

- Etcheverría AI, Arroyo GH, Parma AE. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. BMC Microbiol. 2002;2:6.
- 2) Birch M, Denning DW, Law D. Rapid Genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1996; 15:297-302.
- 3) Kado CI, Liu ST. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J Bacteriol. 1981;145(3):1365-1373.
- 4) 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大腸菌について. 福岡県保健環境研究所年報. 2008;35:59-64.
- 5) Sonntag AK, Prager R, Bielaszewska M, Zhang W, Fruth A, Tschape H, Karch H. Phenotypic and Genotypic Analyses of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 Strains from Patients in Germany. J Clin Microbiol. 2004;42: 954-962.
- 6) 伊藤武, 甲斐明美, 斉藤香彦, 柳川義勢, 稲葉美佐子, 高橋正樹, 高野伊知郎, 松下秀, 工藤泰雄, 寺山武 他. Cytotoxin を産生する *Escherichia coli* O145:H- による集団食中毒の細菌学的・疫学的検討. 東京衛研年報. 1985;36:16-22.

表 1 EHEC O145:H- の解析結果

菌株 No.	分離年	VT型	PFGE型	RAPD型	保有プラスミド(Kbp)	病原因子		疫学情報
						<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	
1	2006	1	Not tested	g	77, 70, 53, 6.3, 5.0	+	+	散発
2	2007	1	A	f	70	+	+	
3	2007	1	B* ¹	f	70	+	+	家族
4	2007	1	A	f	70	+	+	
5	2007	1	B	f	70	+	+	
6	2007	1	B	f	70	+	+	家族
7	2007	1	B	f	70	+	+	
8	2007	1	A	f	70	+	+	家族
9	2007	1	B	f	70	+	+	
10	2007	1	B	f	70	+	+	
11	2007	1	B	f	70	+	+	家族
12	2007	1	A	f	70	+	+	
13	2007	1	B	f	70	+	+	
14	2007	1	B	f	70	+	+	
15	2007	1	A	f	70	+	+	家族
16	2007	1	A	f	70	+	+	
17	2007	1	B	f	70	+	+	
18	2007	1	C* ²	f	70	+	+	家族
19	2007	1	A	f	70	+	+	
20	2007	1	A	f	70	+	+	散発
21	2007	1	B	f	70	+	+	散発
22	2007	1	B	f	70	+	+	散発
23	2007	1	B	f	70	+	+	散発
24	2007	1	A	f	70	+	+	散発
25	2010	2	D	c	70	+	+	
26	2010	2	D	c	70	+	+	家族
27	2011	2	E	d	70	+	+	
28	2011	2	E	e	70	+	+	家族
29	2001	1,2	Not tested	a	70	+	+	散発
30	2011	1,2	F	b	70	+	+	
31	2011	1,2	F	b	70	+	+	家族
32	2011	1,2	F	b	70	+	+	散発

*¹ one band diffr. from A

*² two bands diffr. from A

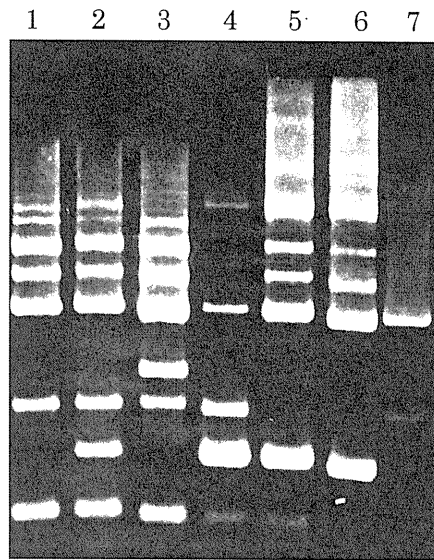


図1 RAPD 法による EHEC O145:H- の型別パターン

Lane 1 : a型 2 : b型 3 : c型 4 : d型

5 : e型 6 : f型 7 : g型

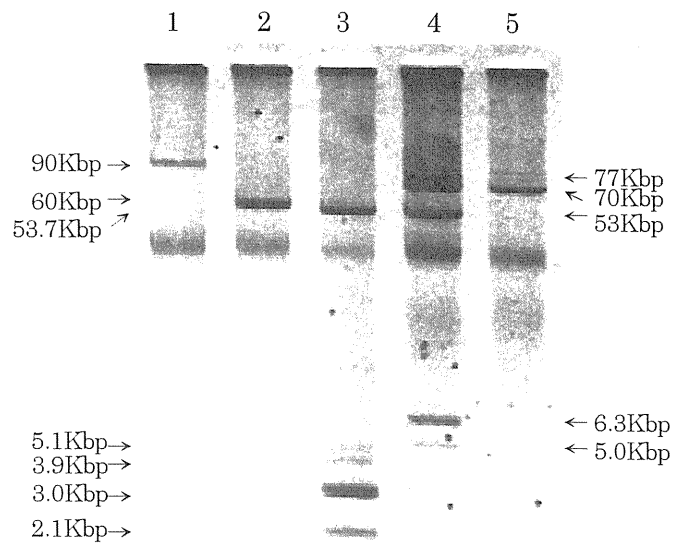


図2 EHEC O145:H- のプラスミドプロファイル

Lane 1 : マーカー (*S. Typhimurium* : 90Kbp)

2 : マーカー (*S. Enteritidis* : 60Kbp)

3 : マーカー (*E. coli* V517 : 53.7Kbp, 5.1Kbp, 3.9Kbp, 3.0Kbp, 2.1Kbp)

4 : O145:H- (77Kbp, 70Kbp, 53Kbp, 6.3Kbp, 5.0Kbp)

5 : O145:H- (70Kbp)

広島県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing System 法による疫学的解析
－ 新しい IS コードによる解析の試み －

研究協力者

広島県立総合技術研究所保健環境センター	竹田義弘	山田裕子	河村美登里
広島市衛生研究所	田内敦子		
岡山県環境保健センター	中嶋 洋	大島律子	石井 学
山口県環境保健センター	富永 潔	矢端順子	亀山光博
島根県保健環境科学研究所	黒崎守人	樫本孝史	
鳥取県衛生環境研究所	花原悠太郎		
香川県環境保健研究センター	宮本孝子		
愛媛県立衛生環境研究所	松本純子		
徳島県立保健製薬環境センター	下野生世	石田弘子	
高知県衛生研究所	藤戸亜紀		

