

厚生科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
総合分担研究報告書

川崎市における下痢原性大腸菌の分子疫学解析法の検討及び流行状況等に関する調査

研究分担者	岡部 信彦	川崎市健康安全研究所	所長
研究協力者	窪村 亜希子	川崎市健康安全研究所	消化器・食品細菌検査室
	本間 幸子	川崎市健康安全研究所	消化器・食品細菌検査室
	松尾 千秋	川崎市健康安全研究所	微生物担当課長

研究要旨

【目的】

平成 26 年度は、腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析に用いられる IS-printing 法（IS 法）について、PCR 法による遺伝子増幅後に通常行っているアガロースゲル電気泳動の代替として、迅速性の高い遺伝子解析装置であるマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA）を用いてよりの確に解析を行うための検討を行った。

平成 27-28 年度は、腸管凝集性大腸菌（EAEC）について表現型及び遺伝子学的特徴に基づく流行状況について調査を行った。

【方法】

平成 26 年度は、川崎市内で分離された O157 菌株のうち IS 法の結果が既に確認されている 5 株を供試株とした。IS 法の各 primer sample の適切な結果判定法については、解析に用いる ladder の違いによる検出遺伝子サイズの違いや、異なるチップで測定することによる遺伝子サイズ誤差を確認し各 set の primer sample 及び positive control との比較がよりの確に行える方法の検討を行った。また定法により調整を行ったサンプルについて、MultiNA で測定し得られた信号強度は低く、PCR 後の増幅遺伝子濃度が低いことが示唆されたことから、PCR 反応液全体量を変えるまたは、作成する template やサンプルへの添加量を変えることにより遺伝子濃度を高くする検討を行った。また同じサンプルのうち最も高濃度であった遺伝子増幅産物の各希釈サンプルと低濃度であった遺伝子増幅産物の原液サンプルの測定結果を比較することにより適切な希釈倍率について検討を行った。

平成 27-28 年度は、40 株の EAEC を供試株として、薬剤感受性試験及び O : H 抗原型別や凝集性付着に関する遺伝子（AAF/ I - IV）の検出を行った。

【結果及び考察】

平成 26 年度の解析法の検討においては、importladder に比べサンプル測定時に同時測定を行った ladder を用いる場合の方が 1st set primer sample と ladder との誤差が少なく良好な結果が得られた。異なるチップによる測定結果についてはチップが同じまたは異なった場合で誤差に大きな違いは認められなかった。PCR 後の増幅遺伝子濃度の検討においては、いずれも定法に比べ高い信号強度を得ることが可能となったが、PCR 反応液全体量を変更するのみでは遺伝子濃度の著増は認められなかった。希釈倍率の検討については、低濃度サンプルを原液測定行った場合に比べ高濃度サンプルを希釈し測定した場合の方がゲルイメージにおいて positive control とのズレが少なく、また誤判定の原因となりうるプライマーダイマーについても低減されることが確認された。

平成 27-28 年度の薬剤感受性試験の結果、最も高い耐性を示したのはアンピシリン（82.5%）であり、次いでテトラサイクリンと ST 合剤（52.5%）であった。また O:H

型別については腸管出血性大腸菌に比べ多様性が認められ、その中でも O99 : H10、O131 : H27 及び O176:H34 が多く流行していることが確認された。また、本研究における EAEC の多くは健康者から分離されたにも関わらず、供試株の 65% で AAF/ I -IV のうち 1 つの遺伝子を保有していることが示唆された。本調査により未だその病原性や特徴について理解されていない EAEC について一定の知見を得ることが可能となった。

平成 26 - 28 年度の調査結果は、食中毒等事件発生時において感染拡大防止及び原因究明などの観点から、迅速な検査結果の還元や分子疫学解析が求められる地方衛生研究所の検査業務において一助となりうるが、今後も検査株数を増やすなど継続した調査が必要であると考えられる。

1. 平成 26 年度研究

A. 研究目的

IS-printing System (IS 法) は、腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子の中に存在する複数の異なる IS (insertion sequence) を 1st 及び 2nd の 2 セットの multiplexPCR 法により、それぞれ最大 18 バンド、合計 36 バンドの有無によりタイピングを行う分子疫学解析法である。

また IS 法はその迅速性や、サンプルと positive control (PC) の比較によりバンド検出有りを「1」、無しを「0」とすることで、結果の数値化が可能になることから現在多くの地方衛生研究所において食中毒や感染症等の発生の際に用いられている。

通常 IS 法は、PCR 法による遺伝子増幅後に 3.0% のアガロースゲルにサンプル 5.0µl と 6×LoadingDye 1µl を添加し、100V においては約 90 分程度の電気泳動を行い、EtBr にて染色後に洗浄を行い (合計約 15 ~ 30 分程度)、撮影装置により結果の確認を行う。

しかし PCR 後の遺伝子の検出について、マイクロチップ電気泳動装置 (MultiNA) を用いると 1 分析あたり約 4 分 30 秒程度と通常のゲル電気泳動に比べ時間の短縮が可能となり、サンプル数が多い場合には検出に用いるマイクロチップを最大 4 枚用いることで約 80 秒ごとに順次分析結果を得ることが可能となるなど迅速性に優れている。

またマイクロチップでは、PCR 増幅産物から得られる信号強度 (mV) を波形 (エレクトロフェログラム) として検出するが、

サンプルに自動添加される 2 つのマーカー (LM と UM) をもとに通常のゲル電気泳動後のバンド画像に似せたゲルイメージに自動変換されることから、結果の確認も容易となる。

平成 26 年度は、IS 法の測定のうち、ゲル電気泳動および染色・洗浄部分の代替として、MultiNA を用いた測定を行い、そこから得られるゲルイメージにおいて IS 法の解析が的確に行えるよう検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株

2013 年に当所で分離し保管され、ゲル電気泳動により IS 法の結果が既に確認されている腸管出血性大腸菌 O157 菌株 5 株 (EH1~EH5) を供試菌株とした (表 1)。

