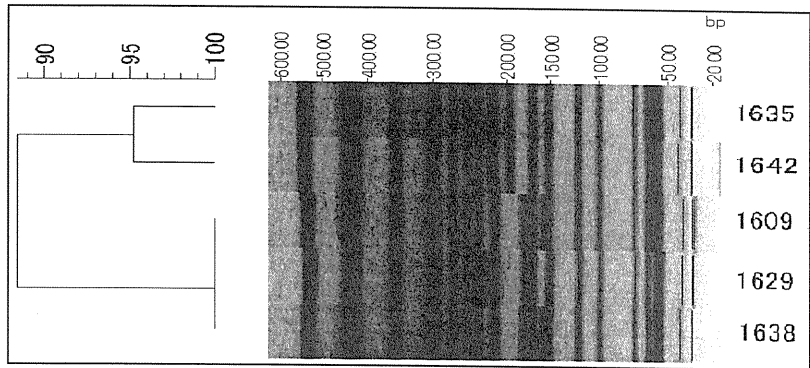
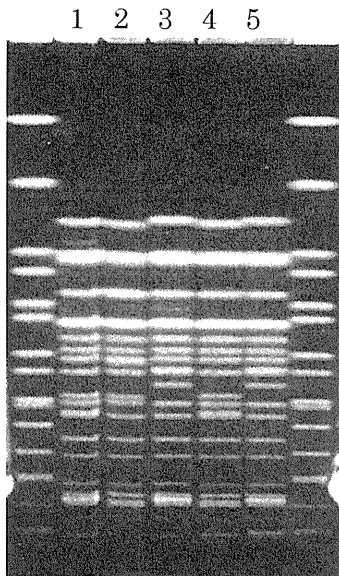


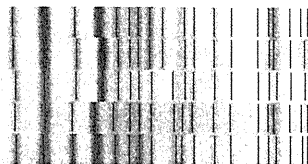
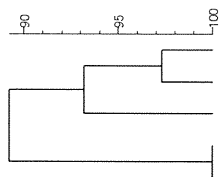
(B)



レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

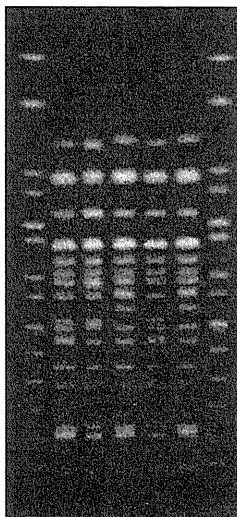
(C)

Dice (Tot 1.0%-1.0%) (H+0.0% S>0.0%) [D.0%-100.0%]
marker_XbaI marker_XbaI



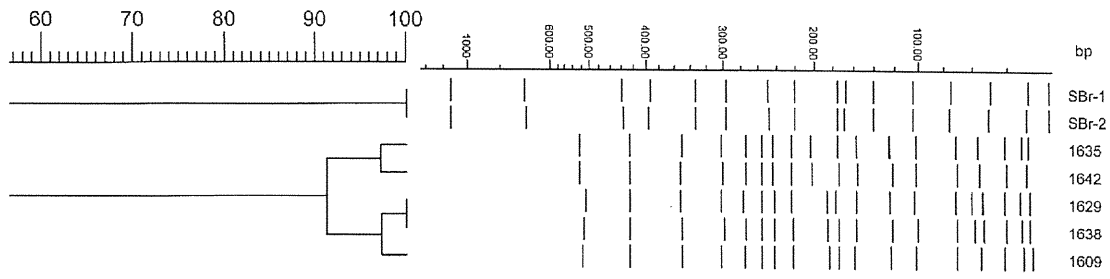
H23/バルス精度管理 1635 O157:H7 XbaI VT1,2
H23/バルス精度管理 1642 O157:H7 XbaI VT1,2
H23/バルス精度管理 1638 O157:H7 XbaI VT1,2
H23/バルス精度管理 1609 O157:H7 XbaI VT1,2
H23/バルス精度管理 1629 O157:H7 XbaI VT1,2

1 2 3 4 5

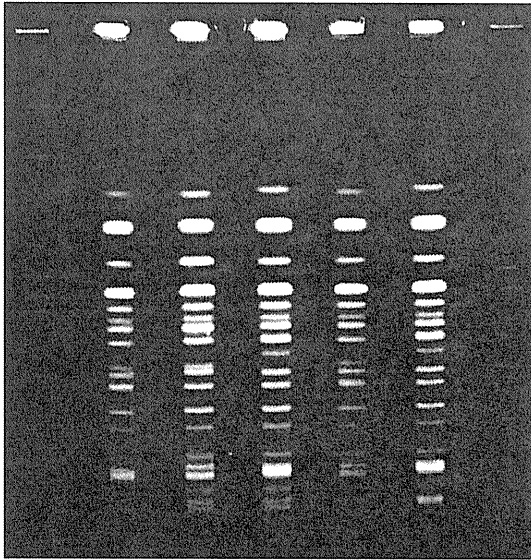


レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

(D)



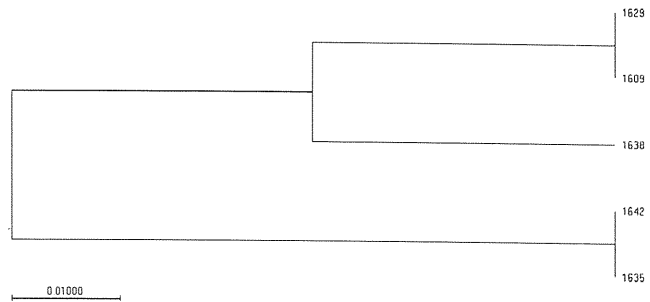
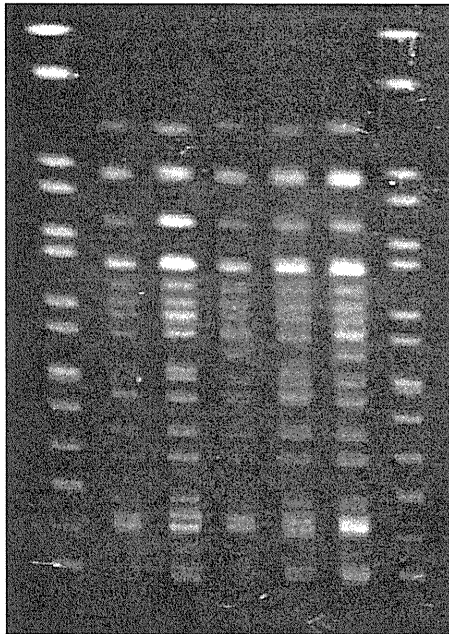
1 2 3 4 5



レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

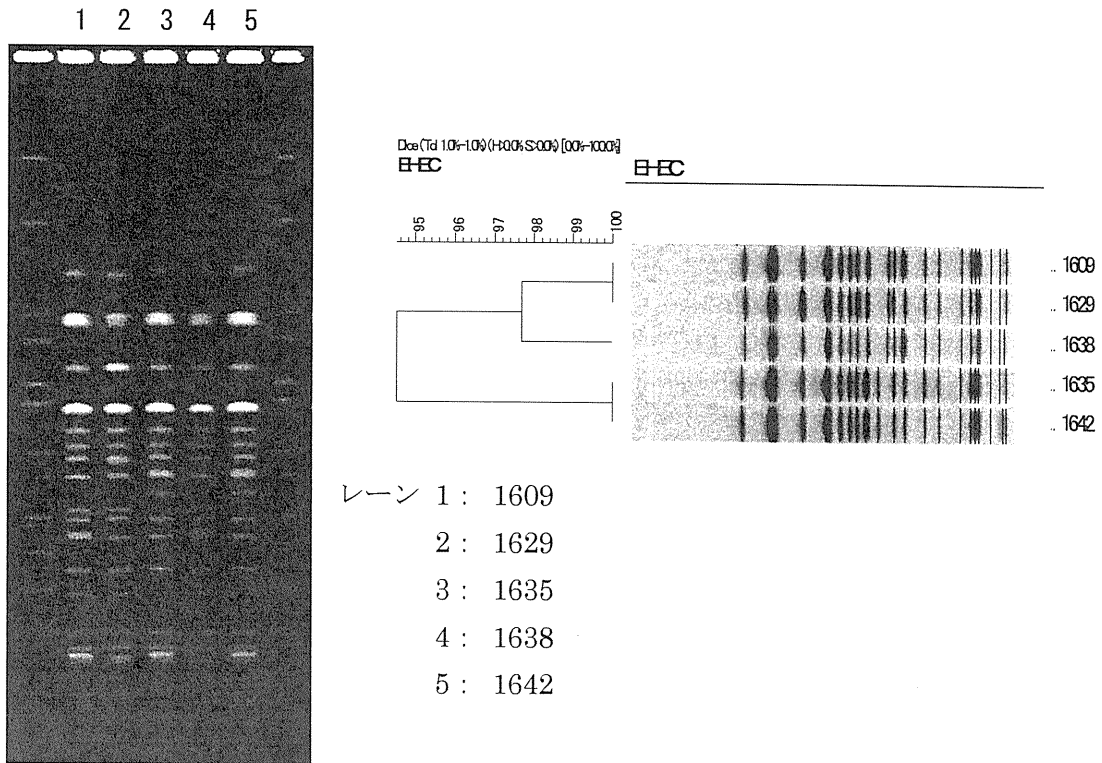
(E)

1 2 3 4 5

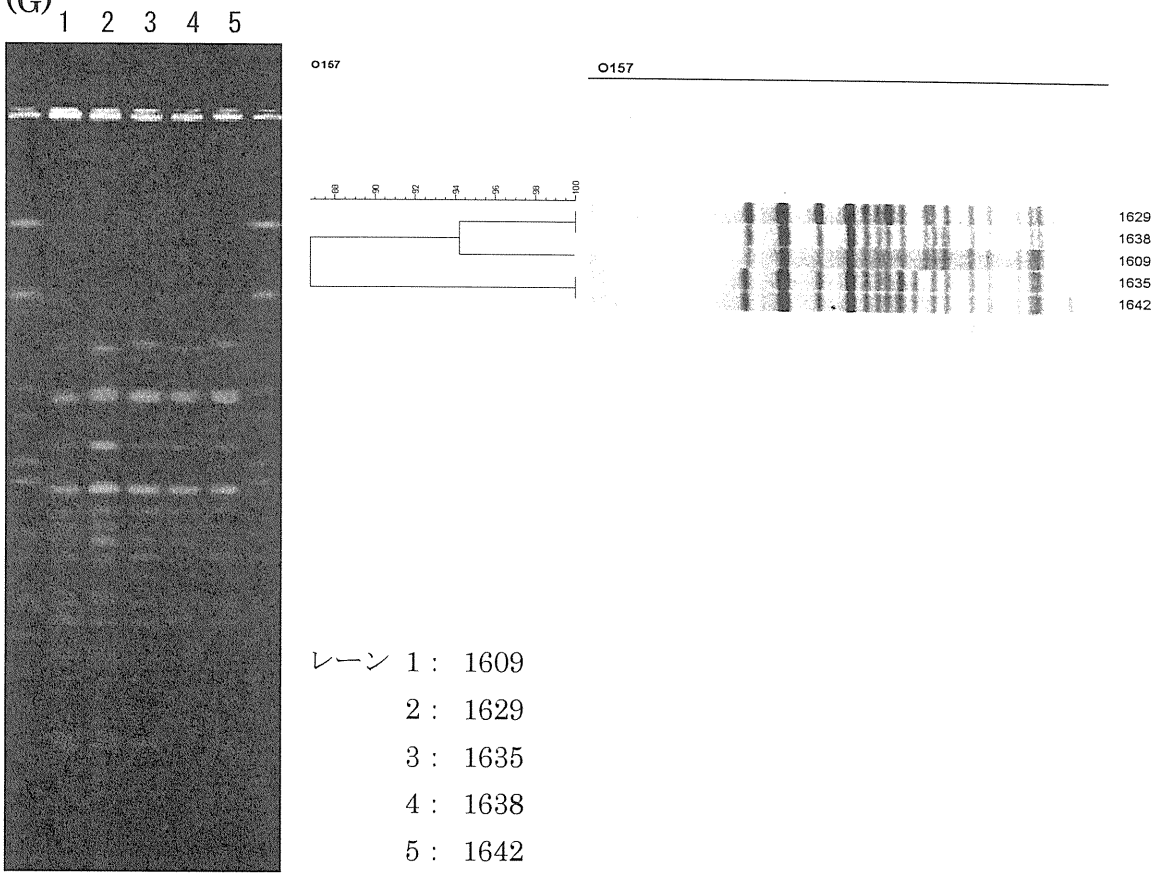


レーン 1 : 1609
2 : 1629
3 : 1635
4 : 1638
5 : 1642

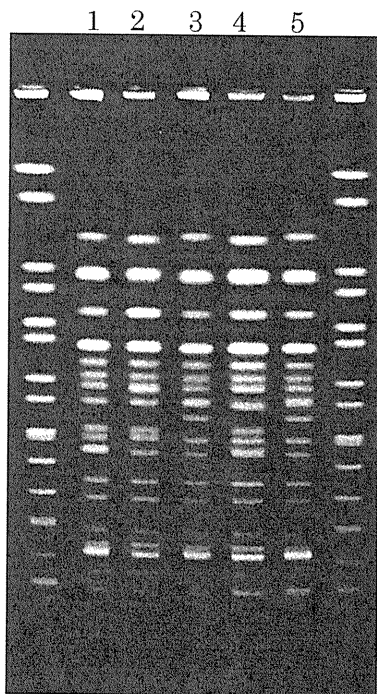
(F)