研究要旨

IS-printing System 法の数字による 12 桁 (6 桁 2 組) の IS コードを、アルファベットと数字による短い IS コードに再変換し、2010 年度に中国・四国ブロックの地方衛生研究所から報告された O157, 273 株と 2011 年に県内で分離された O157, 30 株との関係を検討した。2010 年度に報告された O157 は 93 タイプにタイピングされた。また、2011 年に県内で分離された O157 は 12 タイプにタイピングされ、そのうち 2010 年度に広島県を含む中国・四国の 5 県 1 市から報告された BJ44 タイプが最も多かった。その他のタイプも 2010 年度に報告されたものが多かったが、新しい 4 タイプ (N20, AG59, BM11, BQ26) も認められた。また、短い IS コードにより菌株間の比較が容易となった。

A. 研究目的

近年、腸管出血性大腸菌 O157 の疫学的解析法として IS-printing System (IS) 法が、従来からのパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法と比べて迅速性・簡便性に優れた手法として注目されている。IS 法は、O157 に挿入された多種の配列 (Insertion Sequence : IS) の中で挿入数の多い IS629¹⁾ から選択された 32 カ所の部位と *eae*, *hlyA*, *stx1* 及び *stx2* の 4 種類の病原因子の 36 カ所を、18 カ所ずつ 2 組のプライマー (1st set primer, 2nd set primer) を用いた multiplex

PCR 法で増幅させ、それぞれの部位の増幅の有無を数値化 (増幅無し : 0, 増幅有り : 1) して 36 桁 (18 桁 2 組) の IS コードで O157 のタイピングを行うものである。しかし、「0」、「1」で表された IS コードは桁数が多く複雑で、パソコンによる並び替え (以下、データ処理) などを行わないと比較が難しいなどの問題があった。そのため現在では、各組の 18 桁を 3 桁ずつ 6 区分して、それぞれ増幅サイズの大きいバンドから順に「1」、「2」、「4」の係数を付与し、増幅のあるバンドの係数だけを乗じて 6 桁の数値にコード

変換する手法²⁾等が考案され、中国・四国ブロックの地方衛生研究所もその手法を利用して菌株のタイピングを行っている。しかし、その手法においても2組のプライマーでは12桁(6桁2組)のISコードとなり、まだ桁数も多く、類似したISコードもあるため、データ処理などを行わないと多くの検体の比較が難しいこともある。そのため今回、中国・四国ブロックで使用されている12桁(6桁2組)のISコードを、短い桁数のISコードに再変換し、2010(平成22)年度に中国・四国ブロックの地方衛生研究所から報告されたO157と2011年に県内で分離されたO157との関係について疫学的検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株のISコード

(1) 中国・四国ブロック分離株

2010年度の総括・研究分担報告書に報告されたO157, 273株(岡山県39株^{3,4)}, 島根県16株⁵⁾, 広島県21株⁶⁾, 広島市23株⁷⁾, 徳島県20株⁸⁾, 香川県23株⁹⁾, 愛媛県12株¹⁰⁾, 高知県9株¹¹⁾, 山口県110株(2010年度以前に分離された株も含む。)¹²⁾のISコードを使用した。

(2) 県内分離株

2011年1月から10月までに県内で分離されたO157, 30株を、IS-printing System (TOYOBO)を用いて使用書に従ってテンプレートの作成とPCRによる増幅を行い、検出されたバンドからISコードを求めた。

2. 新しいISコードへの変換方法

12桁(6桁2組)のISコードを、各組の6桁ごとにデータ処理を行い、1st set primerのコードについては、数値の

小さい順からアルファベットのAからZ(Z以降はAA~AZ, BA~BZ, 以下同様), 2nd set primerについては、同様に数字の1から順に番号を付けて、両方の組み合わせで新しいISコードに変換した。なお、各組のISコードの中で、0(ゼロ)で始まるコードについては5桁のコードとなるため、0をアルファベットのo(小文字)に変えてデータ処理を行った。

C. 研究結果

1. 供試菌株の新しいISコードへの変換

(1) 2010年度に中国・四国ブロックから報告されたO157, 273株のISコードのうち、1st set primerのコードには68タイプが認められ、A~BPのアルファベットコードに再変換した。また、2nd set primerのコードには58タイプが認められ、同様に1~58の数字コードに再変換した。その2組のコードによる新しいISコードは、表1に示すA21~BP21の93タイプにタイピングされた。その多くは単県から報告されていたが、BJ44タイプは広島県を含む中国・四国の5県1市から報告され、最も報告数が多かった。次いでBH44タイプが多く、中国の3県1市から報告されていた。また、E21, F21, I33, Z40, AB44, AM44, AM46, AV35, BH44およびBJ42の10タイプは中国の複数の県から、B58, AF54, AN38, AP26, AT3, AX27, BC14およびBL10の8タイプは中国と四国の県から報告されていた。

(2) 2011年に県内で分離されたO157, 30株のISコードのうち、1st set primerのコードには10タイプが認められ、そのうち9タイプは前述の2010年度に報告されたコードと同一タイプであった。

新しい 1 タイプ (コード番号 345057) はアルファベットコードの BQ に再変換した。また, 2nd set primer のコードには 7 タイプが認められ, そのうち 6 タイプは同様に 2010 年度に報告されたコードと同一タイプであった。新しい 1 タイプ (コード番号 610655) は数字コードの 59 に再変換した。その 2 組のコードによる新しい IS コードは, 表 2 に示す N20 ~ BQ26 の 12 タイプにタイピングされた。そのうち BJ44 タイプが 13 株 (43.3%) と最も多く, 次いで BI44 タイプが 4 株と多かった。

2. 県内分離株の疫学的解析

2011 年に県内で分離された O157, 12 タイプのうち, AF54, AP26, BH42, BH44, BI44, BJ42, BJ44 および BL11 の 8 タイプ (66.7%) は 2010 年度にも報告されており, そのうち AF54, BH44, BI44, BJ42 および BJ44 の 5 タイプは, 県内においても分離されていた。また, 最も分離頻度の高かった BJ44 タイプは, 2010 年度に広島県を含めた中国・四国の 5 県 1 市から報告されたものと同じタイプであった。また, BJ44 タイプに次いで多かった BI44 タイプは, 2010 年度に広島市から報告されたものと同じタイプであった。一方, N20, AG59, BM11 および BQ26 の 4 タイプは, 2010 年度には県内および中国・四国からは報告されていない新しいタイプであった。

