

たため、感染者と同じクラスの園児についても検便を行ったが、すべて陰性であった。この集団Ⅲ事例においては、IS法はすべての株で集団Ⅰ、集団Ⅱと一致したが、PFGE法はNo.18のみ、バンド2本の相違を示した。

散発事例のNo.1～5、22、23はIS法、PFGE法ともにそれぞれ異なるパターンを示した。

D. 考察

以上、23株について検討した結果、散発の株はPFGE法、IS法ともに、パターンは明確に異なり、関連は無いものと考えられた。

集団ⅢのPFGE法は、No.18のみ、バンド2本の相違を示したが、3バンドの差までは、きわめて関連ありと解釈されるため、この株も同一起源であると判断した。

3事例の集団発生16株は、すべてISコードが一致し、かつPFGEパターンからも、同一起源であることが示唆された。T保育所とN保育所は20kmほど離れた場所にあるが、関連は不明である。感染研によると、今回の集団発生株のPFGEパターン(感染研Type No. c608)は2009年、2010年に全国各地で散発事例として報告されている。さらに、集団Ⅱと集団Ⅲは同一保育所に通う園児を含む発生であり、感染経路の判明が期待される事例であったが、疫学調査では原因の特定には至らなかった。

IS法は、コードで表記できるため、PFGE法に比べ施設間での比較が容易である。そのため、データベース化が進めば、今回のように全国で散発的に

見られる株であることも早期に知り得る。その反面、バンドの有無や位置を取り違えた場合などは、コードが変わってしまうため、他施設と比較する場合は精度管理が重要であると思われる。

E. 結論

香川県で分離された腸管出血性大腸菌O157の集団発生3事例を含む23株について、PFGE法とIS法で解析を行った。結果は3事例の集団発生株すべてが同一のISコードとなった。

IS法はPFGE法に比べ、識別能は同等か若干劣るものの簡便性、迅速性に優れている。今回の集団発生事例でも有用な結果が得られた。今後、全国的なデータベースの構築ができれば、スクリーニングとしての有効な活用が期待できる。

F. 研究発表

なし

表 1 供試菌株

No.	VT	IS コード		PFGE		分離日	年齢	関連	
		1st	2nd	香川県 Type	感染研 Type				
1	1&2	617577	211547	A	e 762	2009.12.28	21	散発	
2	1&2	317575	611257	B	e 756	2009.12.29	46	散発	
3	2	145047	303441	C	f 73	2010. 6.11	53	散発	
4	1&2	017175	601647	D	f 360	2010 . 7. 1	70	散発	
5	2	012057	214442	E	f 354	2010 . 8. 20	16	散発	
6	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 19	5	集団 I	N 保育所
7	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 23	5		
8	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 27	2		
9	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 27	4		
10	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 28	36		
11	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 26	2	集団 II	T 保育所
12	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 30	2		
13	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 8. 30	71		
14	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 21	3	集団 III	T 保育所
15	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 24	2		
16	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 25	38		
17	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 26	28		
18	1&2	717577	611657	F'	f 268	2010 . 9. 26	55		
19	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 26	82		
20	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 26	1		
21	1&2	717577	611657	F	c 608	2010 . 9. 28	5	No.14 の家族	
22	2	345457	311652	G	c 374	2010.10. 7	58	散発	
23	2	311557	710413	H	e 377	2010.10. 1	80	散発	

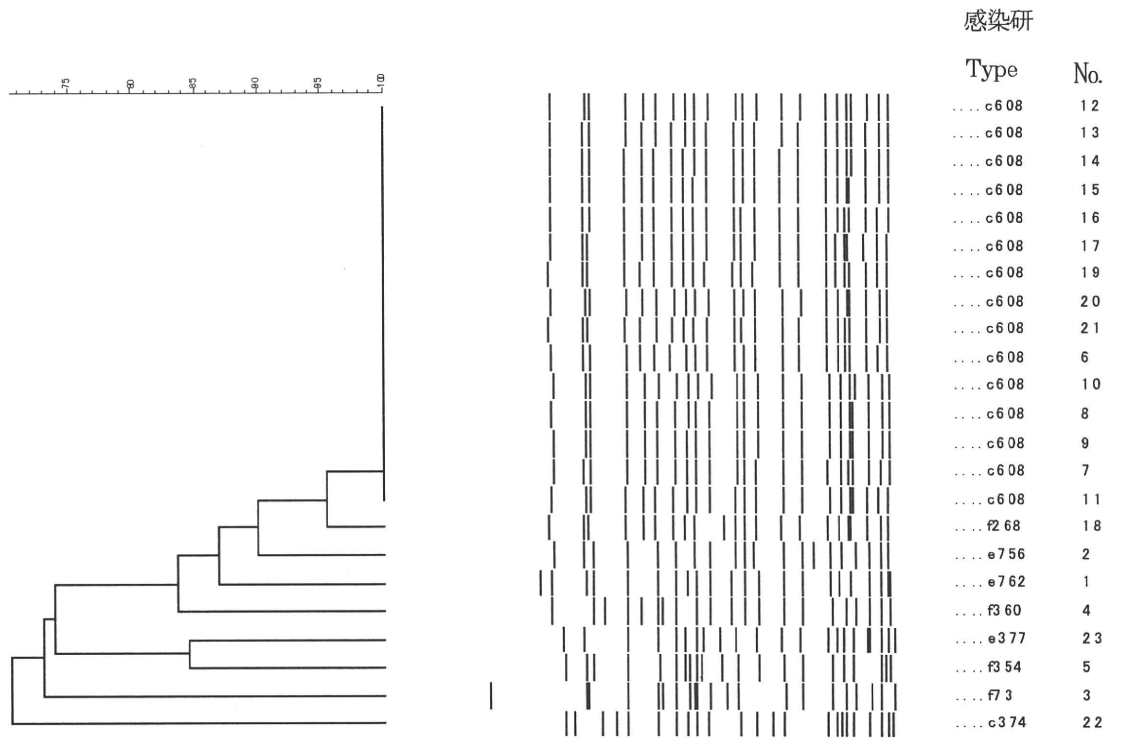


図1 PFGE デンドログラム

愛媛県内の保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O157 VT1 集団発生事例について

研究協力者 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

2010年、愛媛県内の保育園において腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 VT1による集団感染事例が発生した。本事例は発生当初、集団発生事例の可能性は低いと考えられていたが、IS-Printing System（以下、IS・P）及び PFGE 解析の結果、同一株による集団発生事例であることが判明した。また、本事例由来株は *stx2* 変異型(variant)である *stx2c* 遺伝子を保有し、*stx2* 遺伝子に IS629（Insertion Sequence の一種）の挿入が認められ、VT2 の産生が抑制された特異な EHEC 株であった。

