

表 2 遺伝子型類似株比較

グループ	発症(分離) 年月日	菌株番号	事例	VT型	K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	IS-printing	PFGE
1	2006/8/25	6027	N02	1,2	5	12	9	17	8	6	9	7	20	707575611617	b452
	2006/8/30	6028	AM02	1,2	5	12	9	17	8	6	9	7	20	707575611617	b452
2	2007/9/26	7017	焼き肉店04	2	5	13	9	12	7	6	5	7	34	717557611653	c566
	2007/9/27	7018	M01	2	5	13	9	12	7	6	5	7	33	717557611653	c566
	2007/10/1	7019	M01	2	5	13	9	12	7	6	5	7	34	717557611653	c566
	2007/10/2	7021	M01	2	5	13	9	12	7	6	5	7	34	717557611653	c566
3	2008/7/25	8018	AM05	1,2	3	10	10	11	8	6	6	6	29	317577650757	d154*
	2008/7/26	8019	AM06	1,2	3	10	10	11	8	6	6	6	28	317577650757	d523*
4	2008/8/24	8031	H02	1,2	5	9	10	11	8	6	6	6	29	317575211757	d524
	2009/3/3	9001	AK05	1,2	5	9	10	12	8	6	6	6	40	317575211757	d524
5	2008/7/22	8017	N05	2	5	15	9	13	7	6	4	7	30	317557611653	c304**
	2008/12/5	8049	N07	2	5	14	9	13	7	6	4	7	29	317557611653	d879**
6	2009/7/23	9016	N09	1,2	5	6	10	7	9	6	7	5	27	317577611657	d478
	2009/7/24	9017	N09	1,2	5	6	10	7	9	6	7	5	27	317577611657	d478
	2009/7/31	9018	M03	1,2	5	6	10	7	9	6	7	5	27	317577611657	d478
7	2006/7/18	6021	AK01	1,2	5	14	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	a259
	2006/7/18	6022	AK01	1,2	5	14	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	a259
	2006/8/13	6025	広域01	1,2	3	14	9	16	5	4	11	6	21	613577610646	a259
	2006/8/17	6026	広域01	1,2	5	14	9	16	7	4	11	6	21	613577610646	a259
	2006/9/17	6033	広域01	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	b216
	2006/9/19	6034	広域01	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	b216
	2007/7/19	7007	AK02	1,2	5	13	9	17	7	4	11	6	22	613577610646	a259
	2007/7/15	7011	AK02	1,2	5	13	9	17	7	4	11	6	22	613577610646	a259
	2007/9/9	7014	N03	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	20	613577610646	a259
	2007/9/13	7015	N03	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	26	613577610646	a259
	2009/6/19	9011	N08	1,2	5	13	9	16	7	4	11	6	21	613577610646	a259

*one band different

**two band different

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 矢端順子

研究要旨

平成 21 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 32 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 法による型別を昨年度と同様に実施し、PFGE 法との比較のみならず、喫食調査により得られた疫学情報を加味することにより、その解析能力の有用性を検討した。

その結果、IS-printing 法は、疫学的に同一と考えられる感染源による感染例ではすべて同一のプロファイルであり、十分な解析能力が認められた。PFGE 法との比較では、IS で同一プロファイルであったが PFGE パターンが異なった例が 3 例、PFGE パターンは同一で IS のプロファイルが異なった例が 1 例、それぞれ認められた。PFGE を遺伝子型別のゴールデンスタンダードとすれば、やはり IS-printing 法の解析能力はやや劣るものと考えられた。

しかしながら、その他の 6 事例、特に食中毒事件の例では、IS のプロファイルは患者間ですべて同一であり、また本法がきわめて操作が簡便で、結果判定が即日可能であることを考慮すれば、県内の腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析、特に迅速性が求められる食中毒事例において、十分有用な遺伝子解析方法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 21 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 21 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 32 株を用いた(VT2:12,株 VT1+2:20 株)[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 0.5×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、ミューピッド 2pluse(タカラバイオ)で 100V70~90 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

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し、PFGE 型との相関を調べるとともに、感染事例のあった管轄の環境保健所が調査する喫食調査情報の提供を依頼し、このデータも加味して IS-printing 法の解析能力について評価した。なお、環境保健所によっては情報提供の協力がえられない事例もあった。

5 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 32 株の PFGE 型、IS-printing 法の 1st および 2nd プロファイル、VT 型、喫食状況を表 2 に示す。また、そのデータを PFGE パターンを第 1 のキー、IS-printing 1st プロファイルを第 2 のキー、IS-printing 2nd 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。また、すべての株の泳動像の写真を添付した。

32 株のうち同一の PFGE 型と判定された菌株は 9 パターン 19 株であった。(①d833:菌株No.09Y02、09Y03、09Y04②d92:菌株No.09Y10 と 09Y24、③e225:菌株No.09Y13 と

09Y14、④e267:菌株No.09Y25 と 09Y26、⑤e328:菌株No.09Y27 と 09Y29、⑥e550:菌株No.09Y31 と 09Y32、⑦e554:菌株No.09Y33 と 09Y34、⑧e98:菌株No.09Y08 と 09Y09、⑨e99:菌株No.09Y06 と 09Y19)。それらの IS-printing プロファイルを見ると、①d833 は 012057-214443、②d92 は 717557-611657 ③e225 は 117177-601757、④e267 は 703577-510657、⑤e328 は 144047-301443、⑥e550 は 613575-610646、⑦e554 は 717557-611657、⑧e98 は 215555-710403、⑨e99 は 09Y06 が 145047-303443、09Y19 が 145047-103443 で、それぞれの株のプロファイルが完全に一致していたのはパターン①、②、③、④、⑤、⑥、⑦、⑧の 8 パターンで、最後の⑨は 2 株の IS プロファイルは、09Y06 が 145047-303443 で 09Y19 が 145047-103443 と、2nd primer set のプロファイルがわずかに異なっていた。

このように、今回の供試菌株については、IS-printing と PFGE の間に高い相関が認められた。

逆に IS-printing プロファイルが同一であったのは、まずプロファイルが 012057-214443 であった 09Y02、09Y03、09Y04 の 3 株、117177-6017571 であった 09Y13、09Y14 の 2 株、703577-610657 であった 09Y25、09Y26 の 2 株、144047-301443 であった 09Y27、09Y29 の 2 株、613575-610646 であった 09Y31、09Y32 の 2 株、215555-710403 であった 09Y08、09Y09 の 2 株であり、これらはすべてのプロファイルグループ内の PFGE パターンが同一であった。しかしながら、717557-611657 というプロファイルを示した株は、全部で 5 株あり、それぞれ PFGE

パターンに差異が認められた。

すなわち、まず 09Y11 の PFGE パターンは d27、09Y10 および 09Y24 の 2 株は d92、09Y33 および 09Y34 の 2 株は e554 と判定され、IS-printing プロファイルと PFGE パターンの間に相関が認められなかった(表3)。

この理由は明らかにはできなかったが、PFGE が IS-printing よりも解析能力に優れていることを示唆しているのかもしれない。ただ、09Y11 は 09Y10 の母親であり、09Y10 から 09Y11 が感染し無症状保菌者となったと推察され、したがって、この 2 名からは共通の PFGE パターンの株が分離されると推察されたが、09Y10 と 09Y11 との PFGE パターンは 2 バンド異なっており、そのため PFGE パターンに差異が生じた。しかし、クロナルターンオーバーという現象の存在が知られており、3 バンドまでは同一 PFGE パターンと見なすのが一般的と考えられるため、これら 2 株は同一 PFGE 型と解釈すれば、IS-printing が同一プロファイルとなった理由も説明できる。

