

F. 研究発表  
なし

G. 参考文献

1) 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

表 1 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	466
		R	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG		
	EHC-1	F	VIC GTGCGTAACCTGCTGGCACA	6	75
		R	CGCGGCTGCCGGAGTATC		
	EHC-2	F	VIC CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	6	214
		R	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT		
EHC-5	F	NED ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	6	109	
	R	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTC			
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		

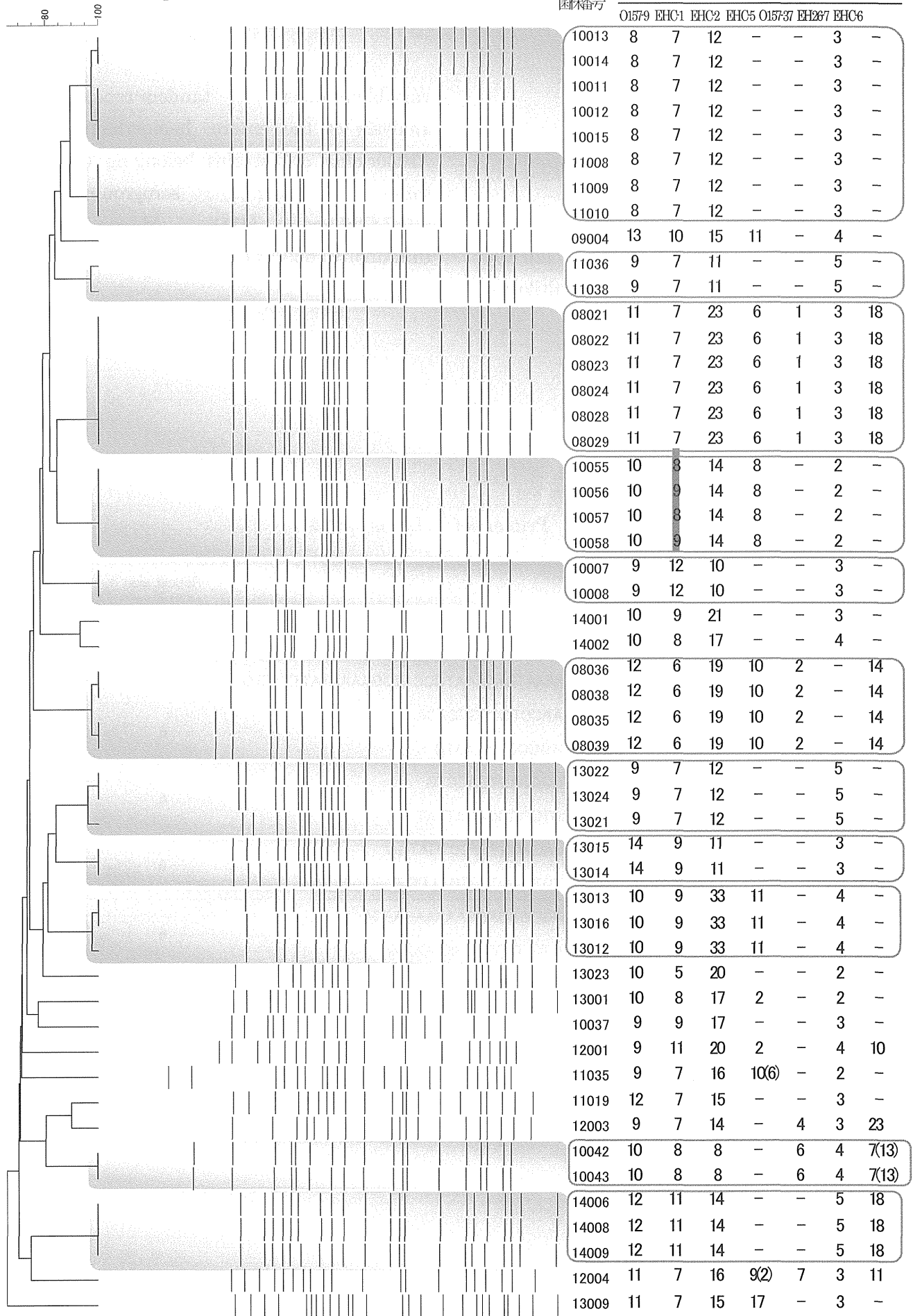


図1 2008~2014年VT1産生EHEC O26:H11分離菌株のPFGEクラスターとMLVA RN

(-; PCR産物なし, ( ); 解析において二つのピークを検出したものの内、低ピーク側の値)

## 2014年に山口県内で多発した腸管出血性大腸菌 O26 感染症の分子疫学的解析

研究協力者 山口県環境保健センター

亀山光博 矢端順子 野村恭晴 富永 潔

### 研究要旨

2014年8月～12月に、39例の腸管出血性大腸菌 O26 による感染症が発生した。保育所等での集団発生が3件(事例 A～C)、家族内感染事例が2件(事例 D、E)及び散発事例1件(事例 F)であり、分離株の血清型、毒素型はすべて O26:H11 VT1 であった。6事例はすべて異なる地域での発生であったが、発生時期が重なる事例もあったため、当所で制限酵素 *Xba*I 処理によるパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)解析を実施した。また、分離菌株を国立感染症研究所に送付し、multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)解析を依頼した。

PFGE 及び MLVA 解析により、集団事例3件(事例 A～C)及び散発事例1件(事例 F)はそれぞれ由来の異なる株による感染であったと考えられた。一方、事例 D と E の家族内事例2件由来4株については、全株が同一 PFGE パターンを示し、MLVA 解析では3タイプみられたものの、2領域異なるのみであったため、2事例は近縁株による感染の可能性が示唆された。

PFGE 法は優れた型別能を有するが、迅速性に欠けるという欠点がある。本調査では、MLVA は PFGE 法と同等あるいはそれ以上の型別能を示し、かつ迅速に結果が得られることから、今回のように県内各地で感染が相次いだ場合の迅速な疫学調査のためには、非常に有用な解析手法であると考えられた。

### A. 研究目的

2014年において、山口県内では57例の腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症が発生した。このうち、39例が血清群 O26 によるものであり、血清型及び毒素型は全株が O26:H11 VT1 (以下、O26)であった。発生時期は8月～12月に集中しており、5ヶ月間という短期間に多発したことから、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)の2種類の分子疫学的手法を用い、O26 分離株の遺伝的関連性を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

