

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 29 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	河合 央博	岡山県環境保健センター
研究協力者	大友 麗	鳥取県衛生環境研究所
	福間 藍子	島根県保健環境科学研究所
	酒井 智健	〃
	平塚 貴大	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田 加奈子	〃
	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 恭晴	〃
	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
	園部 祥代	愛媛県立衛生環境研究所
	阿部 祐樹	〃
	高木 春佳	高知県衛生研究所
	戸梶 彰彦	〃
	狩屋 英明	岡山県環境保健センター
	仲 敦史	〃
	中嶋 洋	〃

研究要旨

食品由来感染症の広域発生事例が発生した場合、各地域の事例間の関連性を明らかにするためには、事例由来株の分子疫学解析結果等を共有し、比較・解析を行うことが有用となる。その際、各地域の施設が実施した分子疫学解析結果を用いて解析等を行うため、各施設における分子疫学解析手法の技術維持や解析精度の向上が不可欠かつ重要となる。そこで、中四国ブロック内の施設を対象に、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、ほとんどの施設で良好な結果が得られたが、一部の施設では検査法の改良や判定方法を含めた技術の習熟が必要と思われた。

平成 29 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、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し解析した結果、同一の分子疫学解析結果である感染事例が複数の県で確認されたが、いずれの事例間でも関連は不明であった。

分子疫学解析結果を用いた広域な菌株データベースの構築は、広域事例発生の迅速な

探知、さらには感染源の究明、感染拡大防止対策の構築等、事例への対応に有益なものとなると考えられる。データベースをさらに有意義に活用するためには、分子疫学解析技術の維持や精度の向上はもちろんであるが、疫学情報をいかに収集し、データベースに組み込むかが今後の課題と思われる。

A. 研究目的

食品由来感染症の広域事例が発生した場合、事例間の関連性を明らかにするためには、事例由来株の分子疫学解析結果の比較・解析が有用であり、適切に解析を行うには、技術の維持と解析精度の向上が不可欠かつ重要である。このため、全国6ブロックの各地域で各種解析手法の精度管理を実施している。中四国ブロックでは、平成27、28年度に引き続き平成29年度もIS-printing System（以下、IS-PSと言う）、パルスフィールドゲル電気泳動法（以下、PFGE法と言う）、multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis（以下、MLVA法と言う）について、腸管出血性大腸菌（以下、EHECと言う）O157株を用いた精度管理を実施するとともに、解析技術の問題点等を考察した。また、ブロック内でのEHEC発生事例について、分子疫学解析結果や疫学情報を収集し、関連性や流行株等を解析した。

B. 研究方法

1. 使用菌株（表1）

精度管理：ウシ直腸内容物由来EHEC O157株 菌株A,B,C,D,E(すべてH7, Stx1, 2) 5株を使用した。

EHEC感染事例解析：平成29年4月から10月までに中四国地域の8県で発生したEHEC感染事例の患者等由来株184株について、中四国地域の9施設で各々の収集株について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-PS (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化し（以下、ISコードと言う）、解析を行った。

(2) PFGE法

PFGE法は感染研ニュープロトコール（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、それぞれの施設のプロトコールにより実施した。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29年度は10施設 ((A) ~ (J)) 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、PFGE法は9施設 ((A)、(C) ~ (J))、MLVA法は4施設 ((D)、(E)、(F)、(I)) で実施した。IS-PSは、各 primer set の増幅産物の有無から作成したISコード及び泳動像を、PFGE法は、泳動像と解析ソフトを使用して作成した dendrogram を回収し、解析した。また、MLVA法は各遺伝子座のリポート数を比較解析した。

3. 疫学情報の収集と解析

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疫学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、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。泳動像はいずれの施設もバンドが認識でき、概ね良好であった。IS コードは多くの施設が一致したが、3 施設 ((A), (H), (J)) では 1st set primer の IS コードが他施設とは異なった。これは、1st set primer の菌株 B の「1-06」、菌株 E の「1-10」、さらに「*hlyA*」の判定に違いが見られたことによるものであった。

(2) PFGE 法による解析

PFGE 法の精度管理は、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、結果をまとめたものを表 3 に示した。

泳動像は、鮮明さ(解像度)等の影響もあるが、一部の施設(施設(D))で、54.7Kb(マーカーの上から 15 本目のバンド)付近より下側の低分子量側のバンドが不明瞭であったが、その他の施設は概ね良好であった。目視によりバンドパターンを比較したところ(54.7Kb 以上のバンドで比較)、若干異なる菌株があった。菌株 B では、施設(I)で他施設では見られない 336.5Kb(マーカーの上から 5 本目のバンド)付近のバンドが見られた。菌株 D では、施設(E)で他施設では見られない 138.9Kb(マーカーの上から 11 本目のバンド)付近のバンドが見られ、さらに施設(I)では、逆に他施設で見られる 167.1bp(マーカーの上から 10 本目のバンド)付近のバンドが見られなかったが、いずれの菌株でも 1 バンドの差異であった。他の菌株ではすべての施設で同一のバンドパターンを示した。また、デンドログラム解析を実施した 8 施設の結果では、類似度の最大値は 94.5%、最小値は 55%であった。類似度の順序は、各施設さまざまに 6 パターンとなった。

(3) MLVA 法による解析

MLVA 法は 4 施設で実施した。3 施設は O157 株の 17 カ所の遺伝子座を、1 施設

は 9 カ所の遺伝子座について、リピート数を解析した。その結果を、表 4 に示した。菌株 C の「O157-34」では施設(D)が、そして菌株 C 及び E の「O157-9」では施設(I)が他施設とは異なるリピート数となった。その他の遺伝子座では、リピート数は一致した。

2. 中四国地域の EHEC 感染事例発生状況と解析結果

中四国地域のうち 8 県で、平成 29 年 4 月～10 月に発生した EHEC 感染事例の患者等由来株について、IS-PS の実施結果及び MLVA 型等を含む疫学情報を収集した。このうち、情報を収集した時点で MLVA 型が決定されていた 184 株(内訳は、O26 株が 74 株、O91 株が 2 株、O103 株が 4 株、O111 株が 11 株、O121 株が 5 株、O157 株が 87 株、O165 株は 1 株)を対象に解析を行った。

その結果、O26 株では、同一の MLVA 型 17m2005 及び MLVAcomplex 17c201 の株が、c 県及び f 県の 2 つの県で検出された(表 5)。O157 株についても、同一の MLVA 型及び MLVAcomplex の菌株が複数の県で検出された。「17m0130、17c013」(MLVA 型、MLVAcomplex の順、以下同じ)の菌株が b 県と f 県で、「17m0121、17c013」及び「17m0129、17c044」が b 県と c 県、そして、「17m0143、17c027」が d 県と h 県で検出された。また、MLVA 型は異なるが同一の MLVAcomplex となった菌株が 3 種類(17c013、17c044、17c027)、複数の県で検出された。その他の O 血清群では、複数の県で同一の MLVA 型等となる菌株は検出されなかった。一方、O157 株の IS-PS では、同一の IS コードとなった菌株が 6 種類(①205457-211242、②317477-611756、③317557-211757、④317577-211756、⑤317577-211757、⑥717557-611657)が複数の県から検出された(表 6)。グループ③内の菌株はすべて同一の MLVAcomplex となったが、その他のグループでは、異なる MLVA 型あるいは MLVAcomplex の菌株が含まれた。

D 考 察

平成 29 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あったが、一部の施設で他施設と異なる結果となり、解析技術や精度の維持、向上が必要であると思われた。IS-PS では、3 施設が 1st set primer の IS コードが他施設とは異なる結果となった。これは、増幅産物の増幅が弱いバンドの判定(取捨)の違いやバンド位置の確認ミス等の原因が考えられた。増幅が弱いバンドの判定については、IS-PS の取扱説明書では、他に比べて明らかに増幅が弱いバンドはエキストラバンドであり結果判定の際に考慮に入れないとなっている。しかし、増幅の弱さの判断基準は検査実施者によって異なることも考えられる。このため、特に、他施設間の IS-PS 結果の比較等解析時は、バンドの有無や IS コードの情報だけで比較するのではなく、泳動像と合わせた確認が必要であると考えられた。併せて、本来明確に出現するバンドが、増幅が弱いバンドとなることも考えられる。これを防ぐためには、テンプレート調製の際、鮮明なバンドが出現するよう適切な濃度調製を行う必要もあると思われた。また、バンド位置の確認では、サンプルの増幅バンド位置と、Standard DNA あるいは Template Mix の増幅バンド位置との異同判定が困難となる場合がある。このようなケースに対応するため、泳動距離が長いゲルを使用する等工夫し、正確に判定する必要があると考えられた。

PFGE 法による解析は、多くの施設が良好な泳動像を示したが、一部の施設で他施設と異なるバンドが出現した菌株があった。検査を始めるまでの菌株の保管中に変異した等の要因が考えられたが不明であった。また、デンドログラム解析結果では、類似度の順番が施設によって異なり、施設間で違いが見られた。これは、先述したとおり異なるバンドが出現した菌株があったこと、さらに一部施設で低分子量側のバンドが不明瞭であったこと

や、検査実施者によるバンド位置の指定の差や、濃く太いバンドを 1 バンドとするところと 2 バンドとするところと違いが見られたことによるものと考えられた。PFGE 法はバンドの位置の指定等が異なることで解析結果に影響するため、サンプル菌液の濃度調製や制限酵素による消化反応、さらには染色を確実に行う等、明瞭なバンドが出現するよう技術を習熟し、慎重な解析が必要と思われた。

MLVA 法は、実施した 4 施設のうち 2 施設で結果が異なったが、その要因は不明であった。MLVA 法は、各遺伝子座のリポート数を基に型別する方法であるため、今後、特に多施設の MLVA 法の結果を集約したデータベースを構築するには、解析技術等の問題点・改善点の洗い出しを行い、精度の向上が必要と思われた。MLVA 法は分離能が PFGE 法とほぼ同等で高く、解析時間が PFGE 法と比べて短時間である等のメリットがある。また、本年度より、国立感染症研究所では、O157、O26、O111 に加え、O91、O103、O121、O145、O165 の血清群について解析を実施しており、多くの血清群について MLVA 法による解析が可能となり、今後ますます MLVA 法の利用度が高くなることが予想される。このようなことから今後 MLVA 法の導入を検討する施設も増加することが考えられ、精度維持や向上のためには導入検討施設に対する技術的支援も重要であると思われた。

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 株は 1 種類、O157 株は 3 種類の同一 MLVA 型あるいは MLVAcomplex の菌株が複数の県から検出された。これらの中には、本年度、関東地方を中心に広域的に発生した EHEC O157 による感染症や食中毒事例の MLVAcomplex 17c013 もあり、また、17c027 及び 17c044 も同様に広域で見られた MLVAcomplex であったが、同一 MLVA 型等での事例間での関連は不明であった。一方で、O157 株の IS-PS では、複数の県から検出された同一 IS コードの

菌株は6種類となったが、同一ISコードとなった事例間の関連も不明であった。同一ISコードの菌株間でも、MLVA型あるいはMLVAcomplexは異なる型が存在し、また逆に、同一のMLVA型あるいはMLVAcomplexの菌株であってもISコードが異なるケースもあった。しかし、疫学的関連性のある家族内事例では、ISコード、MLVA型あるいはMLVAcomplexが同一となった。IS-PS法の分離能は、MLVA法やPFGE法に比べやや劣ると言われている。しかし、手技が非常に簡便で迅速に解析が行えるといった利点があり、疫学的関連がある場合、迅速スクリーニング法として用いるには有効であると思われる。

今回、複数の県で分子疫学解析結果が同一となる事例がいくつか見られたが、疫学情報が少なく、これらの事例間での関連は不明であった。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ため、構築するデータベースに疫学情報をいかに組み込むかが今後の課題と思われる。