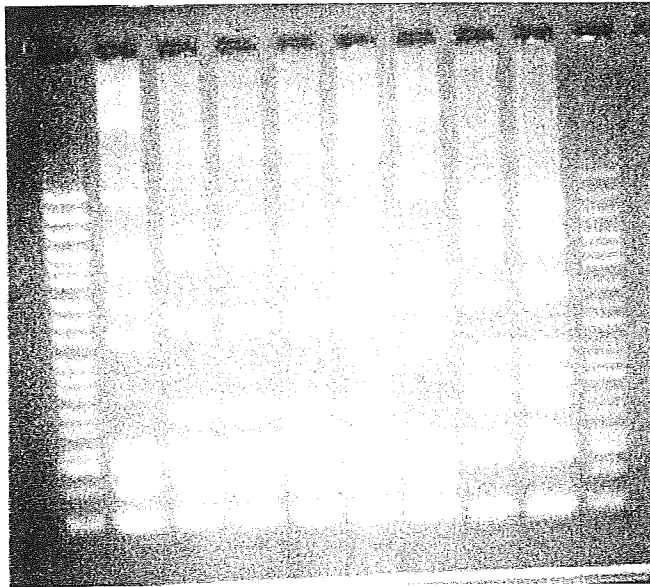
その他の菌株については、特に 09Y33 と、09Y34 の 2 株が分離された患者の発病年月日が同一であることから、何らかの共通感染源の存在が示唆されたが、喫食状況が調査されていないため明らかにすることはできなかった。また、09Y10 と 09Y24 の 2 株についても、この 2 名の患者には接点は無く、発病年月日も約 1 か月異なっているが、2 名ともに牛レバーやバーベキューをしているなど、この例でも共通の感染源となった食材の存在が示唆された。

以上の結果から、より詳しい感染疫学の一助とするため喫食状況調査データも加えて検討した結果、IS-printing 法の解析能力は

PFGE 法にはやや及ばないものの、PFGE 同一パターン株ではすべて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 型が異なった 1 株以外はすべて PFGE パターンも IS-printing プロファイルも同一であったことから、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非常に有用であり、今後ますます利用すべき遺伝子解析手法であると考ええる。

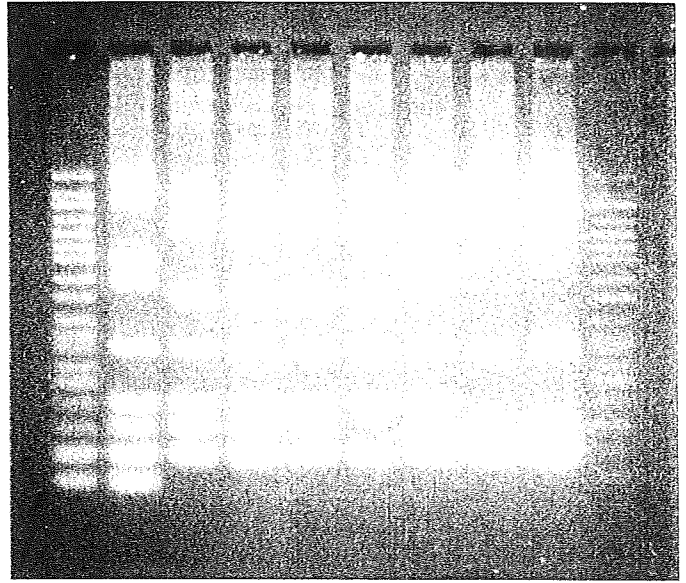
IS-printing 泳動像-1

09Y01~09Y09 1st set primer



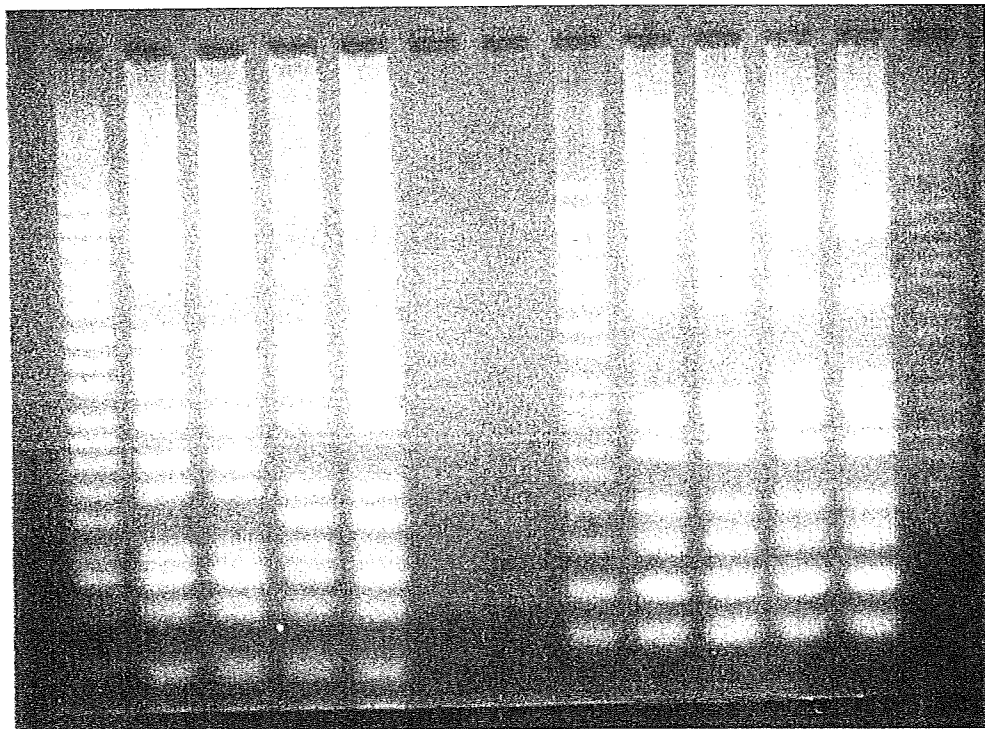
std 01 02 03 04 05 06 08 09 PC

09Y01~09Y09 2nd set primer



std 01 02 03 04 05 06 08 09 PC

09Y10~09Y14 1st set primer



std 10 11 13 14 PC

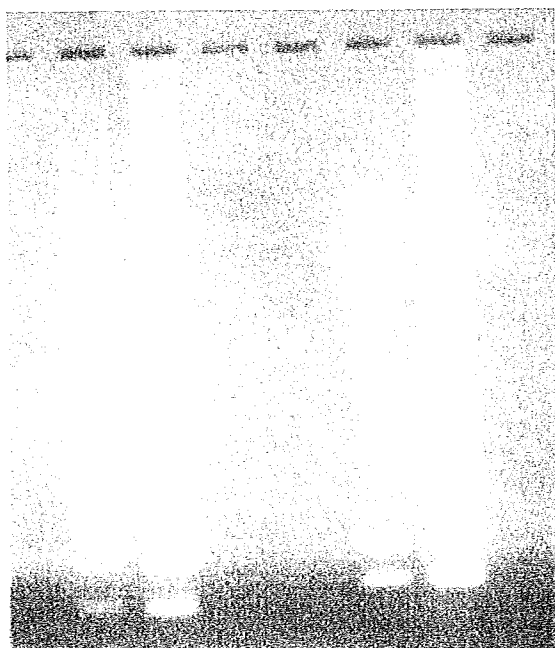
2nd set primer

std 10 11 13 14 PC

(PC 増幅不良)

