

表1) 菌株情報

| 事例※ | 菌株番号 | 分離日 | 発生地域 | 年齢 | 性別 | 備考 | 症状 | O:H | VT型 |
|-----|------|------------|------|-------|----|--------|----------------|---------|-----|
| A | 1 | 2012/10/23 | 鳥取市 | 33 | M | 保菌者、集発 | 無症状 | O157:H7 | 1.2 |
| A | 2 | 2012/10/23 | 鳥取市 | 32 | F | 保菌者、集発 | 無症状 | O157:H7 | 1.2 |
| A | 3 | 2012/10/17 | 鳥取市 | 10 | M | 患者、集発 | 腹痛、嘔吐、発熱、下痢、血便 | O157:H7 | 1.2 |
| A | 4 | 2012/10/24 | 鳥取市 | 8 | F | 患者、集発 | 腹痛 | O157:H7 | 1.2 |
| B | 5 | 2012/8/17 | 米子市 | 2 | F | 患者、集発 | 血便 | O157:H7 | 1.2 |
| B | 6 | 2012/8/21 | 米子市 | 9 | M | 保菌者、集発 | 無症状 | O157:H7 | 1.2 |
| B | 7 | 2012/8/20 | 米子市 | 7歳9ヶ月 | F | 患者、集発 | 下痢 | O157:H7 | 1.2 |

※事例の同じアルファベットは同一事例を示す

表2) ISコード変換例 (菌株 NO.122732)

1st

| primer No. | 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 | eae | 1-16 | hlyA |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|
| 分子量 (bp) | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 137 |
| 増幅の有無 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| コード変換 | 1 | | | 5 | | | 1 | | | 1 | | | 4 | | | 7 | | |

2nd

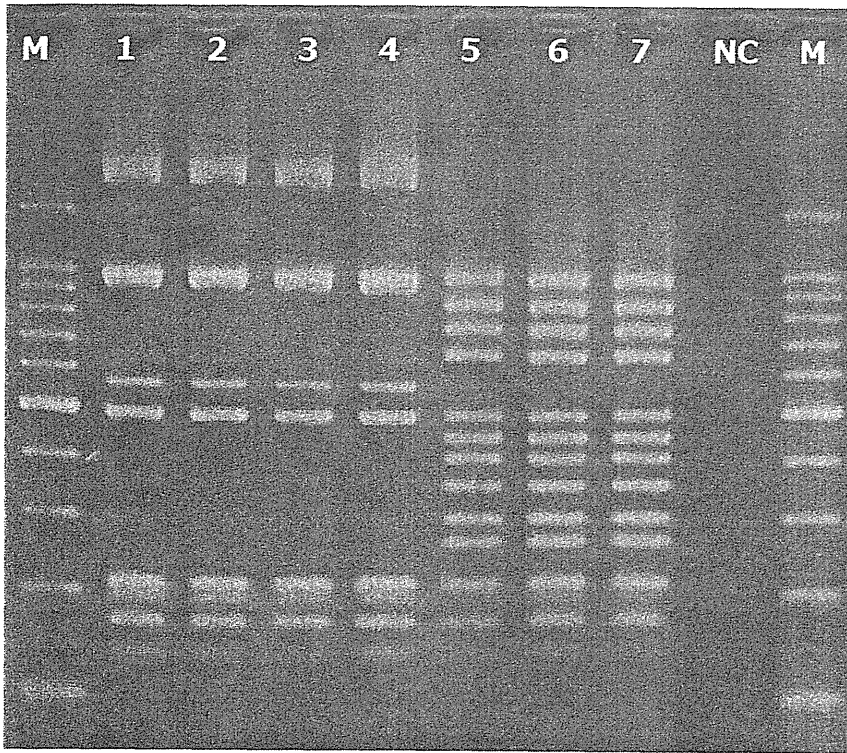
| primer No. | 1-01 | 1-02 | 1-03 | 1-04 | 1-05 | 1-06 | 1-07 | 1-08 | 1-09 | 1-10 | 1-11 | 1-12 | 1-13 | 1-14 | 1-15 | eae | 1-16 | hlyA |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|
| 分子量 (bp) | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 |
| 増幅の有無 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| コード変換 | 3 | | | 6 | | | 1 | | | 4 | | | 4 | | | 7 | | |

表3) IS法の結果

| 事例※ | 菌株番号 | ISコード(当所解析) | |
|-----|------|-------------|--------|
| | | 1st | 2nd |
| A | 1 | 151147 | 361447 |
| A | 2 | 151147 | 361447 |
| A | 3 | 151147 | 361447 |
| A | 4 | 151147 | 361447 |
| B | 5 | 717557 | 757637 |
| B | 6 | 717557 | 757637 |
| B | 7 | 717557 | 757637 |

