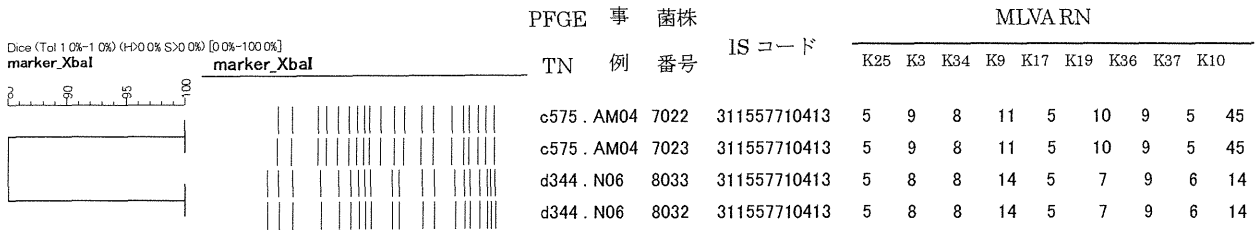
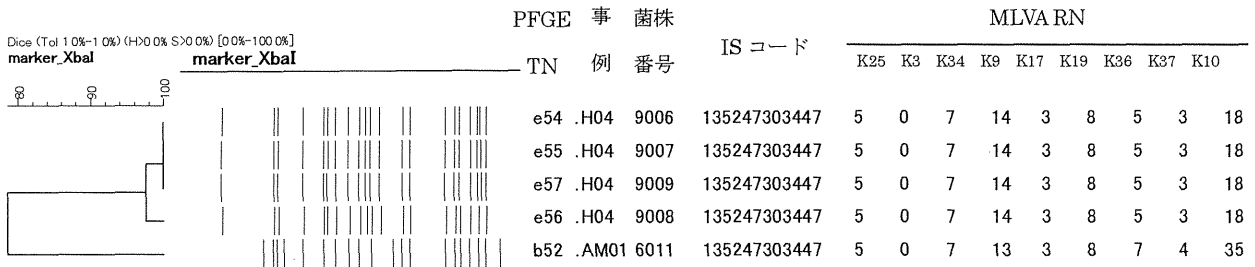