D. 考 察

今回, IS 法の 12 桁 (6 桁 2 組) の IS コードを, アルファベットと数字の組み合わせによる新たな IS コードに再変換し, 2010 年度に中国・四国ブロックから

報告された O157 と 2011 年に県内で分離された O157 との関係を検討した。その結果, 2010 年度には 93 タイプの IS コードが認められ, 多様なタイプの O157 が中国・四国に分布していることが明らかになった。

2011 年に県内で分離された O157 には 12 タイプの IS コードが認められ, 県内にも多様なタイプの O157 が分布していることが分かった。そのうち, 最も分離頻度の高かった BJ44 タイプは, 6 月~9 月にかけて分離されており散発型集団発生 (diffuse outbreak) が示唆された。この BJ44 タイプは, 2010 年度には広島県を含む中国・四国の広い地域からも報告されており, 広域型の集団発生も考えられ, 今後の動向に注意する必要がある。また, 2010 年度には報告されていない 4 タイプも認められ, 新たなタイプの O157 による感染も県内で発生していることが判明した。

IS 法は, PFGE 法と比べて型別能がやや劣るが, 集団発生や散発事例において高い型別能が認められており, 迅速で簡便な分子疫学的解析法として, その有用性が高く評価されている。今回検討したアルファベットと数字による 2 桁から 4 桁の短い IS コードによるタイピングは, これまでの 12 桁 (6 桁 2 組) から 36 桁 (18 桁 2 組) の数字のみの長い IS コードと比べて菌株間の比較が簡単であり, 行政サイドへの情報還元には便利な手法と思われた。そのため今後, 広域で分離された O157 との関連性が比較できるように, これまでに国内で報告された IS コードをデータベース化していく必要があると思われる。

E. 結 論

1. 従来の数字のみの長い IS コードをアルファベットと数字による短い IS コードに再変換することにより，菌株間の比較がより簡単に出来るようになった。

2. 2011 年に県内で分離された O157 のうち，分離株の約 4 割を占めた BJ44 タイプは，2010 年度にも広島県を含む中国・四国の広い地域から分離されており広域型の散発型集団発生（diffuse outbreak）も考えられ，今後の動向に注意する必要がある。

F. 研究発表

なし。

G. 参考文献

- 1) Ooka T., Terajima J., Kusumoto M., Iguchi A., Kurokawa K. et al.. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 2009 ; 47(9) : 2888-2894.
- 2) 勢戸和子, 河野智美, 野村憲一, 平野隆, 小笠原準 他. 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. 2008 : 101 - 128.
- 3) 大島律子, 石井学. 同一飲食店利用者における腸管出血性大腸菌 O157:H7 VT1,2 感染症の続発事例について. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 125 - 126.
- 4) 石井学, 大島律子. 腸管出血性大腸菌 O157 の IS-printing System を用いた分子疫学解析. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 127 - 131.
- 5) 黒崎守人. 島根県における IS printing 法による腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析の有用性の検討. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 132 - 135.
- 6) 山田裕子, 竹田義弘, 桑山勝. 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. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 136 - 141.
- 7) 末永朱美, 田内敦子, 宮野高光, 花木陽子, 国井悦子 他. 腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法の比較検討. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 142 - 148.
- 8) 下野生世, 石田弘子. 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. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 149 - 151.
- 9) 有塚真弓, 関和美, 宮本孝子, 内田順子. IS-printing System を用いた腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 152 - 155.
- 10) 浅野由紀子, 烏谷竜哉, 田中博. 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. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 156 - 161.
- 11) 藤戸亜紀, 松本一繁, 松本道明. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症事例での分子疫学的解析. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 162 - 165.
- 12) 富永潔, 矢端順子, 亀山光博. 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. 平成 22 年度 総括・研究分担報告書. 2011 : 166 - 179.