迅速に分子疫学調査を実施し情報還元を行うことは、効果的な感染症対策を実施するために有益であると思われた。

A. 研究目的

2010年9月、県内の保育園において EHEC O157 VT1 による集団感染事例が発生した。感染症対策に資することを目的に、分子疫学調査法である IS・P 及び PFGE 解析を実施した。

さらに、本事例株は特異な毒素型別を示したことから、遺伝子解析を実施し、IS629 の挿入を確認した。

準拠して PCR を行い、遺伝子増幅を確認した。

stx variant 型別は、*stx2c*、*stx2d*、*stx2e*、*stx2f*、*stx2g* について PCR¹⁾¹¹⁾ を行い、遺伝子増幅の確認を行った。

stx 遺伝子領域の遺伝子解析は、*stx1* 及び *stx2* 遺伝子全領域について塩基配列を決定し、MEGA Ver3.1 を用いて解析を行い、GenBank に登録されている株と比較検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

保育園で発生した EHEC O157 VT1 集団発生事例由来株 12 株（患者 2 名、無症状病原体保有者 10 名）について解析を行った。

2. 検査方法

(1) 病原体検査

分離株の生化学的性状、O 抗原及び H 抗原の血清型別を実施するとともに、VTEC-RPLA「生研」を用いてベロ毒素（VT）の型別を行った。

stx 遺伝子の確認は、Paton らの報告¹⁾に

(2) 分子疫学

PFGE 及び IS-Printing System(東洋紡)を用いて遺伝子パターンを比較した。

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。

IS・P は、添付のプロトコールに準拠した。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

解析結果を表1に示した。

本事例由来株についてIS-Pを用いて解析を行ったところ、12株全てのISコードは305057-311457と一致していた。PFGE解析では、PFGEパターンがe498、e499、e500、e501、e502と5パターンに分かれたが、全て2バンド以内の違いであり(図1)、同一株による集団発生事例であることが示唆された¹²⁾。

RPLAによる毒素産生試験ではVT1陽性、VT2陰性であったが、PCRによる遺伝子検査では*stx1*、*stx2*陽性であった(図2-a)。*stx2* variant型別を実施したところ、1株は型別不能、残り11株は*stx2c*のプライマーセットで明瞭なバンドが確認されたものの、増幅塩基長は通常より1000bp程度長い1500bp位置に確認された(図2-b)。そこで*stx2*遺伝子全領域の塩基配列を決定した結果、*stx2*遺伝子領域のAサブユニットの末端付近にIS-PIS629が挿入されていることが判明した(図3)。

D 考察

今回の事例は、同一保育園の園児2名が1両日中に胃腸炎症状を呈し、医療機関による検便検査の結果、EHEC O157 VT1が共に検出された。疫学調査の結果、他に胃腸炎症状を訴える園児や職員はおらず、患児は別のクラスで保育されており直接的な接触がなかったことから、各家庭で感染した可能性が高いと判断されていた。しかし、当所に搬入された患者由来株2株についてIS-P解析を実施したところ、ISコードが一致し、同一株による感染である可能性が

示唆されたため、管轄保健所へ迅速に情報提供を行った。管轄保健所ではこれらの情報を受け、保育施設内における集団発生の可能性を視野に、原因究明及び接触者検診が行われ、保育園児9名を含む10名の患者が確認された。この患者由来株10株について分子疫学調査を行ったところ、全てのISコードが初発患者由来株と一致し、保育所内の集団発生事例であることが確認された。分子疫学調査に活用されるIS-Pは、PFGE解析に比べ、解析能力はやや劣るものの、迅速性、簡便性において優れており、事例発生時のスクリーニング的な利用が有効であることは既に報告されている。今回の事例においても、初発患者由来株2株のISコードが一致し、集団発生事例を念頭に置いた感染予防対策が行われ、感染拡大防止の一助となったことから、IS-P解析の有用性が確認された。さらに、本事例由来株のPFGEパターンは2バンド以内の違いであり、同一株による集団感染事例であることが確認されたが、その後の疫学調査では感染源は判明していない。

今回解析した集団発生事例由来株は、PCRにより、*stx1*、*stx2*陽性株であり、*stx2* variant型別試験によって*stx2c*遺伝子を保有していることが確認された。EHECの毒素型には、*stx1*群で*stx1*、*stx1c*、*stx1d*、*stx2*群で*stx2*、*2c*、*2d*、*2e*、*2f*、*2g*の変異型がある。*stx2*変異型は、通常の*stx2*に比べ毒素活性が低いものの、*stx2c*は*stx1*と同程度の毒素活性を持つと報告されている。伊豫田らの報告¹³⁾では、ヒト由来EHEC株の24%が*stx2c*で占められているとされており、北川ら¹⁴⁾はヒト由来EHECの16.5%が*stx2*変異型であると報告している。また、県内で平成19年以降のRPLAと遺伝子検査結果が異なったEHEC5株について、

stx2 variant 型別を実施したところ、*stx2c* 3株、*stx2d* 1株と、4株が *stx2* 変異型であったことから、県内においても *stx2c* が一定の割合を占めていることが示唆された。さらに、病原微生物検出情報¹⁵⁾によると、2009年にヒト由来株の EHEC O157 1,402株のうち、VT1&2株が69.2%、VT2単独株が29.5%を占めており、VT1単独株は18株(1.3%)の報告に留まっている。以上のことから、血清型 O157 では、RPLAによりVT1単独株を分離した場合には、*stx2* 変異型の可能性を視野に入れ、遺伝子検査を行う必要があると思われた。

