

M: マーカー、SD: 泳動コントロール、P: ポジティブコントロール、
 N: ネガティブコントロール
 ①: STEC 1872, ②: STEC 1873, ③: STEC 1878,
 ④: STEC 1882, ⑤: STEC 1884

(施設C): 高分子量バンドが濃い

SD ① ② ③ ④ ⑤ P N

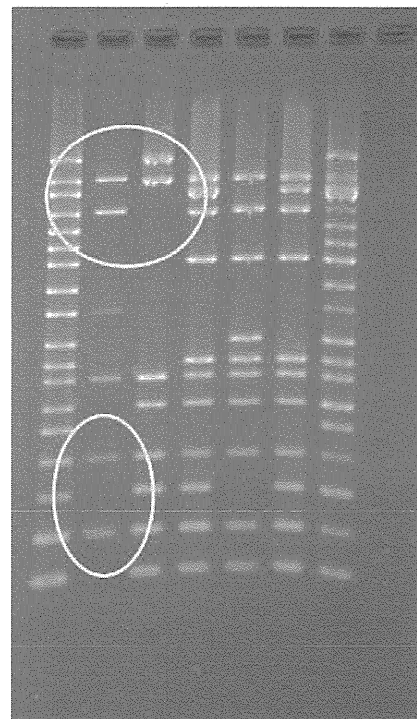


図 2-2b IS-printing system による泳動像の比較

表3 MLVA法による解析結果

| 施設 | 菌株No. | 各領域のリポート数 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|-----------|-------|-------|--------|-------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------|---------|--------|---------|
| | | O157-34 | EHC-1 | EHC-2 | O157-9 | EHC-5 | O157-3 | O157-25 | EH111-8 | EH157-12 | EH111-14 | EH111-11 | O157-17 | O157-36 | O157-19 | EHC-6 | O157-37 | EH26-7 | O157-10 |
| D | 1872 | 9 | 12 | 6 | -2 | -2 | 4 | 4 | 1 | 4 | -2 | 2 | 5 | 6 | 7 | -2 | 5 | -2 | |
| E | | 7 | | | -2 | | 4 | 4 | | | | | 5 | 6 | 7 | | 5 | | -2 |
| F | | 9 | 12 | 6 | -2 | -2 | 4 | 4 | 1 | 4 | -2 | 2 | 5 | 6 | 7 | -2 | 5 | -2 | |
| I | | 9 | 12 | 6 | 6 | -2 | 4 | 4 | 1 | 4 | -2 | 2 | 5 | 6 | 7 | -2 | 5 | -2 | |
| D | 1873 | 9 | 9 | 5 | 11 | -2 | 6 | 5 | 1 | 3 | -2 | 2 | 5 | 4 | 10 | -2 | 2 | -2 | |
| E | | 7 | | | 11 | | 6 | 5 | | | | | 5 | 4 | 10 | | 2 | | 14 |
| F | | 9 | 9 | 5 | 11 | -2 | 6 | 5 | 1 | 3 | -2 | 2 | 5 | 4 | 10 | -2 | 2 | -2 | |
| I | | 9 | 9 | 5 | 11 | -2 | 6 | 5 | 1 | 3 | -2 | 2 | 5 | 4 | 10 | -2 | 2 | -2 | |
| D | 1878 | 12 | 7 | 4 | 10 | -2 | 15 | 5 | 1 | 4 | -2 | 2 | 6 | 5 | 6 | 11 | 7 | -2 | |
| E | | 10 | | | 10 | | 15 | 5 | | | | | 6 | 5 | 6 | | 7 | | 29 |
| F | | 12 | 7 | 4 | 10 | -2 | 15 | 5 | 1 | 4 | -2 | 2 | 6 | 5 | 6 | 11 | 7 | -2 | |
| I | | 12 | 7 | 4 | 10 | -2 | 15 | 5 | 1 | 4 | -2 | 2 | 6 | 5 | 6 | 11 | 7 | -2 | |
| D | 1882 | 12 | 7 | 4 | 7 | 10 | 10 | 5 | 1 | 4 | -2 | 2 | 6 | 6 | 6 | -2 | 7 | -2 | |
| E | | 10 | | | 7 | | 10 | 5 | | | | | 6 | 6 | 6 | | 7 | | 32 |
| F | | 12 | 7 | 4 | 7 | 10 | 10 | 5 | 1 | 4 | -2 | -2 | -2 | 3 | -2 | -2 | 5 | -2 | |
| I | | 12 | 7 | 4 | 7 | 10 | 10 | 5 | 1 | 4 | -2 | 2 | 6 | 6 | 6 | -2 | 7 | -2 | |
| D | 1884 | 12 | 5 | 4 | 13 | -2 | 10 | 6 | 1 | 4 | -2 | 2 | 8 | 3 | 6 | 10 | 5 | -2 | |
| E | | 10 | | | 13 | | 10 | 6 | | | | | 8 | 3 | 6 | | 5 | | 24 |
| F | | 12 | 5 | 4 | 13 | -2 | 10 | 6 | 1 | 4 | -2 | 2 | 8 | 3 | 6 | 10 | 5 | -2 | |
| I | | 12 | 5 | 4 | 13 | -2 | 10 | 6 | 1 | 4 | -2 | 2 | 8 | 3 | 6 | 10 | 5 | -2 | |

