

表 1 EHEC O157 菌株の概要

菌株番号	届出日	地域	年齢	性別	血清型	毒素型	備考
13-01	2013/1/12	A	63	女	O157:H7	VT1,2	13-02,03,04の接触者
13-02	2013/1/17	A	41	女	O157:H7	VT1,2	13-01の接触者
13-03	2013/1/16	A	11	男	O157:H7	VT1,2	13-01の接触者
13-04	2013/1/16	A	14	男	O157:H7	VT1,2	13-01の接触者
13-05	2013/3/21	B	17	女	O157:H7	VT2	
13-06	2013/4/16	A	8	女	O157:H7	VT1,2	
13-07	2013/6/13	A	78	男	O157:H7	VT2	13-08,12と関連有
13-08	2013/6/18	A	80	女	O157:H7	VT2	13-07,12と関連有
13-09	2013/6/27	B	41	男	O157:H7	VT1,2	
13-10	2013/6/28	A	13	女	O157:H7	VT2	13-11,13,14の接触者
13-11	2013/6/29	A	7	女	O157:H7	VT2	13-10の接触者
13-12	2013/6/29	A	91	女	O157:H7	VT2	13-07,08と関連有
13-13	2013/7/1	A	45	女	O157:H7	VT2	13-10の接触者
13-14	2013/7/1	A	27	女	O157:H7	VT2	13-12と関連有
13-15	2013/7/4	A	11	男	O157:H7	VT1,2	
13-16	2013/7/5	A	16	男	O157:H7	VT2	13-10の接触者
13-19	2013/8/1	A	38	男	O157:H7	VT1,2	
13-21	2013/8/7	A	11	男	O157:H7	VT1,2	
13-22	2013/8/13	A	2	女	O157:H7	VT1,2	
13-32	2013/8/31	A	19	女	O157:H7	VT2	

表 2 MLVA の Locus およびプライマー

	Locus	Sequence	Concentration ( $\mu$ M)	Dye	Repeat size	Offset
Mix1	O157-3	F GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	0.04	NED	6	323
		R GAACAACCTAAAACCCGCCTCGCCATCG	0.04			
	O157-9	F GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	0.04	VIC	6	465
		R GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC	0.08			
O157-25	F GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGTTATATTTAGTG	0.04	PET	6	110	
	R GCGCTGAAAAGACATTCTGTGTTGGTTTACAC	0.04				
O157-34	F TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	0.04	6-FAM	18	141	
	R AGGCATTAATAGCAGATGTTC	0.08				
Mix2	O157-10	F CAAACTTTACTGTTCAATTTCTACAGTCTC	0.04	VIC	6	350
		R AGGTATTATAAGGGCTTAAAGATAAAAAG	0.08			
O157-17	F GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	0.04	VIC	6	121	
	R AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC	0.04				
O157-19	F GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTC	0.04	NED	6	273	
	R CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC	0.04				
O157-36	F GGCGTCTTCATCGGCCTGTCCGTTAAAC	0.04	NED	7	102	
	R GCCGCTGAAAAGCCACACCATGC	0.04				
O157-37	F AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	0.04	PET	6	84	
	R GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG	0.04				

表 3 EHEC O157 の MLVA, IS, PFGE 法による解析結果

菌株 番号	MLVA repeat-numbers									ISコード		PFGE
	O157-3	O157-9	O157-25	O157-34	O157-10	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	1st	2nd	Type No.
13-01	12	9	4	11	27	7	4	9	6			
13-02	13	9	4	11	27	7	4	9	6	717577	611557	i12
13-03	12	9	4	11	27	7	4	9	6			
13-04	12	9	4	11	28	7	4	9	6			
13-07	18	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-08	18	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-10	18	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-11	18	9	3	9	16	5	8	-2	8	341057*	310652	g501
13-12	18	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-13	19	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-14	18	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-16	18	9	3	9	16	5	8	-2	8			
13-06	10	12	3	11	29	7	7	11	8	717577	211657	i49
13-15	10	12	3	11	32	7	7	11	8			
13-09	10	12	3	11	27	7	7	11	8	717575	211657	i197
13-21	10	13	8	12	29	8	6	3	5	717555	611657	i399
13-22	10	13	8	12	29	8	6	3	5			
13-05	16	11	4	9	37	6	6	5	7	105457	311252	i48
13-19	11	11	8	12	8	7	6	3	5	717577	611657	i206
13-32	14	9	5	9	33	4	7	6	7	301447	611242	i393

