

進める中で、一部の株について PFGE 画像を交換し、同一パターンであることを確認したが、その後の調査で、30 株は感染研 PFGE タイプ (TN) f93 であることが判明した。TN f93 を示す株は、2010 年 6-7 月に名古屋市中で発生したレバーを推定原因食品とする食中毒事例のほか、愛知県内の複数の焼き肉店関連事例から分離されている (病原微生物検出情報、2011)。今回近畿ブロックで発生した事例については、食肉類の喫食が明らかな症例はほとんどなく、感染源は不明であるが、7 月中旬-下旬に流通した食品による diffuse outbreak である可能性が考えられた。タイプ B は長期間にわたって分離され、わかっている範囲で TN は 10 タイプに分かれたが、第 29-32 週に 6 施設で発生した 19 株は TN c272 で一致しており、何らかの関連性が疑われた。

calde 8 は他の clade に比べて HUS 発症率が高いことから、O157 分離後直ちに判定できれば、患者の経過観察や接触者調査に注意を促すことができる。MAMA-PCR 法を用いた clade 解析はアニーリング温度が高く、毒素遺伝子や付着因子を検出する PCR 法との同時実施は難しいと考えられる。IS 法は、マルチプレックス PCR 法を応用した O157 の遺伝子型別法であるが、毒素遺伝子の型別と腸管上皮細胞への付着に関与するインチミン遺伝子の検出も同時に行える。clade 8 株に限られた IS 型を示すことから、近畿 IS データベースは clade 8 の探知にも有用であると言える。

このように、近畿 IS データベースは多発する EHEC O157 の関連性や重症化の可能性

を探知できるが、リアルタイムに情報を得るため、各施設で分離株を迅速に収集し、IS 型別を実施して登録することが重要である。特定病原体の収集には様々な制約があるが、型別結果を行政に還元することで行政の理解と協力を得られるよう取り組むべきである。

PFGE 法については、昨年度まで EHEC O157 を使用した精度管理を継続し、高い近似度が得られていたが、今年度の供試菌株である O26 は、サイズの近いバンドが多く、画像や解析者によってバンド認識のばらつきが大きい結果となった。施設 2 の画像はコントラストがやや不明瞭で、A 解析者の判定では 5 株中 2 株が同一株のクラスターからはずれていた。後日、施設 2 では電気泳動装置の故障が明らかになり、装置の維持管理の重要性を再認識する結果となった。また、D 解析者の判定では、施設 1 や施設 4 の画像が同一株のクラスターからはずれており、200-300kb にバンドが多く、しかもその一部が太いことが影響したと考えられる。

施設 11 では、精度管理株を再分離した場合と継代培養のみ実施した場合とを同時に電気泳動したが、両者の泳動パターンが 100%一致したのは、A 解析者と C 解析者における菌株 6 のバンド認識のみであった。

「PFGE New Protocol-Kinki」では、ゲルブロック作製時の前培養を TSB での一夜培養に統一しているが、再分離実施の有無については定めていない。限られた菌株数での結果で、O26 が O157 よりも変異しやすい、あるいは今回の供試菌株が変異しやすいとの

結論は早計であるが、保育園での O26 集団事例で、二次感染したと考えられる患者家族由来株が最大 7 本異なるパターンを示したことも報告されており（日本感染症学会中日本地方会、2000）、今後の検討課題である。

MLVA 法については、昨年度の結果より各施設間で増幅産物の分子量を比較する場合、共通のサイズマーカーでの解析が必要であると考えられたため、今年度はすべての施設で GeneFlo を用いて解析を行った。

供試した 8 株については、ほぼすべての Locus で良好な結果が得られ、測定値の施設間差は 3bp 以下であった。Locus 9、17 および 19 については、特定の施設の測定値が他の 3 施設の測定値平均よりも数 bp 程度変動する傾向がみられたが、この傾向はすべての供試株で認められたことから、測定機器の特性による影響であると考えられる。一方、Locus 36 では菌株 No.8 において、施設 X で他の 3 施設とは大きく分子量の異なる増幅産物が認められた。塩基配列は確認していないが、テンプレートあるいは PCR 反応液調整時のコンタミネーションにより非特異的なバンドが増幅された可能性も考えられる。

施設 X が実施した 2 つのサイズマーカーを用いた検討では、両者の測定値に開きがみられた。これは供試菌株や Locus に共通して認められ、さらに増幅産物の分子量が増加するに従い、差も大きくなる傾向がみられた。本検討は同一の機器を使用して実施されたことから、機器による測定誤差の可能性は考えられず、使用するサイズマ

ーカーが測定値に大きく影響を与えることを示している。

MLVA 法は、EHEC O157 の有用な分子疫学手法として、その信頼性が証明されつつある。解析結果が数値で得られることから、IS 法と同様に施設間での比較が容易であり、広域流行株を探知するための有効な手段になりうる。しかし、解析に用いる試薬あるいは機器装置より、測定結果にばらつきが生じる可能性があり、標準化されたプロトコルを用いて精度管理を行うことが信頼性の確保に必要不可欠である。近畿ブロックでは実施施設が 4 箇所とまだ少ないが、各施設で使用する機器の特性を把握しながら、多くの株についてデータを積み重ねていくことが求められる。

E. 結論

IS 法は、EHEC O157 の分子疫学手法として、各施設で実施される機会も増えており、精度管理でも良好な結果が得られた。2011 年は第 31 週を中心に多発したタイプがあり、研究協力者に注意喚起と情報提供を呼びかけた。感染源の解明には至らなかったが、PFGE 法の結果からも diffuse outbreak を探知できたと考えられる。施設によっては、患者発生から IS 型登録までに日数がかかる場合があり、迅速な菌株収集が課題である。

PFGE 法は、バンド数が多い菌株についても安定した電気泳動画像が得られるよう、ゲルブロック作製時の菌量やゲルブロックの大きさを再検討しなければならない。また、電気泳動装置の維持管理についても注意を払うべきである。再分離による泳動パ

ターンの変化については、O26 の特徴であるのか、EHEC に共通した問題であるのか検討する必要がある。

MLVA 法は、使用するサイズマーカーが測定値に大きく影響を与えること、Locus によっては測定結果に若干の施設間差が生じることが明らかになった。施設間で共通の分子疫学手法として使用するためには、試薬や反応条件の統一は不可欠であると考えられた。また、各施設の測定機器の特性を把握し、レポート数の算出時に結果を補正できるように、菌株数を増やして検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

1) Kanki M, Seto K, Harada T, Yonogi S, Kumeda Y: Comparison of four enrichment broths for the detection of non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O91, O103, O111, O119, O121, O145 and O165 from pure culture and food samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 53: 167-173, 2011.

2) Harada T, Sakata J, Kanki M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Molecular epidemiological investigation of a diffuse outbreak caused by *Salmonella enterica*

serotype Montevideo isolated in Osaka prefecture, Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 1083-1088, 2011.

3) Iguchi A, Shirai H, Seto K, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Osawa K, Osawa R: Wide distribution of O157-antigen biosynthesis gene clusters in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6: e23250, 2011.

4) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M: Emergence of a Novel Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O-serogroup Cross-reacting with *Shigella boydii* Type 10. *J. Clin. Microbiol.* 49: 3678-3680, 2011.

5) 勢戸和子：下痢原性大腸菌の検査. 検査と技術 39: 659-664, 2011.

