

5月に大阪で分離された株と同じパターンであったが、他の事例の菌株は島根県以外の地域で分離されたものはなかった。

事例6、8、9では事例間でも同一のISコードを示し、3つの事例の患者等の住所地が半径約20km以内と比較的接近していることから何らかの関連性が疑われた。しかし事例6では生レバーを喫食していたが、他の2事例では特記すべき暴露源は確認できず疫学調査では共通の感染源は認められなかった。また、事例8では事例内でバンドが1本異なった株(菌株 No.⑮)があった。

感染研のPFGE法による解析でも同様の結果であり、これらの菌株と同じパターンのものは島根県以外の地域で分離されたものはなかった。

D 考察

IS printing法の型別能力はPFGE法よりやや劣るものの疫学解析には十分利用可能であるといわれているが、平成22年度の島根県でのO157発生事例ではPFGE法による解析結果と完全に一致しており、IS printing法は有用な解析ツールであると思われる。

事例6、8、9では事例間で同一コードを示し共通の感染源が疑われたが、疫学調査では関連性は見いだせなかった。また、感染症主管課から各管轄保健所に連絡したものの、3事例の発生の際に1ヶ月程度経過しており疫学的関連の有無についての再調査は困難であった。

事例8では事例内で1バンド異なるパターンの株が認められた。PFGE法による解析でも同様の結果であったが、IS printing法において、バンドの若干異なっている場合の菌株の相同性の評価について今後の検

討が必要である。

PFGE法による解析では事例1のみ大阪で分離された株と同じパターンであり、他の事例の株は島根県でのみ分離されていた。PFGE法により広域的な発生の有無を探知するためには、菌株を感染研に送付しなければならないが、IS printing法による解析結果はデジタルなデータであり、データのやりとりやデータベース化は比較的容易である。解析結果を集約し、このような広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する場合でもIS printing法は有用であると思われる。

E 結論

1. PFGE法による結果と一致したことから、IS printing法はO157の分子疫学解析ツールとして有用である。

2. IS printing法は比較的迅速に解析が可能であるが、各事例の発生に時間差があり、疫学的関連性についての再調査は困難であった。

3. IS printing法による解析結果はデジタルなデータのためデータベース化は比較的容易であり、広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する場合にもIS printing法は有用である。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 中嶋 洋 他(2010): 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 平成21年度 総括・分担研究報告書,87-90

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>eee</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	1	1	0	0	1	1	1	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	7			1			7			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	<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	0
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			3		

コード変換の方法

各プライマーごとに図1のスタンダードDNAと比較

増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定

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

セット1、セット2の順に12桁にコード化

表2 使用した菌株とその疫学的関連および解析結果

菌株No.	事例	届出年月日	発生場所等	VT	IS printingコード						各事例内の疫学的関連	PFGE type No. (感染研)						
					1st set			2nd set										
①	1	平成22年5月21日	M市	2	7	1	7	5	7	7	6	1	1	6	5	3	②の子。	f34
②	1	平成22年5月18日	M市	2	7	1	7	5	7	7	6	1	1	6	5	3	①の親。焼肉店でユツケを喫食。	f34
③	2	平成22年6月10日	M市	2	1	1	5	0	5	5	3	0	3	4	4	3	⑤の同僚。宴会でホルモン鍋を喫食。	f81
④	3	平成22年6月10日	I市	2	1	5	5	0	4	5	3	0	3	4	4	2	⑦の弟。母が焼肉店でレバ刺しを喫食。	f80
⑤	2	平成22年6月15日	M市	2	1	1	5	0	5	5	3	0	3	4	4	3	③の同僚、⑥の親。宴会でホルモン鍋を喫食。	f81
⑥	2	平成22年6月18日	M市	2	1	1	5	0	5	5	3	0	3	4	4	3	⑤の子。	f81
⑦	3	平成22年6月20日	I市	2	1	5	5	0	4	5	3	0	3	4	4	2	④の姉。母が焼肉店でレバ刺しを喫食。	f80
⑧	4	平成22年7月17日	T町	2	1	1	4	0	5	7	3	0	3	4	4	3	特記事項なし。	f528
⑨	5	平成22年7月24日	H町	1&2	7	1	7	5	5	7	6	1	1	6	5	7	特記事項なし。	f522
⑩	6	平成22年9月24日	O町	1&2	3	1	7	5	7	7	6	1	1	7	5	6	⑪の居酒屋店員。生レバーを喫食。	f525
⑪	6	平成22年9月30日	O町	1&2	3	1	7	5	7	7	6	1	1	7	5	6	⑩の店長。生レバーを喫食。	f525
⑫	7	平成22年9月30日	M市	1&2	3	0	7	5	5	5	6	1	1	6	5	7	焼肉店で生レバー、ユツケを喫食。	f517
⑬	8	平成22年10月8日	G市	1&2	3	1	7	5	7	7	6	1	1	7	5	6	⑭の子、⑮の弟。特記事項なし。	f525
⑭	8	平成22年10月11日	G市	1&2	3	1	7	5	7	7	6	1	1	7	5	6	⑬、⑮の親。特記事項なし。	f525
⑮	8	平成22年10月19日	G市	1&2	3	1	7	5	5	7	6	1	1	7	5	6	⑬の兄、⑭の子。特記事項なし。	f524(1band diff. from f525)
⑯	9	平成22年10月26日	H市	1&2	3	1	7	5	7	7	6	1	1	7	5	6	特記事項なし。	f525

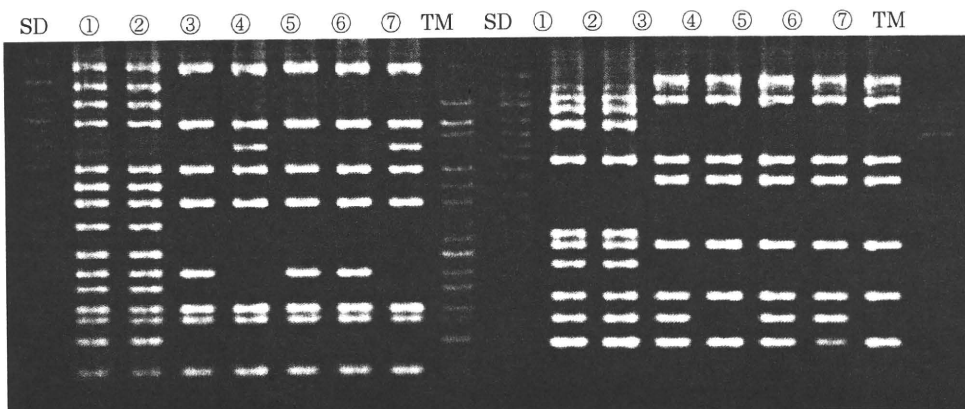


図1 菌株 No.①～⑦ (事例1～3) の IS printing の電気泳動像 (左: 1st set, 右: 2nd set)