2014年8月～12月に山口県内で発生した症例由来 O26 計39株を供試した。

#### 2. 解析方法

##### (1) PFGE 解析方法

厚生労働科学研究補助金 新興・再興感染症研究事業「食品由来感染症の細菌学的疫学指標のデータベース化に関する研究」平成15～17年度総括・総合研究報告書(主任研究者 寺嶋淳)に記載されている九州ブロックマニュアルに従って実施した。制限酵素は *Xba*I(Roche)を用い、泳動装置は

CHEF-Mapper (Bio-Rad)を使用した。得られた PFGE パターンは BioNumerics ver. 7.1 (Applied Maths) により解析し、UPGMA 法によりデンドログラムを作成した。

## (2) MLVA 解析方法

国立感染症研究所細菌第一部に分離菌株を送付し、解析を依頼した。なお、同一事例内で複数の MLVA タイプが検出された場合は、各領域のリポート数を確認した。

## C. 研究結果

### 1. 事例概要

2014 年の山口県内での O26 感染症は、保育所または託児所での集団発生が 3 例(事例 A~C)、家族内感染事例が 2 例(事例 D、E)及び散発事例が 1 例(事例 F)であった。各事例の概要を表 1 に示す。

[事例 A] : 2014 年 8 月に、U 保健所管内の保育所①において、園児 2 名(有症)及びその家族 1 名(無症状)から O26 が検出された(14Y06~14Y08)。その後、9 月中旬になって、2 名の園児から O26 が検出された(14Y14, 14Y16)。なお、14Y06 と 14Y16 は同一人物から分離されたものであり、菌陰性化が確認された後に再度検出された。

[事例 B] : 2014 年 10 月~11 月に、I 保健所管内の託児施設において、感染者 8 名の O26 集団感染症が発生した(14Y25~14Y32)。

[事例 C] : 2014 年 11 月に、HG 保健所管内の保育所②において、園児 4 名を含む感染者 6 名の O26 集団感染が発生した(14Y35~14Y40)。一旦終息したかにみえたが、11 月下旬~12 月にかけて、園児 9 名及びその家族 6 名から O26 が検出された(14Y43~14Y57)。なお、11 月に発症した園

児(14Y38)については、12 月になって再度 O26 が検出された(14Y47)。

[事例 D] : 2014 年 9 月に、HF 保健所管内の下痢等を呈した小学生 1 名及びその家族 1 名から O26 が検出された(14Y21、14Y22)。

[事例 E] : 2014 年 11 月、SI 保健所管内の保育園に通う兄弟 2 名が水様性下痢等を発症し、O26 が検出された(14Y41、14Y42)。

[事例 F] : 2014 年 8 月に、腹痛、水様性下痢を呈し、医療機関を受診後、O26 が検出された(14Y10)。

### 2. PFGE 解析結果

事例 A~F の 37 名由来 39 株について PFGE 解析を実施し、作成したデンドログラムを図 1 に示す。39 株は 6 パターンに型別された(P26-1~P26-6)。事例 A、C~E の 4 事例については、各々の事例で分離株は同一の PFGE パターンを示した。事例 B の 8 株には P26-2(2 株)と P26-3(6 株)の 2 パターンみられたが、1 バンド異なるのみであり、類似度は 97.9%であった。また、事例 D と E の 2 つの家族内感染事例は同一 PFGE パターンを示した。

### 3. MLVA 解析結果

国立感染症研究所に依頼した MLVA 解析結果を図 1 及び表 2 に示す。供試した 39 株は 11 の MLVA タイプに型別された。このうち、事例 A の 5 株及び事例 E の 2 株は、それぞれ同一タイプを示した(13m2123 及び 14m2126)。事例 B には 14m2104(6 株)、14m2127(1 株)及び 14m2128(1 株)の 3 タイプが認められたが、14m2127 及び 14m2128 は 14m2104 とそれぞれ 1 領域が異なるのみであり、3 タイプは同一の complex を形成した(14c071)。

事例 C にも 3 タイプ認められ、主タイプは 13m2040 で 18 株、また主タイプと 2 領域異なる 14m2125 が 2 株、1 領域異なる 14m2147 が 1 株であった。また事例 D の 2 株は 2 領域異なるタイプを示した (14m2101 及び 14m2106)。なお、同一 PFGE パターン(P26-5)を示した事例 D と事例 E において、事例 E の 14m2126 は事例 D の 14m2101 と 2 領域異なるのみであった。

#### D 考 察

本県における過去 7 年間(2007 年～2013 年)の O26 感染症の事例数(分離株数)は、順に 0 件、1 件(1)、2 件(21 株)、2 件(4 株)、2 件(4 株)、0 件及び 1 件(1 株)であった。過去 7 年間と比較して 2014 年は 6 件、39 株と事例数、分離株数ともに圧倒的に多かった。2014 年の 6 事例については、発生時期が重なっていた事例はあるものの、発生場所はそれぞれ異なっており、管轄保健所も異なっていたため、事例間の疫学的な関連については調査されていなかった。このため、分離株の遺伝学的近縁性を分子疫学的手法により明らかにし、事例間の関連性を検討した。

事例 A～C は保育所や託児所での集団発生事例であった。保育所等における O26 の集団感染は、全国的にその発生頻度は高い。一方、県内では 2009 年に 1 件(感染者約 20 名)の発生があったものの、1 年に 3 件もの発生は過去に例がない。近縁株による感染の可能性を疑い、分子疫学的解析を実施したが、PFGE パターン及び MLVA タイプともに事例ごとで異なっていた。このことから、3 事例は同一由来株による diffuse outbreak ではなく、異なる系統の O26 による集団感染が別々に発生したもの

と推察された。

事例 D と E の計 4 株の PFGE パターンは完全に一致し、MLVA 解析では 3 タイプ (14m2101、14m2106 及び 14m2126)が認められた。このうち、事例 D の 14m2101 と事例 E の 14m2126 は 2 領域が異なるのみであった。2 法の結果では事例 D と E の間に関連性が疑われたが、発生時期はそれぞれ 9 月と 11 月、発生場所は県中部と県西部であり、時期的、地理的にも異なっていた。これらのことから、事例 D と E については疫学的な関連は明らかではないが、近縁株による流行であった可能性が示唆された。

制限酵素 *Xba*I 処理による PFGE 法及び MLVA を実施した結果、供試した 39 株は PFGE 法で 6 パターン、MLVA で 11 タイプに型別され、MLVA の方がより詳細に解析可能であることが判明した。各事例において、PFGE パターンは一致あるいは 1 バンド異なるのみであり、MLVA タイプは一致または 1～2 領域が異なるのみであった。本 MLVA 法を開発した Izumiya らは、EHEC 血清群 O26 または O111 の集団発生調査において、MLVA は PFGE 法と同等の結果を示したと報告しており<sup>2)</sup>、本調査においても MLVA の有用性が再確認された。