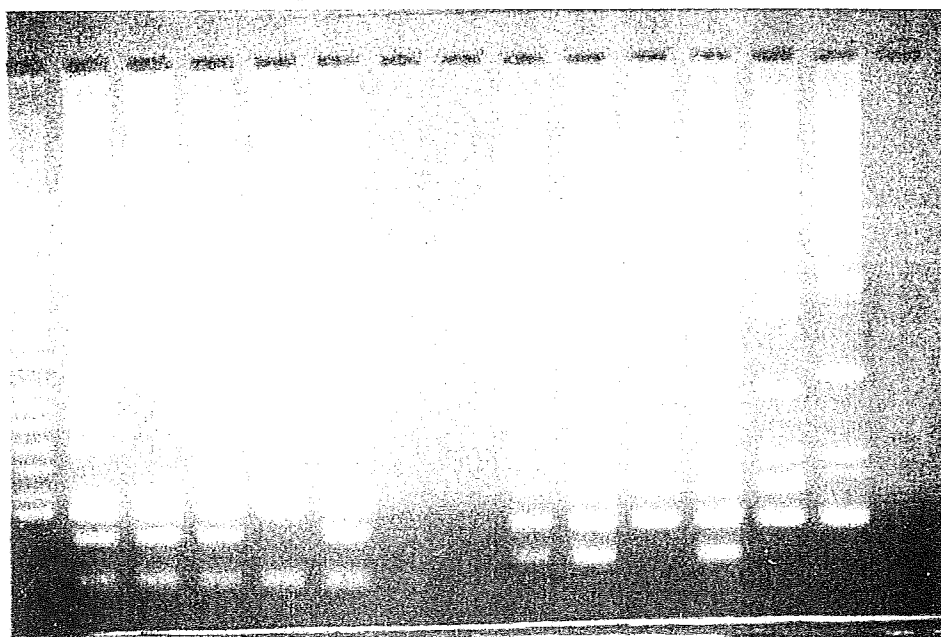
IS-printing 泳動像-2

09Y15 1st set primer 2nd set primer



std 15 PC std 15 PC
(PCが増幅されていない)

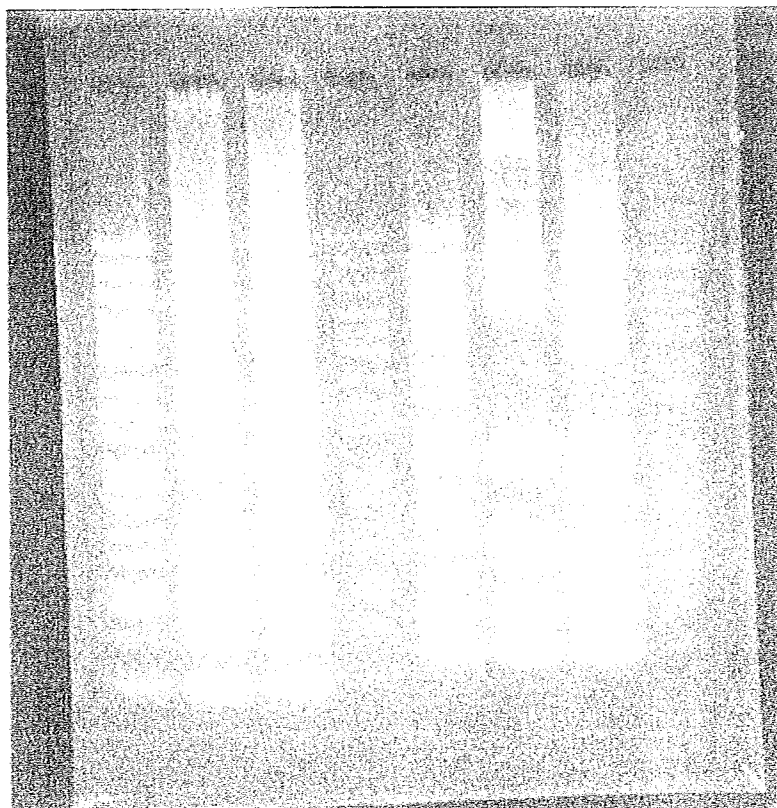
09Y18~09Y22 1st set primer 2nd set primer



std 18 19 20 21 22 PC std 18 19 20 21 22 PC
(PCの増幅が非常に悪い)