E 結論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 : H7 株を用いて、IS-PS、PFGE 法及び MLVA 法による精度管理を実施した。いずれの方法においても、概ね良好な結果が得られたが、一部の施設で結果が異なった。
2. IS-PS では、増幅が弱いバンドの判定の違いやバンド位置の確認ミスが見られた。また、PFGE 法では、低分子量側バンドが不明瞭となったところや施設間でバンド位置の指定の違いが見られた。いずれの方法でも、鮮明な泳動像が得られるよう検査技術の習熟や工夫が必要である。
3. MLVA 法は、解析技術等の問題点・改善点の洗い出しを行い、精度の向上が必要と思われた。
4. 中四国地域の複数の県で MLVA 型等分子疫学解析結果が同一となる事例がいくつか見られたが、事例間での関連は不

明であった。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ため、構築するデータベースに疫学情報をいかに組み込むかが今後の課題である。

F. 研究発表

なし。

表1 精度管理使用 EHEC 菌株

菌株No	血清型		Stx型	備考
	O群	H型		
A	157	7	1, 2	平成12年分離 ウシ直腸内容物由来株
B	157	7	1, 2	平成12年分離 ウシ直腸内容物由来株
C	157	7	1, 2	平成12年分離 ウシ直腸内容物由来株
D	157	7	1, 2	平成23年分離 ウシ直腸内容物由来株
E	157	7	1, 2	平成24年分離 ウシ直腸内容物由来株

表2 IS-PS による解析結果

施設名	菌株A		菌株B		菌株C		菌株D		菌株E	
	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code	1st primer code	2nd primer code
(A)	317573	611757	317173	611557	717575	631757	717573	611657	141043	302447
(B)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(C)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(D)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(E)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(F)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(G)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(H)	317577	611757	357177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(I)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141047	302447
(J)	317577	611757	317177	611557	717575	631757	717577	611657	141147	302447

図1 IS-PS 泳動像

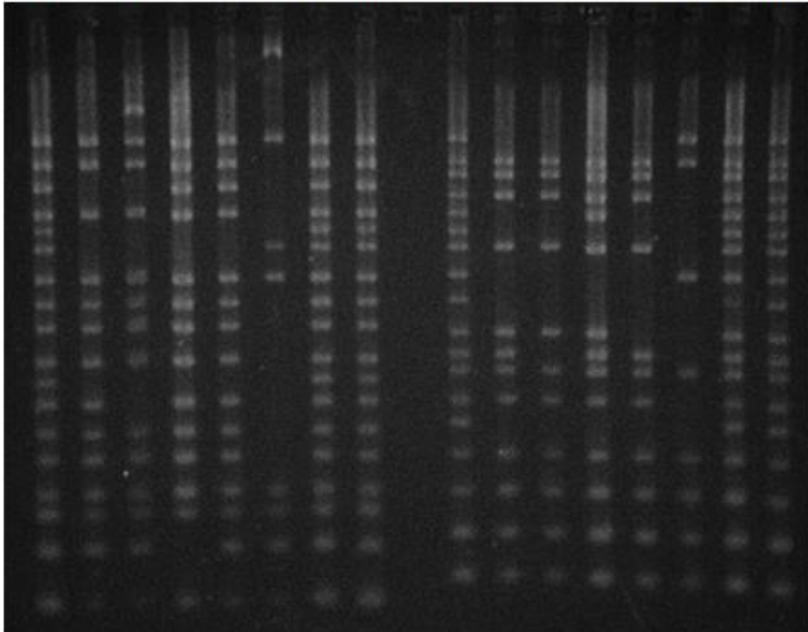
(A)

ISPS

1st set

2nd set

Std A B C D E P Std Std A B C D E P Std



Std:スタンダードDNA
A:菌株 STEC A
B:菌株 STEC B
C:菌株 STEC C
D:菌株 STEC D
E:菌株 STEC E
P:Template Mix

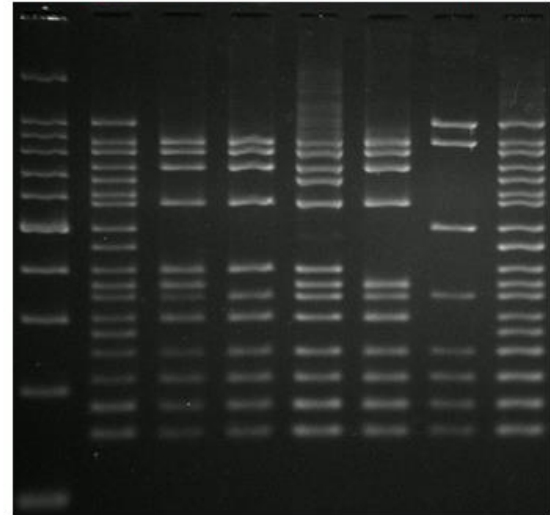
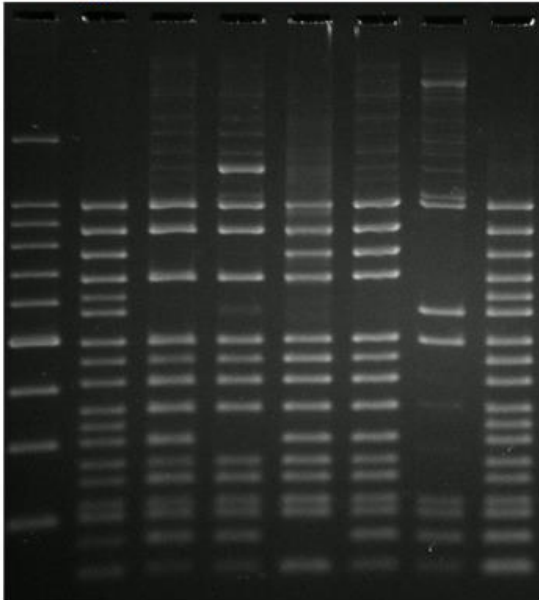
(B)

1st set

2nd set

M Std A B C D E P

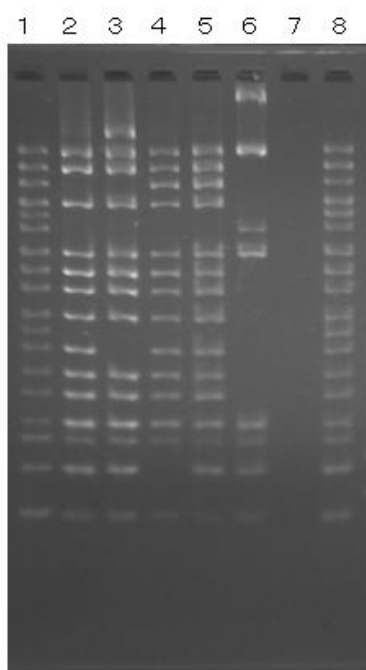
M Std A B C D E P



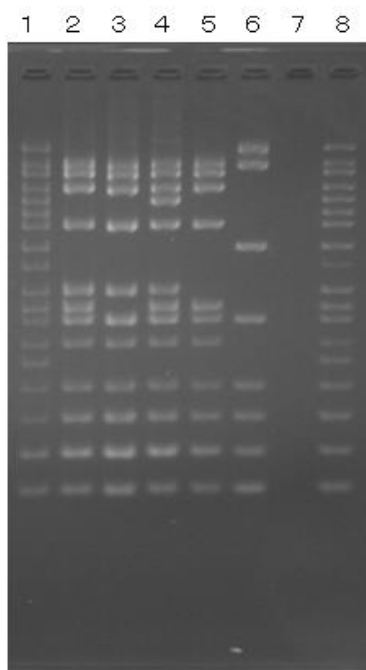
Std : Standard DNA, P : Template Mix
A : STECA, B : STECB, C : STECC, D : STECD, E : STECE

(C)

1st



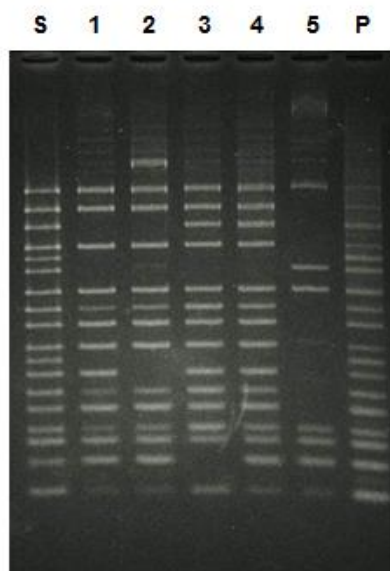
2nd



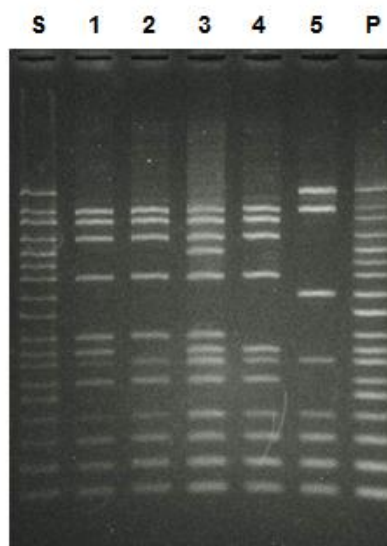
レーン	
1	Std
2	A
3	B
4	C
5	D
6	E
7	NC.
8	P.C.

(D)

[1st set]

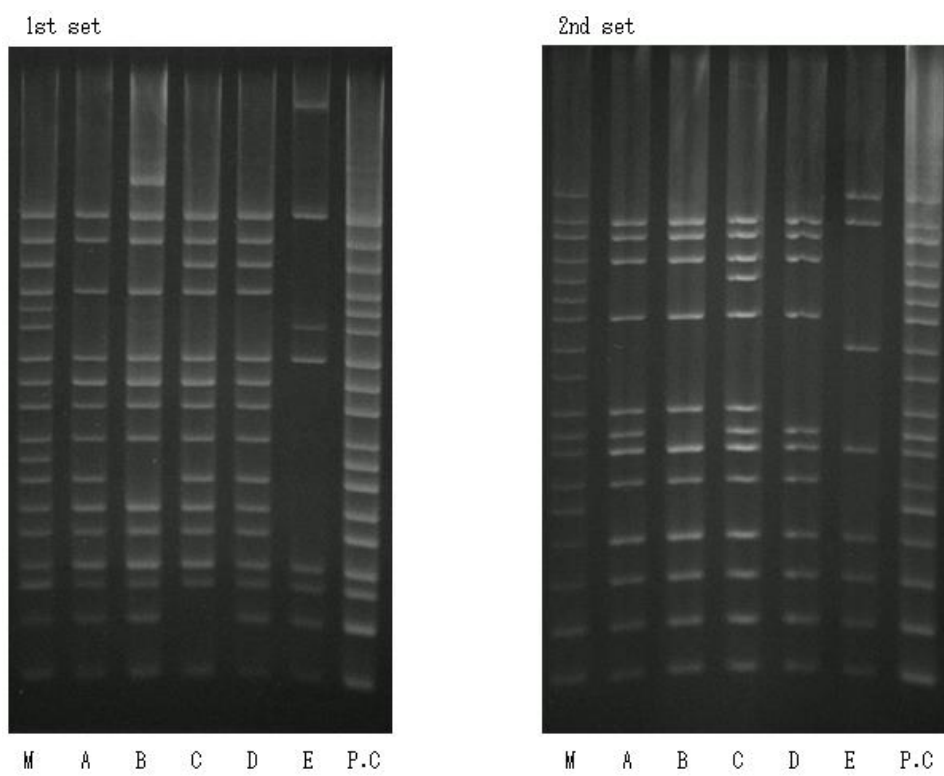


[2nd set]