SD: スタンダード DNA (泳動コントロール)、①～⑦: 菌株 No.①～⑦、

TM: テンプレートミックス (PCR コントロール)。以下同様。

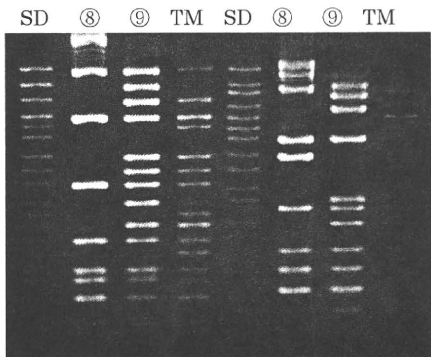


図2 菌株 No.⑧、⑨（事例4、5）
の IS printing の電気泳動像

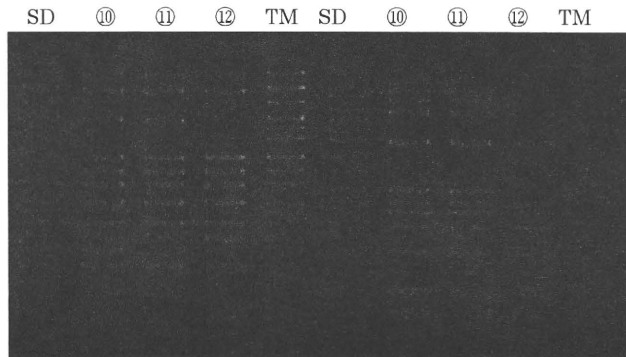


図3 菌株 No.⑩、⑪、⑫（事例6、7）の
IS printing の電気泳動像

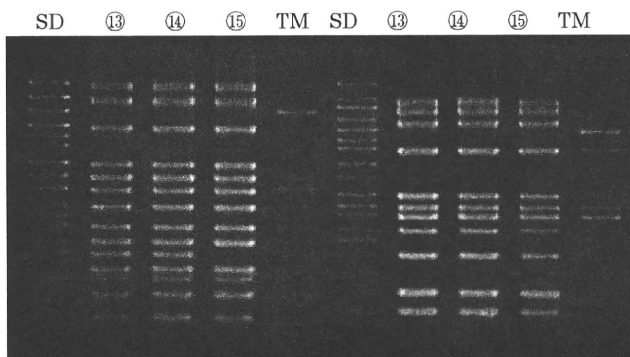


図4 菌株 No.⑬、⑭、⑮（事例8）の
IS printing の電気泳動像

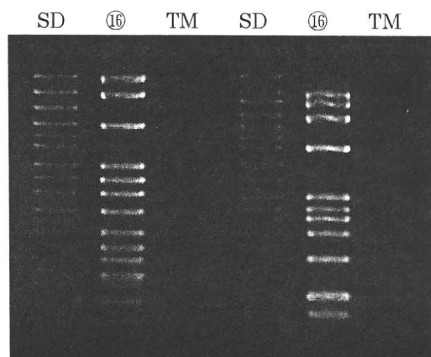


図5 菌株 No.⑯（事例9）の
IS printing の電気泳動像

広島県で分離された腸管出血性大腸菌における疫学的解析指標の検討

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

研究要旨

広島県で分離された腸管出血性大腸菌について、パルスフィールド・ゲル電気泳動法、IS-printing System 法、薬剤感受性試験、生化学的性状試験および病原因子の検索を実施し、菌株間の関連性等を識別するための疫学的解析指標について検討した。その結果、O157 の遺伝子型別については、迅速性・簡便性に優れた IS-printing System 法が、パルスフィールド・ゲル電気泳動法と同等の解析能力 (85.7%) を有しており、事案発生時のスクリーニングに有効な疫学解析法と考えられた。また、遺伝子型別以外の指標では、薬剤感受性が、IS-printing System 法のような簡易な疫学解析法の開発されていない O157 以外の血清型についても、菌株間の関連性の高い家族事例などにおいてパルスフィールド・ゲル電気泳動法との相関を示し、菌株間の簡易な解析法の一つとして有用であると思われた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の疫学的解析法として、従来からパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法が用いられているが、近年、迅速性・簡便性に優れた IS-printing System (IS) 法が開発され、我々もその有用性を検討してきた。今回、2010 年に県内で分離された EHEC O157 について PFGE 法、IS 法、薬剤感受性、生化学的性状および病原因子の解析を行い、それぞれの疫学的解析指標としての有用性を検討した。また、2010 年は O157 以外の EHEC 血清型が 4 割 (35 株中 14 株) を占めたが、これらについては IS 法のような簡易な疫学的解析法は開発されておらず、さらに、O26 と O111 を除く稀な血清型は生化学的性状などの不明な点も多い。そこで、これらの血清型については、2010 年以前に分離された菌株も併せて PFGE 法、薬剤感受性、生化学的性状および病原因子の解析を行い、疫学解析に有用な

指標について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

供試菌株は 2010 年に県内で分離された EHEC O157 21 株、O26 4 株、O91 1 株、O103 4 株、O119 1 株、O121 2 株および O145 2 株の計 35 株と、1997 年から 2009 年に分離された O5 2 株、O91 1 株、O103 4 株、O119 1 株、O121 4 株、O124 1 株、O128 2 株、O145 25 株、O146 1 株および O165 1 株の計 42 株、総計 77 株を用いた。各菌株の概要を表 1 および表 2 に示した。

2. 方法

(1) IS 法

IS 法は、IS-printing System (TOYOBO) を用い、取扱説明書に従ってテンプレートの調製および PCR を実施した。電気泳動には 3% アガロースゲル (NuSieve GTG : SeaKem GTG=2 : 1)

と 0.5×TBE Buffer を用いた。判定は、Standard DNA マーカーおよび検体と同時に増幅した Template Mix の 18 本のバンドと比較して、2 種類のプライマーセット (1st set, 2nd set) ごとに、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」とした。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て、1st set, 2nd set の順に並べた 12 桁の IS コードにより菌株を分類した。

(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) 薬剤感受性試験

センシ・ディスク (日本 BD) を用いて、添付文書に従い薬剤感受性を調べた。薬剤はアンピシリン (ABPC), ストレプトマイシン (SM), テトラサイクリン (TC), シプロフロキサシン (CPFX), カナマイシン (KM), セフォタキシム (CTX), クロラムフェニコール (CP), ST 合剤 (ST), オーグメンチン (AMPC/CVA), ゲンタマイシン (GM), ナリジクス酸 (NA) およびホスホマイシン (FOM) の 12 種類を使用した。

(4) 生化学的性状試験

糖分解試験では、ソルビトール (SOR), ラムノース (RHA), ソルボース (SOB), 白糖 (SUC), 乳糖 (LAC) およびキシロース (XYL) の 6 種類について調査した。試験には各糖を 1% ずつ添加した糖分解用半流動培地 (栄研化学) を用い、36°C で 4 日間培養後に判定した。β-グルクロニダーゼ活性は、CLIG 寒天培地 (極東製薬) を用い、36°C で 24 時間培養後に判定した。Cefixime Tellurite (CT) の感受性は、1% ソルビトール加

MacConkey Agar base (DIFCO) に CT サプリメントを添加した CT-SMAC 寒天培地に 0.5 MacFarland に調製した菌液を 10 μl 画線塗抹して 36°C で 24 時間培養後、発育の有無を判定した。

(5) 病原因子の検索

病原因子は、PCR 法によりインチミン遺伝子 (*eaeA*) およびエンテロヘモリシン遺伝子 (*hlyA*) の保有状況を検査した。それぞれのプライマーは Paton¹⁾らが報告した *eaeAF/eaeAR*, *hlyAF/hlyAR* をカスタム合成して用い、PCR 反応は中村ら²⁾の条件に従った。テンプレート DNA は、BHI 寒天培地で培養した菌株を滅菌蒸留水 100 μl に懸濁し、95°C で 10 分間加熱後、遠心した上清を用いた。

