

相同性 100%であった。これら 7 施設は相同性 97%でひとつのクラスターを形成した。一方、残りの 2 施設はそれぞれ相同性 92.3、95.5%の相同性を示しそれぞれ単独でクラスターを形成した。

## 2. 行政への還元に関する調査

東海・北陸 9 地研のうち 2 地研（富山県、岐阜県）では今年度事例発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は 1 地研が 6 事例、1 地研が 1 事例であった。その概略を以下に示す。

1. 2009年富山県において発生したEHEC集団感染事例とそのPFGEパターンについて(事例報告)  
富山県衛生研究所 細菌部 木全恵子、嶋智子、清水美和子、金谷潤一、磯部順子、倉田毅、綿引正則

平成21年1月～10月にかけて富山県で発生したEHEC感染事例は13事例で散発事例6事例、家族内感染事例7事例であった。家族内感染事例7事例の血清型および毒素保有型による内訳は0157 (*stx1 stx2*) による事例1事例、0157 (*stx 2*) による事例2事例、026、0111による事例がそれぞれ2事例であった。このうち本報告では0157 (*stx 2*) による家族内感染事例2事例、0111家族内感染事例2事例及び026家族内感染事例2事例について事例の概要と各事例間での分離株のPFGEパターンの比較について報告する。

上記の家族内感染事例の発生時期、感染者の内訳を表1に示す。各事例における有症者は事例4を除き初発患者のみであり、他の感染者は家族検便の結果感染が明らかとなった無症状保菌者であった。また、事例1の初発患者は下痢・血便のほかHUSを呈した。

これらの事例において分離されたEHECについてPFGEを行い、デンドログラム解析による各事例の関連性について検討した。PFGEは標準化プロトコールに基づいて行い、得られたPFGEの泳動像の解析は解析ソフトFingerPrinting IIを用いて行った。FingerPrinting IIによるデンドログラム解析にはUPGMA法とDice係数を用いて行い、トレランス値は1.2%とした。

その結果、感染者由来分離株は、事例4を除き各事例ごとに同一パターンを示した。事例4において、感染者1名より他の感染者由来分離とは2パ

ンド異なるPFGEパターンを示す株が分離されていた。

デンドログラム解析結果では各事例間での分離株の PFGE パターンの一致は見られなかった。このことから、これらの家族内感染事例間の関連性は低いと考えられた。

## 2. 宿泊施設の浴場を原因とするレジオネラ症感染事例

### 集団感染事例の概要

- ・原因施設：宿泊施設
- ・患者数：5名
- ・発生期間：平成21年10月中旬～11月初旬

### PFGE 解析結果

施設の浴槽水からは *L. pneumophila* 血清群 1、4、9、*L. oakridgensis* など複数の菌種が分離された。患者1名から *L. pneumophila* 血清群 1 が分離されたため、患者株(2株)と施設由来の *L. pneumophila* 血清群 1(15株)について、制限酵素 *Sfi I* による PFGE を実施した。その結果、患者株と施設株の泳動パターンが一致したことから、施設の浴槽水がレジオネラ症の原因であると判断した。

## 3. IS printing System の実施

6施設で検出された0157についてIS printing system を実施した結果の概略を以下に示した。IS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌0157サブタイピング法の検討について 富山県衛生研究所 細菌部 主任研究員 木全恵子

今回、我々は平成21年度パルスネット研究班検討課題として昨年度に引き続き、IS-printing Systemによる腸管出血性大腸菌0157サブタイピング法の検討を行った。IS-printing Systemによる0157サブタイピングは宮崎大学・林教授らにより開発され、IS (insertion sequence) の分布をマルチプレックスPCRにより検出する。

方法：供試菌は平成20年11月から平成21年10月までに本県で発生した腸管出血性大腸菌0157

(以下0157) 感染事例より分離された0157 9株を用いた。鋳型DNAの調製は以下の方法で行った。5%キレックス懸濁液 (TE pH8.8) に菌体を懸濁し、100℃で10分加熱したのちに、遠心 (12000rpm 5分) 分離を行った。得られた上清を鋳型DNAとしてPCRに用いた。

調製した全ての鋳型DNAの濃度を吸光度OD260より計算し、各鋳型DNA 15ngをIS-printing

SystemのマルチプレックスPCRに用いた。PCR条件及びアガロース電気泳動はIS-printing Systemの推奨条件に従い、3%アガロース (Nusieve GTG Agarose : SeaKem GTG Agarose =2:1混合、0.5×TBE buffer) を、泳動装置にはMupidミニゲル電気泳動装置を用いた。泳動に用いるアガロースゲルと泳動バッファーはあらかじめ4°Cで冷却し、使用した。

さらに、大阪府立公衆衛生研究所のコード変換法(平成20年度報告書参照)に準じ、得られた泳動像を12桁の数値からなるIS-コードに転換した。

PFGEは標準化プロトコールに基づいて行い、得られたPFGEの泳動像の解析は解析ソフトFingerPrinting IIを用いて行った。FingerPrinting IIによるデンドログラム解析にはUPGMA法とDice係数を用いて行い、トレランス値は1.2%とした。

結果と考察：今回供試菌9株のPFGEパターン及びIS-コードは全て異なっていた。このうちPFGEのデンドログラム解析による類似度90%以上を示した事例1と事例8及び事例4と事例9の組み合わせを比較するとIS-printing Systemのバンドパターンのうち異なる増幅バンドは36バンド中2-3バンドとわずかであった。特に毒素保有型が異なる事例1(*stx1 stx2*)と事例8(*stx2*)においてPFGE・IS-printing Systemによるゲノム全体の構造パターン及びIS分布が非常に類似していることから、事例8由来株について*stx1*脱落の可能性を含めた事例1由来株との関連性が示唆された。

当衛生研究所では平成18年以降に当該課題に参加しており、県内で発生した0157感染事例についてIS-printing Systemによる0157サブタイピングを検討し、報告した。そこで上記の本年度の解析結果をあわせ、平成18年から平成21年10月までに富山県内で発生した0157感染症87事例の代表株99株(同一事例内でのPFGEパターンの異なる株も含む)のIS-コードとPFGEパターンの比較を行った。その結果、これら99株のIS-コードは47タイプ検出された。一方、上記99株のPFGEパターンは60パターン検出され、IS-printing Systemによる0157サブタイピングに比べてPFGEによる型別はより細分化し

ていた。

次にPFGEパターンとIS-コードの対応を比較した。PFGEパターンとIS-コードが一对一の固有な組み合わせであった株は36株(36事例)であり、総事例数の41.4%であった。このうち2事例以上の株においてPFGEパターンとIS-コードが一致した事例は8事例であり、これらのPFGEパターンとIS-コードの組み合わせは3組であった。このうちIS-コード317575611756、305457611642が検出された事例はそれぞれ2事例、4事例であり、同一年度内の近接した時期に発生した事例であったが、各事例間の関連性は不明であった。

同一IS-コードで複数のPFGEパターンが検出された事例は44事例(54株)で総事例数の56%を占めた。このうち同一IS-コードで最も多くのPFGEパターンが見られたのはIS-コード613577610646でPFGEパターンは5パターン、感染事例数は8事例であった。IS-コード613577610646株による感染事例は平成18年度に7事例、19年度に1事例発生していた。これらの事例は2事例を除き全て散発事例であった。IS-コード613577610646株のPFGEパターンは2パターンを除き、類似度90%以上のクラスターを形成しており、同一株由来であると考えられた。上記の例を含め、同一IS-コードで複数のPFGEパターンが検出された事例は、IS-コード10タイプのうち、2タイプは同一年度に、5タイプは2年間連続して検出されたが、3年間以上同一タイプのIS-コードが継続して検出される事例はなかった。これらの結果は本県において同一IS分布を示す0157株の流行は1年~2年以内に推移する傾向を示唆していると考えられる。同一IS-コードでPFGEパターンが異なる原因としてはPFGEに用いられる制限酵素切断部位の変異、IS間でのゲノムの逆位などが考えられる。

一方、同一PFGEパターンに複数のIS-コードが検出された事例は27事例(総事例数の31.0%)であり、PFGEパターンとIS-コードは7パターン、12タイプであった。PFGEのクラスター解析から上記7パターンのうちPFGEパターンWとHを除く5パターンは類似度90%以上の大きなクラスターを形成していること、同一PFGEパターンを示した異なるIS-コード間の違いは1から2箇

所のみであった(PFGE パターン X を示した IS-コード 717577611657 と 307577211757 を除く)ことから、これらの PFGE 5 パターンに属する分離株のゲノム構造が非常に近い、若しくは同一であった可能性が考えられた。また、同一 PFGE パターンに複数の IS-コードが検出された事例に関しては IS が小さい分子(IS629 で 1.3kb 程度)であるため、これらの分子の excision や増幅によるコピー数の変化やゲノム内への挿入による IS の分布状況の変化について、20kb～30kb 以上のゲノム制限酵素切断片のパターンを解析する PFGE では反映されなかったと考えられる。

