

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)

平成 28 年度 分担研究報告書

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	佐倉 千尋	鳥取県衛生環境研究所
	川上 優太	島根県保健環境科学研究所
	福間 藍子	〃
	河合 央博	岡山県環境保健センター
	仲 敦史	〃
	畑 ますみ	〃
	秋田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田 加奈子	〃
	平塚 貴大	〃
	千神 彩香	広島市衛生研究所
	青田 達明	〃
	栗林 智早	〃
	坂本 綾	〃
	松室 信宏	〃
	石村 勝之	〃
	尾羽根 紀子	山口県環境保健センター
	亀山 光博	〃
	大塚 仁	〃
	野村 泰晴	〃
	市原 ふみ	徳島県立保健製薬環境センター
	内田 順子	香川県環境保健研究センター
	岩下 陽子	〃
	関 和美	〃
	福田 千恵美	〃
	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	園部 祥代	〃
	高木 春佳	高知県衛生研究所
	高橋 とみよ	〃
	戸梶 彰彦	〃
	松本 道明	〃

研究要旨

食品由来感染症の広域発生事例においては、事例由来株の分子疫学解析結果等を共有・比較する必要がある。このため、中四国地域の各施設における分子疫学解析手法の技術の維持と解析精度の向上や、将来的に解析データや疫学情報を用いたデータベースを構築し利用可能にすることを目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 菌株を用いた IS-printing System、パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)及び multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA 法) による精度管理を、実施した。その結果、多くの施設が良好な結果であったが、一部施設では検査法の改良・工夫や技術の習熟が必要と思われた。

平成 28 年度に中四国地域で発生した EHEC による感染事例について、IS-printing system 等による分子疫学解析データや疫学情報を収集し解析した結果、7 種類の IS コードの菌による感染事例の発生が、複数の県で確認された。このうち、疫学的な関連が確認された 2 事例を含めて 5 事例では、MLVA 法による解析結果も一致していた。広域発生事例の疫学解析に重要である分子疫学解析結果等を用いたデータベース構築に向け、今後さらに分子疫学解析技術の維持・向上が重要になるものと思われる。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域事例発生時には、事例由来株の分子疫学解析結果の比較が必要であり、解析技術の維持と解析精度の向上は重要である。このため、全国を 6 ブロックに分けて、各地域で解析手法毎の精度管理を実施している。さらに、事例由来株の分子疫学解析データを共有して相互に利用可能にするため、国立感染症研究所にサーバーを設置し、IS-printing System (以下、IS-PS とする) と菌株情報を用いたデータベースの構築とその利用を試行している。中四国ブロックでは、昨年度に引き続き平成 28 年度も IS-PS、パルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法とする)、さらに multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (以下、MLVA 法とする) について、腸管出血性大腸菌(以下、EHEC とする) O157 株を用いて精度管理を実施した。また、ブロック内での EHEC 発生事例について疫学情報を収集

し、分子疫学解析結果を比較して、関連性や流行株などを解析した。

B. 研究方法

1. 使用菌株 (表 1)

精度管理：岡山県で平成 28 年度に分離されたヒト由来 EHEC O157 株 (No1940:H7,VT2、No1945:H7,VT2、No1947:H7,VT1,2、No1950:H7,VT1,2、No1951:H7,VT1,2) の 5 株を使用した。

EHEC 感染事例解析：平成 28 年度に中四国地域で発生した事例の患者等由来株 288 株について、中四国地域の 10 施設で分子疫学解析を行った。

2. 分子疫学解析法及び精度管理

(1) IS-PS

IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。本法の各プライマーにより増

幅される産物は、プライマーセット（1st set 及び 2nd set primer）毎に高分子量側から 3 つごとに区切り、迅速同定キット（Api）の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を区分毎に足してコード（IS コード）化し、コードによる解析を行った。

(2) PFGE 法

PFGE 法は感染研ニュープロトコール（集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた）に従って実施し、画像解析ソフト（BioNumerics）を使用して泳動像の解析を行った。

(3) MLVA 法及び型別

MLVA 法は、実施可能な 4 施設で行った。また、MLVA 型別は、すべての施設が菌株を国立感染症研究所に送付して、実施した。

(4) 精度管理

平成 28 年度は 10 施設が参加し、精度管理用の EHEC 菌株 5 株を各施設に送付して、解析を行った。IS-PS は 10 施設（A～J）で、PFGE 法は 9 施設（A,C～J）で、MLVA 法は 4 施設（D～F,I）で実施した。IS-PS は、各 primer set の増幅産物をコード化した IS コードを、PFGE 法は、解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを、それぞれの泳動像とともに回収し、解析した。MLVA 法はターゲットとする遺伝子座のリピート配列数を比較解析した。

3. IS-PS 解析事例の収集

IS-PS 解析集の作成に向けて、IS-PS 解析でエキストラバンドが出現する事例を収集し、解析した。

4. 疫学情報の収集と解析

将来のデータベース構築に向け、中四国

地域で発生した EHEC 感染事例について、患者等由来株の IS-PS や MLVA 法による解析結果を菌株情報とともに収集し、比較・解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) IS-PS による解析

IS-PS の精度管理は、中四国地域の 10 施設が参加して実施した。各施設の IS コードによる解析結果は表 2 に、泳動像は図 1 に示した。多くの施設の解析結果は一致していたが、3 施設（施設 E、H、J）ではいずれも 1st set primer の増幅産物について、IS コードの一部が他の施設と異なっていた。また、1 施設では単一の primer では増幅されるが、set primer では増幅産物の不鮮明化や増幅されないケースが確認された。

(2) PFGE 法による解析

中四国ブロックの 10 施設中 9 施設が参加して実施し、このうち 8 施設でデンドログラム解析を実施した。各施設の泳動像とデンドログラム解析結果は、図 2 に示した。また、結果をまとめて、表 3 に示した。本年度も昨年度に引き続いて、ほとんどの施設が良好な泳動像を示した。デンドログラム解析を実施した 8 施設の結果は、パターンの類似度の最大値が 100%、最小値は 65%で、施設毎の差はほとんど見られなかったが、類似度の順序のパターンは 2 グループに分かれた。No1950 と 1951 は疫学的に関連のある株で、7 施設の解析結果が 100%で一致したが、1 施設は 98%であった。

(3) MLVA 法による解析

MLVA 法は、中四国ブロックの 4 施設で

実施した。3施設は O157 株の 17 遺伝子座を、1 施設は 9 遺伝子座について、リピート数を解析した。その結果を、表 4 に示した。2 施設 (D と E) の解析結果は一致していたが、施設 F は 2 つの、施設 I では 4 つの遺伝子座の解析結果が、施設 D 及び E と異なっていた。これら以外の遺伝子座の解析結果は、各施設とも一致していた。

2. IS-PS 解析事例

IS-PS 解析でエキストラバンドが出現した事例を収集・解析し、表 5 に示した。14 種類の IS コードの株について、15 種類のエキストラバンドが確認された。このうち、5 種類の IS コード株 (C ⑦、C ④、C ③、C ⑨、C ⑤) は複数の県で分離され、2 種類の IS コード株 (H ①、E ④) は同一県内から複数株が分離された。また、1 種類の IS コード株はエキストラバンドの位置が異なる 2 種類の株 (E ③、E ④) が確認された。

3. 中四国地域の EHEC 感染事例発生状況と解析結果

中四国地域で平成 28 年度に発生した EHEC 感染事例について、各県の施設で実施した患者等由来株の IS-PS による解析結果と、MLVA 型等を含む疫学情報を収集した。EHEC O26 株については、同一の MLVA 型 (13m2040) 及び MLVA complex (16c204) の株が、複数県 (B と D) で検出された (表 6-1)。EHEC O157 株については、7 種類の IS コードの株が複数の県から分離された。集団事例あるいは同一施設関連の事例 (表 6-2 ①、⑤) が 2 事例あり、このうちの一部の株では、1st set primer による IS コードの一部や MLVA 型が他の関連株と異なっていた。これら疫学的に関連のある事例由来株を含め、4 種類

の IS コード株による事例 (001457-610652、317577-211757、717557-611657、717577-611657) においては、同一 IS コードに加えて 5 種類の MLVA 型及び 4 種類の MLVA complex が、一致していた。また、家族内感染事例 4 事例のうち 3 事例でも、IS コード、MLVA 型及び MLVA complex が一致していた。

D 考 察

平成 28 年度に実施した IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による EHEC O157 株を用いた精度管理では、多くの施設で解析結果は良好で、一部の施設が他施設と異なった結果を報告した。IS-PS では、3 施設が 1st set primer の増幅産物による IS コードの一部が、他の施設と異なっていた。これは、増幅産物のバンド位置の確認ミスや薄い増幅産物のバンドの見逃しによる読み違い、あるいはコード化のミスなどが原因と思われた。これらの問題解決には、①泳動距離の長いゲルを使用して増幅産物のバンド間の距離を延ばして、バンドの位置確認を正確に行う、②適切な濃度のテンプレートを調製し、増幅産物の薄いバンドや低分子量のバンドの確認ミスを回避する必要がある。また、1 施設で、単一の primer では増幅され、set primer によるマルチプレックス PCR ではバンドが不鮮明なケースや増幅されないケースが確認された。これは、機械的な不具合が原因と推察されたが、各施設においても検査を実施する際に、陽性対照のすべてのバンドについて増幅を確認し、日常の機器の点検を注意して行う必要があると思われた。PFGE 法による解析は、ほとんどの施設が良好な泳動像を示し、デンドログラム解析結果も、施設毎の

差はほとんど見られなかった。デンドログラム解析では実施者による差や泳動像の鮮明さ等により、DNA バンドの位置の指定が異なり、解析結果に影響するため、慎重な解析が必要である。MLVA 法は、実施した 4 施設のうち 2 施設の結果が異なっていた。未だ未導入の施設が多いが、国立感染症研究所では現在主になっている解析方法であるため、既に実施している施設や今後導入を予定している施設も含めて、本解析法の技術的な習熟が必要であり、さらに解析精度の維持・向上が重要と思われた。

IS-PS 解析集の作成に向けて、エクストラバンドの出現事例を収集している。今までの解析データから、14 種類の IS コード株において、15 種類のエクストラバンドが確認された。今後、各ブロックのデータを集積して、膨大なエクストラバンド事例集の作成が予定されており、IS-PS 解析時に役立つものと期待される。

中四国地域で本年度発生した事例の情報を収集し、分子疫学的な解析を行った。その結果、O26 は 1 種類、O157 は 7 種類の IS コードの株が、複数の県から分離された。同一の IS コード株のうち、疫学的な関連性が確認された事例においては、同じ MLVA 型及び MLVA complex を示したが、一部の株では IS-PS の 1 バンドと MLVA 型の 1 遺伝子座の結果が異なっていた。これらはいずれも、人から人への感染の過程での遺伝子変異によるものと思われた。散発事例

では、同一 IS コードで MLVA 型も一致する株があったが、それらの関連は不明である。疫学的な事例解析には、詳細な疫学情報の収集と、それに基づく解析が必要であり、分子疫学解析結果を加えて、関連性を明らかにすることが重要である。

E 結論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 株を用いて、PFGE 法、IS-PS 及び MLVA 法による精度管理を実施した。
2. いずれの方法においても、参加した施設の多くが同じ結果を示したが、一部の施設では結果が異なっていた。
3. PFGE 法及び IS-PS による解析では、鮮明な泳動像を得ることが重要であり、検査技術への習熟と検査法の工夫が必要である。
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では、疫学的に関連のある株の MLVA 型や MLVA complex は、一致していた。
5. 分子疫学解析においても、疫学情報に基づいた解析が重要である。

F. 研究発表

なし。

表1 精度管理使用 EHEC 菌株

菌株No	血清型		毒素型	MLVA型(感染研)
	O群	H型		
1940	157	7	1,2	16m0095
1945	157	7	2	16m0110 16c027
1947	157	7	1,2	14m0053 16c011
1950	157	7	1,2	16m0228 16c010
1951	157	7	1,2	16m0228 16c010

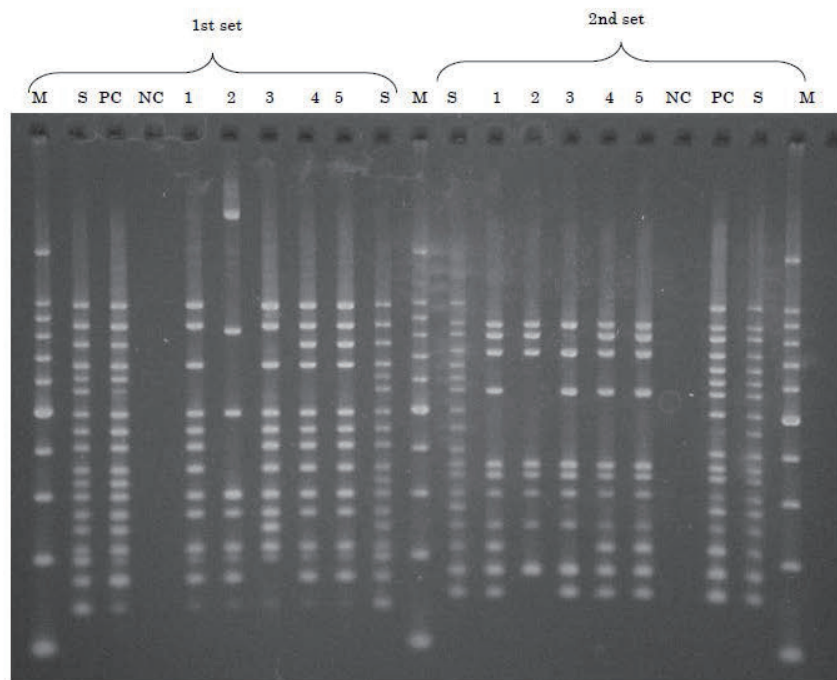
表2 IS-PS による解析結果

施設	1940		1945		1947		1950		1951	
(A)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(B)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(C)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(D)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(E)	317557	611657	211457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(F)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(G)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(H)	317556	611657	201457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(I)	317557	611657	001457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657
(J)	317557	611657	201457	610652	317575	211656	717557	611657	717557	611657

図1 IS-PS 泳動像

(A)

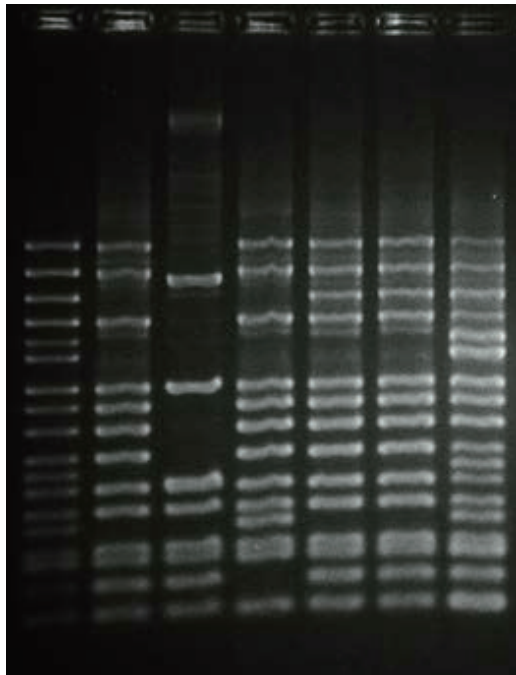
M:100bp ラダーマーカー
 S:スタンダード DNA
 PC:陽性コントロール
 NC:陰性コントロール
 1:1940
 2:1945
 3:1947
 4:1950
 5:1951



(B)

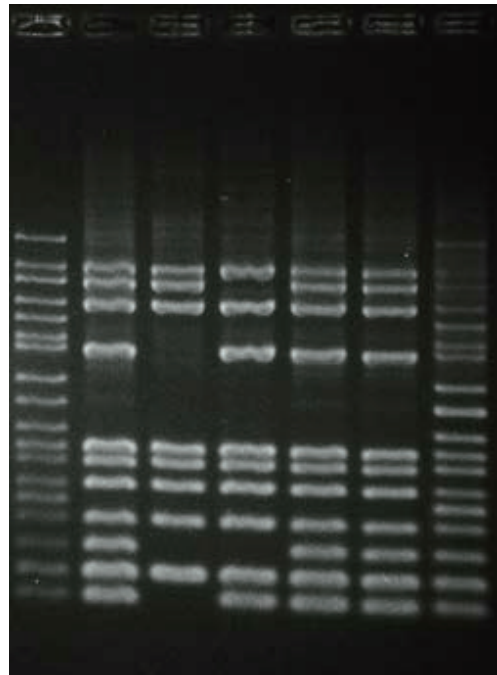
1st set

Std ① ② ③ ④ ⑤ P



2nd set

Std ① ② ③ ④ ⑤ P



Std : Standard DNA 、 P : Template Mix

① : STEC 1940、 ② : STEC 1945、 ③ : STEC 1947、 ④ : STEC 1950、 ⑤ : STEC 1951

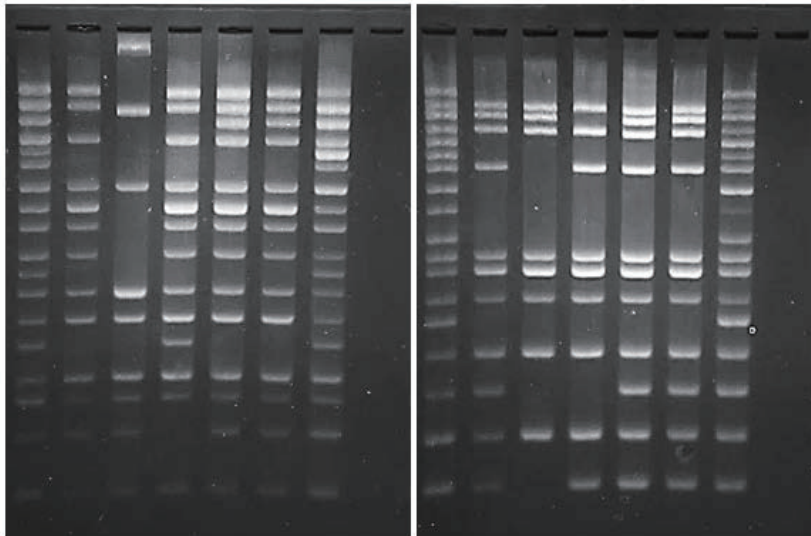
(C)

1st

1 2 3 4 5 6 7 8

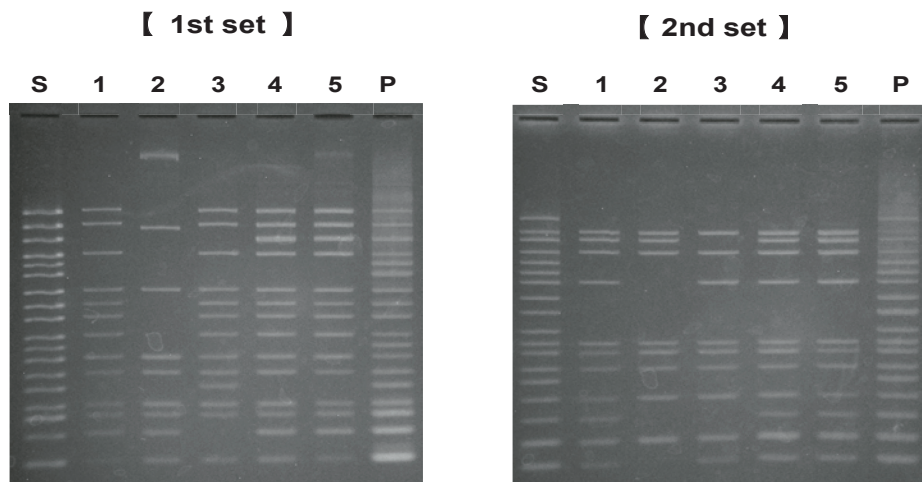
2nd

1 2 3 4 5 6 7 8



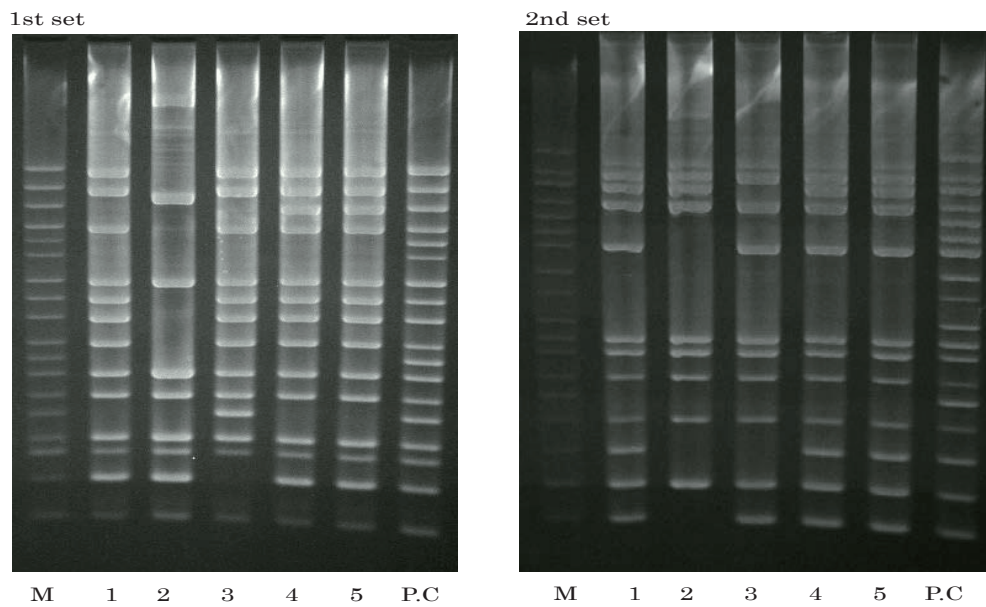
レーン1 : Std
 レーン2 : No.1940
 レーン3 : No.1945
 レーン4 : No.1947
 レーン5 : No.1950
 レーン6 : No.1951
 レーン7 : p.c.
 レーン8 : n.c.