B-2. MultiNA による IS 法測定に用いる試薬の調整と機器の設定

IS 法測定のために MultiNA で使用される試薬については SHIMADZU のアプリケーションで示される方法に準拠し、分離バッファについては蛍光色素 GelSTAR を 4000 倍希釈になるように DNA-1000 に添加したものを、マーカー溶液については LM 及び UM として DNA Quantitation Standard 100bp fragment (Genesure Laboratories, Inc 社製) を終濃度 2.25ng/µl, 及び Nolimit 1200bp DNA Fragment

(Fermentas 社製) を終濃度 0.75ng/μl になるよう TBE に添加したものをを用いた。

Ladder は IS 法の 1st set positive control (1stPC) を用いるため、1st set positive control template の PCR 増幅産物を DNA-1000 キットにより通常通り測定後、MultiNA 取扱説明書に準じて ladder として登録を行った。

さらに IS 法測定に用いるため、新たにプロジェクトを登録する際の条件設定においては、ladder は既に登録を行った 1stPC を選択し、色素は GelStar に設定した。

B-3. 1st 及び 2nd set primer sample の測定結果の解析法の検討

B-3-1. 1st set primer sample の解析に適した ladder の検討

MultiNA 測定後の自動解析により表示されるサンプルの検出遺伝子サイズ(bp)は、通常のシングルプライマーによる PCR の測定を行う場合においては問題にはならない程度ではあるが誤差が生じることが知られている。

しかしゲルイメージ画像により IS 法のサンプルと PC の結果を的確に判定するためにはその誤差を低減させる必要がある。

通常、測定を行ったサンプルの遺伝子サイズ (bp) は併せて測定された ladder の結果をもとに自動解析され、結果を得ることが可能であるが、IS 法の場合は ladder の解析に重要な LM が機器により自動認識されないことから、まず ladder の結果を得るために、測定後に検出される ladder の各ピークから手動で LM を選択し設定する必要がある。しかしサンプルと同時に ladder の測定を行わず、事前に登録された ladder (importladder) を再解析ボタンにより選択する場合は LM の設定が不要となる。

今回、供試株 EH1~3 の 1st primer sample (1st sample) について、サンプル測定時に併せて ladder の測定も行い手動で ladder の LM の設定し解析を行う場合と、ladder の測定は行わずに importladder を用いて解析を行った場合のサンプルの検出遺伝子サイズ(bp)を比較することで、いず

れの解析法がより誤差の低減が可能か検討を行った。

B-3-2. 2nd set primer sample 及び positive control との比較のためのチップ間の検出サイズ誤差の検討

MultiNA の測定に用いるマイクロチップは最大 4 枚まで使用可能であるが、測定に用いるチップが異なると、同じサンプルを測定する場合でも検出遺伝子サイズは異なる。

IS 法測定において 1stPC を ladder とした場合、2nd set positive control (2ndPC) についてはサンプルと同様に測定を行う必要があり、サンプルとして 18 の増幅遺伝子の検出が必要となる。

今回 2ndPC 及び EH1~5 の 2nd set primer sample (2nd sample) をそれぞれ異なる 4 枚のチップ (チップ A~D) を用いて測定を行い、各チップによる検出遺伝子サイズ (bp) や、2ndPC と 2nd sample の検出遺伝子サイズの差について比較検討を行い、チップの違いにより生じる検出遺伝子サイズ誤差がゲルイメージで 2ndPC とサンプルを比較する際に影響するか検討を行った。

B-4. ゲルイメージによる結果解析に適したサンプル濃度の検討

B-4-1. 事前検討 (定法に準拠した方法による検討)

各サンプル濃度及び希釈倍率の検討を行うにあたり、EH1~3 株を用いて事前検討として付属の取扱説明書に準拠し PCR 法により増幅された遺伝子の濃度を確認することとした。

菌株からの template 作成は「(1) 推奨法：アルカリ溶解法」に準拠し、25mM NaOH 水溶液に 1mm 程度の菌体コロニーを懸濁し、95℃で 5 分加熱後、4μl の 1M Tris-HCl を加えて中和、12,000rpm で 5 分遠心し、上清 1μl を template として使用した。PCR 反応液は「4. PCR 反応液の調製」に準拠し、1st または 2nd set Primer Mix を 5μl、2×IS-P Master Mix を 25μl、

template DNA、1st または 2nd set template Mix を 1 μ l に滅菌蒸留水 19 μ l を加え全体量を 50 μ l とした。PCR を行った後に各サンプル及び PC について MultiNA で測定を行った結果、いずれのサンプルも信号強度が低く、希釈せずに原液を用いた測定を行った場合においても、ゲルイメージで各バンドが非常に薄く表示された (図 1)。

ゲルイメージとして表示される画像や信号強度(mV)は遺伝子濃度に比例するため、IS 法サンプルは MultiNA で測定するには遺伝子濃度が低いことが示唆されたことから、初めにより高い濃度の遺伝子増幅産物を得る方法について検討を行い、次に適切な希釈倍率について検討することとした。

B-4-2. 高濃度の遺伝子増幅産物を得るための検討

1. PCR 反応液全体量の違いによる比較検討

取扱説明書「(1) 推奨法：アルカリ溶解法」に準拠するが、PCR 反応液の全体量を 25 μ l または 12.5 μ l に変更することにより増幅遺伝子濃度を高くすることが可能か検討を行った。

全体量が 25 μ l 及び 12.5 μ l の PCR 反応液の調整については、各 Primer Mix と 2 \times IS-P Master Mix をそれぞれ 1/2 量及び 1/4 量とし、template はいずれも 1.0 μ l 添加、滅菌蒸留水の添加量を調整することで全体量をそれぞれ 25 μ l、12.5 μ l とし、PCR 後に超純水により 10 倍希釈した増幅遺伝子を測定し、得られたエレクトロフェログラムや信号強度(mV)について比較検討を行った。

2. template 添加量及び調整法の違いによる比較検討

PCR 反応液全体量は定法と同じ 50 μ l とするが、添加する template の量を増やす、または template 作成の際に供試するコロニー数を増やすことにより高濃度の template を作成し、さらに PCR 反応液へ添加する量も増やすことで PCR 後の増幅