C. 研究結果

1. EHEC O157 の解析結果

O157 21 株の PFGE タイプ、IS コード、薬剤感受性、生化学的性状および病原因子の保有状況を表 3 に示した。O157:H7 (VT2) 2 株の遺伝子型は、PFGE 法、IS 法ともに 2 タイプに分類され、O157:H7 (VT1,2) 19 株の遺伝子型は、PFGE 法では 12 タイプ、IS 法では 10 タイプに分類された。PFGE 法の方が高い型別能力を有していたが、IS 法にも PFGE 法に対して 85.7% (12/14 タイプ) の型別能力が認められた。また、PFGE 法と IS 法の遺伝子型別が一致しなかった IS コードは「717577-611657」(菌株番号 18,19) と「707577-611657」(菌株番号 11,12,16) の 2 種類で、前者の IS コードには昨年度の調査においても複数回の PFGE タイプが認められていた³⁾。

薬剤感受性試験では、21 株中 10 株 (47.6%) が 12 薬剤のうち ABPC, SM,

TC および AMPC/CVA のいずれかまたはすべてに耐性を示し、6 タイプの薬剤耐性パターンに分類された。その薬剤耐性パターンは PFGE 法および IS 法による菌株の分類には対応しておらず、遺伝子型の異なる散発事例にも同一の薬剤耐性パターンが認められた。しかし、遺伝子型が一致した家族事例（菌株番号 11,12）で同じ薬剤感受性（すべての薬剤に感受性）が認められた。

糖分解試験では、いずれの菌株もソルビトールを分解せず、6 株（28.6%）がソルボースを分解しなかったが、糖の分解性に多様なパターンはみられなかった。その他の性状試験では、すべての菌株が β -グルクロニダーゼ活性は陰性、CT 耐性であり、また、病原因子についてもすべての菌株が *eaeA* および *hlyA* を保有しており、特徴的な性状は認められなかった。

2. その他の EHEC 血清型の解析結果

O157 以外の血清型 56 株の PFGE タイプ、薬剤感受性、生化学的性状および病原因子の保有状況を表 4 に示した。

薬剤感受性試験では、血清型による特徴的な薬剤感受性の違いは認められなかった。しかし、O157 と同様に、PFGE タイプの一致した家族および接触者事例（O5：菌株番号 26,27, O103：菌株番号 30,31, O121：菌株番号 40,41, O145：菌株番号 73,74）や PFGE パターンの違いが 2 バンド以内の事例（O26：菌株番号 22,23, O145：菌株番号 49-71）では、それぞれ同一の薬剤感受性（すべての薬剤に感受性も含む）を示した。

糖分解試験では、O26 はラムノース、O5 および O121 は白糖、O91, O103, O119, O124, O128 および O146 はソル

ボース、O145 はソルボースと白糖、O165 はソルボースと乳糖をそれぞれ分解せず、糖の分解性に血清型による差異が認められた。その他の性状試験では、 β -グルクロニダーゼ活性はすべての血清型が陽性であったが、O103 では、CLIG 寒天培地に UV ランプを照射した際の蛍光強度が他の血清型よりも弱いという特徴がみられた。また、O91, O103（8 株中 1 株）、O119, O124, O128, O146 および O165 は CT に対して感受性を示した。病原因子については、O91, O119, O124, O128 および O165 が *eaeA* を保有しておらず、これらはすべて CT に感受性であった。また、O119 および O128 は *hlyA* を保有していなかった。

D. 考察

県内で分離された EHEC の疫学的解析指標について検討した。その結果、O157 については、PFGE 法が最も型別能力が高かったが、IS 法も散発事例や家族事例において高い型別能力を示し、簡便な IS 法の有用性が認められた。また、昨年度の報告と同様に、PFGE 法と IS 法による遺伝子型別が一致しなかった株の IS コード「717577-611657」には、これまでも複数の PFGE タイプが報告されており⁴⁾、この IS コードを示した株については、PFGE 法により分類する必要があると思われる。また、IS コード「707577-611657」についても同様に、複数の PFGE タイプが存在することが示唆された。薬剤感受性試験では、PFGE タイプが異なる菌株間でも同一の薬剤感受性が認められ、薬剤感受性による菌株の分類は困難であった。しかし、家族などの菌株間の疫学的関連性が疑われる事

例では、菌株間の解析に有用な指標になると思われる。また、薬剤感受性試験は、約1日で結果が得られ操作も簡便であることから、O157については、IS法と併用することで、より信頼性の高いデータを得ることが期待される。生化学的性状試験のうち糖分解試験では、糖の分解性に多様なパターンは認められず、今回調査した6種類の糖では菌株の関連性の識別はできなかった。また、その他の生化学的性状および病原因子の保有状況はすべての菌株で一致し、疫学解析に利用できる指標は見出せなかった。

O157以外の血清型については、O157と同様に、PFGEタイプが一致あるいは類似した家族や接触者事例で同一の薬剤感受性を示す傾向が認められた。O157以外の血清型では、IS法のようなPFGE法に代わる疫学的解析法は開発されていないため、薬剤感受性が簡易な指標として有用であると考えられる。一方、今回調査した6種類の糖の分解性、 β -グルクロニダーゼ活性、CT感受性、病原因子の保有状況は血清型ごとにほぼ一致しており、疫学的解析における有用性は確認できなかった。しかし、これらは各血清型の特徴として分離・同定への活用が期待できる。特に、分離株数が少ない血清型についてはデータの集積が重要であると考えられる。これまでの報告と合わせると、糖分解性については、O91, O103, O119, O165がソルボース非分解であること²⁾、また、O91, O119, O165でCT-SMAC寒天培地に発育しない株があること^{2,5)}と一致した結果が得られた。近年増加傾向にあるO157以外の血清型に利用可能な、迅速・簡便な疫学的解析法の開発が今後の課題である。

E. 結論

EHECの疫学的解析指標について検討したところ、O157の遺伝子型別については、PFGE法がIS法よりも高い解析能力を有していたが、IS法はPFGE法に比べて迅速性・簡便性に優れ、特定のISコードを除けばPFGE法と同等の型別能力が認められた。そのため、IS法は事案発生時のスクリーニング法として有効な解析法と考えられる。また、遺伝子型別以外の指標では、O157だけでなく他の血清型についても、薬剤感受性が、PFGE法で疫学的関連性を示す菌株間において一致する傾向が認められた。したがって、薬剤感受性試験は、疫学的関連が疑われる菌株間での簡易な解析法の一つとして有用であると思われる。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Paton A. W. et al. (1998): J. Clin. Microbiol., 36, 598-602.
- 2) 中村祥子 他(2008): 福岡県保健環境研究所年報第35号, 59-64.
- 3) 竹田義弘 他(2010): 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 平成21年度 総括・分担研究報告書, 102-106.
- 4) 勢戸和子 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.
- 5) Seto K. et al. (2007): J. Vet. Med. Sce., 69 (12), 1215-1222.