PFGE 法は株間の型別能の点では優れているが、迅速性に欠けるという欠点がある。また集団発生時には有効であると考えられるが、散発事例、あるいは今回の事例 D や E のような 2 例程度の家族内感染事例発生時に、常時 PFGE 解析を行う体制を構築することは難しい。この点、MLVA や血清群 O157 の IS-printing 法は迅速性及び簡便性の点では PFGE よりも優れている。近年、O26 についても IS621 をタイピングする方

法が開発され<sup>3)</sup>、実際に他の衛生研究所等で導入が検討されている。島根県保健環境科学研究所の榎本らは、O26による集団発生や家族内感染事例について、IS-printing法が有効であったと報告している<sup>4)</sup>。しかし、我々が以前報告<sup>5)</sup>したように、いずれかの方法を単独で実施した場合、由来の異なる株を同一由来と判断してしまう恐れがあるため、複数の手法を併用して解析を実施する必要がある。現在、MLVA解析は国立感染症研究所に依頼しているが、今後は保健所等の行政機関に迅速に情報提供を行うために、MLVA等の解析手法を当所にも導入し、PFGE法と並行して実施していく必要があると考えられた。

#### E 結論

1. 2014年に山口県内で発生したO26による3件の集団発生、2件の家族内感染事例及び1件の散発事例については、2件の家族内事例を除き、由来の異なる株による感染であったと考えられた。家族内感染事例2件については、事例間の疫学的関連は不明であったものの、近縁株による流行の可能性が示唆された。

2. MLVAは型別能が高く、かつ迅速に結果が得られることから、O26についてもMLVAを当所に導入し、迅速に情報提供ができるシステムを構築していく必要がある。

#### F. 研究発表 なし

#### G. 参考文献

- 1) 病原微生物検出情報(IASR) 33:126-127 (2012)
- 2) Izumiya, H. et al. Microbiol. Immunol.54:569-577 (2010)
- 3) Mainil, J. G. et al. J App. Microbiol. 111:773-786 (2011)
- 4) 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 135-138 (2013)
- 5) 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 153-164 (2013)

表1 2014年に発生したO26感染症事例の概要

事例No.	発生施設等	発生地域	発生時期	感染者数			菌株No.
				有症	無症状保菌	計	
A	保育所①	県西部	8-9月	園児	3	1	4 (有症)14Y06*, 14Y08, 14Y14 (保菌)14Y16*
				家族	0	1	1 (保菌)14Y07
				計	3	2	5
B	託児施設	県東部	10-11月	児童	5	0	5 (有症)14Y25~14Y29
				家族	1	2	3 (有症)14Y32 (保菌)14Y30, 14Y31
				計	6	2	8
C	保育所②	県北部	11-12月	園児	5	8	13 (有症)14Y37, 14Y38**, 14Y44-14Y46 (保菌)14Y35, 14Y36, 14Y47**, 14Y48-14Y52
				家族	0	8	8 (保菌)14Y39, 14Y40, 14Y43, 14Y53-14Y57
				計	5	16	21
D	家族内①	県中部	9月		1	1	2 (有症)14Y21 (保菌)14Y22
E	家族内②	県西部	11月		2	0	2 (有症)14Y41, 14Y42
F	散発	県中部	8月		1	0	1 (有症)14Y10

\*14Y06と14Y16は同一人物から分離(事例A)

\*\*14Y38と14Y47は同一人物から分離(事例C)

表2 事例別PFGEパターンとMLVAタイプ

事例No.	分離株数	PFGE パターン (株数)	MLVA タイプ (株数)	備考
A	5	P26-1 (5)	13m2123 (5)	
B	8	P26-2 (2)	14m2104 (1)	
			14m2128 (1)	14m2104と1領域異なる
			P26-3 (6)	14m2104 (5) 14m2127 (1)
C	21	P26-4 (21)	13m2040 (18)	
			14m2125 (2)	13m2040と2領域異なる
			14m2147 (1)	13m2040と1領域異なる
D	2	P26-5 (2)	14m2101 (1)	
			14m2106 (1)	14m2101と2領域異なる
E	2	P26-5 (2)	14m2126 (2)	*事例Dの14m2101と2領域異なる
F	1	P26-6 (1)	14m2099 (1)	