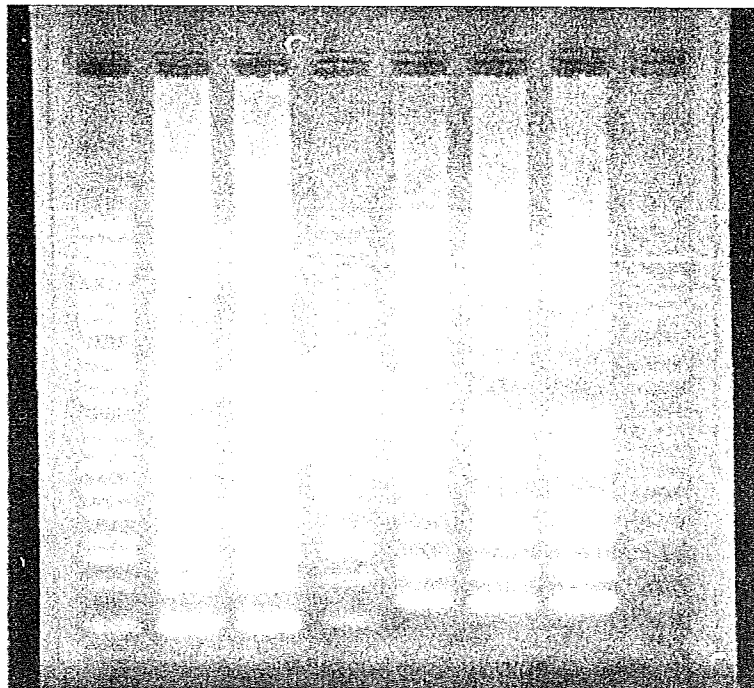
IS-printing 泳動像-3

09Y23~09Y24 1st set primer 2nd set primer



std 23 24 PC std 23 24 PC

09Y25~09Y26 1st set primer 2nd set primer

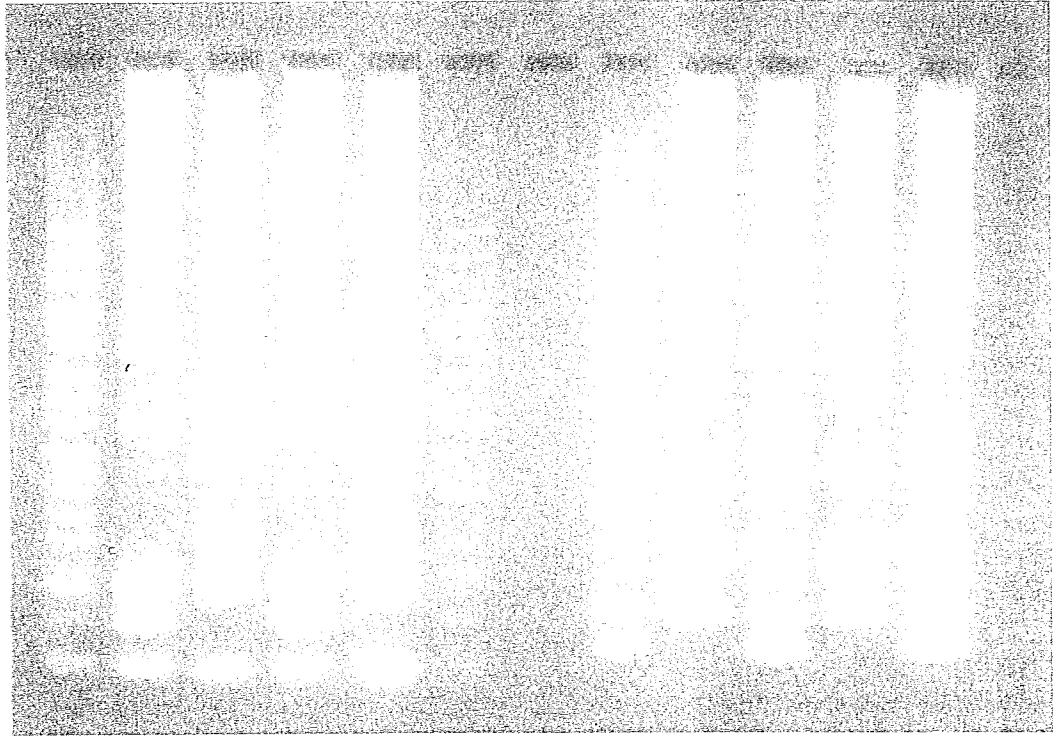


std 25 26 PC std 25 26 PC

IS-printing 泳動像-4

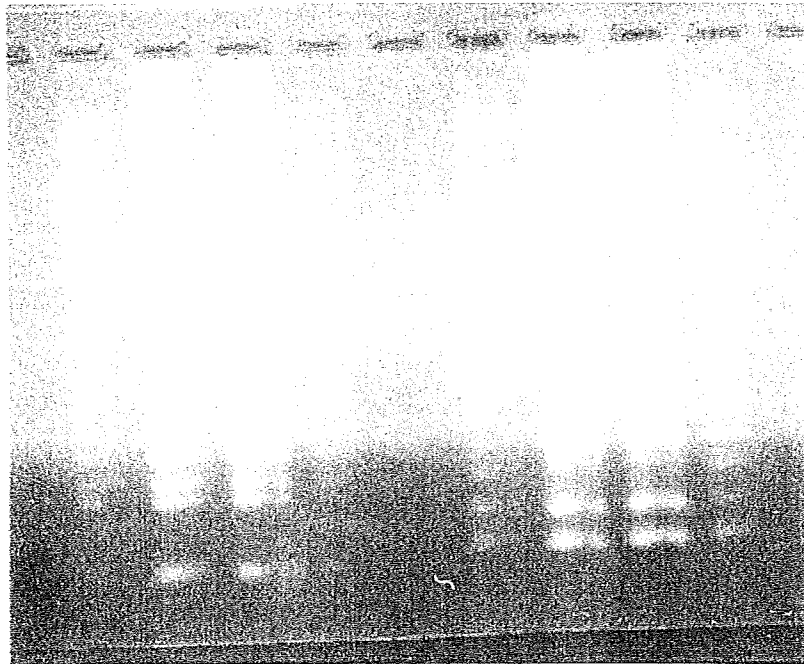
09Y27~09Y30 1st set primer

2nd set primer



std 27 28 29 30 PC std 27 28 29 30 PC
 (2nd set primer PCの増幅が非常に悪い)

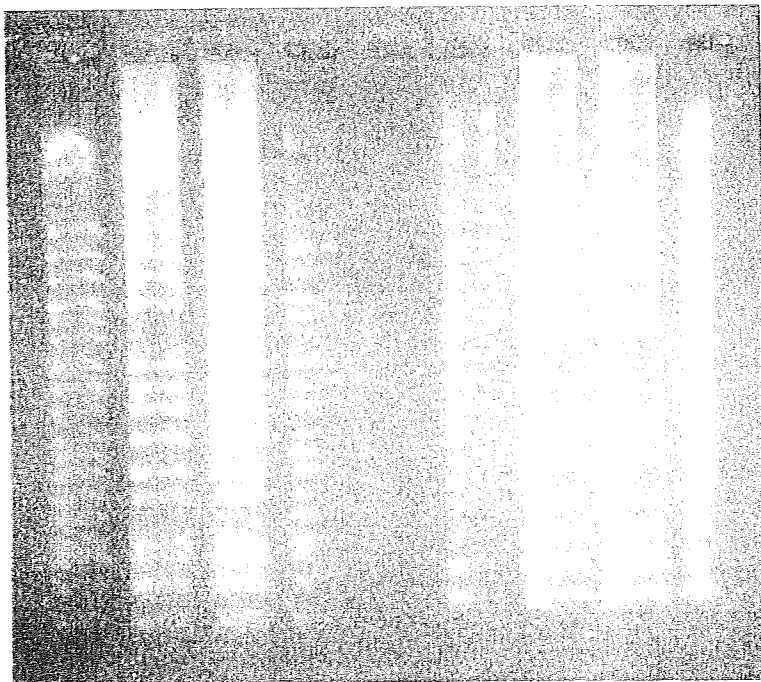
09Y31~09Y32 1st set primer 2nd set primer



std 31 32 PC std 31 32 PC

IS-printing 泳動像-5

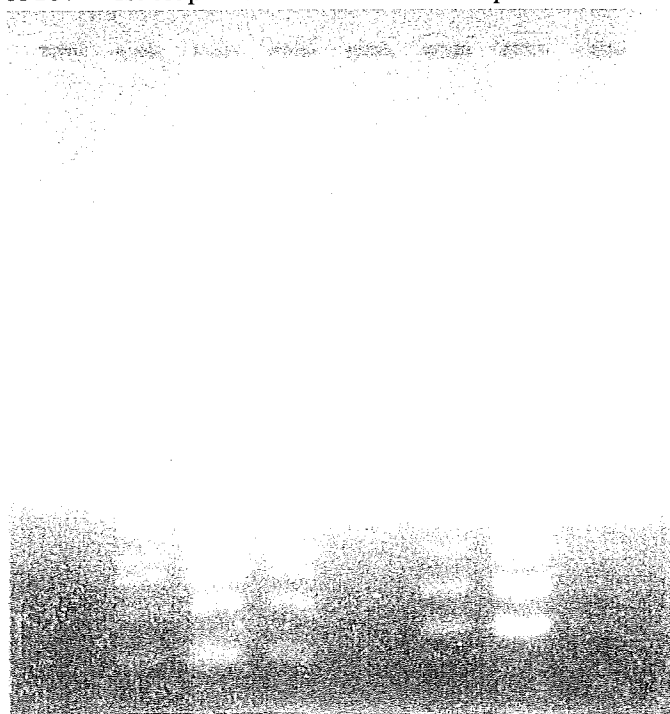
09Y33~09Y34 1st set primer 2nd set primer



std 33 34 PC std 33 34 PC

(ゲルの状態が悪く、PCがwellに十分アプライできなかった)

09Y57 1st set primer 2nd set primer



std 57 PC std 57 PC

(2nd set primer PCの増幅が非常に悪い)