表1 EHEC O157 供試菌株の概要

菌株番号	血清型	毒素型	備考	分離年
1	O157:H7	VT2	散发	2010
2			散发	2010
3			家族内	2010
4			3, 5の家族	2010
5			3, 4の家族	2010
6			3の接触者	2010
7			6の家族	2010
8			3, 6の接触者	2010
9			3, 6の接触者	2010
10			散发	2010
11	家族内	2010		
12	O157:H7	VT1,2	11の家族	2010
13			家族内	2010
14			13の家族	2010
15			散发	2010
16			散发	2010
17			散发	2010
18			散发	2010
19			散发	2010
20			散发	2010
21			散发	2010

表2 O157 以外の EHEC 血清型供試菌株の概要

菌株番号	血清型	毒素型	備考	分離年	菌株番号	血清型	毒素型	備考	分離年				
22			散发	2010	49			散发	2007				
23	O26:H11	VT1	散发	2010	50			散发	2007				
24			家族内	2010	51			散发	2007				
25			24の家族	2010	52			散发	2007				
26			接触者内	2009	53			散发	2007				
27			26の接触者	2009	54			散发	2007				
28	O91:H14	VT1	散发	2010	55			散发	2007				
29	O91:HUT	VT1,2	散发	2008	56			散发	2007				
30			家族内	2010	57			散发	2007				
31			30の家族	2010	58			散发	2007				
32			散发	2010	59			散发	2007				
33	O103:H2	VT1	散发	2010	60	O145:H	VT1	散发	2007				
34			散发	2009	61			散发	2007				
35			散发	2007	62			散发	2007				
36			散发	2006	63			散发	2007				
37			散发	2000	64			散发	2007				
38			O119:H4	VT1	散发			2010	65			散发	2007
39			O119:H	VT1	散发			2007	66			散发	2007
40					家族内			2010	67			散发	2007
41					40の家族			2010	68			散发	2007
42			O121:H19	VT2	接触者内			2009	69			散发	2007
43	42の接触者	2009			70			散发	2007				
44	42の接触者	2009			71			散发	2007				
45	散发	2004			72			散发	2006				
46	O124:H19	VT1,2			散发	2000	73			家族内	2010		
47	O128:H2	VT1,2	散发	2008	74	O145:H	VT2	73の家族	2010				
48			散发	2008	75	O145:H	VT1,2	散发	2001				
					76	O146:H	VT1,2	散发	2009				
					77	O165:H	VT2	散发	1997				

表3 EHEC O157 の解析結果

血清型	VT	菌株番号	PFGE Type No. a)	ISコード		耐性薬剤 b)	糖分解性 (非分解) c)	GUR d)	CT-SMAC での発育	eaeA	hlyA	備考	
				1st set	2nd set								
O157:H7	2	1	c47	305457	611642	AMPC/CVA	SOR	-	+	+	+		
		2	f503	305557	711413	TC	SOR	-	+	+	+		
		3				ABPC	SOR						
		4				AMPC/CVA	SOR						
		5				-	SOR						
		6		b864	713577	231757	-	SOR	-	+	+	+	家族 および 接触者
		7					-	SOR					
		8					-	SOR,SOB					
		9					-	SOR,SOB					
		10		f507 e)	713575	231757	-	SOR	-	+	+	+	
O157:H7	1,2	11	f511	707577	611657	-	SOR	-	+	+	+	家族	
		12											
		13	f510	307557	611657	ABPC,SM,TC,AMPC/CVA	SOR,SOB	-	+	+	+		
		14	f505	307555	611657	ABPC,SM,TC,AMPC/CVA	SOR,SOB	-	+	+	+	家族	
		15	f76	116577	201757	ABPC	SOR	-	+	+	+		
		16	f78	707577	611657	ABPC	SOR	-	+	+	+		
		17	f333	117175	601757	ABPC,SM,AMPC/CVA	SOR	-	+	+	+		
		18	f512	717577	611657	-	SOR	-	+	+	+		
		19	f509	717577	611657	ABPC,SM	SOR,SOB	-	+	+	+		
		20	d377	317557	611756	-	SOR	-	+	+	+		
		21	f618	615455	311656	-	SOR,SOB	-	+	+	+		

a) 国立感染症研究所のサブタイプ名

b) ABPC:アンピシリン, SM:ストレプトマイシン, TC:テトラサイクリン, AMPC/CVA:オーグメンチン

c) SOR:ソルビトール, SOB:ソルボース

d) GUR:β-グルクロニダーゼ

e) one band diffr.from b864

表4 O157以外のEHEC血清型の解析結果

血清型 ^{a)}	VT	菌株番号	PFGE Type No. ^{b)}	耐性薬剤 ^{c)}	糖分解性(非分解) ^{d)}	GUR ^{e)}	CT-SMACでの発育	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	備考	
O26:H11	1	22	f28	ABPC	RHA	+	+	+	+	—	
		23	f29 ^{f)}								
		24	f123	ABPC,AMPC/CVA	RHA	+	+	+	+		家族
		25		AMPC/CVA							
O5:H-	1	26	A	ABPC,AMPC/CVA	SUC	+	+	+	+	接触者	
		27									
O91:H14	1	28		—	SOB	+	-	-	+		
O91:HUT	1,2	29		ABPC,AMPC/CVA	SOB	+	-	-	+		
		30	B	ABPC	SOB	(+)	+	+	+	家族	
31											
O103:H2	1	32		ABPC,AMPC/CVA	SOB	(+)	+	+	+		
		33		ABPC,AMPC/CVA	SOB	(+)	+	+	+		
		34		ABPC,SM,TC,AMPC/CVA	SOB	(+)	+	+	+		
		35		SM,TC	SOB	(+)	+	+	+		
		36		ABPC,AMPC/CVA	SOB	(+)	-	+	+		
		37		ABPC,KM	SOB	(+)	+	+	+		
		O119:H4	1	38		SM,TC,KM	SOB	+	-	-	-
O119:H-	1	39		ABPC,SM,TC,KM,AMPC/CVA	SOB	+	(-) ⁱ⁾	-	-		
O121:H19	2	40	C	—	SUC	+	+	+	+	家族	
		41									
		42		ABPC,SM,AMPC/CVA	SUC	+	+	+	+		接触者
		43	D	ABPC,SM,ST,AMPC/CVA							
		44		ABPC,SM,AMPC/CVA							
45		—	SUC	+	+	+	+				
O124:H19	1,2	46		—	SOB	+	-	-	+		
O128:H2	1,2	47		ABPC,AMPC/CVA	SOB	+	-	-	-		
		48		ABPC,AMPC/CVA	SOB	+	-	-	-		
O145:H-	1	49	E	—	SOB,SUC	+	+	+	+	—	
		50									
		51									
		52									
		53									
		54									
		55									
		56									
		57									
		58									
		59									
		60									
		61									
		62									
63	F ^{g)}	—	SOB,SUC	+	+	+	+				
64											
65											
66											
67	—	—	SOB,SUC	+	+	+	+				
68											
69											
70											
71	h)	—	SOB,SUC	+	+	+	+				
O145:H-	2	72		—	SOB,SUC	+	+	+	+	家族	
		73	G	—	SOB,SUC	+	+	+	+		
74											
O145:H-	1,2	75		—	SOB,SUC	+	+	+	+		
O146:H-	1,2	76		ABPC,AMPC/CVA	SOB	+	-	+	+		
O165:H-	2	77		—	SOB,LAC	+	-	-	+		

a) H-:非運動性, HUT:型別不能

b) O26は国立感染症研究所のサブタイプ名, その他の血清型は複数の菌株で同一タイプを示したものを順にA~Gとした

c) ABPC:アンピシリン, SM:ストレプトマイシン, TC:テトラサイクリン, KM:カナマイシン, ST:ST合剤, AMPC/CVA:オーグメンチン

d) RHA:ラムノース, SOB:ソルボース, SUC:白糖, LAC:乳糖

e) GUR:β-グルクロニダーゼ, (+)は+よりも蛍光強度が弱いもの

f) two bands diffr. from f28

g) one band diffr. from E

h) two bands diffr. from E

i) 発育したコロニー数が少ないため(34コロニー), CT感受性と判定した

腸管出血性大腸菌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 田内 敦子 宮野 高光 花木 陽子 国井 悦子
京塚 明美 伊藤 文明 笠間 良雄 吉岡 嘉暁