以上のように PFGE と IS-コードによるタイピングはその型別対象がゲノム制限酵素切断部位、IS 挿入位置と異なることからその型別は完全には一致しない。しかし IS-printing System はその迅速性・簡便性の点から、発生時期が近接した感染事例(集団感染事例や疫学的関連性の疑われる事例(diffuse outbreak)等)の比較に関してスクリーニングとして有効な手段であると考えられる。また、近年大腸菌において IS-excision を促進し、ゲノムの多様化に参与する因子として IS-excision enhancer (IEE)が報告されている(腸管出血性大腸菌シンポジウム、2009)。上記の同一 PFGE パターンに複数の IS-コードが検出された事例およびそのクラスターに属する株は高頻度 IS-excision が引き起こされている可能性があり、これらの株について IS-excision enhancer がどのように寄与しているかは今後の課題である。

平成 22 年度

#### 1. PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査と IS printing System の実施

東海・北陸 9 地研のうち 8 地研(福井県、富山県、岐阜県、岐阜市、三重県、名古屋市、岡崎市、愛知県)では今年度集団発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は 4 地研(福井県、岐阜市、名古屋市、愛知県)が 2 事例であった。また、IS printing System ver2 は東海・北陸 9 地研のうち 7 地研(石川県、富山県、岐阜県、岐阜市、三重県、名古屋市、愛知県)では今年度発生した集団発生株、若しくは散発事例株について実施した。

福井県：1) サルモネラ食中毒事例の PFGE (X

baI 処理) 事例概要：平成 22 年 10 月 8 日探知。健康福祉センターが調査した結果、患者らは 10 月 2 日、3 日に飲食店において食事をしており、食事した 9 名中 6 名が下痢、発熱等の症状を呈していた。患者および従事者の便ならびに施設の拭き取り検体からサルモネラ・インファンティスが検出され、同施設で提供された料理を原因とする食中毒と断定された。

2) 0145:HNM の家族内事例株および散発事例株の PFGE (XbaI 処理)。12, 13 は、7 月 26、27 日に発症し、8 月 3 日に届出。16 は健康保菌者。12, 13, 16 はそれぞれ、同一家族由来。13, 16 は発症の 2 日前に、同一店舗で焼肉を喫食。21 は、8 月 16 日に発症し、8 月 22 日に届出。発症の 5 日前に焼肉(ホルモン含む)を喫食。患者の住所が 12, 13, 16 と比較的近かった(同一保健所管内)ことから、PFGE を実施したが、毒素型は異なっていた。

富山県は富山県において発生した EHEC 感染事例と PFGE・IS-Printing 実施(2010 年 1 月—9 月)を行った。

このうち、0157(stx1 stx2) 感染事例について分離株の PFGE および IS-Printing による型別を行い、各事例の関連性について検討した。PFGE は標準化プロトコールに基づいて行い、得られた PFGE の泳動像の解析は解析ソフト FingerPrinting II を用いて行った。FingerPrinting II による dendrogram 解析には UPGMA 法と Dice 係数を用いて行い、トレランス値は 1.2% とした。IS-Printing は IS-Printing kit 添付プロトコールに従って行った。IS-Printing により得られた PCR 反応の陽性パターンを、大阪府立公衆衛生研究所のコード変換法(平成 20 年度報告書参照)に準じ、12 桁の数値からなる IS-コードに転換した。

富山県衛生研究所 細菌部 木全恵子 嶋智子 柏島伊津子 金谷潤一 磯部順子 倉田毅 綿引正則

平成 22 年 1 月～9 月にかけて富山県で発生した EHEC 感染事例は 9 件であり、散発 6 件、家族内感染事例 2 件、集団感染事例 1 件であった。血清型および毒素保有型による内訳は 0157(stx1 stx2) 7 件、0157(stx2) 1 件、0111(stx1) 1 件であった。このうち、0157(stx1 stx2) 感染事

例7件のうち、4件は8月に発生していた。また、集団感染事例は保育所を中心とした感染事例であり、感染者は22名(有症者11名、無症状保菌者11名)であった(表1 事例6)。

その結果、感染者由来分離株は事例ごとに異なる PFGE パターンおよび IS-コードを示した。また、事例6(集団感染事例)では3つの PFGE パターンおよび2つの IS-コードを示した。これらは PFGE パターンでは1-2バンド、ISコードでは1バンド異なるのみであった。2010年8月には事例6を含めた4件の0157(stx1 stx2)感染事例が発生しており、関連性を疑い PFGE 及び IS-Printing による解析を行った。しかし、いずれの事例の分離株も PFGE パターンもしくは IS-コードの一致はみられず、関連性は低いと考えられた。

岐阜県は今年度に県内で分離された23株の EHEC 0157 について、制限酵素 *Xba* I による PFGE を行った。PFGE 型別結果は、疫学情報及びパルスネットの PFGE 型別結果と一致した。また、IS printing system ver2 については供試菌株：平成20年5~8月に岐阜県内で分離された EHEC 0157 12株(散発、家族内、集団発生各4株)。プレート調製：アルカリ溶解法。泳動ゲル：3%アガロースゲル(NuSieve GTG:SeaKem GTG = 2:1)。泳動 Buffer：0.5×TBE。泳動条件：100V、60分。結果及び考察：泳動像において1kb以上の高分子量側に非特異バンドが多く見られたが、判定に影響することはなかった。供試した12株の IS-printing 型別の結果は、パルスネットによる PFGE 型別結果とすべて一致した。また家族内や集団発生といった疫学情報とも一致した。従って今回の結果においては、IS-printing System は PFGE と同等の識別能力であった。IS-printing System は PFGE にはない迅速性、簡便性という特長から、集団感染発生時等の迅速検査法として有用であると思われた。

岐阜市は *E. coli* (EHEC) および *Enterobacter cloacae* の PFGE を実施した。EHEC 0157 患者はいずれも同一の焼肉店で生肉等を喫食しているが、喫食日は異なっている。はっきりと確認できるバンドの違いは2本程度であり、かなり近縁の菌であるといえる。飲食店のふき取り検体から分離した *Enterobacter cloacae* は PFGE 上

ではすべてバンドが一致しており、同一の菌であるといえる。また IS-printing System は患者2名、接触者1名由来計3株について実施した。その結果、3株のバンドパターンは全て一致していた。

岐阜市民病院入院患者及び接触者から分離された腸管出血性大腸菌 0157 の IS-Printing System の結果報告。

平成22年11月に岐阜市民病院より地域保健課へ腸管出血性大腸菌 0157 患者の届出があった。当所で患者接触者3名のうち2名の検便を実施した結果、1名から腸管出血性大腸菌 0157 が分離された。そこで岐阜市民病院から患者菌株(衛試1274株)を取り寄せ、接触者菌株(衛試1273株)との比較検討を行った。

接触者検便の増菌菌液から分離されたコロニーの性状は、クロモアガー0157TAM培地上で藤色のコロニー、CT-SMAC倍地上では白色でやや透明なコロニーであった。大腸菌免疫血清による0抗原型別を行ったところ、混合3血清及び0157単味血清で凝集を認めた。グラム染色ではグラム陰性桿菌であった。API20E等で生化学的性状を確認したところ、*Escherichia coli* と一致した。これらの結果から、腸管出血性大腸菌 0157 であると同定した。VT 遺伝子型別の結果、VT2 遺伝子が検出された。また、市民病院入院患者から分離された腸管出血性大腸菌 0157 株の VT 遺伝子型別を行ったところ、VT2 遺伝子が検出された。

三重県は2010年に三重県で検出された腸管出血性大腸菌 026 9株を PFGE で解析した。その結果、集団事例由来3株と散発事例由来1株が同一パターンとなった。また、散発事例由来2株が同一パターンとなった。

北勢地域で検出された腸管出血性大腸菌 0157 について IS printing 解析を行った。2010年7月から9月に桑名・四日市市保健所管内で検出された23株の腸管出血性大腸菌 0157 を IS printing により解析を行った。23株が10パターンに分類され、パターン A が散発事例由来7株と家族内事例由来3株の計10株あり、Diffuse outbreak が疑われた。また、Lane 12及び13は、1つの家族内事例から分離された株であったが異なるパターンを示した。

名古屋市は今年度市内で発生した 0157 集団事例株 8 株、及び保育園で発生した 026 集団事例株 1 2 株について PFGE を実施した。その結果、0157 では 8 株中 7 株の PFGE バンドパターンが一致した。IS-printing System は集団事例由来 8 株株について実施した。その結果、8 株中 7 株はバンドパターンは全て一致していたが、1 株は異なっていた。また、その結果は PFGE と一致していた。

岡崎市では本年 6 月から 7 月にかけて、EHEC 0157 による感染症が多発した。調査の結果、多くの感染事例では焼肉を食べており、そのうちの 1 事例において、患者からの分離株と当該焼肉店の従業員からの分離株の PFGE がほぼ一致し、当該焼肉店による食中毒が強く疑われた。また、同一家族内感染においても PFGE を実施することで、同一菌株による感染であると推定された。6 月から 7 月に集中して発生した 0157 菌株の PFGE を実施することで、事件にならなかった事例も含め、多くの検出菌株が同一又は類似の株であることが推定された。

