

時間培養後、増菌培養液 20 $\mu$ l を 5%キレックス TE (pH 8.8) 200 $\mu$ l に混和した。懸濁液を 95 $^{\circ}$ C 10 分熱処理後、15,000rpm 10 分間遠心し、上清を DNA 鋳型とした。また、遺伝子増幅産物は 2%アガロースゲル (nacalai tesque Agarose for 150~1500bp fragment) にアプライし、0.5 $\times$ TBE buffer (泳動開始時 4 $^{\circ}$ C) で各バンドが分離されるまで (55 分前後)、電気泳動を行った。染色はエチジウムブロマイドで行い、DDW により脱色後、判定を行った (図 1)。判定は各プライマーに対する増幅産物の有無を肉眼で確認し、有した場合を 1、無い場合を 0 として数値表記した後、平成 19 年度の本研究において近畿ブロックが実施した手法で 12 桁にコード化した。

### C 研究結果及び考察

#### 1 O157 事例 (表 2 参照)

事例番号 2~4 については、発症年月日が 2009 年 6 月 30 日~7 月 6 日と 1 週間以内に同一市内で発生した O157 感染症であった。事例 2 は家族内発生であり、事例 3, 4 は散発事例であったが、IS コード及び PFGE パターンは共に一致していた。IS-P コード及び PFGE パターンが一致したことを関係機関へ迅速に還元したが、患者住所地も遠く、患者及び家族への聞き取り調査などからも共通した感染源は特定できなかった。なお、その後、県内で同じ IS コード及び PFGE パターンを示す O157 は検出されていない。また、この PFGE パターン (c47) は 2007 年に首都圏の大学での集団発生事例由来株と同一で、その後広域的に散発事例が相次いでいるパターンであった。

事例 5 は、IS コード及び PFGE パターンが 2008 年 6 月に隣市で発生した散発性 O157 感染症患者由来株 2 株と一致した。2008 年の調査でも共通した感染源は特定できていないが、2009 年に同一パターンを示す菌株が分離されたことから、共通した感染源の可能性、あるいは同一菌株の汚染が拡大していることが示唆される。また、事例 9 については、IS コードが一致していたが、PFGE パターンは異なっていた。

事例 7, 10 は家族内での発生であった。事例 10 については初発患者が、「血清での O 抗原凝集抗体又は抗ペロ毒素抗体の検出 (HUS 発症例に限る)」による届出であり、病原体の搬入は

なかった。

事例 8 は 2009 年 9 月に全国飲食チェーン店で発生した食中毒事例の患者である。

事例 11 は散発であった。事例 1 とは IS コードが一致していたが、PFGE パターンは異なっており、反対に事例 10 とは PFGE パターンが一致していたが、IS コードは異なっていた。事例 10 とは発症日が 1 週間程度と近いことから、何らかの共通した感染源の関与が推察されたが、疫学調査の結果、関与は認められなかった。

#### 2 O26 事例について (表 3 参照)

事例番号 1 は、同一保育園における集団発生事例である。職員、家族など合計 47 名が感染する大規模感染事例であった。PFGE パターンは 3 バンド以内の違いで集団発生と密接に関係した株 (closely related) と判断された。薬剤感受性試験では 2 剤 (ABPC, AMPC/CVA) 耐性株が 3 株、1 剤 (FOM) 耐性株が 3 株であった。

#### 3 O103 事例について (表 4 参照)

事例番号 2 は同一家庭内での発生であった。患者由来 2 株は PFGE パターンが一致していたが、無症状病原体保有者由来株は患者由来株と 2 バンド違いのパターンを示した。薬剤感受性試験では共に同一の 3 剤 (KM, SM, TC) 耐性を示した。病原因子については、無症状病原体保有者由来株のみ、*eaeA* 遺伝子を保有していなかった。

#### 4 その他血清型による事例について (表 5 参照)

事例 2 は定期の検便検査で EHEC を検出した事例である。医療機関からの届出は VT1 産生株であったが、当所で確認検査を実施したところ、RPLA で VT2 判定保留となり、さらに PCR 検査により VT2 遺伝子を確認した。

#### 5 IS-Printing System 法及び PFGE 法の比較 (表 1 参照)

EHEC O157 13 株について IS-P 及び PFGE 法を比較した。IS コードが一致した菌株 No.2~5 及び 2008 年分離株と IS コードが一致していた菌株 No.6 は、それぞれ PFGE パターンも一致していた。しかし菌株 No.1 と 13、菌株

No.6 と 11 は、IS コードは一致していたが、PFGE パターンは異なっていた。さらに PFGE パターンが一致していた菌株 No.12 と 13 は、IS コードは 1st set の primer No.1-14 で不一致となった。

PFGE 法は IS-P に比べ、詳細な疫学解析が可能であることはこれまでに報告されている。しかし概ね IS コードと PFGE パターンは一致していることから、迅速性が必要とされる O157 感染症事例発生初期には、IS-P 解析をスクリーニングとして活用することは有用であると思われる。

#### 6 行政への情報還元

2009 年は IS-P 解析データの迅速な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。愛媛県内において、同一 IS コードを示した場合には、同一菌株による汚染が示唆され、注意喚起にはある程度有用であったと思われるが、広域的な IS コードの迅速還元がなされていなかったこと、IS-P 解析の行政的な評価が PFGE 解析に比べ一般的な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。その為 PFGE 解析を併せた情報還元が必要となったが、迅速性という点では、十分な結果を得ることができなかった。今後、IS-P 解析の行政的な評価の確立が望まれるため、過去の事例について解析を再検証することが必要であると考える。

