散発	26	9	O157:H7	+ +	散発
13	8	O157:H7	- +	散発	27	9	O157:H7	+ +	散発
14	9	O157:H7	- +	散発	28	9	O157:H7	+ +	散発
					29	9	O157:H7	+ +	No.28の接触者
					30	10	O157:H7	+ +	散発
					31	10	O157:H7	+ +	散発

表 2 IS-printing 法の増幅バンドサイズと判定のコード変換例  
(1) 1st set Primer (2) 2nd set Primer

Primer No.	Size (bp)	判定例	係数	加算	Primer No.	Size (bp)	判定例	係数	加算
1-01	974	1	1	3	2-01	987	0	1	6
1-02	839	1	2		2-02	861	1	2	
1-03	742	0	4		2-03	801	1	4	
1-04	645	1	1	1	2-04	710	1	1	1
1-05	595	0	2		2-05	642	0	2	
1-06	561	0	4		2-06	599	0	4	
1-07	495	1	1	7	2-07	555	1	1	1
1-08	442	1	2		2-08	499	0	2	
1-09	405	1	4		2-09	449	0	4	
1-10	353	1	1	1	2-10	394	1	1	7
1-11	325	0	2		2-11	358	1	2	
1-12	300	0	4		2-12	331	1	4	
1-13	269	1	1	7	2-13	301	1	1	5
1-14	241	1	2		2-14	278	0	2	
1-15	211	1	4		2-15	240	1	4	
<i>eae</i>	185	1	1	5	2-16	211	1	1	7
1-16	171	0	2		Stx2	181	1	2	
<i>hlyA</i>	137	1	4		Stx1	151	1	4	

表3 IS-printing 法, PFGE 法およびプラスミドプロファイルによる解析結果

(1) O157:H7(VT2)株の型別分類

プラスミド型	ISコード	PFGE型	菌株No.
a	105455-711642	e422	9
	201457-310242	e417	1, 2
	311555-710413	e425	12
	311557-710413*	e424	10
	311557-710413*	e423	13
	717557-611653	e419	6, 7
b	211555-710403	e98	3, 4, 5
c	307575-611653	e432	11
d	311557-710413*	e416	8
j	115057-303443	e634	14

\*: 同じ IS コード

(2) O157:H7(VT1,2)株の型別分類

プラスミド型	ISコード	PFGE型	菌株No.
a	717575-611657*	e203	28, 29
	717575-611657*	e273	31
	717577-611657**	d111	19, 27
c	317577-611757	e429	18
	617577-231547	e413	15
	717057-231557	e270	16, 17
e	717577-611657**	e431	20
f	717577-611657**	e430	21
g	307555-611657	e426	22, 23, 25
h	317175-611757	e241	24, 30
i	307557-611657	e638	26

\* \*\* : 同じ IS コード

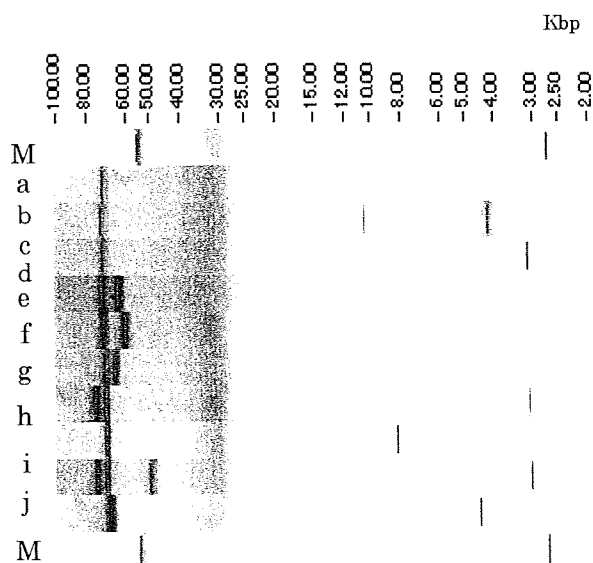


図1 プラスミドの型別泳動像

M: マーカー (*E.coli* V517)  
a~j: プラスミド型

## 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析法の比較検討

研究協力者 広島市衛生研究所

末永 朱美 田中 寛子 宮野 高光 国井 悦子 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

2006年4月から2009年12月までに広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7、80株を分子疫学解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)、IS-printing法、MLVAの3法を用いて解析し、その解析結果を用いて型別法と疫学的関連性および、その有用性について検討した。供試した80株は、PFGEで43のクラスタ、MLVAで50のクラスタ、IS-printing法では29タイプに分類された。3法で一致したタイプに分類された株は、同一事例間では疫学的関連の裏付けとなった。散発事例間で時期的に近い株は、疫学的関連は確認されなかったものの同一感染源由来であることが考えられ、より詳細な疫学解析が必要であると考えられた。一つの解析で同一型に分類されても、他の2法で異なる型として分類される場合については疫学情報などを参考に慎重に型別を行う必要があり、3法により型別の原理が異なるため、複数の解析法を併用して型別を行う必要があると考えられた。