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 細菌・飲料水グループ

腸管出血性大腸菌 O157 IS-printing 法の検討

[目的]2010 年に、石川県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例 15 例について、

IS-printing 法を実施し、PFGE 法と IS-printing 法を比較しその有用性について検討した。

[使用菌株]2010 年に石川県内で発生した腸管出血性大腸菌感染症事例 15 例から分離された 17 菌株を使用した。

[方法]

#### 1) IS-printing 法

IS-printing System キットを使用した。

なお、3%アガロースゲルには、NuSieve GTG : SeaKem GTG=2 : 1 を使用し、0.5×TBE

buffer を用い、Mupid で 100V、80 分、電気泳動を行った。

#### 2) PFGE 法

国立感染症研究所による解析結果を使用した。  
[結果および考察]使用菌株 17 株は、PFGE 法では 12 タイプ、IS-printing 法では 7 タイプに

型別され、PFGE 型が同一である菌株は、IS-printing コードも同一を示した。一方、PFGE 型が f75、f140、f198、f199、f379 については、同一の IS-printing コードとなった。このことから、IS-printing 法の識別能力は PFGE に比べ、若干劣るものの、有用な分子疫学型別法であると思われた。

今回、PFGE 型の 1 バンド違いの家族内事例を検討したところ、No.8 と No.9 については、

同一の IS-printing コードであったが、No.11 と No.12 については、IS-printing コードはバンド 1 本の差がみられた。IS-printing コードの場合、どのくらいのバンドの差であれば、相同ありと解釈できるのか、さらに検討が必要であると思われた。

愛知県では集団事例株を含む 18 株の 0157、及び散発事例由来 026 の 6 株について PFGE を実施した。その結果、18 株の 0157 では 3 つのバンドパターンが認められた。さらにその結果は、IS-printing System の結果と一致していた。また、6 株の 026 の PFGE パターンは 3 つのパターンに分かれた。

## 2. Cica Geneus Staph POT KIT の実施

東海・北陸 9 地研のうち 6 地研（石川県、富山県、岐阜県、岐阜市、三重県、岡崎市）では食中毒由来、及び院内感染由来株について POT を実施した。

### 1) 食中毒由来黄色ブドウ球菌

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部 細菌・飲料水グループ

[目的]黄色ブドウ球菌食中毒と判断するには、分離された黄色ブドウ球菌のコアグラゼ型、エンテロトキシン型別が一致することが因果関係判定の重要な基準となる。しかし、コアグラゼ型別やエンテロトキシン型別は、結果が判明するのに 2、3 日要し、迅速性に欠ける。一方、近年、MRSA の分子疫学解析の手法として POT 法が開発され、その有用性が確認されている。今回、食中毒調査で分離された黄色ブドウ球菌の菌株について、POT 法を行い、コアグラゼ型およびエンテロトキシン型、PFGE 解析と比較し、迅速な型別法としての有用性を検討した。

[使用菌株]

食中毒関連調査で分離された黄色ブドウ球菌 14 株について実施した。内訳は、患者 5 名から分離された 10 株、従業員 1 名の手指の拭き取りから分離された菌 1 株、冷蔵庫内部の拭き取りから分離された 1 株、フキン拭き取りから分離された 2 株である。なお、菌株の由来、コアグララーゼ型、エンテロトキシン型については、表 1 のとおりである。

#### [POT 法]

シカジーニクス DNA 抽出試薬により DNA 抽出を行い、POT キットを用いて解析した。電気泳動は、4%アガロースゲル (Certified PCR Agarose (BIO-RAD))、1×TBE buffer を用い、Mupid で 90 分を行った。また、DNA size standard には 100bp DNA ladder (TaKaRaBio) を使用した。

#### [結果]

使用菌株 14 株について、POT 法を行った結果、コアグララーゼ型およびエンテロトキシン型、由来が同一であった No. 5 および No. 6 (患者 C 糞便)、No. 7 および No. 8 (患者 D 糞便)、No. 9 および No. 10 (患者 E 糞便)、No. 11、No. 12 および No. 13 (従業員 G の手指拭き取り、冷蔵庫内部拭き取り、フキン拭き取り) の各々の POT パターンは一致した。また、それらは、PFGE

#### 黄色ブドウ球菌 PFGE 解析

石川県保健環境センター 健康・食品安全科学部  
細菌・飲料水グループ

[目的] 2010 年に発生した食中毒事例において、患者糞便および拭き取りから分離された黄色ブドウ球菌 14 株について、PFGE 解析を行い、相同性を確認した。

[使用菌株] 食中毒関連調査で分離された黄色ブドウ球菌 14 株について実施した。内訳は、患者 5 名から分離された 10 株、従業員の手指の拭き取りから分離された 1 株、冷蔵庫内部の拭き取りから分離された 1 株、フキン拭き取りから分離された 2 株である。

[方法] PFGE 法は、使用菌の PFGE 用アガロースブロック (Certified Megabase Agarose (BIO-RAD)) を Lysozyme および Lysostaphin 処理、ProteinkinaseK 処理を行った後、制限酵

素 Sma I (ニッポンジーン) 消化処理を行った。そして、ブロックを 1%アガロースゲル

(Seakem®Gold Agarose (TaKaRa Bio))、0.5×TBE buffer を用い、CHEF DRIII System

(BIO-RAD) で PFGE を行った。なお、泳動は 6 V/cm、パルス角度 120 度、スイッチングタイム 1 秒～40 秒で 20 時間行った。対照として、DNA size standard である Lambda Ladder (BIO-RAD) を泳動した。

[結果] 使用菌株 14 株について、PFGE 解析を行った結果、従業員 G の手指拭き取りから分離された No. 11、冷蔵庫内部拭き取りから分離された No. 12 およびフキン拭き取りから分離された No. 13 の 3 株の DNA パターンは一致した。また、患者 C 糞便から分離された No. 5 と 6、患者 D 糞便から分離された No. 7 と 8、患者 E 糞便から分離された No. 9 と 10 についても、各々、同一パターンを示した。

[考察] 本食中毒は、疫学調査および細菌検査の結果から、黄色ブドウ球菌を原因とする食中毒であると判断されている。その根拠のひとつは、拭き取り(従業員 G 手指、冷蔵庫内部、フキン)から分離された黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ型およびエンテロトキシン型が一致したことである(患者糞便と拭き取り検体のコアグララーゼ型およびエンテロトキシン型が一致しなかった理由として、原因である黄色ブドウ球菌は、加熱されたため、患者糞便から検出されなかったと推測されている。なお、当該食品の残品がなかったため、食品中のエンテロトキシン試験は実施できなかった)。今回、PFGE の結果において、それら拭き取りから分離された菌株の DNA パターンが一致したことから、さらにこれらが相同である確率を高めることができた。また、同一由来でコアグララーゼ型、エンテロトキシン型が一致している菌株は、同一 DNA パターンを示し、コアグララーゼ型、エンテロトキシン型が不一致の菌株は、DNA パターンも異なっていた。以上のことから、黄色ブドウ球菌の PFGE 解析は、分子疫学解析として有用な方法であることが示唆された。

富山県衛生研究所 細菌部

木全恵子 嶋智子 柏島伊津子 金谷潤一 磯部順

子 倉田毅 綿引正則

本年度パルスネット研究班課題として、黄色ブドウ球菌の POT 型別法の有効性について検討を行った。POT 法はマルチプレックス PCR による遺伝子型別法であり、主に MRSA の分子疫学的解析において有効である。今回、この POT 法により、MRSA 以外の黄色ブドウ球菌(食中毒事例など)について POT 型別法の有効性を検討した。

供試菌：解析対象は表 1 に示した。No. 1-9 は同一食中毒事例により分離された黄色ブドウ球菌であり、No. 10-14 は同一施設の検便により得られた黄色ブドウ球菌である。

方法：これらの株についてシガジーニウス分子疫学解析 POT キット(関東化学)添付プロトコールに従い、POT 型別法を行った。得られた PCR 産物の電気泳動には 4%アガロース(Nusieve GT G Agarose : SeaKem GTG Agarose=2:1 混合、1×TBE buffer)を、泳動装置には Mupid ミニゲル電気泳動装置を用いた。PCR 陽性をスコア 1、陰性をスコア 0 として各 PCR 産物の POT 係数を乗じ、POT1、POT2、POT3 のグループごとに加算した。

PFGE は標準化プロトコールに基づいて行った。プラグの溶菌処理は 67ug/ml Lysostaphin(Wako)添加処理(37°C 一晩反応)後、Proteinase K 処理を行った。PFGE は、制限酵素 SmaI を用い、泳動条件(1-40s 20 時間泳動、14°C)で行った。得られた画像は FingerPrintingII によりデンドログラム解析を行った。