2009 年 9 月には、全国的な飲食チェーン店による O157 食中毒事例が発生した。本県においてもこの飲食チェーン店で角切りステーキ肉を喫食した EHEC O157 感染症事例 (O157 事例 No.8) が発生している。この事例では、県内の該当飲食店で患者が喫食した当日の検食を保存しておらず、さらに調理場のふき取り検査及びその後に納入された食材等の検査を管轄保健所で実施したが、O157 は分離できなかった。食品衛生法の基づく飲食店への行政対応する為に、患者由来株と飲食チェーン店由来株を早急に比較検討し、因果関係を明確にする必要があったが、当所に搬入された O157 1 株だけでは比較することが不可能であり、国立感染症研究所へ全国的な菌株との比較検討を依頼することとなった。その為、解析終了まで数日のタイム

ラグが生じた結果となった。当所においても PFGE 解析は実施していることから、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構築の必要性を痛感した。

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互的な評価が必要不可欠である。今後、県内においても関係機関との情報共有化システムの構築が必要であると思われる。

#### D 結論

2009 年に愛媛県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症 68 例中、検体の搬入があった 67 例について、PFGE 法あるいは IS-P 法を用いて分子疫学調査を行った。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。しかし IS-P 解析の行政的な評価が確立されてい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が必要で、当所のみでのデータでは解析が不可能であり、十分に解析結果を対策に活用することができなかった。

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重要である。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の構築を推進していく必要性を感じた。

#### E 研究発表

なし

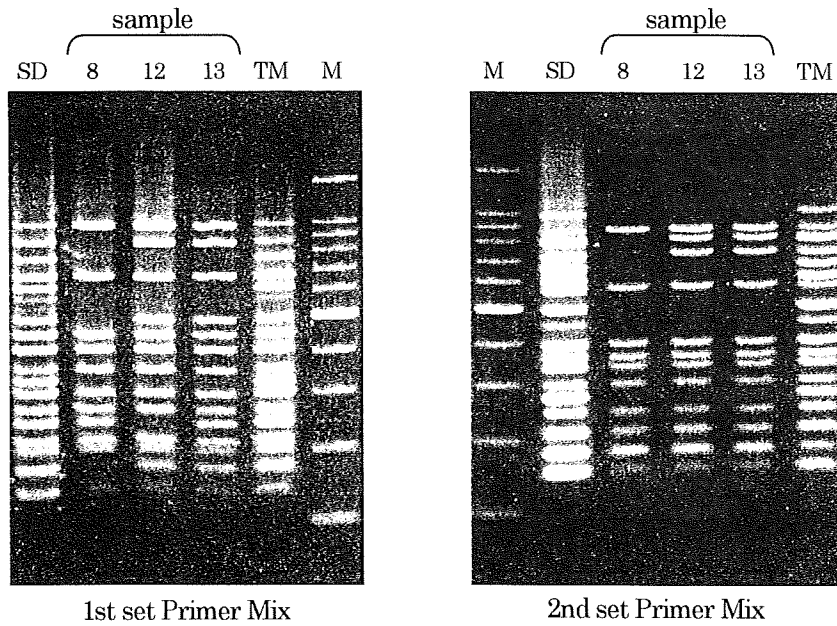


図1 IS-Printing System 結果  
(M: 100bp ladder SD: Standard DNA TM: Template Mix)

表1 2009年 愛媛県における EHEC 感染症発生状況

血清型	感染者数 (病原体搬入数)	病型		集発事例数*	散発事例数
		患者数	無症状 病原体保有者		
O1:H7	1 (1)	1	0		1
O26:H11	47 (47)	19	28	1	1
O91:H28	1 (1)	0	1		1
O103:H2	4 (4)	3	1	1	1
O121:H19	1 (1)	1	0		1
O157:H-	1 (1)	1	0		1
O157:H7	13 (12)	12	1	4	6

\* 家族内発生を含む

表2 2009 腸管出血性大腸菌 (O157) 感染症 解析結果

事例No.	菌株No.	血清型	毒素型	ISコード	PFGE型	病原因子	耐性薬剤 <sup>1)</sup>	備考
1	1	O157:H7	VT1&2	317577-611757	e16	eaeA+	-	散発
2	2	O157:H7	VT2	305457-611642	e47	eaeA+	-	家族内発生
	3							
3	4	O157:H7	VT2	305457-611642	e47	eaeA+	-	散発
4	5	O157:H7	VT2	305457-611642	e47	eaeA+	-	散発
5	6	O157:H7	VT1&2	317577-611756	d73	eaeA+	-	散発
6	7	O157:H-	VT1&2	215457-311656	e292	eaeA+	-	散発
7	8	O157:H7	VT1&2	116575-201757	e291	eaeA+	-	家族内発生
	9							
8	10	O157:H7	VT1&2	317175-611757	e241	eaeA+	-	全国飲食チェーン店での角切りステーキ肉喫食者
9	11	O157:H7	VT1&2	317577-611756	e627	eaeA+	-	散発
10	12	O157:H7	VT1&2	317557-611757	e626	eaeA+	-	家族内発生 (1名は病原体搬入なし)
11	13	O157:H7	VT1&2	317577-611757	e626	eaeA+	-	散発

1) CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) の抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に従い、以下の12薬剤に対する耐性の有無を判定。

アンピシリン(ABPC)、ストレプトマイシン(SM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、スルファメトキサゾール/トリメトプリム合剤(ST)、アモキシシリン/クラバン酸合剤(AMPC/CVA)、セフトキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、シプロフロキサシン(CPFX)、ナリジクス酸(NA)、ホスホマイシン(FOM)