2014 O26 (39 entries)

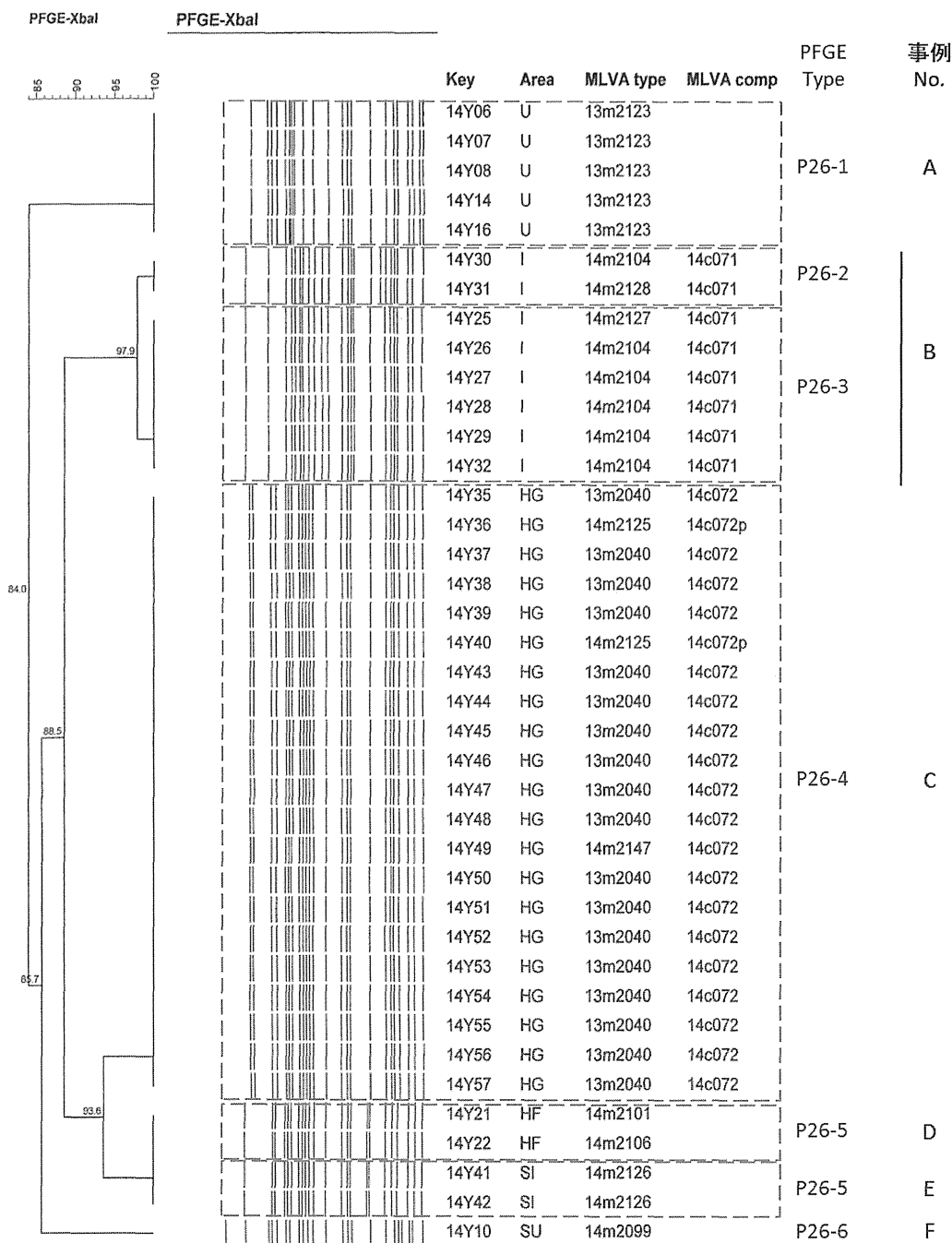


図1 O26 計39株のPFGEパターンに基づき作成したデンドログラム



## 徳島県で発生したカンピロバクター属菌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 小山 絵理子 嶋田 啓司

### 研究要旨

2014年に徳島県内で発生したカンピロバクター属菌2事例から Penner 血清型が D 群と市販血清には該当しない血清型の *Campylobacter jejuni* が分離された。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。血清型が該当しない血清型 (UT) の場合には PFGE パターンが疫学解析において有用な情報となった。

### A. 研究目的

カンピロバクター属菌は食中毒や感染性胃腸炎の主要な原因菌であり、県内における食中毒ではノロウイルスに次いで2番目に多い。食中毒の原因究明において菌株間の比較は重要な情報となるが、カンピロバクター属菌も他の細菌と同様にパルスフィールド電気泳動法(以下 PFGE)によって分子疫学的に解析することができる。

そこで、2014年度に県内で発生した食中毒および有症苦情事例において分離されたカンピロバクター属菌について、PFGE 法による分子疫学解析を実施し疫学関連性について検討したので報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 供試菌株

2014年に食中毒事例、有症事例から分離したカンピロバクター属菌13株を用いた。

#### 2. 血清型別

カンピロバクター属菌について馬尿酸加水分解試験を実施し、陽性を示した菌株を *Campylobacter jejuni* と同定し、市販キットのカンピロバクター免疫血清

「生研」(デンカ生研)を用いて Penner 型別を行った。その際、いずれの抗血清にも凝集しなかった場合は UT(untypable)とした。

### 3. PFGE 解析

トリプトソーヤ寒天培地で培養した菌を PBS に Mc5 になるように調整し、1% Seakem Gold Agarose で包埋し、ProtenaseK で処理後、PefablocSC で不活化した。その後、制限酵素 SmaI で 30°C, 2 時間処理し泳動プラグとした。6.0V/cm 6.8~38.4 秒で 19 時間泳動を行い、解析は BioNumerics を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. 事例の概要

(事例 A) 同一の飲食店を利用した 2 グループ 35 名のうち、飲食店従事者および下痢、腹痛等の食中毒様症状を呈した 11 名のうち 9 名からカンピロバクター属菌が分離された。

(事例 B) 同一の飲食店を利用した 1 グループ 24 名のうち、飲食店従事者および下痢、腹痛等の食中毒様症状を呈した 7 名のうち 4 名からカンピロバクター属菌が分離された。

## 2. 血清型別

事例 A、事例 B の 13 名から分離された 13 株について、馬尿酸加水分解試験を実施したところ、すべて陽性を示したので、*Campylobacter jejuni* と同定した。

次に、Penner の血清型では、事例 A では、D 群が 4 株、UT が 5 株、事例 B では、I 群が 1 株、UT が 3 株であった。(表 1)

## 3. PFGE 解析

図 1 に、PFGE 解析結果を示した。

事例 A では、血清型が D 群であった 4 株の PFGE パターンは、2 つのパターンを示したが 1 バンドの違いであった。血清型が UT であった 5 株の PFGE パターンも、2 つのパターンを示したが 1 バンドの違いであった。

事例 B では、血清型が UT であった 3 株のうち 2 株は同一の PFGE パターンを示し、残り 1 株とは全く異なっていた。血清型が I 群であった株は、他の株の PFGE パターンとは全く異なっていた。

## D 考 察

事例 A の分離株は、Penner の血清型別の結果で、D 群と UT の 2 つの血清型に型別された。さらに、PFGE を実施したところ、各血清型において、PFGE パ

ターンは完全一致または 1 バンド差であり、患者及び従事者は同一由来株と推測された。

事例 B の分離株は 3 株が UT となったが、患者由来 2 株の PFGE パターンは一致し、同一由来株と推測されたが調理従事者由来株の PFGE パターンとは異なっており、患者と調理従事者では由来が異なることが推測された。

いずれの事例においても提供した食品が残っていなかったため、原因の特定には至らなかったが、血清型が UT である *Campylobacter jejuni* の場合、さらに解析する方法の一つとして PFGE 法は有効であり、疫学調査を裏付ける科学的根拠の一つとして活用できることが示唆された。

## E 結 論

1. 食中毒事例から分離されたカンピロバクター属菌について、PFGE 法を実施し分子疫学解析を行った。
2. カンピロバクター属菌による事例では、血清型が UT となる場合には PFGE 法がさらに解析する方法として有用であった。

## F. 研究発表

なし

表 1 各事例から分離された菌株の血清型別

No.	事例	由来	血清型
1	A	患者 グループ 1	D 群
2		患者 グループ 1	D 群
3		患者 グループ 1	D 群
4		患者 グループ 1	UT
5		患者 グループ 2	UT
6		患者 グループ 2	UT
7		患者 グループ 2	UT
8		従事者 ホール係	D 群
9		調理従事者	UT
10	B	患者	UT
11		患者	UT
12		調理従事者	UT
13		調理従事者	I 群