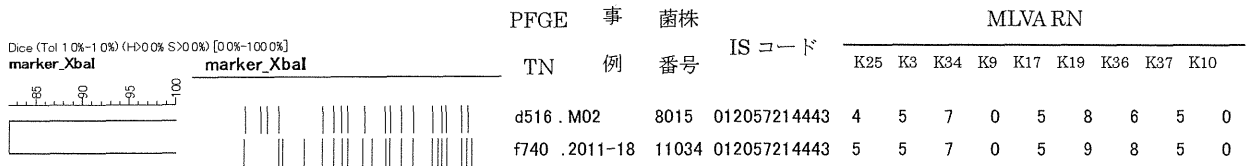
① IS コード 311557710413



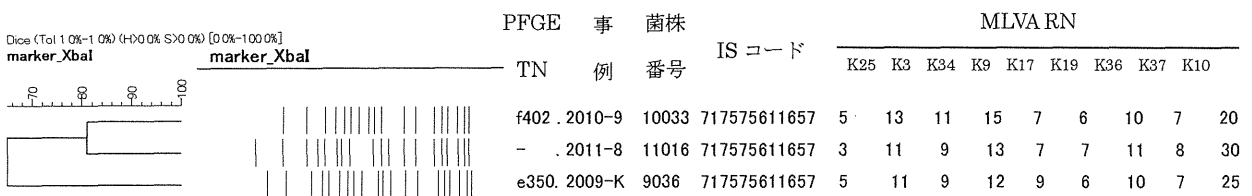
② IS コード 135247303447



③ IS コード 012057214443



④ IS コード 717575611657



⑤ IS コード 717577611657

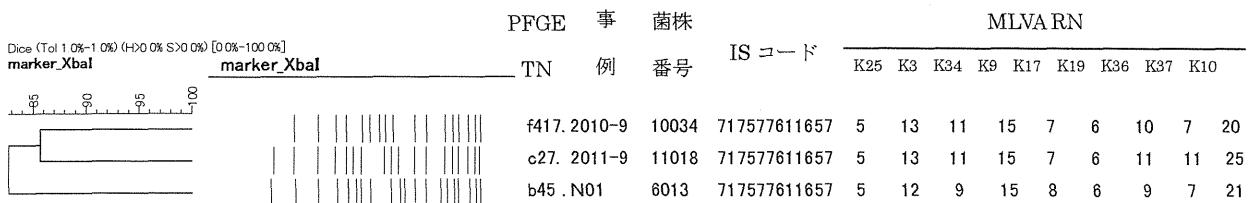


図2 同一 IS コード菌株の PFGE クラスター及び MLVA RN

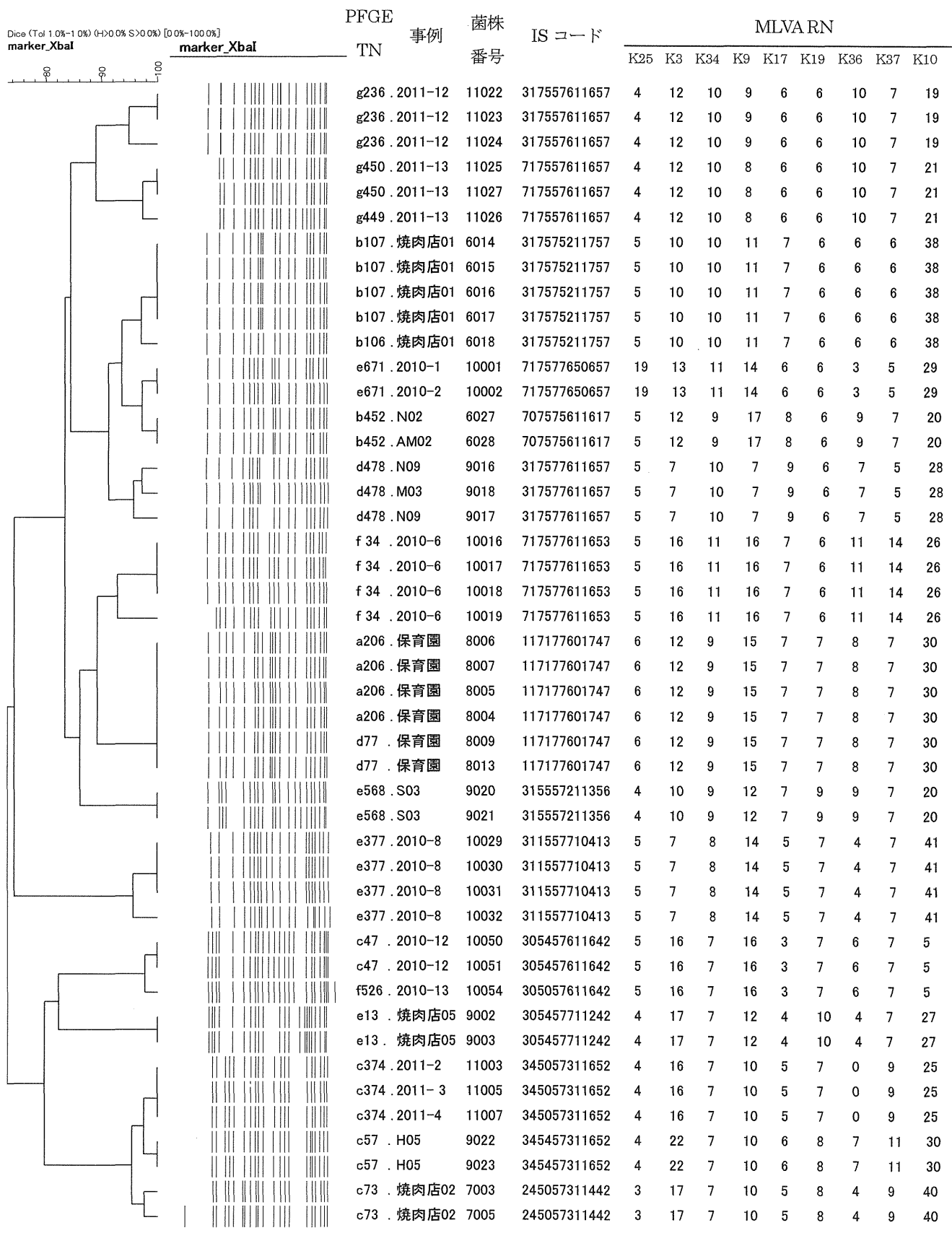


図3 同一 MLVA RN 菌株の PFGE クラスター及び IS コード

2012年1月、8月、9月に県内の3市で発生した同一遺伝子型 O157:H7 stx1+2 産生株による腸管出血性大腸菌感染症の 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

2012年(2012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 34 株で、その毒素型は stx1+2 が 31 株と、ほとんどを占め、本年の特徴と考えられた。また、集団感染事例は 3 事例、散発事例が 19 事例であった。

散発事例のうち、2012年1月に防府市で発生した1事例、8月に山口市/防府市で発生した家族内事例1事例、山口市で発生した1事例、9月に美祢市で発生した1事例、山口市で発生した1事例、計5事例から分離された O157:H7 stx1+2 7 菌株について国立感染症研究所で実施されたパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による遺伝子型は、すべて同一の g307 と判定された。これら 7 菌株の IS-printing のプロファイルは、2012年1月の防府市の事例由来 11Y28 株が 307577-211757 であったのに対して、その他の6事例由来6菌株(12Y27 株、12Y28 株、12Y30 株、12Y31 株、12Y35 株、12Y38 株)は、すべて 317477-611756 と同一で、11Y28 株のそれと比較して、1 st primer set で 2 か所、2 nd primer set で 2 か所、計 4 か所で異なるバンド形成が認められた。そこで、これら 7 菌株について、Multilocus Variable-number Tandem Repeat Analysis(MLVA)による解析を行うとともに、当所において、制限酵素 *Xba*I、*Bln*I による PFGE を実施し解析した結果、MLVA において、11Y28 株とその他の6株の間に 6 locus におけるリピート数の違いが確認されたが、PFGE は *Xba*I、*Bln*I ともに 7 株すべて 100%の相同性であった。

このことから、同一の PFGE パターンを示す O157 菌株においても、起源の異なった株が含まれている場合があり、現在主流となっている PFGE のみでは正確な疫学的解析結果が得られない可能性が推察された。今後は、IS-printing および MLVA 解析等、PFGE とは別の遺伝子解析手法の併用の必要性が示唆された。

### A. 研究目的

2012年1月、8月、9月、県央3市において発生した、PFGE パターンがすべて同一(g307)の O157:H7 stx1+2 感染症事例 5 事例由来 7 菌株について、IS-printing、MLVA および二種類の制限酵素を用いた PFGE の 3 種類の分子疫学解析手法を用いて解析し、PFGE で同一遺伝子型と判定された菌株が、その他の分子疫学手法による

解析でも同一と判定されるか否かについて検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

2012年1月、8月、9月に県内の3市で発生した症例由来 O157:H7 stx1+2 7 株を供試した。菌株No.は、以下のとおりである。菌株No.は、表1に示すとおりである。

## 2. 解析方法

### (1) IS-printing 解析方法

菌株からの DNA 抽出は、DEPC 水 200  $\mu$ 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  $\mu$ l とトラッキングダイ 2  $\mu$ l を混合した 7  $\mu$ l を well に注入し、ミューピッド 2 plus (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 プロファイルとした。

### (2) PFGE 解析方法

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 および *Bln* 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 プロトコール(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。

解析結果を検証するため、代表的な flagment について、Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit[Applied Biosystems 社製]を用い、シーケンシングを行い、各 locus のリピート数を確認した。なお、flagment 解析によりピークが認められず、かつアガロースゲル電気泳動で増幅バンドが得られなかった領域は null と表記した。

## C. 研究結果

### 1. 事例概要

[11Y28]

2012 年 1 月 4 日に下痢が一度認められ

たが、その後症状はなく、家族内に下痢、血便を呈する者がいたため医療機関を受診した結果、O157 が分離され、1月18日管轄保健所に無症状保菌者として発生届が提出された。菌株は当所で同定した結果、O157:H7 stx1+2 と同定された。stx1 の産生力価は 1:128、stx2 は  $\geq 1:4096$  であった。

[12Y30]、[12Y27]、[12Y28]

12Y30 は山口市在住。市内のスーパーで肉を購入し、夫の 12Y27 と孫の 12Y28(12Y30 等と同居はしていない)と焼肉を喫食。7月22日に発病し、下痢と血便を認めた。管轄保健所の接触者健診で、無症状の 12Y27 と 12Y28 から O157 が分離された。菌株を当所で検査した結果、3 株とも O157:H7 stx1+2 と同定された。stx の産生力価は 3 株とも stx1 が 1:256、stx2 が  $\geq 1:4096$  であった。

[12Y31]

山口市在住。2012年8月3日～6日に韓国旅行。8月12日に焼肉を喫食したところ、8月14日に発病、腹痛・水様性下痢、38℃の発熱を認めた。分離菌株を当所で検査した結果、O157:H7 stx1+2 と同定された。stx の産生力価は、stx1 が 1:256、stx2 が  $\geq 1:4096$  であった。

[12Y35]

美祢市在住。2012年9月23日に腹痛、水様性下痢、血便を発症し、翌日、市内の医療機関を受診した結果、O157 が分離され 9月27日に管轄保健所に発生届が提出された。分離菌株を当所で検査した結果、O157:H7 stx1+2 と同定された。stx の産生力価は、stx1 が 1:1024、stx2 が  $\geq 1:4096$  であった。喫食調査の結果、発病日の1週間前の9月16日に、家族3人および近所の人2人とともに自宅で焼肉を喫食していた。通常、食材は市内のスーパーで購入し

ているが、この日の肉の入手方法は明らかではなかった。

[12Y38]

山口市在住。2012年9月20日に腹痛、水様性下痢、嘔気を発症し、市内の医療機関を受診した結果、O157 が分離され、9月28日に管轄保健所に発生届が提出された。分離菌株を当所で検査した結果、O157:H7 stx1+2 と同定された。Stx の産生力価は、stx1 が 1:1024、stx2 が  $\geq 1:4096$  であった。喫食調査の結果、患者は、9月15日に防府市にある父親の実家で、祖父母、伯父夫婦とその子供2人、父母、計9人で、防府市内の食肉販売店から肉とホルモン(牛、豚)と野菜を購入して作られた鉄板焼肉を喫食していた。患者以外に有症者は認められなかった。