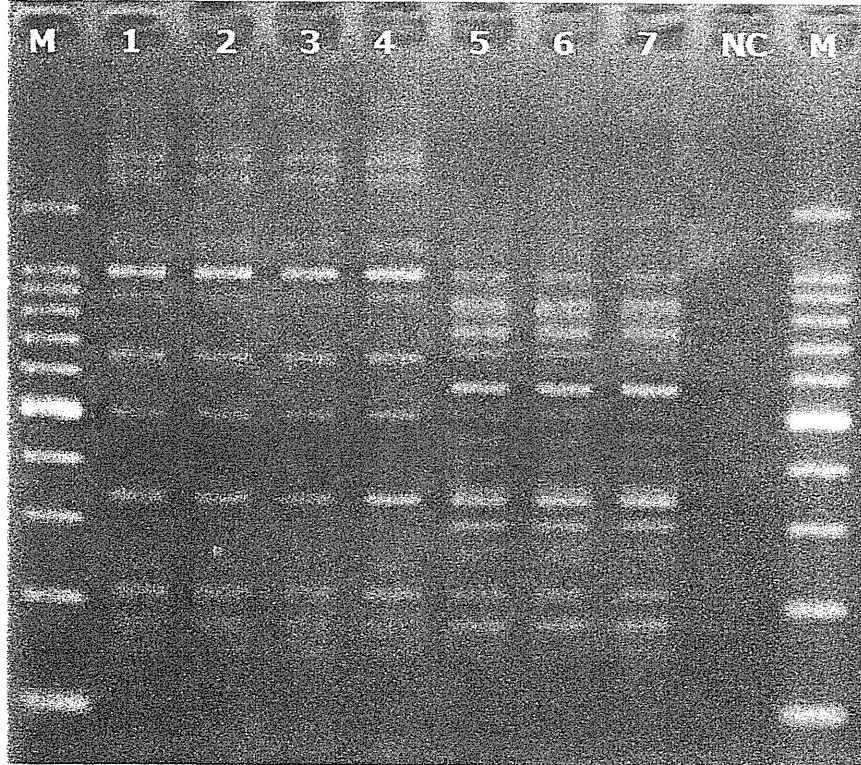
※事例の同じアルファベットは同一事例を示す

1st



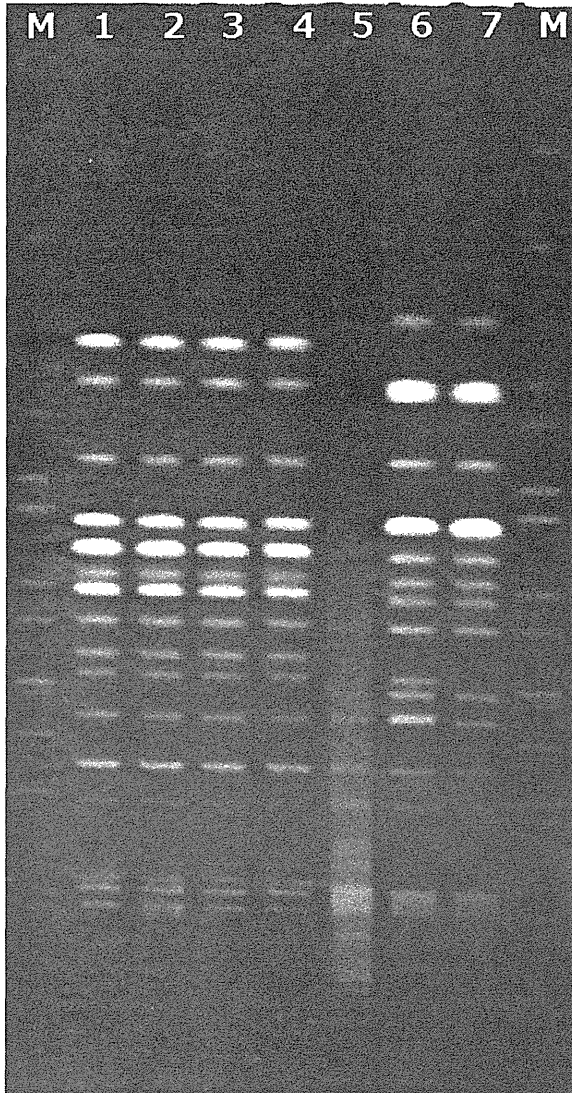
M : マーカー
NC : 陰性コントロール

2nd



M : マーカー
NC : 陰性コントロール

図1) IS-printing 法実施後のゲル写真



M : マーカー

図 2) PFGE 法実施後のゲル写真

島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学解析における
IS-printing 法の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所
樫本 孝史 黒崎 守人

研究要旨

2007 年から 2012 年 3 月までの期間に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26、14 事例 79 株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) と IS-printing 法 (IS 法) を比較し腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学解析における IS 法の有用性を検討した。腸管出血性大腸菌 O26 における IS 法は、PFGE 法と比べると型別の種類が少なく、菌株間の型別法としてはさらなる検討が必要と思われた。しかしながら、IS 法は迅速かつ簡便であり、家族内感染株や集団感染株において事例内で全て同じパターンを示したことから家族内感染由来株や集団感染由来株かを判定することは可能であり、アウトブレイクを探知する一助となると考えられる。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌等の分子疫学的解析手法として広く行われている PFGE 法は解析能や再現性も高く、またデータの蓄積もあり信頼性のある手法である。しかし、特殊な機器を必要とすること、解析に時間がかかることなど問題点もある。一方 IS 法は、Insertion Sequence 領域を標的とし、Multiplex PCR を基本としたサブタイピング法で、腸管出血性大腸菌 O157 については PFGE 法より迅速かつ簡便でほぼ同等の結果が得られるため普及してきている。腸管出血性大腸菌 O26 に関しては 2011 年に Mainil らが IS621 insertion site を標的とした IS 法を報告した¹⁾ ところであり、今回腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学解析において IS 法が有用であるか検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2007 年から 2012 年 3 月までの期間に島根県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26、14 事例 79 株を用いた。

2. 方法

(1) IS printing 法

Mainil らの報告¹⁾ に基づき実施し各 Insertion site の 5' 末端の内側と外側に設計されたプライマー (OS_L) と 3' 末端の内側と外側に設計されたプライマー (OS_R) を用いた PCR (PCR-L 及び PCR-R) を行い、各 Insertion site が正しく検出されていることを確認した。PCR_L 及び PCR_R のプライマーごとに増幅ありを「1」、増幅なしを「0」として、表 1 の例に従い変換し、denetion PCR の結果 (+/-) を合わせて、5 桁にコード化した (以下 IS コード)。なお、反応組成を QIAGEN Multiplex PCR Kit に変更し一部の条件を変更した。

(2)パルスフィールドゲル電気泳動法

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. 結果及び考察

各 Insertion site が正しく検出されていることを確認するために PCR_L 及び PCR_R を実施した。各 Insertion site が正しく検出されていれば PCR_L と PCR_R は同一の IS コードとなるが、今回実施した菌株の中には PCR_L と PCR_R で異なる IS コードを示した菌株があった。図 1 に示すとおり事例 2 の菌株では PCR_R の OS_5(230bp)はバンドが検出されたが、PCR_L は OS_5(260bp)付近に薄いバンドが検出された。確認のため Insertion site 5 に関して OS_L 及び R 各々でシングル PCR を実施したところ、PCR_R ではバンドが検出されたが、PCR_L ではバンドが検出されなかった。このため Mainil らの報告¹⁾に基づき「3/6551+」と表記した。また、図 2 に示すとおり事例 3 の 5 菌株と事例 7 の 4 菌株では PCR_L は OS_10(617bp)のバンドは検出されなかったが、PCR_R は OS_10(164bp)付近に薄いバンドが検出された。確認のため Insertion site 10 に関して OS_L 及び R 各々でシングル PCR を実施したところ、PCR_L、PCR_R 共にバンドは検出されなかった。そのため PCR_R の OS_10 付近に検出された薄いバンドは非特異的バンドと判定した。この非特異的バンドは事例ごとに全株が同じパターンであった。このように標的サイズ付近に非特異的バンドが検出される場合、標的バンドを陽性と判定する可能性が考えられる。

IS 法と PFGE 法を比較すると表 2 に示すとおり 14 事例に対応する 79 株は IS 法

で 8 タイプに、PFGE 法では 20 タイプに分類された。IS コードと PFGE タイプが 1 対 1 に対応する菌株群は 5 グループあった。同一 IS コードで異なる PFGE タイプの菌株群は 15 グループあった。逆に同一 PFGE タイプで異なる IS コードを示した菌株群はなかった。