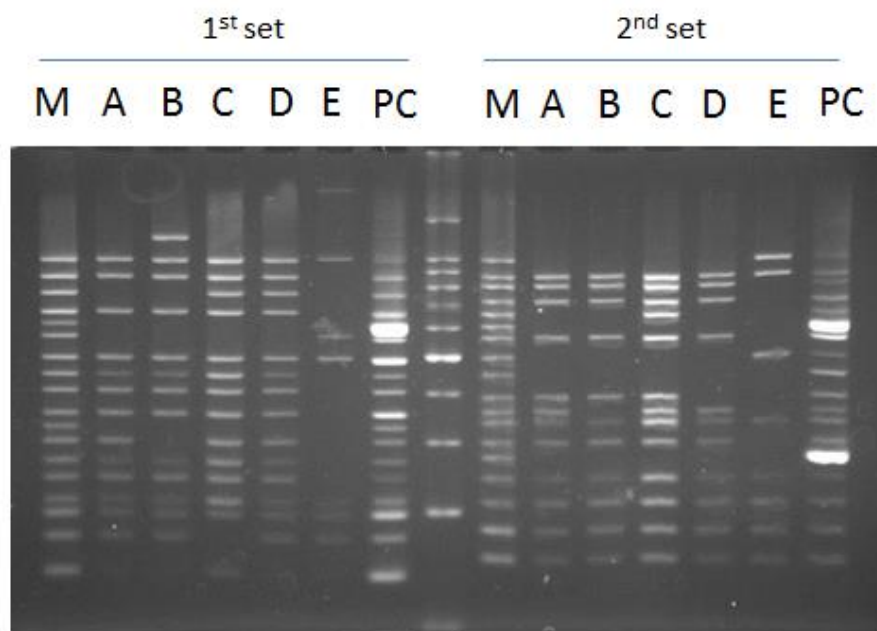


S	: Standard DNA
1	: A
2	: B
3	: C
4	: D
5	: E
P	: PCR Template DNA

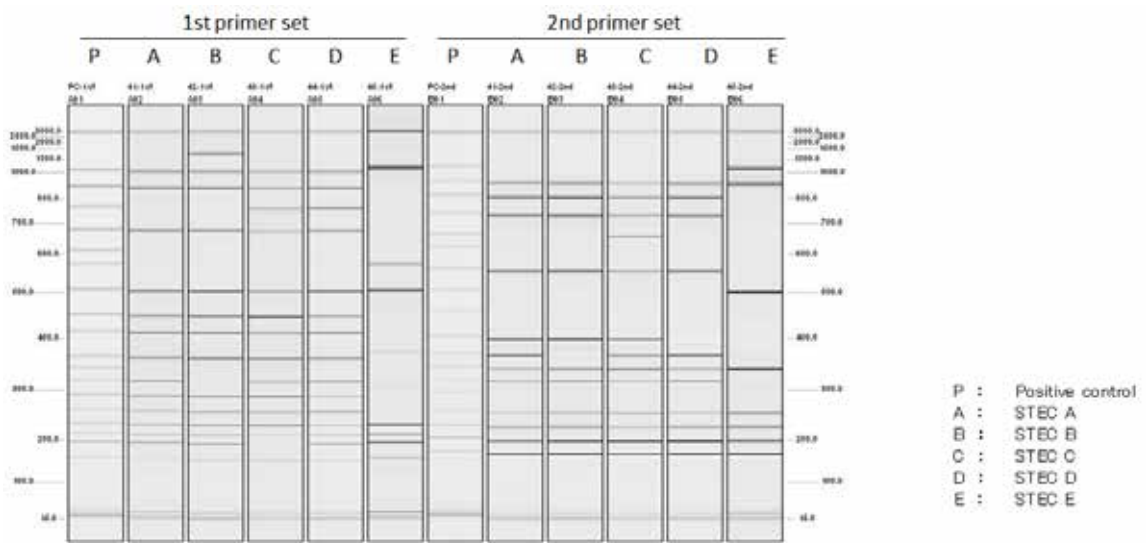
(E)



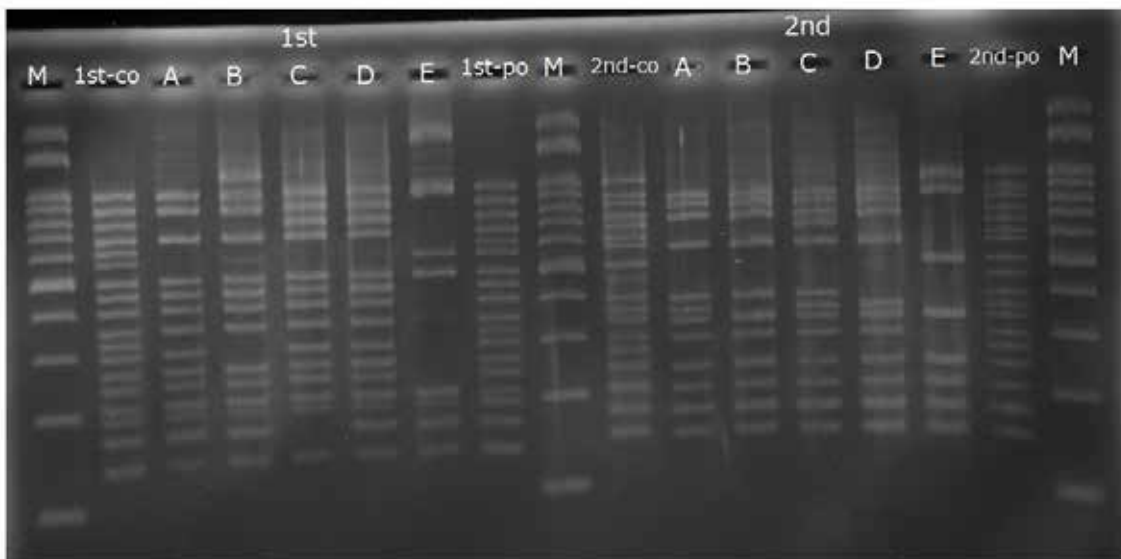
(F)



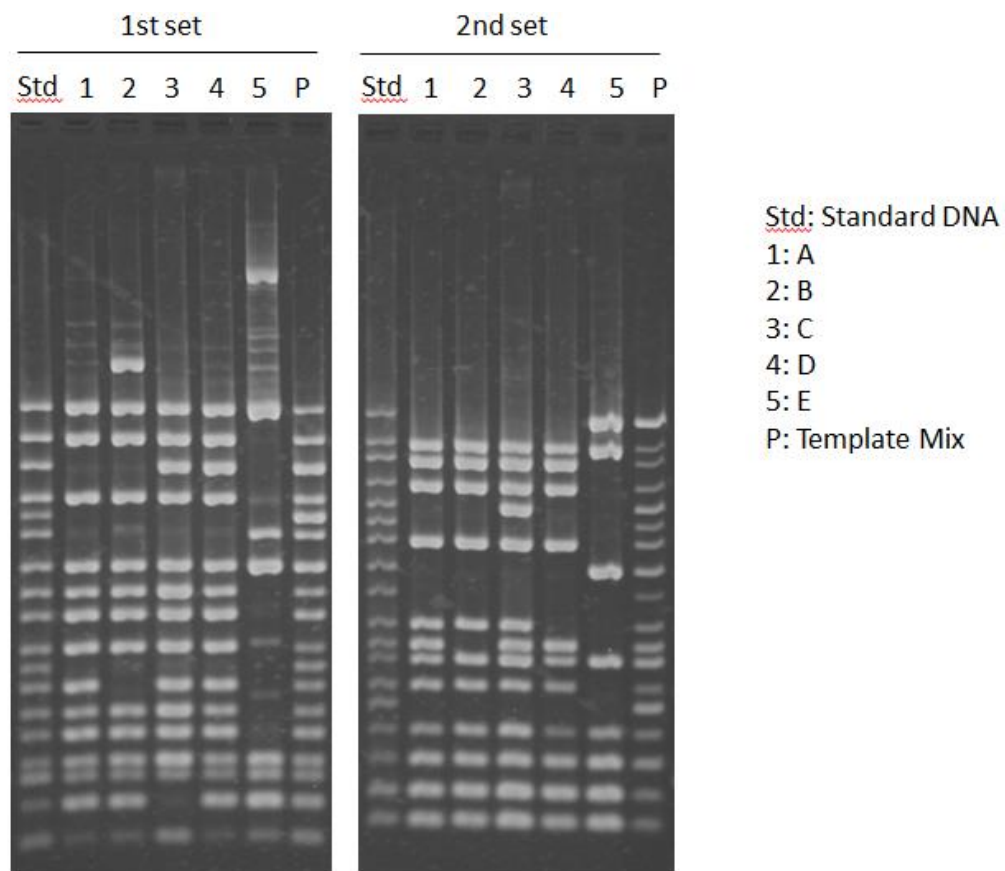
(G)



(H)



(I)



(J)

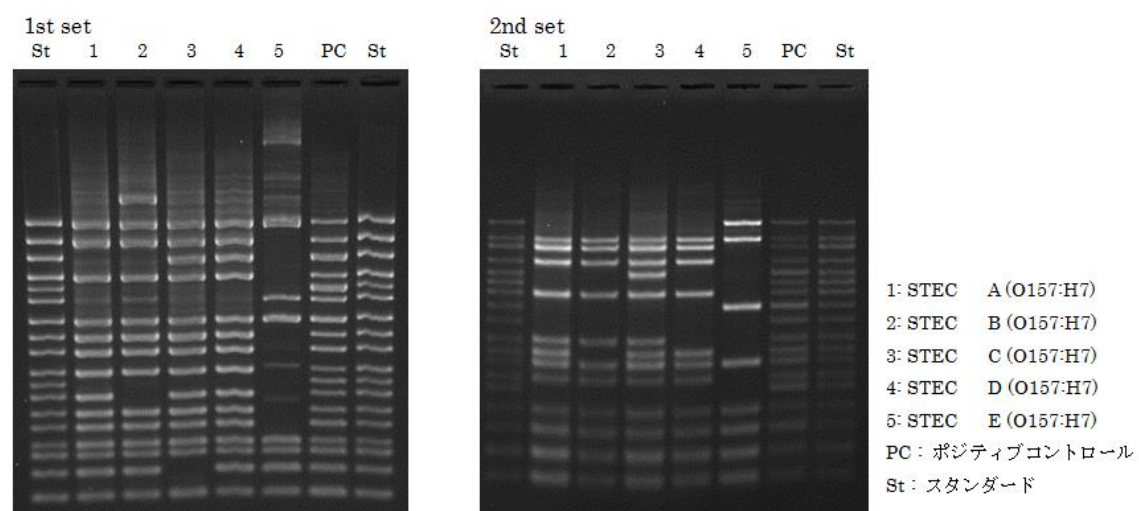
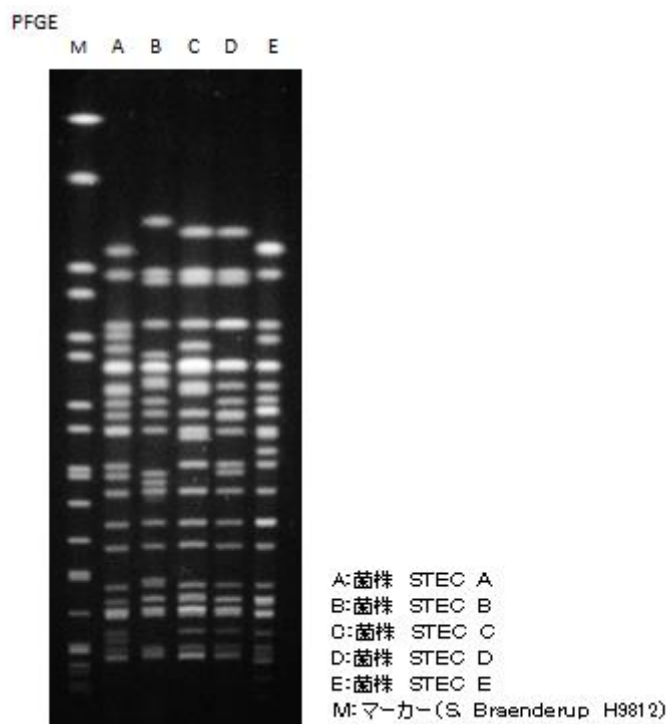
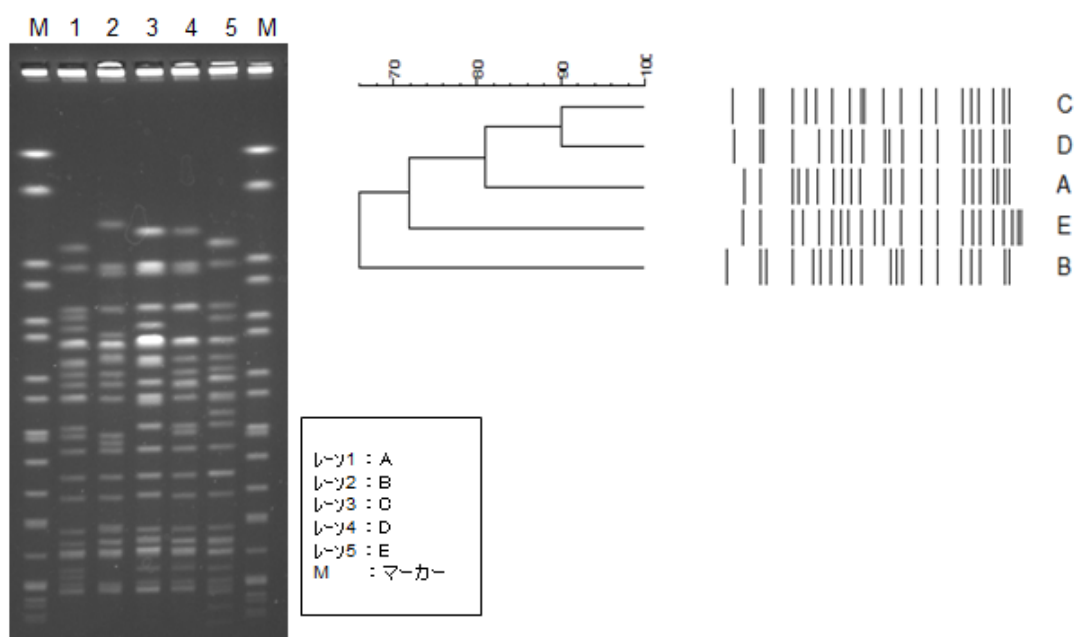