結果と考察：菌株の POT 型は分離検体の各由来(No. 1-9 および No. 10-14)ごとにコアグラマーゼ型また PFGE パターンに対応しており、食中毒事例及び施設検便などの同一集団の複数検体より分離された黄色ブドウ球菌から同一クローン株を迅速に検索するには有効であると思われた。黄色ブドウ球菌の検査において、1つの検体からコアグラマーゼ型の異なる黄色ブドウ球菌が分離されることは多い。このため食中毒検査の場合、原因となった黄色ブドウ球菌と常在するブドウ球菌を区別し、検査対象を絞り込む必要がある。まず、病原因子であるエンテロトキシンやコアグラマーゼ型の同定を行う(エンテロトキシン型別の場合は PCR もしくは RPLA を、コアグラマーゼ

型別は抗血清による血漿凝固中和を用いる)。しかし、1株につきエンテロトキシン型別では 5 タイプ、コアグラマーゼ型別では 8 タイプの型別を行うため、複数株の型別には多大な労力と時間が必要である。さらに、PFGE による型別を行う場合は、グラム陽性菌であるためプラグ作製に Lysostaphin と Proteinase K 処理の 2 段階による溶菌作業を伴うため、PFGE の作業工程は 4 日程度の労力と時間が必要となる。POT 法による型別は同一クローン株を検出することができ、特に食中毒発生時に原因食品等の迅速な検査に利用できると思われる。MRSA の場合と異なり、今回 POT 型別を行った食中毒事例や検便由来の黄色ブドウ球菌の POT 型別で PCR 陽性のスコアは全体に低い傾向であった。このため、今後は食中毒事例や施設検便等で分離された黄色ブドウ球菌について各型別のデータの集積を行い、POT 型の型別能を検証すること、各コアグラマーゼ型や PFGE 型別との関係についての検討が必要であると考えられる。

岡崎市は 3 食中毒由来 32 株について実施した。その結果、POT パターンは PFGE の結果と一致し、さらにエンテロトキシン型、コアグラマーゼ型ともよく一致していた。

## 2) 院内感染由来株等

### 岐阜県

供試菌株：平成 12~18 年に岐阜県内の 3 病院で分離され、PFGE 検査が実施された MRSA 約 400 株の中から、PFGE 型や発生状況をもとに 12 株を選択した。また対照として愛知衛研から分与された POT 型既知の 2 株(愛知番号 2003B069、2002N281)を加えた計 14 株を供試した。

- ・テンプレート調製：Cica Geneus DNA 抽出試薬
- ・泳動ゲル：4% NuSieve 3:1
- ・泳動 Buffer：0.5×TBE
- ・泳動条件：100 V、67 分

## 結果及び考察

### ○泳動像

取扱説明書に記載されているように femA のバンドが薄くなる株があったが、POT 型別のバンドはすべて明瞭に検出された。非特異バンドもほとんどなく、また IS-printing のようにバンド間隔が狭い所がないため、判定は容易であった。

## ○PFGE との比較

PFGE 型が同一の 2 組 (No. 1, 2 及び 3, 4) は、POT 法では各々異なる型を示した。これは PFGE 型が同一の株の中から、あえて分離された年及び病院が異なる株を選択したためと思われた。また逆に PFGE 型が異なるが、同一の POT 型を示した株 (No. 1, 4) もあった。これら以外の PFGE 型が異なる 8 株は、POT 法においてもすべて異なる型を示した。従って、供試株数は少ないが POT 法は PFGE と同等の識別能力を持つと思われた。

## ○POT1 の値による流行クローンの判定

複数の病院で複数年にわたって多数分離されていた PFGE 型 A, B の株 (No. 1~4) は、すべて POT1 の値が NY/Japan クローンを示す 93 となった。また小児流行クローンの POT1 型 73 を示した No. 6 の株は、NICU で分離された株であった。

PFGE と同等の型別結果が迅速簡便に得られるのみでなく、このような有用な情報が得られる POT 法は、MRSA による医療関連感染の対策において非常に有効と思われた。

岐阜市

コメント

衛試 1206~1212 株は、平成 21 年 10 月に行われた薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会に参加した際に、実習で使用した菌株を分与していただいた株である。衛試 1039~1042 株は、2005 年 7 月に岩手大学から分与していただいた株である。今回、研修後初めて POT 法を行った。取り扱い説明書が非常にわかりやすく手技も簡便であった。薬剤耐性菌解析機能強化技術研修会のテキストに、実習で使用した菌株の POT 型の記載があったので、当所の実験結果と比較した。レーン No. 5 とレーン No. 7 の POT1 が少し違ったが、その他の菌株は POT1、POT2、POT3 共に一致した。MRSA の場合 POT1 は 64 以上となる。レーン No. 1~レーン No. 7 は MRSA であるため POT1 が 64 以上になった。逆に、レーン No. 8~レーン No. 11 は MRSA ではないため POT1 は 64 を下回った。パルスフィールドゲル電気泳動法は、時間とコストがかかることから、MRSA による集団感染発生時に実施されることは少ない。それに比べ POT 法は簡単な PCR による分子疫学解析であるため、今後はパルスフィールドゲル電気泳動法にかわ

る方法として分子疫学解析で大いに活躍しそうだ。

三重県内の医療施設で検出された黄色ブドウ球菌の POT 法による解析

三重県 永井祐樹

1999 年に三重県内の医療施設でインフルエンザの院内感染が発生した。その際に検出された黄色ブドウ球菌 38 株 (患者由来株 26 株、施設拭き取り 12 株) の POT 法による解析を行った。38 株が 14 パターンに分類され、パターン 2 が 11 株 (全て患者由来株) と最も多く検出された。また、患者及び施設拭き取り両方から検出されたパターンが 6 種類あった (パターン 1, 6, 7, 8, 10, 13)。POT 法は PFGE 法より迅速性に優れており、健康危機発生時の早期の疫学解析に有用であり、また手技が簡便なことから、多数の黄色ブドウ球菌の解析にも有用と考えられる。

平成 23 年度

### 1-1. PFGE 精度管理

愛知衛研及び各施設より当所に送られた検体 1 から 3 の泳動図の解析を行い系統樹を作成した。

検体 1 に関しては 11 施設全体の相同性は 93.8% と 3 検体中最も高率であった。11 施設の泳動図は 9 施設が 100% の相同性で含まれる 1 つの大きなクラスターが認められた。残り 2 施設はそれぞれ独立に存在していた。

検体 2 については 11 施設の泳動図は全体で 88.6% と 3 検体中最も低かい相同性であった。このうち 4 施設の泳動図は 100% で一致した。残り 7 施設の泳動図はそれぞれ個別に存在したが、お互いの相同性は 1 施設を除いて 90% 以上であった。

検体 3 の 11 施設の泳動図は全体で 92.1% の相同性であった。2 施設、及び 5 の泳動図はそれぞれ 100% で一致した。残り 4 施設の泳動図はそれぞれ個別に存在した。

これまでの PFGE 精度管理で同一検体を配布したにもかかわらず施設によって高分子量領域において明らかにバンドパターンが異なるという一部の 0157 株に認められる遺伝的な不安定さが認められた。今年度も施設によって高分子量もしくは低分子量領域にやや薄いバンドやぼやけ



たバンドが出現していた。

## 1-2. IS printing System 精度管理

1 1 施設中 3 施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。具体的には施設 A では検体 2 で 1 本のバンドを認識することが出来ず、検体 3 では 2 本のバンドを認識出来ず、2 本のバンドは存在していないのにも関わらず認識していた。施設 B では検体 1 から 3 で 1 本のバンドを認識出来ず、検体 1, 2 では存在しないバンドを認識していた。施設 C では検体 3 で 1 本のバンドを認識出来ず、検体 1 から 3 で 1 本のバンドが薄く認識出来なかった。これらの原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスミアーになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。残り 1 1 施設のうち 8 施設では 3 検体全て正しく型別が行われていた。

## 2. 行政への還元に関する調査

平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研から 3 件の事例報告があった。

### 1. 保育所における腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例

#### 事例の概要

- ・原因施設：T 市内の保育所（児童数 70 人、職員数：22 人）
- ・感染者数：17 名
- ・発生日：平成 23 年 7 月 25 日
- ・終息日：平成 23 年 8 月 22 日
- ・原因菌：腸管出血性大腸菌 O26:H11 VT1

#### PFGE 解析結果

感染者 17 名から検出された腸管出血性大腸菌 O26 について、制限酵素 Xba I による PFGE を実施したところ、17 株すべての泳動パターンが一致した。

### 2. 介護老人福祉施設食中毒事例

<概要>平成 23 年 10 月 3 日 18 時頃、K 市内の医療機関から M 保健所に、10 月 2 日に医療機関を受診した K 市内の介護老人福祉施設 A の入所者 1 名の便から腸管出血性大腸菌 O157 が検出されたと報告があった。

保健所による調査の結果、この施設に隣接する施設 B でも、10 月 1 日から 10 日下痢等の症状を

呈する患者が発生していることが判明した。患者は 2 施設計 9 名、全員が入院しており、9 名全員の便から腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) が検出された。