### A.研究目的

分子疫学的解析法である PFGE、IS-printing 法、MLVA の 3 法の解析結果を用いて、腸管出血性大腸菌 O157 の型別法と感染事例での疫学的関連性を検討した。また、3 法を比較し、それぞれの有用性や関連性について検討する。

### B.材料および方法

#### 1.材料

2006年4月から2009年8月までの期間に広島市域で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7、43 事例 80 株を用いた。

#### 2.方法

PFGE は、制限酵素 *Xba*I を用い、国立感染症研究所で示された方法に従い実施し、Finger Printing II (Bio-Rad) を用いて解析を行った。解析は、Dice 法(最適化:0.0%、トレランス:1.0%)による相似係数を算出し、平均距離法(UPGMA)による系統樹を作成した。MLVA 解析には 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)及び Gene Scan Analysis Software (Applied Biosystems 社)を用い、

Hyttia-Trees<sup>1)</sup>らの方法で9カ所のVNTR領域について解析を行った。Fragment size marker は GeneFlo 625 TAMRA labeled(CHIMERx 社)を使用した。

IS-printing 法は IS-printing system<sup>®</sup>(東洋紡)を使用し、添付のプロトコールに従い実施した。結果を、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 set、2nd set の順に並べて12桁で表わして IS コードとした。

### C.結果および考察

供試した80株は、PFGEで43のクラスタに、MLVAでは50のクラスタに分類された(図1,2)。IS-printing法は29のコード型に分類された(表1)。

事例焼肉店01で分離された6株中1株(菌株番号6023)はISコード型、PFGE、MLVAのいずれも他5株と異なった。この株を分離した患者は発症



日が他の患者よりも1週間近く遅く、また喫食した店は系列店ではあったが、別の店舗であったことから、感染源は異なるものと考えられた。また事例広域01で分離された4株ではISコード型は一致したがPFGE、MLVAのパターンではわずかに異なった。これらの株は2006年に感染研に送り、当時のPFGE Type Numberは他県分与株2株(菌株番号6033, 6034)と市内分離株2株(菌株番号6025, 6026)で型別が異なった。当所での2008年、2009年に行ったPFGE、MLVA解析結果ではほぼ一致して市内分離株の一つ(菌株番号6025)が異なるものとなった。この結果は、当所での保存期間中にIS-printing法に影響しない部分で変異が起こった可能性もあるが、原因は不明である。以上2つの事例を除き、集団感染事例、家族間感染事例など疫学的関連のある株はIS-printing法で同一型に分類され、MLVA、PFGEでは画像パターンもよく類似しており、クラスタ解析による類似度も高く、同一感染源由来の事例と考えられた。

疫学的関連性は確認できない事例間で分離された株で、3法でほぼ同一型とされた株は7グループあった(表2)。これらのうち発症または分離の時期が集中している4グループ(グループ1, 2, 3, 6)は疫学的関連性を示すデータはないが、共通の感染源を持つ可能性が示唆された。

異なる事例間においてIS-printingで同一型とされたが、PFGE、MLVAでは違う型とされた株の組み合わせは3組あった。またIS-printingは3法の中で最も型別の種類が少なく、同一型が必ずしも他法での遺伝子型の一致を示すものではないことが考えられ、広域での分子疫学解析を行う際には注意が必要であると考えられた。