(D)



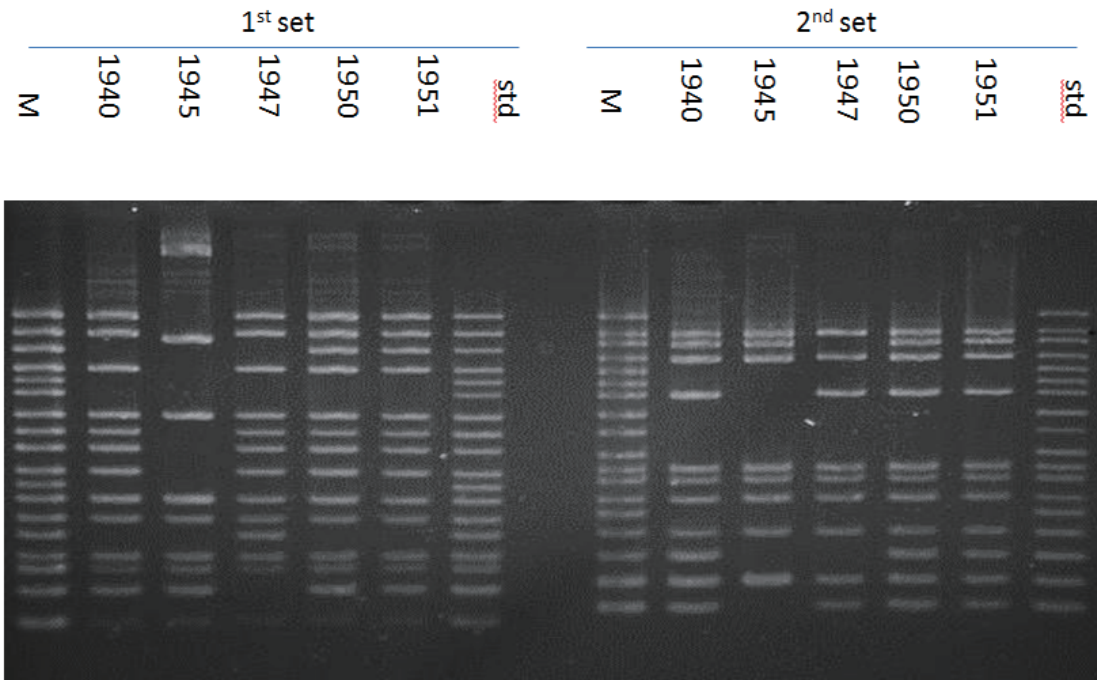
レ ー ン S : Standard DNA
1 : No.1940
2 : No.1945
3 : No.1947
4 : No.1950
5 : No.1951
P : Positive control

(E)

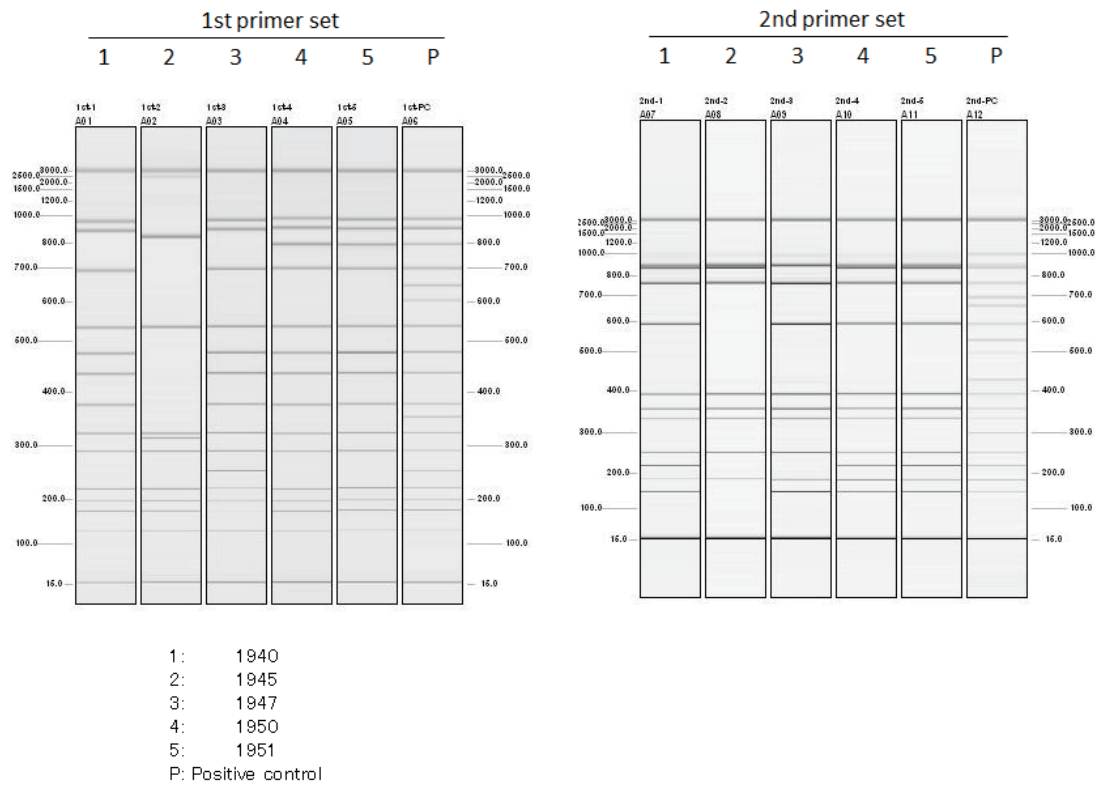


レ ー ン 1 : 1940
2 : 1945
3 : 1947
4 : 1950
5 : 1951

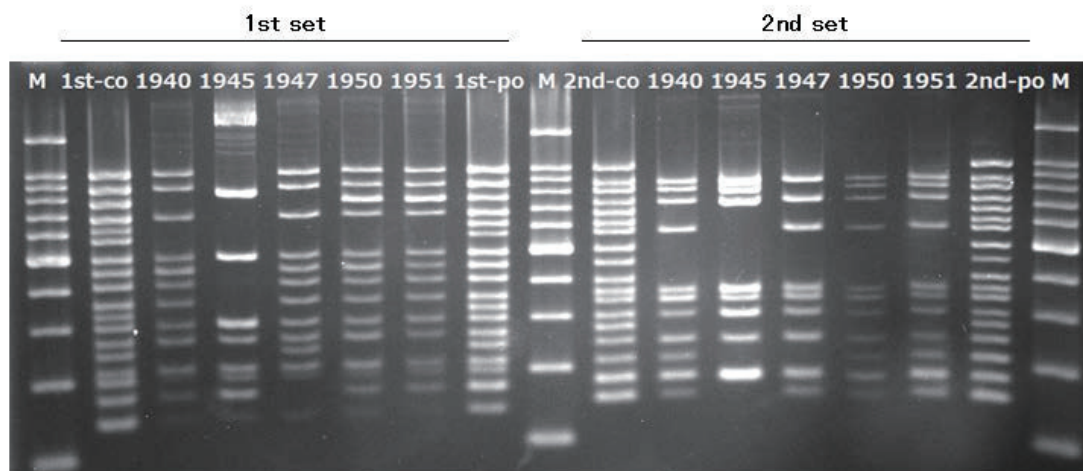
(F)



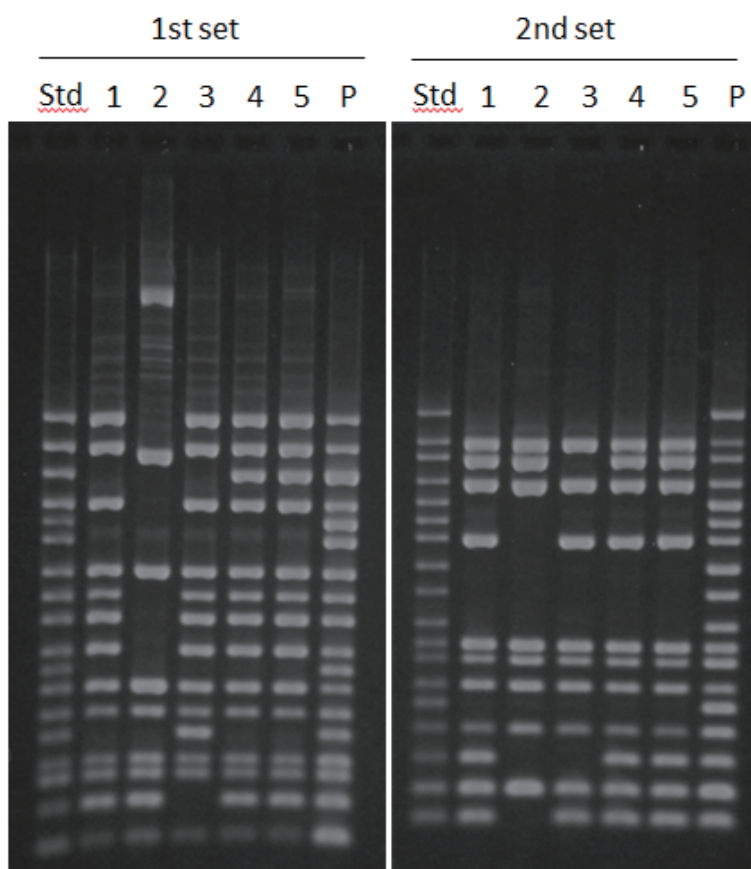
(G)



(H)



(I)

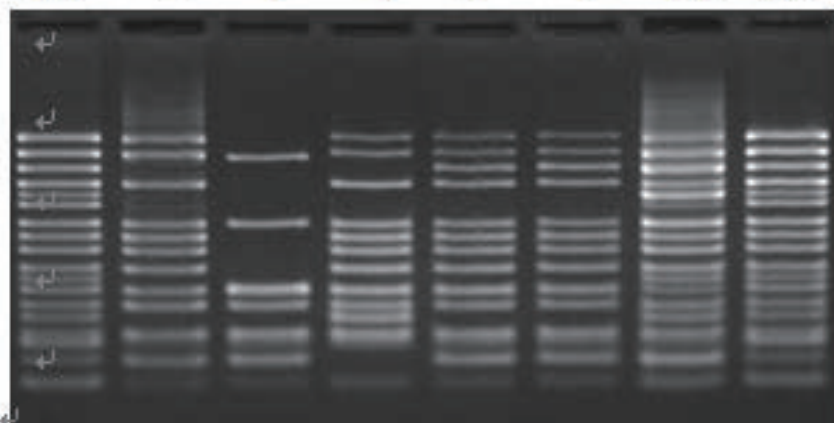


Std: Standard DNA
1: No.1940
2: No.1945
3: No.1947
4: No.1950
5: No.1951
P: Template Mix

(J)

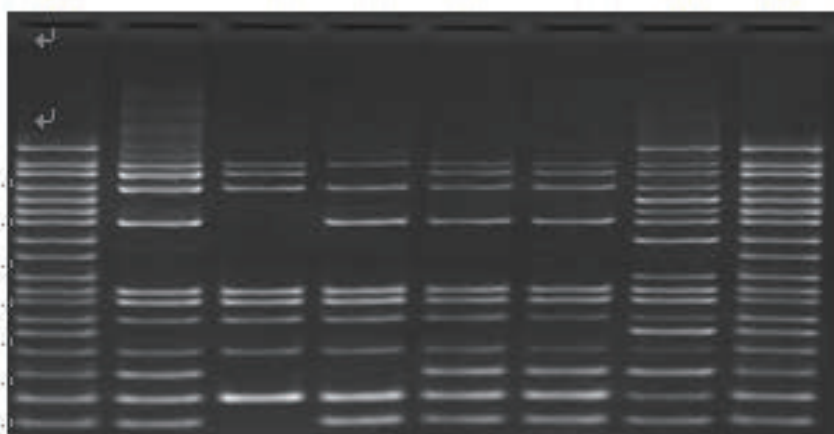
1st set.

St 1 2 3 4 5 PC St



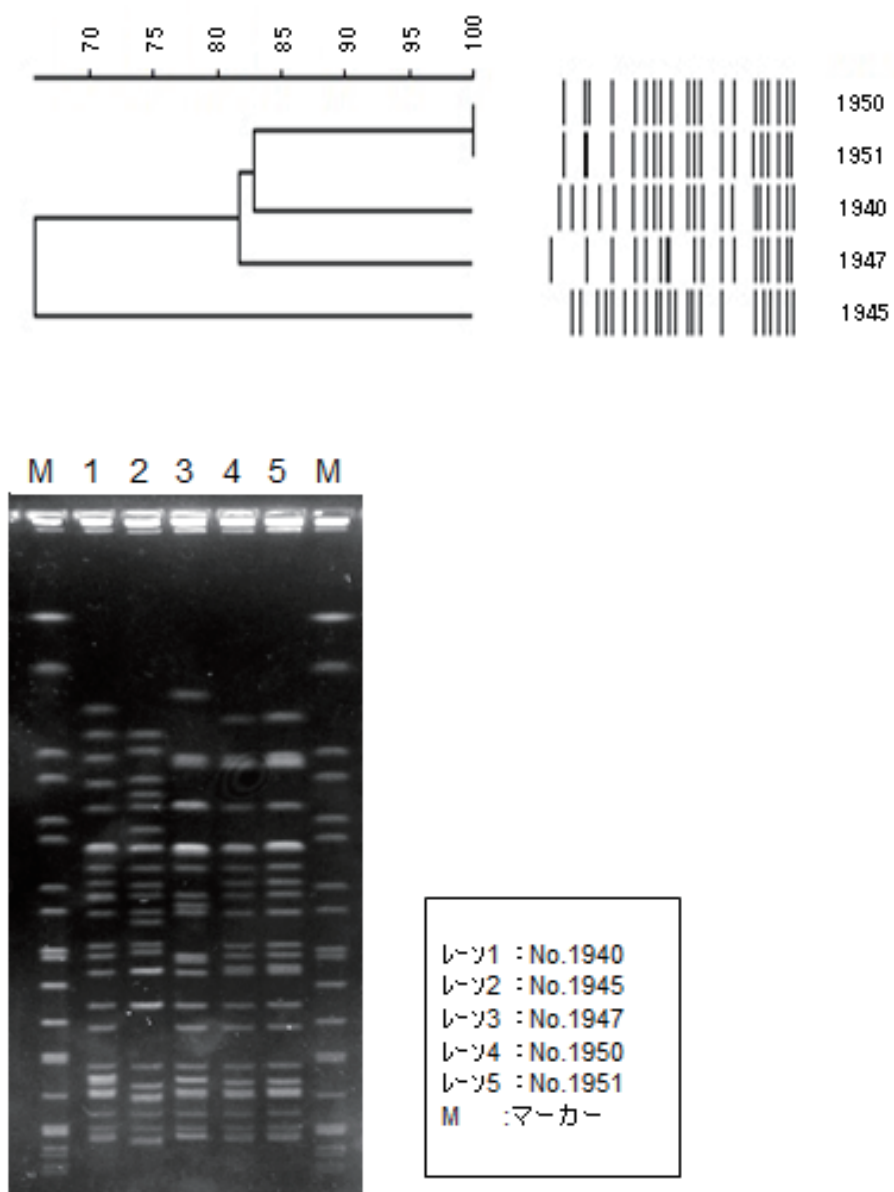
2nd set

St 1 2 3 4 5 PC St

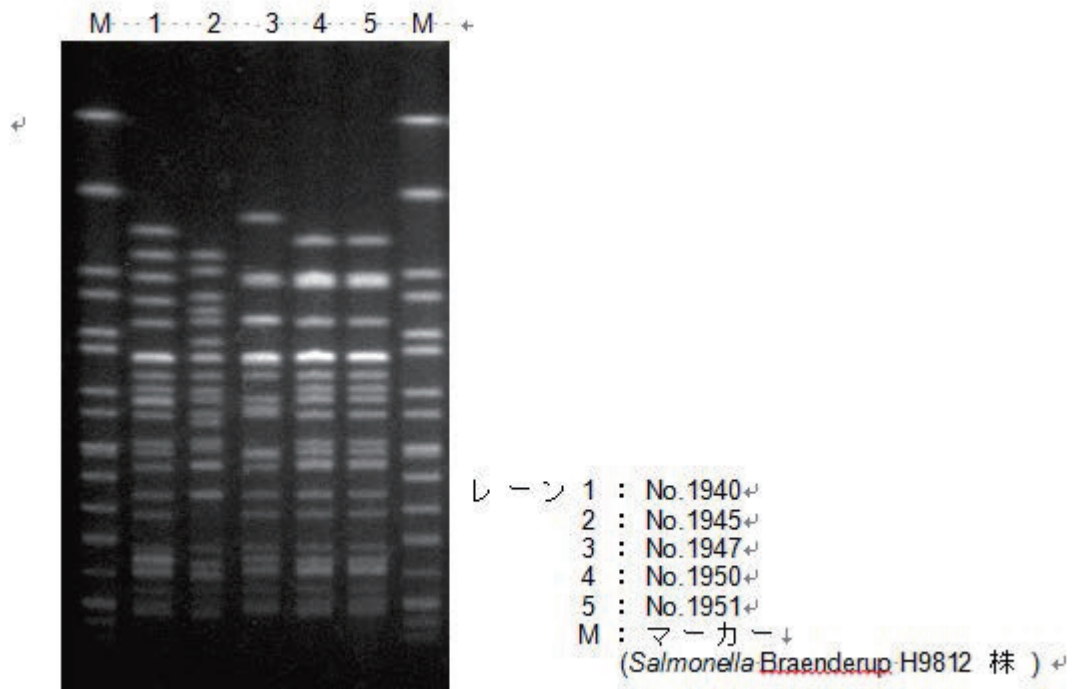
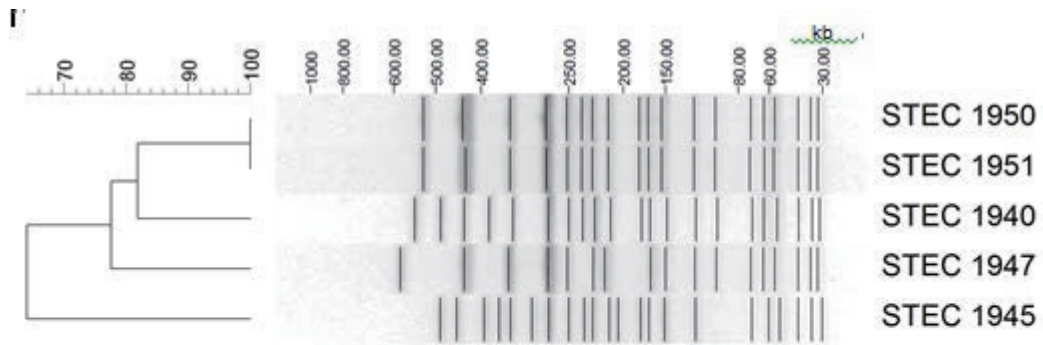


- 1: STEC1940(O157:H7)-----St:スタンダード.
2: STEC1945(O157:H7)-----PC:ポジティブコントロール
3: STEC1947(O157:H7).
4: STEC1950(O157:H7).
5: STEC1951(O157:H7).