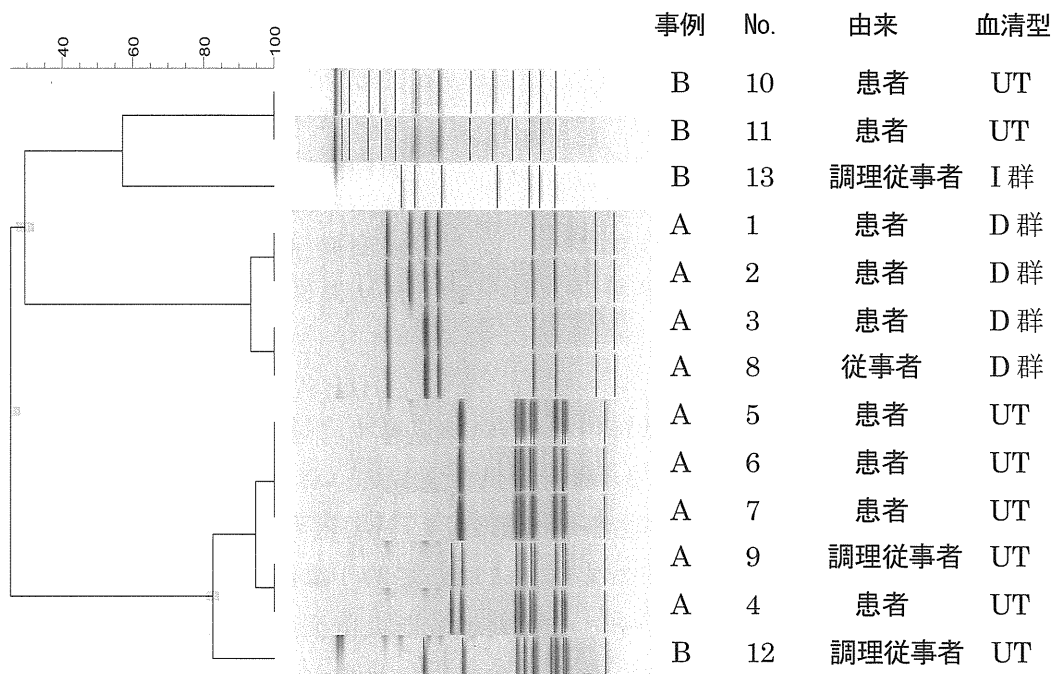


図 1 各事例から分離された菌株の系統樹

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）

「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」

平成 26 年度分担研究報告書

九州地区におけ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  
—IS 型別データベースの運用、EHEC 検出状況、精度管理（ISPS、PFGE）及び  
集団発生事例の解析—

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所
研究分担者	世良暢之	福岡県保健環境研究所
研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	藤田景清	北九州市環境科学研究所
	吉武俊一	佐賀県衛生薬業センター
	浦山みどり	長崎県環境保健研究センター
	江原裕子	長崎市保健環境試験所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	古川真斗	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
	黒木真理子	宮崎県衛生環境研究所
	穂積和佳	鹿児島県環境保健センター
	高良武俊	沖縄県衛生環境研究所
	村上光一	福岡県保健環境研究所
	西田雅博	福岡県保健環境研究所
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所
	岡元冬樹	福岡県保健環境研究所

## 要旨

九州地区では、1. IS-printing System（以下、ISPS とする）による IS 型別データベースの運用、2. 腸管出血性大腸菌（以下、EHEC）検出状況の解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. 精度管理（ISPS、PFGE）及び 5. 集団発生事例の詳細な解析の 5 項目について取り組んだ。5. 集団発生事例の詳細な解析については、それぞれの地方衛生研究所（以下、地衛研）から、(1) 幼稚園で集団発生した細菌性赤痢の状況（北九州市環境科学研究所）、(2) 非典型的な生化学的性状を示す腸管出血性大腸菌 0111 の集団感染事例（沖縄県衛生環境研究所）の 2 事例について、別途報告する。

九州地区における腸管出血性大腸菌 0157（以下 0157EHEC）の IS 型別の

登録数は平成 26 年 12 月現在で 1194 件（平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件及び平成 26 年度 203 件）であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。九州地区で平成 26 年度に収集された EHEC は 549 株であった。その内訳は、O157EHEC が 255 株、O26EHEC が 141 株、O111EHEC が 75 株、O103EHEC が 40 株、O121EHEC が 10 株、O145EHEC が 7 株、その他の血清型が 20 株及び血清型別不能が 1 株であった。九州地区は非 O157EHEC の占める比率が 53.4%であり、本研究で O157EHEC に加えて非 O157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。平成 26 年度の O157EHEC 及び 非 O157EHEC による集団発生事例は 15 事例であった。その内訳は、O157EHEC によるものが 7 事例で、非 O157EHEC によるものは 8 事例で、O26EHEC によるものが 4 事例、O111EHEC によるものが 2 事例、O103EHEC によるものが 2 事例であった。精度管理では例年行っている ISPS と併せて、PFGE についても今回初めて実施した。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数で、全 4 株一致した地衛研はなかった。バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

#### A. 研究目的

食中毒や感染症等の緊急事例発生時には、科学的根拠に基づいた感染源及び感染経路を解明し、原因究明や拡大防止等の行政対応をすることが求められる。科学的根拠としては、有症者、調理従事者及び推定原因食品等から分離された病原細菌について、分子疫学的手法を用いて関連性を鑑別することが最も一般的である。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法として汎用されているパルスフィールド・ゲル電気泳動法（以下、PFGE 法）は、国立感染症研究所（以下、感染研）を中心に全国規模の PFGE 型別データベースの構築が進んでいる。平成 26 年度からは、O157EHEC、O26EHEC 及び O111EHEC に対しては、迅速性と分解能の両立を目指した遺伝子型別解析方法として、Multiple-locus variable

number tandem repeat analysis (MLVA) により情報還元が開始された。九州地区では、従来からの PFGE 法と比較して操作が簡便で迅速性に優れ、デジタル結果が得られるといった特徴がある IS 型別データベースを構築し、菌株識別のためのデジタル情報の共有、流行菌株の探知及び監視等を目的に研究を実施している。また、EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例についても集約し、解析している。

#### B. 研究方法

ISPS は、IS-printing system（東洋紡（株））を用い、取扱い説明書に従って実施した。IS 型別は、IS の分布に由来する 32 の増幅バンド（No. 1-01～1-16/2-01～2-16）及び病原性関連遺伝子（*stx*<sub>1</sub>、*stx*<sub>2</sub>、*eae* 及び EHEC-*hlyA*）

の合計 36 種の遺伝子の検出の有無を 1 及び 0 の 2 進数で置き換えた後、10 進数に再変換した 11 桁の整数として数値化した。

EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例の集約については、メールを利用したエクセルデータ等のやりとりにより実施した。