表3 2009 腸管出血性大腸菌 (O26) 感染症 解析結果

事例No.	血清型	毒素型	PFGE型	病原体数	耐性薬剤 <sup>1)</sup>	病原因子	備考	
1	O26:H11	VT1	e36	33	-	eaeA+	保育園での集団発生事例	
				3	FOM	eaeA+		
				e31 <sup>2)</sup>	2	-		eaeA+
					2	ABPC,AMPC/CVA		eaeA+
				e33 <sup>3)</sup>	1	-		eaeA+
				e34 <sup>4)</sup>	1	ABPC,AMPC/CVA		eaeA+
				e35 <sup>5)</sup>	1	-		eaeA+
				e37 <sup>6)</sup>	2	-		eaeA+
e38 <sup>7)</sup>	1	-	eaeA+					
2	O26:H11	VT1	d102	1	-	eaeA+	散発	

2) e36と1バンド違い

3) e36と2バンド違い, e34と異なる

4) e36と2バンド違い

5) e36と3バンド違い

6) e36と1バンド違い, e33と異なる

7) e36と1バンド違い, e33及びe37と異なる

表3 2009 腸管出血性大腸菌 (O103) 感染症 解析結果

事例No.	血清型	毒素型	PFGE型	病原体数	耐性薬剤 <sup>1)</sup>	病原因子	備考
1	O103:H2	VT1	A	1	ABPC,SM,TC,ST	eaeA+	散発
2	O103:H2	VT1	B	2	KM,SM,TC	eaeA+	家庭内発生
			C <sup>8)</sup>	1	KM,SM,TC	-	

8) Bと2バンド違い

表4 2009 腸管出血性大腸菌 (O157, O26, O103 以外) 感染症 解析結果

事例No.	血清型	毒素型	病原体数	耐性薬剤 <sup>1)</sup>	病原因子	備考
1	O1:H7	VT1	1	SM	-	
2	O91:H-	VT1&2	1		-	VT2はRFLP(±), PCR法でVT2遺伝子確認
3	O121:H19	VT2	1	TC	eaeA+	

# 高知県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析における IS-Printing System の検討

研究協力者 高知県衛生研究所 藤戸亜紀 松本一繁 松本道明

## A. 研究目的

昨年度に引き続き、当県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学的解析を行い、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) とマルチプレックス 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) による解析の比較を行ったのでこれについて報告する。

## B. 研究方法

### 1 供試菌株

平成 21 年に県内で 1 家族 3 名から分離された 3 株および 1 家族 2 名から分離された 2 株とその 1 家族 2 名と同時期に散发事例 1 例から分離された腸管出血性大腸菌 O157 : H7 6 株を用いた。

### 2 検査方法

#### (1) IS-Printing System

試薬キット IS-Printing System (東洋紡績 (株)) を用い、添付のプロトコールにしたがって行なった。

また、結果は平成 19 年度、20 年度の本報告書に準じてコード化して表記した。すなわち、プライマーごとに Standard DNA と比較し、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「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 桁にコード化した (表 1)。

#### (2) PFGE 法

感染研ニュープロトコールに基づいて行な

った。制限酵素は *Xba*I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2-54.2sec、泳動時間 19 時間で行なった。

## C. 研究結果

IS-Printing System の電気泳動像を図 1,2 に、判定結果を表 2 に示した。また、その PFGE 画像を図 3 に示した。

菌株 No.1~3 は、PFGE タイプは異なるが疫学的な関連はみられ、IS-Printing パターンは同じであった。同様に疫学的関連がみられる No.5,6 でも PFGE タイプは異なるが、IS-Printing パターンは同じであった。No.4 は No.5,6 と同時期の散发事例であるが、No.6 と PFGE パターンが一致し、IS-Printing も同じパターンを示した。

## D. 考察

今回の結果から、IS-Printing System は PFGE 法と同等あるいは若干劣るものの識別能力はほぼ同等と思われた。迅速性については、1 日で結果を見ることができ、手法も簡便なため、結果を得られるまでに 3 日以上を要する PFGE 法に比較して優れている。

しかし、今回の使用した製品ロットでは、IS-Printing System 添付のプロトコールに従い 1st・2nd とともに Template Mix を 1 $\mu$ l、Standard を 5 $\mu$ l 使用したところ、陽性コントロールのバンドが不特定に数本欠落し、Standard はスミアになり、判読不能となった (図 4)。Template Mix を 2 $\mu$ l、Standard は 2.5 倍希釈したものを 5 $\mu$ l 使用することで解析可能となったが、最適な量が判

明するまで検査を繰り返さなければならず、数日を要した。

今後 IS-Printing System を広く疫学解析に利用するためには、試薬のロット間格差をなくし、安定した製品を供給することが必要であると思わ

れる。また、このように、プロトコルどおりでは良好な成績が得られにくいロットがあった場合、研究者間の情報交換や、メーカーからの情報提供が不可欠であると思われた。

表 1 IS-Printing System の増幅バンドサイズと判定のコード表

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>	1-17	<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	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	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			1			7			5			7			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	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	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			7			5			7		

※バンドあり→1, バンドなし→0

表 2 IS-Printing System と PFGE 法との比較

菌株 No.	血清型	stx 型	発生状況	PFGE 型 (感染研)	IS コード
1	O157:H7	1+2	家族内	e331	317575 611757
2	O157:H7	1+2	同上	e325	317575 611757
3	O157:H7	1+2	同上	e330	317575 611757
4	O157:H7	2	散发例	e322	105357 711642
5	O157:H7	2	家族内	e321	105357 711642
6	O157:H7	2	同上	e322	105357 711642