遺伝子濃度を高くすることが可能か検討を行った。

具体的な調整法については、template 添加量を増やす場合は、定法に従い作成した template を PCR 反応液に 2.5 μ l または 5.0 μ l 添加することとし、高濃度 template については 2~3 コロニー(1mm 以上のコロニーの場合は 2 コロニー、1 mm 以下のコロニーのみの場合は 3 コロニーとした)を sweep した菌体から作成した template を PCR 反応液に 1.0 μ l、2.5 μ l または 5.0 μ l 添加し、いずれも各 Primer Mix と 2 \times IS-P Master Mix の添加量は変えずに、滅菌蒸留水の量を調整することで全体量を 50 μ l とした。ただし、各 PC の添加量は常に 1.0 μ l とした。

各 PCR 増幅産物については、超純水により 10 倍希釈したものを測定し、得られたエレクトロフェログラムの信号強度(mV)について比較検討を行った。

B-4-3. 測定サンプルの希釈倍率の検討

B-4-2 の結果から 10 倍希釈後の測定で十分な信号強度を示したサンプルについて超純水で 5 倍、10 倍、20 倍希釈を行い測定結果を比較することで適切な希釈倍率を検討した。

さらに B-4-2 の結果から 10 倍希釈後の測定で低い信号強度を示したサンプルについては原液で測定を行い、上記の各希釈サンプルと比較することでいずれの測定方法がよりゲルイメージによる結果解析に適しているかについても検討を行った。

C. 研究結果

C-1. 1st 及び 2nd set primer sample の測定結果の解析法の検討

C-1-1. 1st set primer sample 解析に適した ladder の検討

各 ladder の解析による検出遺伝子サイズ(bp)を表 2 に示した。

いずれの解析法においても検出遺伝子サイズの誤差は増幅サイズ(bp)に比例して大きくなる傾向がみられた。

しかし、個々のピークの比較により測定時に併せて測定を行った ladder (以下、測定時 ladder) の方が importladder による解析を行った場合に比べ多くの検出遺伝子で規定の増幅サイズに近い値を得ることが可能であった。さらに、ゲルイメージとして表示された場合においても同様に測定時 ladder により解析を行った場合の方が PC とのズレも少ない傾向が認められた(図 2)

C-1-2. 2nd set primer sample 及び positive control との比較のためのチップ間の検出サイズ誤差の検討

4 枚のチップ A~D のそれぞれで 2ndPC 及び EH1~5 の 2nd sample について測定し、解析は C-1-1 の結果から測定時 ladder を用いて解析を行った各検出遺伝子サイズ (bp) の結果を表 3 に示した。2ndPC 及び sample の検出遺伝子サイズはいずれも規定値よりも小さい値で検出され、その誤差は stx1 (151bp) から 2-04 (710bp) までのバンドについては、バンドの遺伝子サイズが大きくなるのと比例してその誤差も大きくなる傾向が認められた。

さらに、チップ A で測定した 2ndPC と 2nd sample の検出遺伝子サイズの差 (2ndPC-2nd sample) うちチップ A 及びチップ A 以外 (チップ B~D) の平均値 (表 4) について比較を行ったが大きな違いは認められず、チップ B~D で同じ比較をした場合においてもチップ A と同様の結果となった。

さらに表 4 のうち EH2 の 2-01 バンドは規定値との誤差や、EH3 の 2-02 バンドにおいては他のチップとの誤差においては特に大きくなったが、ゲルイメージとして表示した場合 (図 3)、遺伝子サイズの大きい部分の方が表示間隔が狭まることなどから、数値ほどのズレは認められなかった。

C-2. ゲルイメージによる結果解析に適したサンプル調整及び濃度の検討

C-1 の結果から C-2 の検討においては測定時 ladder によりサンプルの解析を行った。

C-2-1. PCR 反応液全体量の違いによる比較検討

Template 1.0µl に対し全体量を 1/2 または 1/4 にし調整した PCR 反応液の遺伝子増幅産物を 10 倍希釈し測定した結果 (表 5)、多くのサンプルにおいて全体量が少ない場合でより高い信号強度を得たが、著増は認められなかった。しかし、10 倍希釈時において EH3 の様にバンドが明瞭な場合と EH1 の様に不明瞭な場合があるなど、株によりばらつきが認められた (図 4)。

C-2-2. template 添加量及び調整法の違いによる比較検討

定法に準拠し作成した template を PCR 反応液に 2.5µl または 5.0µl 添加したサンプル (以下 1-2.5、1-5.0)、及び複数コロニーの sweep から作成した高濃度 template を PCR 反応液に 1.0µl、2.5µl、5.0µl 添加したサンプル (以下 S-1.0、S-2.5、S-5.0) の遺伝子増幅産物を 10 倍希釈し測定した結果 (表 6)、いずれも定法に比べ高い信号強度を示し、特に S-5.0 サンプルは高い信号強度を得ることが可能となった。

また EH2 1st set の S-1.0 の 1-06 バンド部分、EH3 1st set の S-1.0 の *eae*、*hlyA* バンド部分、EH1 株の 2nd set の 1-2.5、S-1.0 サンプルの 2-09 バンド部分などにおいては極端に信号強度が低いものの、S-2.5 や S-5.0 サンプルの同バンドにおいては、信号強度が高まり、ゲルイメージとしても確認しやすい状態として表示された (図 5)。

C-2-3. 測定サンプルの希釈倍率の検討

C-2-1 の結果から十分な信号強度が得られた S-5.0 について 5 倍、10 倍、20 倍希釈を行ったサンプル、及びある程度の信号強度が得られた S-1.0 について原液で測定を行った結果 (図 6)、S-1.0 については全てのバンドで信号強度を高くすることが可能であったものの、10 倍希釈時において極端に信号強度が低かった EH2 1st set の 1-06 バンド部分、EH3 1st の *eae*、*hlyA* バンド部分、EH1 2nd の 2-09 バンド部分