2. 学会発表

1) 勢戸和子, 田口真澄, 河原隆二, 伊豫田淳, 寺嶋淳：大阪府におけるSTEC O157クレード8の分離状況, 第85回日本感染症学会総会 (2011年4月, 東京)

2) 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 田口真澄：市販食品から分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の性状—ヒト由来株との比較, 第50回感染性腸炎研究会 (2011年6月, 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 IS-printing System および PFGE の精度管理に使用した菌株

菌株番号	菌種(毒素型)	分離年	感染研PFGE型
1	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2011	g166
2	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2011	f93
3	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2011	g164
4	EHEC O157:H7 (VT2)	2011	g224
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2011	g274
6	EHEC O26:H11 (VT1)	2008	d21
7	EHEC O26:H11 (VT1)	2008	d24
8	EHEC O26:HNM (VT1)	2009	e105
9	EHEC O26:H11 (VT1)	2009	e104
10	EHEC O26:H11 (VT1)	2011	g25

表 2 2011 年分離株の主な IS コード

ISコード	登録数	分離時期	登録施設数	備考
118141 114763	45	7~8月	8	5つの家族事例と1つの 集団事例を含む
216959 84463	21	3月, 5~8月, 12月	7	2つの家族事例を含む
249711 116975	15	5~9月, 11月	6	1つの家族事例を含む
249725 116975	13	7~9月	3	1つの家族事例を含む
249727 116975	39	1月, 3月, 7~8月, 10~12月	10	3つの家族事例を含む

表 3 EHEC O26 精度管理株の PFGE 画像解析結果

菌株番号	解析者	近似度(%)	100%一致画像数 ^{a)}	認識バンド数
6	A	86.7	2(23), 2(19), 2(19)	18, 19, 21, 22, 23
	B	90.6	2(22)	18, 20, 21, 22, 23, 25
	C	93.7	5(23), 3(22)	20, 22, 23, 24
	D	92.3		19, 21, 22
7	A	85.9	2(21)	19, 20, 21, 22, 23, 24
	B	87.7	2(23)	21, 23, 24, 25
	C	87.1	4(23), 2(24), 2(24), 2(22)	22, 23, 24, 25
	D	90.2		19, 20, 21, 22, 24
8	A	89.0	2(22)	19, 21, 22, 24
	B	87.3	2(25)	21, 22, 23, 24, 25, 26, 28
	C	91.2	4(26), 2(24)	23, 24, 25, 26
	D	91.6		19, 21, 22, 23, 25
9	A	91.2	2(22)	13, 20, 21, 22, 23, 24, 25
	B	84.3	2(24)	22, 23, 24, 25, 26, 27
	C	95.5	6(23), 3(25)	23, 24, 25
	D	87.4		15, 21, 22, 23, 24, 25
10	A	84.9	4(23)	19, 20, 21, 22, 23, 24
	B	88.5	2(24), 2(23)	22, 23, 24, 25
	C	93.5	5(23), 4(24)	23, 24, 25
	D	89.7		20, 21, 22, 23, 24

a) カッコ内は認識バンド数

表 4 サイズマーカーによる MLVA 測定値の比較(施設 X)

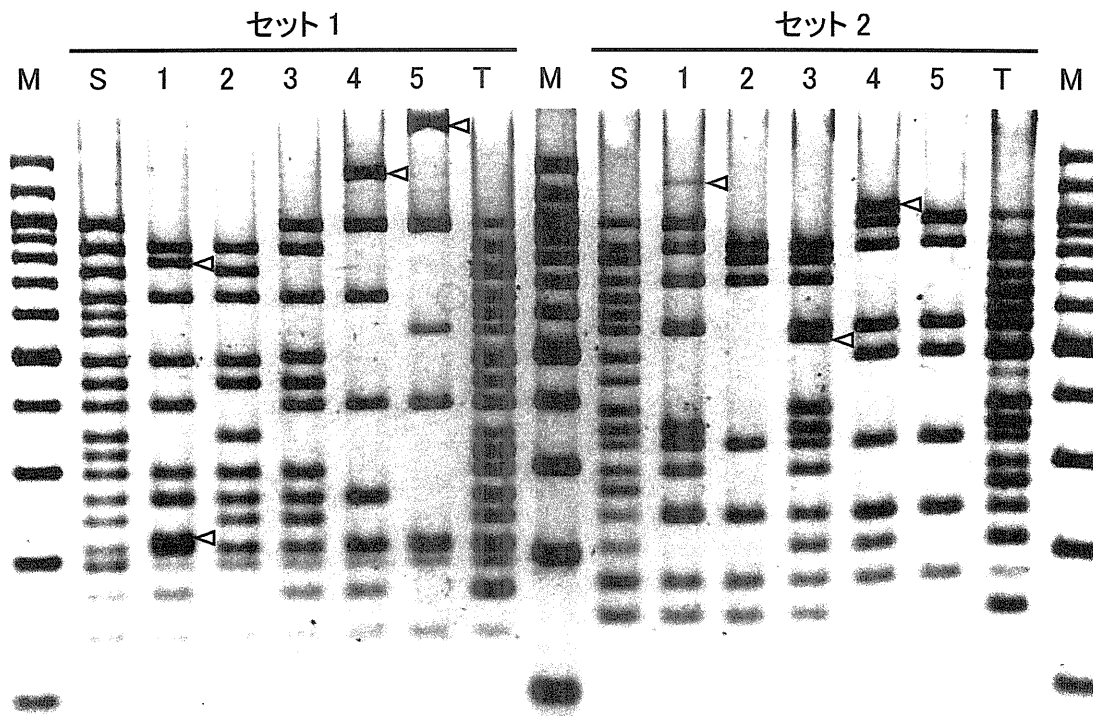
PCR反応液	VNTR	Repeat unit ^{a)} (Off set)	サイズ マーカー	菌株No.							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Reaction 1	Locus 3	6 (323)	GeneFlo	349.7	403.6	397.5	421.7	385.7	397.5	433.3	397.6
			LIZ	344.1	397.9	391.9	415.9	380.1	391.9	427.6	391.9
			差 ^{b)}	5.6	5.7	5.6	5.8	5.6	5.6	5.7	5.7
	Locus 34	18 (99)	GeneFlo	223.3	261.0	279.0	223.3	296.6	279.0	223.3	279.0
			LIZ	219.6	255.5	273.3	219.5	291.1	273.3	219.5	273.3
			差	3.7	5.5	5.7	3.8	5.5	5.7	3.8	5.7
	Locus 9	6 (466)	GeneFlo	- ^{c)}	560.4	531.7	560.5	543.2	520.1	525.9	520.0
			LIZ	-	553.9	524.9	554.0	536.3	513.2	519.0	513.2
			差	-	6.5	6.8	6.5	6.9	6.9	6.9	6.8
	Locus 25	6 (110)	GeneFlo	127.5	138.8	138.7	138.8	157.0	138.9	133.0	138.8
			LIZ	123.6	135.1	135.1	135.0	152.7	135.0	129.2	134.9
			差	3.9	3.7	3.6	3.8	4.3	3.9	3.8	3.9
Reaction 2	Locus 17	6 (121)	GeneFlo	152.0	164.4	164.4	139.1	164.4	158.2	158.2	158.3
			LIZ	147.6	160.1	160.1	135.2	160.1	153.4	154.0	153.9
			差	4.4	4.3	4.3	3.9	4.3	4.8	4.2	4.4
	Locus 19	6 (273)	GeneFlo	321.1	297.1	309.1	315.1	309.1	309.1	321.0	309.1
			LIZ	315.1	291.9	303.5	309.3	303.4	303.5	315.1	303.4
			差	6.0	5.2	5.6	5.8	5.7	5.6	5.9	5.7
	Locus 36	7 (102)	GeneFlo	157.2	177.8	143.0	143.1	123.4	171.0	-	142.9
			LIZ	153.4	174.0	139.5	139.5	119.4	167.2	-	167.3
			差	3.8	3.8	3.5	3.6	4.0	3.8	-	▲ 24.4
	Locus 37	6 (142)	GeneFlo	175.7	181.6	181.6	187.5	181.5	187.5	211.3	187.5
			LIZ	171.8	177.8	177.9	183.9	177.9	183.9	208.1	184.0
			差	3.9	3.8	3.7	3.6	3.6	3.6	3.2	3.5
Reaction 3	Locus 10	6 (178)	GeneFlo	-	296.1	308.0	202.5	345.2	393.9	381.8	369.7
			LIZ	-	284.3	296.4	190.8	339.1	387.6	375.4	363.3
			差	-	11.8	11.6	11.7	6.1	6.3	6.4	6.4