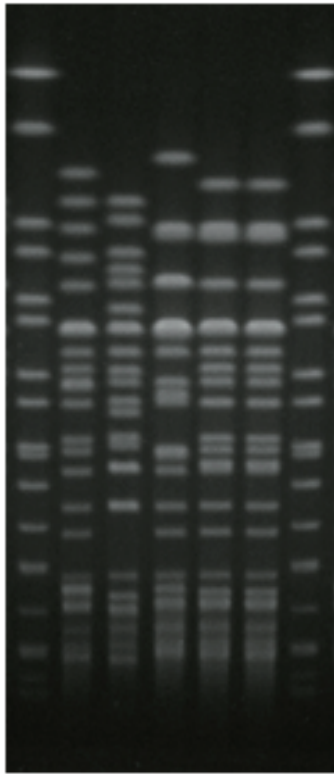
図2 PFGE 法による泳動像とデンドログラム解析結果
(C)



(D)



(E)



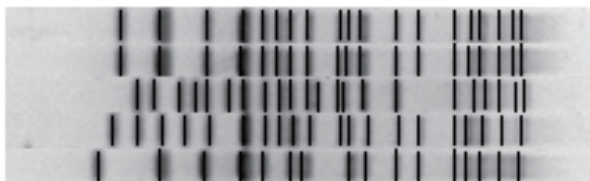
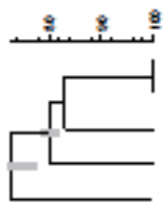
レーン1: 1940.
レーン2: 1945.
レーン3: 1947.
レーン4: 1950.
レーン5: 1951.

M 1 2 3 4 5 M

PFGE 検体写真

PFGE-XbaI

PFGE-XbaI

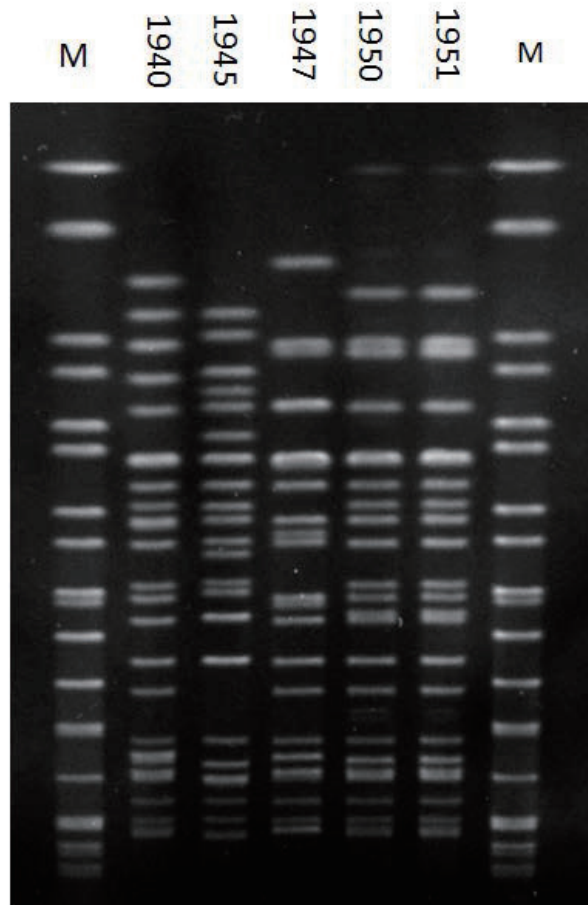


1961.
1969.
1945.
1949.
1947.

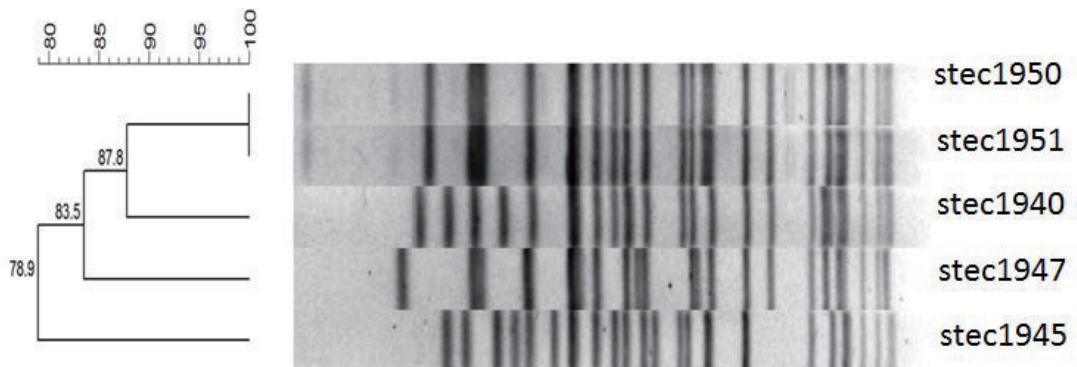
PFGE 検体 dendrogram 解析結果

(F)

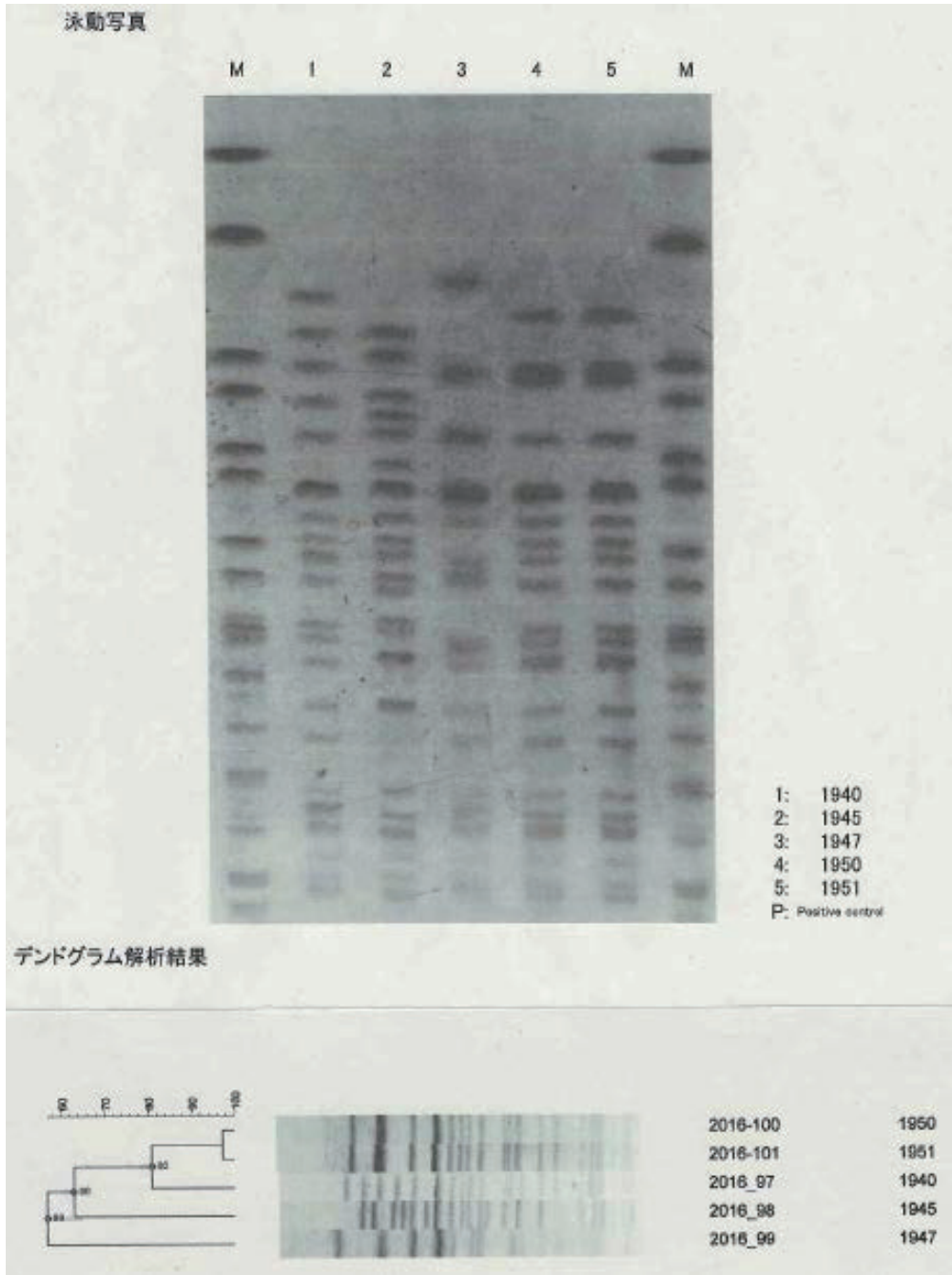
PFGE(Xba1)



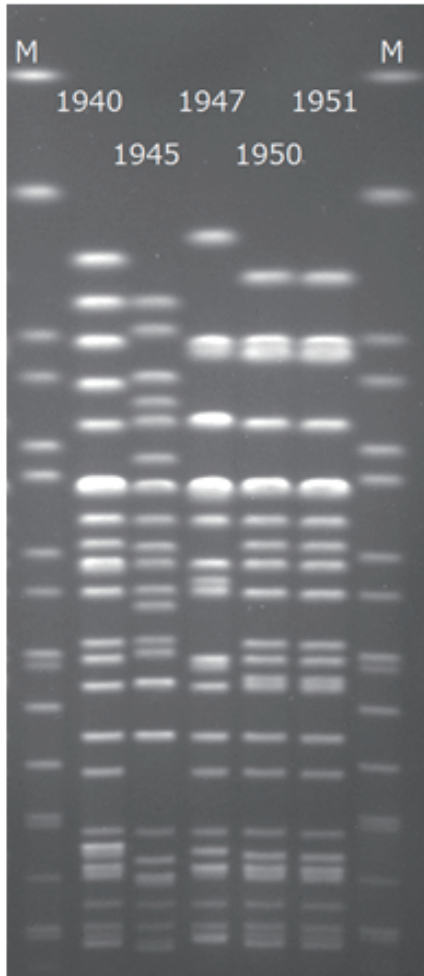
デンドログラム (UPGMA法、係数; Dice)



(G)

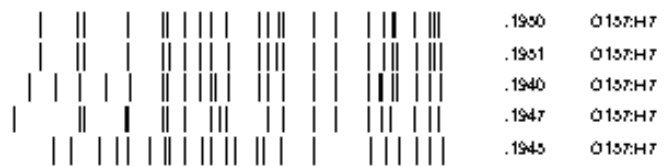
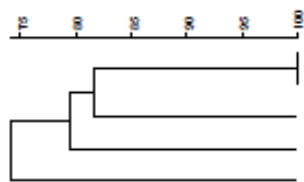


(H)

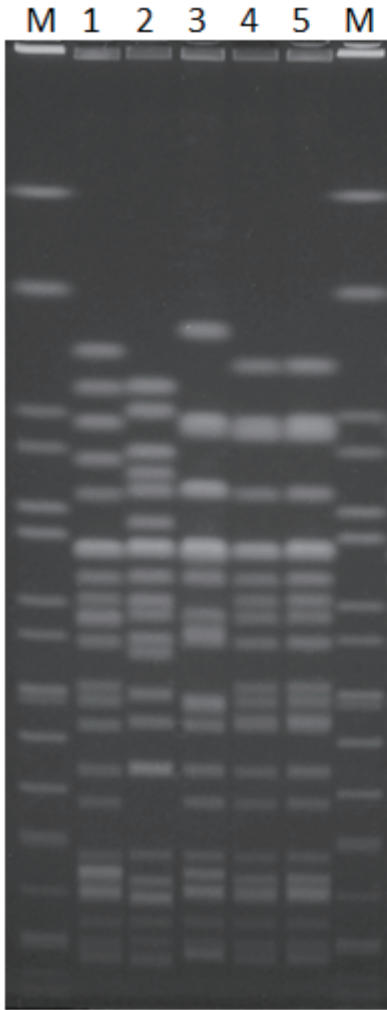


M	: Marker (<i>S. Braenderup</i>)
1940	: STEC 1940
1945	: STEC 1945
1947	: STEC 1947
1950	: STEC 1950
1951	: STEC 1951

Dist. [25.1.0% - 10%] [400.0% 530.0%] [2.0% - 100.0%]
EHEC **EHEC**



(I)



M: Marker(S.Vraenderup H9812)

1: No.1940

2: No.1945

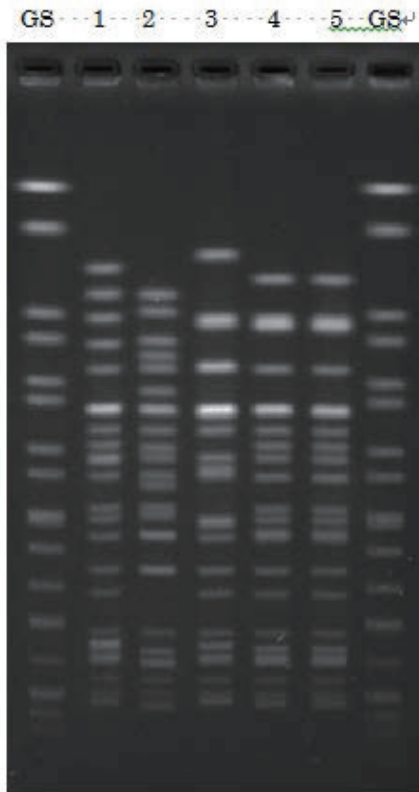
3: No.1947

4: No.1950

5: No.1951

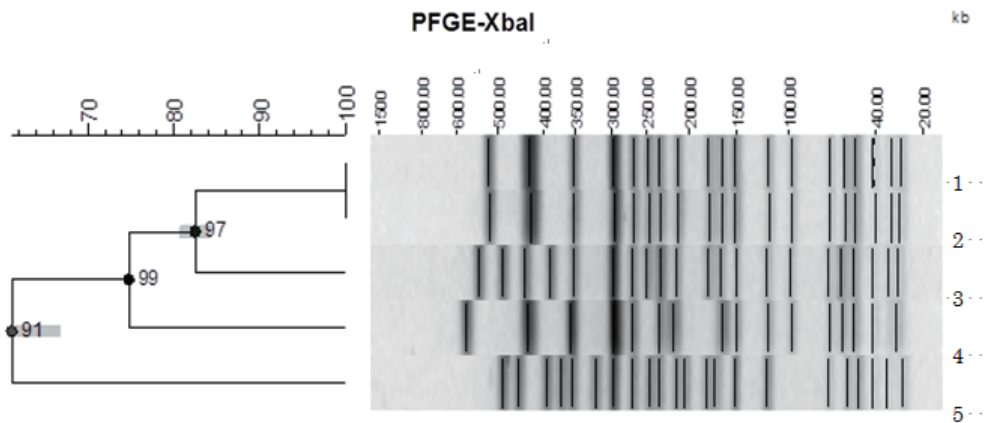


(J)



- 1: STEC 1940 (O157:H7)↵
- 2: STEC 1945 (O157:H7)↵
- 3: STEC 1947 (O157:H7)↵
- 4: STEC 1950 (O157:H7)↵
- 5: STEC 1951 (O157:H7)↵
- GS: Gold Standard↵

PFGE法 (デンドログラム解析結果) ↵



- 1: STEC 1950 (O157:H7)↵
- 2: STEC 1951 (O157:H7)↵
- 3: STEC 1940 (O157:H7)↵
- 4: STEC 1947 (O157:H7)↵
- 5: STEC 1945 (O157:H7)↵

表3 PFGE 法による解析結果

デンドロビウム結果		施設数
65～100 (No.1945→1947→1940→1950, 1951)		6
67～100 (No.1947→1940 or 1945→1945 or 1940→1950, 1951)		2
解析せず		1
実施せず		1

表4 MLVA 法による解析結果

施設	菌株No	#1								
		O157-34Y	EHC-1Q	EHC-2C	O157-9M	EHC-5S	O157-3W	O157-25J	EH111-8O	EH157-12N
(D)	1940	12	5	5	11	2	9	5	1	4
	1945	10	7	4	12	-2	7	3	1	7
	1947	12	6	4	8	-2	16	5	1	4
	1950	12	6	4	12	-2	8	8	1	4
	1951	12	6	4	12	-2	8	8	1	4
(E)	1940	10*			11		9	5		
	1945	8*			12		7	3		
	1947	10*			8		16	5		
	1950	10*			12		8	8		
	1951	10*			12		8	8		
(F)	1940	12	5	5	11	2&10	9	5	-2	4
	1945	10	7	4	12	-2	7	3	-2	7
	1947	12	6	4	8	-2	16	5	-2	4
	1950	12	6	4	12	-2	8	8	-2	4
	1951	12	6	4	12	-2	8	8	-2	4
(I)	1940	12	5	5	11	10	9	5	-2	4
	1945	10	7	4	12	-2	7	3	-2	7
	1947	12	6	4	8	-2	16	5	-2	4
	1950	-2	6	4	13	-2	8	8	-2	4
	1951	-2	6	4	12	-2	8	8	-2	4

*CDC プライマー使用のため、2 つずつ異なっている。

施設	菌株No	#2							
		EH111-14B	EH111-11	O157-17Z	O157-36A	O157-19L	EHC-6U	O157-37V	EH26-7D
(D)	1940	-2	2	7	9	6	6	6	-2
	1945	-2	2	3	-2	5	-2	8	-2
	1947	-2	2	7	7	5	-2	8	-2
	1950	-2	2	7	3	6	-2	6	-2
	1951	-2	2	7	3	6	-2	6	-2
(E)	1940			7	9	6		6	
	1945			3	-2	5		8	
	1947			7	7	5		8	
	1950			7	3	6		6	
	1951			7	3	6		6	
(F)	1940	-2	2	7	9	6	6	6	-2
	1945	-2	2	3	-2	5	-2	8	-2
	1947	-2	2	7	7	5	-2	8	-2
	1950	-2	2	7	3	6	-2	6	-2
	1951	-2	2	7	3	6	-2	6	-2
(I)	1940	-2	2	7	9	6	6	6	-2
	1945	-2	2	3	-2	5	-2	8	-2
	1947	-2	2	7	7	5	-2	8	-2
	1950	-2	2	7	3	6	-2	6	-2
	1951	-2	2	7	3	6	-2	6	-2

表5 IS-PS 解析集のエキストラバンド出現位置と IS コード

県・事例No	IS-PS		エキストラバンドの位置		
	set-1	set-2	set-1		
C ⑦	000000100001101111	011100000011101010	1-01の上	1-02と1-03の間	
C ⑥	000100001001101101	011000101010001110	1-01の上	1-09と1-10の間	1-14と1-15の間
C ⑩	010000101001101111	010100100010001010			
D ④	010100101001101111	011000101010001110	1-14と1-15の間		
C ②	010100101001101111	110000100011101011	1-02と1-03の間	1-14と1-15の間	
C ④	010100101001101111	110100100011101011	1-02と1-03の間	1-14と1-15の間	
F ①	010100111101101111	100100100001101101	1-01の上	1-02と1-03の間	
C ①	100000100000101101	110000000011011111	1-01の上		
C ③	100100001000101111	110000110001001110	1-01の上		
H ①	100100111101111111	011000100111100101	1-01の上		
E ③	110000101001101111	010100100011001010	1-01の上		
E ④	110000101001101111	010100100011001010	1-01の上		
D ①	110001100000101111	110100000011101010	1-01の上	1-12と1-13の間	
C ⑨	110100111100111101	011100100111101101	1-01の上		
C ⑤	111100111101101111	011100100011101111			

IS コードは増幅バンド陽性が「1」、陰性が「0」

県・事例No	IS-PS		エキストラバンドの位置	備考
	set-1	set-2	set-2	
C ⑦	000000100001101111	011100000011101010		C ⑦とB ①～④は同じ
C ⑥	000100001001101101	011000101010001110	2-stx1の下	
C ⑩	010000101001101111	010100100010001010	2-01の上	
D ④	010100101001101111	011000101010001110	2-stx1の下	
C ②	010100101001101111	110000100011101011		
C ④	010100101001101111	110100100011101011	2-01の上	C ④, ⑧, ⑩とD ⑤は同じ
F ①	010100111101101111	100100100001101101		
C ①	100000100000101101	110000000011011111		
C ③	100100001000101111	110000110001001110	2-01の上	C ③とD ②, ③とF ②は同じ
H ①	100100111101111111	011000100111100101		H ①～④は同じ
E ③	110000101001101111	010100100011001010	2-01の上にバンド2本	
E ④	110000101001101111	010100100011001010	2-01の上	E ④, ⑤, ⑥, ⑦は同じ
D ①	110001100000101111	110100000011101010		
C ⑨	110100111100111101	011100100111101101		C ⑨とE ①は同じ
C ⑤	111100111101101111	011100100011101111	2-01と2-02の間	C ⑤とE ②は同じ