また、本事例由来株は遺伝子解析の結果、*stx2c* 遺伝子に IS が挿入されている特異な菌株であったことも判明した。IS629は大腸菌ゲノム中に複数存在し(堺株では28コピー)、株によって挿入数や挿入場所が異なるため、この多様性を疫学調査に活用する方法が IS-Printing法の原理となっている。今回の株は、*stx2* 遺伝子内に IS が挿入されたことにより、VT2産生能が損なわれていると考えられる。しかしながら、感染症法における EHEC 感染症の届出基準では、分離株の「毒素産生の確認」及び「毒素遺伝子の検出」のいずれかとなっている。今回のような事例は極めて稀なケースと考えられるが、EHECの毒素型の判定には、免疫学的方法(RPLA、IC)と遺伝子検査法の結果を総合的に判断するとともに、PCR法を行う際には用いるプライマーの特性を十分に把握しておく必要があると思われた。

E 結論

1. 分子疫学調査の手法である IS-P は、迅速性に優れ、有益な解析方法と思われた。
2. 菌株解析結果を慎重に判断するとともに、得られた情報を迅速に行政側へ還元す

ることは有益である。

3. 集団発生事例由来株 12株について遺伝子解析を行った結果、11株は *stx2c* であり、さらに *stx2* 遺伝子に IS629 が挿入された特異な菌株であることが判明した。
4. EHECの毒素型判定については、免疫学的方法(RPLA、IC)と遺伝子検査法の結果を総合的に判断する必要があると思われた。

F. 研究発表 なし

G. 参考文献

- 1) Paton AW et al.: J Clin Microbiol. 36, 598-602 (1998)
- 2) Kimata K et al.: Microbiol Immunol. 49, 485-492 (2005)
- 3) Lin et al.: Microbiol. Immunol. 37, 543-548 (1993)
- 4) Paton AW et al.: Gene. 153, 71-74 (1995)
- 5) Kobayashi et al: 食品と微生物. 9, 77-88 (1992)
- 6) Paton AW et al.: J Clin Microbiol. 36, 598-602 (1998)
- 7) Lee JE et al.: BMC Microbiol. 7, 109 (2007)
- 8) Nakao H et al.: FEMS Immunol Med Microbiol.
- 9) Wang G et al.: J Clin Microbiol. 40, 3613-3619 (2002)
- 10) Beutin L et al.: Appl Environ Microbiol. 73, 4769-75 (2007)
- 11) Friedrich AW et al.: J Infect. 185, 74-84(2002)
- 12) Tenover FC et al. J Clin Microbiol. 33, 2233-2239 (1995)

13) 伊豫田淳他: 腸管出血性大腸菌の病原性評価, 分担研究報告書, 食品安全委員会食品健康影響評価技術研究 (2009)

14) 北川恵美子他: 石川県保健環境センター研究報告書. 46, 1-8 (2009)

15) 病原微生物検出情報: <http://idsc.nih.go.jp/>

表 1 EHEC 解析結果

患者No.	届出月日	患者分類	血清型		VT型別 *	stx1,2**	stx2 variant type	PFGE型	IS-Pコード
			O	H					
1	9/3	患者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
2	9/8	患者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f502	305057-311457
3	9/12	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f500	305057-311457
4	9/13	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
5	9/13	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
6	9/13	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
7	9/14	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
8	9/17	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f498	305057-311457
9	9/17	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
10	9/18	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457
11	9/18	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	untyped	f499	305057-311457
12	9/24	無症状者	157	7	VT1	stx1 & stx2	stx2c	f501	305057-311457

* RPLA法により確認

**PCR法により確認

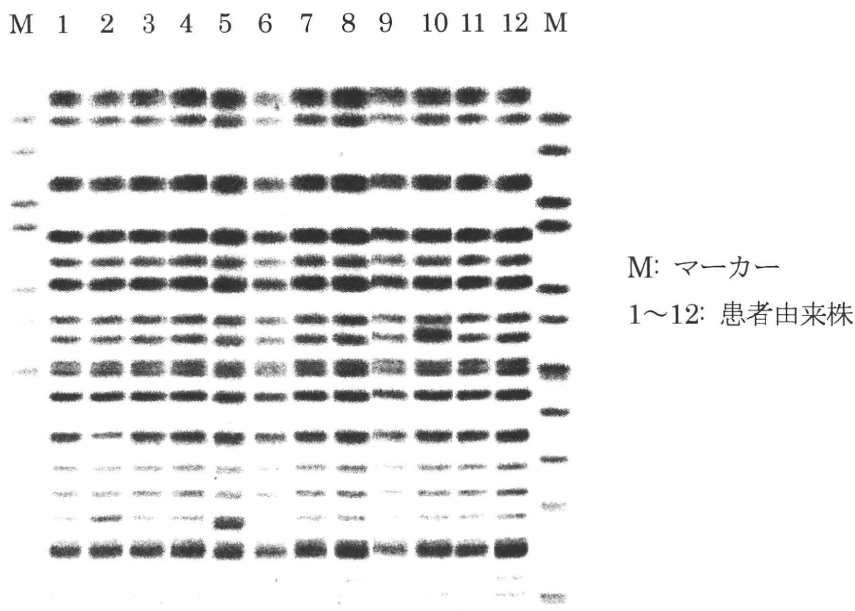
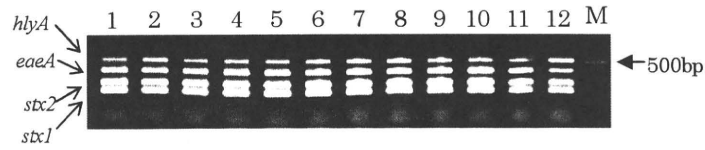


図 1 EHEC O157 集団発生事例 PFGE 結果

(a) *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA* Multiplex-PCR⁶⁾



(b) *stx2c* PCR⁸⁾

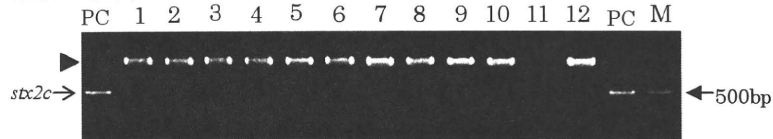


図 2 PCR 結果

(a): *stx2* は図 2-5 に示すプライマーを用いた結果。全ての株に *stx2* 遺伝子領域の増幅を認める。
 (b): *stx2c* は図 2-6 のプライマーを用いた結果。No.11 株は型別不能。*stx2c* 株では、通常 474bp に増幅を認めるが、今回の事例由来株 (No.15 以外) 株は 1000bp 以上長い位置に明瞭な増幅バンドを認めた。