表 1 2010 年度に中国・四国ブロックの地方衛生研究所から報告された
O157 の IS コードと新しい IS コードとの関係

番号	ISコード		新しい ISコード	株数	分離* 地域	番号	ISコード		新しい ISコード	株数	分離* 地域
	1st set primer	2nd set primer					1st set primer	2nd set primer			
1	105057	303443	A21	1	Y	49	317557	611653	AM42	1	Y
2	105457	711642	B58	2	Y,T	50	317557	611657	AM44	3	Hc,Y
3	113157	600653	C30	1	T	51	317557	611756	AM46	4	H,O,S
4	114055	303643	D23	1	Y	52	317575	611257	AN38	4	Y,K
5	114057	303443	E21	5	S,Y	53	317575	611757	AN47	1	Hc
6	115055	303443	F21	4	S,Y	54	317577	211756	AO7	2	O
7	115057	703447	G52	1	Y	55	317577	211757	AO8	2	T
8	116577	201757	H2	1	H	56	317577	611657	AO44	1	O
9	117175	601557	I31	1	Y	57	317577	611756	AO46	5	S
10	117175	601757	I33	2	H,O	58	317577	651755	AO51	1	Y
11	117177	601757	J33	2	Y	59	345457	311652	AP26	5	O,Y,T,K
12	117575	641757	K49	1	Y	60	351557	710413	AQ54	3	Y
13	135047	303447	L22	1	Y	61	415457	311656	AR27	1	Y
14	144047	301443	M16	2	Y	62	517577	611657	AS44	1	Y
15	145047	103443	N1	1	Y	63	613177	210646	AT3	4	Hc,Y,T
16	145047	303441	N19	1	K	64	613575	610646	AU35	4	Y
17	145057	311252	O24	1	Y	65	613577	610646	AV35	4	O,Y
18	145147	303443	P21	1	Y	66	615455	311656	AW27	1	H
19	155045	303442	Q20	2	S	67	615457	301656	AX17	2	T
20	155047	303443	R21	1	Y	68	615457	311656	AX27	3	O,Y,T
21	155047	343443	R28	3	Y	69	617577	211547	AY4	1	K
22	207577	611643	S41	1	O	70	703577	610657	AZ36	2	Y
23	215455	311656	T27	1	Y	71	707577	611657	BA44	3	H
24	215555	710403	U53	2	Y	72	713575	231757	BB14	1	H
25	217557	611747	V45	9	O	73	713575	610657	BB36	2	Y
26	305057	311457	W25	12	E	74	713577	231757	BC14	17	H,O,Ko
27	305057	611642	W40	1	Hc	75	713577	610657	BC36	1	Y
28	305447	711242	X56	2	Y	76	715057	211557	BD5	1	T
29	305455	211642	Y6	2	O	77	716577	611653	BE42	1	Y
30	305455	711242	Y56	1	Y	78	717057	231557	BF13	3	T
31	305455	711642	Y58	6	Y	79	717555	611657	BG44	1	T
32	305457	611442	Z39	1	Y	80	717557	611653	BH42	2	O
33	305457	611642	Z40	4	H,Hc,Y	81	717557	611655	BH43	1	Y
34	305457	711242	Z56	4	Y	82	717557	611657	BH44	19	Hc,O,Y,S
35	305557	711413	AA57	1	H	83	717575	611657	BI44	1	Hc
36	307555	611657	AB44	2	H,S	84	717577	611653	BJ42	9	Hc,Y,S
37	307557	611657	AC44	1	H	85	717577	611657	BJ44	30	H,Hc,O,Y,T,K
38	311057	300457	AD15	1	Y	86	717577	650657	BJ50	2	Hc
39	311555	630253	AE48	1	Hc	87	o10057	214043	BK9	1	Y
40	311555	710417	AE55	1	Y	88	o12057	214442	BL10	2	O,K
41	311557	610253	AF34	2	Y	89	o12057	214443	BL11	9	Y
42	311557	710413	AF54	10	Hc,Y,K	90	o13057	214442	BM10	1	Y
43	313575	610657	AG36	1	Y	91	o17175	601647	BN32	1	K
44	315455	350656	AH29	1	Hc	92	o55045	303043	BO18	1	Y
45	317055	231453	AI12	1	O	93	o57047	303443	BP21	1	Y
46	317157	611157	AJ37	3	T						
47	317175	611757	AK47	1	Y						
48	317455	611757	AL47	1	Y						

* H:広島県 Hc:広島市 O:岡山県 Y:山口県 S:島根県 K:香川県 E:愛媛県 T:徳島県 Ko:高知県

表 2 2011 年に広島県で分離された O157 の IS コードと新しい IS コードとの関係

番号	分離月	ISコード		新しい ISコード	番号	分離月	ISコード		新しい ISコード
		1st set primer	2nd set primer				1st set primer	2nd set primer	
1	8	145047	303442	N20	16	7	717577	611657	BJ44
2	8	311557	710413	AF54	17	8	717577	611657	BJ44
3	10	313575	610655	AG59	18	8	717577	611657	BJ44
4	7	345457	311652	AP26	19	8	717577	611657	BJ44
5	7	345457	311652	AP26	20	9	717577	611657	BJ44
6	9	717557	611653	BH42	21	9	717577	611657	BJ44
7	9	717557	611653	BH42	22	9	717577	611657	BJ44
8	8	717557	611657	BH44	23	9	717577	611657	BJ44
9	7	717575	611657	BI44	24	9	717577	611657	BJ44
10	8	717575	611657	BI44	25	9	717577	611657	BJ44
11	8	717575	611657	BI44	26	9	717577	611657	BJ44
12	8	717575	611657	BI44	27	1	o12057	214443	BL11
13	8	717577	611653	BJ42	28	1	o13057	214443	BM11
14	6	717577	611657	BJ44	29	1	o13057	214443	BM11
15	6	717577	611657	BJ44	30	6	345057	311652	BQ26

腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析

研究協力者 広島市衛生研究所

田内 敦子 京塚 明美 築地 裕美 井澤 麻由 佐藤 真帆
国井 悦子 坂本 綾 伊藤 文明 橋本 和久 笠間 良雄

研究要旨

2011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 O157:H7 感染症事例 15件 19株について、分子疫学解析法であるパルスフィールドゲル電気泳動法、IS-printing system[®]法、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis の3種を実施し、3法間の比較および感染事例間での疫学的関連性について検討した。その結果、同一感染源である可能性の高い家族内事例の菌株は3法で結果がほぼ一致したが、PFGEで類似度の高いクラスターに分類されていても、MLVAやIS-printingでは違う結果になったものもあったことから、3法の結果がほぼ一致していなければ同一感染源であるとはいえないことが示唆された。集団事例や散発事例間の関連性を調べる上での分子疫学解析は、初めに結果が早く出るMLVA、IS-printingを行って関連性を検討し、さらにPFGEでより可能性を高めていくというように3法を使い分けることで、疫学調査への迅速なフィードバックもでき、感染源の特定により有効であると考えられる。

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法 (PFGE)、IS-printing system[®]法 (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:H7 の感染事例間での疫学的関連性を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

2011年3月から11月までに広島市で分離されたEHEC O157:H7 19株を用いた。事例と株の関係は表1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、上記と同じシーケンサーを使用して、一部の検体についてPCR産物のシーケンス解析を行って確認した。プライマーと蛍光標識については表2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準拠し、処理した。すなわち、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. 3 法比較

MLVARN、IS コード及び感染研 PFGE TN を表 3 に、PFGE クラスタとバンドパターンを図 1 に示した。

(1) 家族内事例

家族内感染したと思われる事例 12 で分離された菌株（11022～11024）は、MLVARN、IS コード及び感染研 PFGE TN 全てで結果が一致し、当所で行った PFGE でも 1 band の違いで類似度は 95%であった。

もう一つの家族内事例 13（11025～11027）でも、MLVARN 及び IS コードの結果が一致し、感染研 PFGE TN 及び当所 PFGE では 1 band 違いで類似度 97%であった。

(2) 散発事例

5 月後半から 6 月初めにかけて発生した散発事例 2～5 で分離された菌株（11003、11005、11007、11011）は、11011 の MLVARN が K10 で 1 違っていたが、その他の結果は全て一致した。