表1 平成21年度分離菌株

発症日	分離日	都道府県住所	番号	年齢	性別	備考	症状	O:H	VT1	VT2	PFGE コメント	Type No.
2009/1/27	2009/1/29	山口県下関市	08Y34 4	F	散発		腹痛、下痢、血便、HUS	O157:H7	+			e6
2009/4/20	2009/4/27	山口県岩国市	09Y01 24	F	散発、刺身		腹痛、下痢	O157:H7	+			e101
2009/4/18	2009/4/23	山口県山陽小野田市	09Y02 4	F	散発、焼肉		腹痛、血便	O157:H7	-			d833
-	2009/4/26	山口県山陽小野田市	09Y03 44	M	散発、保菌者		無症状	O157:H7	-		same as 683	d833
2009/4/21	2009/4/29	山口県山陽小野田市	09Y04 11	M	散発、焼肉		腹痛、下痢	O157:H7	-		same as 683	d833
-	2009/5/21	山口県山口市	09Y05 77	F	集発、保菌者	中国への海外ツアーにて感染	無症状	O157:H7	-			e96
2009/5/20	2009/5/27	山口県防府市	09Y06 9	F	散発、焼肉		腹痛、下痢	O157:H7	-			e99
2009/6/1	2009/6/9	山口県防府市	09Y08 5	F	散発		腹痛、発熱(38.0°C)、下痢、血便	O157:H7	-			e98
2009/6/10	2009/6/12	山口県防府市	09Y09 2	M	散発、二次感染者		軟便	O157:H7	-		same as 689	e98
2009/7/7	2009/7/9	山口県下関市	09Y10 3	M	家族内、1077の子		腹痛、水様下痢、血便、嘔吐	O157:H7	+			d92
-	2009/7/13	山口県下関市	09Y11 36	F	保菌者、家族内、1076の母親		無症状	O157:H7	+		two bands diff. from 1076	d27
2009/7/8	2009/7/13	山口県光市	09Y13 22	M	散発		腹痛、水様下痢、血便	O157:H7	+			e225
2009/7/12	2009/7/16	山口県岩国市	09Y14 24	F	散発、二次感染者	1079の接触者	腹痛、水様下痢、血便	O157:H7	+		same as 1079	e225
2009/7/14	2009/7/17	山口県下関市	09Y15 2	F	散発		腹痛、水様下痢、発熱	O157:H7	+			e229
2009/7/31	2009/8/5	山口県美祿市	09Y18 75	F	散発		腹痛、水様下痢、血便、嘔吐	O157:H7	+			d526
2009/8/4	2009/8/7	山口県下関市	09Y19 5	M	散発		腹痛、発熱	O157:H7	-		same as 687	e99
2009/8/1	2009/8/7	山口県山口市	09Y20 2	F	散発		水様下痢、血便、嘔吐、発熱	O157:H7	-			e230
2009/7/12	2009/7/28	山口県宇部市	09Y21 78	F	散発		腹痛、水様下痢、血便、嘔吐	O157:H7	-			e228
2009/7/27	2009/8/2	山口県宇部市	09Y22 7	F	散発		腹痛、水様下痢、血便	O157:H7	-			e227
2009/8/7	2009/8/13	山口県山口市	09Y23 4	F	散発		腹痛、水様下痢、血便、発熱	O157:H7	+		same as 1076	d482
2009/8/12	2009/8/16	山口県宇部市	09Y24 24	F	散発		腹痛、血便	O157:H7	+			d92
2009/8/12	2009/8/17	山口県周南市	09Y25 17	F	集発		腹痛、水様下痢、血便	O157:H7	+			e267
2009/8/12	2009/8/17	山口県熊毛郡	09Y26 12	F	集発		腹痛、水様下痢、血便、嘔吐	O157:H7	+		same as 1137	e267
2009/8/24	2009/8/27	山口県下関市	09Y27 10	M	散発、1358の弟		腹痛、水様下痢、嘔吐、発熱	O157:H7	-			e328
2009/8/26	2009/9/1	山口県山口市	09Y28 19	M	集発、ベッターランチ提供のサイコロステーキ		腹痛、水様下痢、血便、嘔吐、発熱	O157:H7	+			e241
2009/8/18	2009/9/1	山口県下関市	09Y29 12	M	散発、1356の兄		腹痛、発熱、下痢、胃痛	O157:H7	-		same as 1356	e328
2009/9/2	2009/9/6	山口県宇部市	09Y30 11	F	散発		腹痛、水様下痢	O157:H7	+			e553
2009/9/20	2009/9/24	山口県宇部市	09Y31 64	M	家族内		腹痛、水様下痢、血便	O157:H7	+			e550
-	2009/9/28	山口県宇部市	09Y32 55	F	家族内、2073の家族		無症状	O157:H7	+		same as 2073	e550
2009/10/18	2009/10/22	山口県山口市	09Y33 32	F	散発		腹痛、水様下痢、血便、発熱	O157:H7	+			e554
2009/10/18	2009/10/27	山口県防府市	09Y34 25	F	散発		水様下痢	O157:H7	+		same as 2075	e554
2006/1/23	2010/1/26	山口県下関市	09Y57 8	M	散発		腹痛、水様下痢、嘔吐、発熱	O157:H7	+			c293