No.	Target	文献	PCR結果	
			No.11 以外の株	No.11
1	<i>stx2</i> 全長	7)	+	-
2	<i>stx2</i> (変異型全て)	3)	/	-
3	<i>stx2</i>	5)	+	+
4	<i>stx2c</i>	9)	+	-
5	<i>stx2</i>	6)	+	+
6	<i>stx2c</i>	8)	+	-

図 3 *stx2* 遺伝子解析に使用したプライマーの増幅領域と解析結果

腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例での分子疫学的解析

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

研究要旨

2010年8月4日から17日に腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT1&2 陽性)感染症発生について9例の届出があった。これらの事例について調査したところ、最後に報告のあった1例を除いた8例が、同系列の焼肉店を利用していたことが判明した。原因菌が同一由来である可能性が考えられたので、これらの分離株についてパルスフィールドゲル電気泳動(以下 PFGE)による遺伝子解析を実施したところ、PFGE パターンがほぼ一致した。あわせて実施した IS-printing System による IS パターンも一致した。

A. 研究目的

2010年8月、医療機関からの腸管出血性大腸菌 O157 感染症発生届出が相次いだ。調査により、9例中8例が同系列焼肉店の異なる3店舗で喫食していたことが判明した。そこで、感染源の特定や分離株の関連性を調べるため、PFGEによる分子疫学解析を実施した。また、IS-printing System による遺伝子解析もあわせておこなった。残る1例には、同系列店の利用は確認されなかったが、同時期の発生であるため、同時に解析を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

2010年8月に腸管出血性大腸菌 O157 感染症患者・無症状病原体保有者9人から分離された9株を使用した。

2. 研究方法

(1) 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。

(2) 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。

C. 研究結果

1. 事例の概要

2010年8月に届け出られた6グループ9例(表1)の保健所による調査の結果は以下の通りであった。9例中8例(患者 No.1~8)が同系列焼肉店の異なる3店舗で喫食していた。また、それらの店舗では、食肉の一部はまとめて仕入れたものを細切して分配、提供していた。喫食グループ G3 では、No.3 は焼肉店の利用はしているが、肉の喫食はほとんどしていなかった。No.4 は発症の遅れから、No.3 からの感染が疑われた。G4 の3名は同居家族であり、No.6,7 の発

症時期が遅れていたため、No.5からの感染であると思われた。No.9には、同系列店の利用は確認されなかった。

2. 遺伝子型の比較

患者9名のO157分離株のPFGE結果を図1に示す。9株のうち、1株(No.4)を除く8株はほぼ同じパターンであった。No.7は他の7株との一致率が99.33%であったが、これはバンド読み取り時の誤差と思われる。No.4は他の株とバンド3本の位置の違いが見られた(一致率93.03%)。

一方、IS-printing Systemの結果は図2および表2に示すように9名全員が同じIDコード番号「713577・231757」となった。

以上の疫学調査、PFGE法およびIS-printing systemの結果から、患者No1から8までは感染源が同一である可能性が強く示唆された。しかし、喫食メニューや喫食日および発症日が異なることなどから、

集団食中毒事件と断定するまでには至らず、該当焼肉店には保健所より指導が行われた。

D 考察

今回の事例では、行政区が異なっていたことも影響し、食中毒とするに十分な疫学調査の裏づけがとれなかったが、同一感染源が強く疑われたため、遺伝子解析を行うことにより疫学調査の結果を補強し、保健所による指導の根拠とすることができた。

今回の遺伝子解析の結果では、G3の2株中1株が他の株とPFGE法で3バンド違いであったが、IS-printing Systemでは9株すべてが同じISコードとなるなど、両者の結果が一致しない部分があった。

しかし、PFGEやIS-printing Systemのような遺伝子解析法は、散发例であるが疫学的関連が疑われる場合などにおいて、疫学調査の結果を補強あるいは裏付けるものとして非常に有用であると思われる。

表1 喫食グループ別による使用菌株とIS-Printing ID, PFGE型

グループ	患者No.	年齢(歳)	性別	喫食店	毒素型	IS-printing system		PFGE型 (感染研)
						1st set	2nd set	
G1	1	12	男	A店	VT1&2	713577	231757	b864
G2	2	33	男	A店	VT1&2	713577	231757	b864
G3	3	21	女	B店	VT1&2	713577	231757	b864
	4	21	男		VT1&2	713577	231757	f271
G4	5	3	女	C店	VT1&2	713577	231757	b864
	6	28	女		VT1&2	713577	231757	b864
	7	3	女		VT1&2	713577	231757	b864
G5	8	7	女	B店	VT1&2	713577	231757	b864
G6	9	3	男	—	VT1&2	713577	231757	b864