表 4 中四国地域で同一 IS コードの株が複数の県から分離された事例(H27 年度)

| 血清型 | 毒素型 | IS-printing systemコード | | MLVA型 | MLVA complex | 菌株番号 | 発生日 | 備考 | |
|---------|---------|-----------------------|----------------|---------|------------------|------------------|--------|------------------|-----------------|
| | | 1st primer set | 2nd primer set | | | | | | |
| O157:H7 | 1,2 | 317577 | 211757 | 15m0167 | | 1900 | | | |
| | | | | 13m0114 | | EH150012 | | | |
| | | 317577 | 211756 | 13m0625 | 15c020 | 1882, 1912, 1914 | | | 1912,1914は家族 |
| | | | | | | EH150011 | | | |
| | | | | | | EH15-02 | | | |
| | | 307557 | 211457 | 15m0034 | 15c011 | 2, 3 | | | 15Y05-15Y11の接触者 |
| | | | | | | 15Y05-15Y11 | | | 家族と親戚(集発) |
| | | 717557 | 611657 | 15m0099 | 15c011 | 1926 | | | |
| | | | | | | 15m0142 | | 1878 | |
| | | | | | | 14m0512 | 15c011 | 4-6 | |
| | | 717577 | 611657 | 15m0140 | 15c032 | 1886, 1889-1899 | | 7-8月 | 施設関連 |
| | | | | | | 1884 | | | |
| | | | | | | 15m0138 | | 1885, 1887, 1888 | |
| | 15m0139 | | | | | | | | |
| | 2 | 012057 | 214442 | 15c041 | SE15001-15004 | | 4月 | 家族 | |
| | | | | | SE15014他 | | 8-9月 | 施設(集発)、家族、散発 | |
| | | | | | 14 | | | | |
| | | | | | 15Y24 | | | | |
| | | | | | SE15055 | | | | |
| | | SE15018 | | | SE15014等関連施設(集発) | | | | |
| SE15043 | | | | | | | | | |
| 114057 | 303443 | 15m0270 | 15c041 | 1918 | | | | | |
| | | | | 15m0242 | | 15Y12 | | | |
| | | | | 15m0098 | | EH15-2 | | | |

島根県における IS printing 法による腸管出血性大腸菌 O157 の 分子疫学解析の有用性の検討

研究協力者 島根県保健環境科学研究所
川上優太 川瀬遵

研究要旨

2015 年度(平成 27 年度)に、島根県内で発生した腸管出血性大腸菌 O157(以下 O157)感染症事例 6 件 24 株について、IS printing 法を実施し、事例間での疫学的関連に関連性について検討した。

IS printing 法による解析結果は、MLVA 法による結果と概ね一致し、各事例内ではほぼ同一の IS コードが得られた。疫学関連のある菌株について同じ IS パターンを示したことから、IS Printing 法は迅速、簡便に実施できる有用なサブタイピング法であると考えられた。

IS printing 法による解析結果はデジタルデータであり、簡単に比較ができるので、広域での発生の有無を比較的に迅速に探知できるシステムを構築する上でも有用であると思われる。

A. 研究目的

O157 感染症の発生時に IS printing 法を用いた分子疫学解析を行い、解析のツールとして有用であるか検討することを目的とした(表 1)。

B. 研究方法

1. 供試菌株 (表 2)

平成 27 年度中に届出のあった O157 感染症 6 事例 24 株を用いた。なお事例 C については感染者数が多く、得られた菌株が多かった(71 株)ため、優先度の高い代表株(15 株)を選抜して用いた。

2. 方法

(1) IS printing 法

IS printing System(東洋紡)の説明書に記載された方法に準じて実施した。

電気泳動は、3%濃度の Nu Sieve

GTG : SeaKem GTG=2 : 1 アガロース、0.5×TBE バッファーを用い、サブマリン型電気泳動装置で 120V 100 分を行った。

IS printing の結果は、各プライマーセットごとにスタンダード DNA と比較し、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」と判定、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「1」「2」「4」の係数を乗じた数値を加算し、セット 1、セット 2 の順に 12 桁にコード化(以下 IS コード)した(表 1)。

(2) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (以下 MLVA) 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. 研究結果 (表 2、図 1)

島根県における平成 27 年度の O157 感染症の発生は、4 月 13 日届出から 10 月 15 日届出までの 83 件（6 事例、以下事例 A、B、C、D、E、F）であった。事例 C と事例 D、事例 E、事例 F は同一の IS コードを示し、3 事例とも同一市内で発生していたが、疫学的な関連は見いだせなかった。事例 A、C、E では事例内で複数の患者等があったが、IS コードは各事例ごとに同一であり、疫学情報と一致した。

感染研の MLVA による解析では、事例 A、E の MLVA type は事例ごとに同一であり、疫学情報と一致した。事例 C の MLVA type は 15 株のうち 1 株が異なるものの 14 株では一致していた。この 1 株も他の 14 株のシングルローカスバリエーションであり、ほぼ確実に事例 C における集団発生の一部であると考えられる。事例 C の 1 株を除き、各事例ごとに同一の MLVA type が得られ IS-printing の結果とほぼ一致した。

D 考 察

平成 27 年度の島根県での O157 発生 6 事例のうち、1 事例で IS コードが同一だったが、MLVA type が異なっていた。IS printing 法の型別能力は MLVA 法より低いと考えられるが、疫学的関連のある菌株は概ね同じ IS コードを示しており、バンドの若干の違いについて相同性の評価ができれば、迅速、簡便に実施できるため、有用なサブタイピング法であると思われる。

IS printing 法による解析結果はデジタルなデータであり、データのやりとりやデータベース化は比較的容易である。解析結果を集約し、広域での発生の有無を

比較的迅速に探知できるシステムを構築する場合でも IS printing 法は有用であると思われる。

E 結 論

1. 疫学的関連のある菌株は、同じ IS コードを示しており、IS printing 法は O157 の分子疫学解析ツールとして有用である。
2. IS printing 法は比較的迅速に解析が可能であるが、各事例の発生に時間差があり、疫学的関連性についての再調査は困難であった。
3. IS printing 法による解析結果は、デジタルなデータのためデータベース化は比較的容易であり、広域での発生の有無を比較的迅速に探知できるシステムを構築する場合にも有用である。