表2 平成21年 PFGE型、IS-printingプロフィールおよび発生状況・喫食状況

菌株No.	患者等の住所	PFGE型	1st	2nd	VT型	発病	年齢	性別	患者/接触者	主要症状	主要喫食状況・その他
09Y04	下関市	e6	317455	611757	VT1+2	H21.1.28	4歳	女性	患者	腹痛・下痢・血便・HUS	経口感染を推定するが不明
09Y01	岩国市	e101	135047	303447	VT1+2	H21.4.20	24歳	女性	患者	腹痛、水様性下痢	H21.4.19日夕食に友人からもらった牛肉を家庭で調理し喫食、発病日の夕食に刺身喫食、家族には発症者なし
09Y02	山陽小野田市	d833	012057	214443	VT2	H21.4.19	4歳	女性	患者	腹痛、血便	H21.4.16日焼肉店(K大塚)でユッケ・カルビ等喫食、17日スーパーで購入した焼肉セット(赤身・カルビ)で焼肉、18日に昨日の肉の残りでカレー、なお上記はすべて夕食として喫食、朝・昼については不明
09Y03	山陽小野田市	d833	012057	214443	VT2	発病せず	44歳	男性	接触者(09Y02の父親)	なし	同上・朝食は不明、昼食はよく覚えていない
09Y04	山陽小野田市	d833	012057	214443	VT2	H21.4.22	11歳	男性	患者	水様性下痢・腹痛	同上、昼食は学校給食
09Y05	山口市	e96	013057	214442	VT2	発病せず	77歳	女性	ツアー同行者	なし	H21年5月7日～5月13日に中国への海外ツアーに参加、その後に他県?で患者が出たため?、5月22日に接触者確診を実施した結果、菌分離された。
09Y06	防府市	e99	145047	303443	VT2	H21.5.21	9歳	女性	患者	水様性下痢・腹痛	H21年5月17日焼肉を喫食
09Y08	防府市	e98	215555	710403	VT2	H21.6.2	5歳	女性	患者	発熱(38℃)・下痢・血便・腹痛	不明
09Y09	防府市	e98	215555	710403	VT2	H21.6.11	2歳	男性	接触者(09Y09の弟)	軟便	同上
09Y10	下関市	d92	717557	611657	VT1+2	H21.7.8	3歳	男性	患者	腹痛・水様性下痢・血便・嘔吐	7月3日スーパーで買った牛の生レバーを自宅で母親、兄2人とともに喫食。発病前2週間は外出、旅行等なし、焼肉は食べていない、朝・昼食は自宅で母親とともに喫食
09Y11	下関市	d27	717557	611657	VT1+2	発病せず	36歳	女性	接触者(09Y10の母親)	なし	同上
09Y13	光市	e225	117177	601757	VT1+2	H21.7.7	22歳	男性	患者	腹痛・下痢・血便	不明(下記09Y14と一緒に、平成21.7.1日の昼食・夕食を照っている。それ以外は、不明)
09Y14	岩国市	e225	117177	601757	VT1+2	H21.7.13	24歳	女性	接触者(09Y13の友人)	腹痛・水様性下痢・血便	発病前2週間の間、H21.7.1日の昼食(冷やし蕎麦)・夕食(光市で焼肉カルビ・ロース・ハラム・上ホルモンを09Y13と一緒に喫食。また7月4日の夕食(山賊むすび・山賊焼)、7月13日の昼食(光市でカレーハンバーグトリアを別の友人と一緒に喫食。その他は昼食は動機で、夕食は自宅で家族とともに喫食、家族に異常なし。また外出した施設においても発症等はない。09Y13がH21.7.7日に発病し、7月10日に入院したため、7月11日に洗髪・体の清拭、下着の交換・タオルの洗濯等の世話をし、また7月12日・13
09Y15	下関市	e229	517577	611657	VT1+2	H21.7.15	2歳	女性	患者	腹痛・水様性下痢・発熱	H21.7.12に両親、兄弟6人で夕食(焼肉、牛レバー等)を喫食
09Y18	美祿市(美祿町)	d526	317557	611657	VT1+2	H21.8.1	75歳	女性	患者	腹痛・水様性下痢・血便・嘔吐	発病前2週間は外出なし、肉類は食べず野菜中心、夫婦同一の食事、井戸水
09Y19	下関市(川棚)	e99	145047	103443	VT2	H21.8.5	5歳	男性	患者	腹痛・発熱	発病前の夕食は8/4生胡瓜、チキン照り焼き、カボチャ煮物、8/3チキン揚げ物、8/2カレー(合挽ミンチ使用、スーパー丸和購入)、8/1夏祭りでトウモロコシ、焼きそばたこ焼き、焼き鳥を喫食。朝食はいつもパン、昼食は保育園給食が主。自宅、祖母宅は井戸水

表3 表2をPFGE型でソート

菌株No.	患者等の住所	PFGE型	1st	2nd	VT型	氏名	
09Y57	下関市	c293	317577	211757	VT1+2		
09Y11	下関市	d27	717557	611657	VT1+2		09Y10の母親、無症状保菌者
09Y23	山口市阿知須	d482	613177	210646	VT1+2		
09Y18	美祢市美東町	d526	317557	611657	VT1+2		
09Y02	山陽小野田市	d833	012057	214443	VT2		家族、父09Y03は発病せず。09Y02は発病3日前に焼肉店でユッケやカルビを喫食、翌日も焼肉
09Y03	山陽小野田市	d833	012057	214443	VT2		
09Y04	山陽小野田市	d833	012057	214443	VT2		
09Y10	下関市	d92	717557	611657	VT1+2		09Y10は発病(7月8日)の5日前に牛生レバー、
09Y24	宇部市	d92	717557	611657	VT1+2		09Y24は発病(8月13日)2日前にバーベキュー
09Y01	岩国市	e101	135047	303447	VT1+2		
09Y13	光市	e225	117177	601757	VT1+2		二人は付き合っている仲、7月7日に09Y13発病、10日入院、11日に09Y14がY13の付き添いをした。7月1日に二人で焼肉を喫食
09Y14	岩国市	e225	117177	601757	VT1+2		
09Y22	宇部市	e227	305457	711242	VT2		
09Y21	宇部市	e228	115055	303443	VT2		
09Y15	下関市	e229	517577	611657	VT1+2		
09Y20	山口市阿知須	e230	717577	611657	VT1+2		
09Y28	山口市周布町	e241	317175	611757	VT1+2	2009.8.26にペッパーランチ佐波川SA上り店で角切りステーキ喫食(diffuse outbreak)	
09Y25	周南市	e267	703577	610657	VT1+2	食中毒事件。光市焼肉店にて2009.8.9に提供された焼肉料理から感染	
09Y26	熊毛郡平生町	e267	703577	610657	VT1+2		
09Y27	下関市	e328	144047	301443	VT2	兄弟であるが兄が発病後6日目に弟(09Y27)が発病	
09Y29	下関市(27の兄)	e328	144047	301443	VT2		
09Y31	宇部市	e550	613575	610646	VT1+2	同居夫婦	
09Y32	宇部市(31の同居妻)	e550	613575	610646	VT1+2		
09Y30	宇部市	e553	117175	601557	VT1+2		
09Y33	山口市	e554	717557	611657	VT1+2	発病年月日同一である。何らかの共通感染源の存在が推測されたが、喫食調査がなされていないので不明	
09Y34	防府市	e554	717557	611657	VT1+2		
08Y34	下関市	e6	317455	611757	VT1+2		
09Y05	山口市	e96	013057	214442	VT2		
09Y08	防府市	e98	215555	710403	VT2	家族内感染	
09Y09	防府市	e98	215555	710403	VT2		
09Y19	下関市(川棚)	e99	145047	103443	VT2		
09Y06	防府市	e99	145047	303443	VT2		

腸管出血性大腸菌 O157 の感染拡大防止における IS-printing System の活用について

研究協力者 徳島県保健環境センター 下野 生世 宇佐美 實 石田 弘子

研究要旨

H19 年度から検討されてきた IS-printing System について、今年度は、IS-printing 型別変換コード(以下 IS コードという)を保健所に還元すると共に、岡山県環境保健センターを中心として中国・四国ブロック間で情報を共有した。今回、中国四国ブロックと県内では IS コードが一致するものは認められなかったが、県内の 2 つの保健所間ではほぼ同時期に同じ IS コードが認められた事例があり、迅速なデータの還元は、当感染症の疫学調査を進めるうえで有効であると考えられた。

1. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学データを迅速に現場へ還元し、疫学調査に活用されることを目的として IS-printing System の可能性について検討を行った。

2. 研究方法

(1) 病原体情報

平成 21 年度に徳島県内で発生した腸管出血性大腸菌のうち O157 として送付された菌株 7 株について、IS-printing 法を実施し、データの数値化 (IS コード) を行った。

また、PFGE 法については国立感染症研究所に菌株を送付し検査を依頼したが、当所でも感染研ニュープロトコールに基づき実施した。

なお、IS コードについては、保健所にデータ還元すると共に、岡山県環境保健センターにデータ提供を行い、中国四国ブロック全体の IS コード情報の提供を受けた。

(2) 疫学情報

菌株送付書、NESID による患者情報の他、保健所の担当者からの聞き取りにより情報を得た。

3. 結果と考察

徳島県では、毎年 15~20 件程度の腸管出血性大腸菌感染症の届出があり、その多くは経口感染が推定される散発事例、若しくは接触感染と推定される家族内感染事例である。

今年度は 12 月末までに、腸管出血性大腸菌感染症の届出は 18 件あり O157 関連の届出は 9 件あった。そのうち、当所で入手できた O157 菌株は 7 株あり、これらについて検討した。