研究要旨

2010年3月から11月までに広島市で発生した腸管出血性大腸菌(EHEC) O157感染症事例14件23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 system[®](IS-printing)、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(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。また、同時期に広島市で発生したEHEC(O26、O121、O103)感染症事例13件20株をPFGEでクラスター解析し事例との対応を検討した。その結果、O157の株はPFGEのクラスター解析で、15のクラスターに分けられ、同一事例から分離された株は同一クラスターまたは近傍の類似度の高いクラスターに分類された。3法で比較するとほぼ結果は同じであったが、家族内事例においてMLVAでは全て同じ繰り返し回数(RN)であったが、IS-printingとPFGEで1band differ.となる株が分離された。O157以外の血清型においてPFGEのクラスター解析では各血清型で大きな集団にまとめられ、その中で事例ごとに区別できたことから、O157と同様に血清型の中で多様な遺伝子型が存在し、事例ごとに感染源の推定や浸潤状況の把握のためには型別の必要があり、その一つの手法としてPFGEは有用であると思われたが、今後O157と同様に迅速に結果の出る解析方法の検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

分子疫学的解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)、IS-printing System[®](IS-printing)、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)の3法の解析結果を用いて、腸管出血性大腸菌(EHEC) 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、O157以外の血清型でのPFGEを用いて分子疫学的解析を行い事例の関連を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

2010年3月から11月までの期間に広島市域で分離されたEHEC 43株を用いた。

O157の内訳は、O157:H7、VT1,2産生株9株、VT2産生株13株、O157:H-、VT1,2産生株1株、その他の血清型はO26:H11、VT1産生株10株、O121:H19、VT2産生株7株、O103:H2、VT1産生株3株で、事例と株の関係は表1、2に示した。

2. 方法

(1) PFGE

制限酵素 *Xba*I を用い、国立感染症研究所(感染研)で示された方法に従い実施し、Fingerprinting II (Bio-Rad)を用いて解析を行った。解析は、Dice法(最適化:0.0%、トランス: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。また、感染研で解析し型別された結

果を PFGE TN として併記した。

(2) MLVA

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems 社) を用い、Hyytia-Trees¹⁾らの 9 カ所の VNTR 領域について解析を行った。Fragment size marker は GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, Ver 2.0 (Applied Biosystems 社) を使用した。繰り返し回数 (RN) は昨年までに 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) 及び GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems 社) を用いて得られたデータと合うように補正したものを使用した。プライマーと蛍光標識については表 3 のように設定した。

(3) IS-printing

IS-printing は IS-printing system® (東洋紡) を使用し、添付のプロトコールに従い実施した。結果の解析には、平成 19 年度の本研究において近畿ブロックが実施した方法に習い、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. 研究結果

1. O157 株の 3 法比較

O157 の散発事例 1、2 は 3 月に発生し、これらから分離された菌株 (10001、10002) は 3 法全てで結果が一致した。

散発事例 7 から分離された株 10027 と家族内事例 8 から分離された 4 株 (10029~10032) は IS コード、PFGE TN は同一で、MLVA では 10027 は他 4 株と K10 で

のみ RN が 14 違いであった。

家族内事例 9 で分離された 2 株 (10033、10034) は IS コードが 1band differ. により異なったコードになり PFGE でも 1band differ. であったが MLVA では全ての RN は一致していた。また散発事例 10 での分離株 10035 と 10034 は IS コードが 1band differ. により、10033 とは 2band differ. により異なったコードとなり、PFGE は 3~4 band differ. であり、MLVA も 5 か所の RN が異なっていた。

家族内事例 12 で分離された 2 株 (10050、10051) と散発事例 13 で分離された 1 株 (10054) は IS コードが 1band differ. により異なったコードとなり PFGE も 1band differ. であったが MLVA では全ての RN が一致していた。

その他の家族内事例も事例内株間の解析結果は全て一致し、また、他の事例とも区別できた。

2. O157 以外の PFGE の結果

(1) O26 事例

6 事例 10 株は 6 つのクラスターに分けられ、ほぼ事例ごとに区別することができた。家族内事例 3 で分離された 2 株 (10013、10015) のうち 10015 は家族内事例 2 で分離された 2 株と PFGE TN は同じであり類似度 100% のクラスターに分類された。10013 は他 3 株と 1 band differ. で類似度は 96% のクラスターを単独で形成した。

(2) O121 事例

5 事例 7 株はほぼ事例ごとに区別することができた。家族内事例 3 の患者と散発事例 4 の患者は同じ保育園に通っており、発症時期も同時期であった。この二つの事例から分離された株 (10045~10047、10049) は感染研では全て同じパターンで、当所では

1~2band の違いで類似度は 90%以上であった。

(3)O103 事例

2 事例 3 株は 3 つのクラスターに分けられたが、ほぼ事例ごとに区別することができた。家族内事例 2 で分離された 2 株(10052,10053)は 1band differ.で類似度は 96%であった。

D 考察

O157 家族内事例 9 において同一家族内でほぼ同時期に分離した 2 株で、IS コードで 1band differ.により異なったコードになり、PFGE で 1band differ.であり、MLVA では全ての RN は一致したことから、この 2 株は同一由来株であることが考えられた^{1,2,3)}。IS コードのみでは判断できないが MLVA の解析結果を検討することで迅速な結果を得ることができた。また、これまでの結果から IS 部位や PFGE の制限酵素作用部位の変異は MLVA 解析の Locus に影響しないことが示唆された。

O157 家族内事例 12 と散発事例 13 の 3 株は、IS コードで、PFGE で 1band differ.であり、MLVA では全ての RN は一致したことから、上記の家族内感染事例と同様に同一由来株であることが考えられた。O157 家族内事例 12 の患者と散発事例 13 の患者は同じ小学校で同学年であり、発症時期も近かったが、共通する感染源や感染経路等を特定することはできなかった。

O157 家族内事例 9 と散発事例 10 で分離された 3 株は IS コードが似ており、PFGE は 3~4band の違いで類似度は 91.35%とほぼ同一株と判断できる値であったが、MLVA では 5 か所の RN が 1~6 異なっていた。発生時期、年齢等から感染源が同じであることも疑われたが、共通する感染源は

特定できなかった。

MLVA の RN は環境によって短時間で大きく変異することも考えられ⁴⁾、PFGE、IS-printing でも同様に、どの程度までを同一株の変異とするかなどの解釈に関して課題があり、今後さらなる疫学情報をふまえた解析や実験による検討が必要である。