また、12Y41 は、PFGE 型が d483 で、他の7菌株と異なっているが、12Y38 と同じ山口市の同一地区に居住しており、9月29日に 12Y38 が購入したのと同じ食肉販売店から牛、豚、鶏肉、ホルモン、野菜、ウインナーを購入し、勤務先の同僚15人でバーベキューを行ったところ、10月2日に39℃の発熱、水様性下痢、嘔気、嘔吐を発症した。この症例の分離株は、O157:H7 stx1+2 で、stx の産生力価は stx1 が 1:256、stx2 が  $\geq 1:4096$  であった。IS-printing プロファイルは 12Y38 株と同一であり、居住地区も同一、かつ同一の食肉販売店から肉類等を購入して発病している事実から、12Y41 は、他の 12Y30、12Y27、12Y28、12Y31、12Y35 および 12Y38 と疫学的関連が推察された。

上記5事例を、発病ないし菌の分離時期からみると、すべての事例が平成24(2012)年に発生しており、11Y28 は1月であったが、その他の事例については7月下旬から

10月に集中していた。このうち、12Y27、12Y28、12Y30の家族事例は、7月下旬から8月初旬にかけて、12Y31は8月中旬、12Y35及び12Y38は9月下旬、12Y41は10月初旬であり、11Y28とその他の事例とは、発生時期によって明確に区分された。

喫食状況調査からみると、11Y28以外の患者等は、発病前に、購入した食肉による焼肉等を喫食しており、中には同じ食肉販売店で肉等を購入していた事例もあり、喫食状況からも11Y28は他の事例と明確に区分された。

また7人の患者の年齢は、11Y28が19歳、12Y30が59歳、12Y27が61歳、12Y28が4歳、12Y31が12歳、12Y35が59歳、12Y38が9歳とさまざまであった。

## 2. IS-printing 解析結果

図-1に1st primer setによる増幅産物の電気泳動像、図-2に2nd primer setによる増幅産物の電気泳動像を示した。

1st primer setによるIS-printing プロファイルは、11Y28株が307577であったが、その他の6株(12Y27～12Y38)は317477で、11Y28株とその他の6株(12Y27～12Y38)とでは、2本のバンドの有無によりプロファイルに明確な差異が認められた。

一方、2nd primer setによるプロファイルは、11Y28株が211757であったのに対して、他の6株(12Y27～12Y38)はすべて611756で、2nd primer setにおいても、11Y28株と他の6株(12Y27～12Y38)とでは、2本のバンドの有無により、プロファイルに明確な差異が認められた。

## 3. PFGE 解析結果

図-3に7菌株のPFGE泳動像(*Xba*I、

*Bln*I)を、図-4にそのデンドログラム、図-5に7菌株間の相同性(similarity)を示す。

IS-printing プロファイルが他の6菌株とは明らかに異なった11Y28株を含めた、7菌株すべてのPFGEパターンは、*Xba*I、*Bln*Iともに相同性100%であり、同一起源の株と判断された。

## 4. MLVA 解析結果

表-1に7菌株のMLVA解析結果を示す。表に示すように、2012年8月～9月にかけて分離された株のうち、8月初旬に分離された家族事例の12Y27と12Y28のMLVAは同一で、5-10-11-13-10-7-6-9-44であり、先に分離された12Y30株(5-10-11-14-10-7-6-9-44)とも下線の1 locusで1リピートの差異とほぼ一致していた。また、この家族事例から少し遅れて8月中旬に分離された、焼肉を喫食していることだけが関連している12Y31株(5-10-11-13-10-7-6-8-43)は、下線を引いたlocus37とlocus10で12Y27株及び12Y28株と、それぞれ1リピートの差があった。

次に、9月26日にこれまでの株の分離地域とは異なる美祢市において分離された12Y35株の患者は、焼肉の喫食、および食材の購入を山口市で行っている点で他の山口市在住の12Y30、31、38株との疫学的関連がある可能性が推察された。分離株のリピート数は、5-10-11-13-10-7-6-8-46で、12Y30株とは3 locusで1～2リピートと、わずかな差異であった。

12Y35株とほぼ同じ9月27日に山口市で分離された12Y38株の患者は、発病5日前に防府市内の食肉販売店で肉、ホルモン、野菜を購入し、焼肉を喫食していた。12Y38株のMLVAのリピート数は、12Y35株と全く同一の5-10-11-13-10-7-6-8-46

であり、12Y30 株と疫学的に近縁と考えられた。

なお、10月に山口市で分離された 12Y41 株は、PFGE 型が d483 で 12Y38 株とは異なるが、12Y38 株の患者が肉等を購入した食肉販売店から 9 月 29 日に肉・ホルモン・ウインナー・野菜等を購入し、バーベキューをしたのちに発症していることから、12Y38 株の患者と 12Y41 株の患者の感染源は同一の可能性が考えられた。12Y41 株の PFGE サブタイプは 12Y38 株と異なるものの、IS-printing プロファイルは 317477-611756 で 12Y38 株と全く同一、MLVA も 5-10-11-null-11-7-6-8-46 で、locus 17 で 1 リピートの差、および locus 9 で遺伝子の欠失が認められた以外は 12Y38 株と全く同一であり、喫食調査と同様に、疫学的関連が強いことが示唆された。

しかしながら、これまでの 6 菌株と比較して、約 7 か月前の 2012 年 1 月 17 日分離された 11Y28 株の 9 locus におけるリピート数は、5-10-10-12-6-6-6-5-41であり、6 locus、すなわち、locus34 で 1、locus 9 で 1~2、locus 17 で 1~2、locus19 で 1、locus37 で 3~4、locus10 で 2~5 リピートと、大きな差異が認められた。

#### D 考 察

2012 年 1 月および、8 月、9 月に県内の 3 市において発生した O157:H7 stx1+2 による腸管出血性大腸菌感染症 5 事例から分離された 7 菌株は、国立感染症研究所(感染研)における PFGE により、すべて同一のサブタイプ g307 と判定された。しかし、当所で実施している IS-printing による解析では、8 月、9 月に分離された 6 菌株のプロファイルは 317477-611756 ですべて一致したのに対して、1 月に分離された 11Y28 株のプロファイルは、

307577-211757 であり、1 st primer set で 2 本、2 nd primer set で 2 本のバンドの有無により、その他の 6 菌株のそれと大きく異なっていた。

山口県において、パルスネット研究班で平成 20 年度から O157 菌株の IS-printing 解析を実施して以来、平成 24 年度までに 154 株を検査したが、感染研における PFGE サブタイプ No. が同一の株で IS-printing のプロファイルが異なった株が認められた事例は、平成 20 年度に stx 型が異なる株が同一 PFGE サブタイプに型別された 1 事例を除き、皆無であった。

平成 19 年度以降にパルスネット研究班で取り組まれた、PFGE と IS-printing の比較検討成績を見ると、大阪府の勢戸らは、2007 年に近畿ブロック 7 施設で分離された 194 株の O157 菌株について検討した結果、PFGE 型が一致し IS 型が異なる株は 10 タイプ、29 株あることを報告 [1,(101-116)]したが、翌年の報告書では大阪府で 2008 年に分離された 127 株について検討した結果、PFGE 型が一致し IS 型が異なる株はなかった [2,(79-93)]と報告しており、年度により成績が異なっていた。

岡山県の中嶋らは中国・四国ブロックの 8 地衛研から報告された 46 株のデータを PFGE 型ごとに取りまとめた結果、同一 PFGE 型 7 グループ中 4 グループで IS 型が異なっていたが、その差は 1 バンド違いというわずかな違いであったと報告し [1,(145-156)]、また翌年は中四国各県から報告された 125 株のデータを同様に解析した結果、同一 PFGE 型で IS 型の異なる株が認められた型が 8 つ(34.8%)あったがその内、同一県分離株の型が 2 つ、複数県分離株の型が 6 つあったことを報告している [2,(116-128)]。しかし、この報告において