散発事例 9 及び 11 で分離された菌株（11018、11021）と家族内事例 12（11022～11024）で分離された菌株は、PFGE で

は 1～2band の違いで類似度 95%以上であったが、MLVARN 及び IS コードはそれぞれ異なっていた。また散発事例 15 の菌株（11037）についても、11018、11021、11022～11024 と PFGE で類似度 92%であったが、MLVARN 及び IS コードは違っていた。

D. 考察

同一感染源であると推察される家族内事例 12 及び 13 では、それぞれ 3 法ともほぼ結果が一致していた。過去の結果も同様の傾向にあり^{2,3)}、3 法で結果がほぼ一致していれば感染源が同じである可能性はかなり高いことが示唆された。

一方で、PFGE のクラスタ解析で比較的高い類似度に分類された菌株でも、MLVARN や IS コードは違った結果になった。これまでの結果も併せると、3 法での結果が全て、ほぼ一致していなければ同一感染源であるとは言えず、集団事例や散発事例間の関連性を調べる上での分子疫学解析は、それぞれの方法の迅速性、簡便性等特性を考え使い分けを行うことが必要であると考えられる。具体的には、MLVA や IS-printing は最短で 1 日で解析結果が得られるので、関連性を早く知りたければこれらの方法を実施する。結果が違っていれば同一感染源である可能性を否定でき、一致していれば同一感染源である可能性が高いため、疫学調査担当に結果を速報すると同時に PFGE を行い、平行して性状試験や薬剤感受性試験などで総合的に判断するという形である。特に散発事例間で関連性が高いことが早く分かれば、聞き取り等のより詳細な疫学調査が迅速に行えるため、感染源の追及には有用性が高い。

事例間の疫学的関連性については、散発事例 2～5 で 3 法の結果がほぼ一致してい

たため、同一感染源であることが疑われた。これらの事例は発生時期が比較的近かったものの、患者の年齢、職業、生活区域は異なっていた。唯一の共通事項は肉の喫食であり、事例 5 ではバーベキューだったが、その他ではレバ刺し等の生食が確認されていた。しかし一部患者の調査協力が得られなかったため、肉の流通ルート等さらなる遡り調査はできず、感染源の特定には至らなかった。MLVA、IS-printing の結果が出た時点で疫学調査担当に同一感染源の可能性を示していれば、さらに踏み込んだ調査により感染源を追えたかもしれず、迅速な結果のフィードバックとそれを生かして追加調査を行う等の体制の構築が、今後の課題である。

E 結論

1. EHEC O157 の分子疫学解析として 3 法を行うことで、より正確に事例間の疫学的関連性を知ることができるが、3 法とも結果が一致していないと、関連性があるとはいえない。

2. まず MLVA、IS-printing を行って関連性を検討し、さらに PFGE でより可能性を高めていくといった形で 3 法を使い分けることで、疫学調査への迅速なフィードバックができ、感染源の特定により有効である。

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) 末永朱美 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,107-112
- 3) 末永朱美 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,142-148

表1 O157:H7 事例概要と分離菌株

事例	菌株番号	診断の種類	発症年月日	性別	年齢	当該者職業	VT 型
1	11001	患者	20110312	男	11	小学生	VT2
2	11003	患者	20110519	男	41	クレーン車運転	VT2
3	11005	患者	20110520	女	18	専門学校生	VT2
4	11007	患者	20110524	男	46	税理士	VT2
5	11011	患者	20110603	男	11	小学生	VT2
6	11012	患者	20110606	男	23	大学生	VT1VT2
7	11013	患者	20110623	男	53	会社員	VT1VT2
8	11016	患者	20110720	男	9	小学生	VT1VT2
9	11018	患者	20110727	女	64	無職	VT1VT2
10	11020	患者	20110801	男	22	会社員	VT1VT2
11	11021	患者	20110803	女	73	無職	VT1VT2
12	11022	患者	20110813	女	7	小学生	VT1VT2
	11023	無症状病原体保有者		男	40	塗装業	VT1VT2
	11024	無症状病原体保有者		女	32	一般事務	VT1VT2
13	11027	患者	20110830	男	3	保育園児	VT1VT2
	11026	患者	20110901	女	16	高校生	VT1VT2
	11025	患者	20110903	男	51	工場の管理職	VT1VT2
14	11034	患者	20111004	男	3	幼稚園児	VT2
15	11037	患者	20111117	男	24	無職	VT1VT2

表2 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	VIC	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 C
Mix3	K-10	Forward	FAM	CAGCCTCCTGCAAACCTTACTGTTTCATTTCTACAGTCTC
		Reverse		GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTC

表3 MLVA RN、IS コード及び PFGE TN

菌株 番号	事例	VT 型	MLVA RN										IS コード	PFGE TN
			K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10			
1	11001	1	VT2	4	6	7	-	7	9	11	8	-	012057 214442	g28
2	11003	2	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057 311652	c374
3	11005	3	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057 311652	c374
4	11007	4	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	25	345057 311652	c374
5	11011	5	VT2	4	16	7	10	5	7	-	9	26	345057 311652	c374
6	11012	6	VT1VT2	5	10	10	11	8	6	7	7	40	106577 201657	g52
7	11013	7	VT1VT2	5	10	10	11	6	6	6	6	33	307575 211757	e570
8	11016	8	VT1VT2	3	11	9	13	7	7	11	8	30	717575 611657	-
9	11018	9	VT1VT2	5	13	11	15	7	6	11	11	25	717577 611657	c272
10	11020	10	VT1VT2	6	14	9	15	7	4	12	6	25	613575 610446	g233
11	11021	11	VT1VT2	9	13	11	9	7	6	3	6	32	715577 611257	g235
12	11022		VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557 611657	g236
13	11023	12	VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557 611657	g236
14	11024		VT1VT2	4	12	10	9	6	6	10	7	19	317557 611657	g236
15	11027		VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557 611657	g450
16	11026	13	VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557 611657	g449*
17	11025		VT1VT2	4	12	10	8	6	6	10	7	21	717557 611657	g450
18	11034	14	VT2	5	5	7	-	5	9	8	5	-	012057 214443	f740
19	11037	15	VT1VT2	5	12	10	5	7	6	9	6	27	713557 610457	g167