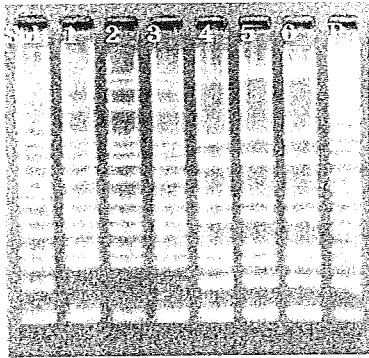


図1 IS-Printing 1<sup>st</sup>泳動像

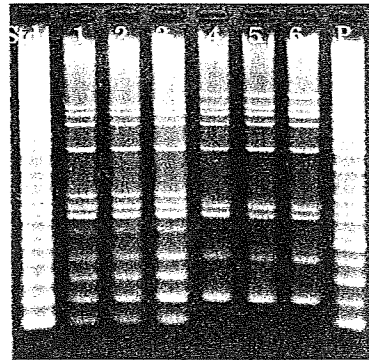


図2 IS-Printing 2<sup>nd</sup>泳動像

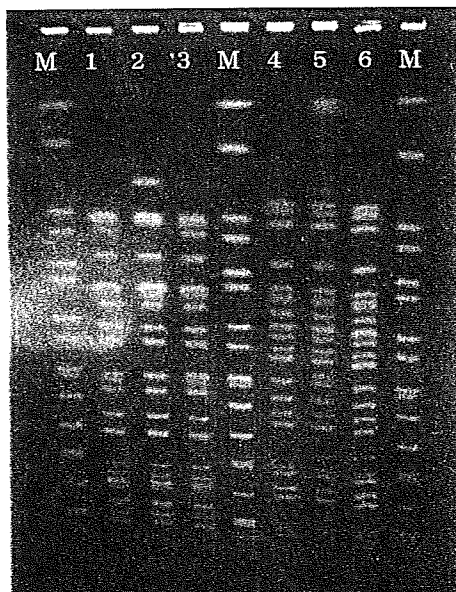


図3 PFGE 泳動像

M : *Salmonella* Brenderup

1 ~ 6 : 菌株 No. 1 ~ 6

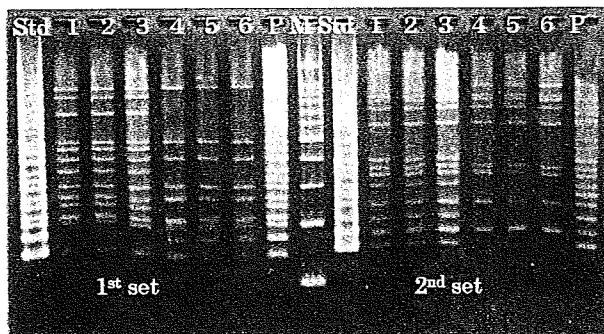


図4 IS-Printing 判読不能泳動像

図1, 2, 4 IS-Printing 泳動像

1 ~ 6 : 菌株 No. 1 ~ 6

Std : Standard DNA

P : Template Mix

M : 100bp ladder



九州地区における食品由来感染症の拡大防止・予防に関する取り組み  
— IS-printing System の分子疫学的解析法としての有用性について —

研究分担者	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	財津修一	福岡市保健環境研究所
	久保田 勉	北九州市環境科学研究所
	西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
	右田雄二	長崎県環境保健研究センター
	江原裕子	長崎市保健環境試験所
	松本一俊	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合研究所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	河野喜美子	宮崎県衛生環境研究所
	上野伸広	鹿児島県環境保健センター
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	大岡 唯祐 <sup>1</sup> 、林 哲也 <sup>1,2</sup>	宮崎大学・ <sup>1</sup> 医学部、 <sup>2</sup> フロンティア
	江藤良樹、市原祥子、	福岡県保健環境研究所
	濱崎光宏、小野塚大介、	
	村上光一、竹中 重幸	

研究要旨 九州ブロック(12施設参加)では、1) IS-printing System (IS)の精度管理および有用性検討、2) 研修(新規遺伝子解析法:大腸菌の病原性因子の検査とその解析法)、3) 事例検討(5事例)を実施した。本稿では1) について以下報告する。

IS の九州ブロック地方衛生研究所間の精度管理は、腸管出血性大腸菌 O157、4 株の DNA を配布し参加施設で IS を実施しその結果を比較するものであり、有用性の検討は各参加機関の分離株を用いて IS を実施しその結果を比較するものである。その結果、精度管理では共通して用いた腸管出血性大腸菌 O157、4 株の IS 型別は、2 株が 2 カ所で、それぞれ、1 施設の結果が他の機関と異なっていたものの、他の 2 株は 11 施設がすべて一致し、違いが生じた 2 株でも 10 施設の結果が一致し、比較的良好的な結果が得られた。有用性の検討では、九州ブロック 311 株についての比較により、IS の結果が一致する菌株のグループには複数のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)型を含む食中毒事例が 2 事例含まれるなど、人手と時間を要する PFGE 検査のスクリーニングとしても有用であると考えられた。

A. 研究目的

パルスフィールド・ゲル電気泳動(PFGE)法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に有

用な手段である。しかし、異なるゲルで泳動された DNA パターンを比較するには、安定した PFGE マーカーの泳動、良好な PFGE および良

好な画像の保存などが必須である。また、PFGE は解析結果を得るまでに最短 3 日を要し、迅速性に欠ける。これらの理由から PFGE 実施前にスクリーニングとして使用可能な分子疫学的情報が望まれている。

宮崎大学医学部林教授のグループにより、O157 株のゲノム構造多型を利用し、デジタル化可能な検査結果を得ることの出来る菌株識別システムの開発が行われた<sup>1)</sup>。現在、IS-printing System Ver. 2(以下、IS)として、東洋紡から市販されている。