表 3 に示すとおり事例別にみると家族内感染の事例 7、10、11、14 の菌株はそれぞれ PFGE タイプおよび IS コードが事例ごとに同一であった。IS コードが同一である散発事例 8、家族内感染事例 10、11、集団感染事例 12、13 の内、事例 11、12、13 は PFGE 法で 1 タイプ、6 タイプ、2 タイプに分けられたものの、3 バンド違いまでであり、互いに関連があると推測されたが、これら 3 事例に疫学的関連性は確認されていない。事例 8 と 10 は PFGE 法のタイプが異なり、疫学的関連性も確認されていない。また、同様に IS コードが同一の散発事例 1、6、家族内感染事例 14 は PFGE 法のタイプは異なり、疫学的関連性も確認されていない。

家族内感染の事例 3 は PFGE 法で 4 タイプに分けられるが、疫学的関連性があり IS コードも同一であった。

腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学解析における IS 法は PFGE 法と比べると型別の種類が少なく、菌株間の型別法としてはさらなる検討が必要と思われた。しかしながら、IS 法は迅速かつ簡便であり、家族内感染株や集団感染株において事例内で全て同じ IS コードを示したことから家族内感染由来株や集団感染由来株かを判定することは可能であり、アウトブレイクを探知する一助となると考えられる。

E. 謝辞

ご協力・ご助言いただいた宮崎大学医学部
大岡唯祐先生、富山県衛生研究所嶋智子先
生に深謝いたします。

G. 参考文献

1).Mainil.JG ら Journal of Applied
Microbiology 111. 773-786

F. 研究発表なし

表1 ISコード変換例(事例1の菌株)

| PCR_L | | | | | | | | | | | | detection PCR | |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|--------|
| IS insertion site | 1 | 3 | 5 | 6 | 9 | 10 | 11 | 13 | 14 | 16 | 17 | 18 | 4 |
| Size (bp) | 328 | 189 | 260 | 292 | 369 | 617 | 457 | 412 | 666 | 983 | 871 | 570 | |
| 増幅の有無 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | (+/-)* |
| 加算 | 6 | | | 7 | | | 5 | | | 3 | | | + |

| PCR_R | | | | | | | | | | | | detection PCR | |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|--------|
| IS insertion site | 1 | 3 | 5 | 6 | 9 | 10 | 11 | 13 | 14 | 16 | 17 | 18 | 4 |
| Size (bp) | 779 | 194 | 230 | 297 | 387 | 164 | 473 | 563 | 257 | 330 | 855 | 139 | |
| 増幅の有無 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | (+/-)* |
| 加算 | 6 | | | 7 | | | 5 | | | 3 | | | + |

* 711bpのバンドが検出されれば(+)と表記し、639bpのバンドが検出されれば(-)と表記する。

図1 標的サイズ付近の薄いバンド

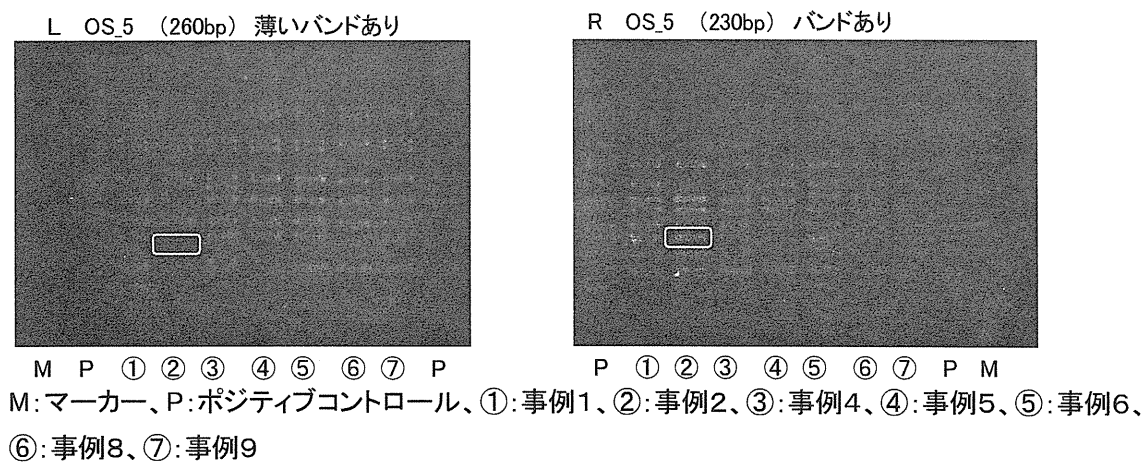


図2 標的サイズ付近の薄いバンド

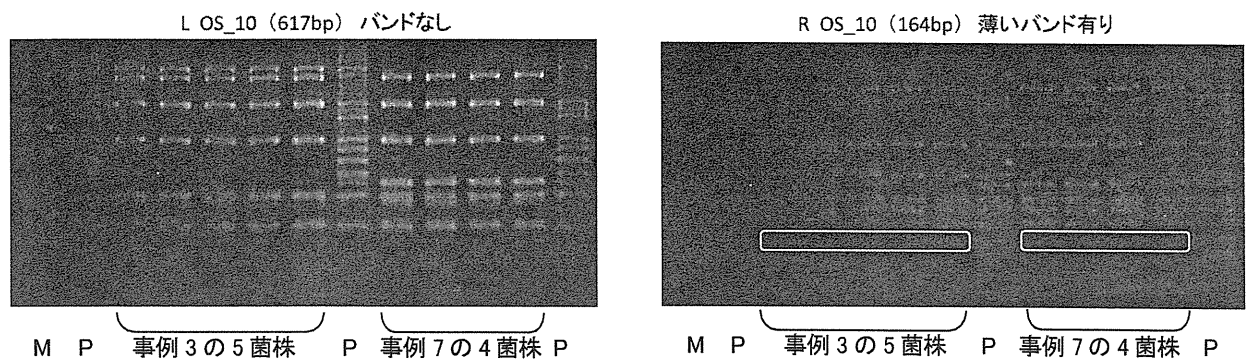


表2 ISコードとPFGEタイプ

| PFGE Type \ ISコード | 6753+ | 3/6551+ ¹⁾ | 6053+ | 6771+ | 4753+ | 6152+ | 6353- | 6753- | 総計 |
|-------------------|-------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| c177 | 1 | | | | | | | | 1 |
| e179 | 1 | | | | | | | | 1 |
| c181 | | 1 | | | | | | | 1 |
| e175 | | | 1 | | | | | | 1 |
| e176 | | | 1 | | | | | | 1 |
| e177 | | | 1 | | | | | | 1 |
| e178 | | | 2 | | | | | | 2 |
| e174 | | | | 1 | | | | | 1 |
| e173 | | | | | 1 | | | | 1 |
| e180 | | | | | | 4 | | | 4 |
| f125 | | | | | | | 1 | | 1 |
| g3 | | | | | | | 6 | | 6 |
| g65 | | | | | | | 43 | | 43 |
| g66 | | | | | | | 1 | | 1 |
| g67 | | | | | | | 1 | | 1 |
| g68 | | | | | | | 1 | | 1 |
| g69 | | | | | | | 2 | | 2 |
| g70 | | | | | | | 6 | | 6 |
| e30 | | | | | | | 3 | | 3 |
| f129 | | | | | | | | 1 | 1 |
| 総計 | 2 | 1 | 5 | 1 | 1 | 4 | 64 | 1 | 79 |