(G)



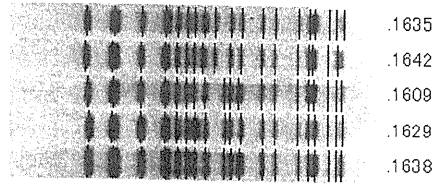
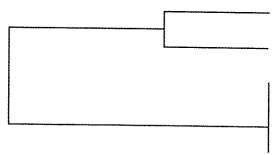
(H)



Dice (Tol1.0%-1.0% (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%])
PFGEパルスネット-O157

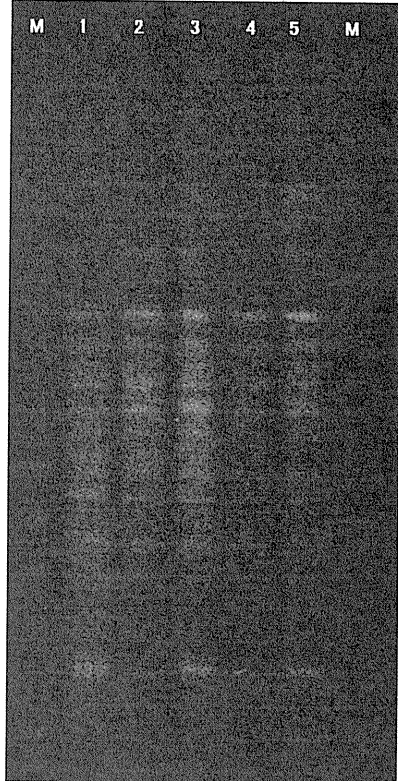
PFGEパルスネット-O157

94 96 98 100



- レーン 1 : 1609
- 2 : 1629
- 3 : 1635
- 4 : 1638
- 5 : 1642

(I)



- レーン 1 : 1609
- 2 : 1629
- 3 : 1635
- 4 : 1638
- 5 : 1642

表1 各施設のデンドログラムによるPFGEパターンの解析結果とPFGE型

施設記号	PFGEパターンが一致した菌株No				
	1609	1629	1638	1635	1642
A	●	●			
B	●	●	●		
C	●	●			
D		●	●		
E	●	●		◎	◎
F	●	●		◎	◎
G		●	●	◎	◎
H	●	●	●		
感染研PFGE型	g120	d342	g163	g161	g159