も、それらの IS 型の差は、1~2 バンド違いと僅かな違いであった。福岡県の堀川らも、九州地区の分離株 267 株(平成 19 年度)、および 217 株(平成 20 年度)を解析し、PFGE 型が同じで IS 型が異なる株は平成 19 年度が 9 グループ、20 年度が 4 グループあったが、いずれも地衛研が異なっている場合に IS 型に差異がみられること、および IS 型の違いは 1~2 か所と、僅かな差異であったことを報告している [1(185-198),2,(167-178)]。

その他の地衛研における同様の解析においても、IS 型が同一で PFGE 型が異なる株は比較的多いが、逆に PFGE 型が同一にもかかわらず、IS 型が異なる事例は少ない成績が得られている [1,2,3]。

上記の報告から、同じ PFGE 型と判定された株の IS 型が異なることはあり得るが、その違いはわずかで、頻度も少ないと考えられたが、同一 PFGE 型の株に IS 型の異なる株の存在を報告した上記の 3 地研の報告例では、PFGE、IS-printing 以外の型別手法は用いられておらず、PFGE 型が同一で IS 型が異なる菌株の起源の異同については詳細に検討されていない。

そこで、今回、PFGE が完全に一致したものの IS-printing プロファイルが他の 6 菌株と異なる株 1 株を含む計 7 株について、平成 23 年から開始した MLVA 解析、ならびに当所における *Xba*I、*Bln*I の 2 種類の制限酵素を用いた PFGE 解析を実施し、それぞれの手法により、7 菌株の相同性について検討した。

PFGE 法では、*Xba*I も *Bln*I もそれぞれ 100%の相同性が認められ、感染研での同一サブタイプ命名を裏付ける結果が得られた。

MLVA 解析では、11Y28 株のリピート数

は 5-10-10-12-6-6-6-5-41 であったが、その他の 6 菌株では、家族内感染事例で疫学的な関連性の強い 12Y30 株、12Y27 株、12Y28 株の 3 株のリピート数は、患者である 12Y30 が 5-10-11-14-10-7-6-9-44 で、保菌者である 12Y27、12Y28 は 1 locus で 1 リピート異なる 5-10-11-13-10-7-6-9-44 で、ほとんど一致していたが、これは 11Y28 株のそれとは 6 locus においてそれぞれ 1、1~2、4、1、4、3 のリピート数の差異が認められた。

また、居住する市が同じで焼肉を喫食している以外は、12Y30 株とは疫学的関連性がないと考えられる 12Y31 株のリピート数は、5-10-11-13-10-7-6-8-43 で 12Y30 株とは 2 locus においてそれぞれ 1 リピートとわずかな差異が認められたにすぎなかった。また、同様に疫学的な関連は焼肉の喫食と食材の購入場所が同じ山口市であるということだけの 12Y35 株と 12Y38 株のリピート数は、5-10-11-13-10-7-6-8-46 と 2 株とも同一であったことから、共通する感染源の存在が推察された。この 2 株のリピート数を 12Y30 株と比較すると、3 locus において、それぞれ 1、1、2 リピートと、これらもわずかな差異であった。しかし、12Y31、35、38 の 3 株のリピート数と 11Y28 株のそれを比較すると、やはり 6 ローカスにおいて、それぞれ 1、1、4、1、3、2~5 のリピート数の差異が認められた。疫学的に焼肉を喫食している 12Y31、35、38 の 3 事例 3 菌株のリピート数は、若干の差異はあるものの、きわめて類似しており、8 月から 9 月にかけて同一~近縁な O157 菌株の感染源の流通が示唆された。

さらに 12Y38 株の患者と居住地が同一地区で、しかも 12Y38 株の患者と同じ食肉販売店で購入した肉やホルモン、野菜などで



バーベキューをしたのちに O157:H7 stx1+2 に感染した患者由来 12Y41 株は、12Y38 株と疫学的関連性がきわめて強いと考えられる。12Y41 株の MLVA 解析結果は、5・10・11・null・11・7・6・8・46 で、1 locus において 1 リピートの差異、および他の 1 locus で 12Y41 株に遺伝子の欠失が見られたため、2 locus で差異が認められたが、その他の locus ではリピート数は完全に一致しており、PFGE のサブタイプは異なるものの、これら 2 菌株の近縁性はきわめて強いものと推察された。

以上のように、7 菌株のうち、共通して焼肉を喫食していた 4 事例 6 菌株の MLVA 解析結果は、6 領域ではリピート数が完全に一致しており、3 領域(locus 9,37,10)で若干の差異が認められた。Locus 10 は他の locus よりも変異しやすい領域であることを考慮すると、その遺伝学的近縁性はきわめて高いことを示していると考えられたが、これら 6 菌株と分離月日が 7 か月離れており、焼肉の喫食も認められなかった 11Y28 株の MLVA 解析結果は、他の 6 菌株と 6 locus という多くの locus において、1~5 リピートも異なっていたことから、起源を異にする株であると考えられた。

このように、これまで O157 感染症における分離菌株の疫学的解析には、ゴールドスタンダードである PFGE 解析が必ず用いられ、3 バンド以内の差異であれば、同一起源の株であると判定されてきた。

しかしながら、今回の事例により、O157 感染症の疫学的解析を PFGE のみで行えば、起源の異なる株を同一起源と誤って判定する危険性があることが判明した。

したがって、今後は、まず初めに迅速解析が可能な IS-printing 法と MLVA 法により疫学的解析を進めるとともに、PFGE 法

も実施し、これら 3 つの手法により、菌株の由来の起源を総合的に判定すれば、誤った判定を回避できるものとする。

ただし、このように解析手法を増やすためには、コストの上昇に対する対応が必要と考える。

## E 結論

1 平成 24 年 1 月、8 月、9 月に県内で発生した O157:H7 stx1+2 の家族内感染 1 事例、散発 4 事例由来 7 菌株の PFGE 型は、国立感染症研究所において、すべて g307 と判定され、同一起源と考えられた。しかし、これら 7 菌株について IS-printing を実施した結果、1 菌株(11Y28 株)のみが、その他の 6 菌株と大きく異なるプロファイルを示した。山口県では平成 20 年度から IS-printing による O157 菌株の疫学的解析に取り組んできたが、このような事例は初めてであったことから、これら 7 菌株について、IS-printing 解析、PFGE 解析(*Xba* I、*Bln* I)ならびに MLVA 解析の三つの手法により解析した。その結果、PFGE では *Xba* I、*Bln* I とともに、7 菌株すべてが同一のバンドパターンを示し、その相同性は 100% で、完全に一致し、これらは同一起源の株であると判定された。しかし、再度実施した IS-printing では、11Y28 株のプロファイルはやはり、他の 6 菌株とは大きく 4 か所で異なっており、異なる起源の株と判定された。MLVA 解析では、11Y28 株以外の 6 菌株のリピート数は、同一もしくは、1~3 locus で 1~2 リピートと僅かな差異しか認められず、これら 6 菌株には疫学的関連性が示唆された。しかし 11Y28 株のリピート数は、その他の 6 菌株と 6 locus において 1~5 リピートも異なっており、異なる起源の株と判定された。

三つの手法による解析結果から総合的に考え、11Y28株は、他の6菌株とは異なる起源の株であると判定した。

2 O157感染症における疫学解析は、通常最も精度の高い PFGE のみによって行われているのが現状であるが、今回の事例の結果から、PFGE でバンドパターンが 100% 一致しても、起源の異なる株が存在することが判明した。したがって、誤った判定をしないためには、今後は PFGE 単独ではなく、IS-printing、および MLVA という異なる遺伝子解析手法を併用し、かつ喫食調査や疫学的調査も十分に行ったうえで、慎重に判定することが重要であると考え。