今回検討した O157 菌株についての疫学情報及び菌株情報は表 1 のとおりである。これらの事例では、推定感染経路として牛肉、牛レバーの生食が関与すると考えられるものが多く認められた。O157 の場合、喫食から発症まで 1 週間程度の潜伏期間があり、原因食品を確定することは困難である。

事例 No 1 と 2 は、IS コードが一致し、発症年月日、その他の情報から疫学関連性が疑われたが、感染源の特定には至らなかった。事例 5 は発症年月日、IS コードから事例 4 との疫学関連性が考えられたが、感染経路の特

定には至らなかった。この2事例は管轄の違う保健所でおきた事例であり、両保健所に迅速かつ適切にISコードデータを還元することにより、原因究明のための一歩踏み込んだ疫学調査ができる可能性が考えられた。

また、県内事例のISコードと他県（中国四国ブロック）のISコードで一致するもの

は認められなかったが、IS-printing法の検査の迅速性に加え、データ比較の簡便性を考えると、昨年発生したサイコロステーキによる食中毒のような散在的集団発生の拡大防止に対して、ISコード情報は十分に有効であると思われた。

表1 菌株についての疫学情報及び病原体情報

事例NO	疫学情報		病原体情報（血清型別はすべてO157:H7）		
	発症年月日	備考	毒素型別	IS-printing: 1st/2nd	感染研PFGE Type No.
1	2009/6/27	散発	VT1, 2	315577/611757	d527
2	2009/6/29	散発、牛肉のたたき喫食	VT1, 2	315577/611757	e127※
3	2009/9/12	散発、9/7生レバー喫食	VT1, 2	213577/610747	e406
4	2009/9/29	9/22焼肉店Aで生レバー喫食	VT2	707555/611653	e503
	2009/9/29	9/21焼肉店Aで生レバー喫食	VT2	707555/611653	e503
5	2009/9/28	散発	VT2	707555/611653	e503
6	2009/11/24	散発	VT1, 2	117177/601757	e630

※one band diff. from d527

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

研究協力者 香川県環境保健研究センター 久保由美子 内田順子 宮本孝子 有塚真弓

研究要旨

香川県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の 15 株について、PFGE 法と IS-printing System を実施し比較検討した。IS-printing System は今後、グループ分けのための基準を検討することが必要であるが、操作の簡便性、迅速性に優れ、情報交換も容易なことから、集団感染発生時の疫学解析の手法として有用と思われる。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の疫学解析法に広く用いられている PFGE 法とマルチプレックス PCR による腸管出血性大腸菌 O157 サブタイピング法 IS-printing System について昨年に引き続き、識別能、操作の簡便性、迅速性について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 21 年度に、香川県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の 15 株、10 事例を検討対象とした。その内訳は、集団発生が疑われた 2 事例の 3 株、家族内発生 4 事例 8 株、散発 4 事例 4 株である。

2. 検査方法

1) PFGE 法

制限酵素 Xba I を用い感染研ニュープロトコールに準じて実施した。

2) IS-printing System

試薬キット添付のプロトコールに準じて実施し、12 桁の数字で IS コードとして表記した。

C. 研究結果及び考察

供試菌株の概要を表 1、PFGE パターンを図 1、IS-printing System パターンを図 2、図 3 に示した。

菌株 No. 4 と 6 (感染研サブタイプ名 Type No. e322)、13 と 14 (Type No. d298) は家族内感染株であり PFGE 法、IS-printing System とともに同一パターンとなった。

菌株 No 5 と 7 (Type No. e297)、11 と 12 (Type No. d192) は家族内発生であるが、PFGE 法はバンドに 1 本の差がみられた。しかし、IS-printing System は同一コード

であった。

菌株 No2 (Type No. e109) と 3 (Type No. e376) は集団発生が疑われた例であるが、PFGE 法は同一パターンに分類され、IS-printing System は、バンド 1 本の差により違ったコードとなった。PFGE 法はバンド 3 本までの差であれば関連株と推測することが提唱されているが、IS-printing System の場合、どう評価するかが課題である。

菌株 No 1 (Type No. e108)、8 (Type No. e377)、10 (Type No. e483)、15 (Type No. e631) は散発例であり、PFGE 法、IS-printing System とともに個別のパターンを示した。

菌株 No9 (Type No. e241) においては、2009 年 9 月に全国で発生した飲食店チェーン関連株で、県内での発生は 1 株であるが PFGE 法、IS-printing System とともに、他県のものとも一致した。

以上、15 株について検討した結果、同一起源と推測されるグループに関しては、PFGE 法、IS-printing System とともに、ほぼ一致したパターンに分類され、起源の異なるものはパターンも明確に異なった。

IS-printing System は、コード表記のため、PFGE 法に比べ情報交換が容易である。さらにコードが一致しない場合も、画像を直接比較することなく、泳動パターンの差がわずかなのか、大きく違うのかも推測可能である。

D. 結論

香川県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 15 株について、PFGE 法と IS-printing System の比較検討した。

IS-printing System は PFGE 法に比べ、識別能は同

等か若干劣るものの簡便性、迅速性に優れており、昨年の全国規模での食中毒発生のような事例には、多いに役立つものと思われる。

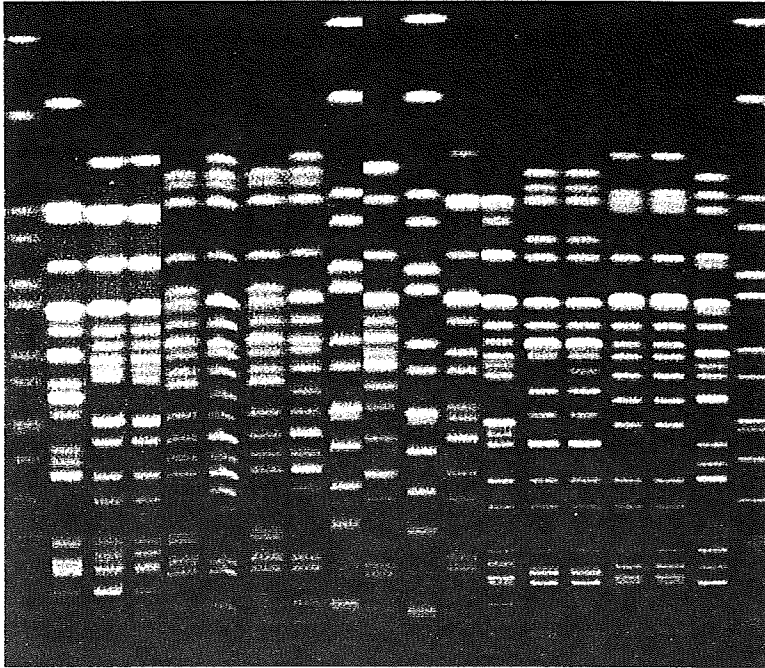
の判断基準などは、今後検討を要するものの、IS-printing System は、集団感染発生時の疫学解析の手段として有用であることが示唆された。