* ●、◎:PFGEパターンが同じ印同士で一致した。

図2 精度管理菌株の IS-printing System による遺伝子解析結果
IS-printing System 電気泳動像の比較

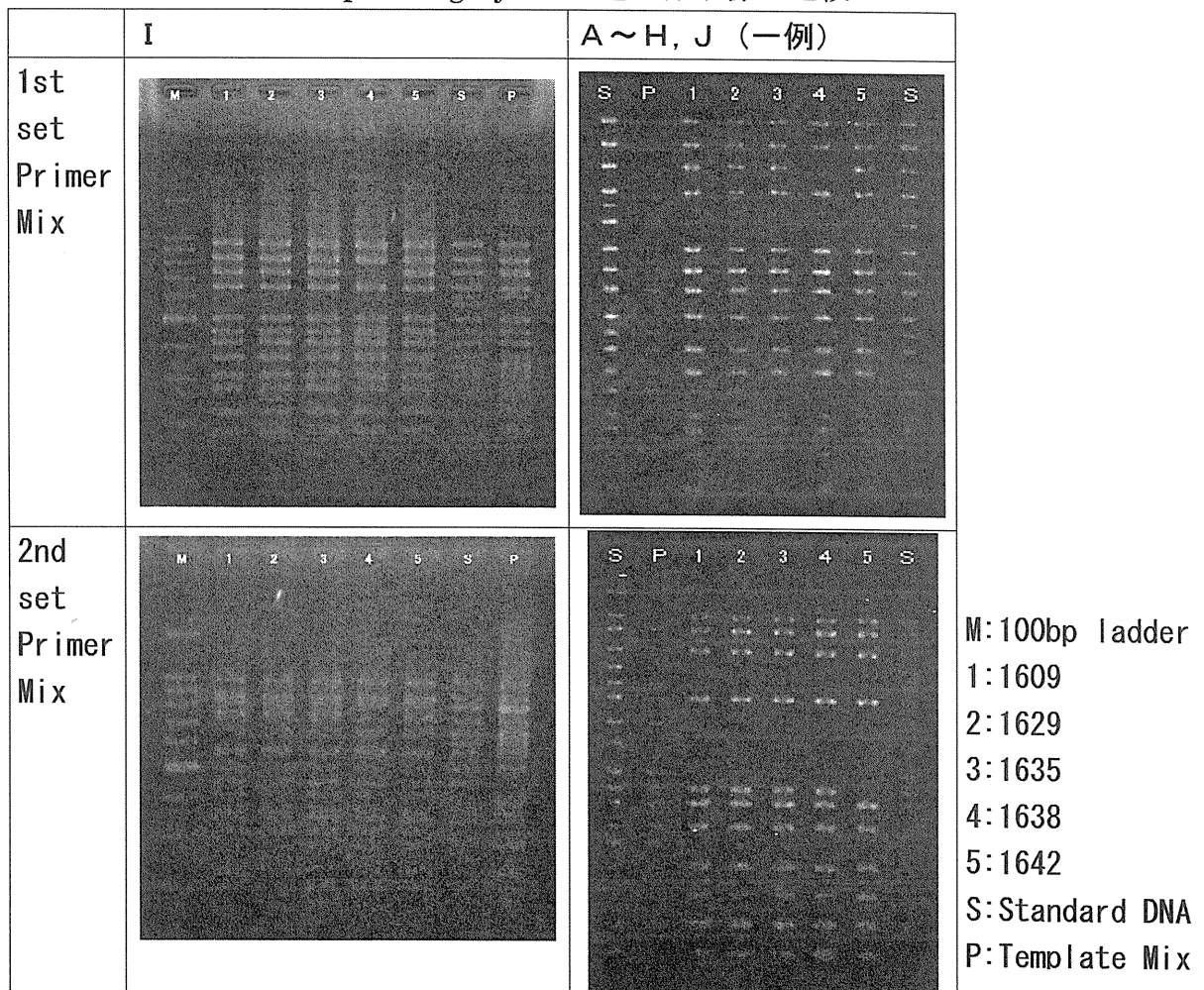


表2 各施設のIS-printing System結果

菌株No		1609																	
1st code		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	1-16	hlyA	
施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
2nd code		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	stx2	stx1
施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1629																	
1st code		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	1-16	hlyA	
施設	717572	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	
他施設	717577	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	
2nd code		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	stx2	stx1
施設	737777	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1635																	
1st code		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	1-16	hlyA	
施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
2nd code		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	stx2	stx1
施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1638																	
1st code		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	1-16	hlyA	
施設	317552	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
他施設	317557	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
2nd code		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	stx2	stx1
施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611657	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

菌株No		1642																	
1st code		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	1-16	hlyA	
施設	717552	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
他施設	717557	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	
2nd code		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	stx2	stx1
施設	737737	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
他施設	611457	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+

表3 中四国地域の県別患者等由来EHECO157株数

県名	分離株数
島根	8
岡山	25
広島県	30
広島市	18
山口	17
徳島	10
香川	5
愛媛	12
高知	2
計	127

表4 中四国地域の患者等由来EHEC O157のISコード一覧

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	株数
012057	214442	4
012057	214443	2
013057	214443	2
101457	310457	1
104057	303403	1
106577	201657	1
113577	600657	1
114057	303443	1
115057	303443	2
117175	201757	1
117175	601547	1
117177	201757	1
145047	303442	1
155047	341446	1
155047	343443	2
175247	303445	1
300457	110406	1
305057	311443	1
305457	611242	1
305457	611642	1
307575	211757	1
311057	310457	1
311557	710413	1
312577	610657	2
313575	610655	1
317477	611755	1
317477	611756	2
317557	611657	4
317575	611756	1
317575	611757	1
317577	211757	4
317577	611755	1
317577	611756	2
317577	611757	3
345057	311652	7
345457	311652	5
517557	601657	1
613571	610446	1
613575	610446	5
613577	610646	2
615457	311656	1
617575	231547	1
713557	610457	1
715577	611257	1
717557	611457	1
717557	611653	5
717557	611657	15
717575	611657	9
717577	251457	2
717577	611653	1
717577	611657	17
ISコード計:	51種類	127

表5 中四国地域で患者等から多数分離されたEHEC0157のISコード

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	発生日	分離県	株数
613575	610446	7~8	C	1
			D	1
			G	3
717557	611657	7~9	A	2
			B	1
			C	3
			E	6
			F	2
			G	1
717575	611657	7~10	A	3
			B	4
			C	1
			H	1
717577	611657	6~9	A	2
			B	13
			C	1
			I	1

中四国ブロックにおける腸管出血性大腸菌 O157 を用いた
パルスフィールドゲル電気泳動システム (PFGE) と IS-printing system の精度管理
研究協力者 花原悠太郎 上田豊 (施設名) 鳥取県衛生環境研究所

研究要旨

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」に参画し、今年度の腸管出血性大腸菌 O157 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動システム (PFGE) と IS-printing system の精度管理の結果を報告した。

結果として PFGE では 2 種に分類され、IS-printing system では PFGE に即してさらに複数に分類された。疫学調査等も踏まえるとより信頼性の高い解析が可能になると考えられた。

A. 研究目的

PFGE および IS-printing system の手法を学ぶ。

B. 研究方法

1. 菌株及び供試菌液

供試菌株は、精度管理用として供与された STEC O157 No. 1609, No. 1629, No. 1635, No. 1638, No. 1642 の 5 菌株を用いた。(以降菌株 No.の小さい順に 1,2,3,4,5 と呼ぶこととする)

これらの菌株を TSB に接種し、36 °C で 17 時間静置培養後供試菌液とした。

2. 手法

(1) PFGE

供試菌液 200 μl を 1.5 ml マイクロチューブに取り、遠心し上清を除去後、滅菌蒸留水 150 μl を加え、よく懸濁した。この懸濁液を用いて、プラグを作成し、Proteinase K 処理、制限酵素 (Xba 1) 処理した。泳動は CHEF DR II (BIO-RAD : 条件 6V/cm, 2.2~54.2 sec) を使用し行った。マーカーとして Salmonella Braenderup H9812 を使用した。

(2) IS-printing system

平板培地上で一晩培養した単一コロニーを用いた。IS-printing system (TOYOBO) の取扱説明書に従って処理し、PCR 後電気

泳動した。バンドの有無により有る方を 1、無い方を 0 として表を作成しそれぞれの菌株について類似性を比較した。

C. 研究結果

PFGE の解析結果は菌株 1,2,4 が同じパターン、菌株 3,5 が同じパターンを示した。前者を A、後者を B として分類した。

IS-printing system の解析結果は PFGE において分類された A の 3 株はそれぞれ別々のパターンを示した。B の 2 株は同一のパターンを示した。また菌株 1 は B の分類と同じパターンだった。PFGE と IS-printing system の結果を表 a、図 a,b,c に示した。

D. 考察と結論

供与された菌株 3,5 は PFGE, IS-printing system 双方の結果より同一菌株である可能性が高いと考えられた。また菌株 1,2,4 はそれぞれ異なる菌株である可能性が高いと考えられた。疫学調査も踏まえて解析することでより信頼性の高い分析が出来ると考えられた。

E. 参考文献

1) 清水俊一, 森本洋, 駒込理佳, 山口敬治. 2009. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 を用いたパルスフィールドゲル電気泳動システム

(PFGE) と IS-printing system の比較検討. 北海道衛生研究所年報, 59, 67-71.

2)金子紀子, 大谷勝美, 青木敏也. 2008. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の PFGE および IS-printing system による分子疫学解析. 山形県衛生研究所年報, 41, 29-31.