a) bp

b) GeneFloの測定値からLIZの測定値を引いた値

c) 増幅されない

1) 電気泳動画像



M: 100bp ladder, S: Standard DNA, T: Template Mix, 1~5: 精度管理株
 ◁ : 非特異バンド

2) 判定

菌株	セット1 判定 ^{a)}																セット2 判定																						
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	790, 220	備考 ^{b)}	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	備考		
1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	790, 220		1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1200
2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1			0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1		
3	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1			0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	540
4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1300		1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1050
5	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	>1500		1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	

a) 1: 増幅あり, 0: 増幅なし
 b) 非特異バンドの増幅サイズ

図 1 EHEC O157 精度管理株の IS-printing System 実施例(施設 9)

公衛研内 IS-printing system データベース		検索	すべて表示	Excelで 書き出し	ワークフロー	初期設定															
菌株番号	PV11-082	血清型	O157:H7	日付	2011-08-22	保健所	藤井寺	住所・地域	羽曳野市												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	cae	hyA	エクストラバンド	clade	解析	検出方法
1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	non8	遺伝子DB照合
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	エクストラバンド	PFGE	レファレンスDB照合	
0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	e230	
コード	200559	118975	備考 PV11-084の家族							このレコードを隠す											
菌株番号	PV11-081	血清型	O157:H7	日付	2011-08-21	保健所	八尾	住所・地域	八尾市												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	cae	hyA	エクストラバンド	clade	解析	検出方法
1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	non8	遺伝子DB照合
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	エクストラバンド	PFGE	レファレンスDB照合	
1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	e224	
コード	148011	169356	備考 PV11-085の家族							このレコードを隠す											
菌株番号	PV11-090	血清型	O157:H7	日付	2011-08-19	保健所	豊中	住所・地域	豊中市												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	cae	hyA	エクストラバンド	clade	解析	検出方法
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	未実施	遺伝子DB照合
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	エクストラバンド	PFGE	レファレンスDB照合	
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	e275	
コード	232871	114873	備考							このレコードを隠す											
菌株番号	PV11-076	血清型	O157	日付	2011-08-14	保健所	藤井寺	住所・地域	羽曳野市												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	cae	hyA	エクストラバンド	clade	解析	検出方法
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	non8	遺伝子DB照合
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	stx2	stx1	エクストラバンド	PFGE	レファレンスDB照合	
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	e277	
コード	138141	114591	備考 PV11-074と同一人							このレコードを隠す											

図2 近畿 IS データベース v2 閲覧画面

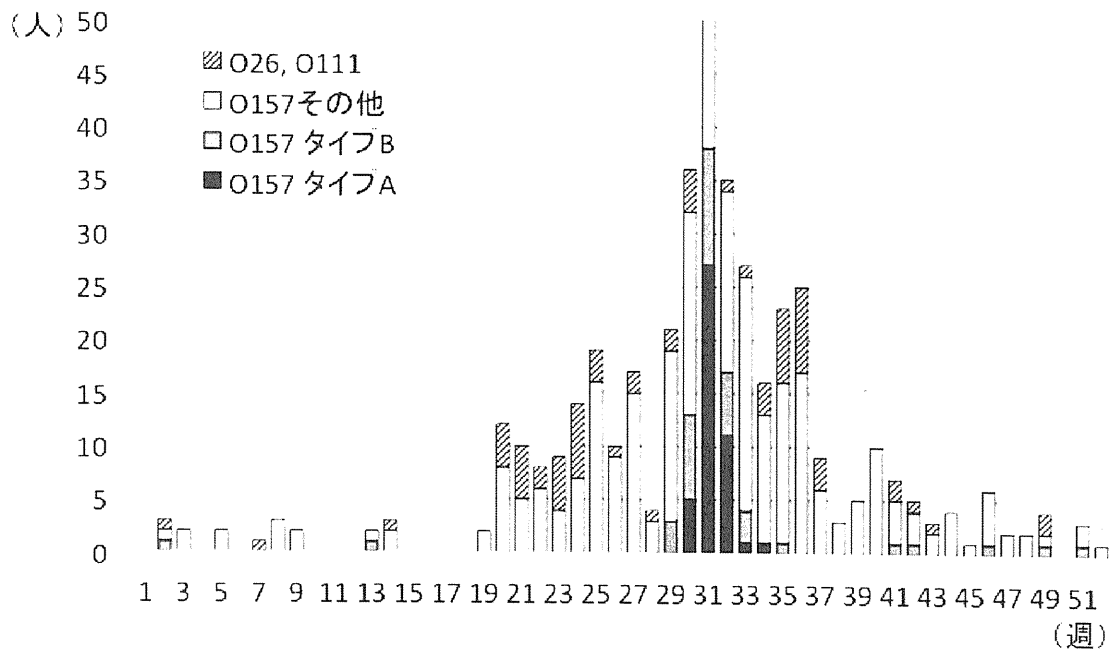


図3 近畿ブロックの EHEC 感染症報告数(2011年)