これらの施設の入所者や利用者の食事は、全て介護老人福祉施設 A で調理しており、保存食の検査で、9 月 25 日の昼食に出された「大根おろしと大葉の和え物」から患者と同じ腸管出血性大腸菌 O157 (VT2) が検出されたことから、施設で調理した食事が感染源となった食中毒と断定した。

#### <PFGE による解析結果>

介護老人福祉施設 A および隣接施設 B の入所者の便から分離された菌株および保存食から分離された菌株 No. 3~11 の DNA 切断パターンは全て同一であった。

### 3. 仕出し弁当を原因とする O26 食中毒

平成 23 年 6 月に、T 県内の施設 A、B が製造した仕出し弁当を喫食したうち、約 20 名が腹痛、血便、発熱等の食中毒症状を呈した。調査を行ったところ、施設 A の弁当を喫食した 25 名および施設 B の弁当を喫食した有症者 1 名から O26 : H11 (stx1) が検出された。施設 A、B の弁当喫食者から分離された O26 の PFGE パターンは同一であった。

これらの施設には、共通して K 県内の食品加工業者から「添え野菜」が納入されていた。施設 A、B の検食について O26 の検査を行ったところ、施設 B の「添え野菜」から O26 が検出された。施設 A の検食には「添え野菜」が残されておらず、他食材からも O26 は検出されなかった。

「添え野菜」から検出された O26 と弁当喫食者から検出された O26 の病原因子遺伝子および PFGE パターンは同一であった。さらに、共通の「添え野菜」が納入されていた K 県内の施設 C の弁当を喫食した有症者 1 名からも O26 が検出され、富山県内患者および「添え野菜」から検出された O26 と PFGE パターンが一致した。

これらの結果から、今回の食中毒は共通食材「添え野菜」が原因で発生したものであると考えられた。

### 4. 散発下痢症患者由来サルモネラ属菌 (09:-:-) PFGE 解析

2011 年に F 県内で散発下痢症患者から検

出されたサルモネラ属菌 (09:-:-) 20 株のうち 19 株の PFGE パターンは類似していた (相同性 85%)。

#### D. 考察

平成 21 年度

##### 1. 精度管理

検体 1 に関しては 9 施設全体の相同性は 93.3% と高率であった。9 施設のうち 6 施設が相同性 100% でひとつのクラスターを形成した。検体 2 については 6 施設が相同性 100% を示し、ひとつのクラスターを形成した。検体 3 に関してはそれぞれ 4 施設と 3 施設が相同性 100% であった。これら 7 施設は相同性 97% でひとつのクラスターを形成した。これらの結果から相同性 100% が高い確率で認められ、非常に良好な結果であった。

##### 2. 行政への還元に関する調査

東海・北陸 9 地研のうち 2 地研 (富山県、岐阜県) では今年度事例発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。その件数は 1 地研が 6 事例、1 地研が 1 事例であった。具体的には 2009 年富山県において発生した EHEC 集団感染事例と宿泊施設の浴場を原因とするレジオネラ症感染事例であった。何れの事例においても PFGE の鮮明な画像が得られており、これまでの PFGE 精度管理の成果であると思われる。また、0157 以外のレジオネラに関しても問題ない PFGE 画像が得られていた。

##### 3. IS printing System の実施

6 施設で検出された 0157 について IS printing System を実施した結果の概略を以下に示した。IS-printing System による腸管出血性大腸菌 0157 サブタイピング法の検討について 富山県衛生研究所 細菌部 主任研究員 木全恵子

結果と考察：今回供試菌 9 株の PFGE パターン及び IS-コードは全て異なっていた。このうち PFGE のデンドログラム解析による類似度 90% 以上を示した事例 1 と事例 8 及び事例 4 と事例 9 の組み合わせを比較すると IS-printing System のバンドパターンのうち異なる増幅バンドは 36 バンド中 2-3 バンドとわずかであった。特に毒素保有型が異なる事例 1 (*stx1 stx2*) と事例 8 (*stx2*) において PFGE・IS-printing System によるゲノム全体の構造パターン及び IS 分布が非

常に類似していることから、事例 8 由来株について *stx1* 脱落の可能性を含めた事例 1 由来株との関連性が示唆された。

当衛生研究所では平成 18 年以降に当課題に参加しており、県内で発生した 0157 感染事例について IS-printing System による 0157 サブタイピングを検討し、報告した。そこで上記の本年度の解析結果をあわせ、平成 18 年から平成 21 年 10 月までに富山県内で発生した 0157 感染症 87 事例の代表株 99 株 (同一事例内での PFGE パターンの異なる株も含む) の IS-コードと PFGE パターンの比較を行った。その結果、これら 99 株の IS-コードは 47 タイプ検出された。一方、上記 99 株の PFGE パターンは 60 パターン検出され、IS-printing System による 0157 サブタイピングに比べて PFGE による型別はより細分化していた。

次に PFGE パターンと IS-コードの対応を比較した。PFGE パターンと IS-コードが一对一の固有な組み合わせであった株は 36 株 (36 事例) であり、総事例数の 41.4% であった。このうち 2 事例以上の株において PFGE パターンと IS-コードが一致した事例は 8 事例であり、これらの PFGE パターンと IS-コードの組み合わせは 3 組であった。このうち IS-コード 317575611756、305457611642 が検出された事例はそれぞれ 2 事例、4 事例であり、同一年度内の近接した時期に発生した事例であったが、各事例間の関連性は不明であった。

同一 IS-コードで複数の PFGE パターンが検出された事例は 44 事例 (54 株) で総事例数の 56% を占めた。このうち同一 IS-コードで最も多くの PFGE パターンが見られたのは IS-コード 613577610646 で PFGE パターンは 5 パターン、感染事例数は 8 事例であった。IS-コード 613577610646 株による感染事例は平成 18 年度に 7 事例、19 年度に 1 事例発生していた。これらの事例は 2 事例を除き全て散発事例であった。IS-コード 613577610646 株の PFGE パターンは 2 パターンを除き、類似度 90% 以上のクラスターを形成しており、同一株由来であると考えられた。上記の例を含め、同一 IS-コードで複数の PFGE パターンが検出された事例は、IS-コード 10 タイプのうち、2 タイプは同一年度に、5 タイプは

2年間連続して検出されたが、3年間以上同一タイプのIS-コードが継続して検出される事例はなかった。これらの結果は本県において同一IS分布を示す0157株の流行は1年～2年以内に推移する傾向を示唆していると考えられる。同一IS-コードでPFGEパターンが異なる原因としてはPFGEに用いられる制限酵素切断部位の変異、IS間でのゲノムの逆位などが考えられる。

一方、同一PFGEパターンに複数のIS-コードが検出された事例は27事例(総事例数の31.0%)であり、PFGEパターンとIS-コードは7パターン、12タイプであった。PFGEのクラスター解析から上記7パターンのうちPFGEパターンWとHを除く5パターンは類似度90%以上の大きなクラスターを形成していること、同一PFGEパターンを示した異なるIS-コード間の違いは1から2箇所のみであった(PFGEパターンXを示したIS-コード717577611657と307577211757を除く)ことから、これらのPFGE5パターンに属する分離株のゲノム構造が非常に近い、若しくは同一であった可能性が考えられた。また、同一PFGEパターンに複数のIS-コードが検出された事例に関してはISが小さい分子(IS629で1.3kb程度)であるため、これらの分子のexcisionや増幅によるコピー数の変化やゲノム内への挿入によるISの分布状況の変化について、20kb～30kb以上のゲノム制限酵素切断片のパターンを解析するPFGEでは反映されなかったと考えられる。

以上のようにPFGEとIS-コードによるタイピングはその型別対象がゲノム制限酵素切断部位、IS挿入位置と異なることからその型別は完全には一致しない。しかしIS-printing Systemはその迅速性・簡便性の点から、発生時期が近接した感染事例(集団感染事例や疫学的関連性の疑われる事例(diffuse outbreak)等)の比較に関してスクリーニングとして有効な手段であると考えられる。また、近年大腸菌においてIS-excisionを促進し、ゲノムの多様化に関与する因子としてIS-excision enhancer(IEE)が報告されている(腸管出血性大腸菌シンポジウム、2009)。上記の同一PFGEパターンに複数のIS-コードが検出された事例およびそのクラスターに属する株は高頻度IS-excisionが引き起こされている可能性があり、これらの株についてIS-

excision enhancerがどのように寄与しているかは今後の課題である。

平成22年度

#### 1) 行政への還元に関する調査

平成22年度東海・北陸9地研の行政への還元に関する調査ではそれぞれ8地研でPFGEの結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。これら8地研の泳動図は疫学調査等に活用されるに十分な画質を有していたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われる。全ての病原菌の泳動図を行政に還元している富山県をはじめ他の地研では活用例は年間1から2事例であった。行政に還元された集団事例由来病原菌は0157をはじめ026、0145、サルモネラ、及びエンテロバクタークロアカであった。今後の研究班活動でPFGE精度管理を行う際にはこれら食中毒菌、及び院内感染原因菌も念頭に置いて実施すべきであると思われる。また、特にこれまでの精度管理では腸管出血性大腸菌のみを検体としてきたが、エンテロバクターのようなそれ以外の病原菌の事例に対しても十分応用可能であることが証明された。