F. 研究発表

なし

表1 IS printing の増幅バンドサイズ及び判定のコード変換

| 1st set primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|------|-------------|
| 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 | <i>eee</i> | 1-16 | <i>hlyA</i> |
| size(bp) | 974 | 839 | 742 | 645 | 595 | 561 | 495 | 442 | 405 | 353 | 325 | 300 | 269 | 241 | 211 | 185 | 171 | 139 |
| 判定例(菌株No.1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 加算 | 6 | | | 1 | | | 3 | | | 5 | | | 7 | | | 7 | | |

| 2nd set primer | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|
| primer No. | 2-01 | 2-02 | 2-03 | 2-04 | 2-05 | 2-06 | 2-07 | 2-08 | 2-09 | 2-10 | 2-11 | 2-12 | 2-13 | 2-14 | 2-15 | 2-16 | <i>stx2</i> | <i>stx1</i> |
| size(bp) | 987 | 861 | 801 | 710 | 642 | 599 | 555 | 499 | 449 | 394 | 358 | 331 | 301 | 278 | 240 | 211 | 181 | 151 |
| 判定例(菌株No.1) | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 係数 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 |
| 加算 | 6 | | | 1 | | | 0 | | | 6 | | | 4 | | | 6 | | |

表2 供試菌株及び IS printing、MLVA の結果

| 事例 | No. | 届出年月日 | VT | ISコード | | MLVA(感染研) | | 備考 |
|----|-----|------------|----------|---------|---------|-----------|---------|-------------------------|
| | | | | 1st set | 2nd set | type | complex | |
| A | 1 | 2015/4/13 | 1&2 | 717577 | 611657 | 14m0387 | | No.1~4は 家族 |
| | 2 | 2015/4/22 | 1&2 | 717577 | 611657 | 14m0387 | | |
| | 3 | 2015/4/10 | 1&2 | 717577 | 611657 | 14m0387 | | |
| | 4 | 2015/4/13 | 1&2 | 717577 | 611657 | 14m0387 | | |
| B | 5 | 2015/7/28 | 1&2 | 317575 | 611657 | 15m0205 | 15c042 | 散発事例 |
| C | 6 | 2015/8/29 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | No.6~20 は同じ高 校の寮生 |
| | 7 | 2015/8/29 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 8 | 2015/8/30 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 9 | 2015/8/30 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 10 | 2015/8/29 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 11 | 2015/8/31 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 12 | 2015/9/1 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 13 | 2015/9/1 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 14 | 2015/9/2 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 15 | 2015/9/1 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0202 | 15c041 | |
| | 16 | 2015/9/1 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 17 | 2015/9/2 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 18 | 2015/9/1 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 19 | 2015/9/1 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | 20 | 2015/9/19 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| | D | 21 | 2015/9/8 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | |
| E | 22 | 2015/9/25 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | No.22,23 は家族 |
| | 23 | 2015/9/28 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | |
| F | 24 | 2015/10/15 | 2 | 012057 | 214442 | 15m0201 | 15c041 | 散発事例 |

腸管出血性大腸菌 O26 集団感染事例における分子疫学的解析

研究協力者 広島県立総合技術研究所保健環境センター

秋田 裕子 増田 加奈子 平塚 貴大

研究要旨

平成 27 年に当県で発生した腸管出血性大腸菌 O26 の集団感染事例において、MLVA 法および PFGE 法による解析を実施した。本事例関連の 9 株は、MLVA 法では 2 遺伝子座以内の相違、PFGE 法では 1 バンド以内の相違であり、いずれの結果からも集団発生である可能性が高いと判断された。このときの結果から、MLVA 法と PFGE 法は、同等の解析能力を有していると考えられたが、MLVA 法の方が、PFGE 法に比べて迅速性、簡便性に優れており、MLVA 法は、集団感染事例等の発生時に、菌株の異同を示すことができる有用な分子疫学的解析法であることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的解析法として、近年、迅速性・簡便性に優れた Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の有用性が報告されており、平成 26 年度より、国立感染症研究所における DNA 型別解析は、EHEC O157, O26, O111 に対しては、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法から MLVA 法に変更された。当県でも、一昨年度より MLVA 法を導入しており、平成 27 年に当県で発生した EHEC O26 の集団感染事例において、分離された菌株間の関連性を明らかにするため、MLVA 法および PFGE 法による解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 27 年 7 月中旬から 9 月中旬に、広島県内の保育所での集団感染事例において分離された EHEC O26 を 9 株、および平成 27 年に県内で分離された本事例とは無関係の EHEC O26 を 2 株用い

た。

2. 方法

(1) MLVA 法

Izumiya ら¹⁾の方法に従い、O157-10 を除いた 17 ヶ所の遺伝子座について解析した。QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて各検体 2 セットの PCR 反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied biosystems) および Gene Mapper Software 5 (Applied biosystems) を用いてフラグメント解析を行った。Fragment size marker は GeneScan 600 LIZ Size Standard v2.0 (Applied biosystems) を使用した。また、代表的なフラグメントについて、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いてシーケンスを行い、各 Locus のリピート数を確認した。なお、フラグメント解析によりピークが認められない場合は、リピート数を「-2」とした。また、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い、Minimum Spanning Tree 解析を行った。

(2) PFGE 法

国立感染症研究所の方法²⁾に準拠した。制限酵素は *Xba*I (TaKaRa) を用い、電気泳動は BIO-RAD CHEF MAPPER (BioRad) を用いて 6V/cm、パルスタイム 2.16-63.8 秒、14°C の条件で 18 時間行った。PFGE パターンは、BioNumerics Ver.6.6 (Applied Maths) を用い、Dice および UPGMA によりクラスター解析を行った。

C. 研究結果

1. 事例の概要

平成 27 年 7 月中旬以降から 9 月中旬にかけて、県内の保育所で下痢、腹痛、発熱等の症状を示す患者の発生が続き、園児 6 名、家族 3 名から腸管出血性大腸菌 (O26 VT1) が検出された。原因究明のため、濃厚接触者等の検便を行い、分離された菌株の分子疫学的解析を実施した。

2. MLVA 法による解析結果

MLVA 法による解析結果を表 1 に示した。集団感染事例関連の EHEC O26 9 株のうち、7 株 (菌株番号 15-06, -14, -15, -17, -18, -19, -20) は 17 ヶ所の遺伝子座すべてでリピート数が完全に一致した。これに対し、菌株番号 15-12 が 1 遺伝子座違い、15-13 が 2 遺伝子座違いであった。一方、本事例とは無関係の 2 株 (15-04, -16) は、3 遺伝子座以上の相違がみられた。Minimum Spanning Tree の解析結果において、本事例関連の 9 株は近いところに位置した (図 1)。