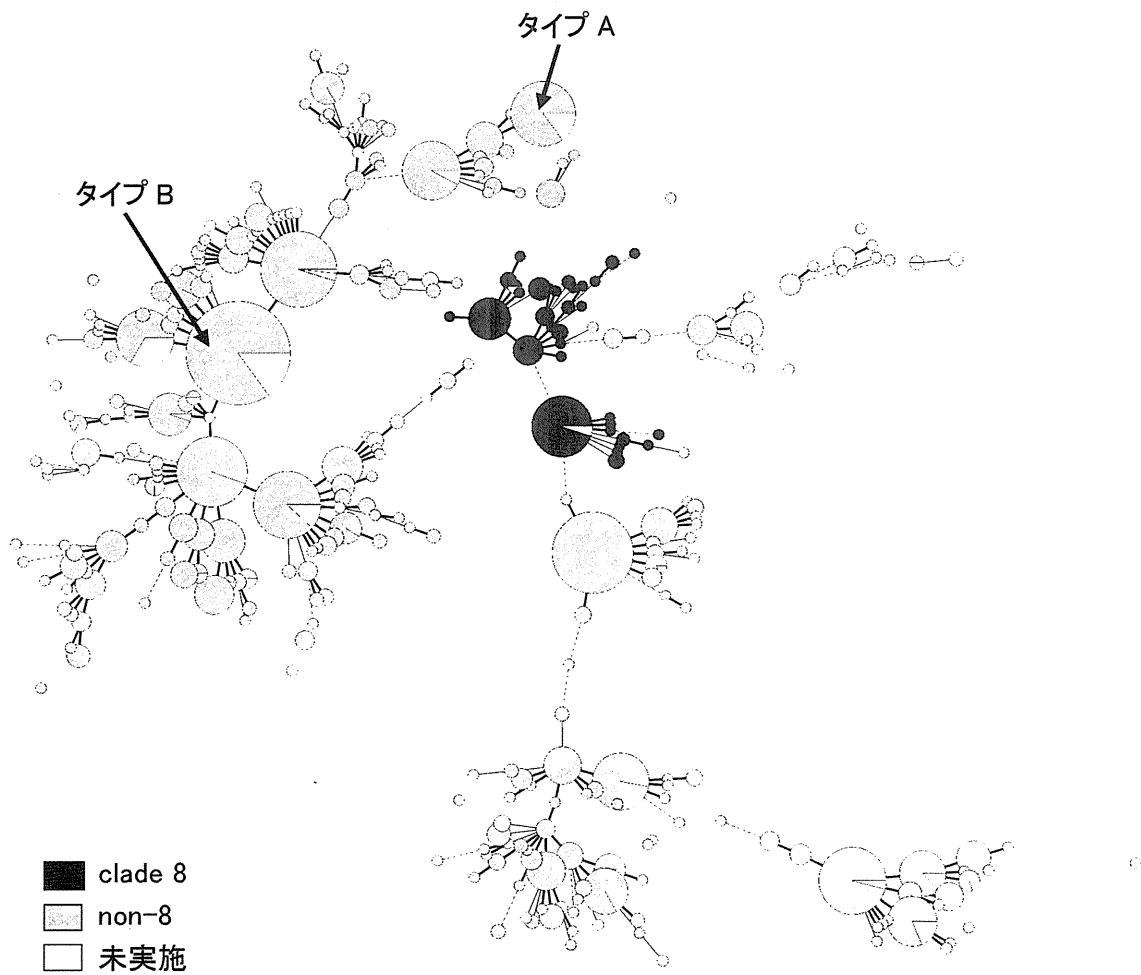
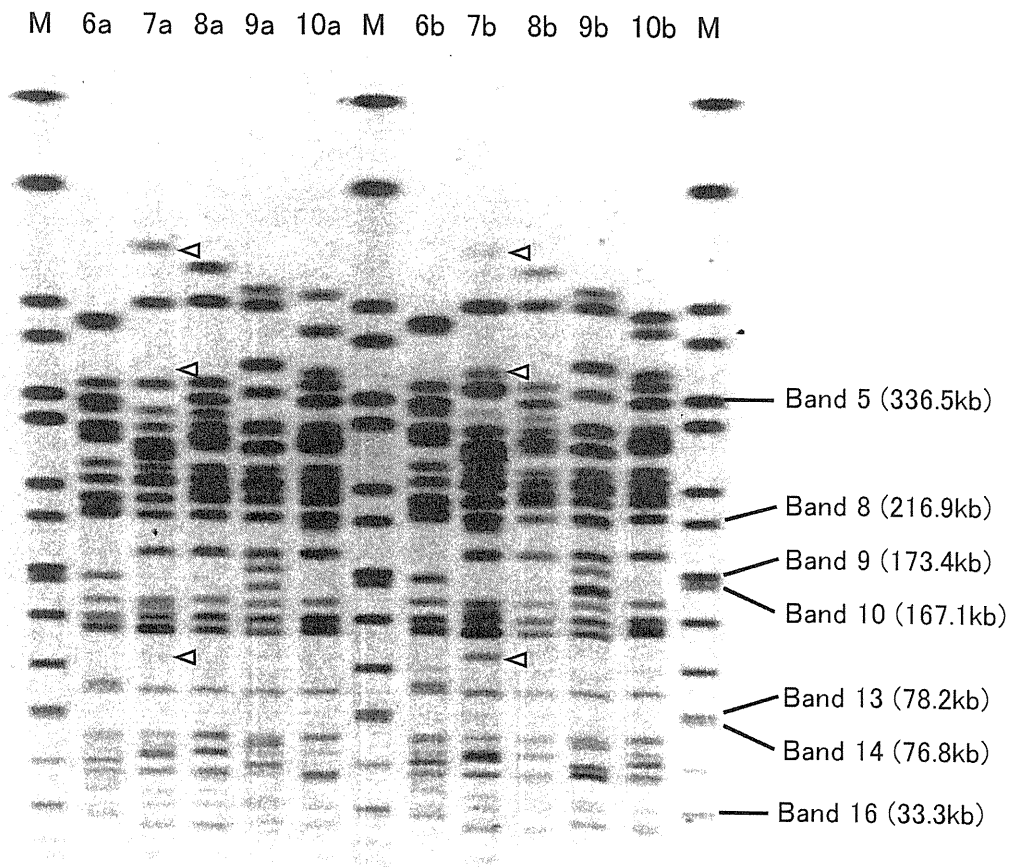


図 4 近畿 IS データベース 1,550 株の Minimum Spanning Tree



M: Marker (*Salmonella* Braenderup H9812)
 6a～10a: 精度管理株 再分離平板釣菌株
 6b～10b: 精度管理株 継代培養株

図5 EHEC O26 精度管理株の PFGE 画像例(施設 11)