#### 2) IS printing Systemの実施

IS printing Systemの検討から、本法はPFGEが同じか非常に類似した集団事例由来株は同一若しくはISパターンのひとつ異なるパターンに分かれたことからその解析力はPFGEと同程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関してはIS printing Systemの方がPFGEより優っていることは明らかであった。今後実用化に向けての検討課題として1) 集団事例発生時にIS printing Systemのみで報告して良いか。2) PFGEとIS printing Systemで結果が異なった場合どのように解釈するか。が考えられる。

#### 3) POTの実施

今年度検討したPOTについての詳しい検討結果、感想は前述したが、6地研で行った検討ではPOT型とエンテロトキシン型及びコアグラゼ型はよく一致し、その解析力はPFGEと同程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関してはPOTの方がPFGEより優っていることが明らかとなった。また、1) 集団事例発生時にPOTのみで報告して良いか。2) PFGEとPOTで結果

が異なった場合どのように解釈するか等が今後実用化に向けての検討課題思われる。

平成 23 年度

PFGE 泳動図の相互比較のために重要と考えられる PFGE 実施条件として 1) サルモネラマーカ-の使用、2) PFGE 泳動条件の統一がある。今年度の精度管理ではこのうちサルモネラマーカ-使用のみ統一としたが、PFGE 泳動条件の統一は全ての施設で行われていた。解析を行なった 11 施設の泳動図に関して 3 検体とも全体の相同性は約 90%であったが、2 から 9 施設では相同性 100%が得られた。今後、全体の相同性を 100%に近づけるためには菌株自体の変異も関係していると思われるが、各施設の画質の向上に加え、各施設から電送された泳動図は大きさや明るさによりバラツキがあることからこれらの統一を行うことが必要であると思われる。

初めての試みとして IS printing System 精度管理を実施した。11 施設中 8 施設では 3 検体何れも正しく型別を行うことが出来た。しかし、残りの 3 施設では一部若しくは 3 検体全て、バンドを正しく認識することが出来なかった。これまでの東海・北陸ブロックでの IS printing System の試行から非特異バンドの出現は指摘されていたが、型別に大きく影響を及ぼすものではなかった。今回、正しくバンドを認識出来なかった原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスミアーになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短い等が考えられた。このうち、1) と 4) に関しては、プロトコルに従って正しく行えば解消される問題と考えられた。2) と 3) の問題点に関しては、試薬、PCR 機器の不都合等が考えられる。また、これまでの研究班活動の結果から、IS printing System の解析力は PFGE とほぼ同程度と考えられた。さら簡便性、迅速性に関しては IS printing System がはるかに PFGE より優っていることは明らかとなっている。従って、来年度は今年度の試みをさらに発展させ、解析する 0157 の菌株数の増加、菌株の分離年月、散発・集団等の情報の追加を行い「IS printing System によるデータベース構築」を進めたい。

E. 結論

平成 21 年度

東海・北陸地方 9 施設による腸管出血性大腸菌を用いた精度管理を実施した。PFGE 実施条件はサルモネラマーカ-使用を統一し、3 検体 (0157:H7) について行なった。その結果、9 施設全ての泳動図は解析ソフトを用いた解析に十分な画質が得られた。施設間の相同性の比較を行なったところ、何れの検体においても施設間の相同性が 89.5%以上と高率であった。

平成 21 年度東海・北陸 9 地研のうち 2 地研では事例発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。何れも良質な泳動図が得られていたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われた。特にこれまでの精度管理では腸管出血性大腸菌のみを検体としてきたが、レジオネラ菌感染事例のようなその他の病原菌の事例に対しても十分応用可能であることを証明した。

6 施設で検出された 0157 について IS printing system を実施した。若干の非特異バンドは依然出現するものの、散発事例、及び集団事例を用いた検討からその解析力は PFGE と同程度と考えられた。

平成 22 年度

1) 行政への還元に関する調査

平成 22 年度東海・北陸 9 地研のうち 9 地研では集団発生の際に PFGE を実施し、その結果を行政に還元していた。何れも良質な泳動図が得られていたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われた。これまでの精度管理では腸管出血性大腸菌のみを検体としてきたが、エンテロバクターのようなその他の病原菌の事例に対しても十分応用可能であることを証明した。

2) IS printing System の実施

5 年間の IS printing System と PFGE との比較検討の結果、その解析力は PFGE と同程度であるが、その簡便性及び迅速性は PFGE より優っていることが明らかとなった。非特異バンドの出現も殆ど認められず集団事例発生時にはその迅速性、簡便性の利点を生かして PFGE と同時に使用すればお互いの利点を生かし有用な疫学情報が得られることが期待される。

### 3) POT の実施

東海・北陸6地研で行なった POT の検討から、本法は PFGE とその解析力は同程度と考えられた。よって本法も PFGE と同様、集団発生時の疫学解析の有力な手段となることが期待される。

平成 23 年度

東海・北陸地方 11 地方衛生研究所及び衛生試験所（施設）による腸管出血性大腸菌 O157 を用いた精度管理を実施した。PFGE はサルモネラマーカーを使用し、PFGE 型の異なる 3 検体（検体番号 1 から 3）について行った。その結果、検体 1 に関しては 11 施設全体の相同性は 93.8% と 3 検体中最も高率であった。11 施設の泳動図は 9 施設が 100% の相同性で含まれる 1 つの大きなクラスターが認められた。検体 2 については 11 施設の泳動図は全体で 88.6% と 3 検体中最も低い相同性であった。このうち 4 施設の泳動図は 100% で一致した。検体 3 の 11 施設の泳動図は全体で 92.1% の相同性であった。2 施設、及び 5 の泳動図はそれぞれ 100% で一致した。

IS printing System 精度管理に関しては、11 施設のうち 8 施設では 3 検体全て正しく型別が行われていた。しかし、3 施設では全てのバンドを正しく認識することが出来なかった。これらの原因として 1) 高分子量領域でバンドが濃くスミアーになっていた。2) 低分子領域のバンドが薄く認識できなかった。3) 全くバンドが認められなかった。4) 泳動時間が短いことが考えられた。

平成 23 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研から 3 件の事例報告があった。

#### 1. 保育所における腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例

PFGE 解析の結果、感染者 17 名から検出された腸管出血性大腸菌 O26 について、制限酵素 Xba I による PFGE を実施したところ、17 株すべての泳動パターンが一致した。

#### 2. 介護老人福祉施設食中毒事例

PFGE による解析結果、介護老人福祉施設 A および隣接施設 B の入所者の便から分離された菌株および保存食から分離された菌株 No. 3~11 の

DNA 切断パターンは全て同一であった。

#### 3. 仕出し弁当を原因とする O26 食中毒

施設 A, B の弁当喫食者から分離された O26 の PFGE パターンは同一であった。さらに弁当の「添え野菜」から検出された O26 と同 PFGE パターンが一致した。

#### 4. 散発下痢症患者由来サルモネラ属菌 (O9:-:-) PFGE 解析

2011 年に F 県内で散発下痢症患者から検出されたサルモネラ属菌 (O9:-:-) 20 株のうち 19 株の PFGE パターンは類似していた (相同性 85%)。

#### F. 健康危機情報 なし

#### G. 研究発表 誌上発表

1. Masaaki Minami, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Nanako Hata, Naoki Wakiyama, Masakado Matsumoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa Prevalence of a Streptococcal Inhibitor of a Complement-Mediated Cell lysis-like Gene (sicG) in *Streptococcus Dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*. Current Microbiology Nov 4 (2010) [Epub ahead of print]
2. Tadao Hasegawa, Akira Okamoto, Takuya Kamimura, Ichiro Tatsuno, Sin-Nosuke Hasegawa, Mitsutaka Yabutani, Masakado Matsumoto, Keiko Yamada, Masanori Isaka, Masaaki Minami, Michio Ohta Detection of invasive protein profile of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates from pharyngitis patients. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica 118(3): 167-178 (2010)
3. Masaaki Minami, Yukio Wakimoto, Masakado Matsumoto, Hideyuki Matsui, Yasue Kubota, Atsushi Okada, Masanori Isaka, Ichiro Tatsuno, Yasuhito Tanaka, Tadao Hasegawa Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from

balanoposthitis patients presumably transmitted by penile-oral sexual intercourse. *Current Microbiology* 61(2): 101-105 (2010)

4. Masakado Matsumoto, Masahiro Suzuki, Kaoru Hirose, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa, Masaaki Minami, Ichiro Tatsuno, Akira Okamoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa. Variation in M protein production among *Streptococcus pyogenes* strains according to emm genotype. *Microbiol Immunol.* 2011; 55: 379-387.
5. Masaaki Minami, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Nanako Hata, Naoki Wakiyama, Masakado Matsumoto, Michio Ohta, Tadao Hasegawa. Prevalence of a streptococcal inhibitor of a complement-mediated cell lysis-like gene (sicG) in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Curr Microbiol.* 2011; 62: 884-887
6. Masahiro Suzuki, Kazuhiro Yamada, Miki Nagao, Etsuko Aoki, Masakado Matsumoto, Tatsuya Hirayama, Satoshi Ichiyama, Yoshitsugu Yamamoto, Reiji Hiramatsu, Hiroaki Iinuma. Antimicrobial ointments

and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1917-20.