ISPS については、平成 25 年度に配分した「IS-printing 電気泳動マニュアル (案) -九州パルスネット ver.-」により実施した。PFGE については各地衛研が通常行っている方法にて行った。昨年までは DNA を配布していたが、今回は PFGE を行うことから、0157EHEC 4 菌株 (A-D ; ISPS で明瞭なエクストラバンドをもつ株を含む) を参加地衛研に配布した (表 1)。

## C. 研究結果及び考察

### 1. IS 型別データベースの運用

ここでは平成 22 年 4 月から平成 26 年 12 月までの IS 型別の登録状況等について解析したものを報告する。

九州地区における 0157EHEC の IS 型別の登録数は平成 26 年 12 月現在で 1194 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件及び平成 26 年度 203 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移している (表 2)。

平成 22~26 年度に登録された 1194 株の 0157EHEC の IS 型別は 241 型に分類され、4 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 12 型 (5.0%) でそれに属する株は合計 534 株 (44.7%) であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 102 株 (8.5%) が 11 地衛研から、登録された (表 3)。また、5 年間で 20 株以下しか登録が無い 0157EHEC の IS 型別

は 229 型 (95.0%) で、それに属する株は合計 660 株 (55.3%) で、その内訳は 11~20 株登録されている 0157EHEC の IS 型別が 9 型、6~10 株の登録が 17 型、5 株以下の登録が 203 型、そのうち 1 株だけ登録されている 0157EHEC の IS 型別が 123 型と最も多かった。

ISPS は操作が簡便で迅速性に優れた特徴を有する一方で、PFGE 型別が同一で IS 型別が異なる株等も報告されていることから、ISPS の精度管理等で解析能力の向上に努める必要がある。ISPS の実施は、人的及び予算的問題、PFGE 法の実施等を考慮し、効率的な運用という観点から、各地衛研において判断され、実施されていると考えられた。

### 2. 九州地区での EHEC 検出状況

九州地区の地衛研における EHEC の 0 群血清型別の検出状況について解析した。

九州地区 12 地衛研にて平成 26 年 4 月から 12 月までに 549 株の EHEC 菌株が収集され (表 4)、その内訳は 0157EHEC が 255 株 (46.4%)、非 0157EHEC が 293 株 (53.4%) 及び 0 群血清型別不能 EHEC が 1 株であった。非 0157EHEC は 16 種類の 0 群に型別され、その内訳は 026EHEC が 141 株 (25.7%)、0111EHEC が 75 株 (13.7%)、0103EHEC が 40 株 (7.3%)、0121EHEC が 10 株 (1.8%) 及び 0145 EHEC が 7 株 (1.3%) などの順であった。九州地区で収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC、0121EHEC 及び 0145EHEC などで、全体の 9 割を占めている。九州地区は本研究で 0157EHEC に加えて非 0157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。

### 3. EHECによる集団発生事例数

平成26年度のEHECによる集団発生事例は15事例であった(表5)。その内訳は、0157EHECによるものが7事例で、非0157EHECによるものは8事例で、026EHECによるものが4事例、0111EHECによるものが2事例、0103EHECによるものが2事例であった。発生場所別に見ると、15事例中12事例(80.0%)が保育園関連であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。これらの集団発生事例のうち、「非典型的な生化学的性状を示す腸管出血性大腸菌0111の集団感染事例(沖縄県衛生環境研究所)」は、別途報告する。

### 4. 精度管理(ISPS、PFGE)

昨年と同様にISPSの精度管理を、九州ブロック12地衛研を対象に実施した。併せてPFGEの精度管理も同10地衛研で行った。AとBはPFGEが同一でISPSが異なる菌株、Cは無作為に選択した菌株、DはISPSにおいて1stセットの1-02と1-03の間、及び、1-14と1-15の間にエクストラバンドが現れる株を選択した。しかし、送付したAのPFGEパターンが変化(バンドが1本増加)していたため、AとBを同一パターンとして各地衛研で判定出来るか、今回は判断できなかった。

ISPSの精度管理の結果、エクストラバンドのないA-Cについては全施設で正しく判定された。しかし、2つのエクストラバンドを含むDについては、3地衛研で誤判定がみられた(図1)。ゲル上部(1-02・1-03間)のエクストラバンドについては、定規等を利用して判定を行うことで、正確に判定できると考えられた。一方、下部のエクストラバンド(1-14・1-15間)については、1-15のバンドと重なるため、注意深く判定を行う必要

がある。また、ポジティブコントロールを設定していない施設が2施設あった。ISPSには、何らかの不具合があると増幅されないバンド(1-06、2-09)があるため、試験毎にポジティブコントロールを設定することが望ましい。

一方、今回実施のPFGEについては、泳動は概ね良好に行われていたが(図2.1-4)、地衛研12はバックグラウンドに薄いバンドが見られた。サンプルプラグの作成過程において、何らかの問題があった可能性が考えられたが、これらが出現した原因は不明であった。一方、AとBのバンド本数は、それぞれ19本と18本を想定していたが、AがBのバンド数より1本多いと判定したのは、10地衛研中6地衛研だった(表6)。また、10地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった。一致しなかった原因として、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

### D. 結論

九州地区における0157EHECのIS型別の登録数は毎年200件前後の登録で推移している。平成22~26年度に登録された1194株の0157EHECのIS型別は241型に分類され、4年間で21株以上登録された0157EHECのIS型別は12型(5.0%)でそれに属する株は合計534株(44.7%)であった。最も多く登録されている0157EHECのIS型別は「66324257743」で102株(8.5%)が11地衛研から、登録された。

九州地区12地衛研にて平成26年4月から12月までに549株のEHEC菌株が収集され、その内訳は0157EHECが255株(46.4%)、非

0157EHEC が 293 株 (53.4%) 及び O 群血清型別不能 EHEC が 1 株であった。九州地区で収集される EHEC の O 群血清型の内訳に大きな変化は無く、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC、0121EHEC 及び 0145EHEC などで、全体の 9 割を占めていた。

平成 26 年度の EHEC による集団発生事例は 15 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 7 事例で、非 0157EHEC によるものは 8 事例で、026EHEC によるものが 4 事例、0111EHEC によるものが 2 事例、0103EHEC によるものが 2 事例であった。発生場所別に見ると、保育所等、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

精度管理では、例年実施している ISPS に加えて、PFGE についても今回初めて行った。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった。バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

#### E. 研究発表

1) Okamoto F, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Etoh Y, Kaida M, Makigusa M, Nakashima K, Jinnouchi Y, Takemoto H, Kakegawa H, Yamasaki C, Manabe S, Sasaki M, Ogata K, Ikebe T and Sera N.