*:one band diffr. from g450

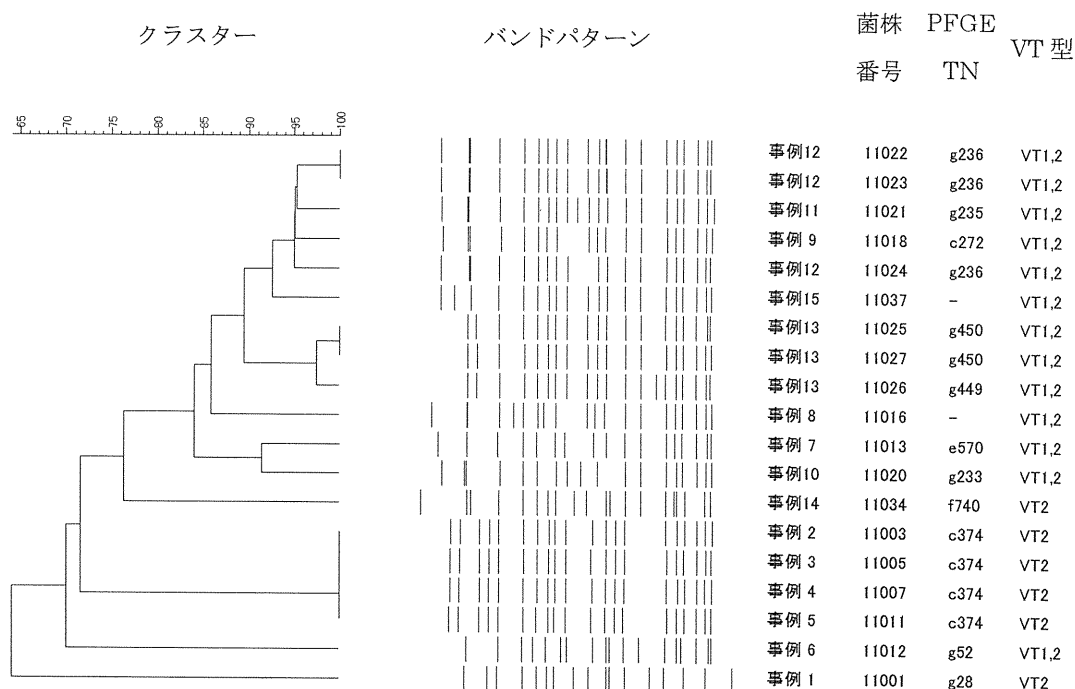


図1 PFGE クラスタとバンドパターン

平成 23 年 3 月～5 月に県内で小規模流行が確認された O157 クレード 8 菌株
の IS-printing、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)、MLVA 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

2011 年(2011 年 1 月～12 月)に山口県内で分離され、当所に搬入された O157 菌株は 23 株と、昨年度の 43 株に比して患者の発生は少なく、集団感染事例もなく散発事例にとどまった。しかし、3 月および 5 月、異なる 4 市町において比較的短期間に同一の VT 型の O157 菌株が分離された事例が 4 事例続発し、これらから分離された 4 菌株(県西部 SI 市 10Y43 株、中東部 SH 市 11Y01 株、東部 IW 市 11Y02 株、東部 WK 町 11Y03 株)について、IS-printing 法、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)、Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis(MLVA)法により解析するとともに、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 か否かを解析した。その結果、IS-printing profile は 345057-311652 が 2 株(11Y01,11Y03)、345457-311652 が 2 株(10Y43,11Y02)で、4 株はきわめて類似した profile であった。国立感染症研究所での PFGE 解析では、11Y01 株は 2010 年 6 月の三重県での集団発生事例、2010 年 7 月の岩手県・東京都、2010 年 10 月の香川県および 2011 年 5 月広島市での散発発生事例由来株と同一のパターン(c374)と判定され、2011 年 5 月に広島市でも 11Y01 株と同一の菌により患者が発生していたと考えられた。他の 3 株は、他県における同一パターン株による患者の発生は確認されなかったが、当所でも PFGE 解析した結果、それらの similarity は 95%～100%ときわめて類似していた。本年度から実施した MLVA 解析では、分離された時期が 2 カ月異なり分離場所も県西部と県東部とかなり離れているが IS-printing の profile が 345457-311652 と同一の 2 株(10Y43,11Y02)では、9Locus のうち Locus25,34,17,37 の 4Locus のリピート数が完全に一致、また Locus9,19 では 1 リピート、Locus3 では 2 リピートの差異が認められたにすぎなかった。しかし Locus10,36 では各々 6,10 リピートと、大きな差異が認められた。一方、同じ 5 月に比較的距離の近い県中東部と県東部で分離され IS-printing の profile が 345057-311652 と同一の 2 株(11Y01,11Y03)では、Locus25,3,34,9,17,19,37,10 の 8Locus のリピート数が完全に一致(Locus36 のみ 11 リピートの差異)し、これら 2 株はきわめて近縁な株であると考えられた。このように、MLVA 解析では IS-printing profile が一致した株においても菌の分離時期の違いや分離場所の違いなどによると思われる、微細な差異をも解析可能であることを示唆する成績が得られ、より詳細な菌の型別が可能であった。

クレード解析により、4 株すべてがクレード 8 に属しており、2011 年の 3 月から 5 月にかけて、県内の西部、中東部、東部と広域にわたり、高い病原性を有していると考えられている O157 クレード 8 の流行があったことが示唆され、このような短期間に 4 症例が続けて発生したことは過去には知られておらず、今後クレード 8 の流行に対して、より厳重な注意が必要と考えられた。昨年報告したように、これまで山口県で分離された 16 株の O157 クレード 8 の IS-printing profile は、305455-711642、305457-711242、345457-311652、305457-611642、

305457-611442、305455-711242、305447-711242、105457-711642、145057-311252 の 9 種類の profile が認められているが、本年度は上記 4 株の 2 種類の profile さらに 2011 年 9 月に SI 市で分離された 1 株(11Y17 株)もクレード 8 でその profile 305457-611242 を加え計 3 種類の profile が認められている。そのうち 345457-311652 は、昨年の 9 種類の中の 1 つと一致したが、他の 345057-311652 と 305457-611242 は新たな profile で、合計 11 種類となった。これらに共通する傾向は、□・□・5・□・□・□・□・1・1・□・□・2 という、全株に共通する部位が存在していることで、とくに重要な共通部位は second primer set の 6 番目の「2」であると考えられた。2 年間 21 株のクレード 8 県内分離株はすべて、この部位が「2」、かつその他の上記の共通部位を有していた。これらのデータからは IS-printing profile によりクレード 8 を推測することは可能であると考えられたが、さらに多数のクレード 8 株についての検討が必要である。