\*高分子量にエキストラバンド有

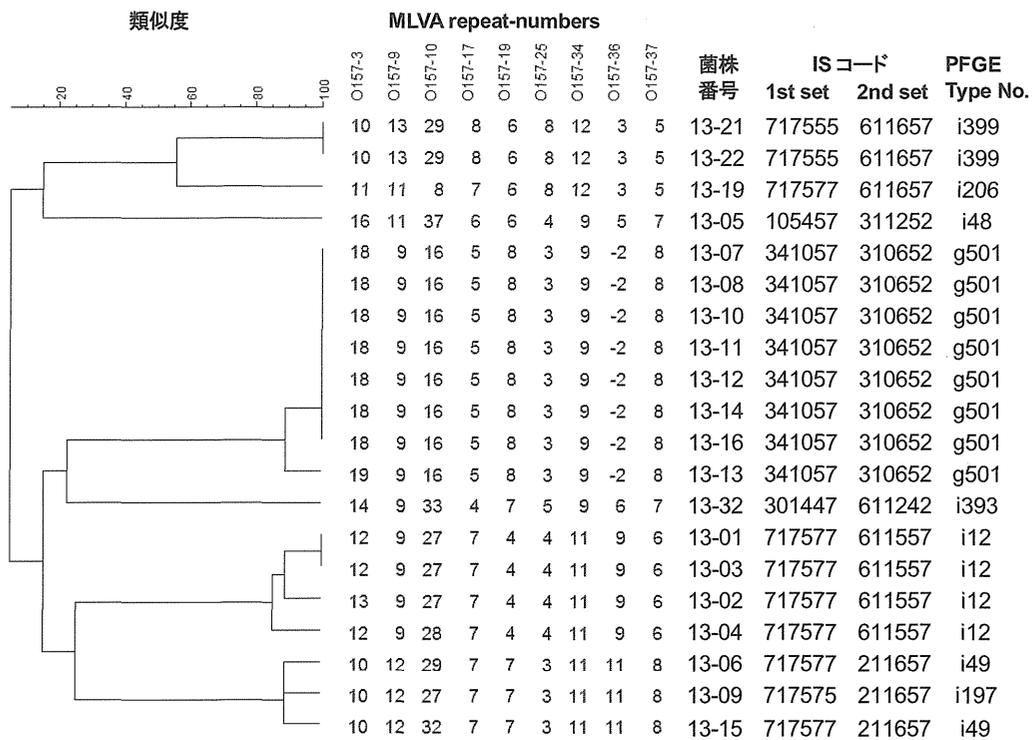


図 1 EHEC O157 の MLVA クラスター

# 2013年に広島市で分離した腸管出血性大腸菌 O26 (VT1 産生) 株の 分子疫学的解析による検討

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

2013年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 O26 (VT1 産生) 感染症事例 9 件 11 株について、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を実施し、事例間での疫学的関連性について検討した。その結果、いくつかの事例で疫学的関連性が疑われたが、感染経路の特定には至らなかった。また PFGE とは異なる分子疫学的解析手法である Multi-locus variable-number tandem repeat analysis を実施し、その解析結果を比較したところ、PFGE で類似度が高い菌株は MLVA でも結果が一致しており、O26 の MLVA が PFGE と同程度の型別能を有し、集団事例内や散发事例間での疫学的関連性を迅速に検討する材料となる可能性が示唆されたが、今後さらなるデータの集積が必要である。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 の Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) を検討し、型別能についてパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) との比較を行った。さらに感染事例間での疫学的関連性についても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料

2013年6月から10月までに広島市で分離した EHEC O26:H11 VT1 産生 11 株を用いた。事例と菌株との関係は表 1 に示した。

### 2. 方法

#### (1) PFGE

制限酵素 *XbaI* 及び *BlnI* を用いて、国立感染症研究所 (感染研) で示された方法に準拠し、さらにスメアバンド発生を防止するためチオ尿素を加えた 0.5×TBE で電気泳動を行った<sup>1)</sup>。Fingerprinting II (Bio-

Rad) を用いて解析を行い、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 26type No. として併記した。

#### (2) MLVA

フラグメント解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社) 及び Gene Mapper (Applied Biosystems社) を用い、7 ヲ所の VNTR 領域について解析を行った<sup>2,3)</sup>。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、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。

## C. 研究結果

### 1. PFGE の解析結果

*XbaI* 処理によるクラスターとバンドパ

ターンを図1に、*BlnI* 処理によるものを図2に示す。

#### (1) 家族内事例

家族内で感染したと思われる事例4の2株(13014、13015)は、2種類の酵素処理ともに同一クラスターであった。

#### (2) 散発事例

事例3(13012、13013)と事例5(13016)は、2種類の酵素処理ともに95%以上と高い類似度であった。またこの3株は、従来の泳動方法ではスメアバンドとなり解析できなかったが、50 $\mu$ Mチオ尿素を加えた0.5 $\times$ TBEで泳動することでバンドを検出することができた。(図3)

9月末に発生した、事例7(13022)と事例9(13024)は、*XbaI* 処理では同一クラスターを形成し、さらにその一週間前に発生した事例6(13021)とは類似度96%であった。一方*BlnI* 処理では、これら3株とも切断されなかった。

### 2. MLVA の解析結果

#### (1) 家族内事例

図1に示すように、事例4の2株(13014、13015)はMLVA RNが一致した。

#### (2) 散発事例

事例3(13012、13013)と事例5(13016)、事例6(13021)と事例7(13022)及び事例9(13024)は、それぞれMLVA RNが一致した。その他の事例間で結果が一致したものはなかった。

### 3. PFGE と MLVA の結果の比較

PFGEで同一クラスター、あるいは95%以上の類似度であった菌株は、MLVA RNも一致していた。その他はクラスターごとにMLVA RNも異なっていた。

### D. 考 察

今回PFGEを実施した11株の内、スメアバンドのため解析不能となったものが3株あったが、泳動バッファーに50 $\mu$ Mチオ尿素を加えることでバンドを検出することができ、さらにこれらの株はクラスター解析で高い類似度を示した。今後は解析不能株を減らすため、チオ尿素を加えたバッファーで電気泳動した方がよいと考えられる。

2013年の感染事例では、事例3と5や、事例6、7と9の発生時期が比較的近く、解析結果から疫学的関連性が疑われたが、患者の生活圏は異なっており、保健センターや保健所による疫学調査でも共通する点はみられず、感染経路は不明であった。

当所におけるEHECの分子疫学的解析は、O157ではPFGE、IS-printing、MLVAの3種類を実施しているのに対し、その他の血清型ではPFGEのみである。しかし、O26はO157に次いで発生件数が多く、また2013年の広島市における件数も例年に比べて多かったため、PFGEに加え、より迅速に解析が可能なMLVAについての検討を行った。PFGEとMLVAの結果を比較すると、PFGEで同一クラスターを形成したり、類似度が高かった菌株のMLVA RNは、7領域全てで一致している一方、PFGEのクラスターが違えばMLVA RNも異なっていた。このことからO26のMLVAはPFGEと同程度の型別能を有しており、集団事例内や散発事例間での疫学的関連性を迅速に検討する材料となる可能性が示唆された。しかしながら今回の解析は2013年分離11株のみと少なく、また7つのVNTR領域の内、O157-37とEHC-6は全ての株がPCRで増幅されなかったため、実質5領域での比較となった。今後O157の解析

における MLVA と同様にその有用性を示していく上でも、さらに解析数を増やして検討していく必要がある。

#### E. 結論

1. PFGE の電気泳動では、泳動バッファーに 50  $\mu$ M チオ尿素を加えることで、スミアバンドを防止することができる。

2. 2013 年は広島市における EHEC O26 の発生件数が多く、解析結果からはいくつかの事例で疫学的関連性が疑われたが、感染経路は不明であった。

3. O26 の MLVA を実施した結果、PFGE で類似度が高い菌株は MLVARN も一致しており、MLVA が迅速に事例間の疫学的関連性を検討する材料となる可能性が示唆されたが、今後さらなるデータの集積が必要である。

F. 研究発表  
なし

#### G. 参考文献

1) 沼田ら:病原微生物検出情報 Vol.23 No.3, 66-68, 2002

2) Hidemasa Izumiya et al. (2010): New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol* 54:569-577

3) 高橋ら: Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis による腸管出血性大腸菌(EHEC)O26 遺伝子型別法の検討 岩手県環境保健研究センター年報第 11 号, 67-69, 2011

表1 2013年のEHEC O26 (VT1 産生) 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	職業	備考
1	13001	患者	20130605	女	21	会社員	
2	13009	患者	20130707	女	12	中学生	
3	13012	患者	20130816	女	71	無職	陰性確認 1 回目
	13013						
4	13014	患者	20130822	女	7	小学生	患者の同居家族
	13015	無症状病原体保有者		女	38	飲食店経理	
5	13016	患者	20130902	女	64	主婦	
6	13021	患者	20130916	男	16	高校生	
7	13022	患者	20130924	男	10	小学生	
8	13023	患者	20130925	男	5	保育園児	
9	13024	患者	20130929	女	7	小学生	