A foodborne outbreak of group A streptococcal infection in Fukuoka Prefecture, Japan.

*Jpn J Infect Dis.* 2014;67(4):321-2

2) Maeda E, Murakami K, Etoh Y, Onozuka D, Sera N, Asoshima N, Honda M, Narimatsu H, Iyoda S, Watahiki M and Fujimoto S. Does Sequence Type 33 of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O91 Cause Only Mild Symptoms?

*J Clin Microbiol.* 2015 Jan;53(1):362-4.

3) Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, Furuta M, Onozuka D, Oda T, Asai T and Fujimoto S.

Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan.

*PLoS One* 2015 in press.



表1 精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子	IS型別
A	7E006	2007	保菌者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>	66324257743
B	7E032	2007	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>	66458474955
C	8E048	2008	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>	22081687690
D	13E079	2013	患者	O157:HNM	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>	57733470538

表2 九州地区地衛研におけるIS型別登録数

地衛研	IS型別登録数					
	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	平成26年度	合計
1	112	48	61	26	28	275
2	50	53	44	24	29	200
3	30	15	12	15	38	110
4	12	10	17	51	28	118
5	23	18	11	28	26	106
6	6	5	4	8	2	25
7	13	16	24	18	11	82
8	16	10	5	30	25	86
9	5	3	7	2	4	21
10	20	17	16	4	3	60
11	19	25	21	15	8	88
12	6	7	7	2	1	23
合計	312	227	229	223	203	1194

表3 九州地区での登録数が多いIS型別(年度別、地衛研別)

No.	IS型別	登録数																合計	
		登録年度					登録地衛研												
		22	23	24	25	26	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
1	66324257743	22	32	4	11	33	20	13	23	7	9		9	6	1	5	8	1	102
2	57733536074	3	15	23	8	16	13	14	4	12	10	5		2	1	4			65
3	56643812046	31	14	3	13	3	19	17	7	3	6	2	8			1	1		64
4	30671622280	33	11	1	7	11	31	5	3		11	3	1		1	6	2		63
5	30653010185	9	4	4	14	6	6	5	3	2	7		1	8		4		1	37
6	27384601163	26	3		7		8	1	4		8	6		2	3	2	2		36
7	57733470538		2	12	1	16	10	4		16			1						31
8	22081687688	12			2	16	9	7	8		3				2	1			30
8	66323217359	10	8	8	4		4	14	1	1			9				1		30
10	66457435083	6	2	9	10	1	9	5	3	1	1		2			3	4		28

表4 平成26年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

地衛研	O血清型別の分離菌株数																	計	
	O157	O26	O111	O103	O121	O91	O145	O183	O115	O136	O55	O128abc	O165	O124	O6	O8	O172		OUT
1	27	4		2	2	1	1		1		1		1			1		1	42
2	28	24	1	1	1	3	1												59
3	39	5					2												46
4	39	3	1	6		1	1		1	1								1	54
5	67	34	12	23				1											137
6	2																		2
7	11	4		2	1	1	1												20
8	25	31	2	1															59
9	4	1	45																50
10	4	2	1		4						1	1							13
11	8	23	8	2	2		1				1		1	1	1				48
12	1	10	5	3															19
合計	255	141	75	40	10	6	7	1	2	1	3	1	2	1	1	1	1	1	549

表5 平成26年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

地衛研	O血清型別のEHEC集団発生事例							
	O157	(概要)	O26	(概要)	O103	(概要)	O111	(概要)
1								
2	2	(高校) × 1、(保育 所) × 1	1	(保育所)				
3	1	(高齢者福 祉施設)						
4	1	(保育園)			1	(保育園)		
5	1	(保育園及 び家庭)	1	(保育園及 び家庭)	1	(保育園及 び家庭)		
6	1	(家族内)						
7								
8	1	(保育園)	1	(保育園)				
9							1	(保育所)
10								
11								
12			1	(保育園)			1	(保育園)
合計	7		4		2		2	