などについては、同サンプルの他のバンドに比べ薄く表示された。

また図 6 のゲルイメージにおいて、多くのサンプルでゲルイメージ上における PC とのバンドのズレは、S-5.0 希釈サンプルに比べ S-1.0 原液測定サンプルの方が大きく、S-5.0 サンプルのうち 10 倍または 20 倍希釈サンプルで最も小さい傾向が認められた。

さらに図 6 のエレクトロフェログラムから LM の前に検出されるプライマーダイマー（点線部分）について、希釈を行った場合の方が信号強度が低くなることも確認された。

D. 考察

サンプルの解析に必要となる ladder については、サンプル測定時に併せて測定を行った ladder を用いる場合、ladder 測定自体にかかる時間や、測定後に手動による LM の設定が必要になるなど、importladder を用いる場合に比べ全サンプルの結果解析終了までに必要となる時間が長くなる。しかし、C-1 の結果から importladder をサンプルの結果解析に用いる場合はバンドの表示位置のズレが大きくなることから、サンプル測定時に併せて測定を行った ladder を用いることが誤判定の低減につながるものと考えられた。

しかし測定毎に複数のピークからの確に LM を選択する必要があることから、人為的ミスも考えられるため、ある程度の熟練が必要であるとも考えられる。

チップ間の誤差については 2ndPC と 2nd sample の比較において重要であると考えられるが、本調査においてはチップが同じまたは異なる場合で大きな違いは認められず、ゲルイメージにおいても表示されるバンドのズレは、チップに係らず一様であり 2ndPC と 2nd sample の結果の比較はいずれのチップで測定を行っても変わらないものであった。しかしながら、チップによる誤差はチップ自体の使用回数や状態によっても左右されるため、極端に使用回数が異なるチップによる測定結果の比較は避けるべきであると考えられる。

また、MultiNA のゲルイメージで表示されるバンドのうち遺伝子サイズが大きい部分ではその表示間隔が狭くなる特性上、

増幅遺伝子サイズ (bp) が近い 2-02 (861bp) と 2-03 (801bp) のバンド間隔はさらに近く表示されることから、IS 法のサンプルを測定する場合においては、ある程度状態の良いチップを使用することや、併せてエレクトロフェログラムの確認を行うことも重要であると考えられる。

PCR 後の増幅遺伝子濃度の検討については表 5 及び表 6 からいずれの検討においても効果が認められた。特に表 6 の S-5.0 では高い信号強度を示したことについて、表 6 の結果のうち template 添加量が同じである定法と S-1.0 サンプルの信号強度の比較において S-1.0 の方が高い信号強度を示したことや、同じ template であっても添加量の異なるサンプルの信号強度の比較においては添加量が多い方が高い信号強度を示す傾向が認められるなど、高濃度 template と添加量を増やすことのいずれも効果が認められたことによるものと考えられた。

また定法による測定を行った場合において、株が異なる場合や、株が同じであっても表 5 (50 μ l 測定結果) 及び表 6 (定法) において信号強度にばらつきが認められたことについては、template 作成にあたり 1 コロニーを釣菌する際、均一な大きさのコロニーが釣菌されなかったことにより template 濃度が異なっていたことが示唆された。

今回、1-2.5 及び S-1.0 で一部ゲルイメージにおいて薄く表示されたバンドが S-2.5、S-5.0 では確認しやすい画像を得られた (図 5)。IS 法のように複数のバンドを検出する場合、極端に信号強度が異なるとゲルイメージのコントラストに影響を及ぼし信号強度が低いバンドは極端に薄く表示される可能性がある。そのため希釈倍率を変えるなど全体の信号強度を高くした場合に信号強度のばらつきが同様であれば、薄いバンドは薄いままである可能性もある。しかし、図 5 のエレクトロフェログラムの比較から、各バンドの信号強度が高くなったと同時に、

サンプル内でのばらつきが低減されている可能性が示唆された。

また、図 6 エレクトロフェログラムにおいて高倍率希釈の方がプライマーダイマーが低減されていたことについては、原液による測定を行った図 1 のエレクトロフェログラムのプライマーダイマー部分についても高値を示していることから、作成する template の濃度などに係らず、PCR 後のプライマーダイマーの濃度はある程度一定であることが示唆され、希釈することで低減されたものと考えられた。

プライマーダイマーは、IS 法測定結果において LM に極めて近い位置に検出されるため、信号強度の高い場合は LM に酷似した波形として認められ、ladder の LM を手動で設定をする際の人為的ミスや、機器がサンプルの LM を自動認識する場合に誤判定を起こす原因となり、ゲルイメージ画像に重大なズレを生じさせる。そのため、プライマーダイマーの信号強度はより低いことが望ましいと考えられ、本調査結果から IS 法を MultiNA で測定する場合は高濃度サンプルを希釈して測定をする方が適していると考えられた。

またエキストラバンドについても、その検出位置によっては同様に機器が誤判定を起こす原因となる。本調査を行うにあたり検出されたエキストラバンドは、添加する template 量に比例して信号強度が増す場合と template 量に係らず一定の場合が認められたが、後者の場合、図 6 のエレクトロフェログラムの EH2 及び EH3 の 1st set の UM 後に認められるエキストラバンドのように、サンプルの希釈により低減されることも分かった。

エキストラバンドや遺伝子濃度のばらつきなどにより生じる薄いバンドについては、ゲル電気泳動を行った場合においても結果を判定する際の誤判定の要因となっており検査室間の結果不一致を招いているなど大きな課題となっているが、ゲル電気泳動に適した希釈倍率の検討を行う必要があるものの、同様の方法によりある程度改善される可能性も示唆された。

希釈倍率の検討については、本調査では最も高濃度であった S-5.0 を用いて希釈を行い、10 または 20 倍希釈で最も誤差が低減されるなど良好な結果を得ることが出来たが、PCR 反応液を通常 1/2 や 1/4 量で実施している場合においては、信号強度が高くなる可能性があるため template 量を下げるとは、希釈倍率を上げるなどの調整が必要であると考えられる。また、MultiNA で安定した測定結果を得るためには、遺伝子増幅産物を希釈する際に十分なピペッティングを行うなど基本的なことも重要であった。