O157 以外の血清型の PFGE 解析では、O26 家族内事例 2、3 と O121 家族内事例 3、散発事例 4 のほかに異なる事例で類似したパターンになることはなかった。O26 の事例は同時期の発生であったが共通する感染源を特定することはできなかった。O121 の事例は同時期の発生であり、患者は同じ保育園の同じクラスであり、同一感染源の可能性が示唆されたが共通する感染源を特定することはできなかった。

PFGE では血清型ごとに類似のクラスターに分かれ、その中で事例ごとに区別することができた。他の血清型による事例も増加していることから今後 O157 以外の血清型でも迅速に解析ができる解析方法を検討していく必要があると考えられる。

E 結論

1. EHEC O157 の分子疫学解析として 3 法を行うことは迅速かつ正確に解析を行う上でかなり有効である。一方では型別の明確な基準がなく、それについては今後の課題である。

2. 昨年から O121 など O157 以外の EHEC が増えているが、これらの血清型も遺伝子的に多様な型があり、感染源の特定や予防のためにも分子疫学的解析の必要がある。PFGE で解析も可能であったが、迅速に解析するために MLVA などの primer を検討する必要があると考えられる。

F. 研究発表
なし

G. 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
2)Tadasuke Ooka,Jun Terajima, Masahiro Kusumoto, et al (2009):Development of a Multiplex PCR-Based Rapid Typing Method for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J.Clin.Microbiol. 47:2888-2894.

3)Noriyo Yoshii,Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi,et al.(2009):Pulsed-Field Gel Electrophoresis Profile Changes Resulting from Spontaneous Chromosomal in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during Passage in Cattle. Appl. Environ. Microbiol. 75:5719-5726
4)Michael B. Cooley, Diana Carychao, Kimberly Nguyen,et al.(2010):Effects of Environmental Stress on Stability of Tandem Repeats in *Escherichia coli* O157:H7.Appl.Environ.Microbiol.76:3398-3400

表1 O157 事例概要と分離菌株

事例	菌株番号	診断の類型	発症年月日	性別	年齢	当該者職業	O	H	VT型
1	10001	患者	20100226	女	35	看護師	157	7	VT1VT2
2	10002	患者	20100309	男	7	小学生	157	7	VT1VT2
3	10005	患者	20100505	男	21	大学生	157	-	VT1VT2
4	10006	患者	20100511	男	6	小学生	157	7	VT2
5	10010	患者	20100507	男	35	会社員	157	7	VT1VT2
6	10016	患者	20100523	女	1	無職	157	7	VT2
	10018	無症状病原体保有者		女	65	会社員	157	7	VT2
	10017	無症状病原体保有者		女	38	無職	157	7	VT2
	10019	無症状病原体保有者		男	67	無職	157	7	VT2
7	10027	患者	20100714	女	31	学生、准看護師	157	7	VT2
	10031	患者	20100718	女	6	小学生	157	7	VT2
8	10030	無症状病原体保有者		男	34	水道工	157	7	VT2
	10032	無症状病原体保有者		女	39	人形販売店員	157	7	VT2
	10029	無症状病原体保有者		女	6	小学生	157	7	VT2
9	10033	患者	20100807	男	5	保育園児	157	7	VT1VT2
	10034	無症状病原体保有者		女	31	会社員	157	7	VT1VT2
10	10035	患者	20100809	女	3	幼稚園児	157	7	VT1VT2
11	10041	患者	20100825	男	10	小学生	157	7	VT1VT2
12	10050	患者	20100906	男	8	小学生	157	7	VT2
	10051	患者	20100907	男	38	自営業(造園業)	157	7	VT2
13	10054	患者	20100915	女	9	小学生	157	7	VT2
14	10064	患者	20101106	男	21	会社員	157	7	VT1VT2
	10067	無症状病原体保有者		女	55	無職	157	7	VT1VT2

表2 O157以外の血清型事例概要と分離菌株

事例	番号	診断の種類	発症年月日	性別	年齢	当該者職業	血清型	VT型
O26-1	10007	患者	20100507	女	45	事務員	O26:H11	VT1
O26-2	10011	患者	20100517	男	15	学生	O26:H11	VT1
	10012	無症状病原体保有者		女	43	無職	O26:H11	VT1
O26-3	10013	患者	20100516	男	11	小学生	O26:H11	VT1
	10015	無症状病原体保有者		女	68	無職	O26:H11	VT1
O26-4	10037	無症状病原体保有者		男	57	調理師	O26:H11	VT1
O26-5	10043	患者	20100831	女	3	保育園児	O26:H11	VT1
	10042	無症状病原体保有者		女	28	保育士	O26:H11	VT1
O26-6	10055	患者	20100926	男	8	小学生	O26:H11	VT1
	10056	無症状病原体保有者		女	37	会社員(パート)	O26:H11	VT1
O103-1	10020	患者	20100528	女	11	小学生	O103:H2	VT1
O103-2	10052	患者	20100914	女	10	小学生	O103:H2	VT1
	10053	無症状病原体保有者		男	7	小学生	O103:H2	VT1
O121-1	10009	患者	20100518	男	18	大学生	O121:H19	VT2
O121-2	10040	患者	20100825	男	29	会社員(IT関連)	O121:H19	VT2
	10046	患者		男	1	保育園児	O121:H19	VT2
O121-3	10049	患者	20100914	女	5	保育園児	O121:H19	VT2
	10047	患者		男	34	建設業	O121:H19	VT2
O121-4	10045	患者	20100911	男	2	保育園児	O121:H19	VT2
O121-5	10065	患者	20101111	男	18	高校生	O121:H19	VT2

表3 MLVA primer と Dye set

PCR mix	locus	Dye	primer (5'-3')
Mix 1	K-3	Forward	VIC GG CGG TAA GGA CAA CGG GGT GTT TGA ATT G
		Reverse	GAA CAA CCT AAA ACC CGC CTC GCC ATC G
	K-9	Forward	NED GC GCT GGT TTA GCC ATC GCC TTC TTC C
		Reverse	GTG TCA GGT GAG CTA CAG CCC GCT TAC GCT C
	K-25	Forward	PET GC CGG AGG AGG GTG ATG AGC GGT TAT ATT TAG TG
		Reverse	GCG CTG AAA AGA CAT TCT CTG TTT GGT TTA CAC GAC
	K-34	Forward	FAM GA CAA GGT TCT GGC GTG TTA CCA ACG G
		Reverse	GTT ACA ACT CAC CTG CGA ATT TTT TAA GTC CC
Mix 2	K-17	Forward	FAM GC AGT TGC TCG GTT TTA ACA TTG CAG TGA TGA
		Reverse	GGA AAT GGT TTA CAT GAG TTT GAC GAT GGC GAT C
	K-19	Forward	PET GC AGT GAT CAT TAT TAG CAC CGC TTT CTG GAT GTT C
		Reverse	GGG GCA GGG AAT AAG GCC ACC TGT TAA GC
	K-36	Forward	VIC GG CGT CCT TCA TCG GCC TGT CCG TTA AAC
		Reverse	GCC GCT GAA AGC CCA CAC CAT GC
	K-37	Forward	NED GC CGC CCC TTA CAT TAC GCG GAC ATT C
		Reverse	GCA GGA GAA CAA CAA AAC AGA CAG TAA TCA GAG CAG
Mix3	Forward	FAM CAGCCTCCTGCAAACCTTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC	
	Reverse	GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTTC	