九州ブロックでは O157 の DNA を九州地区各地方衛生研究所(以下、地研)に配布し、IS 手技に関する精度管理を行った。また、各地研で分離された O157 について解析を行い、その有用性を検討した。

## B. 研究方法

### 【IS-printing System の使用条件】

九州ブロック各地研でおこなった IS の実施状況および使用機器等は、下記のとおりであった。

#### 1) Template DNA の作製

O157 コロニー釣菌用の培地は、普通寒天培地 4 地研、BHI 寒天培地 2 地研、TSA 寒天培地 2 地研、および LB 寒天培地、HI 寒天培地、Chromo Agar O157、SMAC 寒天培地を各 1 地研で使用された(表 1)。Template DNA は、これらの培地からシングルコロニーを釣菌し、アルカリ抽出法により作製した。

#### 2) 機器・機材

PCR 機器は、ABI 社 GeneAmp 9700 が 6 地研、同社 2720 Thermal Cycler が 1 地研、同社 GeneAmp 2700 が 1 地研、BIO-RAD 社 iCycler が 1、ASTECC 社 PC320 が 2 地研および MJ

表 1. Template DNA の作製

地研番号	Temperate DNA		
	培地名	コロニー数	培養時間
1	LB寒天	大1	20h
2	HI寒天	大1	20h
3	普通寒天	1mm	20h
4	BHI寒天	1mm	20h
5	TSA寒天	大1	18h
6	普通寒天	大1	20h
7	クロモアガーO157	大1	20h
8	TSA寒天	小1	18h
9	SMAC寒天	1mm	18h
10	普通寒天	1コロニー	24h
11	BHI寒天	1mm	18h
12	普通寒天	1コロニー	20h

Research 社 DNA engine TETRAD 2 が 1 地研で使用されていた(表 2)。泳動槽は、ADVANCE 社製の Mupid シリーズが 10 地研、ELCHROM SCIENTIFIC 社製、東洋紡社製が各 1 地研で用いられていた。画像の取り込みは、写真をスキャナー等で取り込んでいる地研が 2 施設で、残りの 10 地研はゲルから直接取り込みを実施し、使用機器は BIO-RAD 社製が 6 地研、BioImage 社製が 2 地研、東洋紡社製と ATTO 社製が各 1 地研であった(表 2)。

#### 3) 電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

泳動時間は各地研で PCR 産物の分離能を勘案した最適時間(60分~125分)で行った(表 2)。泳動用バッファーは、すべて 0.5×TBE であった(表 3)。サイズマーカーは、それぞれの地研で使用しているものを使用し、Loading Dye は、2 地研がキット添付品では不足するため別品を使用していた(表 3)。

#### 4) 結果の判定

各菌株の電気泳動により得られた 36 本の遺伝子増幅産物の出現パターンを 2 進数(1, 0)で表現した後に 10 進数に変換し、11 桁の挿入配

列の組み合わせ、固有の番号とした。

#### 5) 解析

解析方法は、Matching 法による近似度計算を行い、NJ 法にて樹状図解析を行い、TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)を用いて描画した。

#### 1. 精度管理

各地研には O157、4 株から抽出した DNA を配布し、それぞれの施設で IS を使用して、PCR、電気泳動および結果判定を実施した(図 1)。

#### 2. 九州地区分離株の IS 解析

各地研で保存され、国立感染症研究所(感染研)へ送付し PFGE 型が判明している 311 株の O157 を対象とした。PFGE 型は、感染研にて実施された PFGE パターンのサブタイプ名を使用した。

### C. 結果および考察

#### 1. 精度管理結果

4 株(A、B、C および D)から抽出した DNA を IS にて解析した結果を図 2~5 に示した。A および B の IS 結果は、11 地研全て一致していた。しかし、C および D は、各 1 地研で異なる結果であった。C は 2nd set で Extra band を 987 bp として判定したものであった。D は 1st set プライマーセット 1-06 の PCR 産物(サイズ 561 bp)が増幅されていなかった。添付されている Control DNA でも同様に増幅されていなかった。この 2 点についての対策として、施設内における PCR マシンの検討および分子量判定方法の工夫、並びに IS に含まれる primer の改善が必要と考えられた。

#### 2. 九州地区分離株の IS 解析結果

解析を行った 311 株は、IS 型が 74 タイプ、PFGE が 158 タイプに分類された。PFGE の総型別数は、IS の総型別数の約 2 倍であった。この比率は、昨年九州地区で 219 株について解析した結果とほぼ同じであった。

PFGE 型と IS 型が同じ株は、10 グループであった(表 4)。各地研に結果を返し、詳細情報を再収集したところ、PFGE 型が【e537】で IS 型が【66324257743】を示す株は、福岡県で発生した集団食中毒事例株と同時期に発症した福岡市の患者株であった(表 5)が、両株の因果関係は不明であった。PFGE 型が【b664】で IS 型が【66324265923】を示す株は、大分県、福岡県および宮崎県由来患者で、福岡県と大分県のグループは同時期に大分市内の焼肉店を利用していることが判明した(表 6)。

次に PFGE 型が同じで IS 型が異なる株は、3 グループであった(表 7)。PFGE 型が a259 のグループは 1 地研 7 株で IS 型が 3 タイプに分類された。b664 のグループは 5 地研 15 株で、IS が 3 タイプに、e169 のグループは 2 地研 2 株で IS が 2 タイプに分類された。このうち b664 のグループには同一の焼肉店で摂食履歴のある大分県と福岡県患者由来株が含まれていた(表 6)。その他は同一県内あるいは隣接した県市在住患者由来株が多かったが、疫学的な因果関係は認められなかった。