表2 Primer set と Locus の概要

PCR mix	Locus	Dye	Sequence (5'-3')	Repeat size (bp)	Offset
Mix 1	O157-9	F VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	6	465
		R	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG		
	EHC-1	F VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	6	75
		R	CGCGGCTGCCGAGTATC		
	EHC-2	F VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	6	214
		R	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT		
EHC-5	F NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	6	109	
	R	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC			
Mix 2	O157-37	F PET	AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	6	84
		R	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG		
	EH26-7	F PET	CCCCTATCAAACTGATACCCGATAAG	22	292
		R	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT		
	EHC-6	F NED	ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	9	387
		R	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC		



図1 2013年 EHEC O26 (VT1 産生) 分離菌株の *Xba*I 処理による PFGE クラスタと MLVA

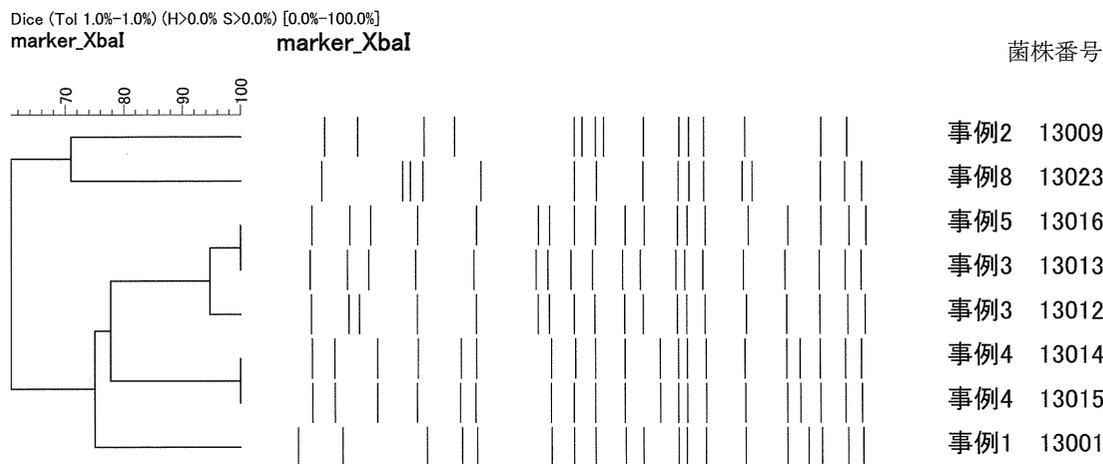


図2 2013年 EHEC O26 (VT1 産生) 分離菌株の *Bln*I 処理による PFGE クラスタ

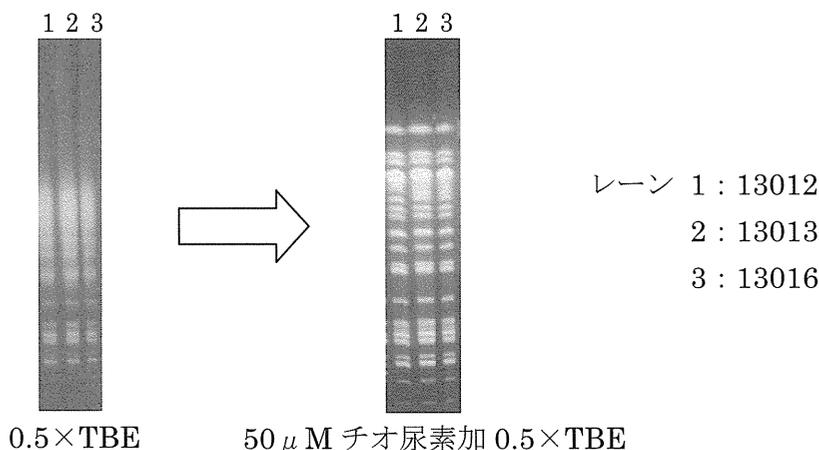


図3 泳動バッファーに 50 μ M チオ尿素を加えた場合の泳動写真 (*Xba*I 処理)

2013(平成 25)年の山口県における腸管出血性大腸菌感染症集団感染事例の  
IS-Printing 法及び MLVA 法による解析結果

研究協力者 山口県環境保健センター  
矢端順子 亀山光博 野村恭晴 富永潔

### 研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子タイピングの方法は、従来から広く実施されているパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)のほかに、集団感染などへの早期の対応のため、より迅速かつ簡便な方法として、PCR 法で検査できる IS-Printing 法が、多くの地方衛生研究所等で実施されるようになった。

2013(平成 25)年に、山口県で発生した腸管出血性大腸菌による集団感染事例は 2 事例であった。1 事例は、7 月に、ステーキ店を原因施設として、もう 1 事例は、8 月に、保育園を中心として発生した事例で、いずれも腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT1+2 産生性)が原因であった。2 事例ともに、初期の患者発生時に、IS-Printing 法による遺伝子タイピングを行ったことによって、早期に集団感染の可能性を探知することが出来た。

この 2 事例は、疫学的関連性は認められなかったものの、IS-Printing 法のプロファイルは、ステーキ店の事例が「717557-611657」保育園の事例が「717577-611657」と、きわめて類似していた。また、この 2 つのプロファイルをもつ菌株は、2011 年と 2012 年に、本県を含めて、中四国ブロックで多数認められており、流行株の可能性があった。

そこで、IS-Printing 法で由来の同一性が推定された、事例 1 由来 8 株と散発事例由来 5 株、並びに事例 2 由来 18 株と散発事例 4 株、計 35 菌株について、MLVA 法により解析した結果、IS-Printing 法では解析できない「菌株の由来の同一性」を明らかにすることができた。

腸管出血性大腸菌感染症における原因菌の分子疫学的解析には、PFGE が繁用されているが、迅速性に欠ける欠点がある。今回の集団発生事例への適用結果から、IS-Printing 法と MLVA 法の併用は、PFGE に劣らない精度で、かつきわめて迅速に原因菌の由来の同一性を明らかにすることが可能であり、突発的な集団発生事例や広域散発事例への対応において、有用な分子疫学的解析手法であると考えられた。

#### A. 研究目的

PFGE による遺伝子タイピングは、時間がかかることと、検査結果の比較が難しいことから、実際の事例発生時のリアルタイムな情報提供には不向きであると考えられる。このため、迅速かつ数値データで結果を得られる IS-Printing 法の有用性を、

2013 年に県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT1+2)の集団感染事例 2 事例(事例 1 及び事例 2)から検証した。また、IS プロファイルが類似していた集団発生 2 事例由来株間及び集団感染由来株と同一プロファイルを有する、疫学的な関連がないとされた散発事例由来株と集団感染事例由来