PC の希釈倍率については今回十分な検討を行えなかったが、サンプルのコントラストに影響を与えない程度の信号強度にする必要があり、本調査においては 10 倍希釈または 20 倍希釈で良好な結果を得られることが多かった。しかし調整した PC によっては PCR 後にバンドの一部で極端に高い信号強度を示す場合が見受けられ、希釈倍率の検討を行うとともに均一な信号強度を得るための検討も必要であると考えられる。

E. 結論

MultiNA で IS 法の解析を行うことは通常のアガロースゲル電気泳動に比べ大幅な時間短縮が可能となり、測定結果についてもデジタルデータとして保存されることから、データ管理や以前測定した株との比較、画像による結果の共有がより容易になるなど多くのメリットがある。

本調査により、バンドの有無の確認が必要となる IS 法の判定をよりの確に行うためには、解析はサンプルと併せて測定を行った ladder を用いて行うべきであると考えられた。また 2nd set のうち、2-02 (861bp)、2-03 (801bp) においてはバンド間が狭いため、両ピークが分離可能である状態の良いチップを用いるべきであると考えられた。

さらに、定法のうち推奨法のアルカリ溶解法に準拠し調整された PCR 反応液から得られる増幅産物の遺伝子濃度は MultiNA で測定する場合においては薄いことから、PCR 後に高濃度の遺伝子増幅産物を得る必要があると考えられ、本調査に

において template の添加量を増やすまたは、供試するコロニー数を増やすなどにより高濃度 template を作成し添加することで効果が得られることが確認された。

さらに測定を行う際、低濃度の遺伝子増幅産物を原液で測定する場合に比べ、高濃度の遺伝子増幅産物を希釈し測定した場合の方が、プライマーダイマーは低減され、かつ各バンドの遺伝子濃度のばらつきが低減されることも示唆されるなど、誤判定の低減にもつながると考えられた。

しかしながら、ladder の LM を手動により設定を行う際に人為的ミスが起こる可能性やエキストラバンドの発生により機器が UM や LM の誤判定を起こすことや、本来のバンドの波形に影響を与える可能性があるなど、今後も株数を増やし検討を続ける必要があると考えられる。

2. 平成 27-28 年度研究

A. 研究目的

腸管凝集性大腸菌 (EAEC) は、以前は途上国の小児における長引く下痢症として知られていたが、近年ではベロ毒素を産生する EAEC による食中毒の発生などにより、先進国においてもその認識が高まってきている。本邦においても EAEC による食中毒事例の調査報告はあるが、その特徴については未だ理解されていない点も多いのが現状である。

平成 27-28 年度については、EAEC の表現型及び遺伝子学的特徴について調査を行うことで流行状況の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株

2012 年から 2014 年まで川崎市健康安全研究所に搬入された検便検体から、PCR 法による *aggR* 遺伝子の検出により分離された EAEC40 株を供試菌株とした。

B-2. O : H 型別

O 型別は、市販されている 43 の大腸菌免疫血清を用いて型別を実施した。さらに血清により O 型別不能 (OUT) であった株に

ついては、162 のプライマーを用いた遺伝子検査を追加で実施し O 型別を行った。H 型別は PCR-RFLP 法により実施した。

B-3. 薬剤感受性試験

ディスク拡散法により実施した。供試薬剤は、セフトキシム、ST 合剤、ノルフロキサシン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、シプロフロキサシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、アンピシリン、ホスホマイシン、ナリジクス酸、テトラサイクリン、イミペネム、メロペネムの 14 薬剤とした。

B-4. 凝集性付着線毛遺伝子の検出

凝集性付着に関与する遺伝子として、AAF/ I (*aggA*)、AAF/ II (*aafA*)、AAF/ III (*agg3A*)、AAF/ IV (*agg4A*) について、PCR 法にて検出を行った。

C. 研究結果

C-1. O : H 型別

40 株中 12 株が O 血清による型別が可能であったが、残り 28 株は OUT であった。さらに OUT28 株について遺伝子検査による O 型別を実施したところ 24 株が型別可能となった。H 型別は 39 株が 10 種の H 抗原型に型別された。

C-2. 薬剤感受性試験

供試した 14 薬剤のうち、シプロフロキサシン、カナマイシン、ホスホマイシン、イミペネム、メロペネムについては全ての株で感受性を示した。残り 9 薬剤においては、アンピシリンで最も高い耐性率(82.5%)を示し、次いで ST 合剤とテトラサイクリン(52.5%)となった。

C-3. 凝集性付着線毛遺伝子の検出

26 株から AAF/ I -IV のいずれかの遺伝子が検出された。最も多く検出されたのは *aggA* で 11 株であり、次いで *agg4A*(6 株)、*aafA*(5 株)、*agg3A*(4 株)であった。

D. 考察および E. 結論

O 型別については、本調査研究では供試株の半数以上である 28 株が市販血清による型別が不能となり、血清による型別は困難であったが、遺伝子検査により OUT であった 28 株のうち 24 株が型別可能となるなど、遺伝子検査が有効であった。

O:H 型については腸管出血性大腸菌に比べ多様性が認められたが、その中でも多く検出されたのは O99 : H10、O131 : H27 で 5 株ずつ、次いで O176:H34 が 4 株であった。またそれら 3 つの主要な O:H 型であった 14 株は全株共通してアンピシリン、テトラサイクリン及び ST 合剤に耐性であったことが確認された。同じ O:H 型がそれぞれ同じ由来である可能性もあるため、O:H 型と薬剤耐性の関連性を示唆するものではないが、本研究においてはこれらの主要な O:H 型の存在が EAEC の薬剤耐性状況に影響していると考えられた。

また、本研究における EAEC の多くは健康者から分離されていたにも関わらず、26 株(65%)から凝集性付着関連遺伝子が検出され、それぞれ AAF/ I-IV のいずれかを保有していることが示唆された。

EAEC については、未だその病原性や特徴について理解されていないが、本調査により一定の知見を得ることが可能となった。またその詳細についてまとめたものを以下の論文等として報告を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

窪村亜希子、小嶋由香、岡部信彦：川崎市における腸管病原性大腸菌及び腸管凝集性大腸菌の分離状況と細胞付着性試験等による病原性の検討，感染症学雑誌，89, 37-45, 2015.