3)浅井紀夫, 中嶋智子, 柳瀬杉夫, 三谷亜里子, 河村絵美, 小嶋新也. 2010.京都府内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例の IS-printing system およびパルスフィールド電気泳動法を用いた疫学解析. 京都府保

環研年報,55,18-21

記入様式

A 4 サイズ 文字数 : 42 行数 : 38

文字 : MS明朝 英数字 : century

文字ポイント : 11 ポイント

余白 : 上下左右 30mm

研究要旨以下本文 2 段組

図表は末尾に A 4 サイズにまとめる

表 a

IS-printing System結果

PFGE分類		A	A	A	B	B
菌株No.		1	2	4	3	5
Primer No.	Size(bp)					
1-01	974	1	1	1	1	1
1-02	839	1	1	1	1	1
1-03	742	1	1	0	1	1
1-04	645	1	1	1	1	1
1-05	595	0	0	0	0	0
1-06	561	0	0	0	0	0
1-07	495	1	1	1	1	1
1-08	442	1	1	1	1	1
1-09	405	1	1	1	1	1
1-10	353	1	1	1	1	1
1-11	325	0	0	0	0	0
1-12	300	1	1	1	1	1
1-13	269	1	1	1	1	1
1-14	241	0	1	0	0	0
1-15	211	1	1	1	1	1
eae	185	0	0	0	0	0
1-16	171	1	1	1	1	1
hlyA	137	0	0	0	0	0
Primer No.	Size(bp)					
2-01	987	1	1	1	1	1
2-02	861	1	1	1	1	1
2-03	801	1	1	1	1	1
2-04	710	1	1	1	1	1
2-05	642	1	1	1	1	1
2-06	599	0	0	0	0	0
2-07	555	1	1	1	1	1
2-08	499	1	1	1	1	1
2-09	449	1	1	1	1	1
2-10	394	1	1	1	1	1
2-11	358	1	1	1	1	1
2-12	331	1	1	1	1	1
2-13	301	1	1	1	1	1
2-14	278	1	1	1	1	1
2-15	240	0	1	0	0	0
2-16	211	1	1	1	1	1
stx2	181	1	1	1	1	1
stx1	151	1	1	1	1	1

1・・・バンド有り
0・・・バンド無し

図 a : PFGE

(右からマーカー、1、2、3、4、5、マーカー)

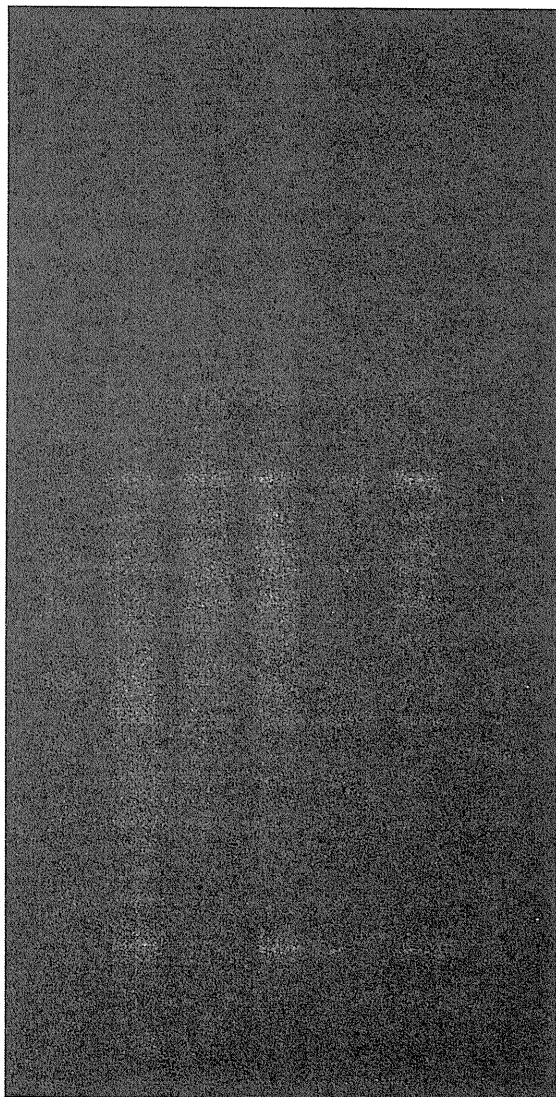


図 b : IS-printing system 1st set

(右からマーカー、1、2、3、4、5、スタンダード、ポジコン)