株間のそれぞれにおける菌株の由来の同一性について、IS-Printing 法と同様に迅速かつ数値データで結果が得られる MLVA 法による解析の有用性を検討するとともに、突発的に発生する集団感染、広域散発事例への対応に有用な、迅速かつ精度の高い分子疫学解析方法について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

事例 1 の患者等 8 名から分離された 8 菌株、事例 2 の 17 名の患者等から分離された 18 菌株並びに 2010 年～2013 年に県内で分離された腸管出血性大腸菌 O157:H7(VT1+2)のうち、事例 1 ないしは事例 2 と IS プロファイルの一致した散発発生事例 7 事例 9 菌株、計 35 菌株を供試した。

### 2. 解析方法

#### (1)IS-Printing 解析方法

菌株からの DNA 抽出は、DEPC 水 200  $\mu$ 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。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 プロファイルとした。

#### (2) MLVA 解析方法

岡山県環境保健センターの中嶋博士を通して送付された、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)に準拠し、Locus25,3,34,9,17,19,36,37,10 の 9 カ所の

領域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 fragment について、Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit[Applied Biosystems 社製]を用い、シーケンスを行い、各 locus のリピート数を確認した。

## C. 研究成果

### 1. 事例の概要及び IS-Printing 法の結果

#### (1)事例 1

S 保健所管内で、7 月 8 日と 7 月 11 日に、別々の医療機関から腸管出血性大腸菌感染症患者の発生届があった。保健所の調査で、両名とも同じステーキ店「M 屋 H 店」をそれぞれ、6 月 29 日と 7 月 3 日に利用していたことが判明した。両者の菌株の同一性をみるため、当センターに IS-Printing 法による解析の依頼があり、IS-Printing 法を実施したところ、IS プロファイルは、いずれも「717557-611657」で一致したため、ステーキ店が原因施設である可能性が示唆された。その後、同保健所管内で 7 月 16 日に、2 名の患者の発生届があり、同じステーキ店を利用していたことが判明し、IS プロファイルも一致したため、腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事件と断定され、同店に対し S 保健所は行政処分を行った。

さらに、7 月 19 日に腸管出血性大腸菌感染症患者として届出のあった、S 保健所とは隣接する地域の U 保健所管内の患者が、同ステーキ店と同系列の別の店舗で S 保健所管内の「M 屋 S 店」を利用したことが判明したため、この患者からの分離菌株についても IS-Printing 法による解析依頼があった。このプロファイルも、前出の患者菌株と一致し、7 月 21 日には S 保健所管内でも同店舗を利用した患者の発生届があったため、S 保健所は、M 屋 S 店についても食中毒による行政処分を行った。また、U 保健所管内の患者の家族 2 名(無症状)からも菌が検出され、合計 8 名の感染者の IS プロファイルの一致を確認した。

8 名は、いずれも 6 月下旬から 7 月中旬に

かけて、2つの店舗の一方ないしは両方で、ステーキの喫食歴があった。感染者らが喫食したステーキは、牛肉を成形加工したもので、同じ施設で加工処理されたものであった。また、ステーキは、店内で客自身が焼いて食べるシステムになっていたことから、加熱不十分であったこのステーキが原因食品であると推定された。

## (2)事例2

8月13日と8月16日に、U保健所管内で、10ヶ月男児と8歳男児における、腸管出血性大腸菌感染症の発生が、別々の医療機関から届出された。U保健所が調査したところ、8歳男児の5歳の弟と3歳の妹が、10ヶ月男児と同じF保育園に通園していることが判明したため、両名の菌株のIS-Printing法による解析依頼があった。ISプロファイルは「717577-611657」で一致した。その後、8月18日に8歳男児の弟と妹がHUSで入院し、さらに8月22日に別の医療機関から、2歳の弟がF保育園に通園している8歳男児の発生届があり、これら3名の菌株についてもISプロファイルが一致することを確認した。

この結果に基づき、U保健所は、F保育園を中心とした腸管出血性大腸菌O157の集団感染であると判断し、疫学調査及び衛生指導等を実施した。また、保育園の園児、職員及び園児の家族等に対し健康診断を実施し、6名の園児と2名の園児の家族からも菌が検出され、ISプロファイルも一致した。なお、園児の関係者で、県外にも2名の菌陽性者の存在が確認され、後日、国立感染症研究所細菌第一部で実施したPFGEで、同じ遺伝子タイプであったことが確認された。8月末には、県内の菌陽性者のうち、治療中のものを除いて再度の健康診断

を実施した結果、菌の陰性化を確認し、一応の終息をみた。

しかし、その後、9月9日に腸管出血性大腸菌感染症患者として届出された1歳男児が、同園の園児であることが判明した。U保健所は、園内の衛生管理が不十分であった可能性が高いとし、再度の衛生指導を行い、健康診断を実施したところ、園児3名と園児の家族1名から、菌が分離された。この3名の園児のうち1名は、菌陰性化が確認されていた園児であった。

本事例で菌が検出された人数は、最終的に県内では、園児13名(再検出の1名を含む)と園児の家族等5名の、計18名であった。また、18株のISプロファイルはすべて一致し、保育園での再感染があったことが推察された。

## 2. MLVA法の解析結果

事例1及び事例2のMLVA法の解析結果を表1に示す。

事例1のISプロファイルは、8株とも

「717557-611657」であったが、MLVA法のパターンは、6株が、

5-11-9-8-10-6-11-7-18、他の2株は

5-12-9-8-10-6-11-7-18と、2タイプ認められた。

事例2のISプロファイルは、18株とも、

「717577-611657」で、MLVA法のパターンは、4タイプ認められた。もっとも多いパターンは、3-10-9-14-7-7-11-8-26で、15株であった。残る3株のうち、1株は、

3-10-9-14-7-7-11-9-26、別の1株は

3-10-9-14-7-7-11-8-27、さらに別の1株は

3-11-9-14-7-7-11-8-26となっており、いずれも1領域の差であった。

事例1と事例2は、発生時期に1ヶ月のずれがあるものの、ISプロファイルはきわ

表 1 集団感染事例の IS-Printing 法と MLVA 法の結果

事例 NO	発生時期	管轄 保健所	菌株数	IS-Printing					MLVA					
				1st	2nd	L25	L3	L34	L9	L17	L19	L36	L37	L10
				1	2013年7月	S(U)	6			5	11	9	8	10
			2	717557	611657	5	12	9	8	10	6	11	7	18
			15			3	10	9	14	7	7	11	8	26
2	2013年8~9月	U	1			3	10	9	14	7	7	11	9	26
			1	717577	611657	3	10	9	14	7	7	11	8	27
			1			3	11	9	14	7	7	11	8	26