Akiko Kubomura, Takako Misaki, Sachiko Homma, Chiaki Matsuo, Nobuhiko Okabe: Phenotypic and molecular characterization of enteroaggregative *Escherichia coli*

isolated in Kawasaki, Japan, Jpn J Infect Dis. Accepted (13-Feb-2017)

2. 学会発表

窪村亜希子、佐藤弘康、湯澤栄子、小嶋由香、岩瀬耕一、岡部信彦. 遺伝子を指標として分離される EPEC 及び EAaggEC の病原性等についての検討. 第 88 回日本感染症学会学術講演会、平成 26 年 6 月 18 日-20 日、福岡

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 供試株の IS パターン

primer set	1st set																2nd set																			
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	stx1	stx2		
size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
EH1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0
EH2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
EH3	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
EH4	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
EH5	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0

図 1. 事前検討結果 (ゲルイメージとエレクトロフェログラム)

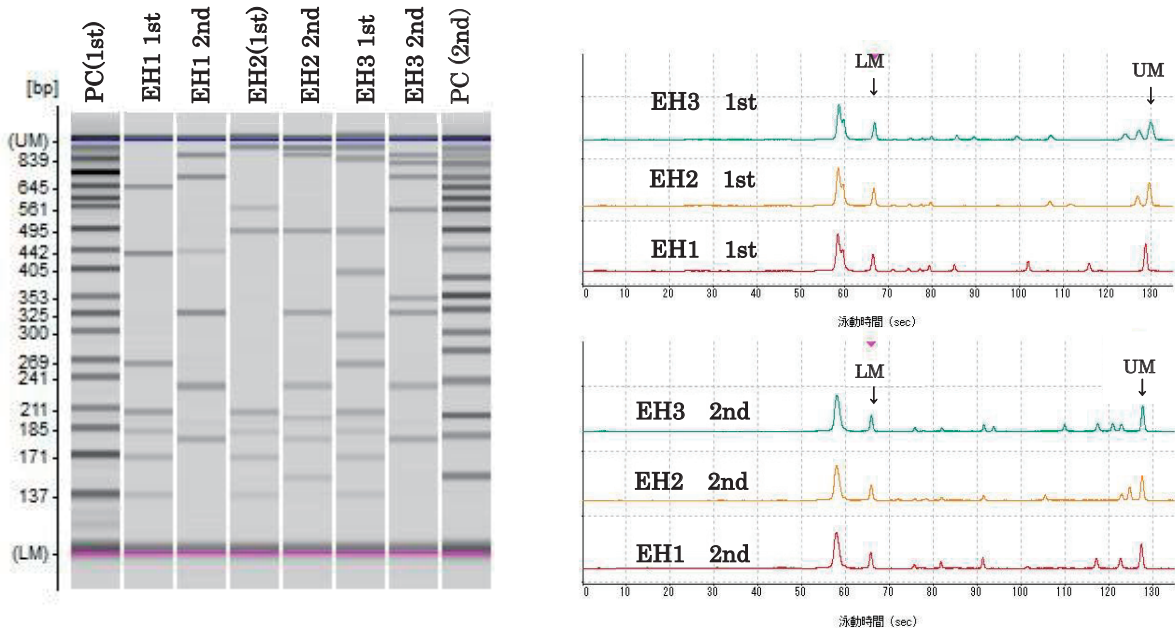


表 2. Ladder の違いによる検出遺伝子サイズ(bp)

株名	1stPC	EH1 1st		EH2 1st		EH3 1st	
		測定時 ladder	import ladder	測定時 ladder	import ladder	測定時 ladder	import ladder
1-01	974			1113	1141	1076	1136
1-02	839					851	857
1-03	742						
1-04	645	643	662				
1-05	595						
1-06	561			560	573		
1-07	495			496	504	494	502
1-08	442	437	447				
1-09	405					404	409
1-10	353						
1-11	325						
1-12	300					299	302
1-13	269	266	268			268	268
1-14	241						
1-15	211	209	214	210	213	211	214
1-16	185	184	191	185	190	185	190
1-17	171	171	173	171	173	171	173
hlyA	137	137	140	137	140	138	140

図 2. サンプルと同時測定した ladder による解析 (A) と import ladder による解析 (B) によるゲルイメージ

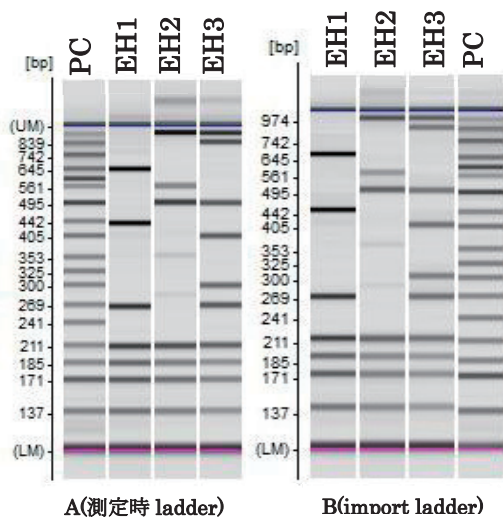


表3. 各チップ (A~D) と検出遺伝子サイズ (bp)

サンプル	規定値	2ndPC				EH1 2nd				EH2 2nd				EH3 2nd				EH4 2nd				EH5 2nd				
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
2-01	987	978	961	971	965					1083	1085	1081	1052													
2-02	861	846	828	851	847	858	850	858	854	859	857	864	856	840	898	851	845	823	839	834	831	834	833	835	835	
2-03	801	798	790	797	793									804	816	806	801	794	807	794	790					
2-04	710	689	680	692	687	701	698	702	697					690	683	694	690	682	684	682	680	679	675	680	678	
2-05	642	624	618	626	623																					
2-06	599	578	571	580	576																					
2-07	555	540	535	542	538									533	530	536	535	529	529	530	528	528	524	528	527	
2-08	499	483	479	485	481					479	477	480	479													
2-09	449	437	433	438	435	437	432	436	435																	
2-10	394	383	380	384	380													377	375	377	375					
2-11	358	349	348	351	348									345	343	346	346	343	342	344	342	341	340	341	341	
2-12	331	323	322	326	323	322	319	321	320	318	316	318	318	317	315	318	318	316	316	316	316	315	313	315	315	
2-13	301	293	292	295	292													288	288	288	287	288	287	287	286	
2-14	278	275	274	276	274																					
2-15	240	236	236	238	236	235	233	234	233	232	230	232	231	231	230	232	232	231	232	231	231	231	232	231	230	
2-16	211	205	203	205	204					200	198	200	200													
stx2	181	180	179	181	180	179	178	179	179	178	177	177	177	177	176	177	177	178	177	177	177	178	178	177	177	
stx1	151	151	150	151	150					148	146	147	147					148	148	147	147					