3. PFGE 法による解析結果

集団感染事例関連の EHEC O26 9 株

のうち 8 株 (15-06, -12, -13, -14, -17, -18, -19, -20) はバンドパターンが完全に一致し、残り 1 株 (15-15) は 1 バンドのみの相違であった。また、事例とは無関係の 2 株 (15-04, -16) のバンドの相違数は、7 以上であった (図 2)。

D. 考察

県内で発生した集団感染事例において分離された EHEC O26 9 株、事例とは無関係の 2 株を MLVA 法および PFGE 法により解析した。

国立感染症研究所の示した分類では、MLVA 法においては、相違する部位数が 0 の場合は一致、1 (SLV) は密接に関係、2 (DLV) は関係する可能性がある、3 以上は不一致と解釈し、PFGE 法においては、バンドの相違数が 0 の場合は一致、2~3 は密接に関係、4~6 は関係する可能性がある、7 以上は不一致と解釈する³⁾。今回の集団感染事例関連株は、MLVA 法では、9 株のうち 7 株が完全に一致し、残り 2 株も 2 遺伝子座以内の相違であったことから、関係する可能性が高いと推察され、分子疫学的観点においても集団感染事例であることが裏付けられた。一方、本事例とは無関係の 2 株は、3 遺伝子座以上の相違で、不一致と解釈された。

また、PFGE 法においても、これら 9 株は 1 バンド以内の相違であり、MLVA 法と同様に、集団発生を示唆する結果が得られた。

MLVA 法および PFGE 法による解析結果より、本事例は EHEC O26 の集団感染であると判断された。

2 法を比較すると、MLVA 法は、菌株を入手して 1~2 日で結果が得られ、操作も簡便で個別対応もしやすかった。一

方、PFGE 法は結果を出すまでに 3～4 日を要し、また、個別での実施は難しいため、MLVA 法に比べて迅速性に欠けた。当県では、一昨年度より MLVA 法を用いているが、即時に対応した事例は今回が初めてであり、その有用性を確認できた。また、本事例では、菌株が分離される度に搬入されたため、その都度結果を出す必要があったが、MLVA 法により迅速な対応ができた。一方、本事例では、MLVA 法では、最初に搬入された 3 株を比較した時点で 1～3 遺伝子座での相違がみられたため、どの株を基準とするかにより、DLV 以内か否かの判断が異なるという問題点があった。MLVA 法と PFGE 法のいずれからも 9 株すべてが関係している可能性が高いという結果が得られ、解析能力は同等であると考えられた。しかしながら、9 株すべてが完全一致ではなく、MLVA 法では一致したが、PFGE 法では若干の相違がみられた株、またその逆も存在したため、解析方法によって、結果の相違を生じる可能性があると考えられた。

E. 結論

本県で発生した EHEC O26 集団感染事例において、MLVA 法および PFGE 法による解析により、集団感染の根拠となるデータを示した。特に、MLVA 法は、PFGE 法に比べ、迅速性、簡便性に優れていたことから、事案発生時の迅速な対応に非常に有用であった。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) Izumiya H. et al. (2010): *Microbiol Immunol*, 54: 569- 577.
- 2) 寺嶋淳 他(2004): 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 年度総括・分担研究
- 3) Tenover FC. et al. (1995): *J Clin Microbiol*, 33(9): 2233-2239.

表 1 菌株の概要と MLVA リピート数

| 菌株番号 | 届出日 | 年齢 | 性別 | 疫学情報 | 血清型 | 毒素型 | 各遺伝子座のリピート数 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|------|------|------|--------|-------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|-------|----------|
| | | | | | | | O157 -3 | O157 -9 | O157 -25 | O157 -34 | EH157 -12 | EH111 -11 | EH111 -8 | EHC-1 | EHC-2 | EHC-5 | O157 -17 | O157 -19 | O157 -36 | O157 -37 | EH26 -7 | EH111 -14 | EHC-6 | |
| 集団事例 | 15-06 | 7.16 | 4 | 男 | 園児 | O26:H- | VT1 | -2* | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-12 | 8.31 | 6 | 男 | 園児 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 10** | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-13 | 9.7 | 1 | 男 | 園児 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | 5 | 3 | 1 | 8 |
| | 15-14 | 9.10 | 62 | 女 | 園児家族 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-15 | 9.11 | 1 | 男 | 園児 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-17 | 9.12 | 4 | 男 | 園児家族 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-18 | 9.12 | 1 | 女 | 園児 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-19 | 9.16 | 2 | 男 | 園児 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 15-20 | 9.17 | 25 | 女 | 園児家族 | O26:H- | VT1 | -2 | 11 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 11 | 13 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 | -2 |
| | 散発事例 | 15-04 | 6.23 | 62 | 男 | | O26:H11 | VT1 | -2 | -2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 13 | 17 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 3 | 1 |
| 15-16 | | 9.3 | 15 | 女 | | O26:H- | VT1 | -2 | 10 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 8 | 14 | -2 | -2 | 1 | -2 | -2 | 2 | 1 | -2 |