図2 PFGE 法による泳動像とデンドログラム解析結果

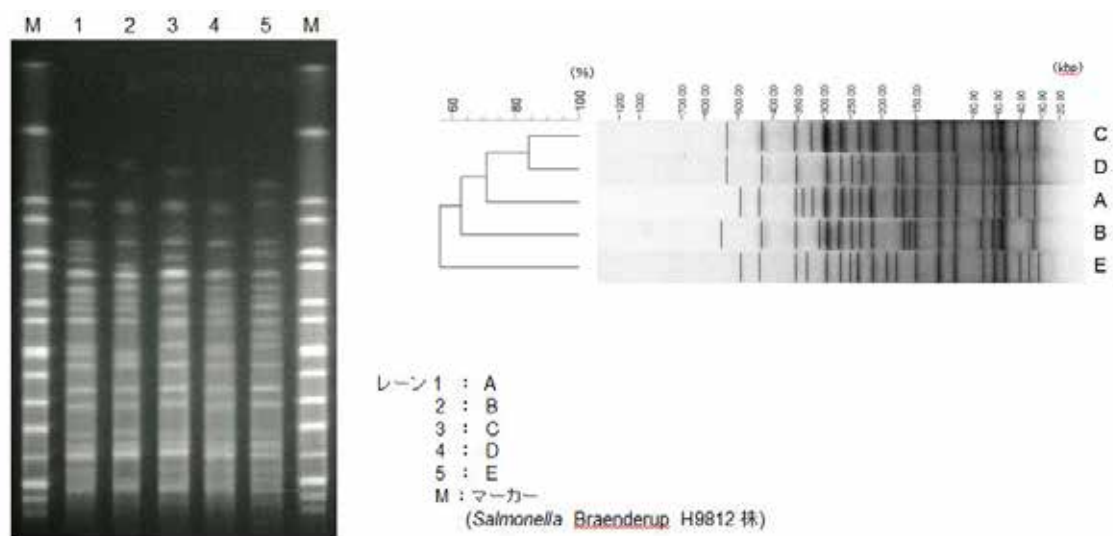
(A)



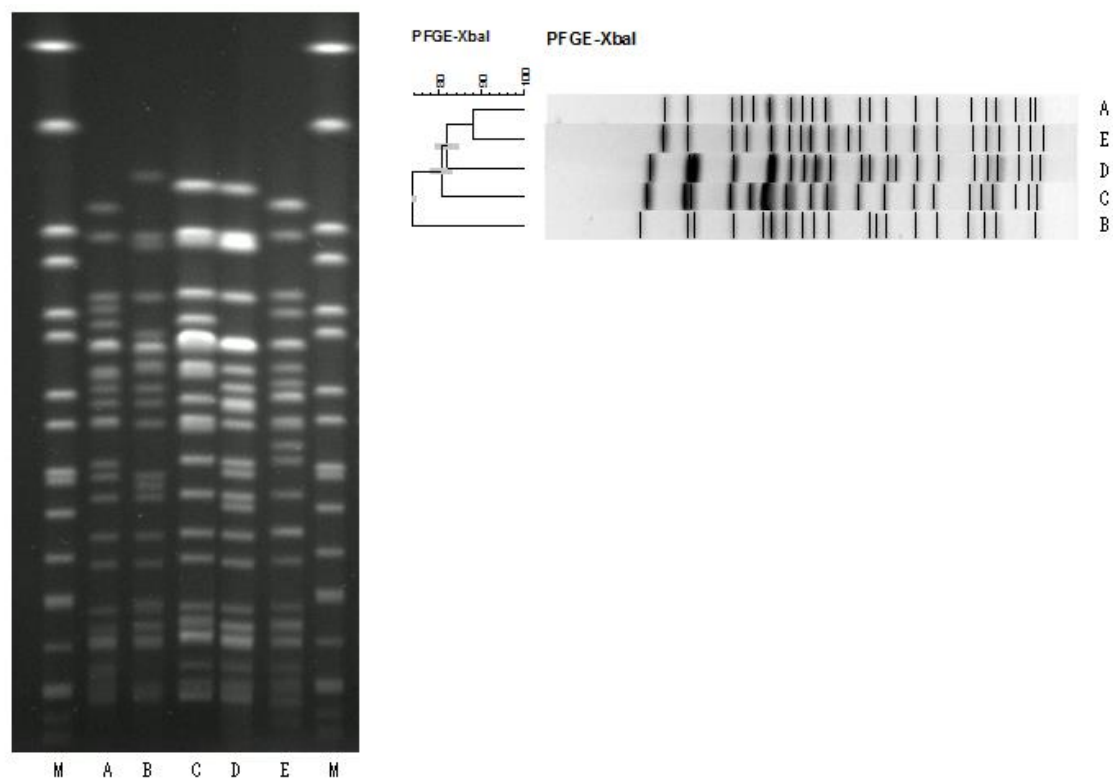
(C)



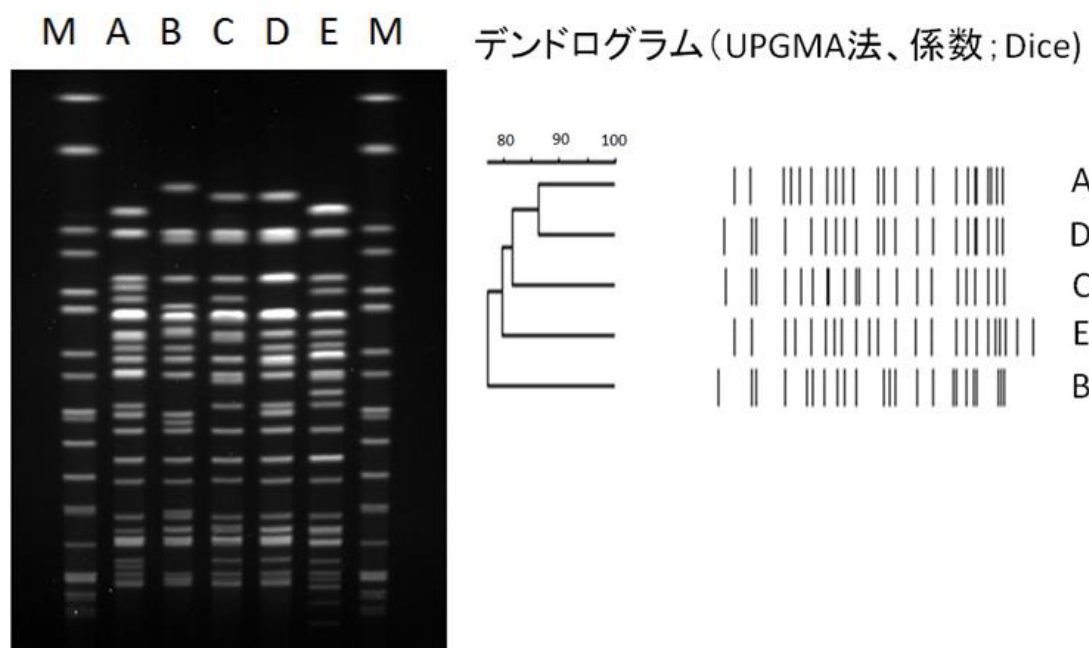
(D)



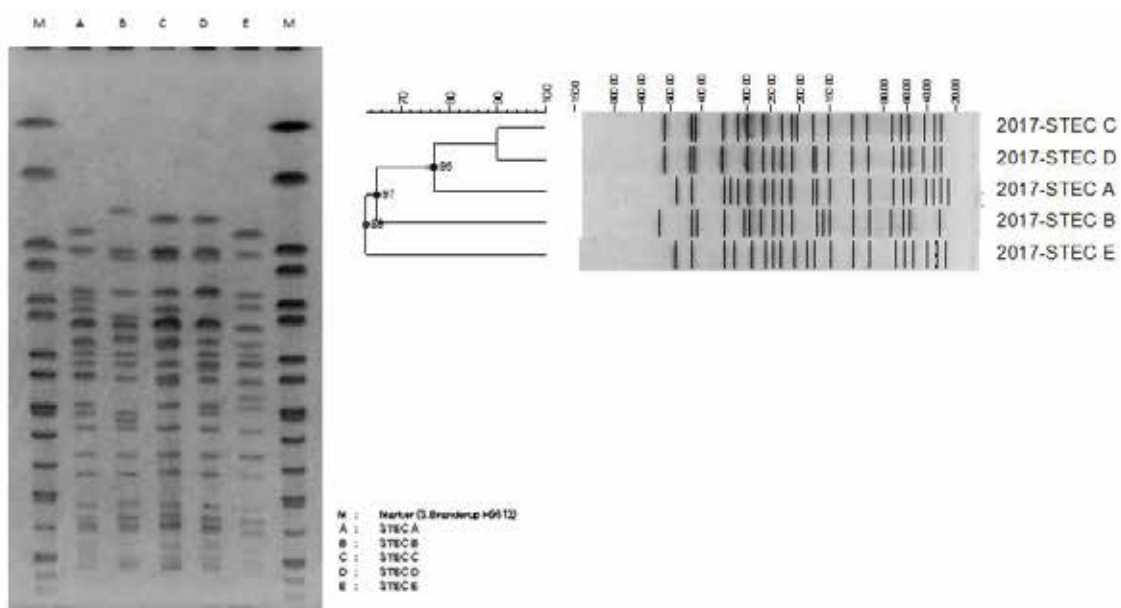
(E)