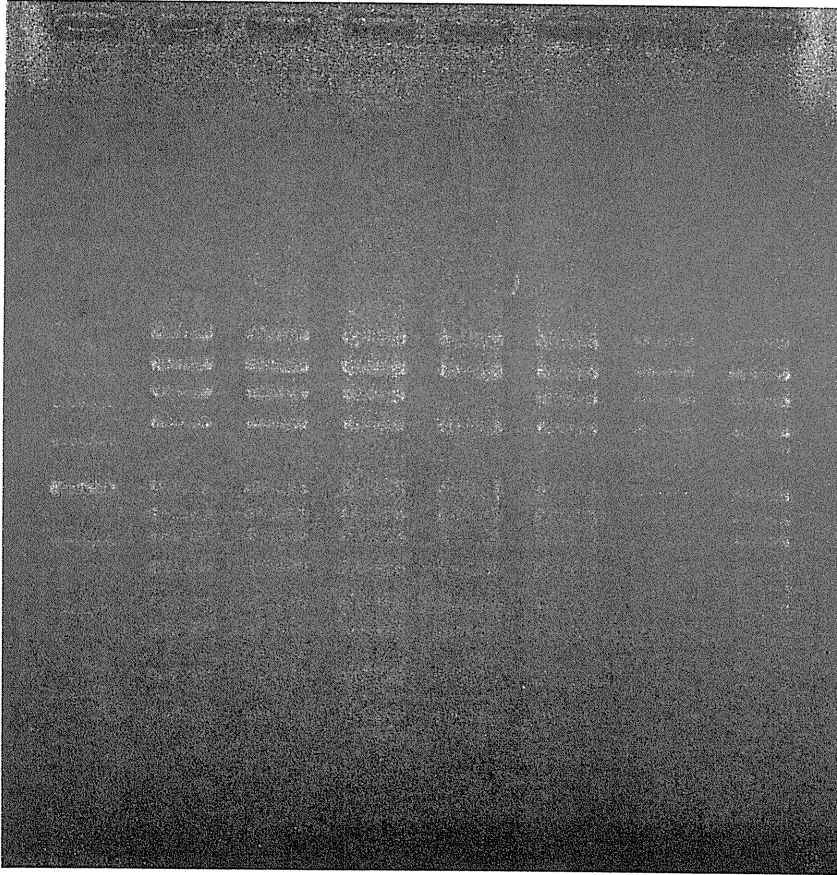
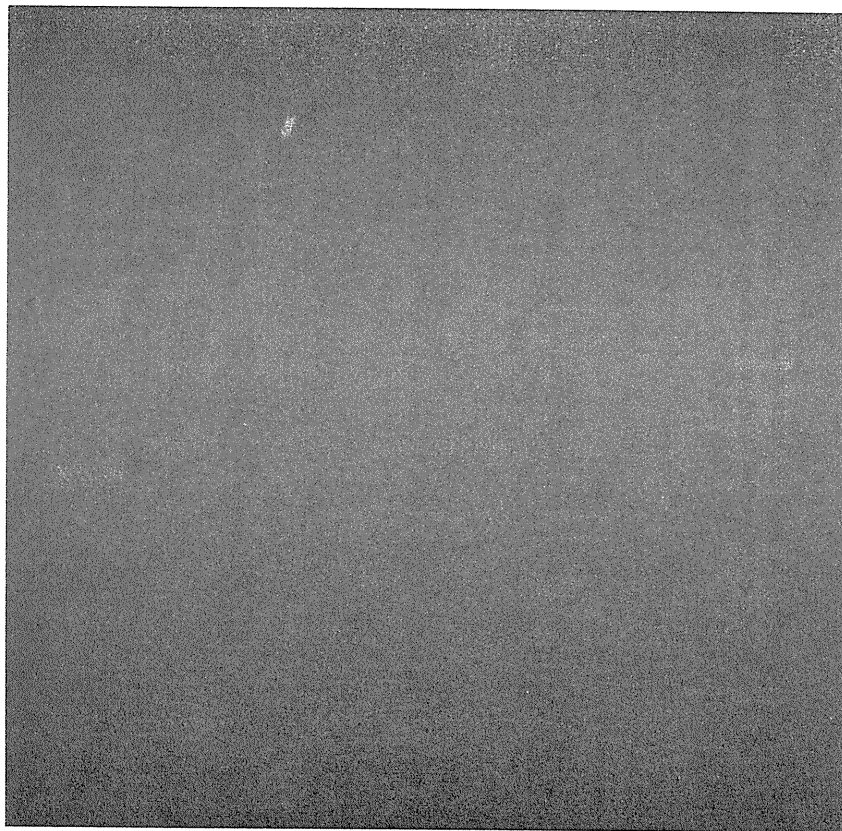


図 c : IS-printing system 2nd set

(右からマーカ、1、2、3、4、5、スタンダード、ポジコン)



島根県における IS printing 法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 島根県保健環境科学研究所

榎本 孝史 黒崎 守人

研究要旨

平成 23 年度中に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157（以下 O157）8 株について IS printing 法による分子疫学的解析を行った。

2 株（2 事例）間で同一の IS コードを示したが、疫学的な関連性は見出せなかった。

IS printing 法よる結果はデジタルデータであるためデータベース化は比較的容易であり、そのデータベースを活用できるシステムが構築されれば、広域での発生の有無を比較的迅速に探知でき、疫学調査を実施する上で有用であると思われる。

A. 研究目的

島根県内の O157 感染症の発生事例について IS printing 法を用いた分子疫学解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株（表）

平成 23 年度中に島根県内で届出のあった O157、8 株（8 事例）を用いた。

2. 方法

(1) IS printing 法

IS printing System(東洋紡)の説明書に記載された方法に準じて実施した。

電気泳動は、3%濃度の NuSieve GTG : SeaKem GTG=2:1 アガロース、0.5×TBE バッファーを用い、サブマリン型電気泳動装置で 120V 120 分を行った。

IS printing の結果は、各プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、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、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化（以下 IS コ

ード）した。

また、電気泳動像および IS コードを県庁の感染症主管課に報告した。

(2) パルスフィールドゲル電気泳動（以下 PFGE）法

国立感染症研究所（以下感染研）に菌株を送付し解析を依頼した。

C. 研究結果

島根県で発生した平成 23 年度の O157 感染症は 8 件（8 事例）であった。事例 1 と 8 は同一の IS コードを示したが、これ以外に同一の IS コードを示した事例はなかった。両事例では患者の住所地が半径 10km 以内と近接していることから何らかの関連性が疑われたが共通の感染源は認められなかった。

感染研の PFGE 法による解析では平成 22 年 6 月の山口県、8 月の尼崎市での散発事例と事例 1 の菌株のパターンは同じであった。事例 8 については現在検査依頼中である。事例 4 は平成 23 年 7 月の大阪府の散発事例由来株と同じパターンであった。

D 考察

事例1と8は同一のISコードを示し、患者の住所地も近接していることから共通の感染源が疑われたが、事例間で5ヶ月経過していることから疫学的関連性の有無についての再調査は困難であった。事例1のPFGE法による解析によると平成22年6月の山口、8月の尼崎での散発事例と同一のパターンであることから、長期にわたり汚染されたものが流通している可能性が示唆された。

IS printing法はPFGE法と比べ、迅速性と簡便性に優れており、結果をリアルタイムに提供でき、疫学調査において有力な分子疫学解析の手法である。事例1と8のように相当程度の時間差がある際は疫学調査が困難な場合もあるが、解析結果はデジタルなデータであるためデータベース化は比較的容易であると思われ、データベースを活用できるシステムが構築できれば、事例1や事例4のように広域での発生の有無を比較的迅速に探知でき有用と思われる。一方、既報¹⁾のとおり非特異的バンドの増幅の有無や位置により異なった結果と示すことがある。今回実施した結果(図1,2,3)においても、非特異的バンドが増幅され、バンドの位置により紛らわしいことがあった。原因として高濃度のテンプレートDNAを用いたこと等が考えられたため、テンプレートDNAの調整時に注意が必要と思わ

れた。

E 結論

- 事例1と8は同一のISコードを示したが、事例間で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。
- IS printing法による結果はデジタルデータであるためデータベース化は比較的容易であり、そのデータベースを活用できるシステムが構築できれば、広域での発生の有無を比較的迅速に探知でき、疫学調査を実施する上で有用であると思われる。
- 非特異的バンドの増幅の有無や位置により判定結果に影響することもあることから、精度管理は重要と思われた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 中嶋 洋 他(2011): 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22年度 総括・分担研究報告書,116-119