IS 型が同一で PFGE 型が異なる菌株群は、32 グループであった(表 8)。各グループ内の患者住居地が同一県や市であり、同一家族や同一保育所の関連株である場合も多かった。また、患者居住地別にみると九州北部 3 県、南部 3 県にグループ分けできる傾向にあり、生活圏を反映しているものと考えられる。

今年度の調査からも継続的に IS 解析を行うことは、見逃されていた疫学情報の再調査の重要

な手がかりとなることが分かった。また、人手と時間を要する PFGE 検査のスクリーニングとしても有用であると考えられる。

### 3. IS を利用した感染源を早期に探知する取り組み

九州ブロックでは、各地研で得られた IS 解析結果について、ある地研のサーバーにアクセスして同一 IS パターンを示す O157 の存在を確認するシステムを構築する準備を行っている。この場合、アクセス権と個人情報を含まない菌株情報の整理など今後整備すべき点は多い。しかし、この取り組みが実現することにより、O157 による食中毒事件の早期探知が可能となる。

#### D. まとめ

IS の精度管理では、比較的良好な結果が得られた。過去3年間に IS に関する種々検討を各地研で行ったことにより、技術の習得がなされたものと考えられた。しかし、2nd set の Extra band の誤判定や、1st set の 1-06 の DNA 増幅が見られなかった例がそれぞれ 1 例ずつあり、IS 利用者が再現性のある結果を得るためには、これらの点が改善されなければならない。

IS で得られた結果は、ID コード化が容易であり、他の機関や過去の結果と普遍的に比較することが容易である。また、IS は 1 日で結果が得られ、迅速性が求められる公衆衛生分野での応用が期待される。ただし、恒常的に正確な結果を得るためには、他の検査と同様に機器および試薬等の管理を厳しく行わなければならない。また、定期的な IS の精度管理や PCR マシーンの保守管理などを徹底することにより、細菌学的な疫学情報源としての正確性が担保される。

IS は、PFGE とは異なる原理を用いた遺伝子解析手法であり、地研の管轄内だけにとどまらず、九州地区の地研が IS 型と最小限の患者情報をともなった O157 菌株情報の登録を行うことにより、似通った食習慣を持つ隣接した生活圏内での早期事件探知・解明の糸口を見いだせるものと考えられる。一方で、菌株の早期搬入が望まれる。

謝辞 腸管出血性大腸菌の調査にあたられた行政機関および分離株を分与頂いた検査機関関係各位並びに PFGE 型別を実施して頂いた感染研細菌第一部の皆様へ深謝致します。

#### E. 研究発表

1) 江藤 良樹、市原 祥子、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、「腸管出血性大腸菌検査の現状と遺伝子解析について」、第 35 回九州衛生環境技術協議会 (2009.10.8-9)。

2) 中村 祥子、江藤 良樹、濱崎 光宏、村上 光一、竹中 重幸、堀川 和美、福岡県で分離された稀な血清型の志賀毒素産生性大腸菌について、福岡県保健環境研究所年報、2008、35、59-64。

#### F. 文献

1) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, and Hayashi T.: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J Clin Microbiol. 2009, 47:2888-94.

表 2. 九州各地研の IS-printing System に使用した周辺機器

地研 番号	PCR機種名		泳動槽			画像取り込み装置	
	メーカー	型式	メーカー	型式	泳動時間	メーカー	型式
1	ABI	GeneAmp 9700	コスモバイオ	Mupid-2	60分	BIO-RAD	Gel Doc XR
2	ABI	GeneAmp 9700	ELCHROM SCIENTIFIC	SEA 2000	125分	BIO-RAD	Gel Doc EQ
3	ASTECC	PC320	ADVANCE	Mupid	70-80分	BIO-RAD	Gel Doc 2000
4	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	120分	BIO-RAD	Gel Doc XR
5	BIO-RAD	iCycler	ADVANCE	Mupid	95分	ATTO	Printgraph typeCX
6	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid	65分	TOYOBO	FAS-III
7	ASTECC	PC320	ADVANCE	Mupid- $\alpha$	70分	BIO-RAD	Gel Doc XR
8	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE	Mupid-2 plus	70分	BioImage	Gel Print INFINITY
9	ABI	GeneAmp 2700	東洋紡	GelMate2000	85分	POLAROID	MP-4
10	ABI	GeneAmp 9700	ADVANCE Co.,Ltd.	Mupid	65分	BioImage	Gel Print 2000i
11	ABI	2720 Thermal Cycler	ADVANCE	Mupid	65分(一部70分以上)	CANON	CanoSCAN LiDO200
12	MJ Research	DNA engine TETRAD 2	ADVANCE	Mupid-ACE	60分	BIO RAD	GEL Doc

表 3. 九州各地研の電気泳動時間と泳動用バッファーおよびサイズマーカー

地研 番号	TBE Buffer			サイズマーカー		Loading Dye	
	メーカー	品番	使用濃度	メーカー	品番	メーカー	品番
1	日本ジーン	318-90041	×0.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
2	invitrogen	15581-044	×0.5	Promega	G829B	-	-
3	ナカライテスク	35432-41	×0.5	SIGMA	MBMA 100BP-S	TOYOBO	RE-DYE
4	SIGMA	T4415-II	×0.5	コスモバイオ	SM0321	コスモバイオ	×6 Loading Buffer
5	BIO-RAD	161-0733	×0.5	BIONEXUS	BN2050	TOYOBO	RE-DYE
6	BIO-RAD	161-0733	×0.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
7	日本ジーン	318-90041	×0.5	TOYOBO	DNA-135	TOYOBO	RE-DYE
8	TAKARA	T905	×0.5	TOYOBO	DNA-035	TOYOBO	RE-DYE
9	TaKaRa	T905	×0.5	TaKaRa	3407A	TaKaRa	×6 Loading Buffer
10	日本ジーン	318-90041	×0.5	TaKaRa	3407B	TOYOBO	RE-DYE
11	日本ジーン	318-90041	×0.5	TaKaRa	3407A	TOYOBO	RE-DYE
12	BIO-RAD	16-10733	×0.5	-	-	TOYOBO	RE-DYE