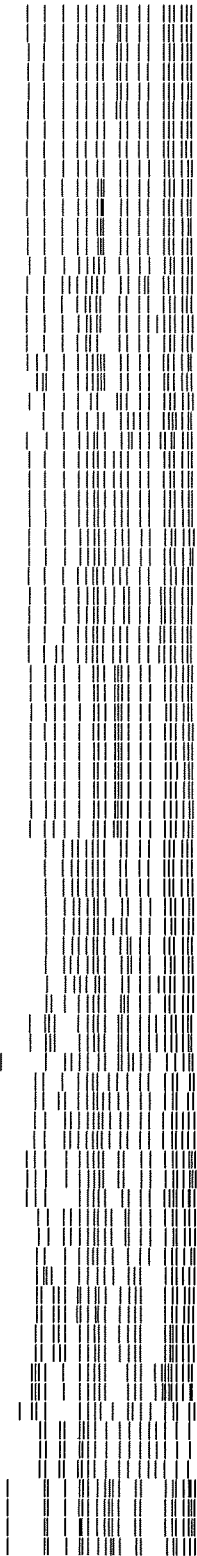
PFGEで同一型とされ、IS-printing法、MLVAで異なる型とされたものは1グループで3事例6株あった。これらは事例で感染研によるPFGE

TNが異なっていたため、再度PFGEを行い、泳動像を目視で確認したところ、2bandでわずかな差異が確認できた。これをFinger Printing IIで解析したところ類似度100%のクラスタを形成した。ソフトによる解析には限界があり、再検査等で確認することも可能だが、MLVAやIS-printingを組み合わせることで容易に区別することができ、複数での解析の有用性が示唆された。

以上のことから、3法を組み合わせることでより効率的に解析ができるものと考えられた。

#### 参考文献

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



菌株番号	事例	PFGE TN	VT型
6027	N02	b452	VT1,2
6028	AM02	b452	VT1,2
9025	広域02	e241	VT1,2
9026	広域02	e241	VT1,2
9027	広域02	e241	VT1,2
9030	広域02	e241	VT1,2
6018	焼肉店01	b106	VT1,2
8031	H02	d524	VT1,2
9001	AK05	d524	VT1,2
6014	焼肉店01	b107	VT1,2
6015	焼肉店01	b107	VT1,2
6016	焼肉店01	b107	VT1,2
6017	焼肉店01	b107	VT1,2
8020	NK02	d526	VT1,2
6044	NK01	b724	VT1,2
9016	H09	d478	VT1,2
9018	M03	d478	VT1,2
9017	N09	d478	VT1,2
8018	AM05	d154	VT1,2
8019	AM06	d523	VT1,2
9019	AM08	e431	VT1,2
6023	焼肉店01	b129	VT1,2
6013	N01	b45	VT1,2
6021	AK01	a259	VT1,2
6022	AK01	a259	VT1,2
6023	広域01	a259	VT1,2
6026	広域01	a259	VT1,2
7007	AK02	a259	VT1,2
7011	AK02	a259	VT1,2
9011	N08	a259	VT1,2
6033	広域01	b216	VT1,2
6034	広域01	b216	VT1,2
7014	N03	a259	VT1,2
7015	N03	a259	VT1,2
8006	保育園	a206	VT1,2
8007	保育園	a206	VT1,2
8005	保育園	a206	VT1,2
8008	保育園	a206	VT1,2
8004	保育園	a206	VT1,2
8009	保育園	d77	VT1,2
8012	保育園	a206	VT1,2
8013	保育園	d77	VT1,2
8010	保育園	a206	VT1,2
7017	焼肉店04	c566	VT2
7018	M01	c566	VT2
7021	M01	c566	VT2
8017	N05	c304	VT2
8049	N07	d879	VT2
7019	M01	c566	VT2
8003	AK03	d76	VT2
6039	AM03	b718	VT2
8046	H03	b325	VT1,2
9020	S03	e568	VT1,2
9021	S03	e568	VT1,2
6012	H01	b56	VT1,2
9012	S02	d371	VT2
7025	N04	b423	VT2
7022	AM04	c575	VT2
7023	AM04	c575	VT2
8033	N06	d344	VT2
8032	N06	d344	VT2
7013	焼肉店03	c574	VT2
8047	AK04	d529	VT2
8048	AK04	d529	VT2
9005	NK03	e52	VT1,2
8011	AM01	b52	VT1,2
7003	焼肉店02	c73	VT2
7005	焼肉店02	c73	VT2
9022	H05	c57	VT2
9023	H05	c57	VT2
9002	焼肉店05	e13	VT2
9003	焼肉店05	e13	VT2
8015	M02	d516	VT2
8030	AM07	d513	VT2
8025	AM07	d513	VT2
8026	AM07	d513	VT2
9006	H04	e54	VT1,2
9007	H04	e55	VT1,2
9009	H04	e57	VT1,2
9008	H04	e56	VT1,2