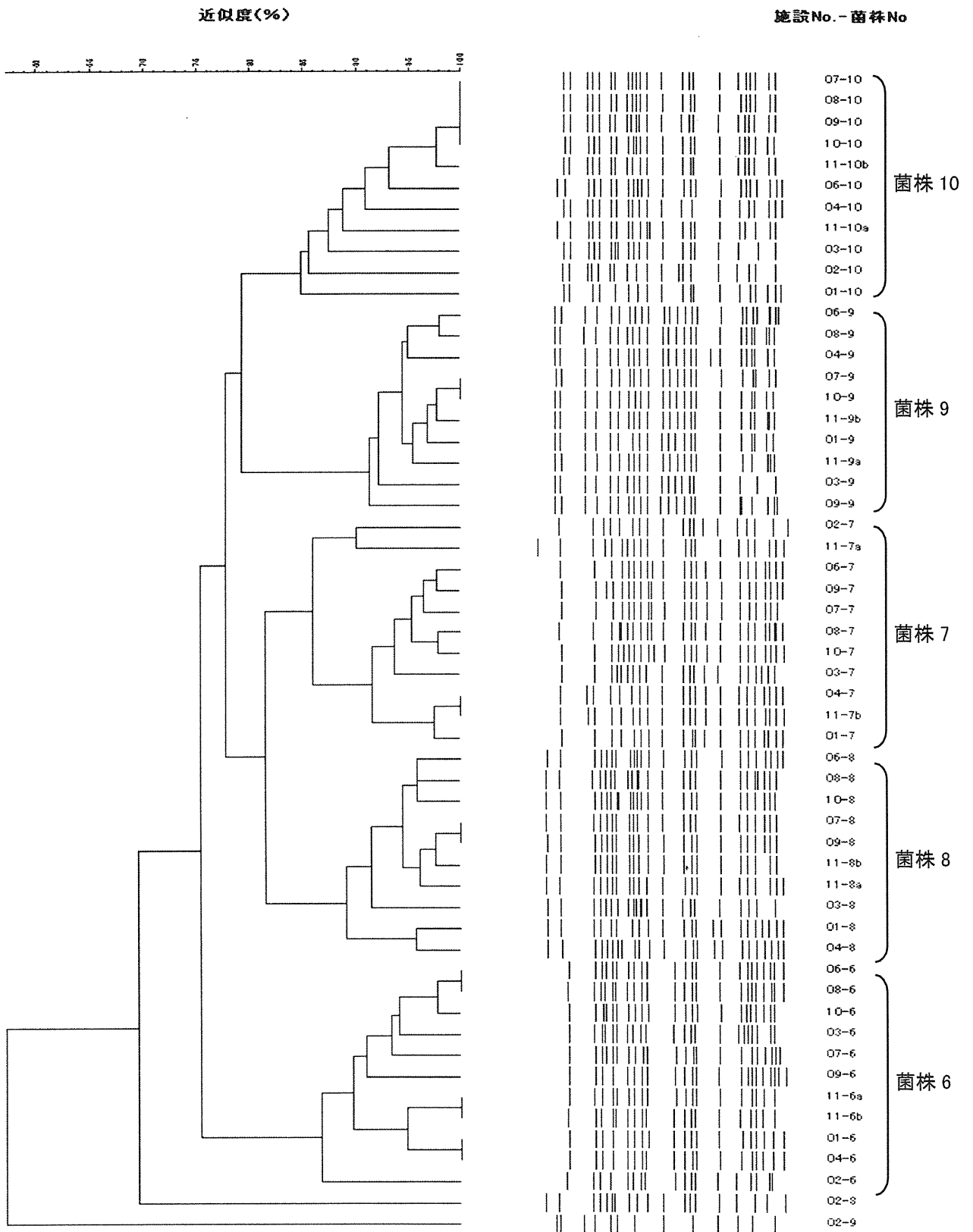


図 6 A 解析者の作成した EHEC O26 精度管理株のデンドログラム

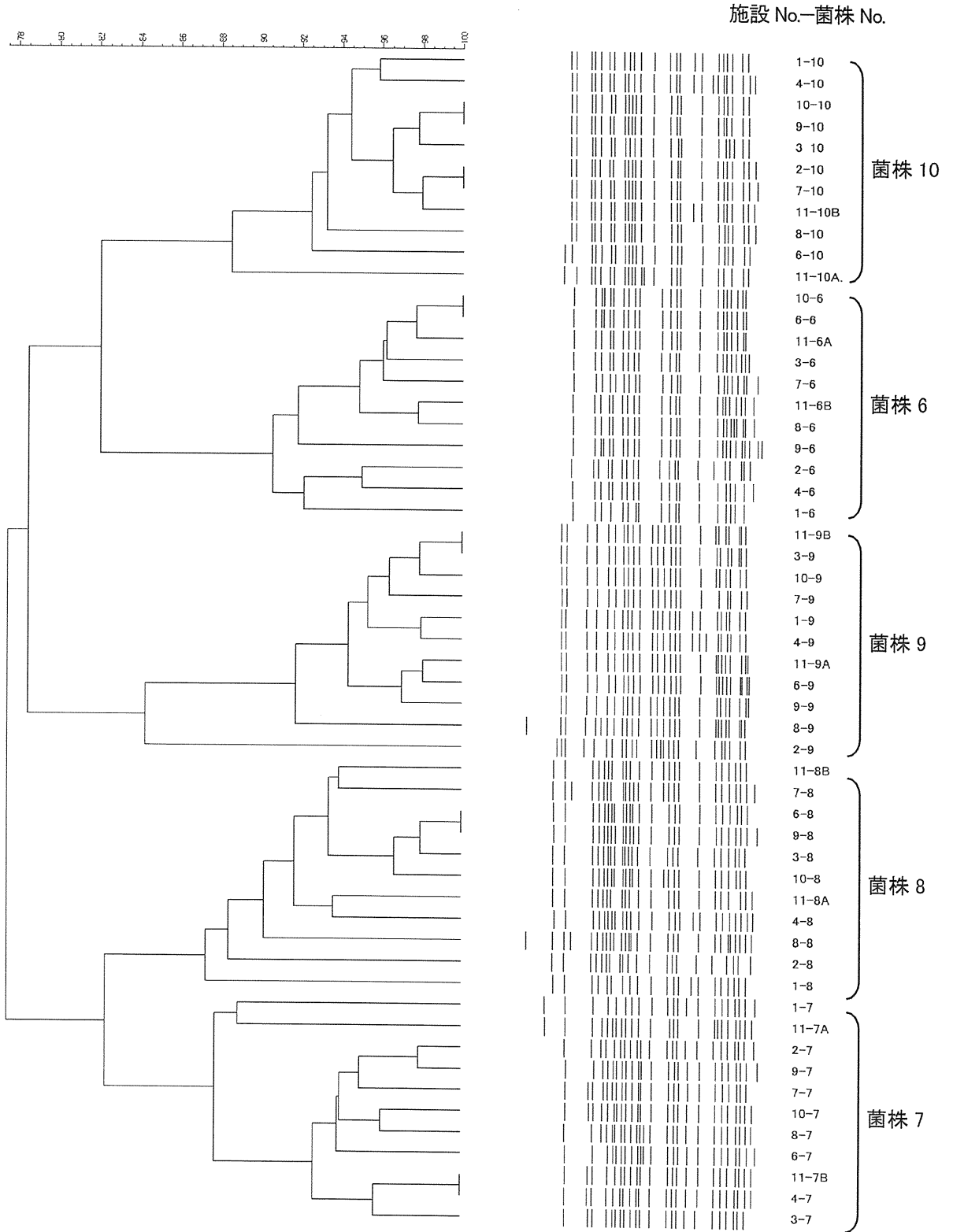


図7 B 解析者の作成した EHEC O26 精度管理株のデンドログラム

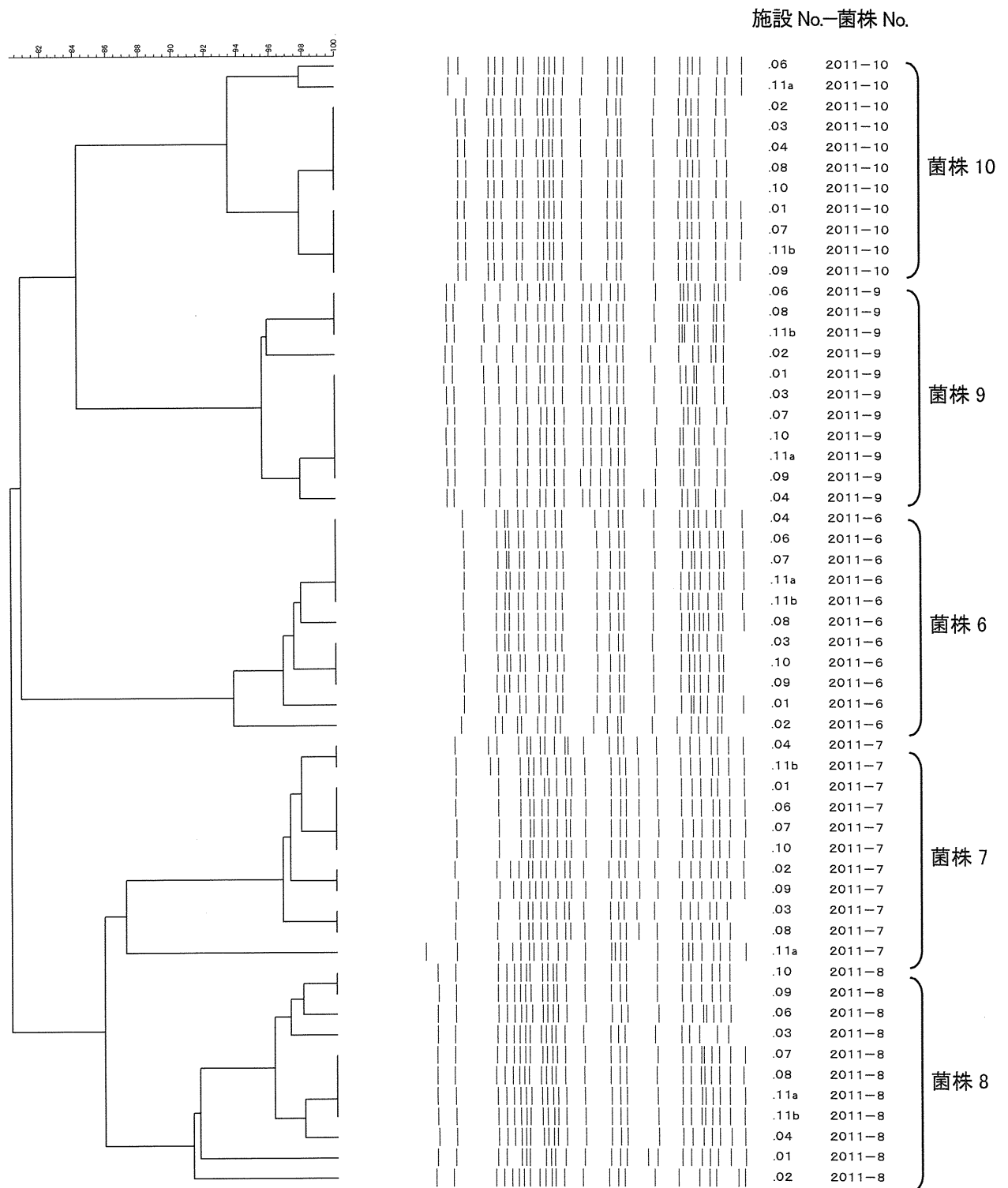


図 8 C 解析者の作成した EHEC O26 精度管理株のデンドログラム

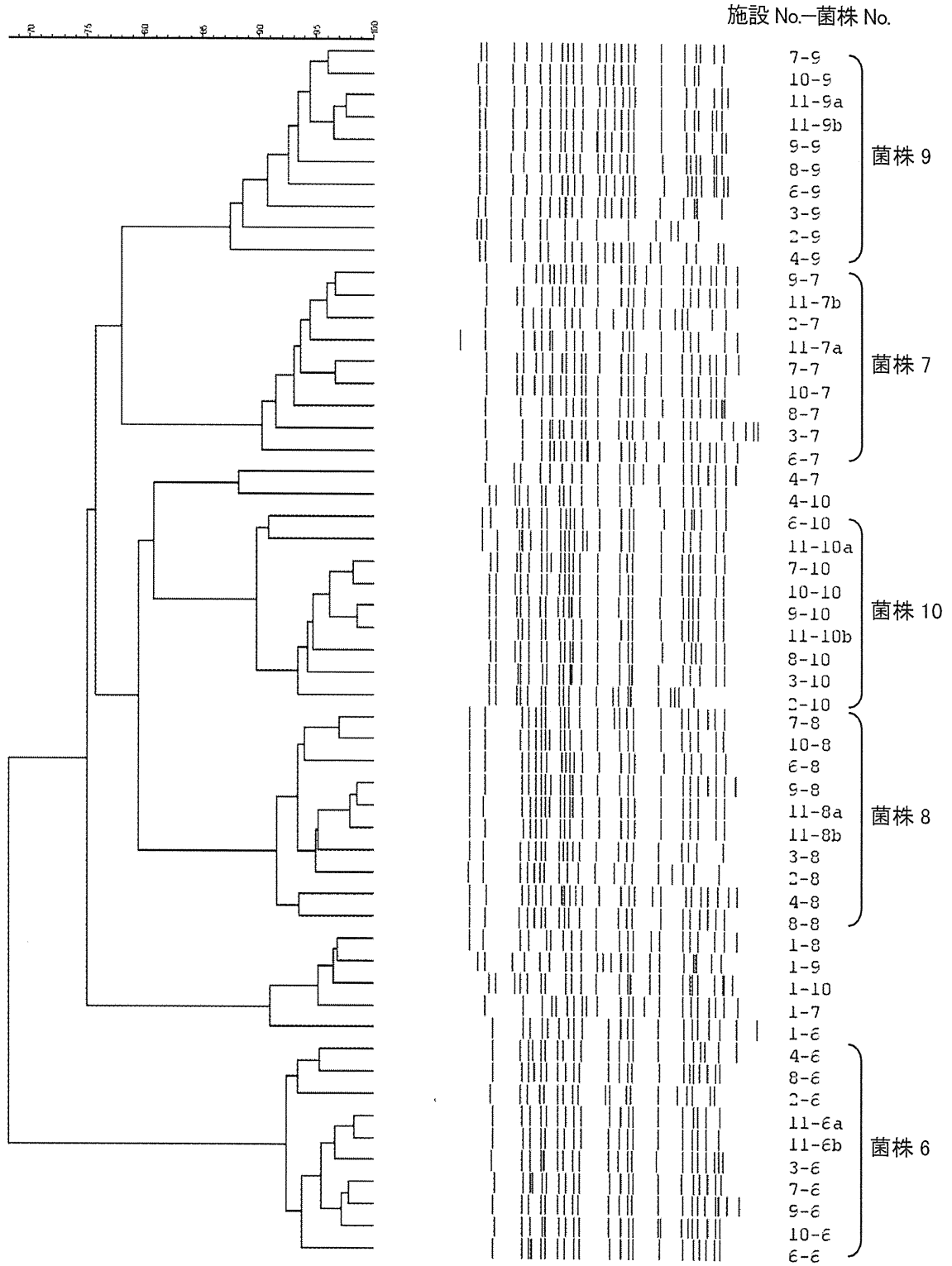


図 9 D 解析者の作成した EHEC O26 精度管理株のデンドログラム

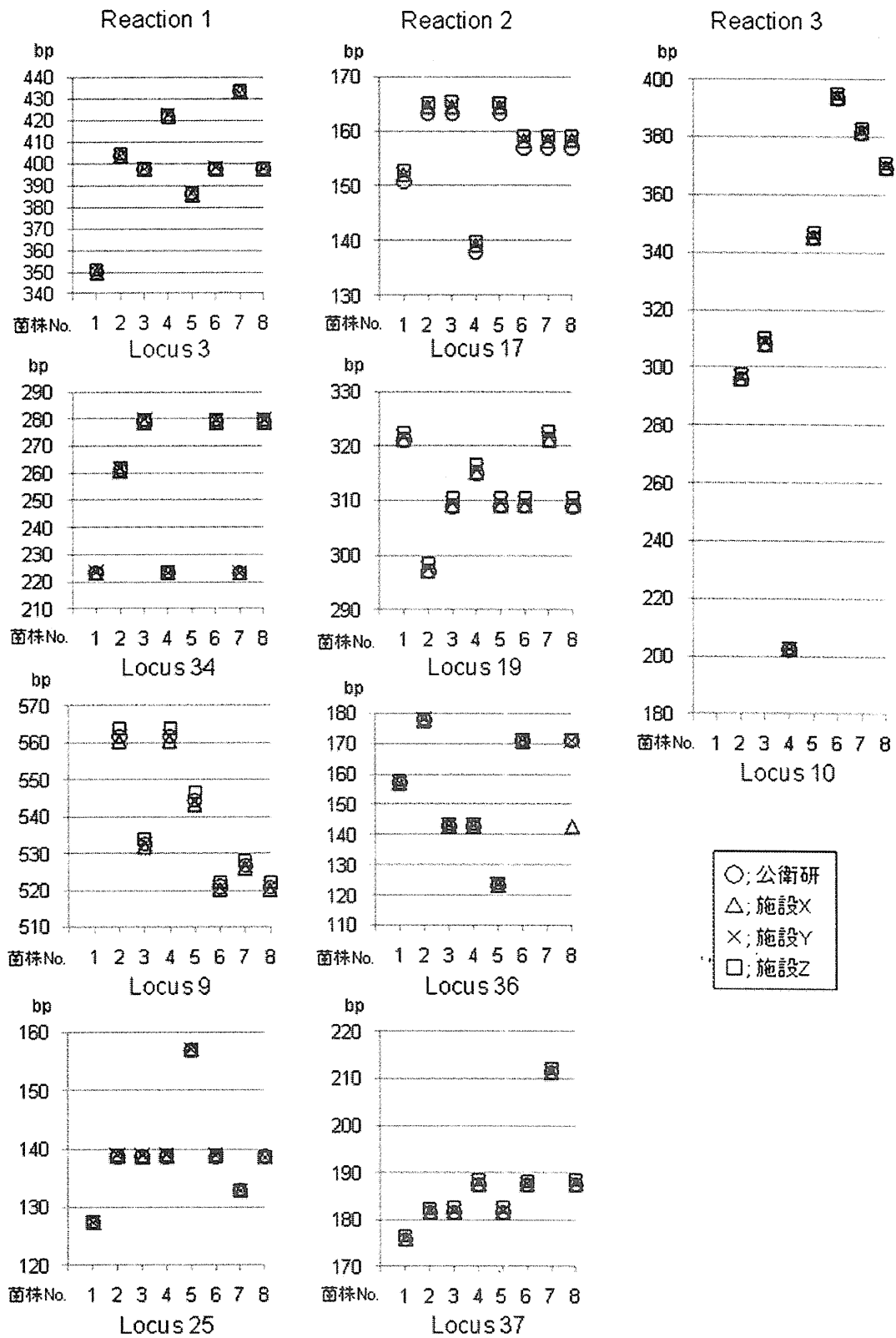


図 10 MLVA 法における測定値の施設間差

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成23年度 分担研究報告書

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

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	花原 悠太郎	鳥取県衛生環境研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	檜本 孝史	〃
	大畠 律子	岡山県環境保健センター
	石井 学	〃
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	山田 裕子	〃
	河村 美登里	〃
	京塚 明美	広島市衛生研究所
	田内 敦子	〃
	富永 潔	山口県環境保健センター
	矢端 順子	〃
	亀山 光博	〃
	下野 生世	徳島県立保健製薬環境センター
	石田 弘子	〃
	宮本 孝子	香川県環境保健研究センター
	松本 純子	愛媛県立衛生環境研究所
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	鍋島 民	〃

研究要旨

中四国ブロックでは、平成23年度にパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)およびIS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌(EHEC) O157菌株の精度管理を実施した。ほとんどの施設は、両法による解析結果がほぼ一致し良好であったが、一部施設では、PFGEおよびIS-printing Systemの泳動像が不明瞭であった。精度管理は、事例対応において正確で安定した結果を得るために、今後も継続して実施することが必要である。各県で発生した事例に分子疫学手法を応用し、IS-printing Systemの解析結果およびPFGE型を含む疫学情報を、中四国ブロックの各施設が共有して、中四国地域の発生状況を把握できるよう試みた。本年度は、メールにより情報を回収したのち、それらをまとめてブロック内の各施設に還元した。発生事例をタイムリーに把握するためには、将来的にデータベースによる疫学情報の管理と、それへの個別のアクセスを可能にすることが必要である。