表 2 散発発生事例の IS-Printing 法と MLVA 法の結果

事例 NO	発生時期	管轄 保健所	菌株数	IS-Printing					MLVA					
				1st	2nd	L25	L3	L34	L9	L17	L19	L36	L37	L10
				3	2012年5月	Ym	1			5	12	10	9	6
4	2012年7月	U	1			5	9	10	9	6	6	10	7	33
5	2012年7月	U	2	717557	611657	5	9	10	9	6	6	10	7	33
6	2012年12月	S	1			5	9	10	10	6	6	10	7	35
7	2010年8月	H	1			8	9	10	12	7	6	3	5	19
8	2013年5月	Sh	2	717577	611657	5	13	11	7	7	6	12	11	21
9	2013年9月	U	1			3	10	9	14	7	7	11	8	26

めて類似しており、1st セットの 14 番目の IS があるかないかの差異にとどまった。しかし、MLVA 法では、Locus34 と Locus36 以外の 7 領域は不一致であった。

散発発生事例の IS-Printing 法と MLVA 法の結果を表 2 に示す。

事例 1 の IS プロファイルと同じ菌株は、4 事例 5 株あった。これら菌株の MLVA パターンは、事例 1 とは、6 領域で不一致であった。また、事例 4 及び 5 については、MLVA パターンは一致し、事例 3 及び 6 についても、事例 4 及び 5 の MLVA パターンと、各々 2 領域異なるのみであった。

事例 2 の IS プロファイルと同じ菌株は、3 事例 4 株あった。このうち、2010 年 8 月の事例 7 と 2013 年 5 月の事例 8 の MLVA パターンは、Locus17 以外の 8 領域は事例 2 と不一致であったが 2013 年 9 月の事例 9 については、MLVA パターンが事例 2 と一致した。

#### D. 考察

今回の集団感染事例は、2 事例とも、初期の患者発生時に、疫学的関連性を伺わせる要素があるものの、確定的とまでは言えず、遺伝子タイピングによる科学的根拠が求められた。どちらの事例も、感染まん延防止のため、

迅速な措置をとる必要性があったため、短時間で検査結果の出る IS-Printing 法による検査を提案、実施し、保健所の調査及び指導等に貢献することができた。また、IS-Printing 法は、菌株がバラバラに搬入されても、その都度、検査を実施、結果を比較できるので、今回のような、持続して患者の発生した事例に対しても、スムーズに対応できた。

ただ、今回の 2 事例の IS プロファイルは、県内では、717557-611657 が 2012 年に 5 株、717577-611657 が、2010 年に 1 株と 2013 年の 5 月に 2 株分離されている上に、2011 年及び 2012 年の中四国ブロックの報告で、他県でも多数分離されており、比較的よく認められるプロファイルであると考えられた。このため、結果を確実なものとするためには、より詳細な遺伝子タイピングの方法による確認が必要であると考えられたので、同一 IS プロファイルの菌株について、MLVA 法による検査を実施し、各菌株の遺伝的同一性をより詳細に検討した。

MLVA 法による解析結果から、事例 1 と事例 2 は、由来の異なる菌株であることが明らかになった。また、事例 1 と同じ IS プロファイルであった、散発事例 3～6 については、事例 1 の MLVA パターンとは大きく異なり、同一感染源由来ではないと考えられた。この散発事例のうち、MLVA パターンの一致した事例 4 と事例 5 は同じ保健所管内の患者で、発生時期も 7 月と同時期であり、疫学的関連は認められていないものの、同一感染源由来の可能性が示唆された。また、これら 2 事例と他の 2 事例の MLVA パターンは、各々 2 領域の差異にとどまっており、4 事例とも 2012 年の発生であることも考慮すると、共通の感染源が存在した可能性が推察された。

事例 2 と同一 IS プロファイルの散発事例 7 と 8 については、事例 2 とは MLVA パター

ンが大きく異なっており、同一感染源ではないと考えられた。しかし、散発事例 9 については、MLVA パターンが、事例 2 の優勢な MLVA パターンと同一であった。また、発生時期は、事例 2 の再発時期の 9 月と同時期で、患者所在地も集団発生の原因施設である保育園の近隣であった。これらのことから、事例 9 は事例 2 と同一感染源由来の可能性が高いと推察された。

なお、国立感染症研究所細菌第一部による PFGE 解析の結果においても、同様の成績であり、MLVA パターンの差異とよく相関していた。

以上のことから、腸管出血性大腸菌 O157 感染症における IS-Printing 法と MLVA 法の併用による分子疫学的解析は、迅速かつ高い精度をもって分離菌株の由来の同一性を判定することが可能であり、集団感染の早期探知のみならず、同時期における散発事例やその地域における過去の類似菌株との関連性を明らかにする上で、きわめて有用な手法と考えられた。

MLVA 法は、PFGE 法に比べると、短時間で結果を得ることができ、IS-Printing 法と同様に、データを数値で得ることができるため、結果の比較が容易である。特に、複数の自治体での広域散発事例などの際には、各地方衛生研究所で検査した結果を、容易に比較できるという利点がある。

IS-Printing 法については、パルスネットによって、広域データベースの構築体制が進んでいるが、今後、MLVA 法についても同様なデータベースの構築がなされれば、集団感染などの突発的な事例のみならず、広域にわたる散発事例においても、原因菌の由来の同一性がより高い精度で判定可能となり、腸管出血性大腸菌 O157 感染症の対策に寄与すると考えられた。

## E. 結論

山口県で平成 25 年に発生した腸管出血性大腸菌による集団感染事例では、いずれも IS-Printing 法により早期に、集団感染の科学的根拠を提供することが出来た。

IS-Printing 法は、簡便でかつ迅速に検査出来るため、集団発生などの早期探知に有用な遺伝子タイピング法である。しかしながら、同様な IS プロファイルを有する菌株なども多く、結果を確実にするためには、PFGE や MLVA 法などを併用する必要がある。特に、MLVA 法は、PFGE に比較し短時間で、結果を数値データで得られるため、IS-Printing 法と併用することで、迅速でかつ確実な結果を得ることが出来ると考えられた。

## F. 研究発表

なし

## G. 参考文献

- 1 寺嶋 淳：食品由来感染症調査における分子疫学的手法に関する研究(課題番号：H21-新興-一般-003)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 87-99(2012)
- 2 寺嶋 淳：病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究(課題番号:H24-新興-一般-005)平成 24 年度総括・研究分担報告書 101-128(2013)