図1 PFGE 解析クラスターとバンドパターン



菌株 番号	事例	PFGE TN	VT 型
8014	焼肉店01	b107	1,2
8015	焼肉店01	b107	1,2
8016	焼肉店01	b107	1,2
8017	焼肉店01	b107	1,2
8018	焼肉店01	b106	1,2
8048	H03	b325	1,2
8044	NK01	b724	1,2
8018	AM05	d154	1,2
8019	AM06	d523	1,2
8031	H02	d524	1,2
9001	AK05	d524	1,2
9016	N09	d478	1,2
9017	N09	d478	1,2
9018	M03	d478	1,2
8023	焼肉店01	b129	1,2
8032	N06	d344	2
8033	N06	d344	2
7013	焼肉店03	c574	2
7022	AM04	c575	2
7023	AM04	c575	2
7017	焼肉店04	c586	2
7019	M01	c586	2
7021	M01	c586	2
7018	M01	c586	2
8017	N05	c304	2
8049	N07	d879	2
8003	AK03	d76	2
8039	AM03	b718	2
8027	N02	b452	1,2
8028	AM02	b452	1,2
8013	N01	b45	1,2
8020	NK02	d526	1,2
8010	保育園	d77	1,2
8012	保育園	a206	1,2
8004	保育園	a206	1,2
8005	保育園	a206	1,2
8008	保育園	a206	1,2
8007	保育園	a206	1,2
8009	保育園	a206	1,2
8013	保育園	a206	1,2
8008	保育園	d77	1,2
9025	広域02	e241	1,2
9027	広域02	e241	1,2
9026	広域02	e241	1,2
9030	広域02	e241	1,2
8021	AK01	a259	1,2
8022	AK01	a259	1,2
7014	N03	a259	1,2
8028	広域01	a259	1,2
8033	広域01	b216	1,2
8034	広域01	b216	1,2
7007	AK02	a259	1,2
7011	AK02	a259	1,2
7015	N03	a259	1,2
9011	N08	a259	1,2
8025	広域01	a259	1,2
9005	NK03	e52	1,2
9019	AM08	e431	1,2
9020	S02	e588	1,2
9021	S02	e588	1,2
8012	H01	b58	1,2
9022	H05	c57	2
9023	H05	c57	2
7003	焼肉店02	c73	2
7005	焼肉店02	c73	2
7025	N04	b423	2
8015	M02	d516	2
9012	S01	d371	2
9008	H04	e54	1,2
9007	H04	e57	1,2
9008	H04	e55	1,2
9009	H04	e56	1,2
8011	AM01	b52	1,2
8025	AM07	d513	2
8028	AM07	d513	2
8030	AM07	d513	2
9003	焼肉店05	e13	2
9002	焼肉店05	e13	2
8047	AK04	d529	2
8048	AK04	d529	2

図2 MLVA解析クラスタ

表1 ISコード型と事例

IS型	IS-printing	株数	事例数	事例	VT型
1	010057214443	1	1	N04	2
2	012057210443	1	1	S01	2
3	012057214443	1	1	M02	2
4	115047341447	1	1	NK03	1,2
5	115057303443	2	1	AK04	2
6	117177601747	9	1	保育園	1,2
7	135247303447	5	2	AM01,H04	1,2
8	215455605243	3	1	AM07	2
9	245057311442	2	1	焼き肉店02	2
10	305457711242	2	1	焼き肉店05	2
11	307557611657	1	1	H01	1,2
12	311557710413	5	3	焼き肉店03,AM04,N06	2
13	315557211356	2	1	S02	1,2
14	315577611357	1	1	NK01	1,2
15	317175611757	4	1	広域02	1,2
16	317557611653	2	2	N05,N07	2
17	317575211757	7	3	焼き肉店01,H02,AK05	1,2
18	317575611757	1	1	焼き肉店01	1,2
19	317577611557	1	1	H03	1,2
20	317577611657	3	2	N09,M03	1,2
21	317577611757	2	2	AM05,AM06	1,2
22	345457311652	2	1	H05	2
23	517557611653	1	1	AK03	2
24	613577610646	11	5	AK01,広域01,AK02,N03,08	1,2
25	707575611617	2	2	N02,AM02	1,2
26	717557611653	4	2	焼き肉店04,M01	2
27	717557611657	1	1	NK02	1,2
28	717577611653	1	1	AM03	2
29	717577611657	2	2	N01,AM08	1,2