#### F.研究発表

なし

#### G.参考文献

1 寺嶋 淳:厚生労働科学研究費補助金「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,4-198(2008)

2 寺嶋 淳:厚生労働科学研究費補助金「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 20 年度総括・分担研究報告書及び平成 18～20 年度総合研究報告書,80-178(2009)

3 寺嶋 淳: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(課題番号:H21-新興・一般-003)平成 21 年度総括・研究分担報告書,15-150(2010)

图-1 IS-printing 1 st primer set

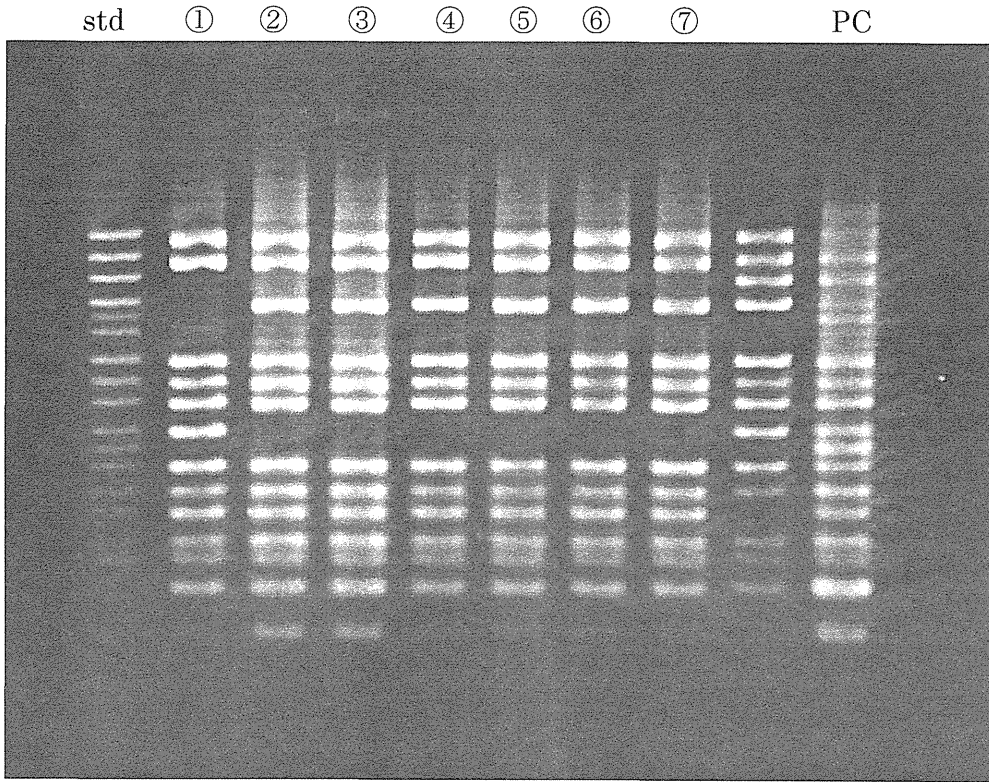
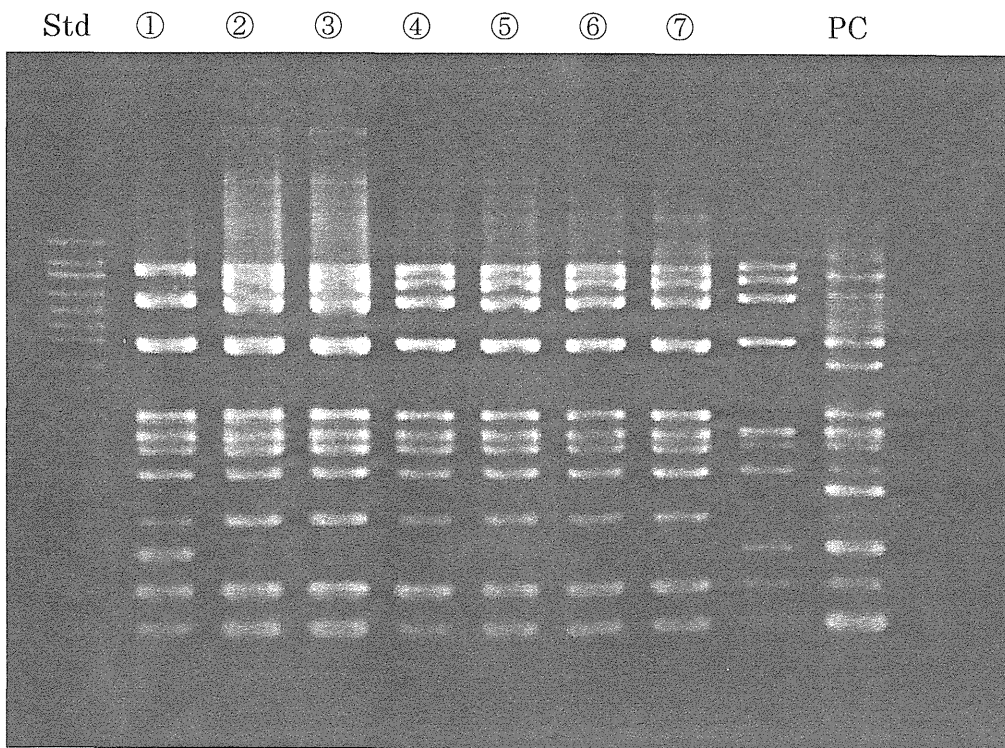
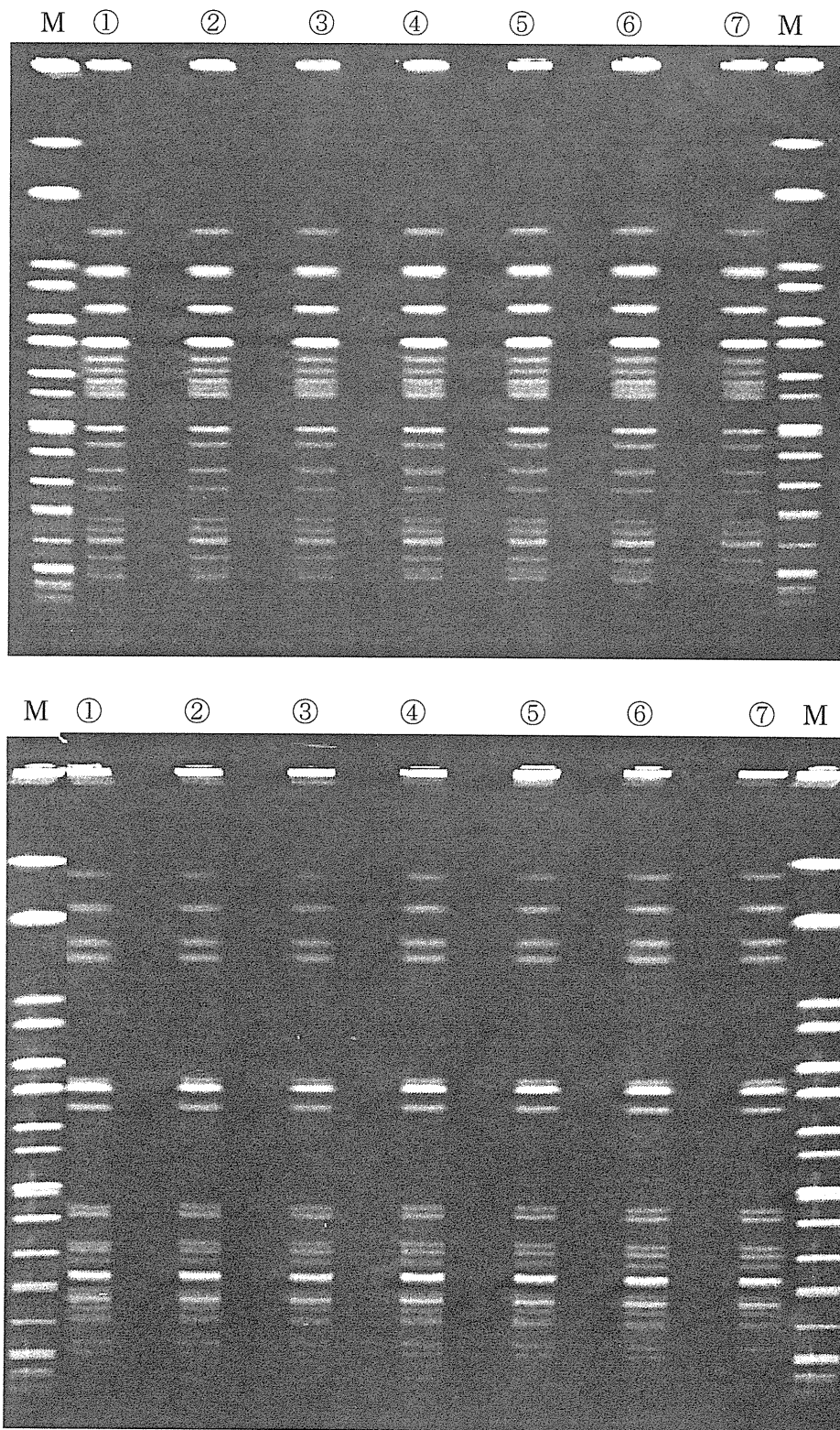