1) PCR_LとPCR_RでISコードが違う

表3 事例とISコードとPFGEタイプ

| 事例 | ISコード | PFGEタイプ(感染研) | VT | 菌株数 | 発症年月 | 住所 | 備考 |
|----|-----------------------|---|-------|-----|----------|-----|-------|
| 1 | 6753+ | c177 | VT1 | 1 | 2007年9月 | M市 | 散发 |
| 2 | 3/6551+ ¹⁾ | c181 | VT1 | 1 | 2007年10月 | U市 | 散发 |
| 3 | 6053+ | e175 | VT1 | 1 | 2009年7月 | O町 | 家族内感染 |
| | | e176 | VT1 | 1 | | | |
| | | e177 | VT1 | 1 | | | |
| | | e178 | VT1 | 2 | | | |
| 4 | 6771+ | e174 | VT1 | 1 | 2009年7月 | I市 | 散发 |
| 5 | 4753+ | e173 | VT1 | 1 | 2009年9月 | OK町 | 散发 |
| 6 | 6753+ | e179 | VT1 | 1 | 2009年11月 | O町 | 散发 |
| 7 | 6152+ | e180 | VT1 | 4 | 2009年12月 | G市 | 家族内感染 |
| 8 | 6353- | f125 | VT1 | 1 | 2010年8月 | O市 | 散发 |
| 9 | 6753- | f129 | VT1,2 | 1 | 2010年9月 | Y市 | 散发 |
| 10 | 6353- | g3 | VT1 | 6 | 2011年2月 | I市 | 家族内感染 |
| 11 | 6353- | g65 | VT1,2 | 3 | 2011年4月 | I市 | 家族内感染 |
| | | g65 | VT1,2 | 25 | | | |
| | | g66 (one band diff. from g65, diff. from g69) | VT1,2 | 1 | | | |
| | | g67 (one band diff. from g65, diff. from g69 g66) | VT1,2 | 1 | | | |
| | | g68 (two bands diff. from g65) | VT1,2 | 1 | | | |
| | | g69 (one band diff. from g65) | VT1,2 | 2 | | | |
| | | g70 (three bands diff. from g65) | VT1,2 | 5 | | | |
| 12 | 6353- | g65 | VT1,2 | 15 | 2011年6月 | U市 | 集団感染 |
| | | g70 (three bands diff. from g65) | VT1,2 | 1 | | | |
| 13 | 6753+ | e30 | VT1 | 3 | 2012年3月 | U市 | 家族内感染 |

1) PCR_LとPCR_RでISコードが違う

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 (第 2 報) －

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 |
| 広島市衛生研究所 | 児玉 実 | 田内敦子 |
| 岡山県環境保健センター | 中嶋 洋 | 大畠律子 石井 学 河合央博 |
| 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 | 櫛本孝史 |
| 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 | 鍋島 民 |

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子型のタイピングに用いられる IS-printing System 法の IS コード (12 桁 : 6 桁 2 組) を, アルファベットと数字による短い英数コードに変換する手法を用いて, 2010 年度~2011 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, 362 株と, 2012 年に広島県内 (広島市を除く) で分離された O157, 23 株との関係を検討した。その結果, 2010 年度~2011 年度に中国・四国ブロックから報告された O157 は A24~CE24 の 113 タイプにタイピングされ, そのうち BY55 (45 株) と BW55 (32 株) の 2 タイプは検出数も多く, いずれも中国・四国ブロックの 6 県・1 市~7 県・1 市に及ぶ広い地域から検出されていた。また, 2012 年に広島県内で分離された O157 は W20~BZ13 の 11 タイプにタイピングされ, そのうち 3 タイプ (BV55, BW55, BY55) は 2010 年度~2011 年度に中国・四国ブロックから報告されたものと同じタイプであった。このうち BY55 タイプ (7 株) が最も多かった。その他の 8 タイプ (W20, AF10, AJ10, AT55, AV9, BE42, BX56, BZ13) は, 新しいタイプであった。また, 桁数の多い IS コードを, 英数コードに変換することで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 の分子疫学的解析法として IS-printing System (IS) 法が, 従来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 ヲ所の部位と *eae*, *hlyA*, *stx1* 及び *stx2* の 4 種類の病原因子の 36 ヲ所を, 18 ヲ所ずつ 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 の遺伝子型をタイピングするものである。これにより O157 の遺伝子型がデジタル的に処理できるようになり、散发事例や過去の事例および他県の株との比較がより簡単にできるようになった。しかし、「0」，「1」で表された 36 桁の IS コードは、桁数が多く複雑で、データ処理などを行わないと比較が難しいなどの問題も有していた。そのため、勢戸ら²⁾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各組を 6 桁の数値にコード変換する手法を考案した。現在、中国・四国ブロックの地方衛生研究所もその手法を用いて菌株の遺伝子型をタイピングしている。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、また、類似した IS コードもあるため、多くの検体の場合には菌株間の比較が難しいこともある。そのため我々は、12 桁（6 桁 2 組）の IS コードを、更に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（以下、英数コード）に変換して菌株間の比較を行う手法について検討し、その概要を昨年度報告した³⁾。今回、その手法を用いて 2010（平成 22）年度～2011（平成 23）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、2012 年に広島県内（広島市を除く）で分離された O157 との関係について検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

(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³⁾と、2011 年度の総括・研究分担報告書に報告された O157，89 株（島根県 8 株⁴⁾，広島県 30 株⁵⁾，広島市 19 株⁵⁾，山口県 5 株⁶⁾，徳島県 10 株⁷⁾，香川県 5 株⁸⁾，愛媛県 12 株⁹⁾），総計 362 株の IS コードを使用した。

(2) 広島県内分離株

2012 年 1 月～12 月までに広島市を除く県内の保健所から当センターに搬入された O157，23 株の IS コードを使用した。IS コードは、市販の IS-printing System（TOYOBO）を用いて求めた。

2. 英数コードへの変換方法

昨年度と同様に、各菌株の 12 桁（6 桁 2 組）の IS コードを、各 primer の 6 桁のコード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、同様に数値の小さい順から数字の 1 から順に番号を付け、両方の組み合わせで英数コードに変換した。また、各組のコードの中で、0（ゼロ）で始まるものについては、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。なお、昨年度報告した 2010 年度の菌株の英数コードについては、2011 年度と 2012 年の菌株と共に、改めて新しい英数コードに再変換した。