表6-1 複数県で発生した EHEC O26 の同一 MLVA 型、MLVA complex 株による事例

県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	VT型	MLVA型	MLVA complex	備考(疫学的関連など)
B	SE16003	4	26	11	1	13m2040	16c204	患者家族
	SE16004	4	26	11	1	13m2040	16c204	
	SE16005	4	26	11	1	13m2040	16c204	
	SE16006	4	26	11	1	13m2040	16c204	
D	EH16-07	7	26	11	1	13m2040	16c204	

表6-2 複数県で発生した EHEC O157 の同一 IS コード株による事例

No	県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	VT型	ISコード(1st)	ISコード(2nd)	MLVA型	MLVA complex	備考(疫学的関連など)
①	C	1945	8	157	7	2	001457	610652	16m0110	16c027	沖縄サトウキビジュース集発関連株
		SE16009	8	157	7	2	001457	610652	16m0110	16c027	
	B	SE16010	8	157	7	2	001457	610652	16m0110	16c027	沖縄サトウキビジュース集発関連株 (No9の家族)
		SE16011	8	157	7	2	001457	610652	16m0110	16c027	
		SE16012	8	157	7	2	001457	610652	16m0110	16c027	
D	EH16-12	8	157	7	2	201457	610652	16m0110	16c027	沖縄サトウキビジュース集発関連株 (16-11の家族)	
	EH16-11	8	157	7	2	201457	610652	16m0384	16c027		
②	D	EH16-08	7	157	7	2	305457	211642	14m0056	16c021	
	E	16027	11	157	7	2	305457	211642	15m0278	16c059	
	H	EH16-12	7	157	7	2	305457	211642	16m0142	16c025	
	J	162085	6	157	7	2	305457	211642	16m0321	16c025	
③	I	4	9	157	7	1.2	317577	211756	13m0625	16c026	
	C	1984	11	157	7	1.2	317577	211756	16m0093	16c070	
		1975	10	157	7	1.2	317577	211756	16m0094	16c026	
④	D	EH16-16	8	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036	
		16008	7	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036	
	E	16012	8	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036	
		16Y04	7	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036	16Y04の家族
		16Y05	7	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036	
		16Y07	7	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036	
	16Y07	7	157	7	1.2	317577	211757	15m0434	16c036		
C	1970	10	157	7	1.2	317577	211757	16m0389			
	1988	10	157	7	1.2	317577	211757	16m0389			
	1978	10	157	7	1.2	317577	211757	16m0389			
⑤	C	1949	8	157	7	1.2	717557	611657	13m0694	16c010	
		16Y08	7	157	7	1.2	717557	611657	15m0099	16c010	
		16Y09	7	157	7	1.2	717557	611657	15m0099	16c010	
	E	1934	4	157	7	1.2	717557	611657	16m0079	16c078	
		16011	8	157	7	1.2	717557	611657	16m0134		
	C	1950	8	157	7	1.2	717557	611657	16m0228	16c010	Gの同一店舗で喫食歴有り。原因不明。
		1951	8	157	7	1.2	717557	611657	16m0228	16c010	
		1963	8	157	7	1.2	717557	611657	16m0228	16c010	
	D	EH16-14	8	157	7	1.2	717557	611657	16m0228	16c010	
		EH16-17	8	157	7	1.2	717557	611657	16m0228	16c010	
	G	12	9	157	7	1.2	717557	611657	16m0261		
	C	1958	9	157	7	1.2	717557	611657	16m0317	16c010	
		1968	9	157	7	1.2	717557	611657	16m0319		
D	1979	9	157	7	1.2	717557	611657	16m0419	16c078		
D	EH16-27	9	157	7	1.2	717557	611657	16m0419	16c078	推定感染地域:C	
⑥	C	1936	5	157	7	1.2	717577	611657	16m0080		
		162086	7	157	7	1.2	717577	611657	16m0089	16c055	患者No162086の家族
	162087	7	157	7	1.2	717577	611657	16m0089	16c055		
	162088	7	157	7	1.2	717577	611657	16m0089	16c055		
	H	EH16-13	8	157	7	1.2	717577	611657	16m0132		
C	1966	9	157	7	1.2	717577	611657	16m0132			
⑦	E	16004	6	157	-	1	317175	611755	16m0131		
		1980	10	157	-	1	317175	611755	16m0390		
	C	1987	10	157	-	1	317175	611755	16m0390		

: IS コード、MLVA 型、MLVA complex が一致

鳥取県における IS-printing System の検討

研究協力者 佐倉 千尋 鳥取県衛生環境研究所

研究要旨

平成28年度に研究班で実施の IS-printing System (以下「IS」という。) 精度管理において陽性コントロールの一部のバンドが不鮮明化もしくは欠損する現象が生じた。Tm 値の低い一部のプライマーにおける PCR 反応性の低下が考えられることにより、マルチプレックス PCR の条件検討 (テンプレートの高濃度化) や不鮮明化および欠損するバンドを検出するためのシングル PCR 等を実施した。マルチプレックス PCR の条件検討では不鮮明化および欠損するバンドは改善されなかったが、シングル PCR との組合せで、IS を分子疫学に関する遺伝子解析手法として用いることは可能と考えられた。

A. 研究目的

IS の精度管理において陽性コントロールの一部のバンドの不鮮明化や欠損が認められ、試験不成立となったことより、当所において IS を行政検査や精度管理に使用する可能性を検証するため、マルチプレックス PCR の条件変更やシングル PCR での検出を試みた。

B. 研究方法

1. 使用菌株

平成28年度中国四国ブロック精度管理事業で提供された O157:H7 菌株 5 株を用いた。

2. 検討条件

(1) IS のマルチプレックス PCR 条件の検討

東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所の助言により、相対的なテンプレート量を増やし反応性を上げる目的で、IS のキット (TOYOBO QCIS-001) に記載の反応液の液量を半量である 25 μ L にし、テンプレート量およびその他の条件は変更せずにマルチプレックス PCR を実施した。

サーマルサイクラーは、Bio-Rad 社 S1000 であり、Ramp rate (温度変化率)

の設定が可能であり IS キットの PCR 条件に合わせ 2°C/sec に設定し、試験を実施した。

(2) シングル PCR

陽性コントロールの PCR 産物において不鮮明なバンド (1st set の 561bp(1-06)、137bp(*hlyA*)、2nd set の 449bp(2-09)、301bp(2-13)、240bp(2-15)) に対応するプライマーセットを用い、陽性コントロール及び供試菌株抽出 DNA のシングル PCR を実施した。試薬はプライマーを除き IS キットのものを用い、プライマーの終濃度は 0.5 μ M、アニーリング温度は 50°C で実施した。

(3) 陽性コントロールの追加

不鮮明なバンド ((2)に記載) に対応する各々の陽性コントロール (DNA 濃度約 250ng/ μ l、東洋紡 (株) より提供) を Template mix (DNA 濃度約 2ng/ μ l、IS キットに含む) に 1:110(2nd は 120)、1:2、1:1 の割合で追加し、マルチプレックス PCR を実施した。なお、反応液の液量は 25 μ L とした。

C. 研究結果

1. IS の PCR 条件の検討

反応液の液量を 50 μ L から 25 μ L へ変更したところ、不鮮明化した陽性コントロールのバンドの濃度でいくらかの改善が認められたが、2nd set の 449bp におけるバンドの欠損に変化は認められなかった (図 1-a,1-b)。

2. シングル PCR

1st set の 561bp(1-06)、137bp(*hlyA*)、2nd set の 449bp(2-09)、301bp(2-13)、240bp(2-15)についてシングル PCR を実施したところ、図 2-a,2-b のとおり、すべての陽性コントロール、および供試菌株の一部において結果判定に十分な増幅産物を得ることができた。

3. 陽性コントロールの追加

不鮮明なバンドに対応する各々の陽性コントロールを Template mix 追加したところ、追加割合 1:110(2nd では 120)では改善は認められず、1:2 もしくは 1:1 で改善が認められた (図 3)。

D 考 察

当所で不鮮明化もしくは欠損した陽性コントロールのバンドに対応するプライマー (inside primer を除く。) はいずれも Tm 値が 50°C 以下 (IS inside for 1st,2nd set primer を除く。) と低く、IS キットのマルチプレックス PCR サイクル条件のアニーリング温度である 64°C では十分にテンプレートにアニールできていない可能性が考えられた。上記プライマー以外のキットに含有されるプライマー (IS inside for 1st,2nd set primer を除く。) の平均 Tm 値は 68.6°C であり、Tm 値の違いが PCR の増幅効率に影響を及ぼしていると推察された。

陽性コントロールが不鮮明もしくは欠損

したバンドサイズにおける供試菌株の判定はシングル PCR により可能であり、当所で IS を行政検査における分子疫学解析に使用するには、キットによるマルチプレックス PCR と 5 種のシングル PCR の組み合わせが必要であることが明らかになった。

不明瞭なバンドに対応する各々の陽性コントロールの Template mix (IS キットに含む) への追加は陽性コントロールのマルチプレックス PCR における増幅産物の泳動像を改善させ、IS キットの試験成立条件を満たすことに繋がったが、不鮮明もしくは欠損であったバンドサイズ部分の供試菌株における増幅効率を保証するものではない。したがって陽性コントロールを Template mix に追加したマルチプレックス PCR のみを用いて行政検査や精度管理を実施するにはさらなる検討が必要である。

今後は、マルチプレックス PCR のアニーリング温度を IS キットに記載の条件である 64°C から下げることや、サイクル数を上げることが検討したい。またプライマーの Tm 値を上げる方法として LNA (Locked Nucleic acid) 修飾も検討し改善に繋げたい。

E 結 論

1. 反応液量を 1/2 に減らして実施したものの、IS キットでは 1st set 及び 2nd set の陽性コントロールにおける 18 本のバンドパターンのうち、Tm 値の低いプライマーが対応するバンドが不鮮明化もしくは欠損することがある。

2. IS キットとシングル PCR との組合せにより、Tm 値の低いプライマーに対応するバンドパターンについても判定することが可能である。

3. IS キットに添付の Template mix への

陽性コントロールの追加は、同じバンドサイズにおける供試菌株の増幅効率を保証するものではなく、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

なし

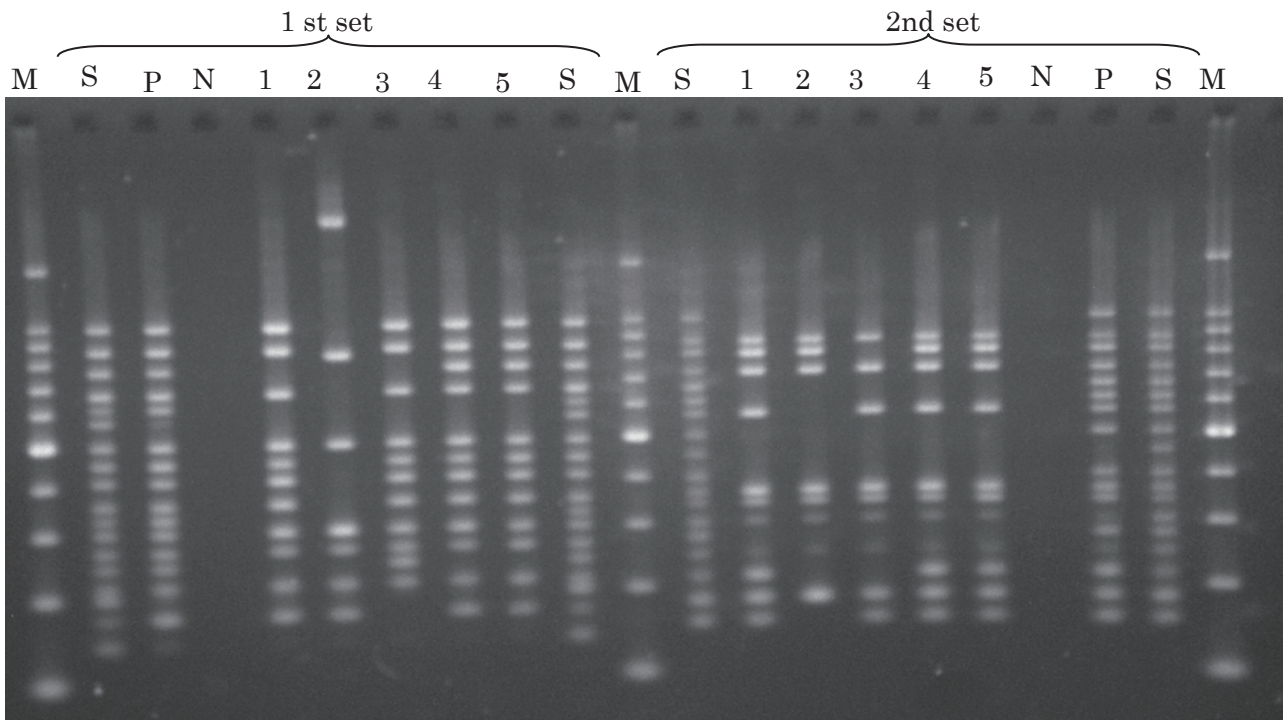


図 1-a 50 μ l 系での IS キットによるマルチプレックス PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

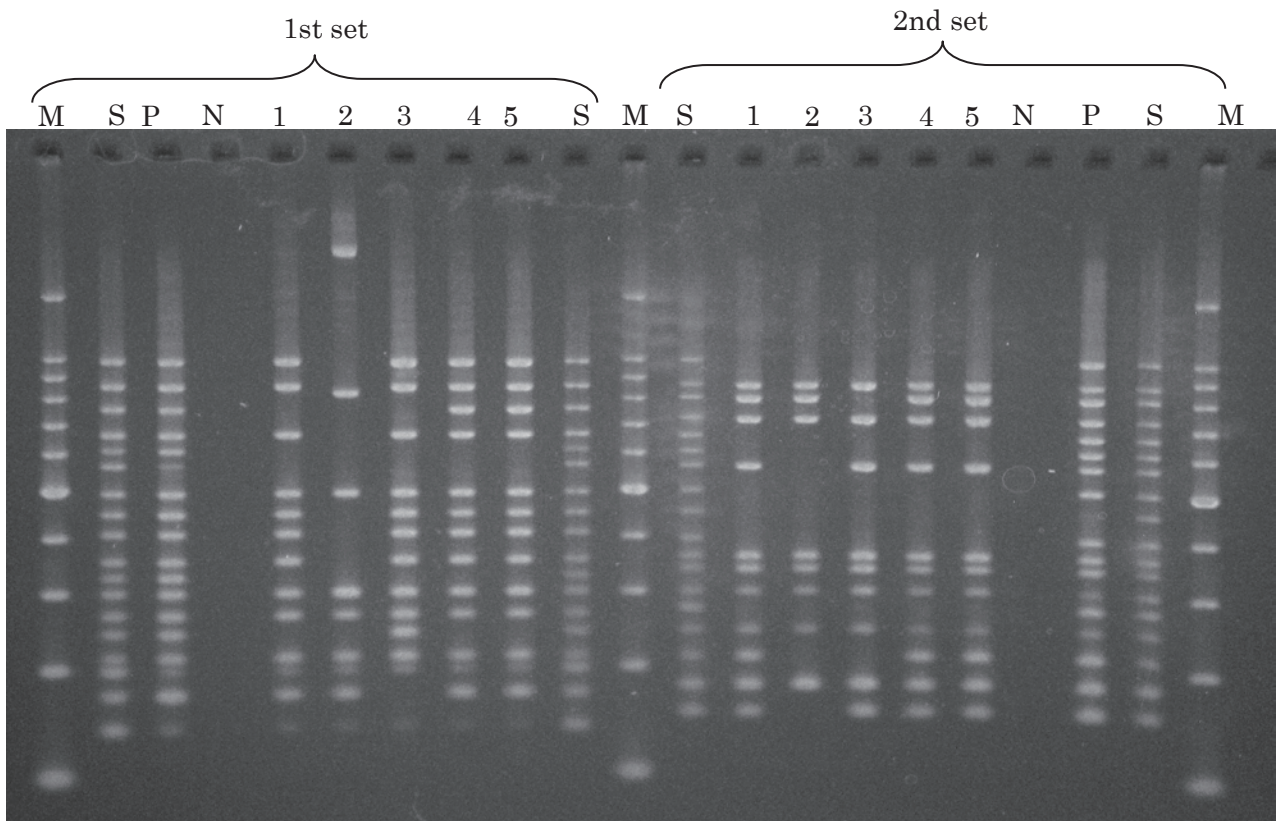


図 1-b 25 μ l 系での IS キットによるマルチプレックス PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

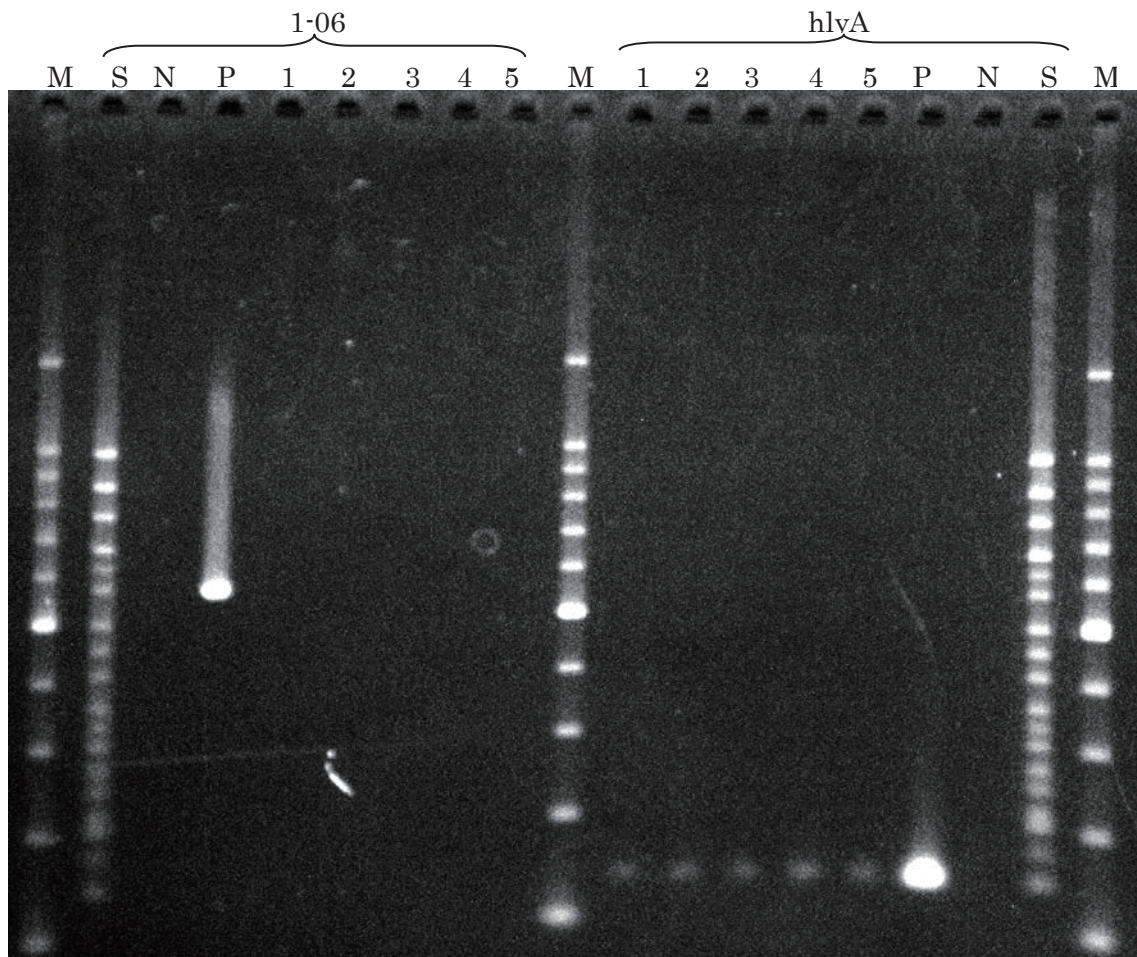


図 2-a 1st set の 561bp(1-06)、137bp(*hlyA*)シングル PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