图-2 IS-printing 2 nd primer set



① 11Y28 ②12Y27 ③12Y28 ④12Y30 ⑤12Y31 ⑥12Y35 ⑦12Y38

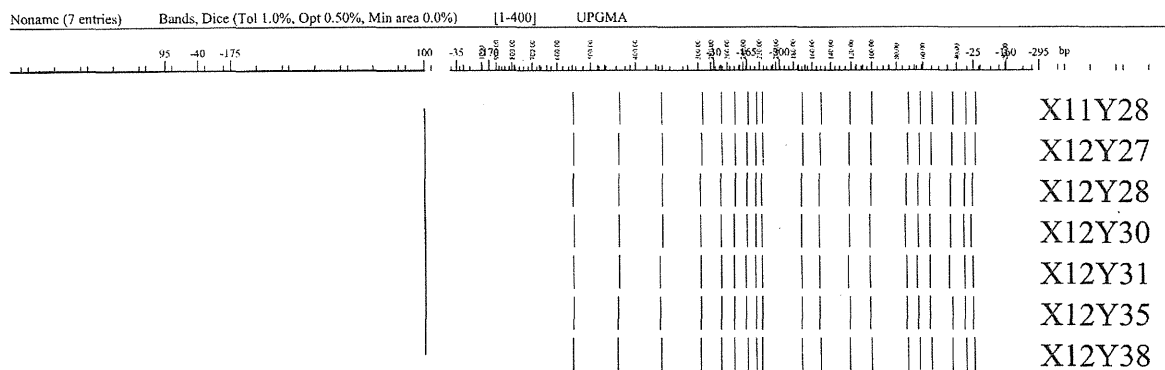
図-3 O157:H7 7菌株のPFGE泳動像(上:*Xba*I 下:*Bln*I)



M:*Salmonella braenderup* H9812 株

①11Y28 ②12Y27 ③12Y28 ④12Y30 ⑤12Y31 ⑥12Y35 ⑦12Y38

図-4 g307 菌株 7 株の PFGE(*Xba* I) パターンのデンドログラム



g307 菌株 7 菌株の PFGE(*Bln* I) パターンのデンドログラム

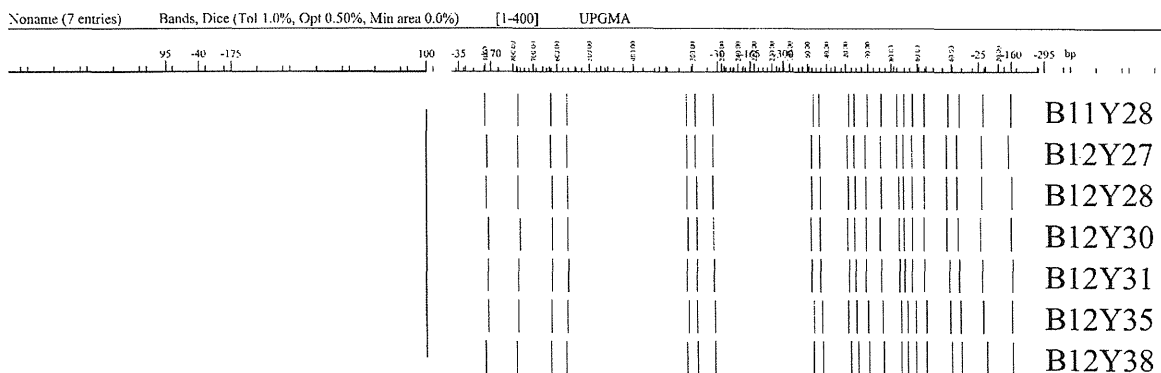


図-5 g307 菌株 7 株の各株間の相同性(similarity, %) *Xba* I、*Bln* I ともに同一

①	100						
②	100	100					
③	100	100	100				
④	100	100	100	100			
⑤	100	100	100	100	100		
⑥	100	100	100	100	100	100	
⑦	100	100	100	100	100	100	100

株No.①                  ②                  ③                  ④                  ⑤                  ⑥                  ⑦