## 徳島県で発生したウェルシュ菌食中毒事例における分子疫学解析について

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

2013年に徳島県内で発生したウェルシュ菌による食中毒事例は、Hobbs13型と市販の血清には該当しない型の複数の血清型菌が分離された事例であった。そこで、パルスフィールド電気泳動法による分子疫学解析を実施したところ、患者由来検体から分離した菌株と検食および従事者由来検体から分離した菌株は共通のPFGEパターンを示した。血清型が複数となる場合やUTとなる場合にはPFGEパターンが疫学解析において有用な情報となると考えられる。

#### A. 研究目的

ヒトの腸内の常在菌であり、環境中にも広く存在するウェルシュ菌を原因菌と判断するためには、分離された菌株が同一であることを確認する必要がある。しかしながら、Hobbs血清型別は一部の型しか市販されておらず、これらの血清型で分類されない株も多い。そこで、食中毒事例において分離されたウェルシュ菌をパルスフィールド電気泳動法（以下PFGE法）により比較を行い検討したので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 供試菌株

2013年5月に県内で発生した食中毒事例において食中毒起因菌の検査を行ったところ、給食検食（ちらし寿司）、患者（5名中4名）、調理従事者（9名中4名）からウェルシュ菌が分離された。これらの分離されたウェルシュ菌株14株を用いた。

##### 2. 血清型別試験、エンテロトキシン遺伝子およびエンテロトキシンの検出

分離菌の血清型別試験は、Hobbsの血清型別診断用血清（デンカ生研）を用いて行

った。エンテロトキシン産生遺伝子（以下*cpe*）は、ウェルシュ菌毒素産生遺伝子 Primer Set CPE-1,2 (TAKARA) を用いて確認した。また、ウェルシュ菌エンテロトキシン検出用キット PET-RPLA（デンカ生研）を用いてエンテロトキシンの存在を確認した。

#### 3. PFGE法

分離された菌株をトリプトソーヤ寒天培地で一夜培養後、精製水に懸濁し等量の1% SeaKemGold agaroseを加えプラグを作成した。次に、5mg/ml Lysozyme 溶液で溶菌後、1mg/ml ProteinaseK 溶液で処理し、制限酵素 Sma I および Nru I を用いて切断した。泳動は、6.0V/cm、スイッチングタイム0.5-40秒で19時間の条件で行った。サイズマーカーは、*Salmonella Branderup* H9812をXba I 処理し使用した。

#### C. 研究結果

##### 1. 事例の概要

本事例は、施設管理者から食中毒様症状を呈している入所者がいるとの届出が保健所にあり探知された。患者は同一の施設入

所者であり共通食は同施設が調理提供した給食のみであった。患者の発生には一峰性のピークが認められ、下痢 (96.3%)、嘔吐 (7.4%) を呈していた。

2. 血清型およびエンテロトキシンを検出分離したウェルシュ菌の血清型は Hobbs13 型 (6 株) と型別不能 (以下 UT) (8 株) であった。また、エンテロトキシン産生性については 1 株を除きすべて *cpe* を有していた。(表 1)

### 3. PFGE 解析

図 1 (A) に制限酵素 Sma I 処理をした PFGE パターンを示した。Hobbs13 型の 6 株では、*cpe* を有する 5 株は同一パターンを示したが、患者由来の *cpe* を保有しない 1 株は異なるパターンを示した。また、UT の 8 株はすべて同一のパターンを示した。

図 1 (B) に制限酵素 Nru I 処理をした PFGE パターンを示した。Hobbs13 型の 6 株では、Sma I 処理した場合と同様に *cpe* を有する 5 株は同一パターンを示したが、患者由来の *cpe* を保有しない株は異なるパターンを示した。UT の 8 株では調理員由来の 1 株が異なるパターンを示した。

### D 考察

本事例は Hobbs 血清型が 13 型および UT の混合したウェルシュ菌による事例であった。患者便、検食 (ちらし寿司)、従事者便から、多数のコロニーを釣菌するなどしたが、一方の血清型の *cpe* を有するウェルシュ菌しか得られない検体もあった。

そこで、得られた株について PFGE を実

施したところ、Hobbs 13 型、UT 型の *cpe* を有するウェルシュ菌は、検食 (ちらし寿司) 由来株と患者由来株において、2 種の制限酵素を用いて解析を行ったが、同一の PFGE パターンを示した。このことから、ちらし寿司に含まれたウェルシュ菌が本事例において関与している可能性が高いと考えられた。また、従事者由来株においても、1 株を除き同一の PFGE パターンを示した。

したがって、本事例の発生要因として、

1) 原材料が汚染されており調理工程で増殖した可能性、2) 従事者は給食を喫食していないことから、従事者が保菌していたウェルシュ菌が調理工程で付着・増殖した可能性が考えられた。

本事例を通じて、健康保菌者もあるウェルシュ菌では、血清型が複数となる場合や UT となる場合には、PFGE パターンを疫学解析の一指標とすることにより、事例との関連性をより詳細に検討することができる。

### E 結論

1. 食中毒事例から分離されたウェルシュ菌について、PFGE 法を実施し分子疫学解析を行った。

2. ウェルシュ菌による食中毒事例では、血清型が複数となる場合や UT となる場合には PFGE パターンが疫学解析において有用な情報となる。

### F 研究発表

なし

表1 検出されたウェルシュ菌のエンテロトキシン産生性と血清型

Sample No.	2	3	5	8	11	12	13	14	15	
由来	調理従事者				患者				検食	
便中のエンテロトキシン	-	-	+	+	+	+	+	+	/	
<i>cpe</i> 遺伝子	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Hobbs	13型	+	+		+	+			+	+
	UT		+	+	+	+	+	+		+