表 4. IS 型と PFGE 型が同じ菌株が分離された機関とその株数

IS-printing	PFGE	福岡県	福岡市	北九州市	佐賀県	長崎県	長崎市	大分県	熊本県	熊本市	宮崎県	鹿児島県	沖縄県	総計
27384601163	e377		2					1				3		5
56643812046	c356	1						6						7
65382642633	a206		1							2				3
66324257743	d240							1				1		2
66324257743	d92	2	2				1	1						5
66324257743	e537	28	4											32
66324265923	b664	3						7			1			11
66456318921	e313	4	1	1										6
66456318921	e556		1	1										2
66457435083	c293	2						1		1	1			5

表 5. PFGE 型が【e537】で IS 型が【66324257743】を示すグループ

IS-printing	PFGE	感染研番号	地研菌株番号	血清型	VT1	VT2	Type No.	地研名	その他疫学上の重要なコメント
66324257743	e537	092244	09E057	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月7日にB店にて焼肉を喫食。
		092245	09E058	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E057の家族。9月7日にB店にて焼肉を喫食。
		092246	09E060	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月20日B店にて焼肉等を喫食。
		092249	09E061	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月22日にB店に焼肉等を喫食。
		092251	09E062	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月23日にB店にて喫食。
		092255	09E064	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。
		092257	09E068	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。9月30日にB店で夕飯。
		092258	09E069	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。9月28日にB店にて夕飯。
		092259	09E070	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。
		092260	09E071	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員(アルバイト)。
		092261	09E072	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。
		092262	09E073	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。
		092263	09E074	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。B店におろしている業者の従業員。
		092242	09E075	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E066の家族。9月11日または12日にB店にて焼肉を喫食。
		092265	09E076	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月16日にB店にて焼肉を喫食。
		092256	09E077	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。
		092264	09E078	O157:H7	+	+	e537	福岡県	B店従業員。
		092247	09E079	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E060の家族。9月20日にB店にて焼肉を喫食。
		092248	09E080	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E060、09E079の家族。9月20日にB店にて焼肉を喫食。
		092252	09E081	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E062の家族。9月23日にB店にて焼肉を喫食。
		092253	09E082	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E062の家族。9月23日にB店にて焼肉を喫食。
		092250	09E083	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E061の家族。9月23日にB店にて焼肉を喫食。
		092275	09E088	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E101の家族。家族内感染?
		092266	09E093	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月23日にB店(焼肉)にて喫食。農場の定期検便で判明。
		092268	09E097	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月19日にB店にて喫食。09E096の家族。
		092282	09E098	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E094(HUS発症)の家族。
		092269	09E099	O157:H7	+	+	e537	福岡県	9月25日にB店にて焼肉を喫食。
		092284	09E104	O157:H7	+	+	e537	福岡県	09E100の家族。
		092057	20091002	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内
		092058	20091003	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内、092057の姉
092059	20091004	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内、092057の姉		
092060	20091005	O157:H7	+	+	e537	福岡市	家族内、092057の兄		

表 6. PFGE 型が【b664】で IS 型が【66324265923】を示すグループ

IS-printing	PFGE	感染研番号	地研菌株番号	血清型	VT1	VT2	Type No.	地研名	その他疫学上の重要なコメント
66324265923	b664	092210	09E023	O157:H7	+	+	b664	福岡県	7/30に焼肉を喫食(別府)。09E022.024.037の家族。
		092211	09E024	O157:H7	+	+	b664	福岡県	7/30に焼肉(別府)を喫食。09E022.023.037の家族。
		092212	09E037	O157:H7	+	+	b664	福岡県	7/30に焼肉を喫食(別府)。09E022.023.024の家族。
		091724	大分-09-034	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091725	大分-09-035	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091728	大分-09-038	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091729	大分-09-039	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091730	大分-09-040	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		091731	大分-09-041	O157:H	+	+	b664	大分県	患者(大分09039)宅冷蔵保管されていたキムチ(開封済み)
		091734	大分-09-044	O157:H	+	+	b664	大分県	A焼肉店関連
		100196	9587	O157:H7	+	+	b664	宮崎県	

表 7. PFGE 型が同じで IS 型が異なる菌株が分離された機関とその株数

PFGE	IS-printing	福岡県	福岡市	北九州市	佐賀県	長崎県	長崎市	大分県	熊本県	熊本市	宮崎県	鹿児島県	沖縄県	総株数
a259	56642763470							1						1
	56643812042							2						2
	56643812046							4						4
b664	27384076875								1					1
	27384601163											3		3
	66324265923	3						7			1			11
e169	57733536074							1						1
	57733536078			1										1