学会発表

1. A群レンサ球菌の産生するMタンパク産生量の多様性 松本昌門、鈴木匡弘、皆川洋子、岡本 陽、太田美智男、長谷川忠男 第46回日本細菌学会中部支部総会 2009 10.23 名古屋市
2. 山崎 貢, 松本昌門, 青木日出美, 山本弘明, 山田和弘, 平松礼司, 皆川洋子, 岩出義人 増菌培養とLAMP法を組み合わせた腸炎ビブリオ高感度検出法の検討 第31回日本食品微生物学会学術総会 平成22年11月11日~12日 滋賀県大津市
3. Masahiro Suzuki, Masakado Matsumoto, Kazuhiro Yamada, Reiji Hiramatsu, Hiroko Minagawa. Evaluation of a novel *Staphylococcus aureus* genotyping called phage open reading frame typing by detecting phage-derived open reading frames, *Staphylococcal* cassette chromosome *mec*, and genomic islets. IUMS 2011 2011.9.10.

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 21～23 年度総合研究報告書（分担研究）

近畿ブロックにおける腸管出血性大腸菌感染症の分子疫学手法に関する研究

研究分担者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河野智美、福島敬介	滋賀県衛生科学センター
	安田奈央、吉田時子	滋賀県衛生科学センター
	浅井紀夫、杉浦伸明、中嶋智子	京都府保健環境研究所
	木澤正人、平野 隆	京都市衛生環境研究所
	小笠原準、中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	下迫純子、横田正春	堺市衛生研究所
	齋藤悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹、宮本園子、岩本朋忠	神戸市環境保健研究所
	川西伸也	姫路市環境衛生研究所
	田辺純子、榮井 毅	奈良県保健環境研究センター
	金澤祐子	和歌山市衛生研究所
	田口真澄、河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所
	原田哲也、神吉政史	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症の原因究明と感染拡大防止に向け、近畿ブロックの地方衛生研究所で実施されている分離株の遺伝子解析法について検討した。EHEC O157 の迅速な遺伝子型別法である IS-printing System（IS）法については、精度管理の実施により非特異バンドの誤判定が解消され、信頼性を確保できた。さらに、O157 の流行菌型を迅速に探知するため、近畿 IS データベースを構築してその充実と活用をはかったところ、diffuse outbreak だけでなく、溶血性尿毒症症候群（HUS）発症率が高いと言われている clade 8 の探知にも有用であると考えられた。パルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法は、EHEC O157 と EHEC O26 を用いて精度管理を実施し、異なる 10 施設で実施した電気泳動画像の解析で、O157 は同一菌株が高い近似度を示したが、O26 は近似度の低い画像もみられた。PFGE 法は汎用性の高い手法であり、O157 以外の血清群に使用できるようプロトコールの再確認と電気泳動装置の維持管理が必要である。Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法については、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

とが明らかになり、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が不可欠であるとともに、測定機器による差を補正するため、多くの菌株についてデータを蓄積することが求められる。

#### A. 研究目的

近畿地方の2府4県は互いに通勤・通学圏内にあり、食中毒や集団下痢症の患者が複数の自治体に分かれて探知されることが多い。各事例の関連性を見極めることは、原因追及だけでなく感染拡大防止にも重要で、行政対応には科学的な根拠が求められる。腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症は、近畿地方で毎年400～600例の届出があり、その発生時期は夏季に集中する。原因の多くが汚染食品の摂食であると考えられるが、EHEC感染症は感染菌量が少ないため、喫食者が必ず発症するとは限らず、感染源が明らかになる事例は少ない。各府県で分離される菌株の遺伝子型を解析することにより、同一タイプ分離事例に共通の食品やエピソードから感染源を追究することが可能になると考えられる。EHECの遺伝子型を解析する分子疫学手法として、近畿ブロックの地方衛生研究所（地研）ではパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法やIS-printing System（IS）法、Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法を用いている（表1）。これらの方法を近畿ブロックで共通の疫学指標として使用するため、その信頼性確保は重要な課題である。本研究では、すでにプロトコールが確立されているPFGE法と試薬がキット化されているIS法については精度管理を、MLVA法についてはプロトコールの標準化に向けた施設間差

の検証に取り組んだ。さらに、EHECで最も分離数の多いO157の流行菌型を迅速に探知できるよう近畿ISデータベースを構築し、その充実と活用をはかった。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

初年度と次年度は、IS法とPFGE法の精度管理に実施年に分離されたEHEC O157を6株ずつ使用した。最終年度は、IS法の精度管理には実施年に分離されたEHEC O157を5株、PFGE法の精度管理には、2008～2011年に分離されたEHEC O26 5株を使用した。精度管理株はトリプトソイ寒天培地1mlを分注したマイクロチューブに接種し、大阪府立公衆衛生研究所（公衛研）から研究協力者に配布した（表2）。MLVA法の施設間差の検討は、2005～2008年に分離されたEHEC O157を8株ずつ使用し、95℃10分間加熱して作製したテンプレートを公衛研から研究協力者に配布した（表2）。

##### 2. IS法

IS-printing System Version 2（東洋紡）のPCR反応液量を半量に変更して使用した。電気泳動は、3%アガロースゲル（NuSieve GTG:SeaKem GTG=2:1）と0.5xTBEバッファまたは自動電気泳動装置QIAxcel（QIAGEN）を使用し、試薬に添付のStandard DNAの18本のバンドが明瞭に区別



できるよう、各施設で電気泳動量を調整した。

精度管理株については、プライマーごととバンドの有無を「1」と「0」で判定した表と電気泳動画像を研究分担者に送信した。

### 3. 近畿 IS データベース

各施設で型別された EHEC O157 の IS 型と菌株情報のデータベースを、2009 年 10 月に立ち上げた。データベースは FileMaker Pro10 Advanced で作成し、ランタイム版を研究協力者に配布した。データ入力は、菌株番号、血清型、発症日・検体採取日、管轄保健所、IS 法の判定結果 (IS データ) を必須項目とし、住所・地域、IS 法の非特異バンド、備考も入力できるようにした。また、IS データは十進数に変換し、セット 1、セット 2 の順に組み合わせた「IS コード」としても表示した。2011 年 6 月には、以下の 4 点を改良したバージョンアップ版を配布した。

- 1) clade 解析と感染研 PFGE タイプ番号を独立した項目として入力する。
- 2) 照合結果を日付などでさらに絞り込む。
- 3) Google Earth (<http://www.google.co.jp/intl/ja/earth/index.html>) 用にデータを書き出す。
- 4) SplitsTree 解析 (<http://www.splitstree.org/>) 用にデータを NEXUS で書き出す。

研究協力者は各施設で実施した成績を「レファレンス用データ」として随時公衛研に送信し、公衛研では各施設から送付されたデータをもとにレファレンス・データベースを更新して、毎週金曜日に最新版を研究協力者に配布した。

データベース化にあたって、個々のデータの所有権は実施施設に帰属すること、データを報告や発表に使用する際は事前に実施施設の了解を取り、あわせて研究分担者へ連絡することをルールとした。

### 4. データベース登録株の clade 解析

伊豫田のプライマー (未発表) を用いた MAMA-PCR 法により、clade 8 に特徴的な塩基置換 (C から A) を検出した。clade 8 以外の株については、non-8 と判定した。

### 4. PFGE 法

平成 15 年度から使用している「PFGE New Protocol-Kinki」に従って *Xba* I で切断した。サイズマーカーには、*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断を使用し、Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できる泳動像を条件とした。

### 5. PFGE 画像の解析

PFGE 画像は、研究協力者から公衛研に電子メールで集約した後、CD に記録して別々の施設に所属する 4 人の解析者に送付した。

3 施設では Fingerprinting II ver. 3 (Bio-Rad) を、1 施設では BioNumerics ver. 6.1 を使用し、バンド検索の設定は画像ごとに最小ピーク高さ 5%、ショルダー感度 0 で行い、目視で補正した後、20.5kb~1135kb 間のバンドについて類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.2% でデンドログラムを作成した。