表4. チップAの2ndPCと各チップのサンプル検出遺伝子サイズ (bp) の差

サンプル	2ndPC	EH1 2nd		EH2 2nd		EH3 2nd		EH4 2nd		EH5 2nd	
		A	A以外平均	A	A以外平均	A	A以外平均	A	A以外平均	A	A以外平均
2-01	987			-105	-95					7	9
2-02	861	-12	-8	-13	-13	6	-19	23	11	12	12
2-03	801					-6	-10	4	1		
2-04	710	-12	-10			-1	0	7	7	10	11
2-05	642										
2-06	599										
2-07	555					7	6	11	11	12	14
2-08	499			4	4						
2-09	449	0	3								
2-10	394							6	7		
2-11	358					4	4	6	6	8	8
2-12	331	1	3	5	6	6	6	7	7	8	9
2-13	301							5	5	5	6
2-14	278										
2-15	240	1	3	4	5	5	5	5	5	5	5
2-16	211			5	6						
stx2	181	1	1	2	3	3	3	2	3	2	3
stx1	151			3	4			3	4		

図3. チップAの2ndPCと各チップのサンプル測定結果(EH2、EH3)

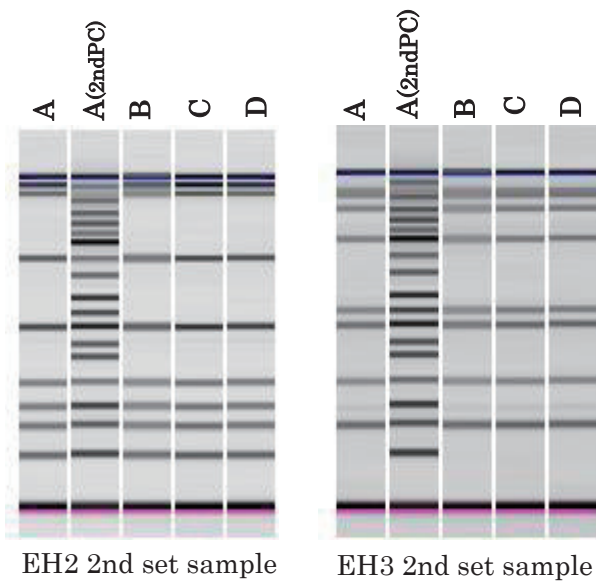
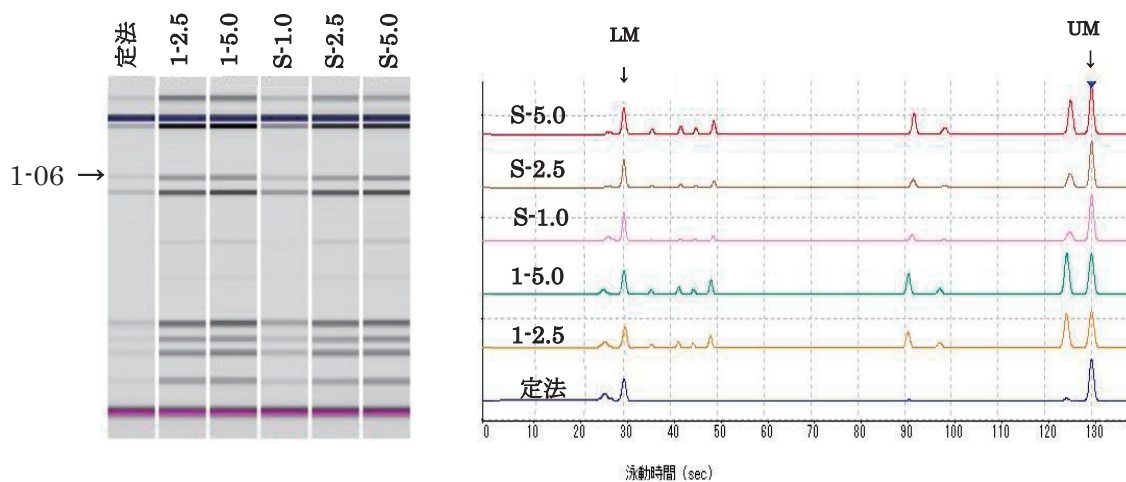
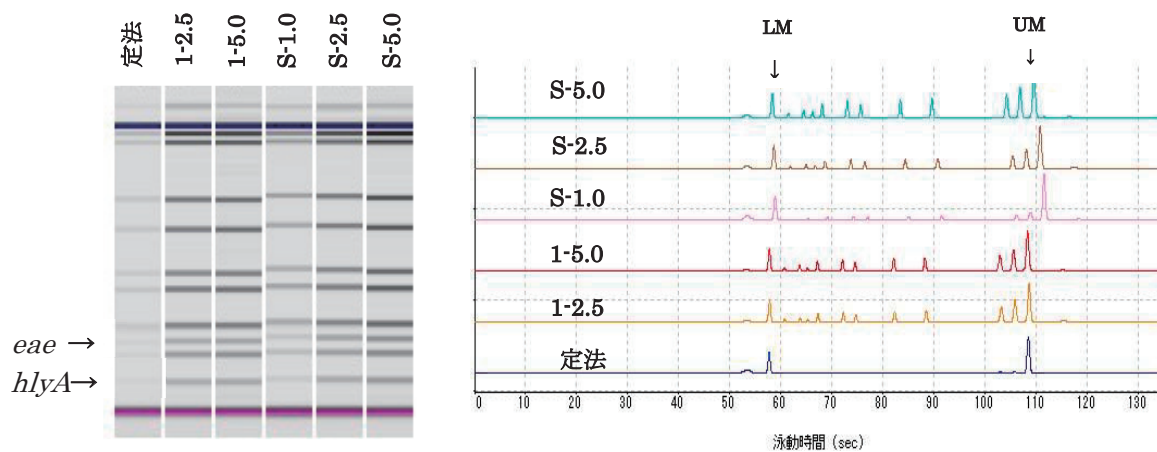