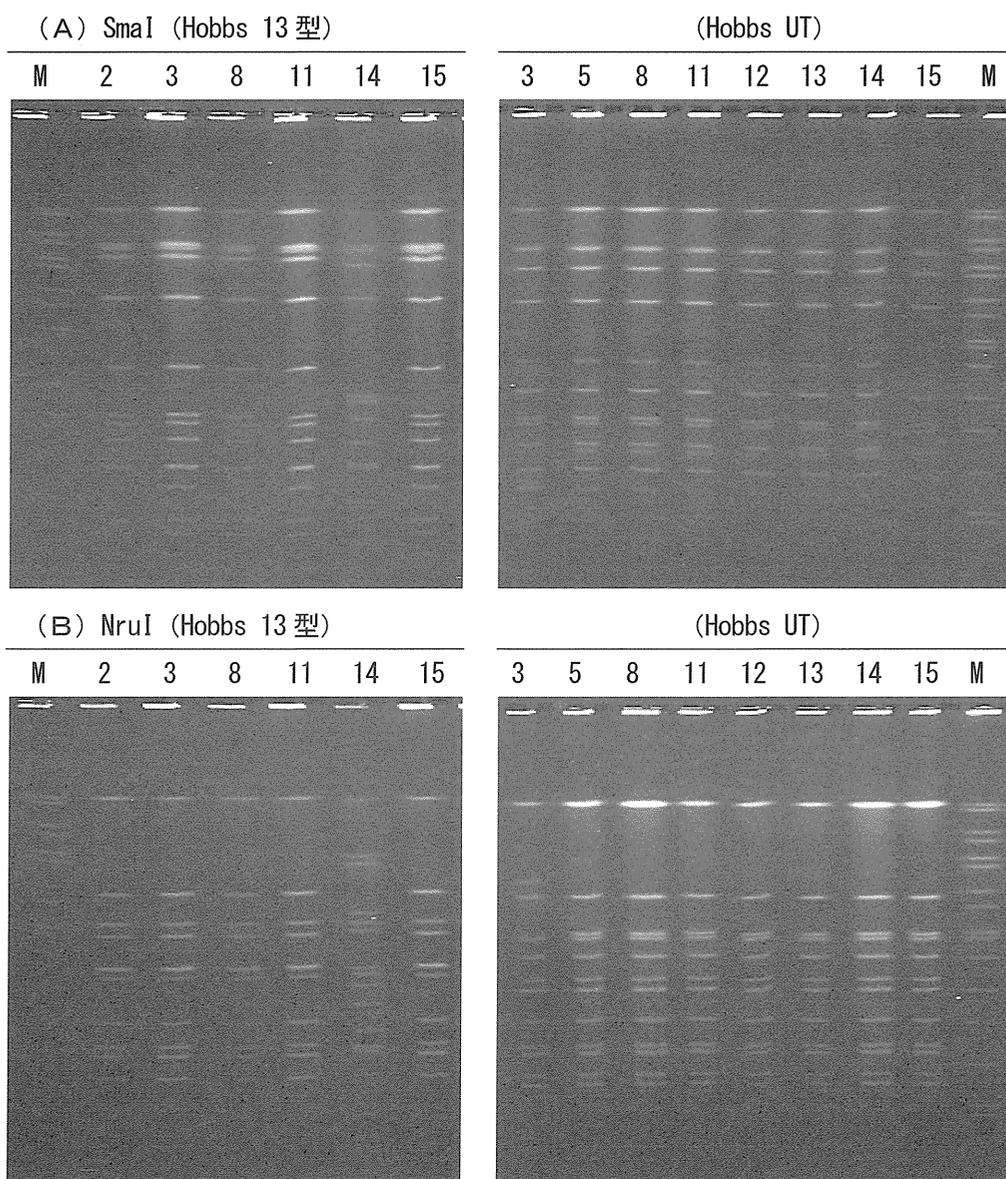


図1 PFGE パターン画像 (A) SmaI 処理 (B) NruI 処理  
(M : *S.Branderup*, 2,3,5,8 : 調理従事者, 11,12,13,14 : 患者, 15 : 検食)

## 香川県で分離された下痢原性大腸菌の分子疫学解析

研究協力者 香川県環境保健研究センター

福田千恵美 岩下陽子 有塚真弓 内田順子

### 研究要旨

平成 25 年 1 月から 12 月に香川県内で分離された下痢原性大腸菌は、毒素原性大腸菌 O159 : 17 株、腸管出血性大腸菌 O157 : 9 株、O26 : 9 株、O165 : 1 株、O119 : 1 株、O146 : 1 株、O111 : 1 株、O168 : 1 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 以外の下痢原性大腸菌については PFGE 法を実施し分子疫学解析を行った。

発生状況は、散発が 10 事例、家族内感染が 2 事例、同一施設 2 事例であり、家族内感染、同一施設感染では関連性がそれぞれ見られた。また、O146 については昨年同じ施設で検出された株と PFGE 法では関連性が見られたが、施設調査の結果では原因が不明であった。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌のうち O157 は PFGE 法と IS 法を、それ以外の毒素原性大腸菌を含む菌については、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 25 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 22 株（O157 : 9 株、O26 : 9 株、O165 : 1 株、O119 : 1 株、O146 : 1 株、O111 : 1 株、O168 : 1 株）、毒素原性大腸菌<sup>1)</sup> O159 の 17 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<sup>2)</sup> 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

事例概要を表 1 に PFGE 法解析結果を図 1 に示した。

家族内感染が 2 事例あり、IS コードはそれぞれ同じであった。PFGE 法の類似度はそれぞれ 100% であった。感染研の解析では 3 バンド違いが 1 事例と同じ PFGE 型が 1 事例であった。

#### 2. O157 以外の腸管出血性大腸菌の血清型事例

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。同じ保育園内の発生のうち 2 家族からも菌が検出された事例である。PFGE 法の類似度が 98% であった。感染研の解析では全株同じ

PFGE 型であった。

## (2) O146

事例概要を表 3 に、PFGE 法解析結果を図 3 に示した。昨年同じ施設で検出された O146、2 株のうち 1 株では PFGE 法の類似度が 100%、もう 1 株の類似度は 93% であった。感染研の解析では昨年検出された 2 株は PFGE 型が同じであり、今年検出された株は 2 バンド違いであった。

## (3) その他の血清型事例

今後のためにデータを蓄積した。

## 3. 毒素原性大腸菌の事例

事例概要を表 4 に、PFGE 法解析結果を図 4 に示した。

有症者、従事者とも PFGE 法の類似度が 99% と高かった。

## D. 考察

O157 の事例 2、事例 5 の家族内発生では IS コードが一致し、図 1 の PFGE 法の類似度が 100% であり、感染研の解析でも 3 バンド以内であることから家族間で感染したものと考えられる。

表 2 事例 8 の O26 については、感染研の解析で全株同じ PFGE 型であったことより同じ保育園内で幼児が感染し 2 家族で家族内感染を起こした事例である。幼児から家族へ感染が広がっており、今後、幼児の感染防止対策、家族間の感染防止対策の啓蒙が必要である。

表 2 事例 11 の O146 については、無症状で、職員定期健診で発見された事例である。昨年同じ施設で検出された株との PFGE 法の類似度が高く、感染研の解析でも昨年の株と 2 バンド違いであった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。

今年より Multiplex PCR 法で下痢原性大腸菌の病原因子が検出できるようになり毒素原性大腸菌 O159 による食中毒を検出した。PFGE 法の類似度が高いことより同一感染源と推定されるが、同一職場内の従事者と有症者は同じ弁当を喫食していたので原因の特定には至らなかった。

## 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 法でもパターンが類似していたため同一感染源と推定された。

2. O26 の保育園内、家族内発生においては PFGE 法でパターンが同じであり同一感染源と推定された。

3. O146 の発生において昨年同一職場で発生した O146 株と 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。

4. 毒素原性大腸菌 O159 の同一職場内の感染では 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