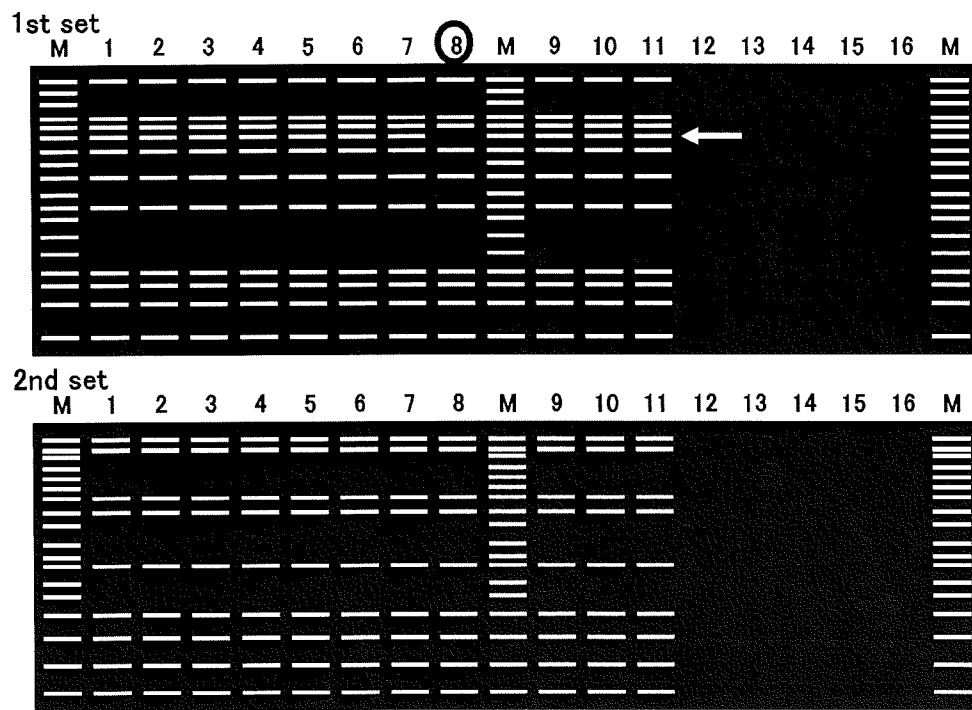
表 8. IS 型が同じで PFGE 型が異なる菌株が分離された機関とその株数

IS-printing	PFGE	福岡県	福岡市	北九州市	佐賀県	長崎県	長崎市	大分県	熊本県	熊本市	宮崎県	鹿児島県	沖縄県	総計
21764233539	d224	2												2
	d402											1		1
	e544		4											4
	e75											1		1
22284073678	e141	1												1
	e250				1									1
	e317													1
23373797731	c374	2												2
	e320			1										1
	e541		1											1
	e558					2								2
27384601163	b684											3		3
	e377		2				1					3		5
	e605						1							1
30652748041	e728										1			1
	e729										1			1
30652944713	e530											1		1
	e727										1			1
	e730										1			1
30653010241	c786							1						1
	e125											2		2
30653010249	d836									1				1
	e384											1		1
	e434							2						2
	e76											1		1
30671556744	e121											1		1
	e437							1						1
	e447							2						2
	e448							1						1
	e588	3												3
30671622280	e120											1		1
	e122											2		2
	e135	4												4
	e148					1								1
	e248					1								1
	e253					1								1
	e254					1								1
	e272	1												1
	e580	1												1
	e581	1												1
	e592	1												1
56643812046	a259							4						4
	c358	1						6						7
	d482					2								2
	e140	1												1
	e251					1								1
	e306					1								1
	e307					1								1
	e308					6								6
	e314					1								1
	e315					1								1
	e316					1								1
	e436													1
	e441							1						1
	e442							1						1
	e449							1						1
	e45													1
	e593	1			2									2
	e596	1												1
	e597	2												2
	e711				1									1
57733536078	e169				1									1
	e594	1												1
65012745561	e433							3						3
	e715													1
65382642633	a206		1		1						2			3
	c876		10											10
66324192207	e408											2		2
	e463					1								1
	e600						1							1
	e601	3												3
66324257743	d200											1		1
	d240											1		1
	d300							1						1
	d751	3												3
	d92	2	2					1						6
	e249					1								1
	e349		2											2
	e350		2											2
	e537	28	4											32
	e540											1		1
	e587	2												2
	e598	1												1
	e599	3												3
	e602							1						1
66324265923	b664	3						7			1			11
	d604											1		1
	e445							1						1
	e578	1												1
	e712				1									1
66455335881	e119											1		1
	e594	1												1
66456318921	b184						1							1
	e313	4	1	1										6
	e556		1	1										2
66457435083	b142										1			1
	c293	2						1		1	1			5
	c483				1									1
66458483659	d639									1				1
	e403							1						1
	e603													1
	e713			1										1









1: 2D

9: 10D

图5 精度管理株 D

平成 21 年度 厚生労働省研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
「食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究」に関する 九州地区 研修

新規遺伝子解析法について

場所 熊本市画図町所島 404-1、熊本市環境総合研究所  
日時 平成 22 年 2 月 12 日(木)、13:00 - 15:00  
平成 22 年 2 月 13 日(土)、9:00 - 12:00  
講師 感染症研究所 細菌第一部 伊豫田 淳 先生  
宮崎大学・医学部・感染症 大岡 唯祐 先生

1. 研修参加者

氏名	機関名
樋脇 弘	福岡市保健環境研究所
財津 修一	
久保田 勉	北九州市環境科学研究所
西 桂子	佐賀県衛生薬業センター
右田 雄二	長崎県環境保健研究センター
江原 裕子	長崎市保健環境試験所
緒方 喜久代	大分県衛生環境研究センター
松本 一俊	熊本県保健環境科学研究所
岩永 貴代	熊本市環境総合研究所
杉谷 和加奈	〃
河野 喜美子	宮崎県衛生環境研究所
上野 伸広	鹿児島県環境保健センター
久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
堀川 和美	福岡県保健環境研究所
江藤 良樹	〃
市原 祥子	〃

2. 研修内容

内容：腸管出血性大腸菌感染症の動向

内容：IS-printing system による遺伝子解析