図1 PFGE 系統樹

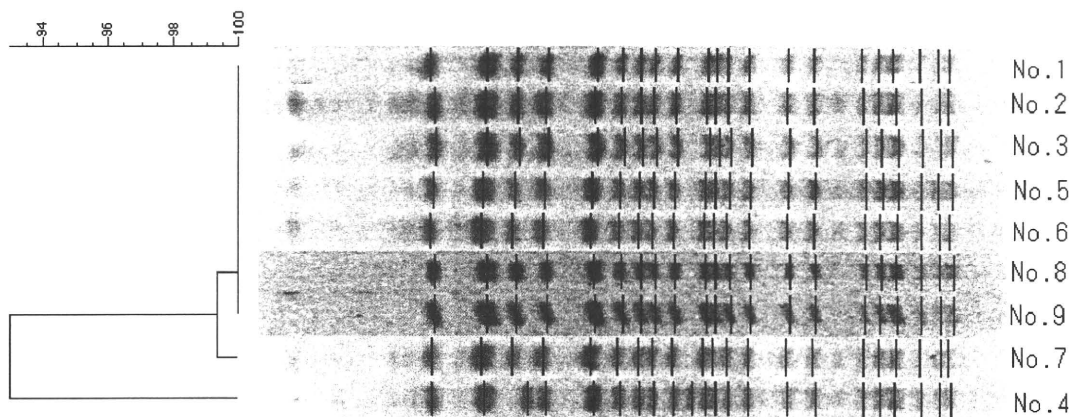


図2 IS-printing System 泳動像

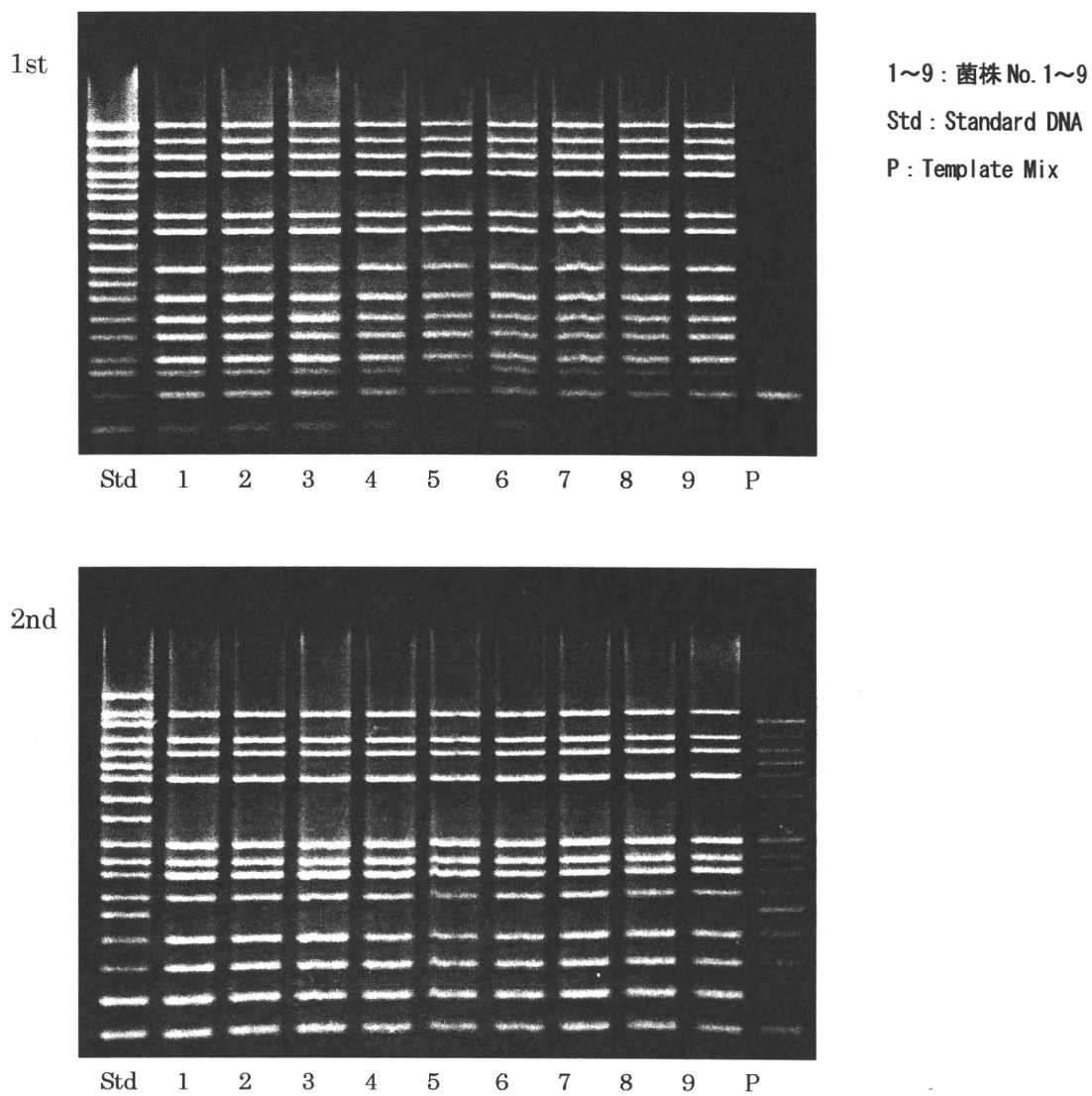


表2 IS-printing System 結果

IS-printing system検査結果																				
菌株No	1st primer set																1st primer code	2nd primer code		
1	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
2	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
3	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
4	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
5	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
6	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
7	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
8	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		
9	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	eae	16	hlyA	713577	231757
	2nd primer set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1		

クレード解析でクレード 8 と判定された O157 菌株の IS-printing、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析

研究協力者 山口県環境保健センター
富永 潔 矢端 順子 亀山 光博

研究要旨

1998 年～2010 年に山口県内で分離された O157 菌株のうち 149 株について、クレード解析を実施し、高病原性株と推測されているクレード 8 と判定された 16 株について、IS-printing 法ならびにパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)により解析した。その結果、IS-printing のプロファイルは 305455-711642 が 6 株、305457-711242 が 2 株、345457-311652 が 2 株、305457-611642、305457-611442、305455-711242、305447-711242、105457-711642、145057-311252 が各々 1 株で、9 種類のプロファイルが認められたものの、それらには顕著な差異は認められず、類似したプロファイルであった。

一方、PFGE では、パターンは大きく 4 つのクラスターを形成し、2 株を除いた 14 株が属する 4 つのクラスターの類似性は、約 89% と高い値であったことから、クレード 8 と判定された菌株の遺伝子型にはある程度の類似性があることが推測された。

以上の結果から、分離された O157 菌株を IS-printing 解析し特定のプロファイル(1 st =3/1-0/4-5-4/0-5/4-5/7 2 nd =7/3/6-1-1-6/2/4-4/5-2)を示す株がある場合、その株はクレード 8 である可能性が推測された。今後、多数の菌株についてのデータを収集し検討することにより、迅速性に優れる IS-printing 法は、本来の目的である遺伝子型別と同時に、高病原性株と推測されている O157 クレード 8 をスクリーニングする方法の一つとしても利用出来る可能性が示唆された。

A. 研究目的

IS-printing 法による O157 菌株の遺伝子解析を実施すると同時にその菌株が高病原性株と推測されているクレード 8 に属する株であるかどうかの推測を行うことが可能か否かを検討する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

クレード解析に使用した菌株は、1998 年の山口県では初めての特別養護老人ホームでの O157 集団発生事例由来 6 株(患者:3 株、原因食品:1 株、同時期に発生した T 市の散発 2 事例各 1 株)の他、分離菌株 142 株(2004 年:26