A. 研究目的

本研究班では、感染症や食中毒事例由来株などについて、遺伝子による分子疫学的な解析を行い、その結果を感染研のサーバーにデータベース化し、必要時にアクセスすることで、全国あるいは他地域の分離株と比較して、同じ遺伝子型株の流行状況の把握や、場合によっては感染源の究明が可能になるネットワーク体制の構築に向けて、検討を行っている。そのためには、データベースを構成する分子疫学手法の種類やその解析精度の検討が、必要である。研究班では長年、これらについて継続して検討を重ねており、中四国ブロックでも平成 23 年度に、腸管出血性大腸菌(以下 EHEC と表記) O157 菌株を用いた精度管理と分子疫学的手法の事例への応用を、行った。また、中四国地域の EHEC O157 患者等の発生状況と分子疫学的解析結果を、中四国ブロックの各施設で共有するネットワーク作りを試行したので、これらについて報告する。

B. 研究方法

1. 使用菌株

精度管理：岡山県で平成 23 年度に分離された EHEC O157 : H7 VT1,2 菌株 5 株 (No.1609、1629、1635、1638、1642) を使用した。

疫学情報の共有：中四国地域で発生した患者等由来の EHEC O157 菌株を用いた。

2. 分子疫学解析法および精度管理

(1) PFGE 法および型別

PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、泳

動像を画像解析ソフト(BioNumerics)を使用して解析した。

PFGE 型別は、菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(2) IS-printing System

IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増幅される産物は、各プライマーセット毎に高分子量側から3つごとに区切り、迅速同定キット(Api)の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を各区分毎に足してコード化し、コードによる解析を行った。

(3) 精度管理