C. 研究結果

1. 供試菌株の英数コード

(1) 2010 年度～2011 年度に中国・四国ブ

ロックから報告された O157, 362 株の IS コードと英数コードを表 1 に示した。1st set primer の IS コードは 78 タイプのアルファベットコードに, 2nd set primer の IS コードは 70 タイプの数字コードにそれぞれ変換され, その組み合わせによって 362 株は, A24~CE24 の 113 タイプにタイピングされた。そのうち 86 タイプ (76.1%) は単県から報告されたものであった。複数の県・市から報告された 27 タイプのうち, BY55 (45 株) と BW55 (32 株) は検出数も多く, それぞれ広島県を含む中国・四国ブロックの 6 県・1 市と 7 県・1 市の広い地域から検出されていた。この 2 タイプに次いで, BQ16 (17 株), AA30 (12 株), AM67 (11 株), CA13 (11 株), BY53 (10 株), Y57 (9 株) および AY31 (9 株) の 7 タイプが多かった。また, 広島県内のみで検出されたものは I4, O23, AE70, AH55 など 9 タイプ (広島市分を含めると 17 タイプ) が認められたが, いずれも検出数は 1~3 株と少なく, 散発的な発生によるものであった。

(2) 2012 年に広島県内 (広島市を除く) で分離された O157, 23 株の IS コードと英数コードを表 2 に示した。1st set primer の IS コードは 11 タイプのアルファベットコードに, 2nd set primer の IS コードは 7 タイプの数字コードにそれぞれ変換され, その組み合わせによって 23 株は, W20~BZ13 の 11 タイプにタイピングされた。そのうち BV55, BW55 および BY55 の 3 タイプは, 2010 年度~2011 年度に中国・四国ブロックから報告されたものと同じタイプであった。特に BY55 (7 株) は中国・四国ブロックの広い範囲から検出されているタイプで,

2012 年 5 月~10 月にかけて検出され, 最も検出数が多く, 全体の約 3 割 (30.4%) を占めた。一方, W20, AF10, AJ10, AT55, AV9, BE42, BX56 および BZ13 の 8 タイプは, 2010 年度~2011 年度には中国・四国ブロックからは報告されていない新しいタイプであった。

D. 考 察

IS 法は, PFGE 法と比べて識別能はやや劣るが, 集団発生や散発事例などにおいて迅速で簡便な O157 の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。しかし, IS 法の IS コードは桁数の多い数字だけで構成されており, 類似したコードもあるため, 行政サイドへの還元には複雑すぎるなどの問題もあった。そのため我々は昨年度, できるだけ桁数が短く, 分かりやすい IS コードで菌株間の比較ができるように IS コードの英数コード化について検討し, その概要を報告した³⁾。今回もその手法を用いて 2010 年度~2011 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, 2012 年に広島県内 (広島市を除く) で分離された O157 との関係について検討した。その結果, 2010 年度~2011 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, 362 株の遺伝子型は, A24~CE24 の 113 タイプにタイピングされ, 昨年度報告した 2010 年度の遺伝子型 (273 株, 93 タイプ)³⁾と比べて 2 年間で 1.2 倍に増加していた。そのため, 中国・四国ブロックでは感染源が多様化し, 新たな遺伝子型の O157 による感染が多く発生していることが示唆された。また, 検出数の多い遺伝子型には, BY55 と BW55 の 2 タイプ

があり、いずれも中国・四国ブロックの6県・1市～7県・1市の広い地域から検出されていた。そのため、これらの2タイプは広域型の散発型集団発生 (diffuse outbreak) も考えられた。特に BY55 タイプは、広島県内においては、2011年(昨年度のコード番号:BJ44)³⁾と2012年にも、最も多く検出されていることから、今後も BY55 タイプの動向には注意するとともに、早急な感染源の究明が必要であった。また、2012年に広島県内で検出された O157, 23株の遺伝子型11タイプのうち8タイプは、2010年度～2011年度にはみられない新しい遺伝子型であったことから、県内においても感染源が多様化していることが示唆され、これらの感染源の究明も必要であった。

今回、昨年度に続いて数字のみのISコードを英数コード化して菌株間の比較を行ったが、これまでの数字だけの長いISコードと比べて遺伝子型の違いが明瞭であり、行政サイドへの情報還元には便利な手法と思われた。そのため今後も中国・四国ブロックで分離された O157 との関連性が比較できるように、より多くの菌株のデータを収集し、データベース化していく必要があると思われた。

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英数コードに変換することにより、菌株間の遺伝子型の違いがより明瞭に解析出来るようになった。

2. 2012年に県内で分離された O157のうち、分離株の約3割を占めた BY55 タイプは、2011年にも広島県内で最も多く分離されており、また、中国・四国ブロ

ックの広い地域からも検出されていることから、広域型の散発型集団発生 (diffuse outbreak) も考えられ、早急に感染源の究明が必要であった。

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) 竹田義弘, 山田裕子, 河村美登里, 田内敦子, 中嶋 洋 他. 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—. 平成23年度総括・研究分担報告書及び平成21～23年度総合研究報告書. 2012 : 115 - 120.
- 4) 檜本孝史, 黒崎守人. 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. 平成23年度総括・研究分担報告書及び平成21～23年度総合研究報告書. 2012 : 106 - 108.
- 5) 田内敦子, 京塚明美, 築地裕美, 井澤麻由, 佐藤真帆 他. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の分子疫学的解析. 平成23年度総括・研究分担報告書及び平成21～23年度総合研究報告書. 2012 : 121 - 125.

6) 富永 潔, 矢端順子, 亀山光博. 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. 平成 23 年度総括・研究分担報告書及び平成 21～23 年度総合研究報告書. 2012 : 126 - 136.

7) 石田弘子, 下野生世. IS-printing system における自動電気泳動装置の有用性に関する検討. 平成 23 年度総括・研究分担報告書及び平成 21～23 年度総合研究報告書. 2012 : 137 - 139.

8) 宮本孝子, 有塚真弓, 関 和美, 内田順子. 中四国ブロックにおける香川県の

腸管出血性大腸菌 O157 感染事例の分子疫学解析. 平成 23 年度総括・研究分担報告書及び平成 21～23 年度総合研究報告書. 2012 : 140 - 147.

9) 林 恵子, 松本純子. 愛媛県で分離された腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について. 平成 23 年度総括・研究分担報告書及び平成 21～23 年度総合研究報告書. 2012 : 158 - 161.