株、2005 年:17 株、2006 年:11 株、2007 年:24 株、2008 年:20 株、2009 年:23 株、2010 年 21 株)、並びに環境由来株として、と畜場搬入牛第一胃内容物由来 1 株、総計 149 株である。

2. 解析方法

(1) クレード解析方法

菌株からの DNA 抽出は、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従って実施した。抽出 DNA は PCR を実施するまで 20°C に保存した。

クレード解析用プライマーは、伊豫田の

設計した、クレード 8 に特異的な SNP の検出が行える 2357-F3(forward) と 539A-R(reverse)、その他のクレード検出には 2357-F3(forward) と 539C-R(reverse) の、それぞれのプライマーセットを使用し、20 μ l の系で PCR を行い、539A-R プライマーで 222bp の増幅産物が認められた場合クレード 8 と判定し、539C-R プライマーで 222bp の増幅産物が認められた場合、その他のクレードと判定した。

(2) IS-printing 解析方法

テンプレート DNA は、クレード解析に用いたものを使用した。

PCR は市販キット 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 \times 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 2 pluse(タカラバイオ)で 100V 75 分間泳動した。泳動終了後、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーターで観察した。解析は、1st set, 2nd set とともに陽性コントロールに含まれる 18 本のバンドの増幅の有無を調べ、有りの場合は 1、無しの場合は 0 をカウントして 18 桁の数字の列を作成し、それを始めから 3 つずつ区切り 6 グループとし、1 グループの 3 つの数字について順に 1、2、4 の数値を与え、元の数字が 1 ならそれに与えた数値をカウントし、0 ならカウントせずとして、それぞれのグループごとに合計の数値をもとめ、他の 5 グループについても同様な計算を行い 6 桁の数値を算出し、IS-printing 法のプロファイルとした。

(3) PFGE 解析方法

厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染

症研究事業「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」平成 15～17 年度総括・総合研究報告書(主任研究者 寺嶋 淳)に記載されている九州ブロックマニュアルに従って PFGE を実施した。制限酵素は、*Xba* I (Roche 社製)を用いた。解析は、Gel Doc2000(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社ライフサイエンスグループ)を用いて画像を処理し、Molecular Analyst Finger printing PLUS ver3(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社, 2000/6/1 製)により UPGMA 法による系統樹作成を行った。

C. 研究結果

1. クレード解析結果

1998 年の集団発生事例(Tab)および 2004 年度～2010 年度の 6 年間に解析を行った菌株数とクレード 8 と判定された菌株数を表-1 に示す。149 株検査を行い 16 株がクレード 8 と判定された。その内、1998 年 Tab 事例では、供試した患者 3 名由来 3 株、原因食品(サラダ)由来 1 株、事例とは疫学的に無関係の 2 名の散発患者(2 事例)由来 2 株、計 6 株すべてがクレード 8 と判定された。この事例では 3 名が死亡しているが、いずれも溶血性尿毒症症候群を発症していた。一方、6 年間の分離菌株の内、各年度概ね 10～20 数株を検査した結果、2008 年度を除く各年度において、1～3 株がクレード 8 と判定された。2010 年度に牛の第一胃内容物から分離された株はクレード 8 ではなかった。また、クレード 8 と判定された 16 株のペロ毒素型はすべて 2 型であった。

2. IS-printing 解析結果

(1) クレード 8 と判定された菌株の IS-printing プロファイル

図-1～2 に 1 st primer set による増幅産物の電気泳動像、図-3～4 に 2nd primer set に

よる増幅産物の電気泳動像を、またこれを解析し求めた、IS-printing プロファイルを表-2~4に示した。

1 st primer set による IS-printing プロファイルは 6 種類認められ、その内 305455 が 7 株(43.75%)と最も多く、次いで 305457 が 4 株(25.0%)、345457 が 2 株(12.5%)でこれら 3 種類で全体の 81.25%と大半を占めた。その他、305447、105457、145057 が各 1 株ずつ認められた。一方、2 nd primer set によるプロファイルも 6 種類認められ、その内 711642 が 7 株(43.75%)と最も多く、次いで 711242 が 4 株(25.0%)、311652 が 2 株(12.5%)で、これら 3 種類で全体の 81.25%と、1 st set と全く同様の値で大半を占めていた。その他、611642、611442、311252 が各 1 株ずつ認められた。

1 st set および 2 nd set primer のプロファイルを連結した総合プロファイルを表-4に示した。総合プロファイルは 9 種類認められ、その内訳は集団発生事例由来株 (Tab-1~3,110) 及び同時期の無関係散発 2 事例 T98-42,43 の 305455-711642 が 6 株(33.3%)と最も多く、次いで家族内感染事例 (07Y31,32) の 345457-311652 が 2 株(12.5%)、および年代が異なり無関係であるが同一市内の散発 2 事例 (09Y22,10Y25) の 305457-711242 が 2 株(12.5%)、これらを合計すると 62.5%と過半数を占めた。

その他には、305455-711242(06Y28),305457-611642(04Y37),305457-611442(04Y49),305447-711242(10Y05),105457-711642(04Y15),145057-311252(05Y59)が各 1 株ずつ認められた。このようにクレード 8 菌株の IS-printing のプロファイルは、9 種類のパターンがあるものの、そのプロファイルには類似性があることが示唆された。そこで、各 primer set での増幅の

有無が全ての株に共通している部位がどれくらい存在するかを調べた。その結果、表-2 の 1 st primer set では黄色、表-3 の 2 nd primer set では黄褐色で示すように、1 st では全体の 72.2%に当たる 13 ヶ所、2 nd では全体の 77.8%に当たる 14 ヶ所の共通部位が存在し、全体では 75%(27/36 部位)が共通していることが確認された。

なお、IS-printing 法による O157 菌株の遺伝子解析を開始した平成 20 年度以降に検査した 94 株のプロファイルを表-5に示した。クレード 8 株と判定された 3 株を除き、他の 91 株においては、今回認められたクレード 8 株と同一のプロファイルを示した株は 1 株も認められなかった。

(2) PFGE 解析結果

16 菌株について *Xba*I を用いて PFGE 解析を行い、作成した系統樹を図-5に、各株間の相同性の値(%)を図-6に示した。16 菌株中 14 菌株が下記の 4 つのクラスターに分けられた。