*-2: 増幅なし

**太字: Single locus variant

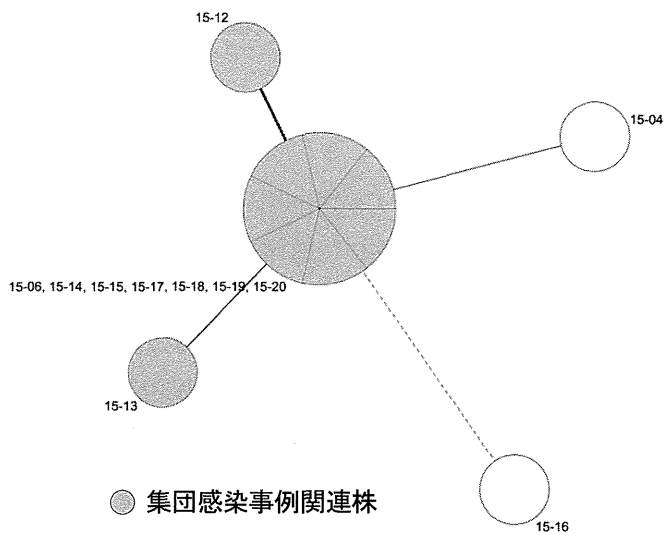


図1 EHEC O26のMLVA Minimum Spanning Tree

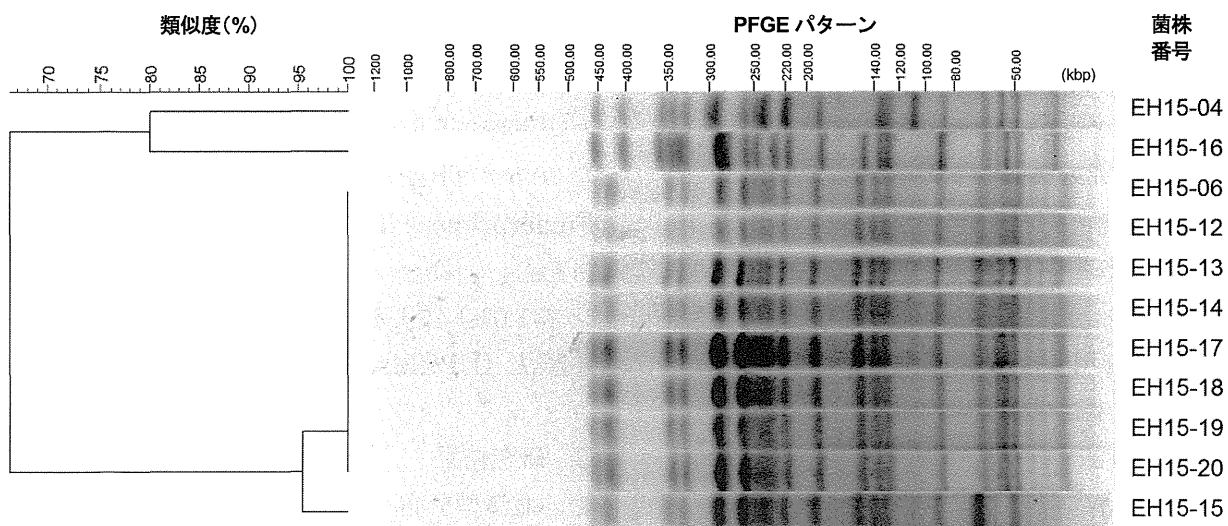


図2 EHEC O26のPFGE法による解析結果

広島市で分離されたサルモネラのパルスフィールドゲル電気泳動解析結果

研究協力者 広島市衛生研究所

千神 彩香 青田 達明 田内 敦子 坂本 綾 石村 勝之

研究要旨

2015年に広島市内で分離されたサルモネラを用いてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法の有効性を検討した。複数分離された血清型の分離菌株27株について、制限酵素 *Xba* I 及び *Bln* I で処理し解析した結果、類似度が比較的 low 区別できた血清型と、同一または類似度の高いクラスターを形成した血清型がみられた。これらの結果の解釈としては、株間に関連性がある、または血清型により遺伝的類似度が元来高いものがあるため区別できていない等が考えられることから、さらに検討が必要である。

A. 研究目的

サルモネラ症(食中毒・感染症)において、事例間の疫学的関連性を追究するための分子疫学的手法として、現時点では主にパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法による解析が利用されている。そこで、市内で発生するサルモネラ症からの同一血清型分離株間の評価への本法の適用性を検討した。

B. 研究方法

1. 材料

2015年に広島市内で分離されたサルモネラのうち、複数株が分離された血清型株27株を用いた。内訳は、食中毒等事例4株、収去2株、散発事例21株である。

2. 方法

(1) 血清型別試験

サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研)及びサルモネラ相誘導用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いて血清型別試験を実施し、Kauffmann-Whiteの様式により血清型を決定した。

(2) 薬剤感受性試験

感受性ディスク(BD)を用い、アンピシリン(ABPC)、テトラサイクリン(TC)、スト

レプトマイシン(SM)、ナリジクス酸(NA)、カナマイシン(KM)、クロラムフェニコール(CP)の6剤について、CLSIの抗菌薬ディスク感受性試験実施基準に基づき実施した。

(3) PFGE

制限酵素 *Xba* I 及び *Bln* I 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実施した。なお、電気泳動はスミアバンド発生を防止するためチオ尿素を加えた0.5×TBEで行った。系統樹は、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)により作成した。

C. 研究結果

1. 血清型分布

分離株27株の血清型別試験結果を表1に示した。最も多い血清型は *S.Schwarzengrund* の7株であった。次いで *S.Thompson* 5株、*S.Braenderup* 4株、*S.Saintpaul* 4株、*S.Pakistan* 3株、*S.Typhimurium* 2株、*Salmonella* O4:i:-2株の順であった。

2. 薬剤感受性

同一血清型毎の分離株の薬剤感受性試験結果を表 2 に示した。

3. PFGE 解析結果

(1) *S.Schwarzengrund*

*Xba*I 処理によるバンドパターンを図 1 に、*Bln*I 処理によるものを図 2 に示した。

*Xba*I 処理では 2 つのクラスターを形成し、その類似度は 90.8%と高かった。15019 及び 15022 と、15001、15002 及び 15003 は、それぞれバンドが 100%一致した。

*Bln*I 処理では、*Xba*I 処理とは異なるクラスターを形成し、全体の類似度は 93.6%と高かった。15005、15019 及び 15022 と、15001、15002 及び 15003 とで 100%一致した。

(2) *S.Thompson*

*Xba*I 処理を図 3 に、*Bln*I 処理を図 4 に示した。

*Xba*I 処理では、10 月発生の散発事例由来株 15034 及び 15035 が 100%一致した。その他は類似度が異なり、最も異なる 15026 で 55.8%であった。