①11Y28 株   ②12Y27 株   ③12Y28 株   ④12Y30 株   ⑤12Y31 株   ⑥12Y35 株   ⑦12Y38 株

表・1 PFGE subtype g307 7 菌株および疫学的関連が示唆された PFGE subtype d483 1 菌株の MLVA 解析結果

菌株番号	発病日	分離日	患者等の住所	年齢	性別	疫学的事項	血清型	stx1	stx2	PFGE Type	IS_Printing		VNTR loci								
											1st set	2st set	25	3	34	9	17	19	36	37	10
11Y28	*	2012/1/18	防府市	19	M	保菌者、散発	O157:H7	+	+	g307	307577	211757	5	10	10	12	6	6	6	5	41
12Y30	2012/7/22	2012/8/6	山口市	59	F	患者、散発、スーパーで肉を買い、夫12Y27と孫12Y28と一緒に焼肉、7/22発病、7/31に近医受診、夫・孫は無症状保菌者	O157:H7	+	+	g307	317477	611756	5	10	11	14	10	7	6	9	44
12Y27	*	2012/8/9	山口市	61	M	保菌者、散発、12Y30の夫、12Y28の祖父	O157:H7	+	+	g307	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	9	44
12Y28	*	2012/8/10	防府市	4	F	保菌者、散発、12Y30と12Y27の孫	O157:H7	+	+	g307	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	9	44
12Y31	2012/8/14	2012/8/21	山口市	12	M	患者、散発、8/3-6韓国旅行。8/12焼肉	O157:H7	+	+	g307	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	8	43
12Y35	2012/9/23	2012/9/27	美祢市	59	F	患者、散発、9/16焼肉喫食、9/23発病普段は、朝はご飯・味噌汁、昼は前日の残り・豆腐、夕食はスーパー購入の魚や肉を焼いて喫食、食材は山口市で購入	O157:H7	+	+	g307	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	8	46
12Y38	2012/9/20	2012/9/28	山口市	9	F	患者、散発、9/15防府市の父親実家で、祖父母、伯父夫婦とその子(大学生男1、中学生男1)及び父母、で鉄板焼肉喫食(牛・豚・ホルモン・野菜)。9/20発病、他の人は症状なし。肉の製造・販売業者が12Y41と同じ、居住地は山口市	O157:H7	+	+	g307	317477	611756	5	10	11	13	10	7	6	8	46
12Y41	2012/10/2	2012/10/5	山口市	24	F	患者、散発、9/29昼、牛・豚・鶏・ホルモン・ウインナー・野菜を、12Y38が購入したのと同じ業者から購入し、15名とBBQ、10/2発病	O157:H7	+	+	d483	317477	611756	5	10	11	null	11	7	6	8	46

## 中四国ブロック

### 黄色ブドウ球菌食中毒事例における PFGE 法及び POT 法の検討

研究協力者 徳島県立保健製薬環境センター

石田弘子 下野生世 嶋田啓司

#### 研究要旨

黄色ブドウ球菌食中毒 2 事例から分離した 14 株について、PFGE 法及び POT 法を実施したところ、従来から実施しているコアグララーゼ型別、毒素型別に加えて、更に詳細な菌株の情報を得ることができた。特に POT 法は、迅速性・簡便性に優れており、行政へ速やかにデータを提供できる有用な方法であると考えられた。

#### A. 研究目的

当センターでは食中毒疑い事例が発生した場合、食品、便等が搬入され原因微生物の検査を実施している。

中でも黄色ブドウ球菌は常在する細菌であり、食中毒の原因菌と区別する必要がある。そのため、患者の疫学情報等を勘案し、疫学マーカーであるコアグララーゼ型別、毒素型別を実施し追加情報として提供している。

今回、平成 23 年、24 年に発生した 2 事例から分離した菌株について、従来法（コアグララーゼ型別及び毒素型別）および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（以下 PFGE 法）、Phage ORF typing 法（以下 POT 法）を実施し比較検討したので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

以下の 2 事例から分離された黄色ブドウ球菌 14 株について実施した（表 1 参照）。

（1）事例 1：H23 年 6 月、県内飲食店（中華そば屋）で発生し、患者 3 名中 3 名、従業員 8 名中 3 名、食品 8 検体中 3 検体から黄色ブドウ球菌を分離した。

（2）事例 2：H24 年 6 月、県外施設（弁当）で発生し、患者 4 名中 3 名から黄色ブドウ球菌を分離した。

##### 2. 検査方法

###### （1）PFGE 法

各菌株について、菌体処理を行い<sup>1)</sup>制限酵素 *Sma* I による処理の後、パルスタイム 5.3~34.9 秒、電圧 6V/cm、buffer 温度 14°C、19 時間で泳動を実施した。

###### （2）POT 法

各菌株についてシカジーニアス分子疫学解析 POT キット（関東化学）を用い、取扱説明書に従い実施した。

#### C. 研究結果

##### 1. PFGE 型別

14 株について実施したところ、表 1 及び図 1 に示すとおり 7 パターンに分類され、コアグララーゼ型、毒素型が異なる菌株は、PFGE パターンも異なっていた。また、同じ型（コアグララーゼ IV 型、毒素 A 型）の菌株であっても 2 事例間では、PFGE パターンは異なった。さらに、同一事例内でも菌株 No1,4,7,8 グループと No2,3,9 グループでは、若干の変異（2 バンド差）が認められた。

## 2. POT 型別

14株について実施したところ、表1に示すとおり7タイプに分類され、コアグラゼ型、毒素型が異なる菌株は、POT 型も異なった。また、各菌株における POT 型別は PFGE 法による分類と一致した。

## D 考 察

今回、黄色ブドウ球菌による食中毒2事例から得られた菌株について、遺伝子型別（PFGE 法及び POT 法）を実施した。その結果、両法とも菌株のコアグラゼ型別、毒素型別をさらに分類することができた。

事例1では、黄色ブドウ球菌が、食品と便(患者及び従業員1名)より検出された。これらは、PFGE 法及び POT 法により、患者①、従業員③、チャーシュー、ネギのグループと、患者②、患者③、煮卵のグループの2つのパターンに分類された。しかし、グループ間の PFGE パターンの違いは2バンドの違いであり、同一由来株と推測され、原因食品が中華そばのトッピング具材であった可能性を示唆している。

事例2では、患者の疫学調査等で黄色ブドウ球菌が疑われた。しかし、原因食品の喫食から検体搬入までの時間経過が長かったため、直接培養では黄色ブドウ球菌数が少量の検体や増菌培養でしか検出されない検体が認められた。また、検出された菌のコアグラゼ型別、毒素型別でも異なる型を示すものが混在しており、原因となった黄色ブドウ球菌との判別が困難であった。このような場合、各菌株の PFGE 法や POT 法による遺伝子型別による追加情報が原因菌検索の中で有効となった。特に POT 法は、迅速性に優れており手技が簡便なため、多数の菌株解析も可能であり、行政への早期のデータ提供につなげること

ができる。また、数値データであることにより、事例2のような県外施設事例においても情報共有しやすい方法と考えられた。

## E 結 論

1. PFGE 法、POT 法により、コアグラゼ型別や毒素型別に加えて、詳細な菌株情報が得られた。

2. PFGE 法による分類と POT 法による分類は一致した。

3. POT 法は簡便で、数値化できることから、菌株同士の詳細な比較が必要な場合や他県と情報共有する場合に有効である。

## F. 研究発表

なし

## G. 参考文献

1)F.M.HAMBATY

et.al(1994):Epidemiol.Infect.,113,75-81





## 香川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

研究協力者 香川県環境保健研究センター

宮本孝子 有塚真弓 関和美 内田順子

### 研究要旨

平成 24 年 1 月から 12 月に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌は、O157 が 9 株、O26 が 6 株、O103 が 3 株、O146 が 2 株、O18 が 1 株、O 型不明が 2 株であった。そのうち O157 については、パルスフィールドゲル電気泳動法（以下 PFGE 法）、IS - printing System（以下 IS 法）を、O157 以外の血清型については PFGE 法を実施し分子疫学解析を行った。

発生状況は、散発が 9 事例、家族内感染が 5 事例、同一職場 1 事例であり、家族内感染、同一職場感染では関連性がそれぞれ見られた。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌のうち O157 については、PFGE 法と IS 法を、それ以外については、PFGE 法を実施し分子疫学解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

平成 24 年 1 月から 12 月に香川県内で分離された腸管出血性大腸菌 23 株（O157 が 9 株、O26 が 6 株、O103 が 3 株、O146 が 2 株、O18 が 1 株、O 型不明が 2 株）を用いた。

#### 2. 方法

##### (1) PFGE 法

制限酵素 *Xba*I を用い、国立感染症研究所で示された方法に従い PFGE 法を実施した。

##### (2) IS 法

IS - printing System（東洋紡）を用いて実施した。電気泳動は 3% アガロースゲルを使用した。増幅されたスタンダード DNA18 バンドを高分子量側から 3 バンドに区切り、各区分に順に「1」「2」「4」