クラスター I: 2004 年度の散発事例由来 2 株(04Y37、49)

クラスター II: 1998 年の集団発生事例 (Tab)由来の 4 株(Tab-1、2、3、110)ならびに同時期に集団発生地域近郊の T 市で発生した 2 事例の散発患者由来 2 株(T98-42、43)の計 6 株

クラスター III: 2007 年度の散発事例(家族内感染)由来 2 株(07Y31、32)

クラスター IV: 2009 年度散発事例由来 1 株 (09Y22)、2010 年度散発事例由来 2 株(10Y05、25)、2006 年度散発事例由来 1 株(06Y28)

これら 4 つのクラスターのうち、クラスター I、II、III に属する菌株の各々は、100% の相同性(similarity)を示し、同一起源と考えられた。クラスター I と II とは約 97%、これらとクラスター III とは約 91%、これらとクラスター IV とは約 89% の相同性を示し、4 つの

クラスターに属する 14 株の遺伝的相同性は概ね高いものと考えられた。残りの 2 株のうち 2004 年度散発事例由来 1 株(04Y15)とクラスター I～IV とは約 82%、これと 2005 年散発事例由来 1 株(05Y59)との相同性は約 77% で、これら 2 菌株は、クラスター I～IV との遺伝的相同性はやや低いと考えられた。

D 考 察

近年、アメリカ合衆国の研究者らによって 96 遺伝子座の一塩基置換(SNPs)に基づいた腸管出血性大腸菌 O157:H7 の遺伝系統解析法(クレード解析)が開発され、2006 年にアメリカ合衆国で発生したハウレン草やレタスの喫食に関連した O157:H7 の集団発生事例について遺伝系統解析した結果、これらの株は、これまでの集団事例由来株とは異なる遺伝系統であるクレード 8 に属することが明らかにされた。このハウレン草とレタス関連の集団発生における溶血性尿毒症症候群(HUS)の発症率が、ハウレン草で 15%、レタスで 11% と、通常事例における 1～5% に対してきわめて高いことが注目され、クレード 8 に属する原因株は、高病原性の O157:H7 株であることが推測されている¹⁾。

わが国において分離された O157:H7 菌株におけるクレード 8 の分布状況について、伊豫田らは、2004 年～2008 年に国内で分離された O157:H7 のうち HUS 患者由来 144 株と無症状保菌者由来株 150 株についてクレード解析を行った結果、クレード 8 は HUS 患者由来株に有意に多く存在していること、さらに過去に発生した特定の集団発生²⁾由来株がクレード 8 に属していたことを報告している³⁾。このように、O157:H7 感染症において、クレード 8 は重症化症例に関与する可能性が推測されていることから、分離した O157:H7 菌株がクレード 8 に属するか否かを判定する

ことは、患者の容体の変化を推定するためにも重要であると考えられる。現在、クレード解析は、伊豫田が設計した primer set を用いた PCR 法により実施されている⁴⁾が、特に集団発生等では種々の由来の菌株についての遺伝子型別を通常実施するため、遺伝子型別と同時に、分離菌株がクレード 8 であるかどうかを推察できれば、より効率化が図れると考えられる。

そこで、今回、1998 年～2010 年に山口県で分離され、クレード解析によりクレード 8 と判定された 16 株(すべて O157:H7 VT2 型)について、O157 菌株の遺伝子型別に使用される IS-printing 法による解析を試みた結果、9 種類のプロファイルが認められた。これらのプロファイルは、すべて同一ではないものの非常に類似した傾向が認められ、しかも IS-printing 法により遺伝子型別を実施したクレード 8 以外の菌株 91 株中に同一のプロファイルを示す株は全く認められなかったことから、クレード 8 を IS-printing 法で解析すれば、類似した特有のプロファイルが得られることが推察された。このことから、クレード 8 に属する O157:H7 の遺伝子型に類似性があることが示唆された。

そこで、PFGE 解析を行って系統樹を作成し 16 株の遺伝子型の相違を検討した結果、2 株を除く 14 株において 4 つのクラスターが形成され、その相同性は約 89% と高くこれらの遺伝子型に類似性が認められた。一方、他の 2 株はこれらのクラスターとの相同性は約 82%、約 77% と若干低かったが、総体的にみて、供試した 16 菌株は分離年度、由来が全く異なるにもかかわらず、それらの PFGE パターンにはきわめて大きな違いは認められなかったと考えられ、今回供試したクレード 8 の多くが、類似した遺伝子型であることが示唆された。

以上より、O157:H7をIS-printing法により遺伝子型別し、今回の研究で得られた、数種類の特有なプロファイルが認められた場合、その菌株がクレード8に属する可能性があることを推察できることが示唆された。

今後、広域から採取された多数のクレード8についてデータを収集し、さらに詳細に検討することが必要である。

E 結論

1. 1998年～2010年に山口県内で分離されたO157菌株のうち149株について、クレード解析を実施し、高病原性株と推測されているクレード8と判定された16株について、IS-printing法により解析した。その結果、IS-printingのプロファイルは305455-711642が6株、305457-711242が2株、345457-311652が2株、305455-711242、305447-711242、305457-611642、305457-611442、105457-711642、145057-311252が各々1株で、9種類のプロファイルが認められものの、それらには顕著な差異は認められず、類似したプロファイルであった。

一方、PFGEでは、パターンは大きく4つのクラスターを形成し、2株を除いた14株が属する4つのクラスターの類似性は、約89%と高い値であったことから、クレード8と判定された菌株の遺伝子型にはある程度の類似性があることが推測された。

2. 分離されたO157菌株をIS-printing

解析し特定のプロファイル(1st=3/1-0/4-5-4/0-5/4-5/7 2nd=7/3/6-1-1-6/2/4-4/5-2)を示す株がある場合、その株はクレード8である可能性が推測された。