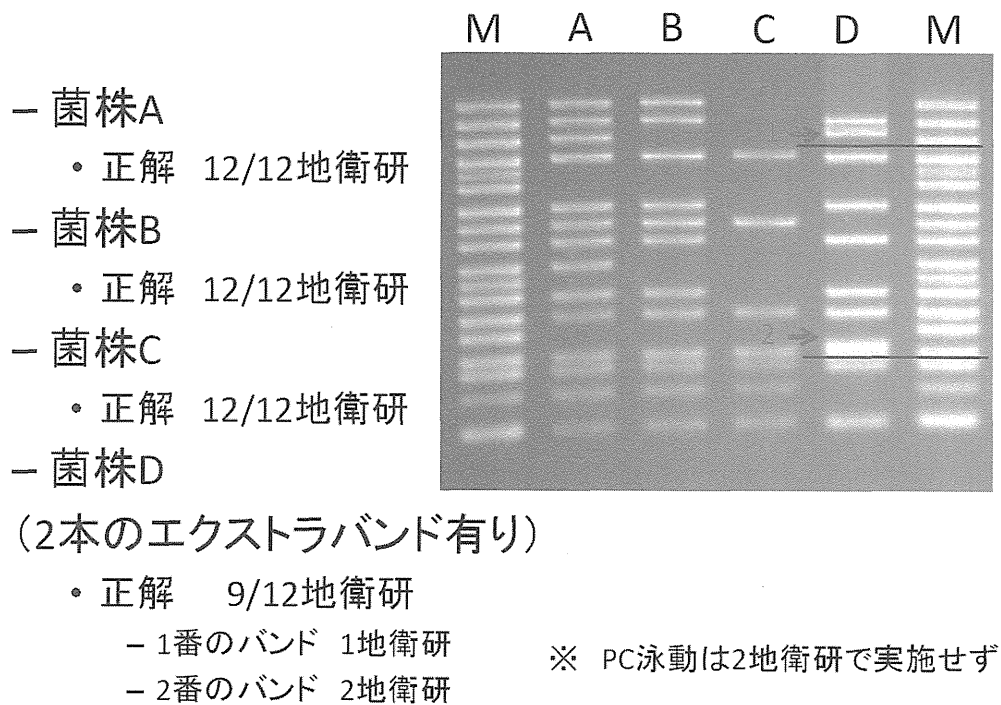


図1 ISPSの結果

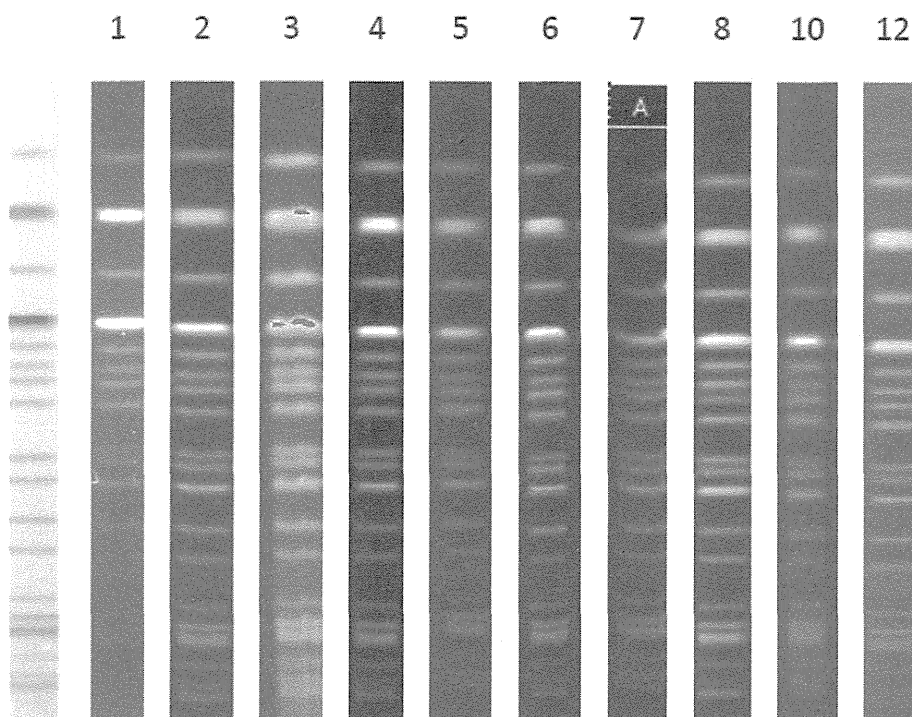


図2.1 PFGEの結果(菌株A)

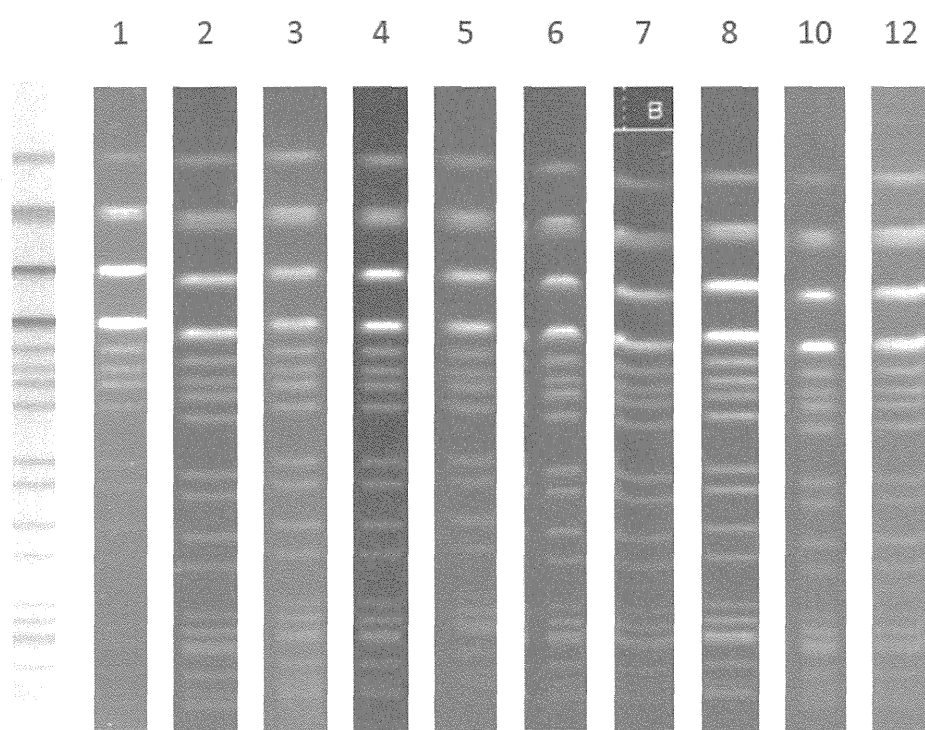


図2.2 PFGEの結果(菌株B)

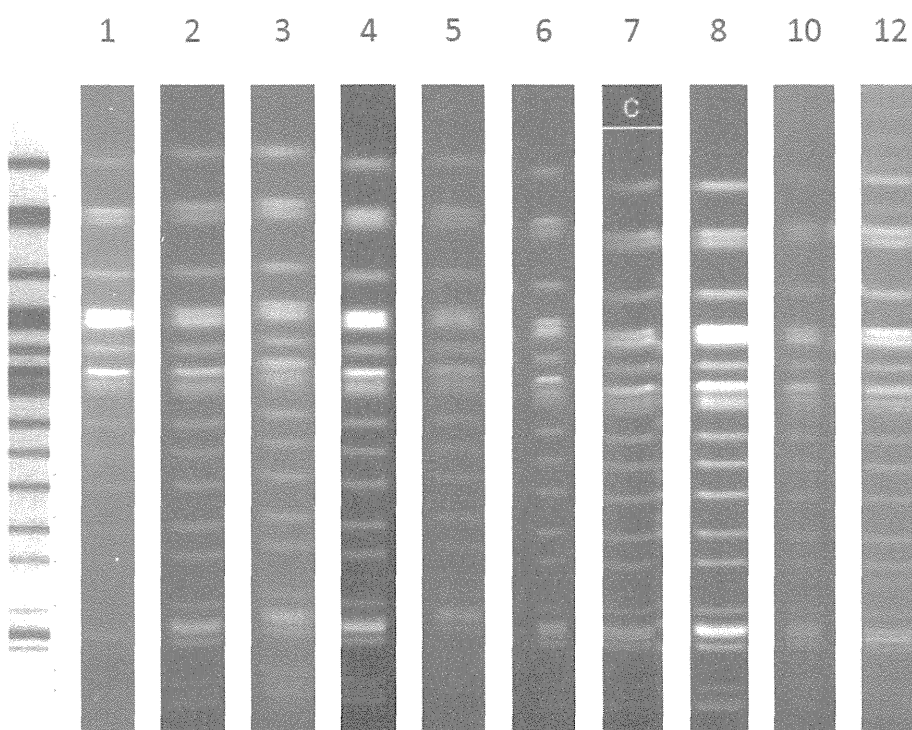


図2.3 PFGEの結果(菌株C)