*Bln*I 処理でも同様に、15034 及び 15035 は 100%一致した。その他の株の類似度は、15030 が 85.7%と高かったが、15017 は 51.1%を示した。

(3) *S.Braenderup*

*Xba*I 処理を図 5 に、*Bln*I 処理を図 6 に示した。*Xba*I 処理では 4 株全てのバンドが 99.9%一致した。*Bln*I 処理では 15016、15018 及び 15027 でバンドが 100%一致し、これら 3 株と 15031 との類似度も 88.9%と高かった。

(4) *S.Saintpaul*

*Xba*I 処理を図 7 に、*Bln*I 処理を図 8 に示した。

*Xba*I 処理及び *Bln*I 処理において、類似したクラスターを形成した。どちらも

15009 及び 15012 と、15024 及び 15028 のクラスターに分けられ、両クラスター間の類似度は *Xba*I 処理では 51.1%、*Bln*I 処理では 51.5%と共に低い値を示した。なお、*Bln*I 処理での 15024 及び 15028 は 100%一致した。

(5) *S.Pakistan*

*Xba*I 処理を図 9 に、*Bln*I 処理を図 10 に示した。

*Xba*I 処理及び *Bln*I 処理において類似のクラスターを形成した。どちらも 15013 及び 15014 が 100%一致した。この 2 株と 15029 との類似度は、*Xba*I 処理では 70.4%、*Bln*I 処理では 66.7%を示した。

(6) *S.Typhimurium*

*Xba*I 処理を図 11 に、*Bln*I 処理を図 12 に示した。2 株の類似度は *Xba*I 処理では 81.3%、*Bln*I 処理では 37.5%と異なった。

(7) *Salmonella* O4:i:-

*Xba*I 処理を図 13 に、*Bln*I 処理を図 14 に示した。2 株の類似度は *Xba*I 処理では 74.3%、*Bln*I 処理では 64.3%を示した。

D 考 察

現在、本邦でも細菌性食中毒等の疫学的解析手法として、次世代シーケンサーによる網羅的解析手法の開発が進みつつあるが、現在のところ細菌性の食中毒や感染症の発生時の分離菌株の分子疫学解析には、PFGE 法が最も広く普及し、応用範囲の広い解析手法となっている。

サルモネラにおいても、これまでサルモネラ・エンテリティディス食中毒の解析等において広く使用されてきた。しかし、腸管出血性大腸菌 O157 や O26, O111 等に比較すると、本邦におけるその有用性の評価はあまり報告されていない。そこで、本法の型別能の基礎的な把握を目的として、

2015年に広島市で分離された同一血清型株を用いて検討した。

S.Schwarzengrund では、*Xba* I 処理及び *Bln* I 処理において同一事例関連株である 15001 と 15002 株は一致し、関連性を示唆する結果であったが、異なる食中毒事例からの 15003 株もバンドが一致した。また、全体の類似度も約 90% と高かった。

このように *S.Schwarzengrund*、*S.Thompson*、*S.Braenderup*、*S.Saintpaul*、*S.Pakistan* など、多くの血清型で PFGE バンドが一致した株がみられた。また、今回、*S.Schwarzengrund*、*S.Braenderup* は、類似度の高い株で構成された。

PFGE の有効性について、今回の検討結果では、類似度の高いバンドが出現したのは株間に関連性があるためなのか、あるいは同一血清型サルモネラの PFGE 法の識別限界によるものなのか、明確にはできなかった。疫学情報のある菌株を追加するなど、さらに検討が必要である。

E 結論

サルモネラ症の疫学解析手法としての PFGE 法の有効性を検討した。今回の 2015 年の市内分離菌株の検討で、*Xba* I あるいは *Bln* I による切断において PFGE パターンが一致する菌株が認められた血清型は 5 種類と多かった。また、差異は認められるものの相互の類似度が高い血清型もみられた。以上の結果からは、サルモネラ血清型の種類によって PFGE 法による株間の識別能力に差異がある可能性が示唆されることから、菌株間の異動の判定への PFGE 法の適用結果の解釈には血清型ごとに慎重な検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

なし。

表 1 2015 年サルモネラ分離菌株の血清型別結果

| 血清型 | 株数 |
|-------------------------|------|
| <i>S.Schwarzengrund</i> | 7 株 |
| <i>S.Thompson</i> | 5 株 |
| <i>S.Braenderup</i> | 4 株 |
| <i>S.Saintpaul</i> | 4 株 |
| <i>S.Pakistan</i> | 3 株 |
| <i>S.Typhimurium</i> | 2 株 |
| <i>Salmonella</i> O4:i- | 2 株 |
| 計 | 27 株 |

表 2 2015 年サルモネラ分離菌株情報と薬剤感受性結果(血清型ごと)

| 菌株番号 | 分離年月 | 事例、区分 | 由来 | 耐性薬剤 | 血清型 |
|-------|---------|--------------|--------|-------------|-------------------------|
| 15001 | 2015.1 | 有症事例 1 | 食品(鶏肉) | SM、TC | <i>S.Schwarzengrund</i> |
| 15002 | 2015.1 | 有症事例 1 | 食品(鶏肉) | SM、TC | |
| 15003 | 2015.5 | 食中毒事例 2 | 食品(鶏肉) | SM、KM、TC | |
| 15005 | 2015.5 | 食中毒事例 2 | ヒト(患者) | SM、KM、TC | |
| 15019 | 2015.8 | 収去 | 食品(鶏肉) | SM、KM、TC | |
| 15021 | 2015.8 | 収去 | 食品(鶏肉) | - | |
| 15022 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | SM、KM、TC、NA | |
| 15017 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 B) | ヒト(患者) | - | <i>S.Thompson</i> |
| 15026 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15030 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15034 | 2015.10 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15035 | 2015.10 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15016 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 B) | ヒト(患者) | - | |
| 15018 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 B) | ヒト(患者) | - | |
| 15027 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |

| | | | | | |
|-------|--------|--------------|--------|-----------------|-------------------------|
| 15031 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15009 | 2015.5 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15012 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | <i>S.Saintpaul</i> |
| 15024 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | SM、TC | |
| 15028 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | TC | |
| 15013 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15014 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | <i>S.Pakistan</i> |
| 15029 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | |
| 15007 | 2015.5 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | TC | |
| 15033 | 2015.9 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | - | <i>S.Typhimurium</i> |
| 15011 | 2015.7 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | SM、TC、AM、 CP | <i>Salmonella O4:i-</i> |
| 15023 | 2015.8 | 散発事例(医療機関 A) | ヒト(患者) | SM、TC、AM、 CP | |