表 1 2010 年度と 2011 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 コードと変換した英数コードとの関係

| No. | ISコード | | 英数コード | 株数 | 分離* 地域 | No. | ISコード | | 英数コード | 株数 | 分離* 地域 |
|-----|----------------|----------------|-------|----|-----------|-----|----------------|----------------|-------|----|------------------|
| | 1st set primer | 2nd set primer | | | | | 1st set primer | 2nd set primer | | | |
| 1 | 105057 | 303443 | A24 | 1 | Y | 58 | 317557 | 611653 | AU53 | 1 | Y |
| 2 | 105457 | 711642 | B71 | 2 | Y,T | 59 | 317557 | 611657 | AU55 | 6 | Hc,Y |
| 3 | 106577 | 201657 | C3 | 1 | Hc | 60 | 317557 | 611756 | AU59 | 4 | O,H,S |
| 4 | 113157 | 600653 | D35 | 1 | T | 61 | 317575 | 611257 | AV49 | 4 | Y,K |
| 5 | 114055 | 303643 | E27 | 1 | Y | 62 | 317575 | 611756 | AV59 | 1 | E |
| 6 | 114057 | 303443 | F24 | 5 | Y,S | 63 | 317575 | 611757 | AV60 | 2 | Hc,E |
| 7 | 115055 | 303443 | G24 | 4 | Y,S | 64 | 317577 | 211756 | AW9 | 2 | O |
| 8 | 115057 | 703447 | H65 | 1 | Y | 65 | 317577 | 211757 | AW10 | 5 | T,K |
| 9 | 116577 | 201757 | I4 | 1 | H | 66 | 317577 | 611657 | AW55 | 1 | O |
| 10 | 117175 | 601547 | J36 | 1 | E | 67 | 317577 | 611755 | AW58 | 1 | S |
| 11 | 117175 | 601557 | J37 | 1 | Y | 68 | 317577 | 611756 | AW59 | 5 | S |
| 12 | 117175 | 601757 | J40 | 2 | O,H | 69 | 317577 | 651755 | AW64 | 1 | Y |
| 13 | 117177 | 601757 | K40 | 2 | Y | 70 | 345057 | 311652 | AX31 | 7 | H,Hc,Y |
| 14 | 117575 | 641757 | L62 | 1 | Y | 71 | 345457 | 311652 | AY31 | 9 | O,H,Y,T,K |
| 15 | 135047 | 303447 | M26 | 1 | Y | 72 | 351557 | 710413 | AZ67 | 3 | Y |
| 16 | 144047 | 301443 | N19 | 2 | Y | 73 | 354457 | 311652 | BA31 | 1 | S |
| 17 | 145047 | 103443 | O1 | 1 | Y | 74 | 415457 | 311656 | BB32 | 1 | Y |
| 18 | 145047 | 303441 | O22 | 1 | K | 75 | 517557 | 601657 | BC39 | 1 | T |
| 19 | 145047 | 303442 | O23 | 1 | H | 76 | 517577 | 611657 | BD55 | 1 | Y |
| 20 | 145057 | 311252 | P28 | 1 | Y | 77 | 613177 | 210646 | BF5 | 4 | Hc,Y,T |
| 21 | 145147 | 303443 | Q24 | 1 | Y | 78 | 613571 | 610446 | BG42 | 1 | K |
| 22 | 155045 | 303442 | R23 | 2 | S | 79 | 613575 | 610446 | BH42 | 4 | Hc,E |
| 23 | 155047 | 303443 | S24 | 1 | Y | 80 | 613575 | 610646 | BH44 | 4 | Y |
| 24 | 155047 | 343443 | S33 | 5 | Y,S | 81 | 613577 | 610646 | BI44 | 4 | O,Y |
| 25 | 175247 | 303445 | T25 | 1 | T | 82 | 615455 | 311656 | BJ32 | 1 | H |
| 26 | 207577 | 611643 | U52 | 1 | O | 83 | 615457 | 301656 | BK20 | 2 | T |
| 27 | 215455 | 311656 | V32 | 1 | Y | 84 | 615457 | 311656 | BK32 | 4 | O,Y,S,T |
| 28 | 215555 | 710403 | X66 | 2 | Y | 85 | 617577 | 211547 | BL6 | 1 | K |
| 29 | 217557 | 611747 | Y57 | 9 | O | 86 | 703577 | 610657 | BM46 | 2 | Y |
| 30 | 300457 | 110406 | Z2 | 1 | S | 87 | 707577 | 611657 | BN55 | 3 | H |
| 31 | 305057 | 311443 | AA29 | 1 | S | 88 | 713557 | 610457 | BO43 | 1 | Hc |
| 32 | 305057 | 311457 | AA30 | 12 | E | 89 | 713575 | 231757 | BP16 | 1 | H |
| 33 | 305057 | 611642 | AA51 | 1 | Hc | 90 | 713575 | 610657 | BP46 | 2 | Y |
| 34 | 305447 | 711242 | AB69 | 2 | Y | 91 | 713577 | 231757 | BQ16 | 17 | O,H,Ko |
| 35 | 305455 | 211642 | AC8 | 2 | O | 92 | 713577 | 610657 | BQ46 | 1 | Y |
| 36 | 305455 | 711242 | AC69 | 1 | Y | 93 | 715057 | 211557 | BR7 | 1 | T |
| 37 | 305455 | 711642 | AC71 | 6 | Y | 94 | 715577 | 611257 | BS49 | 1 | Hc |
| 38 | 305457 | 611242 | AD48 | 1 | Y | 95 | 716577 | 611653 | BT53 | 1 | Y |
| 39 | 305457 | 611442 | AD50 | 1 | Y | 96 | 717057 | 231557 | BU15 | 3 | T |
| 40 | 305457 | 611642 | AD51 | 5 | H,Hc,Y,K | 97 | 717555 | 611657 | BV55 | 1 | T |
| 41 | 305457 | 711242 | AD69 | 4 | Y | 98 | 717557 | 611653 | BW53 | 4 | O,H |
| 42 | 305557 | 711413 | AE70 | 1 | H | 99 | 717557 | 611655 | BW54 | 1 | Y |
| 43 | 307555 | 611657 | AG55 | 2 | H,S | 100 | 717557 | 611657 | BW55 | 32 | O,H,Hc,Y,S,T,K,E |
| 44 | 307557 | 611657 | AH55 | 1 | H | 101 | 717575 | 611657 | BX55 | 6 | H,Hc |
| 45 | 307575 | 211757 | AI10 | 1 | Hc | 102 | 717577 | 251457 | BY17 | 2 | E |
| 46 | 311057 | 300457 | AK18 | 1 | Y | 103 | 717577 | 611653 | BY53 | 10 | H,Hc,Y,S |
| 47 | 311555 | 630253 | AL61 | 1 | Hc | 104 | 717577 | 611657 | BY55 | 45 | O,H,Hc,Y,S,T,K |
| 48 | 311555 | 710417 | AL68 | 1 | Y | 105 | 717577 | 650657 | BY63 | 2 | Hc |
| 49 | 311557 | 610253 | AM41 | 2 | Y | 106 | o10057 | 214043 | BZ11 | 1 | Y |
| 50 | 311557 | 710413 | AM67 | 11 | H,Hc,Y,K | 107 | o12057 | 214442 | CA12 | 6 | O,Hc,K,E |
| 51 | 313575 | 610655 | AN45 | 1 | H | 108 | o12057 | 214443 | CA13 | 11 | H,Hc,Y |
| 52 | 313575 | 610657 | AN46 | 1 | Y | 109 | o13057 | 214442 | CB12 | 1 | Y |
| 53 | 315455 | 350656 | AO34 | 1 | Hc | 110 | o13057 | 214443 | CB13 | 2 | H |
| 54 | 317055 | 231453 | AP14 | 1 | O | 111 | o17175 | 601647 | CC38 | 1 | K |
| 55 | 317157 | 611157 | AQ47 | 3 | T | 112 | o55045 | 303043 | CD21 | 1 | Y |
| 56 | 317175 | 611757 | AR60 | 1 | Y | 113 | o57047 | 303443 | CE24 | 1 | Y |
| 57 | 317455 | 611757 | AS60 | 1 | Y | | | | | | |