## 参考文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター第 5 室 (国立保健医療科学院併任 伊藤健一郎):平成 23 年度新興再興感染症技術研修 遺伝子検査法, 3-33, 2011
- 2) 国立感染症研究所細菌第一部 (主任研究者 寺嶋 淳):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 17 年度総括・分担研究報告書及び平成 15~17 年度総括・総合研究報告書, 168 - 185, 2005

表1 O157 事例概要と IS 法結果

事例	菌株No. (EH13-)	発生日	年齢	菌株の由来	VT型	H抗原	IS-printing コード 1st	IS-printing コード 2nd	感染研 PFGE型
1	1	7月	0-4才	患者	VT1+VT2	7	717557	611657	i317
2	2	7月	5-9才	患者	VT1+VT2	7	317577	611557	i319
	12	7月	30才代	保菌者(家族)	VT1+VT2	7	317577	611557	three bands differ. from i319
3	14	9月	50才代	患者	VT1+VT2	7	317557	611657	i63
4	15	9月	0-4才	患者	VT1+VT2	7	517557	611657	i578
5	17	9月	30才代	患者	VT1+VT2	7	317577	211757	i491
	20	9月	10才代	保菌者(家族)	VT1+VT2	7	317577	211757	i491
6	19	9月	10才代	患者	VT1+VT2	7	317557	211757	h461
7	21	10月	40才代	患者	VT1+VT2	-	111457	300447	i581

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

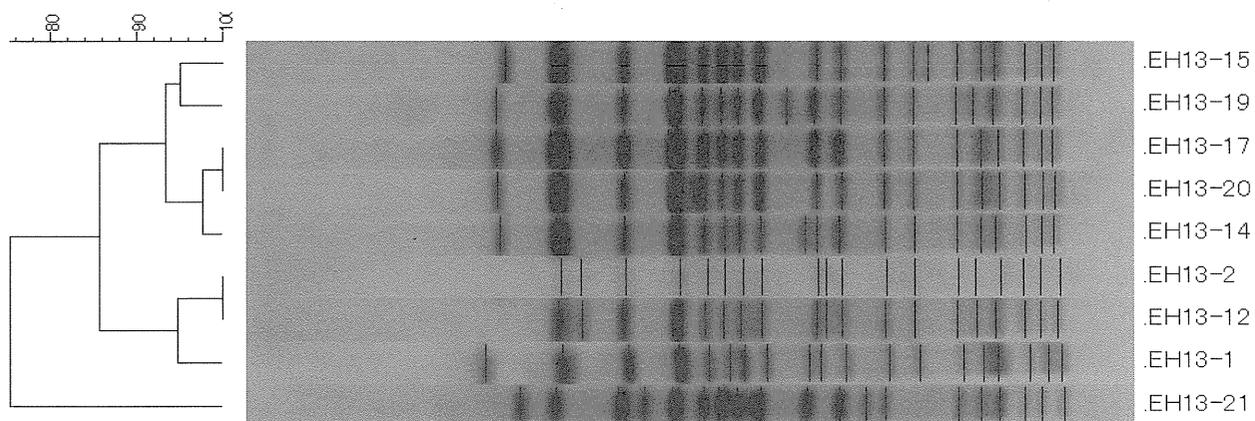


図1 O157 PFGE 法結果

表2 O157以外の腸管出血性大腸菌の血清型事例概要

事例	菌株No. (EH13-)	血清型	発生日	年齢	菌株の由来	VT型	感染研 PFGE型
8	3	O26:H11	7月	0-4才	患者	VT1	i69
	4			0-4才	患者		same as i69
	5			60才代	保菌者(家族)		same as i69
	6			0-4才	患者		same as i69
	7			0-4才	患者		same as i69
	8			0-4才	患者		same as i69
	9			40才代	保菌者(家族)		same as i69
	10			30才代	保菌者(家族)		same as i69
	11		20才代	保菌者(家族)	same as i69		
9	13	O165:H-	8月	20才代	患者	VT2	
10	16	O119:H-	9月	50才代	保菌者	VT1	
11	18	O146:H21	9月	60才代	保菌者	VT1+VT2	two bands differ. from EH12-3
12	22	O111:H-	11月	0-4才	患者	VT1	
13	23	O168:H-	12月	40才代	患者	VT2	

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

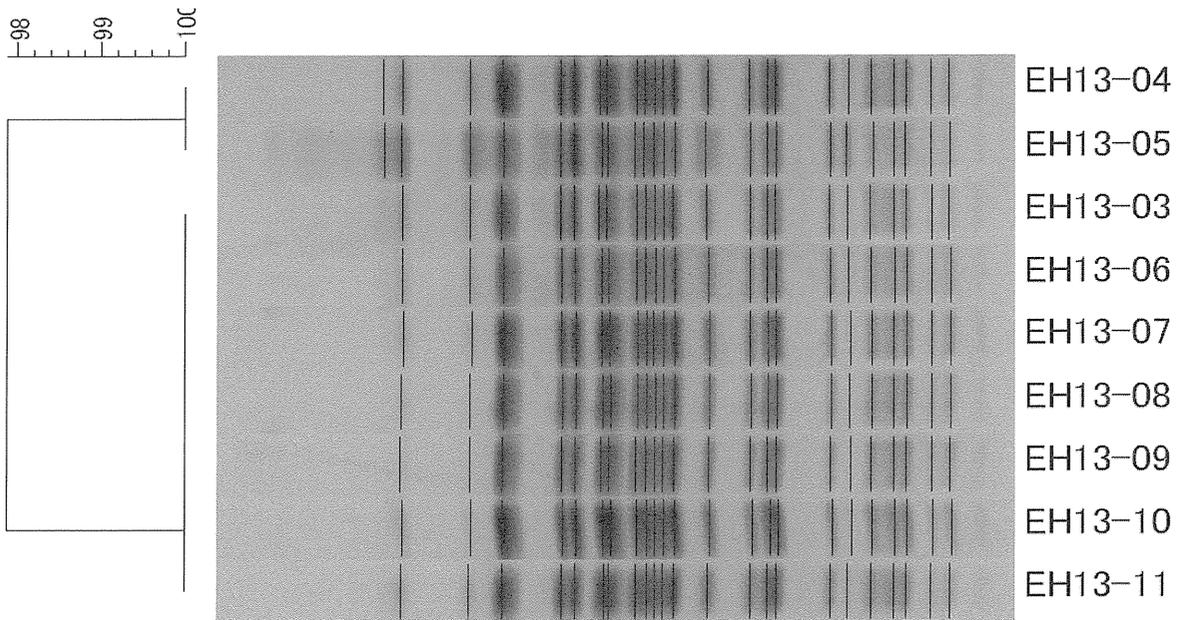


図2 O26 PFGE法結果