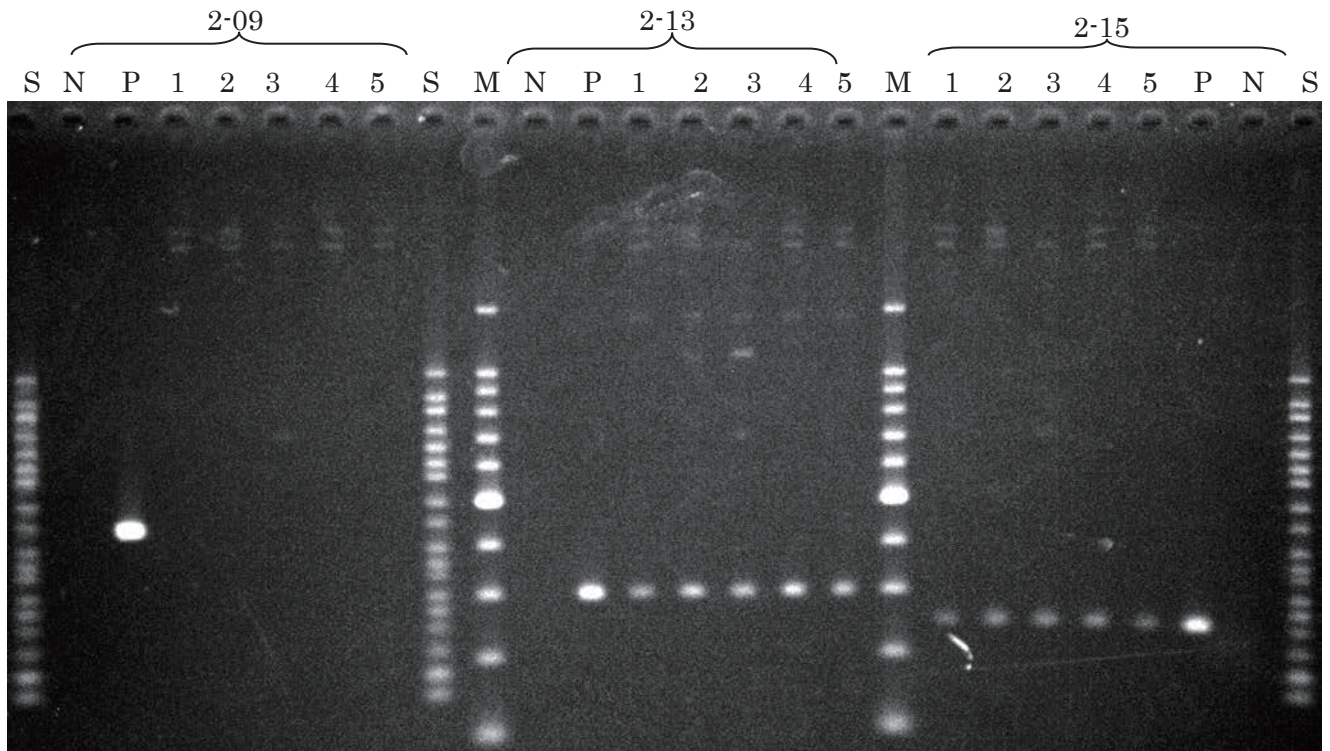


図 2-b 2nd set の 449bp(2-09)、301bp(2-13)、240bp(2-15)シングル PCR (M:マーカー、S:スタンダード DNA、P:陽性コントロール、N:陰性コントロール、1~5:供試菌株)

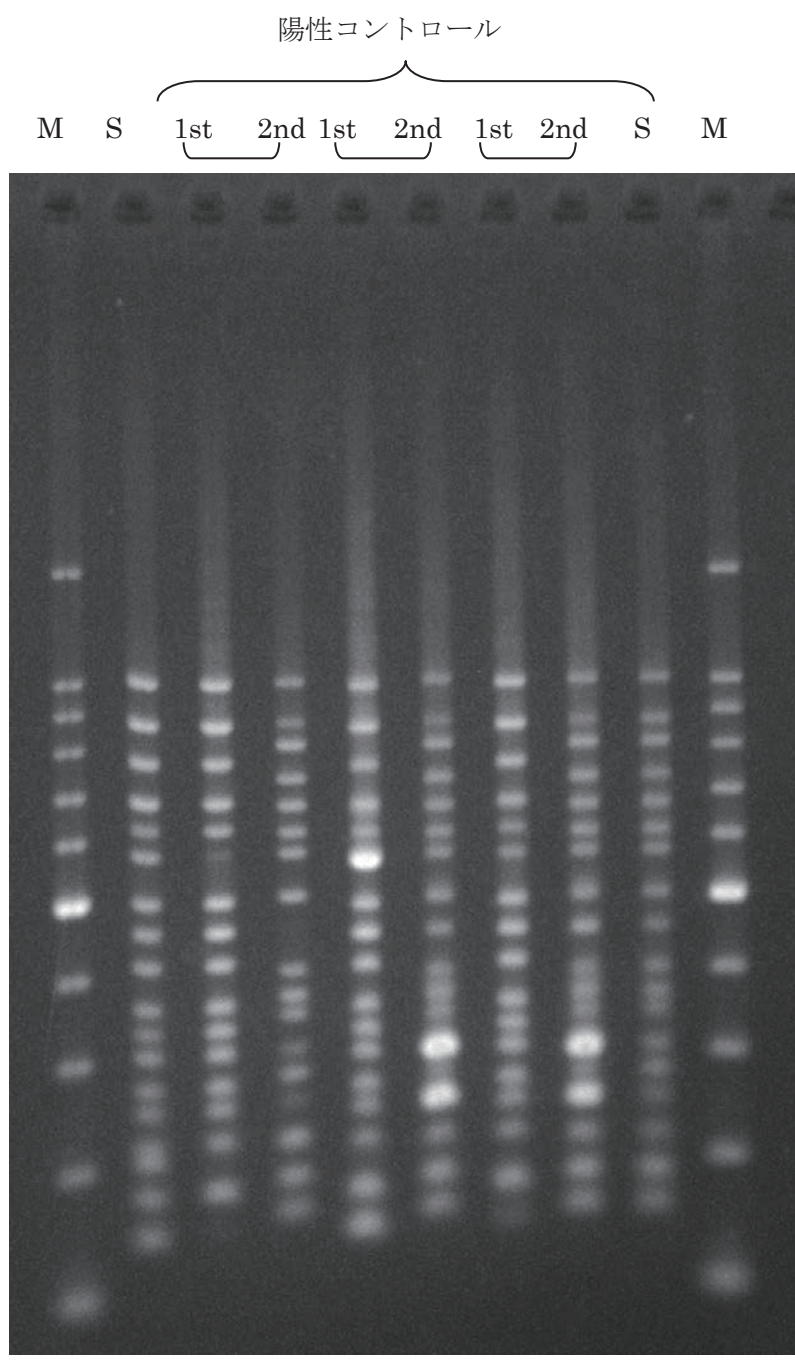


図3 陽性コントロール (DNA 濃度約 250ng/ μ l) を Template mix に追加したマルチプレックス PCR (左から追加の割合 1:110(2nd set は 120)、1:2、1:1 の順)

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 福間藍子

研究要旨

2016年度(平成28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 2 件 5 株について IS printing 法(以下 IS 法)を実施し、事例間での疫学的関連性について検討した。

IS 法による解析結果は MLVA 法による結果と一致し、事例内では同一の 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 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 法の解析結果はデジタルデータであるためデータの比較が容易であり、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 28 年度中に届出のあった O157 感染症 2 事例 5 株を用いた。

2. 方法

(1)O157 の 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。

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 (IS コー

ド) した (表 1)。

(2) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法

国立感染症研究所 (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 28 年度の O157 感染症の発生は 7 月 15 日届出から 8 月 17 日届出までの 5 件 (2 事例、事例 A、B) であった。

当所における IS 法による解析では、事例 A と B の IS コードは異なっていた。また、事例 B では事例内で複数の患者等があったが、IS コードは同一であり、疫学情報と一致した。ただし、事例 B では primer set 1-02 と 1-03 の間に明瞭なエキストラバンドが発生しており、注意深く陽性コントロールと比較する必要性が感じられた。

感染研の MLVA 法による解析でも、事

例 A、B の MLVA type は事例ごとに同一の MLVA type が得られ、IS 法の結果と一致した。

D 考察

平成 28 年度の島根県で発生した O157 2 事例の IS 法と MLVA 法の結果が一致しており、IS コード、MLVA type は事例ごとに異なり、事例内では同一であった。

事例 B は平成 28 年 7 月下旬から沖縄県で発生した O157 感染症事例の関連株であったが、IS 法を用いることにより解析結果を関係自治体に迅速に情報提供することができた。一般的に IS 法の型別能力は MLVA 法より低いとされるが、疫学的関連のある菌株は同じ 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 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>eae</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)	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
係数	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
加算	7			1			7			5			5			5		

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	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	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
加算	2			1			1			6			5			7		

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	2016/07/15	1&2	717555	211657	16m0199		
	2	2016/08/12	2	001457	610652	16m0110	16c027	
B	3	2016/08/15	2	001457	610652	16m0110	16c027	No.2~5
	4	2016/08/16	2	001457	610652	16m0110	16c027	は家族
	5	2016/08/17	2	001457	610652	16m0110	16c027	

広島県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

2016年に広島県で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 18株について、PFGE法、IS法、MLVA法による解析を行った。その結果、家族事例 (4例8株) では、すべて、PFGE法では1バンド以内の相違、IS法では同一のISコード、MLVA法では1遺伝子座以内の相違を示し、分子疫学的にも関連があるという結果が得られた。今回の結果からは、3法は同等の解析能力を有していると考えられた。一方、疫学情報からは関連が認められない菌株間でも、3法いずれにおいても、関連があると解釈される例が複数存在したことから、疫学情報を考慮した結果の解釈が重要であると考えられた。

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 IS-printing System (IS) 法、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法の有用性が報告されており、2014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、本県でも MLVA 法を導入している。本年は、EHEC O157 による感染症事例が多く発生したため、PFGE 法、IS 法、MLVA 法により解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

広島県内で分離され、2016年に当センターへ搬入された EHEC O157 18株を用いた。各菌株および患者の概要を表 1 に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

国立感染症研究所の方法¹⁾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。バンドパターンの相違数が 3 以内を同一クラスターとして分類した。

(2) IS 法

IS-printing System (東洋紡) を用い、取扱説明書に従って実施した。判定は、2 種類のプライマーセット (1st set, 2nd set) ごとに、増幅ありを「1」、増幅なしを「0」とし、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て、1st set, 2nd set の順に並べ、12桁の IS コードとした。

(3) MLVA 法

Izumiya ら²⁾の方法に従い、O157-10を除いた17ヶ所のLocus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。リピート数の相違が1遺伝子座以内[Single locus variant (SLV)] を同一グループとして分類した。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。

C. 研究結果

1. PFGE 法

EHEC O157 18株は、PFGE法により12のパターンに分類された(図1)。家族事例では、PFGEパターンが16-09/-13は1バンド違い(クラスターc)、16-11/-12 (b)、16-18/-19 (c)、16-23/-24 (a)は完全に一致し、それぞれ同一クラスターに分類された。その他、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、16-23/-24と-08、16-18/-19と16-09/-13、さらに-01、-14、-17、-20、-26が3バンド以内の相違で同一クラスターに分類された。

2. IS 法

EHEC O157 18株は、IS法により8パターンのコードを示した(表1)。家族間では、すべて同一のISコードを示した。(16-09/-13, 16-11/-12, 16-18/-19, 16-23/-24)。一方、疫学情報では関連のない菌株間では、16-18/-19と-01、-03、-20、-26、また、16-14、17、27のISコードが一致した。

3. MLVA 法

EHEC O157 18株をMLVA法により解析した結果を、表1および図2に示した。家族事例では、16-09/-13 (complex A)、16-18/-19 (A)、16-23/-24 (D)は、それぞれリピート数が完全に一致、16-11/-12 (B)は1遺伝子座違い(SLV)で同一complexに分類された。また、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、16-09/-13と16-18/-19、さらに-01、-03、-20、-26 (A)、16-14/-17 (C)が1遺伝子座以内の相違で同一complexに分類された。

D. 考 察

2016年に広島県内で分離されたEHEC O157 18株について、PFGE法、IS法およびMLVA法により解析した。

国立感染症研究所の示した分類では、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し³⁾、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する。

今回解析した18株は、家族事例が4例8株(16-09/-13, 16-11/-12, 16-18/-19,

16-23/ -24) 存在したが、これらはすべて、PFGE 法では 1 バンド以内の相違、IS 法では同一の IS コード、MLVA 法では 1 遺伝子座以内の相違を示し、関連があるという結果が得られた。

一方、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、関連があると解釈される株が複数認められた。16-14 と-17 は、PFGE 法では 1 バンド違い、IS 法および MLVA 法で一致し、届出日も近いことから、地域は異なるが、関連を有する可能性があると考えられた。また、16-20 は、16-18/ -19 の家族と PFGE 法、IS 法、MLVA 法のすべてで完全に一致し、届出日、地域も一致していることから、疫学的関連は不明であるが、関連を有する可能性が示唆された。

16-09/ -13 の家族事例と 16-18/ -19 の家族事例は、PFGE 法で同一クラスター (c)、MLVA 法では SLV、IS 法でも 1 バンド違いという結果が得られ、地域は異なるが時期も近いため、関連している可能性もある。次に、16-01、-03、-26 は、MLVA では、これらの家族事例を含む 5 株とともに SLV の同一 complex に分類され、IS コードも一致したが、PFGE 法では、-01 と-26 は同一クラスター、-01 と-03 は 3 バンド違い、-03 と-26 は 6 バンドの相違で関係する可能性があるという結果であった。また、16-08 は、PFGE 法では 16-23/ -24 と 1 バンド違いで同一クラスターに分類されたが、MLVA 法では 3 遺伝子座、IS 法では 1 バンドの相違がみられた。また、16-27 と 16-14/ -17 は IS 法ではコードが一致したが、PFGE 法および MLVA 法では関連は認められなかった。解析法により結果の解釈が異なる場合、これらの関連性を明らかにする

には、詳細な疫学情報が必要であると考えられる。

3 法を比較すると、疫学情報から関連が認められる菌株間では、いずれの方法でも分子疫学的にも関連があると解釈される結果が得られており、同等の解析能力を有していると考えられた。

一方、疫学情報からは関連が認められない菌株間で、関連があると解釈される例も複数存在した。このような結果が得られた場合、必要に応じて、詳細な疫学調査を行い、分子疫学的解析の結果と併せて解釈を考慮することが重要であると考えられる。また、IS 法と MLVA 法は、PFGE 法に比べ、短時間で結果が得られ、操作も簡便であることから、それぞれ、O157、主要 3 血清群だけでなく、その他の血清群への応用が期待される。

E. 結論

2016 年に広島県内で分離された EHEC O157 18 株について、PFGE 法、IS 法、MLVA 法により解析した。3 法とも、家族事例では、分子疫学的にも関連があるという結果が得られた。一方、いずれの方法でも、疫学情報からは関連が認められない菌株間でも、関連を示唆する結果となった例も存在したことから、結果の解釈には、疫学情報を考慮することが重要であると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

1) 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

報告書, 10-21.

2) Izumiya H. et al. (2010): Microbiol Immunol, 54: 569- 577.

3) Tenover FC. et al. (1995): J Clin Microbiol, 33(9): 2233-2239.

表 1 腸管出血性大腸菌 O157 の菌株の概要と MLVA 法および IS-Printing System 法による解析結果

菌株番号	届出日	地域	年齢	性別	血清型	毒素型	疫学情報	各遺伝子座のリポーター数														ISコード					
								O157 -3	O157 -9	O157 -25	O157 -34	EH157 -12	EH111 -11	EH111 -8	EHC-1 -17	EHC-2 -19	EHC-5 -36	O157 -7	EH26 -7	EH111 -14	EHC-6 -14	MLVA complex	1st	2nd			
16-01	5/16	A	38	女	O157:H7	VT1,2		10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2*	7	6	3	7	-2	-2	-2	-2	317577	611657
16-03	5/11	B	77	男	O157:H7	VT1,2		10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	7	-2	-2	-2	-2	317577	611657
16-09	8/3	C	6	女	O157:H7	VT1,2		10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	7	-2	-2	-2	-2	317575	611657
16-13	8/12	A	67	女	O157:H7	VT1,2	16-09の家族	10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	7	-2	-2	-2	-2	317575	611657
16-18	8/23	B	77	男	O157:H7	VT1,2		10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	8**	-2	-2	-2	-2	317577	611657
16-19	8/26	B	72	女	O157:H7	VT1,2	16-18の家族	10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	8	-2	-2	-2	-2	317577	611657
16-20	8/26	B	67	女	O157:H7	VT1,2		10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	8	-2	-2	-2	-2	317577	611657
16-26	9/20	A	22	男	O157:H7	VT1,2		10	13	8	12	4	3	1	5	4	-2	7	6	3	7	-2	-2	12	317577	611657	
16-11	8/6	B	40	男	O157:H7	VT2		9	12	3	10	7	2	1	7	4	-2	3	5	-2	8	-2	-2	-2	201457	610652	
16-12	8/6	B	39	女	O157:H7	VT2	16-11の家族	7	12	3	10	7	2	1	7	4	-2	3	5	-2	8	-2	-2	-2	201457	610652	
16-14	8/20	D	13	男	O157:H7	VT1,2		8	12	8	12	4	2	1	6	4	-2	7	6	3	6	-2	-2	-2	717557	611657	
16-17	8/21	B	13	男	O157:H7	VT1,2		8	12	8	12	4	2	1	6	4	-2	7	6	3	6	-2	-2	-2	717557	611657	
16-23	9/7	B	94	女	O157:H7	VT2		8	12	5	9	6	2	1	9	5	-2	4	7	10	6	-2	-2	-2	205457	211642	
16-24	9/10	B	70	男	O157:H7	VT2	16-23の家族	8	12	5	9	6	2	1	9	5	-2	4	7	10	6	-2	-2	-2	205457	211642	
16-08	7/13	B	35	女	O157:H7	VT2		11	12	5	9	6	2	1	11	5	-2	4	7	9	6	-2	-2	-2	305457	211642	
16-16	8/17	B	87	男	O157:H7	VT1,2		8	-2	5	-2	-2	-2	1	6	4	-2	7	-2	6	6	-2	-2	-2	317577	211757	
16-21	8/23	B	34	女	O157:H7	VT2		9	11	5	9	4	2	1	5	5	2	3	6	5	12	-2	-2	-2	215457	605247	
16-27	9/28	B	78	女	O157:H7	VT1,2		10	14	8	12	4	2	1	5	5	-2	7	6	3	5	-2	-2	-2	717557	611657	