表 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	H型	IS printingコード		PFGE type No (感染研)	備考
						1st set	2nd set		
①	1	H23.6.7	M市	2	7	1 5 5 0 4 7	3 4 3 4 4 3	f120	焼き肉店で生レバーを喫食。
②	2	H23.6.11	O市	1,2	UT	3 0 0 4 5 7	1 1 0 4 0 6	g252	特記事項なし。
③	3	H23.7.4	M市	1,2	7	7 1 7 5 7 7	6 1 1 6 5 7	c610	自宅で牛肉の野菜炒めを喫食。
④	4	H23.7.27	I市	1	UT	3 1 7 5 7 7	6 1 1 7 5 5	g171	馬術部で馬の糞尿の世話実施。
⑤	5	H23.8.22	Y市	1,2	UT	6 1 5 4 5 7	3 1 1 6 5 6	g440	特記事項なし。
⑥	6	H23.10.7	I市	2	7	3 5 4 4 5 7	3 1 1 6 5 2	検査依頼中	特記事項なし。
⑦	7	H23.10.3	I市	2	7	3 0 5 0 5 7	3 1 1 4 4 3	検査依頼中	特記事項なし。
⑧	8	H23.11.15	M市	2	7	1 5 5 0 4 7	3 4 3 4 4 3	検査依頼中	自宅で焼き肉を喫食。

SD ① ② ③ ④ TM SD ① ② ③ ④ TM

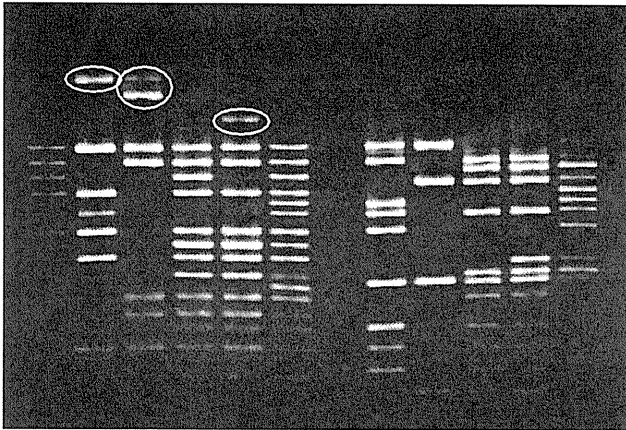


図1 菌株 No.①～④ (事例 1～4) の IS printing の電気泳動像 (左: 1st set、右: 2nd set)

SD: スタンダード DNA (泳動コントロール)、

①～④: 菌株 No.①～④

TM: テンプレートミックス (PCR コントロール)。

○: 非特異的バンド

以下同様。

SD ⑤ ⑥ ⑦ TM SD ⑤ ⑥ ⑦ TM

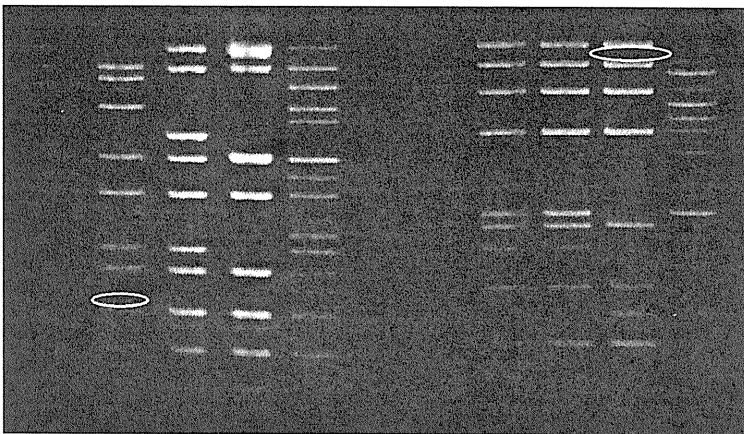


図2 菌株 No.⑤、⑥、⑦ (事例 5, 6, 7) の IS printing の電気泳動像

SD ⑧ TM SD ⑧ TM

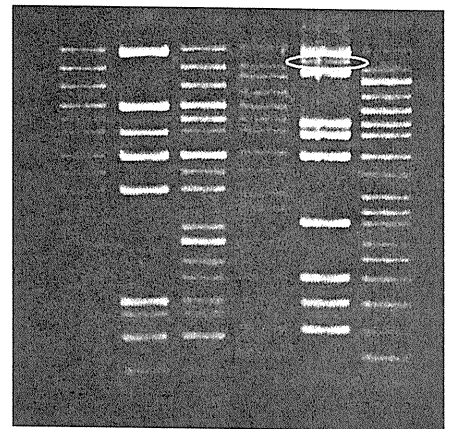


図3 菌株 No.⑧ (事例 8) の IS printing の電気泳動像

腸管出血性大腸菌 O145 の疫学的解析法についての検討

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

研究要旨

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O145 の疫学的解析法を検討するため、パルスフィールド・ゲル電気泳動法、Random Amplified Polymorphic DNA 法、プラスミドプロファイルおよび病原因子検査を実施した。その結果、パルスフィールド・ゲル電気泳動法が、最も菌株間の識別能力が高かった。また、Random Amplified Polymorphic DNA 法も、パルスフィールド・ゲル電気泳動法と良い相関がみられ、迅速で簡便な疫学的解析法として有用と考えられた。一方、プラスミドプロファイルと病原因子検査では菌株間の明確な識別はできなかった。しかし、集団感染等の事例においては、プラスミドの保有状況が菌株間の関連性を検討するための一つの指標として利用できるものと考えられた。

A. 研究目的

本県では、年間 100 件前後の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症が発生している。その主要な血清型は O157 であるが、近年、O145 による EHEC 感染症も発生している。この O145 は、本県では 2001 年に初めて分離され、その後分離されない年もみられたが、2011 年には O157 に次いで多く分離されるようになり、今後注意しておく必要のある血清型と考えられる。

これまで、これら EHEC の疫学的解析は、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法で行われてきたが、解析に時間を要し、手技が煩雑で迅速性にかけることから、迅速性・簡便性に優れた新たな解析法が求められてきた。そうしたなか、O157 については、PFGE 法と比べて若干識別能は劣るが、集団発生や散发事例では高い識別能を有し、迅速で簡便な 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。一方、O145 については、これまで疫学