3. 多数の菌株についてのデータを収集し検討することにより、迅速性に優れるIS-printing法は、本来の目的である遺伝子型別と同時に、高病原性株と推測されているO157クレード8をスクリーニングする方法の一つとしても利用出来る可能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Shannon D. Manning, Alifiya S. Motiwala, A. Cody Springman, et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. 105 4868-4873, (2008)
- 2) 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科: 学生食堂で発生した腸管出血性大腸菌O157による大規模食中毒事例, 病原微生物検出情報, 29, 120-121 (2008)
- 3) 伊豫田 淳, 寺嶋 淳, 泉谷秀昌ほか: 第92回日本細菌学会関東支部総会講演抄録集, 38 (2009)
- 4) 厚生労働省健康局結核感染症課、国立感染症研究所: 平成21年度希少感染症診断技術研修会資料, 11 (2010)

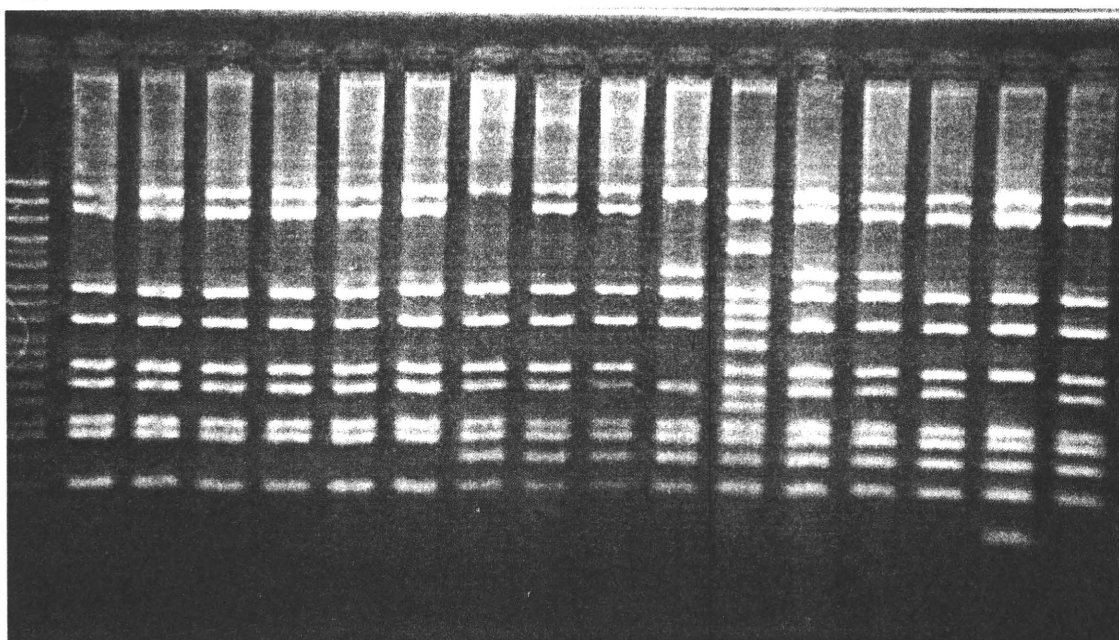
表-1 クレード解析実施年度、検査株数ならびにクレード8菌株数

年 度	検査株数	クレード8菌株数
1998年(平成10年)	6	6*
2004年(平成16年)	26	3
2005年(平成17年)	17	1
2006年(平成18年)	11	1
2007年(平成19年)	24	2(1事例、家族感染)
2008年(平成20年)	20	0
2009年(平成21年)	23	1
2010年(平成22年)	22	2
	149	16

*特別養護老人ホーム集団発生事例[菌陽性患者数27名]

クレード8菌株の内訳:患者3名、原因食品1検体、施設とは無関係の
散発2事例2名

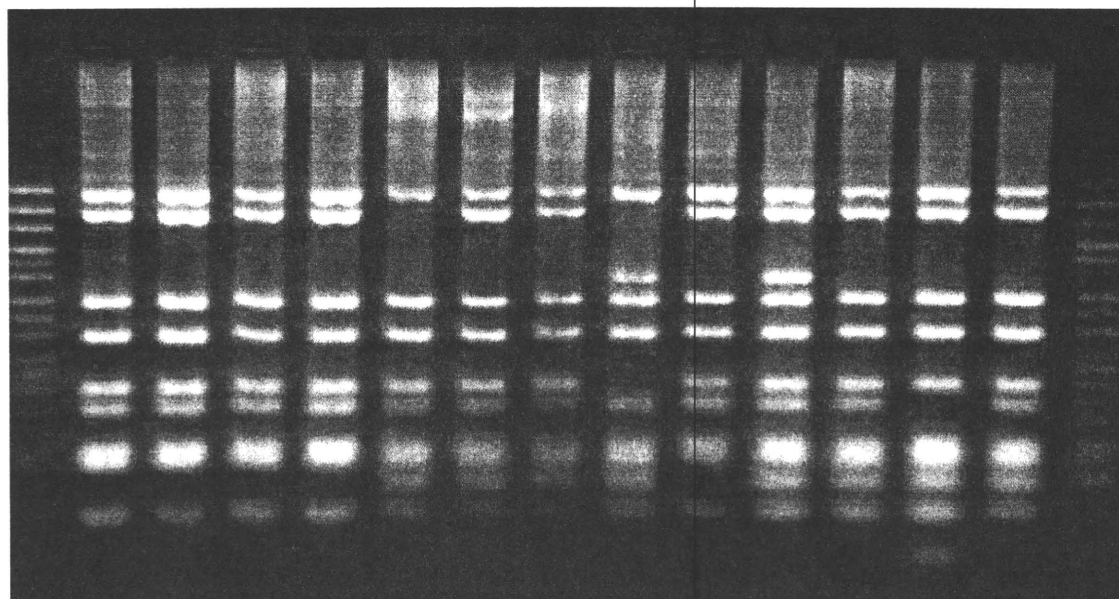
図-1 IS-printing 1 st primer set 泳動像-1(16 株のクレード 8 菌株、内 #はクレード 8 ではない)



1:Tab-1 2:Tab-2 3:Tab-3 4:Tab-110 5:T98-42 6:T98-43 7:04Y15 8:04Y37
 9:04Y49 10:05Y59 #:clade8 でない株 12:07Y31 13:07Y32 14:09Y22
 15:10Y05 16:10Y25

図-2 IS-printing 1 st primer set 泳動像-2(泳動像-1 の代表株及びクレード 8 のNo.11 の泳動像)

std	1	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	PC



11:06Y28、他は上図(1 st primer set 泳動像-1)の菌株No.と同一株