表4 O157 MLVA RN および IS コード並びに PFGE TN

	菌株番号	事例	VT型	K 25	K 3	K 34	K 9	K 17	K 19	K 36	K 37	K 10	ISコード	PFGE TN
1	10001	1	VT1VT2	19	13	11	14	6	6	3	5	29	717577 650657	e671
2	10002	2	VT1VT2	19	13	11	14	6	6	3	5	29	717577 650657	e671
3	10005	3	VT1VT2	2	14	8	16	11	5	4	7	33	315455 350656	f59
4	10006	4	VT2	5	9	10	16	10	4	9	9	40	311555 630253	f60
5	10010	5	VT1VT2	6	14	10	21	7	4	12	6	28	613177 210646	d482
6	10016	6	VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653	f34
7	10018		VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653	f34
8	10017		VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653	f34
9	10019		VT2	5	16	11	16	7	6	11	14	26	717577 611653	f34
10	10027	7	VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	27	311557 710413	e377
11	10031	8	VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413	e377
12	10030		VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413	e377
13	10032		VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413	e377
14	10029		VT2	5	7	8	14	5	7	4	7	41	311557 710413	e377
15	10033	9	VT1VT2	5	13	11	15	7	6	10	7	20	717575 611657	f402
16	10034		VT1VT2	5	13	11	15	7	6	10	7	20	717577 611657	f417*
17	10035	10	VT1VT2	4	11	10	9	6	6	10	7	20	717557 611657	f404
18	10041	11	VT1VT2	5	9	10	11	7	6	6	6	44	317575 611757	c785
19	10050	12	VT2	5	16	7	16	3	7	6	7	5	305457 611642	c47
20	10051		VT2	5	16	7	16	3	7	6	7	5	305457 611642	c47
21	10054		VT2	5	16	7	16	3	7	6	7	5	305057 611642	f526**
22	10064	14	VT1VT2	5	11	9	12	9	6	10	7	25	317557 611657	f634
23	10067		VT1VT2	5	11	9	12	9	6	10	7	25	317557 611657	f634

* : one band diffr. from f402 ** : one band diffr. from c47

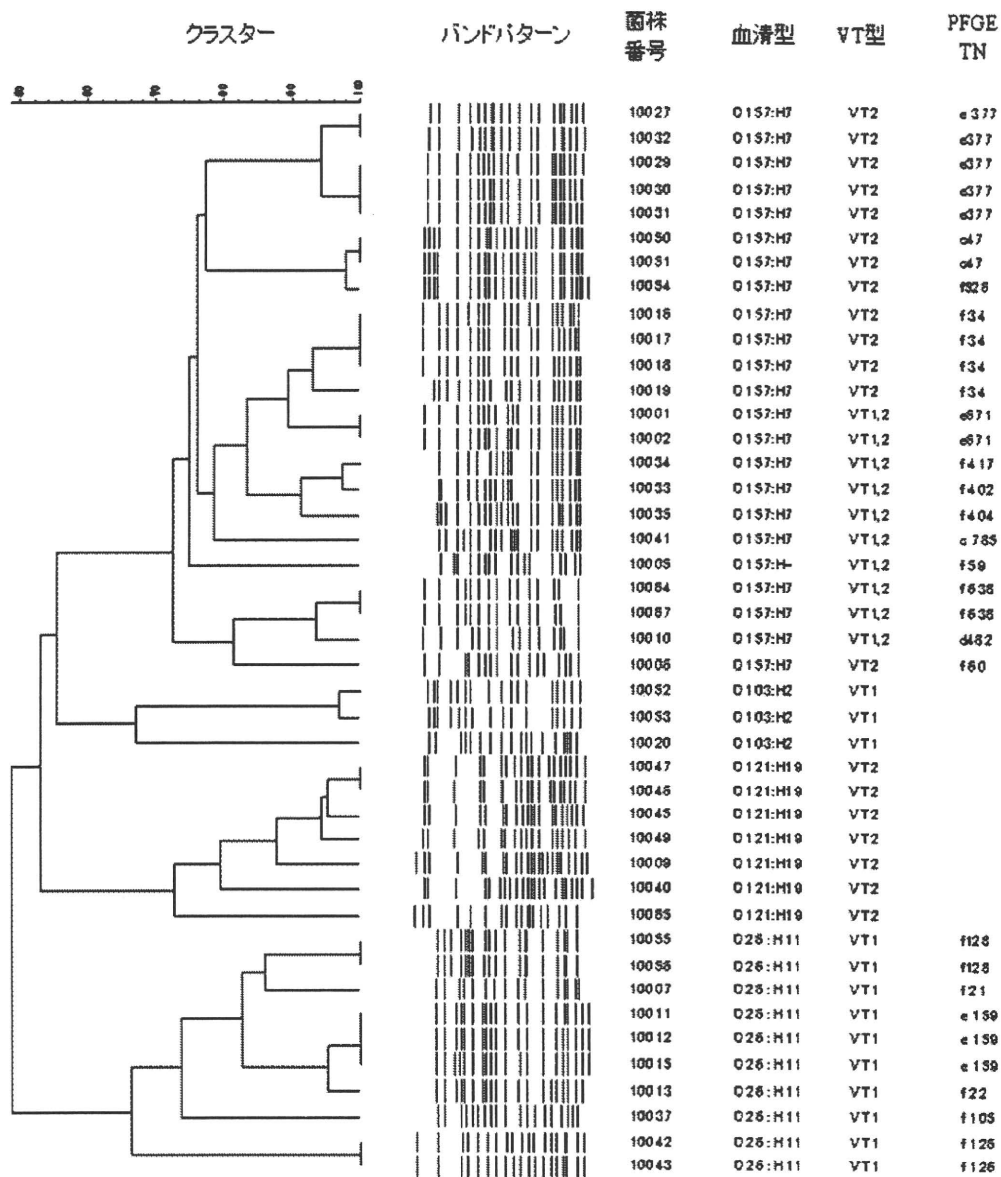


図1 PFGE クラスターとバンドパターン

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 石田弘子

研究要旨

腸管出血性大腸菌O157の分子疫学手法の1つであるIS-printing Systemを用い、解析結果を保健所に迅速に還元した。これに基づき再調査が行われた結果、散発事例間の疫学関連性が疑われる事例があり、当手法はO157感染症の拡大防止の初期探知に大変有効なツールであるとの認識を保健所・本庁担当者間で共有することができた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌O157の分子疫学手法の1つであるIS-printing法による解析結果を実際に活用することにより、O157感染症の拡大防止における有用性と問題点を検討した。

B. 研究方法

1. 菌株情報

平成22年度に県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症のうちO157として送付された20株について、IS-printing法を実施し、その解析結果を保健所及び本庁へ迅速に還元した。

PFGEについては、国立感染症研究所に検査を依頼し、IS-printing結果と比較した。

2. 疫学関連情報

(1) 患者情報

O157感染症発生時に、保健所において作成された感染症患者調査票を患者情報として提供を受けた。

(2) 保健所における対応状況

IS-printing解析結果に基づき、保健所において実施された再調査結果及び食品担当との連携により得られた情報等については、

本庁を通じて情報提供を受けた。

C. 研究結果

1. IS-printing法とPFGE法の比較

表に示すとおり、20株はIS-printing法、PFGE法、ともに12パターンに分類された。しかしながら、IS-printing法では一致するもののPFGE法で一致しない株が1株(菌株No605とNo622, 623)、また逆にIS-printingでは一致しないがPFGEでは一致する株が1株(菌株No616とNo615, 617, 618)認められた。