の数字を当て、検体はスタンダード DNA のバンドと比較し増幅された場合はその数字を加算して 12 桁にコード化し解析した。

### C. 研究結果

#### 1. O157 事例

事例概要と IS 法結果を表 1 に示した。6 事例のうち菌株 2 と 3、4 と 5、6 と 7 はそれぞれ同じ IS コードであった。

また PFGE 法解析結果を図 1 に示した。PFGE 法での遺伝子パターンの類似度の高いものは①（菌株 2 と 3）97%、②（菌株 6 と 7 と 8）95%、③（①と②）91.5%、菌株 4 と③は 90%であった。

#### 2. O157 以外の血清型事例

事例概要を表 2 に示した。

##### (1) O26

PFGE 法解析結果を図 2 に示した。PFGE 法での遺伝子パターンの類似度の高いものは④（菌株 11 と 12）100%、⑤（④と菌株 13）95%、菌株 15 と⑤は 93.5%であった。

##### (2) O103

PFGE 法解析結果を図 3 に示した。PFGE 法での遺伝子パターンの類似度は⑥(菌株 17 と 18) 100%、⑥と菌株 16 は 97% であった。2008 年、2009 年の香川県で分離された事例との類似性は 83% であった。

(3)O146  
PFGE 法解析結果を図 4 に示した。PFGE 法での遺伝子パターンの類似度は菌株 19 と菌株 20 で 97% であった。

(4)O18 と O 型不明

比較するものがないため、データを蓄積した。

#### D. 考察

表 1 事例 2 の O157 については、家族内発生であり IS コードが一致し、図 1 の PFGE 法の類似度が 97% であることから同一感染源と推定され、家族間で感染したものと考えられる。

同様に表 1 事例 4 の O157 についても、家族内発生であり IS コードが一致し、図 1 の PFGE 法の類似度が 95% であることから同一感染源と推定され、家族間で感染したものと考えられる。

表 1 事例 3 の O157 は、家族内発生であり、IS コードが一致し、他の要因がないことから、同一感染源の可能性が高いと推定された。しかし、図 1 の PFGE 法(本県)の類似度が 80% と高くなく、また、感染研の PFGE 法では、菌株 4、5 がそれぞれ h142, h141 と異なる結果となった。この事例は、異なる泳動パターンを示した家族内感染であり今後の検討課題となった。

表 2 事例 8 の O26 については、家族内発生であり図 2 の PFGE 法の類似度が 95% 以上であることから同一感染源と推定され、家族間で感染したものと考えられる。

表 2 事例 11 の O103 については、3 名と

も無症状の家族内発生であり、図 3 の PFGE 法の類似度が 97% 以上であることより同一感染源と推定され、家族間で感染したものと考えられる。事例 11 と過去 2008 年、2009 年に本県で分離された O103 の菌株と合わせて解析を試みた結果、類似度は高くなかったので関連性はないと思われる。今後に向けてデータを蓄積したい。

表 2 事例 12 の O146 については、2 名とも無症状で、職員定期健診で発見された事例である。図 4 の PFGE 法の類似度が 97% であることより同一感染源と推定されるが、原因の特定には至っていない。

PFGE 法は時間を要し技術や泳動の鮮明な画像が必要になる。

IS 法は、簡便で迅速に結果を数値化でき、スクリーニング的に用いることにより、行政への迅速な情報還元が期待され、腸管出血性大腸菌 O157 の感染拡大防止に有用と考えられる。

広範囲な事例では IS 法のコードによりタイムリーな情報交換ができるようになればより一層大きな解析手段となるのではないかとと思われる。

#### E. 結論

1. O157 の家族内発生において IS コードはそれぞれ一致し PFGE 法でもパターンがほぼ類似していたため同一感染源と推定された。

2. O26、O103 の家族内発生において PFGE 法でパターンが類似していたため同一感染源と推定された。

3. O146 の同一職場発生において PFGE 法でパターンが類似していたため同一感染源と推定された。

#### F. 研究発表

なし

表1 O157 事例概要と IS 法結果

事例	菌株	発生月	VT 型	H 型	IS-printing コード 1st・2nd	感染研 PFGE 型	菌株由来
1	1	1月	1&2	7	3 1 7 5 7 5 ・ 2 1 1 7 5 7	h 10	患者
2	2	7月	1&2	7	3 1 7 5 7 7 ・ 2 1 1 7 5 6	e 807	患者
	3	7月	1&2	7			保菌者 (家族)
3	4	7月	1&2	7	7 1 7 5 7 7 ・ 6 1 1 6 5 7	h 142	患者
	5	7月	1&2	7		h 141	保菌者 (家族)
4	6	8月	1&2	7	7 1 3 5 5 7 ・ 6 1 0 4 5 7	h 143	患者
	7	8月	1&2	7		h 202	保菌者 (家族)
5	8	8月	1&2	7	7 1 7 5 5 7 ・ 6 1 1 6 5 7	d 580	患者
6	9	12月	1&2	7	3 0 5 5 7 7 ・ 2 1 1 7 5 7	h 610	患者

Dice (Td 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
E-HEC

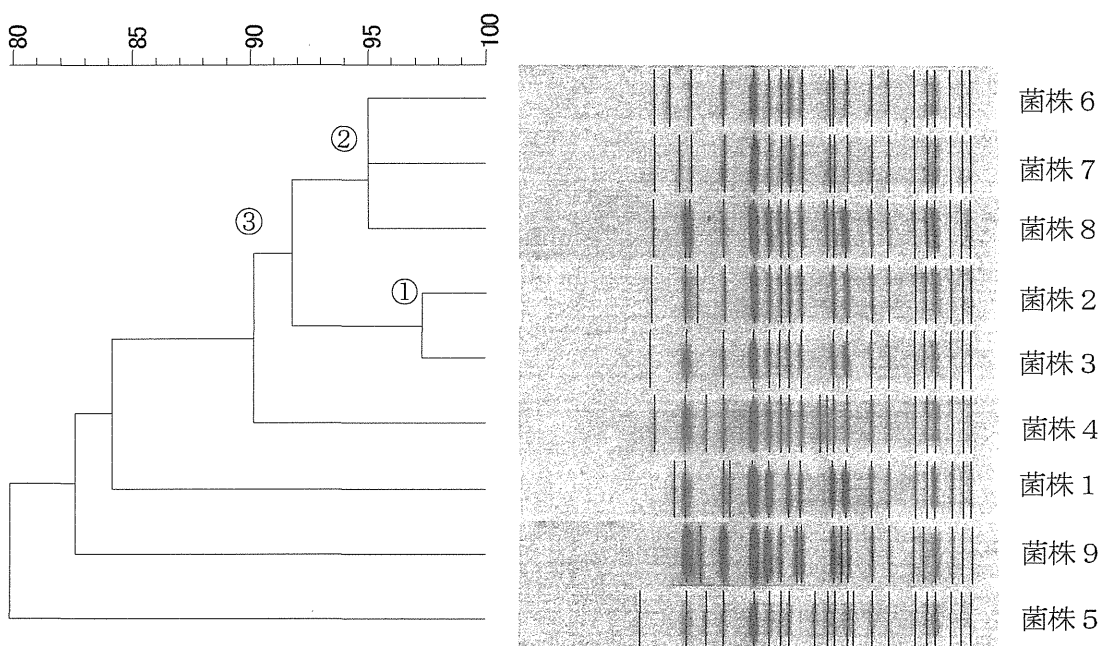


図1 O157 PFGE 法結果