*.2: 増幅なし

**太字: Single locus variant

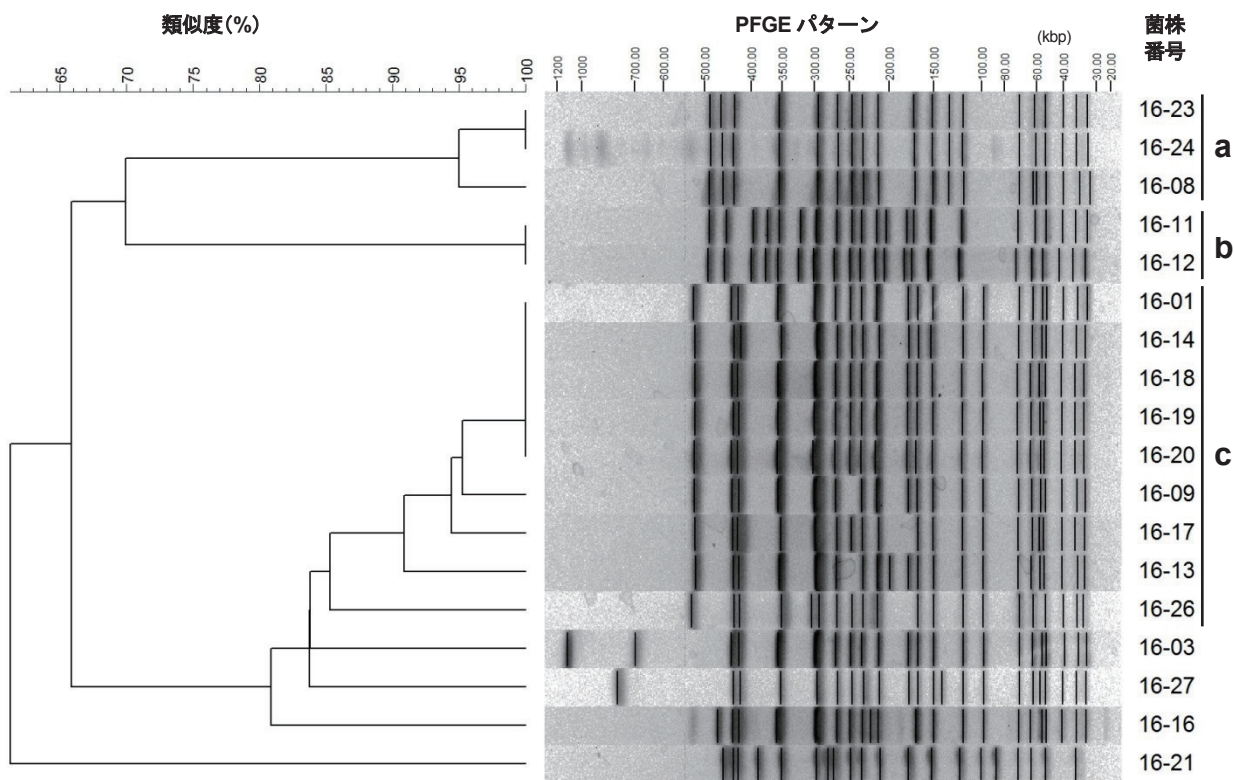


図1 腸管出血性大腸菌 O157 の PFGE 法による解析結果

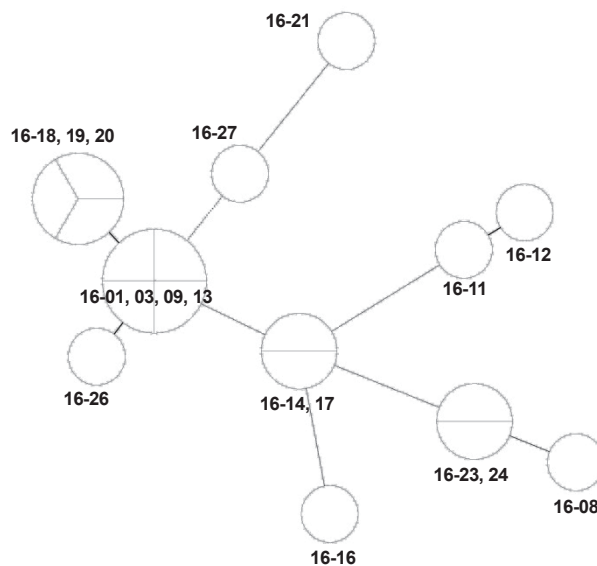


図2 腸管出血性大腸菌 O157 の MLVA Minimum Spanning Tree

2016年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株の分子疫学的解析

研究協力者 広島市衛生研究所

千神 彩香 青田 達明 栗林 智早 坂本 綾 松室 信宏 石村 勝之

研究要旨

2016年に広島市で発生した散発7事例及び広域食中毒1事例の患者便及び食品から分離された腸管出血性大腸菌 O157 12株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法、IS-printing system[®](IS)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(9 座位)(MLVA)法で解析した。疫学調査で関連が不明であった散発事例由来7株のうち4株は3法とも明確に区別されたが、残りの3事例由来3株中2株は3法で一致し区別されなかった。残り1株は PFGE 法で高い類似度を示し、IS 法でも1か所のコードの違いであったが、MLVA 法では5座位が異なった。一方、広域食中毒事例の患者由来1株と食品由来4株の解析では、PFGE 法及び IS 法では一致した結果であったが、MLVA 法では食品由来の1株に1座位のみに1リピート異なる SLV を認めた。

今回の解析結果からは、迅速性、簡便性に優れる IS 法であるが、解析能力がやや低いことが認められ、特に疫学調査で関連性が不明な事例間の異同の解釈は、MLVA 法の解析結果を加えて総合的に判断することの必要性が認められた。

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(PFGE)法、IS-printing system[®](IS)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法の3法を用いて、2016年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株を解析し、感染事例間での疫学的関連性を検討するとともに3法間の型別能について検証した。

B. 研究方法

1. 材料

2016年に広島市内で分離された腸管出血性大腸菌 O157 12株を用いた。内訳は、散発事例患者由来6株、散発事例無症状病原体保有者由来1株、広域食中毒事例患者由来1株、広域食中毒事例食品由来4株である。事例と株の関係は表1に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

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。

(2) IS 法

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。

(3) MLVA 法

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 カ所の 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。プライマーと蛍光標識については表 2 のように設定したものをを用いた。

C. 研究結果

1. 2016 年分離菌株の解析結果

2016 年に分離された菌株 12 株の MLVA リピート数 (MLVA RN)、IS コード及び PFGE バンドパターンの一致の有無を表 3 に、類似度 95% 以上を示したものを同一 PFGE クラスタ (点線内) とし、制限酵素 *Xba* I で処理したものを図 1 に、*Bln* I で処理したものを図 2 に示した。

(1) 散発事例

事例 3(16008) 及び事例 5(16012) において、MLVA RN、IS コード及び PFGE バンドパターンが全て一致した。事例 2(16007) は事例 3 及び事例 5 と IS コードが類似し、PFGE でも類似度 97% の同一クラスタを示したが、MLVA 法では 5 座位が異なった。他の事例は 3 法とも互いに異なった。

(2) 広域食中毒事例

事例 8 の患者由来菌株(16027)、食品由来菌株(16028、16029、16030 及び 16031) において、IS コード及び PFGE バンドパターンは一致した。MLVA では、5 株とも 8 領域で一致したが、食品由来株(16028) が 1 座位(K10)で他の 4 株と RN が 1 違った(single Locus Variant, 以下 SLV)。

2. 3 法間の型別能の比較^{1),2),3)}

(1) PFGE 法

Xba I 処理では、散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) でバンドパターンが 100% 一致した。事例 2(16007) はこの事例 3 及び事例 5 と類似度 97% の同一クラスタに区別された。広域食中毒事例 8 の 5 株は 100% 一致した。

Bln I 処理でも散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) はバンドパターンが 100% 一致し、事例 2(16007) の類似度が 97% と高かった。なお、事例 7(16020) は *Bln* I では切断されなかった。広域食中毒事例 8 の 5 株は 100% 一致した。

(2) IS 法

散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) は IS コードが一致した。これらと PFGE 法で類似度の高かった事例 2(16007) は、IS 法では 12 桁中 1 か所のコードが異なった。

広域食中毒事例 8 由来の 5 株は同一コードを示した。

(3) MLVA 法

散発事例 3(16008) 及び事例 5(16012) では MLVA RN が 9 座位全て一致した。これらと前述の 2 法で類似度の高い事例 2(16007) は、MLVA RN が K3、K34、K19、K36 及び K10 の 5 領域で異なっていた (Multi Locus Variant)。

広域食中毒事例 8 の 5 株は、9 領域中 8 領域で一致したが、食品由来 16028 の RN が K10 の RN で 1 リピート異なった。

D. 考 察

今回、2016 年の散発事例及び全国的な広域食中毒事例の一つとして広島市で発生した患者及び原因施設で保管されていた食品 (そうざい半製品) から分離された腸管出血性大腸菌 O157 菌株について分子疫学的解析を行った。

散発事例由来株においては、事例 3 の

16008 株及び事例 5 の 16012 株において、PFGE 法、IS 法及び MLVA 法の 3 法全てで一致した。この解析結果からは、この菌株同士が遺伝子学的に同じか近縁である可能性が高いことが考えられる。一方で、疫学的に関連性のない事例間で偶然パターンの一致した株が検出された可能性も考えられるが、今回の事例の疫学調査からは事例間の関連性は認められなかった。

広域食中毒事例 8 の分離株 5 株においては、PFGE 法及び IS 法の 2 法ではパターンが完全に一致したが、MLVA では食品由来 1 株(16028)の 1 座位(K10)で RN が 1 違う SLV であった。感染研が作成した 14 座位における MLVA 解析結果の基準では、SLV は「ほぼ確実に集団発生の一部である」と解釈できるとされている。当所が検討実施している MLVA 法は、現在のところ 9 座位のみの解析方法であるため、感染研での 14 座位における解析能との同等性は保証されないが、今回の解析において、これら 5 株は疫学情報から考慮しても全て同一食中毒事例の患者及び食品から分離された菌株であり、1 株のみが MLVA RN の一部違う SLV であることから、5 株とも関連性が高いことが推察される。

3 法のうち、IS 法の識別能力は比較的低いと言われており、当所の今回を含めたこれまでの検討結果からも言えるが、特に関連性の不明な散発事例株での使用と結果の解釈には他の 2 手法との総合的な判断が必要である。MLVA 法は今回の適応例からも有用性が認められたことから、MLVA も合わせて実施することで異なる遺伝子型であることを再確認できる場合があると考えられた。以上より、疫学情報を照らし合わせながら使用する手法を総合的に選択することが重要である。

E 結論

1. 散発事例 3 の 16008 及び事例 5 の 16012 において、3 法全てにおいて一致した。このような事例については疫学調査手法の検討が必要である。

2. 広域食中毒事例株においては PFGE 法及び IS 法の 2 法でパターンが一致したが、MLVA 法では 1 領域で RN が 1 違う株(SLV)がみられた。5 株は一部変異が認められるが関連性の高いことが推察された。

3. 関連性の低い散発事例の株間では、PFGE 法及び IS 法において高い類似度を示しても、MLVA 法では SLV 以上の異なるパターンを示す場合もあるため、疫学情報も照らし合わせながら総合的に手法を判断することが重要である。

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 2016年腸管出血性大腸菌 O157 型分離菌株の事例概要

事例番号	事例区分	菌株番号	診断の種類	発症年月日	血清型	VT 型
1	散発	16004	無症状病原体保有者	20160621*1	O157:HNM	VT1
2	散発	16007	患者	20160709	O157:H7	VT1VT2
3	散発	16008	患者	201607(日は不明)	O157:H7	VT1VT2
4	散発	16011	患者	20160718	O157:H7	VT1VT2
5	散発	16012	患者	20160730	O157:H7	VT1VT2
6	散発	16019	患者	20161002	O157:H7	VT1VT2
7	散発	16020	患者	20161008	O157:H7	VT2
8	食中毒	16027	患者	20161027	O157:H7	VT2
		16028	食品*2		O157:H7	VT2
		16029	食品*2		O157:H7	VT2
		16030	食品*2		O157:H7	VT2
		16031	食品*2		O157:H7	VT2

*1：無症状病原体保有者のため、発症年月日ではなく届出報告年月日を記載

*2：原因施設で保管されていた食品(そうざい半製品)

表2 使用した MLVA primer と Dye set

PCR	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			GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTTC	

表3 2016年分離菌株のMLVA RN、ISコード及びPFGEバンドパターン一致の有無

菌株番号	事例番号	血清型	VT型	MLVA RN									ISコード	PFGEバンドパターン一致の有無
				K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10		
16004	1	O157:HNM	VT1	5	10	11	11	7	6	6	6	38	317175 611755	無
16007	2	O157:H7	VT1VT2	5	13	8	10	7	4	7	6	35	317577 611757	無
16008	3	O157:H7	VT1VT2	5	8	10	10	7	6	6	6	46	317577 211757	16012と一致
16011	4	O157:H7	VT1VT2	4	12	10	9	7	6	10	6	15	717557 611657	無
16012	5	O157:H7	VT1VT2	5	8	10	10	7	6	6	6	46	317577 211757	16008と一致
16019	6	O157:H7	VT1VT2	4	10	9	8	8	6	8	5	18	106555 211457	無
16020	7	O157:H7	VT2	3	4	7	-*	5	7	6	5	-*	012057 214442	無
16027	8	O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	16027、16028、
16028		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	19	305457 211642	
16029		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	16029、16030、
16030		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	16031は一致
16031		O157:H7	VT2	5	8	7	12	4	7	10	6	18	305457 211642	

*：“-”はPCR産物なし

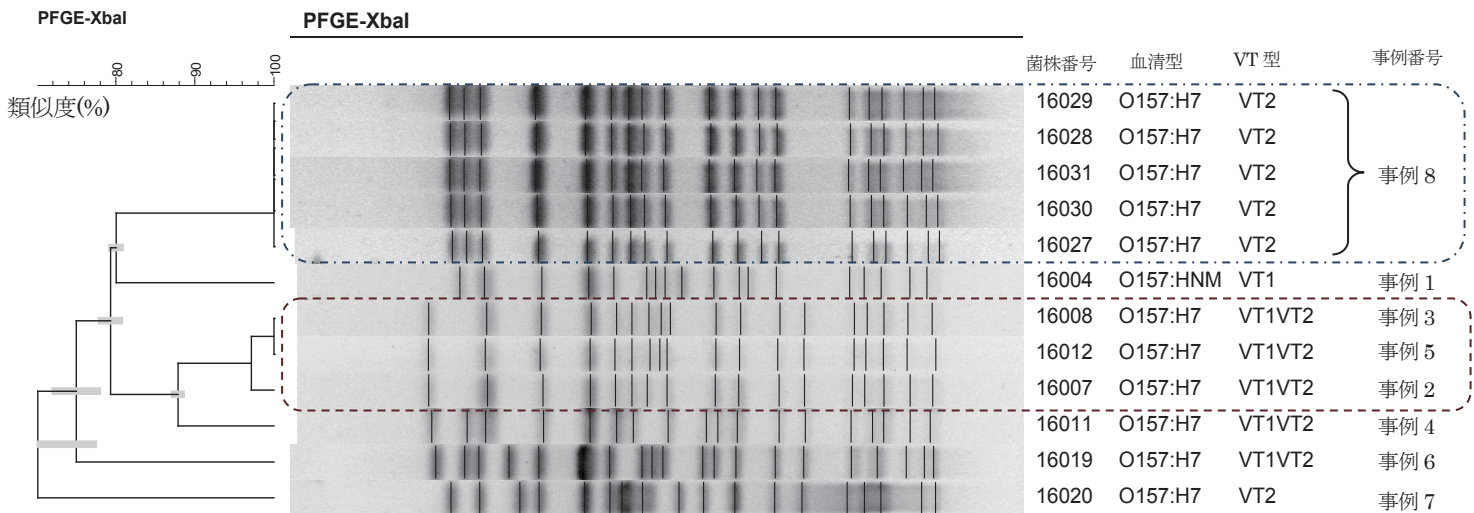
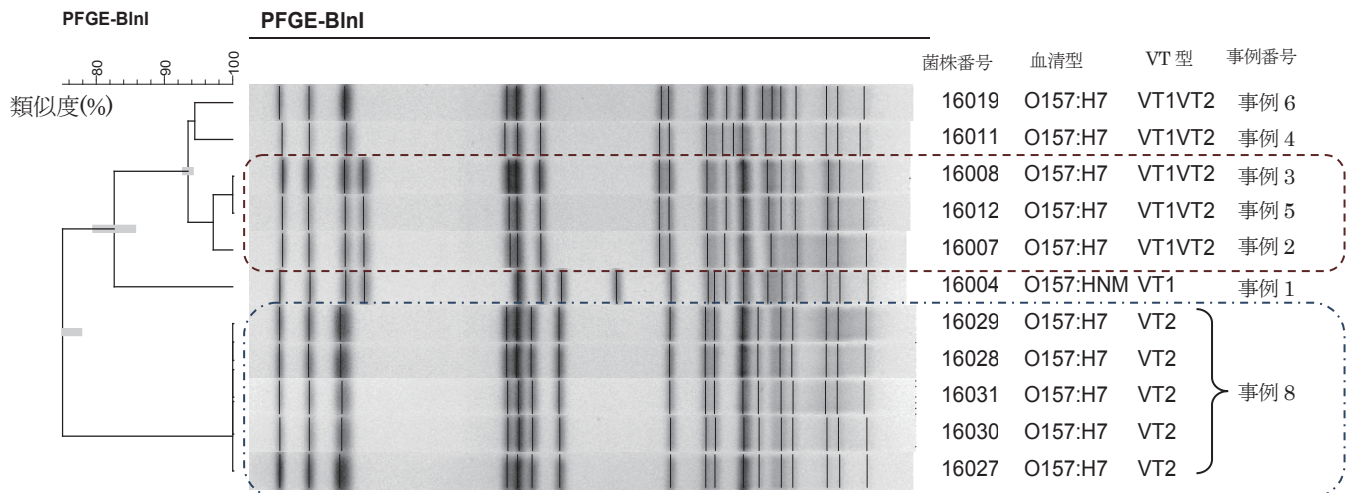


図1 2016年分離菌株のXbaI処理によるPFGEクラスター



※16020はBln Iで切断されなかった。

図2 2016年分離菌株のBlnI処理によるPFGEクラスター

2016年に山口県内で発生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

尾羽根紀子 亀山光博 大塚 仁 野村泰晴

研究要旨

2016年に山口県で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染症は 18 例であった。

これら 18 株についてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と、昨年より導入した Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法で解析を行った。

発生状況は、集団事例が 2 件、散発事例が 4 件であった。

2 法による解析の結果、6 事例中 4 事例由来の菌株は同一、あるいは極めて類似しており、さらにもう 1 事例とも由来が近似していた。

また、MLVA 法のリピート数を昨年の菌株と比較すると、同じリピート数の菌株による感染症が発生していたことを探知し、PFGE 法の解析の結果バンドパターンも一致した。

よって、2016年に山口県内で発生した腸管出血性大腸菌 O26 感染症は、昨年より続く近縁株による diffuse outbreak の可能性がうかがえた。

MLVA 法は PFGE 法に比べ簡便性、迅速性に優れ、異なる施設間のデータ比較が可能なため導入が進んでいる。

これらの結果から、広域散発的に発生した事例の探知が可能であると考えられた。

A. 研究目的

山口県では、腸管出血性大腸菌 (EHEC)の分子疫学的解析法としてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法と、国立感染症研究所が 2014 年より腸管出血性大腸菌 O157 O26 O111 の DNA 型別解析として行っている、Multi-locus variable-number tandem repeat analysis(MLVA)法を昨年より導入し、2 種類の方法で分離菌株の遺伝的関連を明らかにしている。

2016 年 1 月～12 月までに山口県内で 36 例の腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症が発生した。そのうち、O26 感染症は 18 例で全て O26:H11 VT1 であった。(以下 O26)。

これら分離株の遺伝的関連を明らかにするため、2 法による解析を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2016 年 6 月～9 月に山口県内で発生した O26 感染症例由来 18 株を供試した。

2. 解析方法

(1) DNA 抽出

O26 菌株をトリプトソイ寒天培地(日水製薬)上で純培養後、QIAamp DNA blood mini kit(QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。

(2) PFGE 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 17 年度総括・総合研究報告書(主任研究者 寺島淳)に記載されている九州ブロックマニュアル¹⁾に従って実施した。制限酵素は *Xba* I (Roche)を用い、

泳動装置 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。バンドの相違が3バンド以内を、同一クラスターとした。

(3) MLVA 法

Izumiya らの方法²⁾に従い実施した。18 領域のうち、locusO157-10 を除く領域について解析した。QIAGEN multiplex PCR kit plus(QIAGEN)を使用した PCR 反応後、3500 genetic analyzer (Applied Biosystems)及び Gene Mapper software ver.4.1 を使用してフラグメント解析を行った。size maker は、Genescan 600LIZ size standard (Applied Biosystems)を用いた。

なお、フラグメント解析により、増幅産物が認められなかった場合は「-2」と表記した。また、リピート数の相違が1遺伝子座[Single locus variant(SLV)]の場合を、同一コンプレックスとした。

(4) MLVA リピート数による 2015 年分離株との比較

2016 年の O26 菌株と、2015 年に分離された O26 菌株(3 事例由来 8 株)の MLVA のリピート数を比較した。MLVA タイプが一致、あるいは類似した株について PFGE 法による解析を実施した。

C. 研究結果

1. 事例概要

2016 年の山口県内の O26 感染症の概要を表 1 に示す。

集団事例は 2 件(G-1、G-2)、散発事例

は 4 件(S-1～S-4)であった。

発生は夏季に集中していた。

2. PFGE 解析結果

図 1 に示すとおり 6 パターンに型別された。

集団事例 G-1 の 2 株の PFGE パターンは一致(B)した。G-2 の 12 株の内 11 株の PFGE パターンは一致し、残る 1 株は 2 バンド異なっていた。

散発事例 S-1 は、G-2 の主パターンと一致し、S-2 はそれらと 2 バンド、S-4 は 3 バンド異なり、4 事例(G-2、S-1、S-2、及び S-4)由来 15 株は同一クラスター(A)に含まれた。

G-1 は G-2 等と 4 バンド異なっていた。

S-3 は、他の株と 7 バンド以上異なる PFGE パターンであった。

3. MLVA 解析結果

表 2 に示すとおり、7 つに型別された。

集団事例 G-1 の 2 株のリピート数は一致

した。G-2 は 3 タイプに型別され、12 株の内 10 株は同一タイプを示し、残る 2 株は locusO157-9、locusEHC-6 のリピート数がそれぞれ異なる SLV であった。

散発事例 S-1 と S-2 のリピート数は一致

した。S-1・S-2 は G-2 の主タイプと locusEHC-2 のリピート数が異なる SLV で、さらに散発事例 S-4 とは、locusEHC-1 のリピート数が異なる SLV であった。この 4 事例 (G-2、S-1、S-2、及び S-4) 由来 15 株は同一コンプレックス(a)を形成した。

集団事例 G-1 は S-1・S-2、S-4、及び G-2 の内 1 株とリピート数が 2 ヶ所異なっていた。

S-3は他の株とリピート数が3か所以上異なっていた。

4. MLVA リピート数による 2015 年分離株との比較

2015年11月に発症した家族内感染1事例由来3株がG-2の主タイプと一致した。

PFGEパターンも図2のように、完全に一致した。

D. 考察

2016年に山口県内で分離されたO26感染症は6事例18株あり、発症時期は夏季に集中していたことからPFGE法、MLVA法を用いて解析³⁾した。

疫学的情報から関連のある集団事例G-1、G-2について、事例ごとにPFGEパターンは一致、または2バンドの相違であった。MLVAは同一またはSLVで、分子疫学的解析からも分離株は事例ごとに密接に関係しているとわかった。

また、散发事例のS-1とS-2は、PFGEパターンが2バンドの相違、MLVA法は一致する結果となった。よって、散发事例と思われた2つの事例は、発症時期が近いことから近縁株による感染と推察された。

2法による解析の結果、4事例(G-2、S-1、S-2及びS-4)由来15株は、PFGE解析で同一クラスターに属し、MLVA解析でも同一クラスターに属す結果となった。

また、別の集団感染G-2由来2株も、これらと類似したPFGEパターン、MLVAタイプを示した。

よって、集団事例G-2、散发事例S-1、S-2、及びS-4の4事例については、事例間の疫学的関連性は不明なものの、発症

時期が近いことや分離菌株の解析結果から密接な関係があり、遺伝的に近縁な菌株による感染が連続したものと推察された。

また、集団事例G-1もこれらと発症時期が重なっており、関係する可能性があること示唆された。

さらに、2015年11月に発生した家族内感染事例由来3株のMLVAタイプがG-2の主タイプと一致し、PFGEパターンも一致した。このことから遺伝的に近縁な株による感染が、年をまたいで継続し発生していたと推察された。

S-3については、PFGE、MLVAの結果が全ての事例の菌株と異なっていた。疫学情報から海外での感染が疑われる事例であることから、他の5事例とは全く異なる菌株による感染と推察した。

E. 結論

2016年に山口県で分離された腸管出血性大腸菌O26感染症は、2015年末から遺伝的に近縁な株による感染が、継続し拡散した可能性がうかがえた。

このような状況が継続する場合、diffuse outbreakであるかどうかの証明するためには、より詳細な疫学情報の収集が必要である。

本研究において、PFGE法、MLVA法による解析の結果は概ね一致しており、型別能は同等であると考えられた。

MLVA法は、迅速性に優れているだけでなく、菌株の比較が容易なため、広域散発的に発生した事例の探知にも優れていることがわかった。

F. 研究発表

なし

strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111.