精度管理用に送付した菌株 5 株について、各県の施設(A~J)の計 10 施設で、PFGE 法および IS-printing System の両法により、解析した。なお、1 施設は、IS-printing System による解析のみ、参加した。PFGE 法は、解析ソフトを使用して作成した dendrogram を、IS-printing System は、1st および 2nd set primer ごとに増幅産物のバンドをコード化した表を、いずれも泳動像と共に当センターにメールで送付してもらって、解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) PFGE 法による解析結果

中四国ブロックの 10 施設中 9 施設で、PFGE 法による精度管理を実施した。解析結果は、図 1 に示した。当センターの結果では、遺伝子パターンの類似度は、① (No.1609、No.1629)は 100%、②(No.1635 と No.1642)は約 97.5%、③(①と No.1638)

は約 95.5%、②と③は約 91.5%で、いずれの株もかなり類似した PFGE パターンを示した。他県の 7 施設の解析結果も、多くの施設がほぼ同様な遺伝子パターンを示し、デンドログラムによる類似度は 87%以上であった。8 施設のデンドログラムによる解析結果と PFGE 型について、表 1 にまとめた。菌株 No1609、1629 および 1638 のデンドログラムによる解析結果は、すべての施設が、これらの菌株中 2~3 株の類似度が 100%であるとした。No1635 と 1642 の類似度は 3 施設が 100%としたが、5 施設では異なった PFGE パターンであるとした。一方、国立感染症研究所で実施した精度管理株 5 株の PFGE 型別結果は、それぞれ異なった PFGE 型に型別された。参加した 9 施設のうち、1 施設の PFGE 法による泳動像はやや不鮮明であり、デンドログラムによる解析は未実施であった。

(2) IS-printing System による解析結果

昨年同様、IS-printing System による精度管理は、中四国ブロックの 10 施設すべてが参加した。各施設の泳動像および IS コード一覧表は、図 2 および表 2 に示した。当センターの結果では、菌株 No1609 と 1635 の IS コードが一致した。この 2 株に対して、No1629 と 1638 は 1st primer set による増幅バンドのうち、それぞれ異なったバンドが 1 つ、No1642 は 2nd primer set による増幅バンドのうちの 1 つが、異なっていた。他の 8 施設の解析結果も当センターと一致したが、1 施設は 1st primer set による増幅バンドのうちの 2 つと、2nd set primer による増幅バンドのうちの 6~8 つが異なっていた。この施設の泳動像は、1st set primer による低分子側の増幅産物が見られず、2nd set primer による泳動像はやや不鮮明で、増幅産物の確認が難しい状態であった。