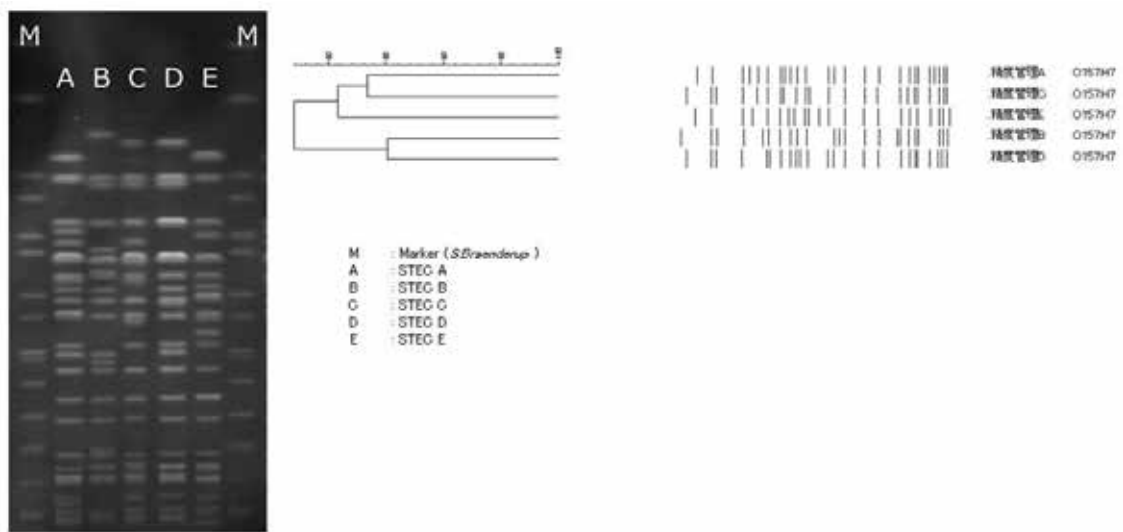
(F)



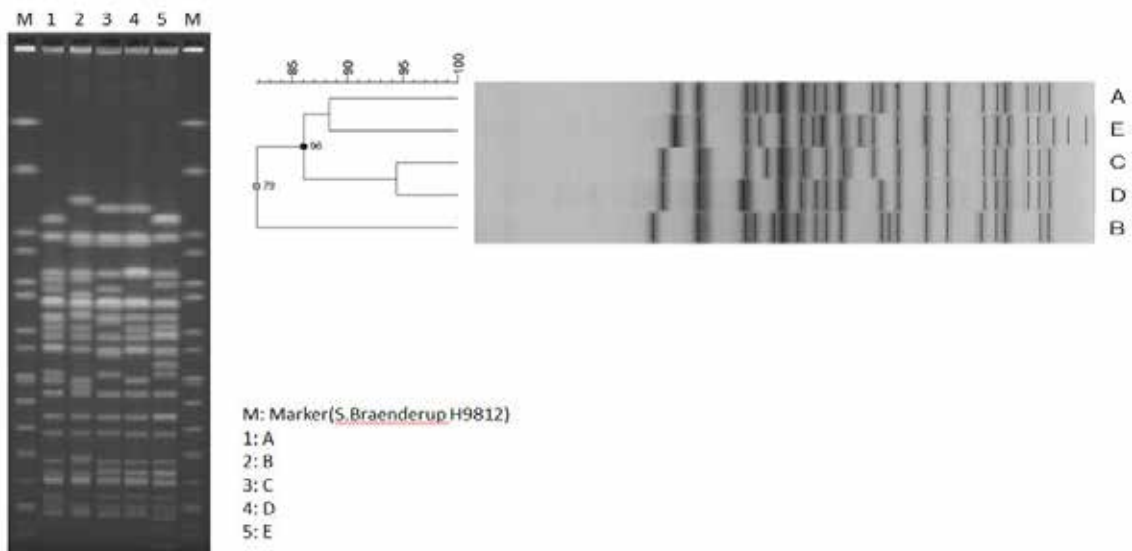
(G)



(H)



(I)



(J)

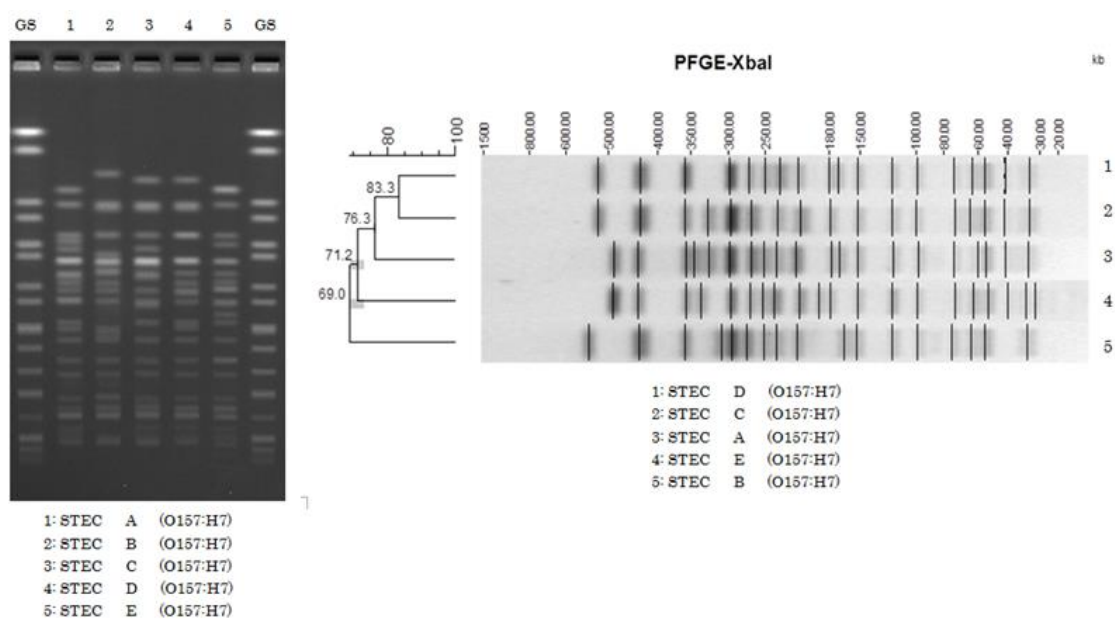


表3 PFGE法によりデンドログラム解析結果

施設名	デンドログラム解析結果
(A)	デンドログラム解析せず
(B)	PFGE法実施せず
(C)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株E ⇒ 菌株B (90→66%)
(D)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株B ⇒ 菌株E (85→55%)
(E)	菌株A - 菌株E ⇒ 菌株D ⇒ 菌株C ⇒ 菌株B (88→74%)
(F)	菌株A - 菌株D ⇒ 菌株C ⇒ 菌株E ⇒ 菌株B (86→78%)
(G)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株B ⇒ 菌株E (90→63%)
(H)	菌株A - 菌株C ⇒ 菌株E ⇐ 菌株B - 菌株D (85→77%)
(I)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A - 菌株E ⇒ 菌株B (94.5→82%)
(J)	菌株C - 菌株D ⇒ 菌株A ⇒ 菌株E ⇒ 菌株B (83.3→69.0%)

-:左右の菌株でグループ形成、 ⇒:矢印の方向へ類似度が低くなる

表 4 MLVA 法による解析結果

菌株	施設		EH111-11	EH111-14	EH111-8	EH157-12	EH26-7	EHC-1	EHC-2	EHC-5	EHC-6	O157-3	O157-34	O157-9	O157-25	O157-17	O157-19	O157-36	O157-37	O157-10
	(D)	(E)																		
菌株A	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	4	-2	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	6	23
	(E)	(D)	2	-2	1	4	-2	4	-2	10	9*	17	4	8	6	9	6	9	6	23
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	4	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	9	6	23
	(D)	(F)	2	-2	1	4	-2	4	-2	10	11	17	4	8	6	9	6	9	6	23
菌株B	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	11	12	3	6	13	6	13	7	5
	(E)	(D)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	9*	12	3	6	13	6	13	7	5
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	11	12	3	6	13	6	13	7	5
	(D)	(F)	2	-2	1	4	-2	4	-2	12	14	11	12	3	6	13	6	13	7	5
菌株C	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	13	11	4	8	4	10	7	26
	(E)	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	10*	11	4	8	4	10	7	26
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	12	11	4	8	4	10	7	26
	(D)	(F)	2	-2	1	4	-2	5	4	13	-2	10	12	11	4	8	4	10	7	26
菌株D	(D)	(E)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	7
	(E)	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	9*	13	7	7	5	3	7	26
	(F)	(D)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	26
	(D)	(F)	2	-2	1	4	-2	5	4	-2	-2	12	11	13	7	7	5	3	7	26
菌株E	(D)	(E)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	8
	(E)	(D)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	7*	9	4	3	5	5	8	31
	(F)	(D)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	31
	(D)	(F)	2	-2	1	1	-2	7	6	7	-2	-2	9	9	4	3	5	5	8	31

*:ODCプライマー使用のため、2ずつ異なっている。

表5 複数県で発生した EHEC の同一 MLVA 型あるいは MLVAcomplex 株による事例

グループ	県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	Stx型	MLVA型	MLVA complex	備考(疫学的関連など)
I	c	17006	4	26	11	1	17m2006	17c201	
	f	EHI7-8	6	26	11	1	17m2006	17c201	EHI7-8の家族
		EHI7-9	7	26	11	1	17m2006	17c201	
II	b	2027	8	157	7	2	17m0130	17c013	
	f	EHI7-13	8	157	7	2	17m0130	17c013	
	b	2017	8	157	7	2	17m0144	17c013	2026の家族
		2026	8	157	7	2	17m0144	17c013	
	b	2023	8	157	7	2	17m0121	17c013	2023の家族
		2033	8	157	7	2	17m0121	17c013	
	c	EHI7-12	8	157	7	2	17m0121	17c013	
	c	EHI7-13	8	157	7	2	17m0121	17c013	EHI7-13の家族等(家族及びいとこ)
		EHI7-14	8	157	7	2	17m0121	17c013	
		EHI7-15	8	157	7	2	17m0121	17c013	
		EHI7-16	8	157	7	2	17m0121	17c013	
EHI7-17		8	157	7	2	17m0121	17c013		
c	EHI7-18	8	157	7	2	17m0121	17c013		
III	b	2035	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	2035の家族
		2038	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	
	b	2032	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	
	c	17013	8	157	7	1, 2	17m0129	17c044	
	e	9	9	157	7	1, 2	17m0340	17c044	
IV	b	2022	8	157	7	1, 2	17m0210	17c027	
	b	2043	8	157	7	1, 2	17m0210	17c027	
	b	2046	8	157	7	1, 2	17m0210	17c027	
	d	17Y08	8	157	7	1, 2	17m0143	17c027	
	h	他24	9	157	7	1, 2	17m0143	17c027	