2. 疫学関連性

接触者検診により分離された菌株を同一事例由来とすると、表に示すとおり、今回の20株は15事例に由来している。同一事例内では、IS-printing, PFGE共に同一パターンを示すものが3事例中2事例あったが、事例No11においてPFGEパターンが一致するにもかかわらず患者と無症状保菌者でIS-printingで相違が認められた。

一方、散発事例としてとらえられていた事例No6と7、事例No10と11、事例13と14は両法でパターンが一致した。事例No6, 7についてIS-printingが一致したことにより、保健所で再調査を行ったとこ

る店舗は異なるが同一チェーンの焼肉店で
の喫食歴が判明し、原因食品は不明である
が保健所による立ち入り指導が行われた。
事例 No10, 11 は、再調査においても疫学
関連性の可能性を確認することはできな
かった。また、事例 No13, 14 は、2つの異
なる焼肉店での喫食歴が判明したが疫学関
連性は確認できなかった。

事例 No 3 は IS-printing 結果が No13,
14 と一致したが、PFGE 結果が異なり、発
生時期も異なっていた。

事例 No 1 は、M 県の焼肉店で喫食歴が
あり、感染研で実施された PFGE 結果のコ
メントにも M 県での集団事例で分離され
た菌株のパターンと一致したとのことであ
った。

D 考 察

O157 感染症の拡大防止の観点からすれ
ば、いかに迅速に菌株情報を還元し、それ
に基づき必要な再調査を行うかが重要で
ある。事例 No10, 11 のように発生時期及び
PFGE 結果から考えると疫学関連性のある
可能性は高いにもかかわらず疫学関連性が
全く確認できない事例があった。この原因
として患者同士の IS-printing 結果が相違
したため、情報の還元が遅れたことが考え
られた。この IS-printing 結果の相違は同
一のゲノム領域に存在するターゲットに由
来しておらず、この両株を近縁株であると
判断することは困難であった。今後、この
ような事例がどれくらいの頻度でおきるの
か、また、IS-printing のどのターゲットで
おきやすいのか、データの蓄積が必要であ
る。

一方、今回の試みにより IS-printing 解

析結果の迅速な情報還元は、地域の感染拡
大の初期探知に大変有効であるとの認識を
保健所、本庁の担当者間で共有することが
できた。

昨年度の報告書¹⁾で、多くの地研が
IS-printing System のスクリーニング検査
としての有用性を報告している。今後、
PFGE と並んで IS-printing System の全
国的なデータベースの作成と、リアルタイム
で各地研において活用できるシステムが
構築されれば、O157 感染症の広域事例の
初期探知にも大変有効であると考えられる。

E 結 論

IS-printing 解析結果を迅速に還元する
ことにより、当手法は O157 感染症の拡大
防止の初期探知に大変有効なツールである
との認識を保健所、本庁との担当者間で共
有することができた。しかしながら、疫学
関連性があるにも関わらず、IS-printing パ
ターンが一致せず情報還元が遅れた事例も
あり、今後の検討課題である。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 研究代表者 寺嶋淳：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
平成21年度 総括・分担研究報告書

表 H22年度に徳島県内で分離されたO157の疫学情報及び菌株情報について

事例No	疫学情報				病原体情報					
	管轄保健所	診断類型	診断月 (2010年)	備考 ^{注1)}	菌株NO	H型別	毒素型別	IS-printingコード ^{注2)}		感染研 PFGE Type No
								1st	2nd	
1	A	患者	5月	焼肉、生レバー、ささみ刺身(焼肉店)	602	7	VT2	345457	311652	c57
2	A	無症状	6月		604	7	VT2	105457	711642	f48
3	A	無症状	6月		605	7	VT1VT2	717577	611657	d239
4	A	患者	6月	焼き肉(ハラミ、生レバー、ホルモン)	606	7	VT1VT2	613177	210646	d482
5	A	患者	7月		607	7	VT1VT2	317157	611157	f128
	A	無症状	7月		608	7	VT1VT2	317157	611157	f128
	B	無症状	7月		609	7	VT1VT2	317157	611157	f128
6	C	患者	8月	馬刺し(焼肉店)	610	7	VT1VT2	317577	211757	f236
7	A	患者	8月	牛肉ステーキ(焼肉店)	611	7	VT1VT2	317577	211757	f236
8	A	患者	8月		612	7	VT1VT2	717555	611657	f239
9	D	患者	9月	牛ステーキ(焼肉店)	614	7	VT2	113157	600653	f423
10	A	患者	10月		615	7	VT1VT2	717057	231557	f570
11	A	患者	11月		616	7	VT1VT2	715057	211557	f570
	A	無症状	11月		617	7	VT1VT2	717057	231557	f570
	A	無症状	11月		618	7	VT1VT2	717057	231557	f570
12	A	患者	11月		620	-	VT1VT2	615457	301656	f567
	A	無症状	11月		621	-	VT1VT2	615457	301656	f567
13	A	患者	11月	焼き肉(焼肉店)or牛たたき	622	7	VT1VT2	717577	611657	f568
14	A	患者	12月	焼き肉(焼肉店)	623	7	VT1VT2	717577	611657	f568
15	A	患者	12月	牛肉・鶏肉の生食(居酒屋)	624	-	VT1VT2	615457	311656	f623

注1)聞き取り調査による発症前1週間以内の食肉の喫食状況

注2)中国四国ブロックで使用されている変換法に準じる

IS-printing System を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析

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

研究要旨

香川県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 について、集団発生 3 事例を含む 23 株を対象に、PFGE 法と IS-printing System(以下 IS 法)を実施した。3 事例の集団発生は、すべての株で IS コードが一致する結果となった。操作の簡便性、迅速性に優れた IS 法は、集団発生時の疫学解析に有用であり、全国的なデータベース化が期待される。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 について PFGE 法、および IS 法による分子疫学解析を試みた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 22 年に、香川県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の 23 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 3 事例 16 株、散発 7 事例 7 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(東洋紡)を用い、添付のプロトコールに準じて実施した。バンドの有無により 12 桁の数字に換算し IS コードとして表記した。

C. 研究結果

供試菌株の概要を表 1 に、また PFGE のデンドログラムを図 1 に示し

た。

集団 I は、昨年 8 月に発生した N 保育所での事例である。園児 2 名(No.6、7)から腸管出血性大腸菌 O157 の感染者が確定したため、全園児と職員、感染者の家族を対象として検便を実施した。その結果、3 名から O157 が検出された(No.8~10)。分子疫学解析の結果は PFGE 法、IS 法とも、全株で一致した。初発の患児(No.6)と家族(No.10)は生レバーの喫食があったため、推定食材は生レバーであると考えられた。

集団 II は T 保育所に通う姉妹(No.11、12)を含む家族内感染事例である。PFGE 法、IS 法ともに同一パターンとなり、また集団 I のパターンとも一致した。この時点では他の園児の検便は行わなかった。

集団 III は、集団 II の約 1 ヶ月後に再び T 保育所の園児 2 名(No.14、15)が発症した事例である。全園児と職員、感染者の家族を対象に検便を行った結果、両患児の家族計 6 名(No.16~21)の感染が確認された。この家族の中には別の幼稚園に通う園児(No.21)が含まれてい