解析された報告が少なく、IS 法のような簡易解析法も開発されていない。そのため、今回我々は、県内で分離された O145 について、PFGE 法、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法、プラスミドプロファイルおよび病原因子検査を行い、疫学解析に有用なそれぞれの識別能について検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

表 1 に示す 2001 年から 2011 年に分離された EHEC O145:H-, 32 株を用いた。

2. 方法

(1) 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。

(2) RAPD 法

PCR 反応は、Padola ら¹⁾の条件に従い実施した。プライマーは、970-11²⁾をカスタム合成して用いた。テンプレート DNA には、Mc Farland 0.5 に調整した

菌液からアルカリ熱抽出法で DNA 抽出したものをを用いた。

(3) プラスミドプロファイル

Kado ら³⁾の方法により、プラスミドを抽出し、0.6%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイド染色を行い判定した。

(4) 病原因子検査

病原因子は、中村ら⁴⁾の報告に従い、インチミン遺伝子 (*eaeA*) とエンテロヘモリシン遺伝子 (*hlyA*) の保有状況を PCR 法により検査した。なお、テンプレート DNA は、RAPD 法で調整したものをを用いた。

C. 研究結果

解析結果を、表 1 に示した。なお、PFGE 型および RAPD 型は、同一タイプに型別されたものをそれぞれアルファベットで標記した。

(1) PFGE 法

供試株は、6 タイプに型別された。このうち、2007 年に分離された VT1 型株は、A 型、B 型、C 型の 3 タイプに型別されたが、それぞれの PFGE パターンの違いは、切断断片が 1, 2 本程度の差異であり、類似していた。2010 年と 2011 年に分離された VT2 型株は、分離年により、D 型と E 型の 2 タイプに分かれた。また、2011 年に分離された VT1, 2 型株は、いずれも F 型に型別され、分離年と VT 型によって PFGE 型はそれぞれ異なった。

(2) RAPD 法

供試株は、7 タイプに型別された。その泳動パターンを図 1 に示した。2011 年に家族事例から分離された 2 株 (No.27, 28) を除き、分離年と VT 型によって

RAPD 型はそれぞれ異なった。また、RAPD 法と PFGE 法の型別結果には、良い相関が認められた。PFGE 型別が行われていない 2001 年と 2006 年の分離株は、いずれのタイプとも異なった。

(3) プラスミドプロファイル

供試株は、2 タイプに型別された。その泳動パターンを図 2 に示した。すべての株が 70Kbp のプラスミドを保有し、No.1 を除き、いずれも単独保有であった。No.1 は、それ以外にも 4 個 (77, 53, 6.3, 5.0Kbp) のプラスミドを保有し、他の O145 とは異なった。

(4) 病原因子の保有状況

供試株はいずれも *eaeA* と *hlyA* を保有し、菌株間の差異は認められなかった。

D. 考察

これまで疫学的解析報告が少なかった EHEC O145:H- について、種々の解析法を検討した結果、PFGE 法が最も識別能力が高かったが、RAPD 法も PFGE 法と良い相関がみられ、O145 の疫学的解析法として有用と思われた。特に PFGE 法では、2007 年に分離された一連の株が 3 タイプに型別されたものの、これらの PFGE パターンは非常に類似していたことから、微妙な株の変異をも捕えたものと考えられ、PFGE 法は非常に精度の高い解析法であることが分かった。また、この結果から、2007 年の一連の発生は、単一株に起因した散発型集団感染 (Diffuse Outbreak) の可能性が高いと考えられた。

RAPD 法は、今回検討した手法の中でも PFGE 法と良い相関がみられ、同じ VT 型の株であっても、PFGE 法と同様に分離年の違いにより異なる型を示して

いたことから、PFGE 法に次ぐ識別能力を有していた。そのため、PFGE に比べて、迅速性および簡便性に優れた簡易な疫学的解析法として有用であると考えられた。しかし、2007 年の Diffuse Outbreak と思われる一連の株において、PFGE 法では僅かな株の変異を捕え 3 タイプに型別されたものが、RAPD 法ではすべて同じ型に型別されており、今回用いたプライマーでは、微妙な遺伝子の違い（サブタイプ）を解析することは難しいと考えられた。また、2011 年に分離された VT2 型の家族事例 (No.27, 28) においては、PFGE 法では同一型を示したものの、RAPD 法では異なる型を示しており、これが株の変異を捕らえたものか、それ以外の要因によるものかは分からなかった。

一方、プラスミドプロファイルと病原因子の検査では、明確な型別はできなかった。このうち、プラスミドについては、本報では 1 個 (70Kbp) または 5 個 (77, 70, 53, 6.3, 5.0Kbp) のプラスミドを保有する 2 タイプが検出されたが、Sonntag ら⁹⁾は、165Kbp や 135Kbp と大きなものから 2.5Kbp と小さなものまでの種々のサイズのプラスミドを 1~4 個保有する、29 タイプの O145 を報告している。このことから、O145 は菌株によって多様なプラスミドを保有することが示唆され、集団感染等が考えられる事例においては、その保有状況が疫学的な指標の一つとして利用できるものと考えられた。

今回対象とした EHEC O145 感染症は、わが国では 1984 年の東京都内の小学校における集団事例⁹⁾を初発とし、その後は年間数件程度で推移していた。しかし、

2008 年以降は、本県を含めた複数の県において保育所や幼稚園で集団発生したことから、O145 感染症の報告数は年間数十件に増加している。これらの多くは O145:H-によるものであるが、これまで本血清型の株について詳細な疫学解析がされた報告は少ない。この理由の一つとして、比較的新しい血清型であるため、2005 年に抗血清が市販されるまでの間、民間の検査機関等では血清型の同定が難しく、精査されていなかった可能性が考えられる。しかし、近年の報告数の増加を考慮すると、今後は O157 に続き注意が必要な血清型と思われ、IS 法のような迅速性・簡便性に優れた精度の高い解析法を検討するための、基礎データの集積が必要となると考えられた。

E. 結論

EHEC O145 の疫学的解析法について検討したところ、PFGE 法が最も高い識別能力を有していた。しかし、RAPD 法も一部の変異株を除けば PFGE 法と同等の識別能力が認められ、さらに、PFGE 法よりも迅速性・簡便性に優れていることから、事案発生時のスクリーニング法として有効な解析法の一つと考えられた。また、プラスミドプロファイルも、集団感染等の事例においては、菌株間の関連性を検討するための指標の一つとして利用できるものと考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Padola NL, Sanz EM, Lucchesi PM, Blanco JE, Blanco J, Blanco M,