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

グループ	県名	菌株No	発生日	O血清群	H型	Stx型	IS-PS		MLVA型	MLVA complex	備考(疫学的関連など)
							1st primer code	2nd primer code			
①	b	2027	8	157	7	2	205457	211242	17m0130	17c013	
	f	EHI7-13	8	157	7	2	205457	211242	17m0130	17c013	
	b	2017	8	157	7	2	205457	211242	17m0144	17c013	2026の家族
		2026	8	157	7	2	205457	211242	17m0144	17c013	
	b	2023	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	2023の家族
		2033	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
	c	EHI7-12	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
	c	EHI7-13	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	EHI7-13の家族等 (家族及びいとこ)
		EHI7-14	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-15	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-16	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-17	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
		EHI7-18	8	157	7	2	205457	211242	17m0121	17c013	
b	2049	10	157	7	2	205457	211242	17m0438	17c056	2049の家族	
	2050	10	157	7	2	205457	211242	17m0438	17c056		
	2052	10	157	7	2	205457	211242	17m0439	17c056		
②	d	17Y02	6	157	7	1, 2	317477	611756	17m0070		
	b	2028	8	157	7	1, 2	317477	611756	17m0227		
③	b	2035	8	157	7	1, 2	317557	211757	17m0129	17c044	2035の家族
		2038	8	157	7	1, 2	317557	211757	17m0129	17c044	
	b	2032	8	157	7	1, 2	317557	211757	17m0129	17c044	
	e	9	9	157	7	1, 2	317557	211757	17m0340	17c044	
④	b	1994	5	157	7	1, 2	317577	211756	17m0017		
	c	EHI7-11	8	157	7	1, 2	317577	211756	16m0374		
⑤	b	2022	8	157	7	1, 2	317577	211757	17m0210	17c027	
	b	2043	8	157	7	1, 2	317577	211757	17m0210	17c027	
	d	17Y08	8	157	7	1, 2	317577	211757	17m0143	17c027	
	h	他24	9	157	7	1, 2	317577	211757	17m0143	17c027	
	f	EHI7-17	8	157	7	1, 2	317577	211757	16m0085		
⑥	b	2000	6	157	7	1, 2	717557	611657	17m0078	17c008	2000の家族
		2001	6	157	7	1, 2	717557	611657	17m0079	17c008	
	b	2004	6	157	7	1, 2	717557	611657	17m0186		
	d	17Y20	10	157	7	1, 2	717557	611657	14m0028		

島根県で分離された腸管出血性大腸菌 O26 の分子疫学的解析

研究協力者 島根県保健環境科学研究所

福間 藍子 酒井 智健

研究要旨

2017年に島根県で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 7株について、PFGE 法による解析を行い、MLVA 法の解析結果との比較を行った。その結果、これら 7株は PFGE 法では 1 バンド以内の相違、MLVA 法では 1 遺伝子座以内の相違を示し、2つの分子疫学的解析から共に密接な関連性が示唆された。また疫学情報からも関連性が認められたことから、今回解析した 7株は同一集団感染事例由来株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には、従来から実施されているパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法の他に、近年開発された IS-printing System (IS) 法や Multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) 法がある。IS 法は、迅速かつ簡便性に優れた方法であるが、実用化されているものはまだ O157 のみで、その他の血清型についてはまだ研究段階である。国立感染症研究所 (感染研) における MLVA 法による解析は、これまでの EHEC O157, O26, O111 に加え、2017年より O103, O121, O145, O165, O91 が追加された。

本研究では、2017年に島根県内で分離された O26 7株について、PFGE 法と MLVA 法による分子疫学的解析から、これら 7株の関連性について検討を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株 (表 1)

2017年に島根県で届出のあった O26 感染症 7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

感染研の方法に準拠した¹⁾。制限酵素は Xba I (Takara) を用い、電気泳動は BIO-RAD CHEF MAPPER (Bio-Rad) を用いて 6V/cm, パルスタイム 2.2-54.2 秒, 14°C の条件で 19 時間行った。PFGE 法において、感染研の示した分類では、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た²⁾。

(2) MLVA 法

菌株を感染研に送付し、解析を依頼した。MLVA 法においては、相違する部位数が 0 の場合は一致、1 の場合は密接に関係、2 の場合は関係する可能性がある、3 以上は不一致と解釈した²⁾。

C. 研究結果

(1) PFGE 法 (図 1)

EHEC O26 7株は、PFGE 法により 2 パターンに分類された (図 1)。SE17007 及び SE17009 は同一パターンを示し、SE17008, SE17010~SE17013 も同一パターンを示し

た。SE17007 及び SE17009 のパターンと SE17008, SE17010～SE17013 のパターンは、1 バンドの相違を示したことから、これら 7 株は密接な関係が示唆された。

(2) MLVA 法 (表 1)

EHEC O26 7 株の MLVA 法による解析結果は表 1 に示した。SE17007～SE17013 (SE17010 を除く) の 6 株の MLVA 型は 17m2162 で一致していた。SE17010 株の MLVA 型は 17m2163 で、1 遺伝子座違いであった。そして、これら 7 株はすべて同一の MLVA complex 17c219 に分類された。

D. 考察

2017 年に島根県内で分離された EHEC O26 7 株について、PFGE 法及び MLVA 法による解析を行った。今回解析した 7 株のうち、PFGE 法で 1 バンドの相違を示した株 (SE17007, SE17009) と、MLVA 法で 1 遺伝子座違いを示した株 (SE17010) は、異なる株であった。しかし、これら 7 株は、PFGE 法で 1 バンド以内の相違、また MLVA 法で 1 遺伝子座違い以内の相違を示していたことから、密接な関連性が示唆された。

またこれら 7 株はすべて同時期に A 保育園を利用した人またはその家族から分離された株であり、疫学情報からも関連性が認められた。

今回解析した O26 7 株は、分子疫学的解析及び疫学情報から共に密接な関連性が認められたことから同一集団感染事例由来株と考えられた。

PFGE 法は、手技は煩雑で、時間を要するなどの問題点はあるが、識別能が高く、今回のような県内における集団感染事例などの

場合には有用な方法である。

MLVA 法は、迅速かつ簡便で、広域集団感染事例などの場合において、異なる施設間の比較が可能な方法である。しかし、現在、当所では MLVA 法は実施しておらず、感染研に解析を依頼しているため、解析結果が得られるまでに要する時間は感染研に依存するなどの課題がある。今後、当所においても MLVA 法の導入を検討する必要があるかもしれない。

E. 結論

今回解析した O26 7 株は、分子疫学的解析及び疫学情報から共に密接な関連性が認められたことから同一集団感染事例由来株と考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) 寺嶋敦 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) 病原微生物検出情報: 腸管出血性大腸菌の分子型別. Vol. 35 No.5 (2014.5), 129-130.

表 1. 腸管出血性大腸菌 O26 の菌株の概要と MLVA 法による解析結果

菌株番号	血清型	毒素型	MLVA 型	MLVA complex	届出日	発症日	年齢	患者性別	疫学情報	症状
sE17007	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/1	2017/8/26	1	F	A 保育園利用者	水溶性下痢、発熱、咳、鼻水、膿痂疹
SE17008	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/9	2017/8/25	1	M	A 保育園利用者	発熱、下痢、咳、嘔吐
SE17009	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/11	2017/8/26	0	F	A 保育園利用者	軟便
SE17010	O26:H11	VT1	17m2163	17c219	2017/9/14		1	M	A 保育園利用者	咳、鼻水
SE17011	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/16		31	F	A 保育園利用者	なし
SE17012	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/16		39	F	SE17009 の家族	なし
SE17013	O26:H11	VT1	17m2162	17c219	2017/9/16		3	F	A 保育園利用者	なし

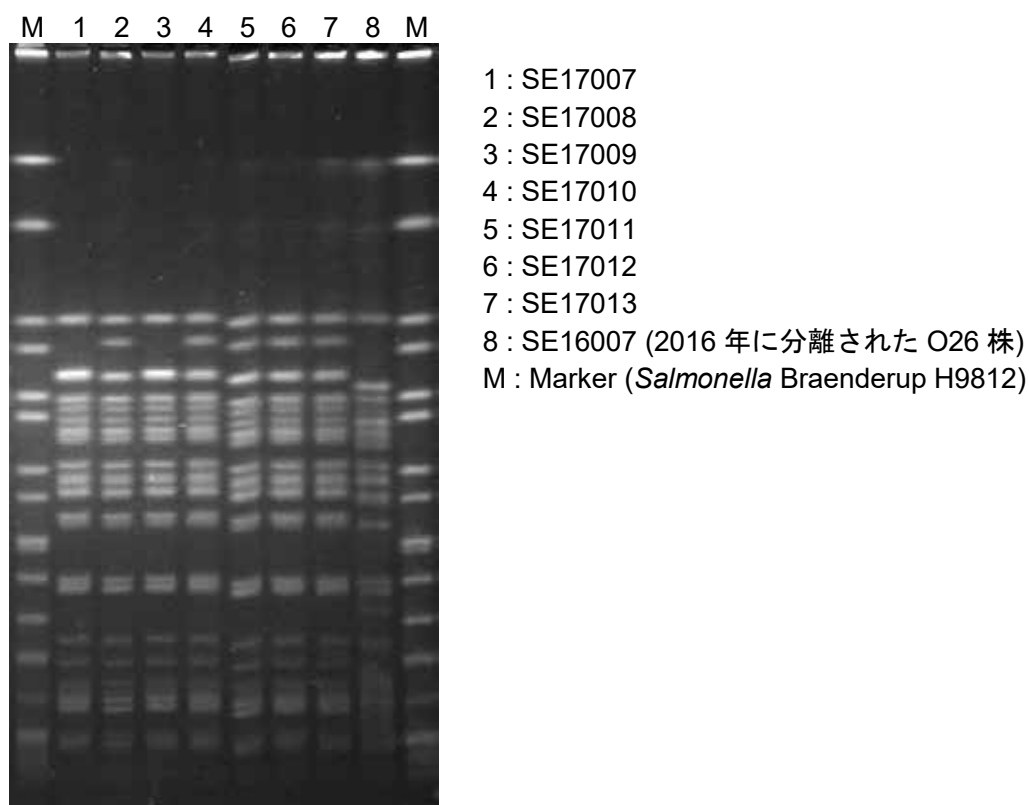


図 1. 腸管出血性大腸菌 O26 の PFGE 法による解析結果

腸管出血性大腸菌 O26 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

平塚 貴大 増田 加奈子

研究要旨

2017年に広島県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 について、分子疫学解析手法として、MLVA 法を実施した。家族内感染事例で分離された菌株は、各事例で同じ MLVA 型を示したが、集団感染事例で分離された菌株は5つの型に分かれた。一方この集団感染事例で分離された菌株について PFGE 法を実施した結果、すべての株で1バンド以内の相違であった。MLVA 法、PFGE 法ともに集団感染を特定するために有用な手法であるが、MLVA 法では、同一の集団感染事例の中でも多型がみられる場合があることが示された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌感染症のうち、2017年に広島県内で最も発生届の多かった血清型は O26 であり、3例の家族内感染と、県内の保育所で発生した1例の集団感染事例が含まれていた。今年発生した腸管出血性大腸菌感染症のうち、当所に搬入された O26 の菌株について分子疫学的関連性を明らかにするため、MLVA 法及び PFGE 法を行った。

B. 研究方法

1. 供試菌株

広島県内で分離され、2017年に当所へ搬入された腸管出血性大腸菌 (EHEC) O26 28株(菌株番号17-01~42)を用いた。各菌株及び患者の概要を表1に示した。

2. 方法

(1) MLVA 法

Izumiyama らの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)を用いて各菌株で2セットの PCR 反応を実施し、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 及び 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) を用いてシークエンスを行い、各遺伝子座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 (MST) 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。バンドパターンは, BioNumerics Ver.6.6 を用い, Dice 及び 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。

C. 研究結果

1. MLVA 法

MLVA 法によって解析を行った菌株の各遺伝子座のリピート数(MLVA 型)を, 表 2 に示した。すべての遺伝子座のリピート数が一致した株を MLVA グループとして分類した(G1~G6) (表 2, 図 1)。家族内感染事例と思われる 3 例(事例 A~C)については, 各事例ですべての株の MLVA 型が一致した(表 2)。また, G6 は 17-01 と 2 遺伝子座でリピート数の違いがあったが, 疫学的な関連性はなかった。