バンドに若干の差異が見られた場合のグループ分け

表 1 供 試 菌 株

菌株 No	血清型	毒素型	発生状況	香川県 PFGE 法 Type	感染研 PFGE 法 Type No.	IS-printing System IS-コード	
						1st	2nd
1	0157:H7	Stx1+2	散発	A	e 108	1 7 5 2 4 7	3 0 3 4 4 7
2	0157:H7	Stx1+2	集団疑い	B	e 109	3 0 7 5 7 7	2 1 1 7 5 7
3	0157:H7	Stx1+2	集団疑い	B	e 376	3 1 7 5 7 7	2 1 1 7 5 7
4	0157:H7	Stx 2	家族内	C	e 322	1 0 5 4 5 7	7 1 1 6 4 2
5	0157:H7	Stx 2	家族内	D	e 297	3 0 5 4 5 7	6 1 1 6 4 2
6	0157:H7	Stx 2	No4 の家族	C	e 322	1 0 5 4 5 7	7 1 1 6 4 2
7	0157:H7	Stx 2	No5 の家族	E	e 297	3 0 5 4 5 7	6 1 1 6 4 2
8	0157:H7	Stx 2	散発	F	e 377	3 1 1 5 5 7	7 1 0 4 1 3
9	0157:H7	Stx1+2	全国集団	G	e 241	3 1 7 1 7 5	6 1 1 7 5 7
10	0157:H7	Stx1+2	散発	H	e 483	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 7
11	0157:H7	Stx1+2	家族内	I	d 192	0 1 2 0 5 7	2 1 4 4 4 2
12	0157:H7	Stx1+2	No11 の家族	J	d 192	0 1 2 0 5 7	2 1 4 4 4 2
13	0157:H7	Stx1+2	家族内	K	d 298	6 1 3 5 7 7	6 1 0 6 4 6
14	0157:H7	Stx1+2	No13 の家族	K	d 298	6 1 3 5 7 7	6 1 0 6 4 6
15	0157:H7	Stx1+2	散発	L	e 631	1 7 5 2 4 3	3 0 3 4 4 7

M 1 → 7 M 8 M 9 → 15 M



M : Marker
(*S. Braenderup* H9812)

図 1 P F G E 泳 動 像

M P St 1 → 5 St 6 → 10 St 11 → 15 St P M

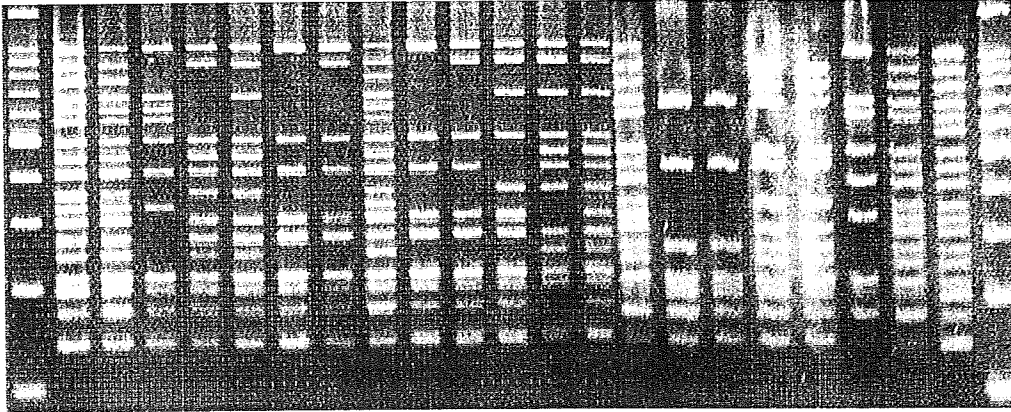
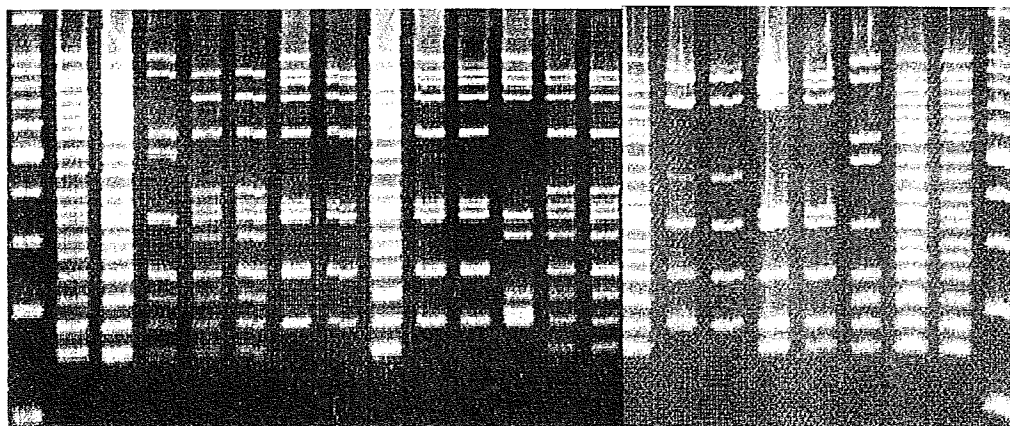


図 2 I S - p r i n t i n g 1 s t 泳 動 像

M P S t 1 → 5 S t 6 → 1 0 S t 1 1 → 1 5 S t P M



M : 100bp DNA Ladder
P : Template Mix
ST : Standard DNA

図3 IS-printing 2nd 泳動像

愛媛県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学調査

愛媛県立衛生環境研究所 浅野由紀子 烏谷竜哉 田中 博

研究要旨

2009年に愛媛県内で発生した腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）感染症68例中、検体の搬入があった67例について、PFGE法を用いて分子疫学調査を行った。また、EHEC O157についてはPFGE法に加え、IS-Printing System法（以下、IS-P）を併用して調査を実施した。さらに調査結果を感染症対策の科学的根拠とするため、行政側へ迅速に情報提供を行った。

2009年9月には、全国飲食チェーン店において提供された角切りステーキ肉のEHEC O157汚染が原因となった食中毒事例が発生しており、県内にも喫食者1名が胃腸炎症状を呈した。食品衛生法に基づく行政対応の根拠とするため、患者由来菌株についてIS-P解析及びPFGE解析を迅速に実施したが、ISコードの迅速還元がなされなかったことに加え、IS-P解析がPFGE解析に比べ一般的でないこと等の理由により、IS-P解析の結果を有効に活用することができなかった。また、PFGE解析は菌株間の比較検討をする必要があることから、迅速性で問題が指摘された。

感染症あるいは食中毒対策においては、疫学調査と病原体検査結果の相乗効果が最大限に発揮されるシステム作りが最大の課題である。今後、関係機関との情報の共有化システムの構築及び全国レベルでのリアルタイム情報交換が可能なインターネットを介した検査データの集積及び解析が可能なシステム（例、米国CDC Pulse-net）の構築を推進していく必要性を感じた。

A 研究目的

EHEC 感染症の分子疫学解析法であるPFGE法及びIS-P（O157の場合のみ）を用いて県内で発生した患者由来株について分子疫学調査を行った。さらに、それらの情報を関係機関へ迅速に提供し、感染症対策あるいは食中毒予防に活用し得るか検討を行った。

B 研究方法

1 供試菌株

2009年に愛媛県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症18事例（集団発生事例を含む）の患者及び無症状病原体保有者から分離した67株を用いた。内訳は、O157 11事例（13株）、O26

2事例（47株）、O103 2事例（4株）、さらにO1、O91、O121は各1事例（1株）であった（表1）。

2 検査方法

(1) PFGE法

PFGEは国立感染症研究所のニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素はXbaIを用い、泳動条件は6.0V/cm、パルスタイム2.2-63.8秒、泳動時間は19時間で行った。なお、供試した菌株は国立感染症研究所においてサブタイプが付与された。

(2) IS-Printing System

試薬キットIS-Printing System（東洋紡）を用い、添付のプロトコールに準拠した。すなわち、供試菌株をTSB培地に接種し、37℃ 18