2. 中四国地域の発生状況と解析結果

平成 23 年度に中四国地域で発生した EHEC O157 による事例について、各県の施設で患者由来株を用いて IS-printing System による分子疫学的解析を行った。その結果と、PFGE 型を含む疫学情報を収集し、解析した。解析結果は、表 3~5 に示した。

中四国地域の各県で分離された患者等由来 EHEC O157 株は計 127 株で、広島県 30 株、岡山県 25 株、広島市 18 株、山口県 17 株など、多数の株が分離された(表 3)。これらの株を IS-printing System で解析した結果、51 種類の IS コードに分類された。1st primer set および 2nd set primer の各々で増幅されたバンドの IS コード[IS コード(1st)-IS コード(2nd)]は、717577-611657 が 17 株で最も多く、以下 717557-611657 が 15 株、717575-611657 が 9 株、345057-311652 が 7 株、613575-610446 が 5 株などの順に多かった(表 4)。このうち、多数の同一 IS コード株が、ほぼ同時期に複数の県で患者等から分離された事例は、613575-610446 が 7~8 月に 3 県で、717557-611657 が 7~9 月に 5 県で、717575-611657 は 7~10 月に 3 県で、717577-611657 も 6~9 月に 3 県で発生した事例などである。(表 5)。特に、IS コード(2nd)が 611657 の株は、IS コード(1st)も非常に類似しており、遺伝子型が非常に類似した多数の株が、広範囲な地域で 6~10 月に分離されていた。

D 考 察

今回精度管理に供した 5 菌株は、本年度岡山県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 : H7 株 5 株である。これらの株は、PFGE 法および IS-printing System による解析で、遺伝子型の違いが少ない株であり、

各施設の解析結果を比較した。PFGE 法のデンドログラム解析では、どの施設の解析結果も、使用した5株の類似度が87%以上と高く、良好な結果であった。各施設のデンドログラムの結果から、PFGE パターンが100%一致した株について比較すると、①菌株 No.1609 と 1629 が一致した施設(A と C)、②No.1609 と 1629 と 1638 が一致した施設(B と H)、③ No.1609 と 1629 が一致、1635 と 1642 が一致した施設(E と F)、④No.1629 と 1638 が一致した施設(D)、⑤No.1629 と 1638 が一致、1635 と 1642 が一致した施設(G)の、5つのパターンに分かれた。PFGE 法による解析は、使用した菌株の保存状況、培養条件、PFGE そのものの技術や、デンドログラム解析における PFGE パターンのバンド認識など、解析に影響を及ぼす多数の因子が存在するため、結果に差が出たものと思われる。国立感染症研究所で実施した PFGE 型別結果では、これら5株はすべて異なった PFGE 型に型別された。PFGE 型は、PFGE パターンが完全一致しない場合は、異なった PFGE 型として表記される。このことから、これら5株の PFGE パターンは異なっており、一致する PFGE パターンは無かったことを、示している。これらの結果を総合して、正確な解析を行うための様々な工夫や注意が、一層必要であると思われた。一方、IS-printing System の解析結果は、1施設を除いて他のすべての施設が同じ結果となった。このことから、施設間で解析結果に差が出にくく、迅速な分子疫学解析法として、広域発生時などの分子疫学的解析法として、有用であると考えられる。なお、1施設の PFGE 法および IS-printing System の結果が多施設と異なったのは、両法の泳動像が他施設に比べて不鮮明であったことが、原因として考えられた。正確で信頼性のある結果を得るために、今後も両法の精度管理を継続して

実施する必要があると考える。

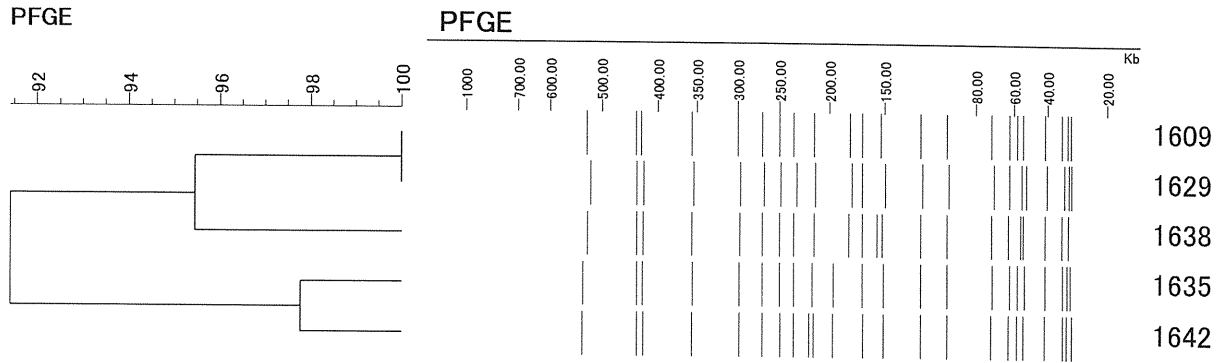
中四国地域で発生した EHEC O157 による事例について、感染源究明や感染予防などに役立てることを目的として、疫学情報の共有を試行した。患者等由来株は、多種類の IS コード株に分類され、疫学情報として有用であると思われた。多数の同一 IS コード株が、ほぼ同時期に複数の県で患者等から分離された事例では、何らかの共通した感染源が存在し、あるいはそれらが広域的に流通した可能性が、示唆された。しかし、残念ながら、メールでの疫学情報のやり取りは、タイムリーな情報の交換ができない。将来、これらの疫学情報が国立感染症研究所に設置されたサーバーのデータベースで管理され、各県の担当者が自由にアクセス可能になれば、事例対応において大きな力を発揮できる分子疫学的解析手段として、期待できる。

E 結論

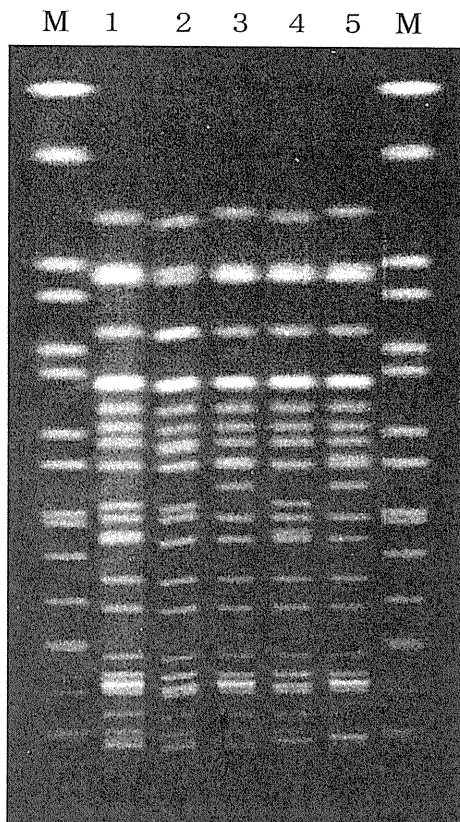
1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 菌株を用いて、PFGE 法と IS-printing System による精度管理を実施した。
2. PFGE 法による解析結果は、施設により多少の差が見られたが、多くの施設が同様の傾向の結果を報告した。
3. IS-printing System による解析結果は、ほとんどの施設が同一の結果であり、施設間で解析結果に差の出にくい、有用な疫学解析法であると思われた。
4. PFGE 法と IS-printing System について、継続した精度管理の必要性が示された。
5. IS-printing System による疫学情報の広域的な共有を、試行した。

F. 研究発表
なし。

図1 精度管理菌株の PFGE 法による遺伝子解析結果



(A)



レーン 1 : 1609

2 : 1629

3 : 1635

4 : 1638

5 : 1642

M : マーカー (Salmonella Braenderup H9812 株)