Microbiol.Immunol,54,569-577(2010)

G. 参考文献

1)寺島 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(課題番号：H15-新興-1)平成17年度総括・分担研究報告書,168-185(2006)

3)国立感染症研究所：腸管出血性大腸菌の分子型別,病原微生物検出情報,35,129-130 (2014)

2)Izumiya H, et al : New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic Escherichia coli

4)山田裕子,増田加奈子,高尾信一：腸管出血性大腸菌 O157、O26 および O111 の分子疫学的解析法の比較,広島県立総合技術研究所保健環境センター研究報告,23,7-14(2015)

表1 2016年に山口県で発生したEHECO26感染症事例の概要

事例No.	発生時期	感染者数	内 訳		菌株No.	備考
			患者数	無症状保菌者		
S-1	6月	1	1		16Y02	
S-2	7月	1	1		16Y03	
G-1	8月	2	2		16Y13、14	家族内感染
S-3	8月	1	1		16Y16	海外渡航歴あり
G-2	8~9月	12	6	6	16Y19~30	保育園
S-4	9月	1	1		16Y31	

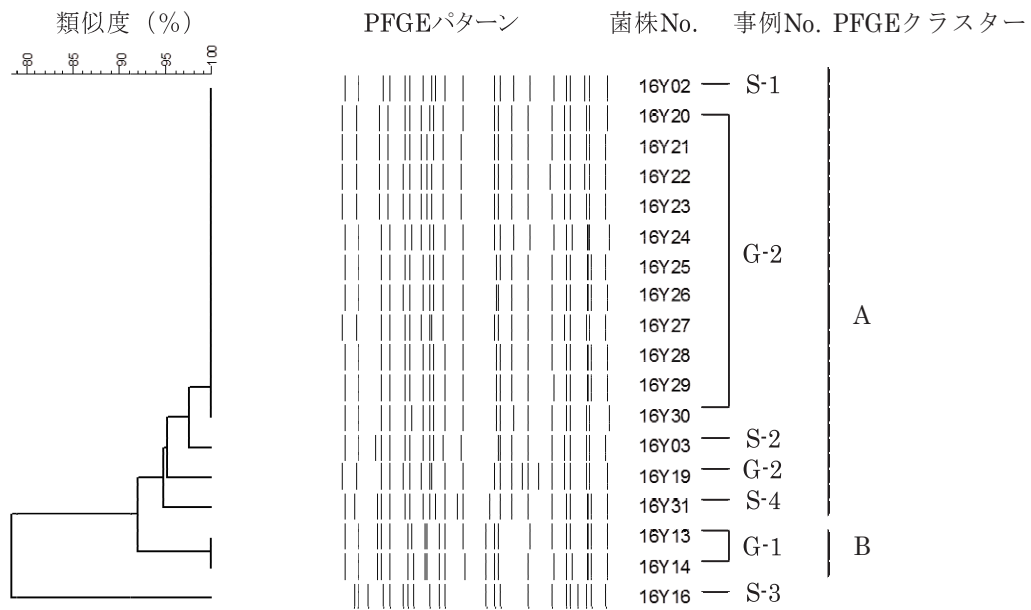


図1 EHEC O26のPFGEのデンドログラム

表2 EHEC O26のMLVAおよびPFGEの解析結果

事例No.	株数	0157-34	EHC-1	EHC-2	0157-9	EHC-5	0157-3	0157-25	EH111-8	EH157-12	EH111-14	EH111-11	0157-17	0157-36	0157-19	EHC-6	0157-37	EH26-7	MLVA complex	PFGE クラスタ
S-1	1	1	12	15*	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	a	A
S-2	1	1	12	15*	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	a	A
G-1	2	1	7	15	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	.	B
S-3	1	1	11	12	8	2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	4	.	.
	10	1	12	14**	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
G-2	1	1	12	14	9*	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	a	A
	1	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	8*	-2	3		
S-4	1	1	13**	15	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	a	A

*太字はG-2主リビート数とのsingle locus variantを示す

**太字はS-1, S-2とのsingle locus variantを示す

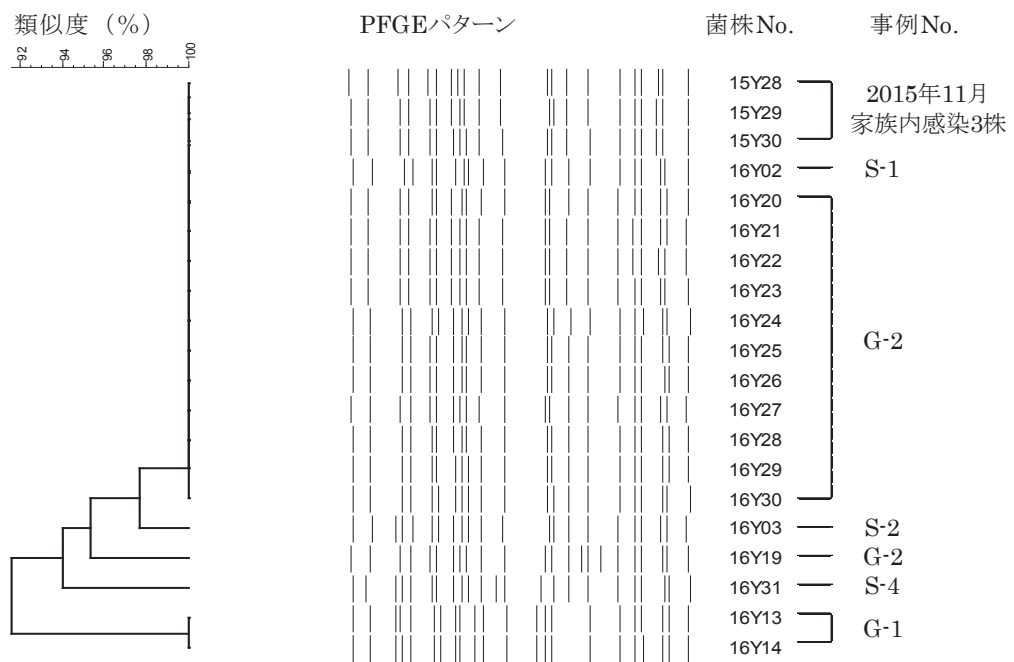


図2 2015年11月の家族内感染3株とのPFGEのデンドログラム

中四国ブロックにおける香川県内で発生したカンピロバクター食中毒事例

研究協力者 香川県環境保健研究センター

内田順子 岩下陽子 関 和美 福田千恵美

研究要旨

2015、2016年に香川県内飲食店において *Campylobacter jejuni* (以下 *C.jejuni*) による食中毒が4件発生した。そこで4事例より分離された *C.jejuni* の血清型と PFGE による遺伝子解析を行った。Penner による血清型は全て型不明となったが、PFGE による遺伝子解析により4件の事例の由来がそれぞれ異なることが示された。市販されている Penner 法の型別率が低いという欠点により血清型による疫学的解釈の助言は難しく、PFGE による疫学解析が重要である。

A. 研究目的

2015、2016年に香川県内飲食店において *C.jejuni* による食中毒が4件発生した。そこで4事例より分離された *C.jejuni* の血清型と PFGE による遺伝子解析を行い、関連性を調査した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2016年に起きた事例Aより分離された3株、事例Bより分離された8株、2015年に起きた事例Cより分離された4株、事例Dより分離された2株、合計17株を対象とした(表1)。

2. 方法

1) 血清型

デンカ生研の感作血球調整試薬およびカンピロバクター免疫血清を用いて間接赤血球凝集反応によるPenner型別¹⁾を行った。

2) PFGE

八尋らの方法²⁾に準じて行った。分離菌株を血液寒天培地で微好気培養後ブロックを作製し、制限酵素 *Sma* I と *Kpn* I を用

いて処理した。電気泳動は CHEF DRIII (Bio-Rad) を用い、6.0V/cm, 6.8 to 38.4 sec, 14.0°Cで19時間泳動した。解析は、FingerPrinting II (Bio-Rad) を使用した。

C. 研究結果

1) 血清型別

分離された *C.jejuni* の血清型はすべて型別不能であった(表2)。

2) PFGE 解析

図1は制限酵素 *Sma* I 処理の解析結果を示す。遺伝子型は大きく5種類に分類された。A事例、D事例は類似度100%と一致した。C事例もバンド数は同じで類似度90%を超えていた。B事例は患者・従業員ともバンド数が同じで類似度90%を超えていたが、残品は類似度25%と低かった。

図2は制限酵素 *Kpn* I 処理の解析結果を示す。遺伝子型は大きく6種類に分類された。C・D事例は類似度100%と一致した。A事例はバンドが2本異なっているが類似度90%を超えていた。B事例は患者由来4株と患者由来2株・従業員

由来 1 株で類似度は 85%となり、残品は類似度 57%と低かった。

D. 考察

C・D 事例においては残品はなく患者便だけであったが、PFGE の解析の結果、それぞれの飲食店で同じものを喫食して発症したと推定された。

A 事例は、残品・患者便とも PFGE で類似度が高く、残品が原因食材と推測された。

B 事例については、残品において制限酵素 *Sma* I 処理、*Kpn* I 処理ともに類似度が低く遺伝子型が異なった。これは、残品が喫食時の食材と仕入れ日が異なっていたためである。しかし *C.jejuni* に汚染された食材であることより、調理時の取り扱いと生食の注意喚起となった。患者・従業員便については、制限酵素 *Sma* I 処理での類似度は 95%と同一由来と推測された。制限酵素 *Kpn* I 処理での類似度は 85%であり同じ由来と思われたが、遺伝子パターンが変化した可能性があるかと推測された。

同一事例で複数の菌種が検出されることもあり、原因究明には分離された菌株の解析だけではなく、喫食調査等の疫学調査も重要である。

E 結論

C. jejuni による食中毒が香川県内飲食店において 4 件発生し、今回調査した結果、4 件の事例の由来がそれぞれ異なることが示された。

Penner による血清型はすべて型不明となり市販されている Penner 法の型別率が低いという欠点により血清型による疫学的解釈の助言は難しく、PFGE による疫学解析が重要である。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) 添付文書:カンピロバクター免疫血清(デンカ生研)
- 2) 八尋俊輔, 上野伸広, 山崎省吾, 堀川和美:「*Campylobacter jejuni* 分子疫学解析の検討」, 厚生労働省科学研究補助金(新興・再興感染症研究事業) 分担研究報告書

表1 4事例より分離された菌株

事例A (2016)	残品1株 患者便2株
事例B (2016)	残品1株 患者便6株 従業員便1株
事例C (2015)	患者便4株
事例D (2015)	患者便2株

表2 4事例より分離された菌株の血清型とPFGE型

			Penner型別	Sma I 処理	Kpn I 処理
事例A (2016年)	A-1	残品	UT	G1	g1
	A-2	患者便	UT	G1	g1
	A-3	患者便	UT	G1	g1'
事例B (2016年)	B-1	残品	UT	G2	g2
	B-2	患者便	UT	G3	g3-2
	B-3	患者便	UT	G3	g3-2'
	B-4	患者便	UT	G3	g3-1
	B-5	患者便	UT	G3'	g3-1
	B-6	患者便	UT	G3''	g3-1'
	B-7	患者便	UT	G3	g3-1
	B-8	従業員便	UT	G3	g3-2''
事例C (2015年)	C-1	患者便	UT	G4	g4
	C-2	患者便	UT	G4	g4
	C-3	患者便	UT	G4'	g4
	C-4	患者便	UT	G4'	g4
事例D (2015年)	D-1	患者便	UT	G5	g5
	D-2	患者便	UT	G5	g5

G3'・G3''はG3とバンド数は同じ

G4'はG4とバンド数は同じ

g1'はg1とバンドが2本異なる

g3-1'はg3-1とバンド数は同じ

g3-2'はg3-2とバンド数は同じであるが、バンド位置が異なる

g3-2''はg3-2とバンドが2本異なる

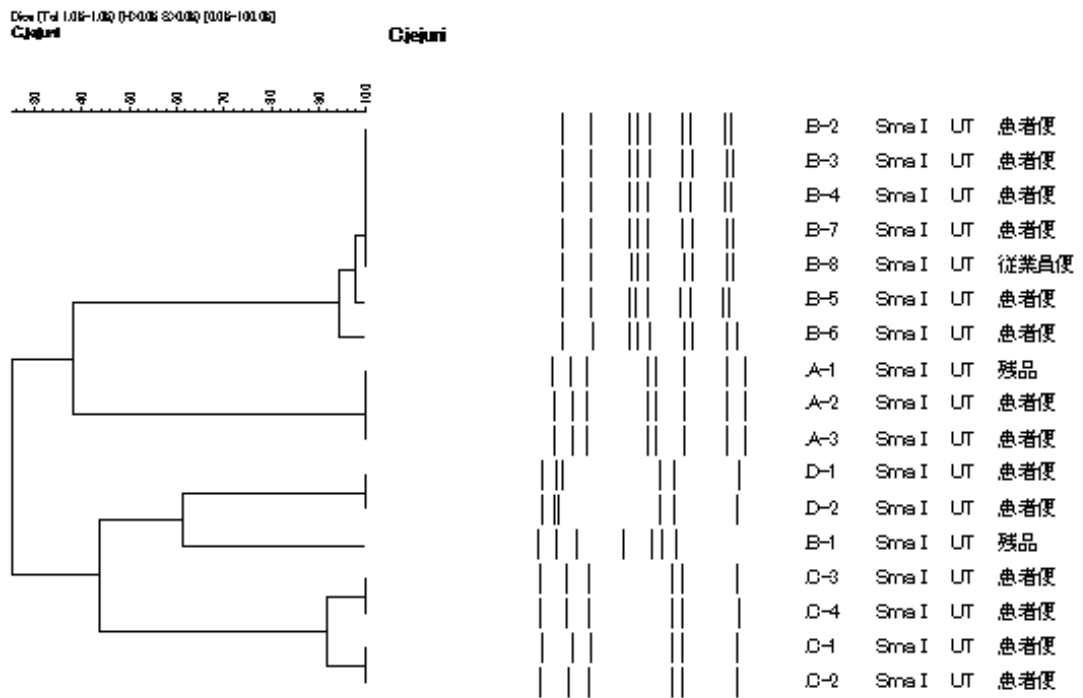


図1 分離された *Campylobacter jejuni* のデンドログラム (制限酵素 *Sma* I 処理)

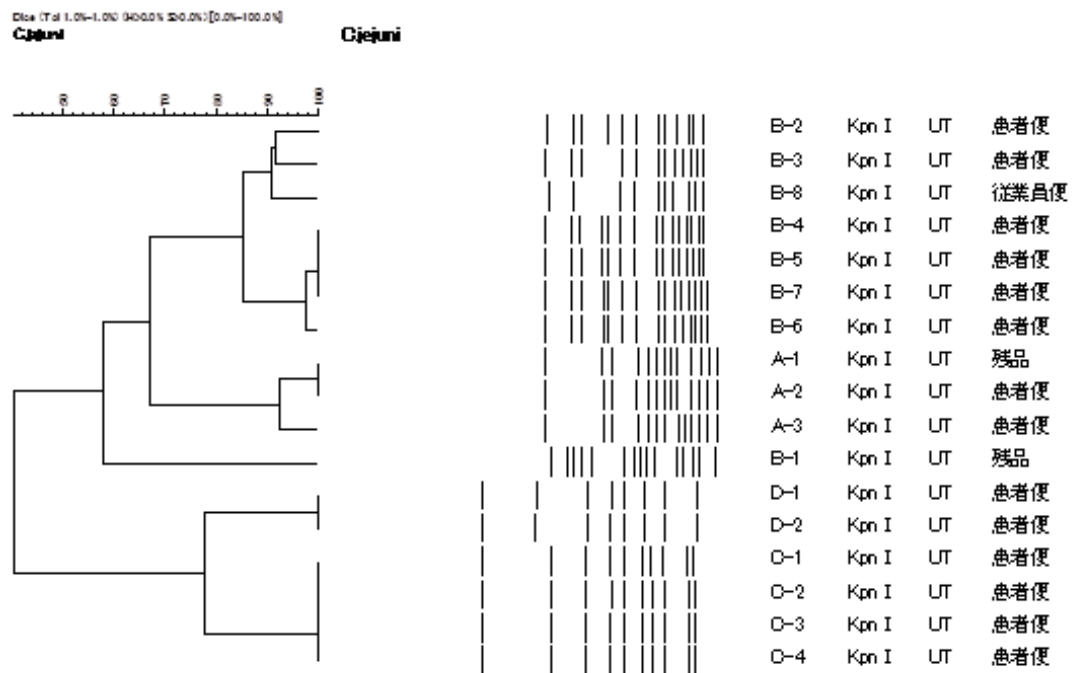


図2 分離された *Campylobacter jejuni* のデンドログラム (制限酵素 *Kpn* I 処理)

高知県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 高知県衛生研究所
高木 春佳 高橋 富世

研究要旨

平成 28 年 6 月～8 月に県内の 1 家族 4 名から分離された 4 株及び散発事例 2 例から分離された 2 株の腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 計 6 株について、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法)、IS-Printing System 法 (IS 法)、multilocus variable-number tandem-repeat analysis 法 (MLVA 法) による分子疫学解析を実施した。

解析結果から、家族内感染事例の 4 株中 3 株は PFGE 法のパターンがほぼ一致し、IS 法及び MLVA 法の結果は完全に一致した。しかし、残りの 1 株は 3 株と PFGE 法、IS 法、MLVA 法のいずれにおいても全く違うパターンを示し、この家族内感染事例の起原菌には 2 種類の EHEC O157 が存在する可能性が示唆された。