## 6. MLVA 法

国立感染症研究所で実施されている「感染研 MLVA プロトコール（細菌第一部 2008 年 7 月現在）」に準じ、Locus 10 は new version に変更して実施した。プライマー（インビトロジェン）は公衛研で購入して研究協力者に送付し、その他の試薬は各施設のものを使用した。2 年目（最終年度）の検討では一部の施設にサイズマーカーである GeneFlo 625（GeneFlo、コスモバイオ）を配布した。Locus ごとの Off set 値と Repeat 数は表 3 に示した。施設 3、施設 5、施設 7、施設 11 ではフラグメント解析に Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer を使用し、測定した各 Locus の増幅サイズを公衛研に集約して比較した。なお、蛍光発色強度が高く結果測定に支障をきたす場合には、PCR 反応液のプライマー濃度を半量にするか、フラグメント解析時に PCR 産物を 250-1000 倍に希釈することを指示した。施設 9 は、感染研 MLVA プロトコールと識別領域は同一であるが標識蛍光色素の異なるプライマーによる MLVA 変法 (Jpn. J. Infect. Dis., 63: 152-153, 2010) で実施し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer でフラグメント解析を行った後、独自の方法で補正した増幅サイズを報告した。また、施設 5 では、異なるサイズマーカーである GeneScan 600 LIZ (LIZ、Applied Biosystems) を用いた測定を並行して行い、その測定値を GeneFlo と比較した。

### C. 研究結果

#### 1. IS 法の精度管理

IS 法の精度管理には 9 または 10 施設が参加した（表 2）。各施設の判定結果を菌株ごとと比較したところ、初年度はセット 1 で 3 株、セット 2 で 6 株について判定に不一致がみられたが、次年度はセット 1 で 1 株、セット 2 で 2 株、最終年度はセット 1 の 1 株のみで、不一致は減少した（表 4）。プライマーごとにみると、セット 1 では 1-03 の判定不一致が 3 年間で 6 画像あり、1-03 付近の非特異バンドを陽性と判定していた。セット 2 では 2-03 の判定不一致が最も多く 12 画像あったほか、2-01、2-02 などサイズの大きいバンドで不一致が多くみられた。

#### 2. 近畿 IS データベース

近畿 IS データベースは、当初 9 施設の参加でスタートし、現在は 11 施設から 1,550 株が登録されている（2012 年 2 月 3 日現在）。

各年で登録数 13 株以上の IS 型に型名をつけ表 5 に示した。O9A や O9C、10H、11A のように分離時期が集中している場合と、長期間にわたって分離される場合があった。O9C はステーキハウスチェーンの複数の店舗で患者が発生した食中毒事例で、PFGE 型が 1 本異なる株も IS 型は同一であった。2010 年に最も多く登録された 10E は、施設 1 から 29 株、施設 2 と施設 4 から計 11 株が登録され、Google Earth に菌株データを書き出すと地域的な偏りが明らかであった（図 1）。11A の IS 型は、2010 年に 1 施設から 2 株分離されていたが、2011 年 7 月 24 日～8 月 6 日を中心に 8 施設から 45 株が登録された。一部の施設で PFGE 解析を実施して画像を

交換し、同一パターンであることが確認された。後になって、少なくとも 30 株は感染研 PFGE タイプが一致することがわかった。一方、IS コード「249727 116975」は 09E、10I、11E と毎年登録数が多く、しかも長期間にわたって分離されていた。このうち、2011 年の 7 月 19 日～8 月 8 日に発症した 28 株のうち少なくとも 6 施設から登録された 19 株は、感染研 PFGE タイプが一致していた。

### 3. データベース登録株の clade 解析

1,428 株について clade 解析が実施され、116 株が clade 8 に判定された。clade 8 の IS コードは 32 タイプに分かれ、non-8 と判定された株で clade 8 と同じ IS コードを示す株はなかった。

### 4. PFGE 法の精度管理

PFGE 法の精度管理には毎年 10 施設が参加した(表 2)。初年度と次年度は EHEC O157、最終年度は EHEC O26 を用いて精度管理を実施した。施設によっては担当者の変更があったが、O157 では概ね良好な PFGE 画像が得られた。4 名の解析者による画像解析で、各株の 10 画像中 2～10 画像は 100%一致と判定され、デンドログラムでは菌株ごとに近似度 91.9～100%のクラスターをつくった。合計 48 個のクラスターのうち、36 個は近似度 95%以上であった。

O26 では、O157 よりもバンド数が多い傾向があり、画像によってはバンドが太く 200～300kb のバンドが近接したものや、バンドが薄いあるいは不鮮明なものがあった。施

設 11 では、配布株を再分離した場合と継代培養のみ実施した場合の二種類のゲルブロックを同時に電気泳動したが、再分離の有無によって泳動パターンは異なっていた。そこで、施設 11 の 2 画像を含む 11 画像について解析したが、解析者によって認識バンド数のばらつきが大きい結果であった。O157 に比べ 100%一致と判定された画像は少なく、デンドログラムは 2 名の解析者では菌株ごとにクラスターをつくったものの、近似度は 84.3～95.5%であった。別の 2 名の解析者が作成したデンドログラムは、一部で菌株ごとのクラスターに含まれない画像があり、これを除くと近似度は 84.9～92.3%であった。合計 20 個のクラスターのうち、近似度 90%以上は 9 個、95%以上は 1 個であった。

### 5. MLVA 法の施設間差

1 年目の検討では、Locus によってまたは菌株によって施設間差がみられた。特に施設 3 の測定値が小さい傾向があり、Locus 25、Locus 3、Locus 34、Locus 19、Locus 10 では、増幅のみられたすべての株で他の 3 施設よりもそれぞれ 2bp、3～5bp、3bp、4bp、4bp 程度小さく、Locus 9 では 8 株中 3 株で 4～7bp 程度小さい値を示した。

2 年目の検討ではサイズマーカーを Gene Flo に統一し、同じプライマーを用いた 4 施設で測定値を比較した。1 株で施設 5 の Locus 36 の測定値が 142.9bp となり、他の 3 施設の平均値である 171.2bp よりも極端に小さい値を示した。それ以外でも若干の施設間差はみられ、Locus 9 と Locus 19 では全

株で施設 3 の測定値が 1.1～2.6bp 大きく、Locus 17 では全株で施設 11 の測定値が 1.5～1.7bp 小さい値を示した。

施設 5 では 2 つのサイズマーカーを用いた測定結果を比較したが、前述の Locus 36 で極端に小さい値を示した 1 株を除き、すべての Locus と菌株で、LIZ の測定値が GeneFlo の測定値に比べ小さい値を示した。この測定値の差は、増幅産物の分子量が 220bp 以下の 4 つの Locus では 4bp 程度であったが、増幅産物が大きくなるに従い測定値差も大きくなる傾向がみられた。さらに、Locus 10 では供試菌株によって測定値差にばらつきがあり、4 株は 6bp 程度の差であったのに対し、3 株は約 12bp の差がみられた。

## 6. 分子疫学手法を用いた事例解析

各自治体で発生した集団感染症や食中毒について、聞き取り調査に加えて分離株の遺伝子型別解析を実施し、事例間の関連性や原因食品を明らかにした。成果の一部は病原微生物検出情報に報告した（表 6）。

### (1) EHEC O157

2007 年 8 月から 10 月にかけて、京都府 A 市を中心に EHEC O157 感染症が 8 事例発生した。うち 5 事例は家族事例で、いずれも飲食店の利用がなく散発的な発生であった。IS 法および PFGE 法を用いて分離株を解析したところ、8 月中旬以降に発生した 6 事例 12 株は一致していた。また同年 7 月から翌年 1 月にかけて、と畜処理された牛の直腸便や牛枝肉のふきとり検査から分離された EHEC O157 11 株についても同様の検討を行ったところ、8 月 20 日に分離された牛枝肉

由来株とも一致していた。

2009 年 8 月から 9 月にかけて 13 都府県で発生した飲食チェーン店の「角切りステーキ」事件では、奈良県内で発生した患者等 10 名について、分離株の PFGE 解析を実施した。「角切りステーキ」喫食者 8 名と接触者 1 名の分離株は、PFGE パターンが一致し、接触者への二次感染が疑われた。別メニューを食べた 1 名の分離株は 5～6 本異なっており、感染源は別にあると考えられた。

### (2) *Campylobacter*

2010 年 4 月に京都府内で発生した 2 事例の *Campylobacter* 食中毒で、分離された *C. jejuni* はともに Penner 型別が O 群であった。そこで、両事例の関連性を調査するため *flaA* 遺伝子の PCR-RFLP 法と PFGE 法を用いて、詳細な検討を行った。食品由来株を含む 2 事例由来 7 株について、PCR-RFLP は同じ制限酵素切断パターンを示した。PFGE 法は、*Sma* I 切断パターンは事例ごとに一致したものの事例間では異なっていた。*Kpn* I 切断パターンは、事例 1 由来株は一致し、事例 2 由来株は互いに 1～2 バンド異なる 3 パターンに分かれ、いずれも事例 1 とは異なっていた。

## D. 考察

### 1. IS 法

IS 法は、1 株につき 2 組のマルチプレックス PCR を実施し、合計 36 か所の遺伝子の有無を判定するが、菌株によって非特異バンドが増幅される。初年度の精度管理では、陽性バンドに近いサイズの非特異バンドを誤判定するケースが多く、各施設で電気泳動