A. 研究目的

平成 23 年 3 月～5 月に県西部、中東部、東部 3 市 1 町に続発した O157:H7 VT2 感染症事例 4 事例について、IS-printing 法、PFGE 法、MLVA 法の 3 種類の分子疫学解析手法を用いて解析し、原因となった O157 菌株の型別と類似性を検討すると同時に、昨年度に続き、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 IS-printing profile から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

平成 23 年 3 月および 5 月に県内の 4 市町で発生した症例由来 O157:H7 4 株を供試した。

2. 解析方法

(1)IS-printing 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。

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×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 profile とした。

(2) PFGE 解析方法

流行事例由来菌株 4 株に加え 9 月の県西部の散发事例由来 1 株(11Y17 株)、1998 年の集団発生事例由来 Tab-1 株、計 6 株を用いて PFGE 解析を実施するとともに、国立感染症研究所細菌第一部に送付し、PFGE パターン解析を依頼した。

当所で実施した PFGE 解析は、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。

(3) MLVA 解析方法

岡山県環境保健センター中嶋博士を通じて送付された国立感染症研究所細菌第一部作成の MLVA プロトコル(2008 年 7 月現在)にしたがって、9 か所の Locus(25,3,34,9,17,19,36,37,10)について解析を行った。Fragment 解析は、Applied Biosystems 社製 3500 Genetic Analyzer および Gene Mapper ver.4.1 を使用した。Fragment size marker は、GeneFlo 625 DNA Ladder(ROX Label)[コスモバイオ社製]を使用した。国立感染症研究所細菌第一部が解析し報告した山口県分離菌株 2 株(052345 株、051079 株)の Fragment size データ⁵⁾と当所における同一株の 3500 Genetic Analyzer による解析データとを比較し、差異の生じた Locus(3,36,37)については、その差異を補正し当所の機器にマッチした Fragment size からのリピート数換算表を作成し、各々の Locus のリピート数を求めた。

(4) クレード解析方法

テンプレート DNA は、IS-printing 解析に用いたものを使用した。

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て 20 μ l の系で MAMA-PCR(Mismatch Amplification Mutation Assay 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。

C. 研究結果

1. 事例概要

[10Y43 株]平成 23 年 3 月 6 日発病、腹痛・水様性下痢・血便を主徴とした県西部 SI 市の事例。

[11Y01 株]平成 23 年 5 月 19 日発病、腹痛・水様性下痢を主徴とした県中東部 SH 市の事例。

[11Y02 株]平成 23 年 5 月 22 日発病、腹痛・血便を主徴とした県東部 IW 市の事例。

[11Y03 株]平成 23 年 5 月 25 日発病、腹痛・水様性下痢・血便を主徴とした県東部 WK 町の事例。

[11Y17 株]平成 23 年 9 月 26 日発病、腹痛・水様性下痢を主徴とした県西部 SI 市の事例。

これら 5 事例の患者の年齢は、10Y43、11Y01、11Y02、11Y03 株の春先の流行 4 事例では 28 歳、34 歳、25 歳、37 歳と一定の年齢帯に属していたが、これらから 4～6 か月後の 11Y17 株の事例は 15 歳で、他の 4 事例とは明らかに異なった年齢帯であった。

管轄保健所による喫食調査では、11Y03 株の事例および 11Y17 株の事例で、いずれも発病 3 日前にレバ刺を喫食していたが、その他の事例では特記すべき食材や共通事項は認め

られなかった。

2. IS-printing 解析結果

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示した。

1 st primer set による IS-printing profile は 3 種類認められ、10Y43 株と 11Y02 株が 345457、11Y01 株と 11Y03 株が 345057、11Y17 株は 305457 であった。一方、2 nd primer set による profile は、3月、5月に分離された 10Y43 株～11Y03 株はすべて 311652 と同一であったが、9月に分離された 11Y17 株は 611242 と、他の 4 株とは異なっていた。したがって、IS-printing profile は、10Y43 株と 11Y02 株の 2 株が 345457-311652、11Y01 株と 11Y03 株の 2 株が 345057-311652、そして 11Y17 株が 305457-611242 の、計 3 種類が認められた。

これら 3 種類の profile には共通した数値が認められた。すなわち、3-□-5-□-5-7-□-1-1-□-□-2 と、□の部分の数値は菌株によって異なるものの、実数で示した 7 か所の値はすべて同一であり、極めて特徴的な profile であった。

3. クレード解析結果

MAMA-PCR の結果、4 菌株すべてがクレード 8 と判定され、昨年と同様、山口県内においてクレード 8 株による患者の発生が確認された。

4. PFGE 解析結果

図-3 に 6 菌株の PFGE 泳動像を、図-4 にそのデンドログラム、図-5 に 6 菌株間の相溶性(similarity)を示す。

IS-printing profile が一致した 11Y01 株と 11Y03 株間、ならびに同じく profile が一致した 10Y43 株と 11Y02 株間における PFGE パターンは、11Y01 株-11Y03 株間では相溶性 100%と判定され同一起源の株と判断され

た。また 10Y43 株-11Y02 株間では、その相溶性は 95.0%とやや低いものの、ほぼ同一のパターンと考えられ、3月および5月の流行株は、疫学的に極めて類似性の高い株であると考えられた。

しかしながら 11Y17 株と他の 5 菌株との相溶性は 85.0%と、他には認められない低い相溶性であったことから、11Y17 株とその他の株の疫学的類似性は低いものと考えられた。

一方、国立感染症研究所における PFGE パターンは、10Y43 株が g255、11Y01 が c374、11Y02 株が g254、11Y03 株が g256、11Y17 株が g461 で、同一のサブタイプ名の株はなかった。