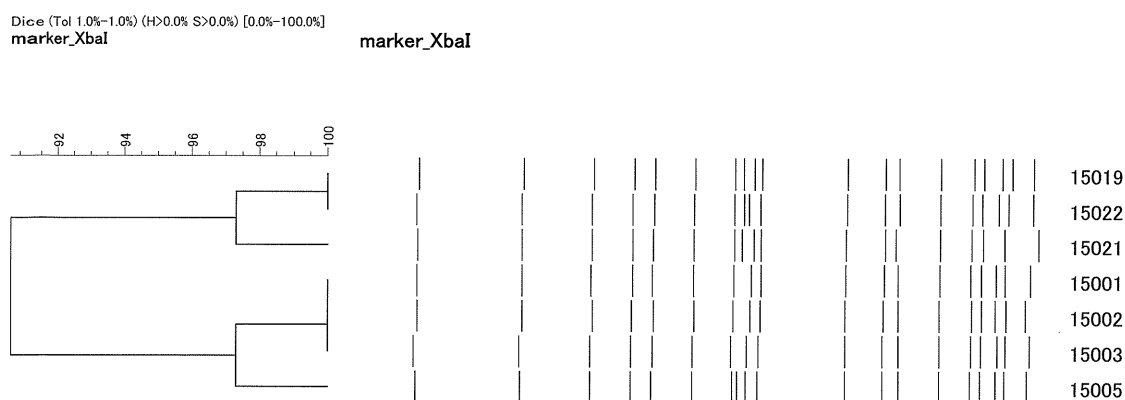


図1 2015年 *S.Schwarzengrund* 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスタ

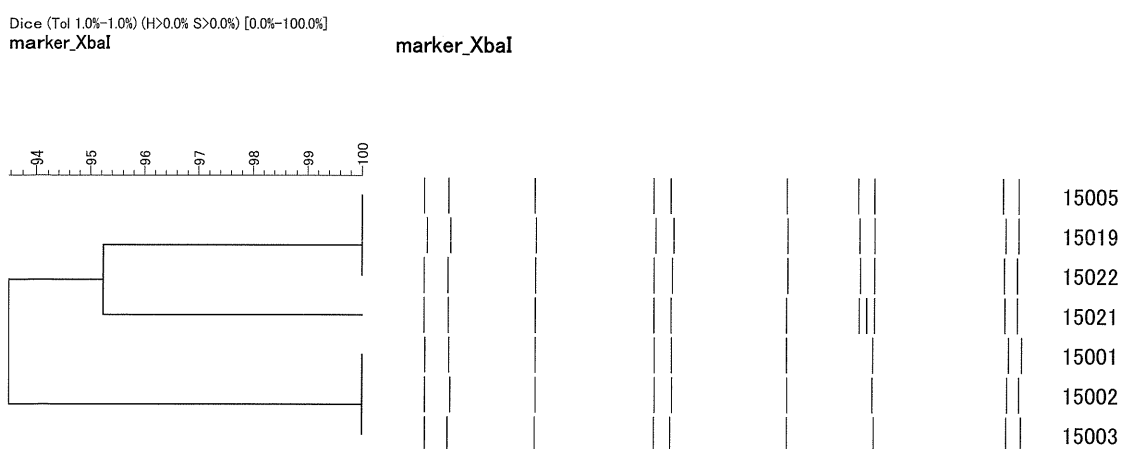


図2 2015年 *S.Schwarzengrund* 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスタ

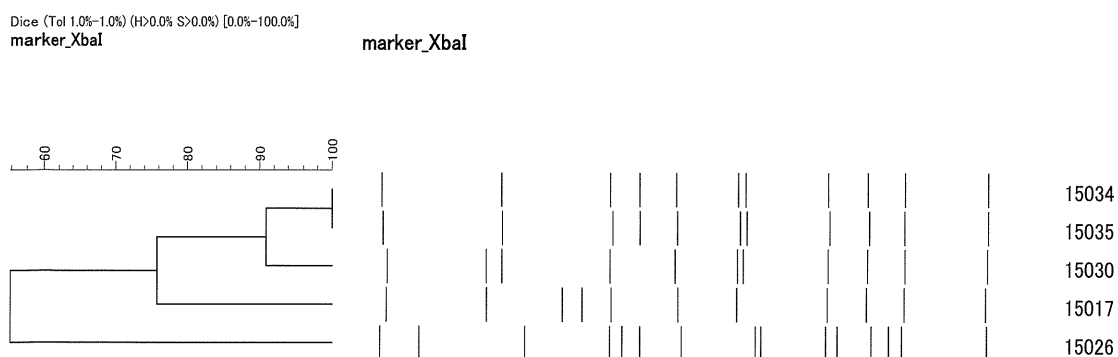


図3 2015年 *S.Thompson* 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

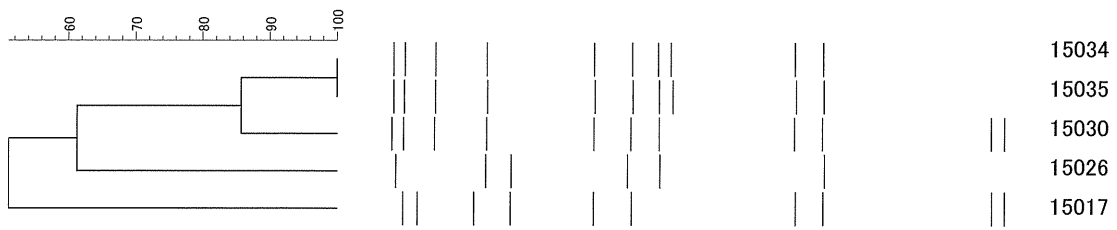


図4 2015年 *S.Thompson* 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

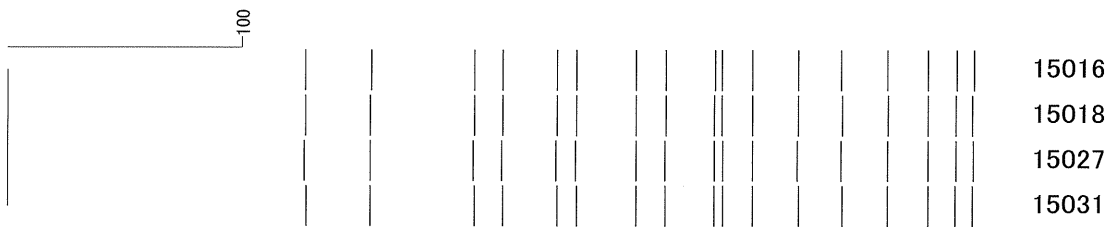


図5 2015年 *S.Braenderup* 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

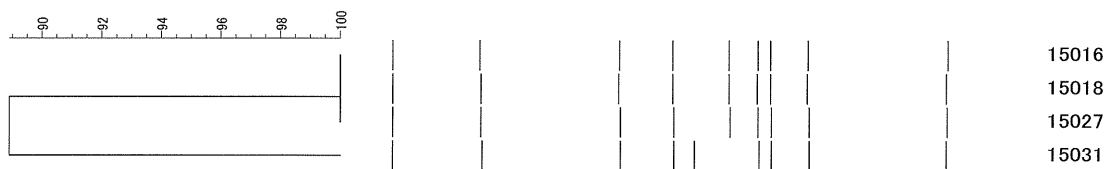


図6 2015年 *S.Braenderup* 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

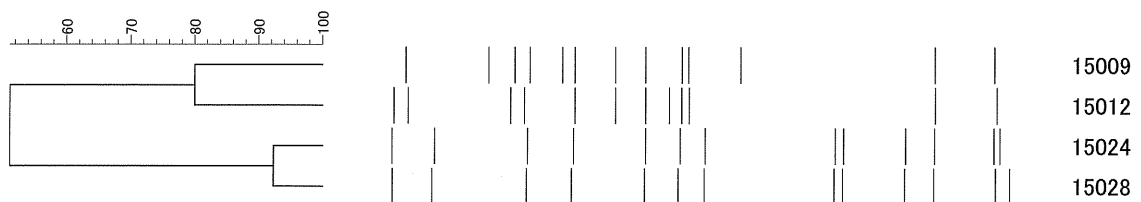


図7 2015年 *S.Saintpaul* 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

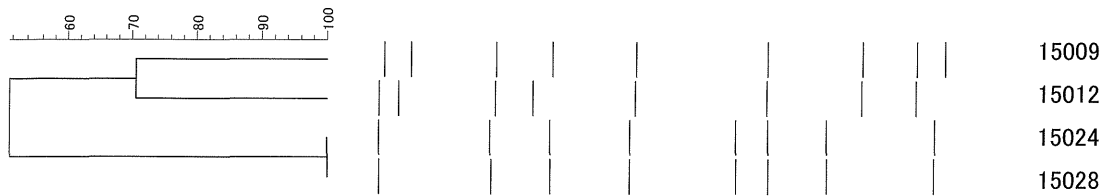


図 8 2015 年 *S.Saintpaul* 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

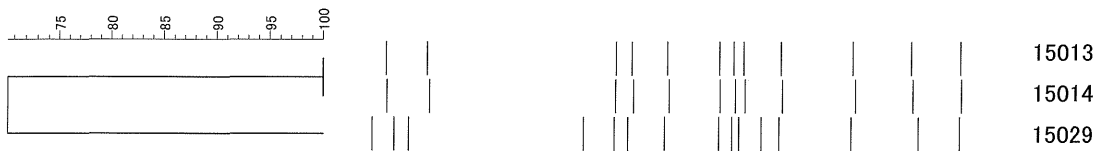


図 9 2015 年 *S.Pakistan* 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI



図 10 2015 年 *S.Pakistan* 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI

marker_XbaI

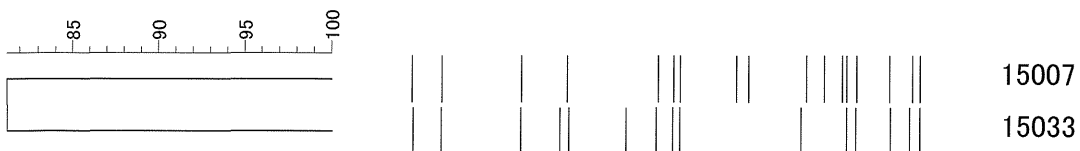


図 11 2015 年 *S.Typhimurium* 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスタ

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

marker_XbaI



図 12 2015 年 *S. Typhimurium* 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスター

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

marker_XbaI



図 13 2015 年 *Salmonella* O4:i:- 分離菌株の *XbaI* 処理による PFGE クラスター

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

marker_XbaI

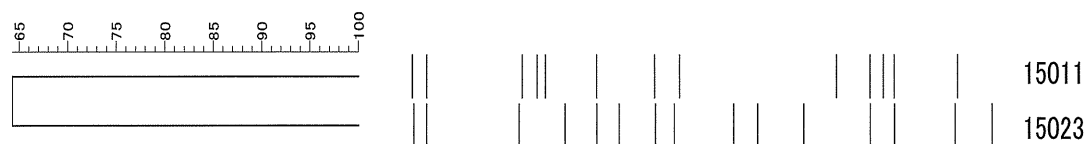


図 14 2015 年 *Salmonella* O4:i:- 分離菌株の *BlnI* 処理による PFGE クラスター