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

表 2 2012 年に広島県内(広島市を除く)で分離された
O157 の IS コードと変換した英数コードとの関係

| 発生月 | ISコード | | 英数 コード |
|-----|-------------------|-------------------|-----------|
| | 1st set primer | 2nd set primer | |
| 8月 | 215457 | 301656 | W20 |
| 8月 | 215457 | 301656 | W20 |
| 11月 | 305577 | 211757 | AF10 |
| 10月 | 307577 | 211757 | AJ10 |
| 10月 | 307577 | 211757 | AJ10 |
| 10月 | 307577 | 211757 | AJ10 |
| 10月 | 307577 | 211757 | AJ10 |
| 5月 | 317555 | 611657 | AT55 |
| 8月 | 317575 | 211756 | AV9 |
| 6月 | 613157 | 610446 | BE42 |
| 12月 | 717555 | 611657 | BV55 |
| 4月 | 717557 | 611657 | BW55 |
| 5月 | 717557 | 611657 | BW55 |
| 11月 | 717557 | 611657 | BW55 |
| 8月 | 717575 | 611667 | BX56 |
| 5月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 5月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 7月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 7月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 7月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 9月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 10月 | 717577 | 611657 | BY55 |
| 5月 | o10057 | 214443 | BZ13 |

広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157 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 児玉 実 築地 裕美 佐多 俊子 石村 勝之

研究要旨

2012年5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 感染症事例 8 件 10 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、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、集団感染が疑われた 1 事例は感染源の特定には至らず、その他の散発事例も関連性は低いと考えられた。また、2006~2012 年に広島市で分離された EHEC O157 139 株の 3 法での解析結果を比較検討したところ、IS-printing や PFGE では、株間の結果が一致していても他の 2 法での結果が異なるケースが見られたが、MLVA で結果が完全一致していると他の 2 法の結果はほぼ一致しており、散発事例間の関連性を検討する上での MLVA の有用性が示された。

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 の感染事例間での疫学的関連性を検討し、さらに 3 法間の型別能についての比較を行った。

B. 研究方法

1. 材料

2012年5月から11月までに広島市で分離された EHEC O157 10 株を用いた。事例と株の関係は表 1 に示した。また、3 法間の型別能を比較するため、2006 年から 2011 年までに広島市で分離された O157 129 株の解析結果も用いた。^{1),2),3)}

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) で示された方法に準拠し、

Fingerprinting II (Bio-Rad) を用いて解析を行った。解析は、Dice 法 (最適化:0.0%、トレランス:1.0%) による相似係数を算出し、平均距離法 (UPGMA) により系統樹を作成した。また、感染研で型別された結果を 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-Trees⁴⁾らの 9 ヶ所の 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、上記と同じシークエンサーを使用して、一部の検体について PCR 産物のシークエ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、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. 2012年分離菌株の解析結果

2012年に分離された菌株のMLVA RN、ISコード及び感染研PFGE TNを表3に、PFGEクラスターとバンドパターンを図1に示した。

(1) 集団感染疑い事例

事例2で分離された菌株(12020～12022)は、12021のMLVA RNがK10で他の2株と1違い、PFGEでも1band違っていたが類似度は97.44%であり、ISコードは3株で一致していた。

(2) 散発事例

8月初めに発生した事例3で分離された菌株(12023)と事例5で分離された菌株(12024)は、PFGEで1band違いの類似度97.30%であったが、MLVA RN及びISコードが違っていた。その他の事例間で結果が一致したものはなかった。

2. 3法間の型別能の比較^{1),2),3)}

(1) ISコードを軸にした比較

図2に示すように、2006～2012年の分離株の中で、ISコードが一致していてもPFGEバンドパターンやMLVA RNは異なっているケースがあった。

(2) MLVA RNを軸にした比較

図2及び図3に示すように、2006～2012年の分離株において、MLVA RNが9ヶ所の領域全てで一致したものは、PFGEバン

ドパターンが1～2band違いの類似度95%以上、ISコードは2例(10033と10034、10050、10051と10054)を除いて一致していた。

(3) PFGEバンドパターンを軸にした比較

2006～2012年の分離株において、PFGEバンドパターンの類似度が高いものでも、ISコード及びMLVA RNが異なっているケースが多数存在した。

D. 考察

2012年の事例2は、同時期に併設する高齢者施設の入所者及び施設内にあるデイサービスの職員から分離された菌株であり、3法全てで結果がほぼ一致していたため、集団感染が疑われたが、保健センターや保健所の調査では3名に接触はなく、また施設内の給食施設に残されていた検食からO157が検出されなかったため、感染源を特定することはできなかった。

その他の散発事例は、発生時期や発生場所、疫学調査でも共通するところはなく、関連性はないと考えられる。例年に比べ、2012年はEHEC発生件数が特に少なかったが、これは飲食店における牛生レバーの提供禁止も寄与しているものと思われる。また、家族内感染が1例もなく、保健センターによる患者、家族への衛生指導の効果が確実に現れていた。

2006～2012年までに広島市で分離されたEHEC O157菌株の中で、家族内感染や共通食があるなどの同一事例内の株同士では、ISコードが一致していれば他の2法でも結果がほぼ一致していたが、事例間で比べると、ISコードが一致していてもPFGEバンドパターンが違い、さらにMLVA RNも異なっていたケースが5例あった。散発事例間の関連性をISコードのみで見る場

合、疫学的背景はさらに重要になることが示唆された。

なお、2012年の事例1で分離された菌株12002のISコード345457 311652と同じコードの菌株が、2010年度に岡山、山口、徳島、香川の各県で、2011年には山口県で分離されている³⁾。しかし、この2011年の山口県分離株10Y43と12002のMLVA解析結果は異なっており、広域的な感染像をみる解析手法として、さらに継続した検討が必要と考えられた。