図5. 添加する template の量及び濃度の違いによる比較
(ゲルイメージとエレクトロフェログラム)

EH2(1st set)



EH3(1st set)



EH1(2nd set)

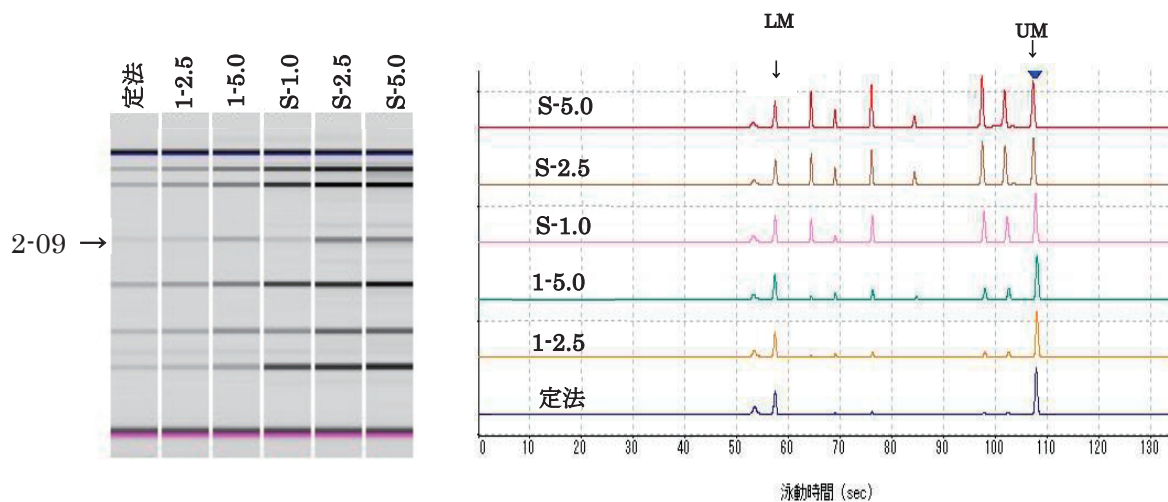
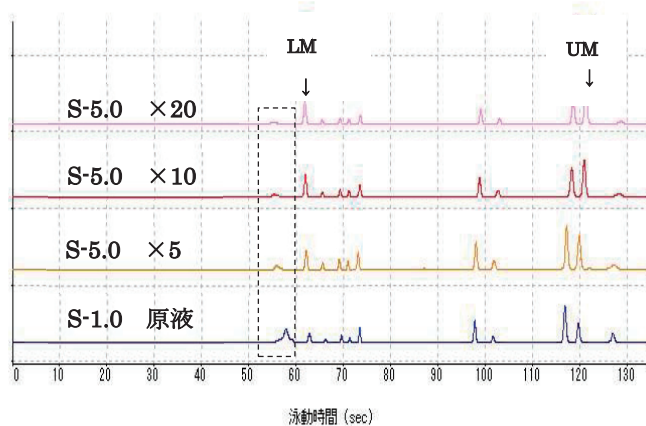
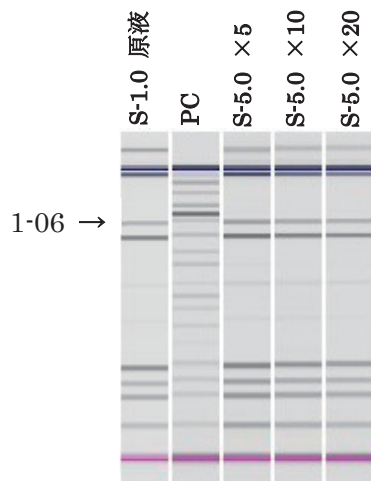
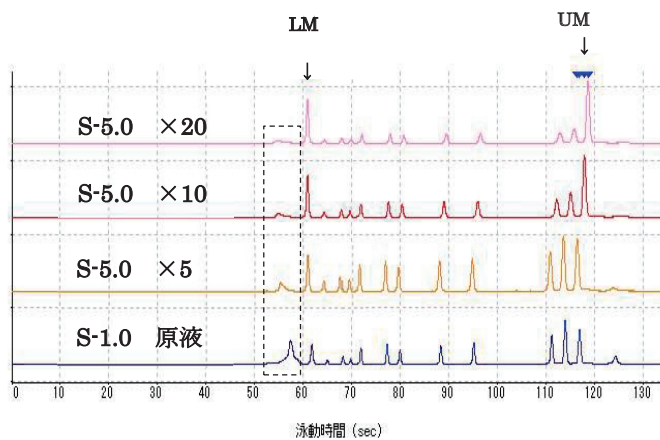
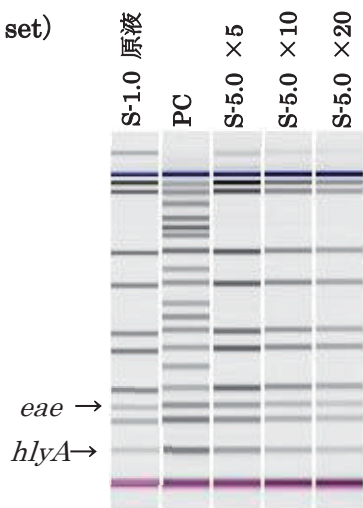


図6. 希釈倍率の違いによる比較 (エレクトロフェログラムとゲルイメージ)

EH2(1st set)



EH3(1st set)



EH1(2nd set)