集団感染事例(事例 D)で分離された 18 株(17-24~41)は, 大きく 3 つのグループ(G1~G3)と, どのグループにも属さない 2 株(17-30, 17-33)に分類された(図 1)。17-30 は G2, G3 と 2 か所の遺伝子座でリピート数が異なり, 17-33 は G1, G3 と 2 か所の遺伝子座でリピート数が異なっていた。また, 事例 D の中には 4 例の家族内感染が含まれていたが, これらのうち, 3 例(17-24,25,26,27,28/17-31,36/17-32, 37)については各家族内で MLVA 型が一致したが, 1 例(17-33,38,39,40,41)については 17-33 のみが 2 遺伝子座(O157-37, EHC-6)でリピート数が異なった(表 2)。17-33 のリピート数は O157-37 で 5, EHC-6 で 7 であり, 他の 4 株ではどちらもピークが検出されず, 遺伝子座が存在

しないことが予測された。

2. PFGE 法

事例 D で分離された 18 株について, PFGE 法を行った。17-32 以外の 17 株は同一のバンドパターンを示し, 17-32 とは 1 バンドの差があった(図 2)。

D. 考 察

MLVA 法による解析の結果, 家族内感染事例と思われる 3 例(事例 A~C)については, 各事例で MLVA 型が一致した一方で, 集団感染事例(事例 D)で分離された菌株については 5 つの型がみられた。これらの型は最も近い型と 2 遺伝子座以内の違いであったため, 集団感染の一部と考える基準の範囲内であった。一方で, G6 と 17-01 のように, 疫学情報では共通事項がみられない株でも 2 遺伝子座以内の違いになる場合もあるので, MLVA 法による集団感染事例の判断は, 疫学情報を基にして行わなければならない。

集団感染事例中の家族内感染について, 1 つの家族内(17-33,38,39,40,41)で 2 遺伝子座のリピート数が異なっており, 17-33 は他の 4 株には存在しない遺伝子座を保有していた。O157-37, EHC-6 はプラスミド上にあることが知られており¹⁾, 17-33 のみがプラスミドを保有していたため, 家族内で 1 株だけ異なるリピート数であったと考えられた。同一の集団感染事例の中で MLVA 型に多型がみられるひとつの理由として, プラスミドの獲得や脱落によるリピート数の変化があることが考えられた。

PFGE 法では, 事例 D に関係する 18 株

のうち、17-32 が1バンド異なるのみで、他の株は同一のバンドパターンを示したことから、これらの株が同一の集団感染事例の患者から分離されたことが強く示唆された。PFGE 法の結果では、MLVA 法でみられたような多型がみられず、判断が容易であった。

E. 結論

2017年に広島県内で分離された腸管出血性大腸菌 O26 28 株について、MLVA 法、PFGE 法により分子疫学解析を実施した。家族内感染事例及び集団感染事例で分離された株は、関連性を示した。ただし、集団感染事例では MLVA 法の結果に多型がみられたため、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) 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・分担研究報告書, 10-21.

表1 2017年に分離された腸管出血性大腸菌 O26

菌株番号	性別	年齢	地域	血清型	毒素型	事例番号	疫学情報
17-01	男	18	F	O26:H11	VT1		
17-04	女	12	WE	O26:H11	VT1	A	
17-05	女	43	WE	O26:H11	VT1	A	17-04の家族
17-06	男	3	F	O26:H11	VT1	B	
17-07	女	1	F	O26:H11	VT1	B	17-06の家族
17-09	男	62	F	O26:H11	VT1		
17-19	女	40	E	O26:H-	VT1	C	
17-20	女	1	F	O26:H11	VT1	B	17-06と同一人物
17-23	男	4	E	O26:H-	VT1	C	17-19の家族
17-24	男	2	F	O26:H11	VT1	D	
17-25	女	63	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-26	男	38	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-27	男	5	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-28	男	1	F	O26:H11	VT1	D	17-24の家族
17-29	女	2	F	O26:H11	VT1	D	
17-30	男	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-31	男	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-32	男	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-33	女	1	F	O26:H11	VT1	D	
17-34	女	22	F	O26:H11	VT1	D	
17-35	女	49	F	O26:H11	VT1	D	
17-36	男	33	F	O26:H11	VT1	D	17-31の家族
17-37	女	42	F	O26:H11	VT1	D	17-32の家族
17-38	女	41	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-39	男	40	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-40	男	10	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-41	女	9	F	O26:H11	VT1	D	17-33の家族
17-42	女	27	F	O26:H11	VT1		

表2 MLVA法による各遺伝子座のリポート数 (MLVA型)

菌株番号	事例	MLVA型	各遺伝子座のリポート数																	
			O157	O157	O157	O157	EH157	EH111	EH111	EHC	EHC	EHC	O157	O157	O157	O157	EH26	EH111	EHC	
17-24			-3	-9	-25	-34	-12	-11	-8	-1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	1	-2
17-25			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-26			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-27			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-28			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-35			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-38			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-39			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-40			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-41	D		-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-29			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-31			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-34			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-36			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	-2
17-32			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	7
17-37			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	-2	-2	-2	1	7
17-30			-2	13	2	1	2	2	1	7	16	9	-2	1	-2	4	-2	-2	1	19
17-33			-2	13	2	1	2	2	1	7	15	9	-2	1	-2	5	-2	-2	1	7
17-06			-2	13	2	1	2	2	1	6	20	9	-2	1	-2	1.5	-2	-2	1	11
17-07	B	G4	-2	13	2	1	2	2	1	6	20	9	-2	1	-2	1.5	-2	-2	1	11
17-20			-2	13	2	1	2	2	1	6	20	9	-2	1	-2	1.5	-1	-2	1	11
17-19			-2	13	2	1	2	2	1	6	15	12	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-23	C	G5	-2	13	2	1	2	2	1	6	15	12	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-04			-2	13	2	1	2	2	1	11	14	-2	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-05	A	G6	-2	13	2	1	2	2	1	11	14	-2	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-01			-2	8	2	1	2	2	1	11	19	-2	-2	1	-2	11	3	1	-2	
17-09			-2	13	2	1	2	2	1	6	16	15	-2	1	-2	1.5	-2	-2	1	10
17-42			-2	13	2	1	2	2	1	8	12	-2	-2	1	-2	2	-2	-2	1	13

実線...2遺伝子座以内の相違を示した集団
破線...同一のMLVA型を示した集団 (MLVAグループ)

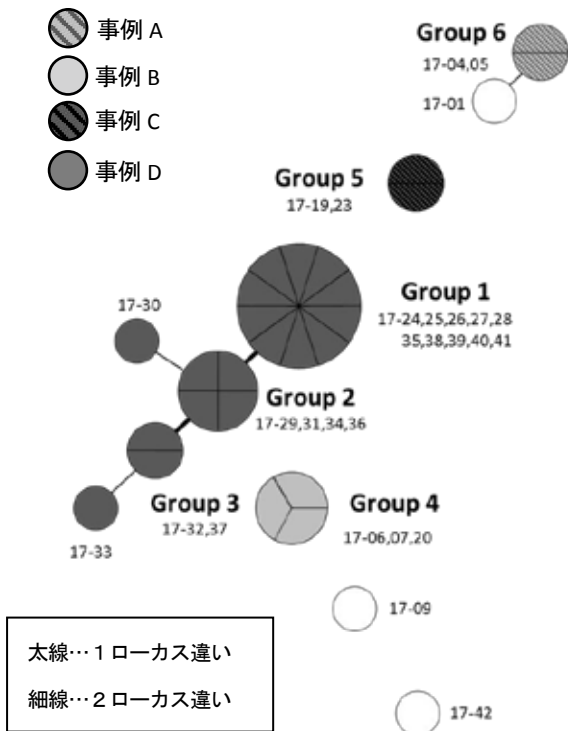


図1 腸管出血性大腸菌 O26 の MLVA 法による
Minimum Spanning Tree

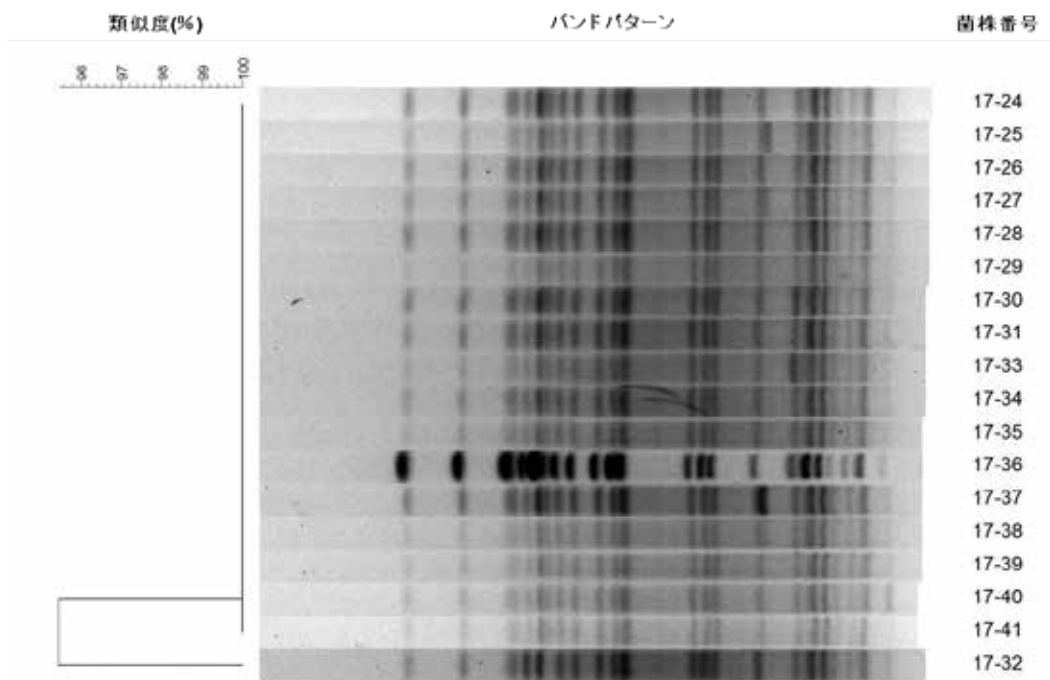


図2 腸管出血性大腸菌 O26 の PFGE 法による解析結果

2013～2017年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O26 : H11(VT1 産生)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

2013～2017年に分離された腸管出血性大腸菌 O26 : H11(VT1 産生)株 22 事例 32 株について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法(7 座位)を用いて分子疫学的解析を実施した。複数の事例間で PFGE 法、MLVA 法共に一致したものの中には、疫学調査による関連性が不明なものもあったが、2017年に発生した 2 事例に関しては、疫学的関連性の可能性が認められた。分子疫学的解析結果は疫学情報と照らし合わせて総合的に解釈することが重要であると言える。

また、多年にわたり MLVA 法で型が一致した 6 事例では PFGE 法でバンドパターンが異なったことから、当所での現行の MLVA 法(7 座位)を実施する際は留意が必要であると考えられた。

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)法及び Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA)法(7 座位)を用いて、2013～2017年に広島市で分離された腸管出血性大腸菌 O26:H11(VT1 産生)株を解析し、感染事例間での疫学的関連性を検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

2013～2017年に広島市で発生した腸管出血性大腸菌 O26:H11(VT1 産生)感染症事例から分離された菌株 32 株を用いた。内訳は、2013年分離菌株 10 株、2014年分離菌株 3 株、2015年分離菌株 7 株、2017年分離菌株 12 株である。分離菌株の事例概要を表 1 に示した。

2. 方法

(1) PFGE 法

制限酵素 *Xba*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、BioNumerics Ver. 7.5(Applied Maths 社)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) MLVA 法

MLVA 解析には 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)及び Gene Mapper(Applied Biosystems 社)を用い、表 2 の 7 ヶ所の 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。また、BioNumerics Ver. 7.5(Applied Maths 社)を用いて MST(Minimum Spanning Tree)解析を行った。