散発事例の 2 例は家族内感染事例との関連性は低いと思われた。

A. 研究目的

感染源・感染経路の解明及び事例間の関連性を明らかにし、感染拡大を防止することを目的として、平成 28 年 6 月～8 月に当県で分離された EHEC O157 について、PFGE 法及び IS 法による分子疫学解析を実施した。また、国立感染症研究所 (感染研) で MLVA 法を実施・解析したので、結果を併せて報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 28 年 6 月～8 月に県内の保健所及び医療機関で分離された 1 家族 4 名からの 4 株及び散発事例 2 例からの 2 株の EHEC O157 計 6 株について、生化学的性状、血清型別、毒素産生性を確認した。

生化学的性状及び血清型別は定法を用い、毒素産生性はベロ毒素 (VT) 遺伝子の保有について、PCR 法を実施した。

2. 分子疫学解析

(1) PFGE 法

感染研ニュープロトコールに基づいて実施した。制限酵素は *Xba*I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2-54.2sec、泳動時間 19 時間で実施した。

(2) IS 法

試薬キット IS-Printing System (東洋紡(株)) を用い、添付のプロトコールに従って実施した。各プライマーにより増幅される産物を各セット毎に高分子量側から 3 バンドずつ「1」「2」「4」の数字を当て、Standard DNA と比較し、増幅があったバンドの数値を区分毎に加算し、1st、2nd の順に並べて 12 桁のコード化したものを判定結果とした。

(3) MLVA 法

感染研にて分子疫学解析を実施した。

C. 研究結果

1. EHEC の性状

結果を IS 法及び MLVA 法の結果と併せて表 1 に示す。

分離された 6 株は全て O157:H7 で、菌株 No.1～3 は VT1VT2 遺伝子を保有

し、菌株 No.3~6 は VT2 遺伝子のみ保有していた。

2. 分子疫学解析

(1) PFGE 法

PFGE 法の系統樹及び電気泳動画像を図 1、図 2 に示す。

家族内感染事例の 4 株中 3 株は 95% 以上の一致率を示したが、残りの 1 株は一致率が 47.5% であった。

散発事例である菌株 No.5 と No.6 の一致率は 85.7% であり、5 つのバンドで相違があった。

(2) IS 法

家族内感染事例の 4 株中 3 株は、「717577 611657」であり、残りの 1 株は「012057 210442」であった。

散発事例である菌株 No.5 は「305457 211642」であり、菌株 No.6 は、「305057 211242」と 1st と 2nd でそれぞれ 1 つのバンドの相違があった。

(3) MLVA 法

家族内感染事例の 4 株中 3 株は、MLVA type 16m0089、MLVA complex 16c055 で神戸市環境保健研究所（神戸市）の 8 株と一致した（12 月 8 日時点）。残りの 1 株は MLVA type13m0322、MLVA complex16c075 で神戸市の 3 株及び滋賀県立衛生環境センターの 1 株と一致した（12 月 11 日時点）。

散発事例の菌株 No.5 は MLVA type16m0142、MLVA complex16c025 で MLVA complex は複数の地衛研の分離株と一致したが、MLVA type が一致するものはなかった（11 月 24 日時点）。

散発事例の菌株 No.6 は MLVA type16m0102 で神戸市の 1 株及び相模原市衛生試験所の 2 株と一致した（10

月 26 日時点）。

D. 考察

家族内感染事例の 4 株中 3 株は、PFGE 法においてバンド 1 つの相違が見られたが、IS 法、MLVA 法では完全に一致しており、由来株は同一と考えられる。しかし、残りの 1 株は、PFGE 法の一致率も低く、IS 法、MLVA 法の結果も大きく異なっているため、3 株の由来株が変異したものではなく、3 株とは全く異なる由来株があったと推測される。

また、家族内感染事例の 3 株と残りの 1 株の MLVA type は全く異なっているにも関わらず、共に神戸市で検出された菌株の MLVA type と一致していた。疫学情報は不明であるが、1 つの家族の中で感染源の異なる曝露があったわけではなく、2 種類の EHEC O157 に汚染された食品が原因となった可能性が示唆された。しかし、当所に提供された菌株は感染者 1 名につき 1 株であったため、1 名の感染者からこの 2 種類の EHEC O157 を検出することはできなかった。

2 件の散発事例については、PFGE 法、IS 法、MLVA 法の結果より、家族内感染事例とは関連性は低いと考えられる。また、散発事例の PFGE 法及び IS 法において近縁菌株のようなパターンを示したが、MLVA 法の結果より、関連性は低いと判断することができた。今後の県内の発生において、近縁菌株の有無等に注視していきたい。

E. 結論

1. 今回の家族内感染事例では、由来

の異なる 2 種類の EHEC O157 が検出され、同一の MLVA type が他県でも検出されていることから、原因食品が 2 種類の EHEC O157 に汚染されていた可能性が示唆された。しかし、疫学情報の不足等により感染源・感染経路の特定には至らなかった。

2. 散発事例については、分離時期が家族内感染事例と近いが、分子疫学的な関連性は低いと考えられた。また事例間の関連性も低いと考えられる。

3. 各事例の関連性把握するうえでは、迅速な分子疫学解析が重要であり、感染源・感染経路を明確にするためには、詳細な疫学情報の収集が必要不可欠と考える。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

なし

表 1 EHEC の性状、IS 法及び MLVA 法の結果

菌株 No.	血清型	毒素型	発生状況	分離日	IS コード		MLVA(感染研)		一致した地衛研
					1st	2nd	type	complex	
1	O157:H7	VT1+VT2		7/6	717577	611657	16m0089	16c055	
2	O157:H7	VT1+VT2	家族内	7/7	717577	611657	16m0089	16c055	神戸市
3	O157:H7	VT1+VT2	感染	7/2	717577	611657	16m0089	16c055	
4	O157:H7	VT2		7/6	012057	210442	13m0322	16c075	神戸市・滋賀県
5	O157:H7	VT2	散发例	6/20	305457	211642	16m0142	16c025	-
6	O157:H7	VT2	散发例	8/25	305057	211242	16m0102	-	神戸市・相模原市

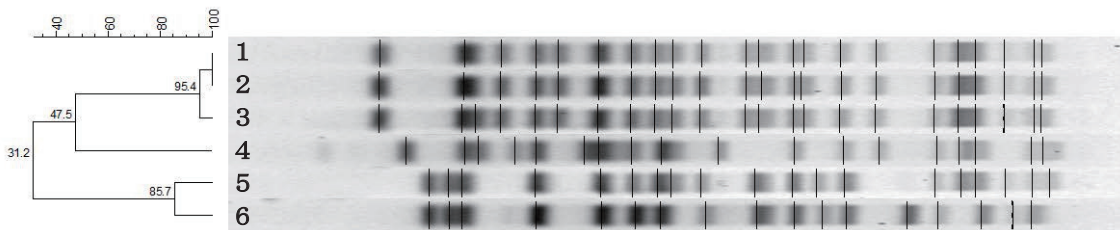
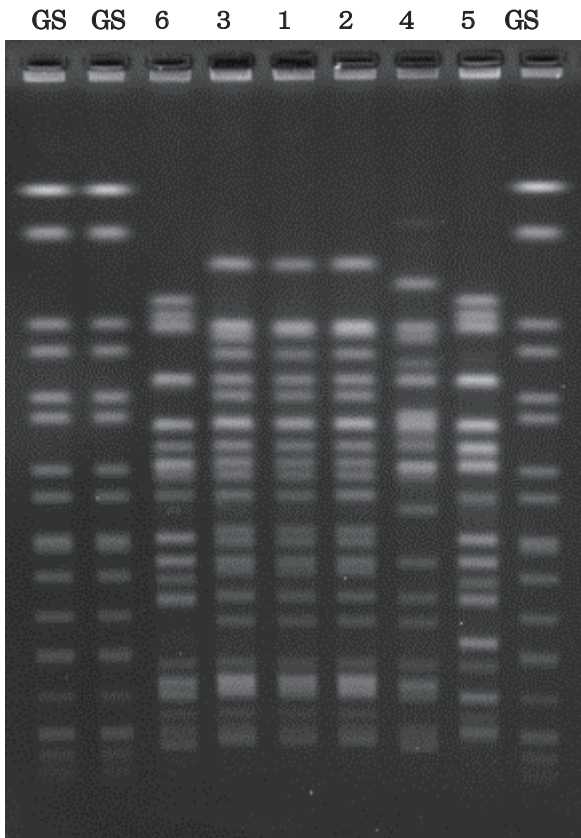


図 1 PFGE 系統樹

1～6：菌株 No. 1～6



GS : *Salmonella* Brenderup

1～6：菌株 No. 1～6

図 2 PFGE 泳動画像

腸管出血性大腸菌 O26 感染症事例での分子疫学的解析

研究協力者 高知県衛生研究所

高橋富世 高木春佳 戸梶彰彦 松本道明

研究要旨

平成 28 年 (2016 年) 9 月上旬に端を発した高知県高岡郡内 K 保育所の腸管出血性大腸菌 O26 感染症の集団事例を報告する。

9 月 9 日に県内 2 箇所の保健所に腸管出血性大腸菌 O26 (VT1 産生) (以下「EHEC O26」) の届出があった。届出のあった 2 事例は同じ保育所の同じクラスに通所する園児であったため、K 保育所を管轄する S 保健所が接触者調査と共に K 保育所に立入り調査を実施した。その結果、園児・職員および感染者家族の検便 241 検体中 26 件から EHEC O26 が検出された。感染者のうち下痢や血便などの有症者は園児 3 名であったが、溶血性尿毒症、脳症や死亡などの重症例はなかった。また、感染者の約 9 割が無症状であった。疫学調査および検査結果から食中毒は否定された。

これらの分離株についてパルスフィールドゲル電気泳動(以下「PFGE」)による遺伝子解析を実施したところ、PFGE パターンがほぼ一致した。また、国立感染症研究所(以下「感染研」)での Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (以下「MLVA」)からも集団事例関連株との結果が得られた。データベースにおいて、現在までに集積された菌情報で本事例株と同じ MLVA 型を示す菌株はなかった。

本事例は、分子疫学解析の結果から同一感染源による感染が疑われる事例であった。感染源の特定には至らなかったが、感染経路としてヒト→ヒト伝播が強く示唆された。

A. 研究目的

平成 28 年 9 月 9 日に発生した K 保育所の集団感染事例から分離された EHEC O26 28 株について感染源の特定や分離株の関連性を調べるため、PFGE による分子疫学解析を実施した。また、感染研において MLVA を実施・解析したので報告する。

B. 研究方法

1. 供試菌株

平成 28 年 9 月に S 保健所で実施した検便から分離された EHEC O26 26 株および医療機関を受診した EHEC O26 感染症患者(以下「患者」)から分離された

2 株、合計 28 株について、生化学的性状、血清型別、毒素産生性を確認した。

生化学的性状および血清型別は定法を、毒素産生能はベロ毒素 (VT) 遺伝子の保有については PCR 法を実施した。

2. 分子疫学解析

(1) PFGE 法

感染研新プロトコールに基づいて行った。制限酵素は *Xba*I を用い、泳動条件は 6.0V/cm、パルスタイム 2.2–54.2sec、泳動時間 19 時間で行った。

参考として、当所で保存している EHEC O26 1 株の PFGE を実施した。

(2) MLVA 法

感染研にて分子疫学解析した。

C. 研究結果

1. 事例の概要

平成 28 年 9 月 9 日、県内 2 箇所の保健所に EHEC O26 の届出があった。届出のあった 2 事例は同じ保育所の同じクラスに通所する園児であることが判明したため、S 保健所が接触者調査および立入り調査を実施した。

当初、患者が 1 つのクラスに限定されていたため、患者在籍クラスと患者の兄弟が在籍するクラスの園児、同クラスを担当する保育士、調理従事者および患者家族の計 31 名を検便の対象者とした。その結果、4 名から EHEC O26 が検出された。これをうけて、K 保育所へ通所する全園児、保育所全職員および感染者家族に検便対象を拡大し、合計 241 検体(再検査 1 名)の検便を実施し、26 件から EHEC O26 が検出された(表 1)。なお、給食従事者からは検出されなかった。また、職員 2 名(0 歳児 B クラス担任、4 歳児 A クラス担任)から菌は分離されなかったが、スクリーニング検査で VT 遺伝子が確認された。

感染者のうち下痢や血便などの有症者は 3 名(1 歳児: 2 名、3 歳児; 1 名)であったが、溶血性尿毒症、脳症や死亡などの重症例はなかった。また、感染者の約 9 割(園児 20 名、家族 5 名)は無症状であった。1 歳児 B クラスでは、患者 2 名に加え園児 1 名が 9 月 2 日に下痢症状を呈していたが、EHEC O26 は検出されなかった。

8 月 23 日～31 日(8 月 27 日、28 日を除く)の給食保存食(原材料および調理

品)からは EHEC O26 は検出しなかった。

K 保育所では 8 月末までプールを実施しており、0～1 歳児のグループ、2 歳以上のグループがそれぞれプールを共用していた。また、居残り保育は 0～2 歳児のグループ、3 歳児以上のグループで実施されていた。

S 保健所は、K 保育所に対し立入り調査時から施設の消毒、手洗いの徹底、石鹸・タオルの共用禁止、また、保護者へは二次感染予防の周知等について指導を行い、感染拡大の防止に努めた。

9 月 23 日の検便陽性者を最後に 3 週間以上新規感染者発生のないこと、感染者 28 名全員の菌が陰性化したことをもって、10 月 13 日に終息を確認した。

2. EHEC の性状

分離した 28 株は、すべて O26 : H11 で VT-1 遺伝子を保有していた。

3. 遺伝子型の比較

(1) PFGE 法

28 名の分離株および参考株の PFGE 結果を図 1 に示す。

28 株のうち、3 株(No.19, 20, 21)を除く 25 株は一致率 90.3～100%でほぼ同じパターンであった。上記 3 株は同一家族であり、他の 25 株との一致率は 83.9%であった。

また、分離株 28 株と参考株との一致率は 52.9%であった。

(2) MLVA 法

MLVA 型は、28 株中 25 株が「16m2135」、2 株(同一家族)が「16m2137」、1 株が「16m2136」で

あった。「16m2135」と比較して「16m2137」は2SNP、「16m2136」は1SNPの違いしかなく、28株は集団事例関連株と考えられると判定された。

また、感染研データベースにおいて集積された菌情報には、本事例菌株と一致している菌株データはなかった。

D 考察

今回の事例では、0～1歳児クラスを中心にEHEC O26が検出された。疫学調査および検査結果より食中毒は否定されたが、分離された菌株のPFGEパターンおよびMLVA型の解析から同一の感染源に由来するものと考えられる。

2歳児クラス以上で検出された園児7名のうち5名は兄弟が0～1歳児クラスに在籍していたことから、患者を含む0～1歳児クラスを中心として、園児および家族間でのヒト→ヒト感染が強く推測された。

今回の集団事例では、無症状保菌者が多く、届出のあった2名が初発と判定するには十分ではないことから、感染源の特定には至っていない。しかし、何らかの要因で保育所に持ち込まれたEHEC O26がプール、居残り保育を通じて、また、0歳児Bクラス担任の検便よりVT遺伝子の痕跡が検出されたことから、排泄処理時の汚染等により拡大した等が考えられた。

保育園におけるヒト→ヒト感染によるEHEC集団感染事例は数多く報告されており、また、患者発生に伴う家族内の二次感染も多く報告されている^{1~3)}。保健所では、日頃から保育所に対し、食中毒や感染症予防として、施設の消毒、手洗いの徹底、石鹸、タオルの共用禁止等、

保護者への二次感染予防の周知等について指導を行っている。しかし、立入り調査時には固形石鹸や共用タオルが使用されていたことから、今後とも基本的な予防策として手洗い等の衛生管理および二次感染防止の徹底指導が必要であると思われる。

E 結論

1. 無症状病原体保菌者が多く、重症例はなかった。
2. 分離した28株は、全て血清型O26:H11でVT-1遺伝子を保有しており、分子疫学的にはほぼ同じパターンで、感染研データベースにおいて集積された菌情報には、本事例菌株と一致している菌株データはなかった。
3. 感染源の特定はできなかったが、ヒト→ヒト感染が示唆された。

F 研究発表

なし

G 参考文献

- 1)腸管出血性大腸菌感染症 2015年4月現在;病原微生物検出情報 Vol.36 No5;2015.5
- 2)腸管出血性大腸菌感染症 2016年4月現在;病原微生物検出情報 Vol.37 No5;2016.5
- 3)保育園における腸管出血性大腸菌O26:H11の感染事例—大阪府;病原微生物検出情報 Vol.37 No5;2016.5

表 1 事例概要(感染者一覧)

	感染者数	クラス年齢 (在籍者数)	有症者数	無症状者数	備 考
K 保育園	23 名	0 歳児(9 名)	0	6	
		1 歳児 A(11 名)	0	6	
		1 歳児 B(8 名)	2	2	
		2 歳児 A(11 名)	0	1	1 歳児 A クラスの家族 1 名
		2 歳児 B(11 名)	0	1	
		3 歳児(22 名)	1	2	0 歳児クラスの家族 1 名 1 歳児 B クラスの家族 2 名
		4 歳児 A(13 名)	0	1	1 歳児 A クラスの家族 1 名
		4 歳児 B(13 名)	0	0	
		5 歳児 A(20 名)	0	1	
		5 歳児 B(21 名)	0	0	
家族	5 名		0	5	0、3 歳児クラスの家族 1 名 1 歳児 A クラスの家族 2 名 1 歳児 B クラスの家族 1 名
計	28 名		3 名	25 名	

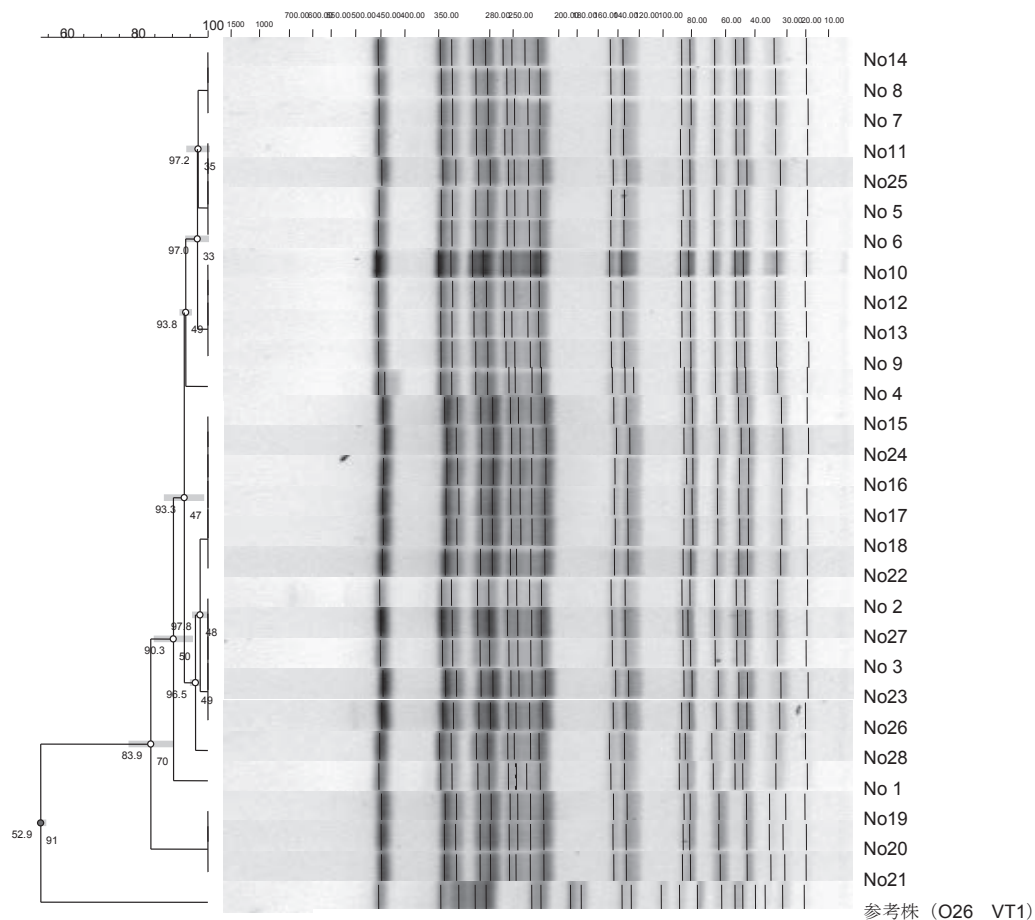


図1 有症者便由来株 PFGE 系統樹