一方、MLVA RNが9領域で全て一致していた場合、家族又は集団事例内でも散発事例間でも、PFGEバンドパターンの類似度は高く、さらにISコードは2例を除き全て一致していたことから、MLVAは散発事例間の関連性を見る上で、有用性が高いことが示唆された。しかし、9ヶ所のVNTR領域の内、1ヶ所のみが1違っている例も存在することから、どの程度の違いまでが同一株と判断できる許容範囲であるか明確にしていくことが今後の課題である。

またPFGEバンドパターンの類似度が高くても、他の2法では違った結果になった例が多数見られたことから、3種の異なる分子疫学的解析法を用いることは事例間の関連性を判断する上で有意義である。

E 結論

1. 2012年に広島市で発生したEHEC

O157感染事例の中で、集団感染が疑われた1事例は感染源の特定には至らず、その他の散発事例も関連性は低いと考えられた。

2. 2006～2012年に広島市で分離されたEHEC O157菌株の3法での解析結果を比較検討したところ、MLVA RNの完全一致が最も、他の2法での結果も一致している確率が高く、散発事例間の関連性を検討する上でのMLVAの有用性が示された。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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23年度総括・平成21～23年度総合研究報告書
- 4) 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

表1 2012年の事例概要と分離菌株の

| 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 | 12002 | 患者 | 20120519 | 女 | 38 | パート(飲食以外) | VT2 |
| 2 | 12020 | 患者 | 20120622 | 女 | 43 | 介護職員 | VT1VT2 |
| | 12021 | 患者 | 20120625 | 男 | 84 | 無職 | VT1VT2 |
| | 12022 | 患者 | 20120626 | 男 | 91 | 無職 | VT1VT2 |
| 3 | 12023 | 患者 | 20120802 | 男 | 10 | 小学生 | VT1VT2 |
| 4 | 12024 | 患者 | 20120811 | 女 | 66 | 事務職 | VT1VT2 |
| 5 | 12025 | 患者 | 20120917 | 男 | 70 | 無職 | VT2 |
| 6 | 12026 | 患者 | 20120924 | 女 | 68 | 薬剤師 | VT1VT2 |
| 7 | 12032 | 患者 | 20121024 | 男 | 11 | 小学生 | VT1VT2 |
| 8 | 12033 | 患者 | 20121028 | 男 | 39 | 会社員 | VT2 |

表2 MLVA primer と Dye set

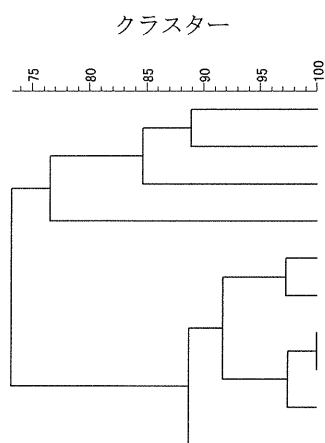
| PCR Mix | locus | | Dye | primer (5'-3') |
|---------|-------|---------|-----|---|
| Mix 1 | K-3 | Forward | VIC | GG CGG TAA GGA CAA CGG GGT GTT TGA ATT G |
| | | Reverse | | GAA CAA CCT AAA ACC CGC CTC GCC ATC G |
| | K-9 | Forward | NED | GC GCT GGT TTA GCC ATC GCC TTC TTC C |
| | | Reverse | | 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 | CAGCCTCCTGCAAACCTTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC |
| | | Reverse | | GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTCT |

表3 2012年分離菌株のMLVA RN、ISコード及びPFGE TN

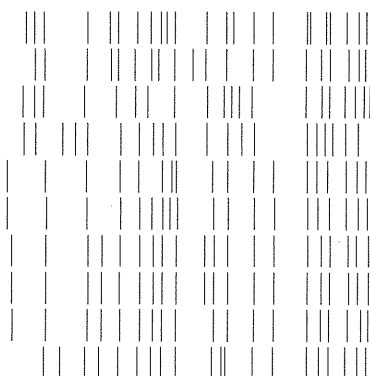
| 菌株 番号 | 事例 | VT型 | MLVA RN | | | | | | | | | | ISコード | PFGE TN |
|----------|-------|-----|---------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---------------|------------|
| | | | K25 | K3 | K34 | K9 | K17 | K19 | K36 | K37 | K10 | | | |
| 1 | 12002 | 1 | VT2 | 4 | 24 | 7 | 10 | 6 | 8 | - | 10 | 35 | 345457 311652 | g255 |
| 2 | 12020 | | VT1VT2 | 5 | 14 | 9 | 6 | 7 | 4 | 12 | 6 | 26 | 613157 610446 | g332 |
| 3 | 12021 | 2 | VT1VT2 | 5 | 14 | 9 | 6 | 7 | 4 | 12 | 6 | 27 | 613157 610446 | h81* |
| 4 | 12022 | | VT1VT2 | 5 | 14 | 9 | 6 | 7 | 4 | 12 | 6 | 26 | 613157 610446 | g332 |
| 5 | 12023 | 3 | VT1VT2 | 5 | 11 | 9 | 7 | 7 | 5 | 6 | 7 | 35 | 317575 211756 | h115 |
| 6 | 12024 | 4 | VT1VT2 | 5 | 9 | 10 | 10 | 7 | 6 | 6 | 6 | 39 | 317577 211756 | h128 |
| 7 | 12025 | 5 | VT2 | 5 | 16 | 7 | 6 | 4 | 7 | 9 | 6 | 34 | 305457 211642 | h325 |
| 8 | 12026 | 6 | VT1VT2 | 5 | 14 | 9 | 14 | 8 | 6 | 9 | 7 | 6 | 717577 211657 | h330 |
| 9 | 12032 | 7 | VT1VT2 | 3 | 20 | 9 | 5 | 11 | 7 | 4 | 4 | 23 | 310457 110416 | h368 |
| 10 | 12033 | 8 | VT2 | 4 | - | 7 | 11 | 3 | 5 | 7 | 7 | 21 | 145047 103443 | g591 |

*: one band diff. from g332

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



バンドパターン



| 菌株 番号 | ISコード | PFGE TN |
|----------|---------------------|------------|
| 事例7 | 12032 310457 110416 | h368 |
| 事例8 | 12033 145047 103443 | g591 |
| 事例5 | 12025 305457 211642 | h325 |
| 事例1 | 12002 345457 311652 | g255 |
| 事例3 | 12023 317575 211756 | h115 |
| 事例4 | 12024 317577 211756 | h128 |
| 事例2 | 12020 613157 610446 | g332 |
| 事例2 | 12022 613157 610446 | g332 |
| 事例2 | 12021 613157 610446 | h81 |
| 事例6 | 12026 717577 211657 | h330 |

図1 2012年分離菌株のPFGE クラスターとバンドパターン