5. MLVA 解析結果

表-1 に 6 菌株の MLVA 解析結果、ならびにそれに加えて、これまで県内で分離された O157:H7 クレード 8 株 5 株およびクレード 8 ではない株 5 株の解析結果を示す。

表に示すように、5月に流行した 3 株(11Y01 株、11Y02 株、11Y03 株)のうち、IS-printing profile、PFGE の遺伝子パターンが同一であった 11Y01 株と 11Y03 株の各 Locus のリピート数は、9Locus 中 8Locus が同一と、極めて類似していたが、唯一、Locus36 のみが 11Y01 株が 5、11Y03 株が 16 で、11 リピートの差異が認められた。これに対して、同じく IS-printing profile は同一であったが、PFGE の遺伝子パターンが若干異なった 2 株(10Y43 株、11Y02 株)では、各 Locus のリピート数は大きく異なり、同一のリピート数であったのは Locus25,34,17,37 の 4Locus のみであり、他の Locus では 1～10 のリピート数の差異が認められた。

その他のクレード 8 株の MLVA 解析結果は、株によりさまざまであったが、クレード 8 以外の株の MLVA 解析結果に比較して 9Locus 中 Locus25,34,9,17,19 におけるリピート数

がある程度一定しており、クレード8に属する株の遺伝的な類似性が反映されているのではないかと推察された。

クレード8以外の菌株5株のMLVA解析結果は、株によって極めて大きく異なっており、遺伝的な差異によるものと推察された。

D 考 察

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⁾。

わが国においても、伊豫田らが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。

このような高病原性と推定されているO157クレード8株のわが国における感染事例は、2010年三重県のN学園の事例など、わが国でも次第に感染例が増加しつつあり、

山口県においても、これまでの調査では、昨年報告したように1998年に発生した県内初の集団感染事例を始めとして、毎年数例の患者の発生が認められてきたが、短期間おける続発事例は知られていない。

2011年3月および5月に、続けて4例のO157クレード8株感染事例が続発(その間にO157を含む腸管出血性大腸菌感染症の発生は認められなかった)したため、これらの症例から分離されたO157菌株4株ならびに同年9月に分離されたクレード8株、計5株を中心に、IS-printing法、PFGE法、MLVA法の3種類の分子疫学解析手法を用い、これらの菌株の遺伝子を解析した。

その結果、IS-printing profileは5月に県の東部で分離された2株が345057-311652、3月に県西部で分離された1株と5月に県の中東部で分離された1株が345457-311652、そして9月に県西部で分離された1株が305457-611242の合計3種類認められた。昨年、クレード8と判定された16株についてIS-printing法により解析した結果、IS-printingのprofile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たことを報告したが、今回の345457-311652のprofileは昨年のクレード8株でも認められているが、他の2種類のprofileは認められておらず、現在山口県で分離されたO157クレード8株には合計11種類のprofileが認められている。

これらに共通する傾向は、□-□-5-□-□-□-□-1-1-□-□-2という、全株に共通する部位が存在していることで、とくに重要な共通

部位は second primer set の 6 番目の「2」であると考えられた。2 年間 21 株のクレード 8 県内分離株はすべて、この部位が「2」、かつその他の上記の共通部位を有していた。これらのデータから IS-printing profile によりクレード 8 を推測することは可能であると考えられたが、さらに多数のクレード 8 株についての検討が必要であろう。

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。迅速性の優れた IS-printing profile からのクレード 8 の推測について、今後さらに検討していきたい。

今回のクレード 8 株 5 株について、国立感染症研究所にサブタイプの決定を依頼した結果、5 月に分離された 3 株中、11Y01 株は c374 と判定された。この株は、2010 年三重県での集団感染事例由来株、2010 年 7 月の岩手県・東京都、2010 年 10 月の香川県および 2011 年 5 月広島市での散発発生事例由来株と同一のパターンと判定され、わが国においてクレード 8 株による感染の拡大が推察された。

平成 22 年度の総括・研究分担報告書⁶⁾に記載されている中国・四国ブロックにおける分離菌株の IS-printing profile の中に、上記の共通部位が認められた(岡山県精度管理菌株 1563,1564,広島市分離株番号 10050,10051,徳島県分離事例 1,2,香川県供試菌株 22)ことから、これらの株はクレード 8 株の可能性が推察され、クレード 8 株は広域に分布している可能性が高く、今後、クレード 8 株の分離動向を注視していく必要性が示唆された。

平成 23 年度に県内で分離した O157 クレード 8 株 5 菌株ならびに、これまで分離され

たクレード 8 株 6 株、さらに他のクレードの O157 菌株 5 株、計 16 株について、初めて MLVA 解析を実施した。

その結果、5 月に流行した 3 株中県東部で分離された IS-profile 一致の 2 株(11Y01,11Y03)の 9Locus におけるリピート数が極めて類似していたことから、同一地域由来であることを含め、極めて近縁な株であることを明らかにすることができたが、もう一組の IS-profile 一致の 2 株(10Y43,11Y02)では、株間にかなり大きな差異が認められた。この 2 株は分離時期が前者は 3 月、後者は 5 月と 2 か月の差異があること、分離場所が前者が県西部の SI 市、後者は県東部の IW 市と遠距離の隔たりがあること、遺伝子パターンに差異があること、など菌株の持つ違いを MLVA 解析は鋭敏に反映したものと推察され、このような同じクレード 8 に属する O157 菌株であっても、菌の持つ微細な差異を鋭敏に検出し型別できる手法であると考えられ、菌株の詳細な型別に有用となろう。

クレード 8 以外の菌株 5 株の MLVA 解析結果をみると、株によって極めて大きく異なっており、遺伝的な差異によるものと推察された。一方、クレード 8 に属する株の MLVA 解析結果は、株によりさまざまであるが、クレード 8 以外の株の MLVA 解析結果に比較して 9Locus 中 Locus25,34,9,17,19 におけるリピート数がある程度一定しており、クレード 8 に属する株の遺伝的な類似性が反映されているのではないかと推察された。

9 月に分離された PFGE パターンが他とかなり異なる株については、リピート数の差異が大きく、IS-printing および PFGE で極めて近縁と考えられた株でも、MLVA 解析ではかなりの差異が認められた。したがって、MLVA 解析は、IS-printing および PFGE 解析では一致した株についても、微細な菌株間