C. 研究結果

2013～2017年に分離された O26 菌株 32 株の PFGE バンドパターン及び MLVA リピート数(Repeat Number,以下 RN)を図 1 に、MLVA 解析結果に基づく MST 系統樹を図 2 に示した。PFGE バンドパターンにおいて類似度 95%以上のものを同一 PFGE クラスタ(図 1 の A～F)とし、MLVA RN が完全に一致したものを同一 type(図 1 及び図 2 の a～d)とした。

1. PFGE 法

事例 2014-1 の 14001 株及び事例 2014-2 の 14002 株は、類似度 95.0%で同一クラスタ(A)を示した。

事例 2013-4 の 13014 株及び 13015 株は、バンドパターンが 100%一致し同一クラスタ(B)を示した。

事例 2013-3 の 13012 株及び事例 2013-5 の 13016 株においても同一クラスタ(C)を示した。

事例 2015-4 の 3 株(15009、15010 及び 15012)及び事例 2015-3 の 2 株(15008 及び 15011)では共にバンドパターンがそれぞれ 100%一致し、これら二つの事例間の類似度は 95.5%で同一クラスタ(D)を示した。

事例 2013-7 の 13022 株及び事例 2013-9 の 13024 株ではバンドパターンが 100%一致し、これら 2 株と事例 2013-6 の 13021 株との類似度は 95.7%で同一クラスタ(E)を示した。

事例 2017-5 の 4 株(17031、17032、17033 及び 17034)及び事例 2017-6 の 2 株(17036 及び 17037)はバンドパターンが 100%一致し、これら 6 株と事例 2017-5 の 17035 株との類似度は 97.9%を示した。事例 2017-3 の 17008 株及び 17009 株ではバンドパターンが 100%一致し、これら 2 株と事例 2017-5、2017-6 の 7 株との類似度は 95.2%

で同一クラスタ(F)を示した。

2. MLVA 法

事例 2013-4 の 13014 株及び 13015 株は、MLVA RN が 7 座位全て一致し、同一 type(a)であった。

事例 2013-3 の 13012 株及び事例 2013-5 の 13016 株は同一 type(b)であった。

事例 2015-4 の 3 株(15009、15010 及び 15012)、事例 2015-3 の 2 株(15008 及び 15011)、事例 2013-7 の 13022 株、事例 2013-9 の 13024 株、事例 2013-6 の 13021 株、事例 2017-3 の 2 株(17008 及び 17009) 及び事例 2015-1 の 15001 株は同一 type(c)であった。

事例 2017-5 の 5 株(17031、17032、17033、17034 及び 17035)及び事例 2017-6 の 2 株(17036 及び 17037)は同一 type(d)であった。

なお、PFGE で同一クラスタ A を示した 2 株については、MLVA type が 3 座位で異なった。

D. 考 察

2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)は、共に患者は高齢であるが発生区が異なり、疫学的関連性も認められていないが、両解析方法で完全に一致した(PFGE 法でクラスタ C、MLVA 法で type b)。

2015 年の事例(2015-3 及び 2015-4)は、発生区が同じであり、発生時期も近いが疫学的関連性は認められていない。しかしこれらの株は PFGE 法で類似度が高く同一クラスタを示し(クラスタ D)、MLVA 法で一致した(type c)。

これら 2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)や 2015 年の事例(2015-3 及び 2015-4)のように、疫学調査から関連性が認められていないが PFGE 法で同一クラスタかつ同一 MLVA type を示した例もあった。こ

これらの株は、類似の遺伝子を持つ可能性、又は疫学的関連性のない株間で遺伝子のパターンが偶然一致した可能性が考えられる。しかし 2013 年の事例(2013-3 及び 2013-5)の 2 株(13012 及び 13016)に関しては、PFGE クラスターのみならずバンドパターンも 100%一致したことから、疫学的関連性を示唆している可能性もあると考えられる。

2017 年の事例(2017-5 及び 2017-6)は、PFGE 法ではほぼ一致し、MLVA 法でも一致した(type d)。この二事例は両家族の交流が聞き取り調査から認められ、疫学的関連性が示唆された。

2013 年から 2017 年までに発生した O26(VT1 産生)感染症の家族内感染事例 6 事例(2013-4、2015-3、2015-4、2017-3、2017-5 及び 2017-6)由来株は、各事例で両解析方法共に高い一致性が認められた。一方、今回の MLVA 解析から type c とした事例が多年にわたり認められたが、年が異なると PFGE 法ではバンドパターンが異なることから、当所の現行の O26 用 MLVA 法を使用する際には留意が必要であると考えられた。

E 結論

1. 疫学的関連性の認められていない事例間で PFGE 法及び MLVA 法の両法共に一致する場合もある。これらの株は、類似の遺伝子を持つ可能性、又は疫学的関連性のない株間で遺伝子のパターンが偶然一致した可能性が考えられるが、今回、潜在的な疫学的関連性を示している可能性があると考えられる事例もあった。

2. 同一 MLVA type の株が多年にわたって認められたが、年が異なる株同士では PFGE バンドパターンが異なった。このことから、当

所での現行の MLVA 法(7 座位)を使用する際には留意が必要であると考えられた。

3. 今回、異なる事例間ではあるが PFGE 法、MLVA 法共にほぼ一致し、疫学情報から関連性の可能性が認められた例もあった。これらの例から、改めて、分子疫学的解析の結果は、疫学情報と照らし合わせて総合的に解釈することが重要である。

F. 研究発表

なし。

G. 参考文献

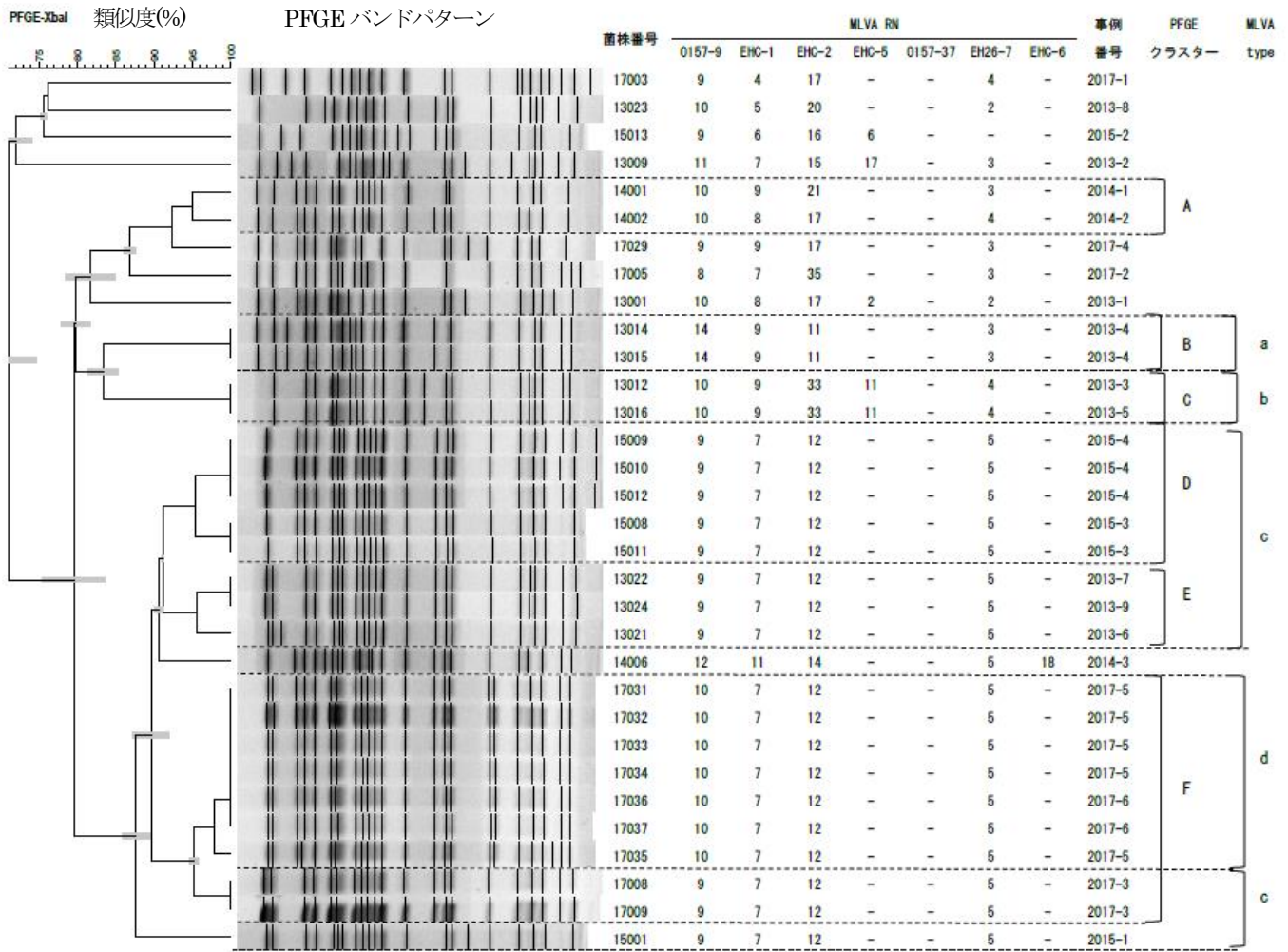
- 1) 病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究 平成 26 年度総括・研究分担報告書及び平成 24～26 年度総合研究報告書
- 2) 食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究 平成 28 年度総括・研究分担報告書
- 3) Hidemasa Izumiya et al. (2010): New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol* 54:569-577
- 4) 高橋ら: Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis による腸管出血性大腸菌(EHEC)O26 遺伝子型別法の検討 岩手県環境保健研究センター年報第 11 号, 67-69, 2011

表1 2013~2017年腸管出血性大腸菌 O26:H11(VT1 産生)分離菌株の事例概要

事例番号	菌株番号	診断の種類	発症年月日	発生区	性別	年齢	備考
2013-1	13001	患者	20130605	ア	女	21	
2013-2	13009	患者	20130707	イ	女	12	
2013-3	13012	患者	20130816	イ	女	71	
2013-4	13014	患者	20130822	ウ	女	7	同一家族事例
	13015	無症状病原体保有者			女	38	
2013-5	13016	患者	20130902	エ	女	64	
2013-6	13021	患者	20130916	オ	男	16	
2013-7	13022	患者	20130924	ウ	男	10	
2013-8	13023	患者	20130925	イ	男	5	
2013-9	13024	患者	20130929	エ	女	7	
2014-1	14001	患者	20140619	ウ	女	82	
2014-2	14002	患者	20140626	イ	女	2	
2014-3	14006	患者	20140830	オ	男	2	
2015-1	15001	患者	20150508	カ	女	5	
2015-2	15013	無症状病原体保有者		ウ	女	59	
2015-3	15008	患者	2015(月日は不明)	ウ	男	32	同一家族事例
	15011	患者	20150629		女	2	
2015-4	15009	患者	20150624	ウ	男	35	同一家族事例
	15010	無症状病原体保有者			女	8	
	15012	患者	20150624		女	5	
2017-1	17003	患者	2017(月日は不明)	キ	女	23	
2017-2	17005	患者	20170406	ク	男	19	
2017-3	17008	無症状病原体保有者		ウ	女	34	同一家族事例
	17009	患者	20170528		女	15	
2017-4	17029	患者	20171005	イ	女	12	
2017-5	17031	無症状病原体保有者		カ	男	37	同一家族事例
	17032	無症状病原体保有者			女	37	
	17033	無症状病原体保有者			女	7	
	17034	無症状病原体保有者			女	5	
	17035	患者	20171009		女	1	
2017-6	17036	無症状病原体保有者		カ	男	8	同一家族事例
	17037	患者	20170925		女	5	

表2 Primer set と Locus の概要

PCR mix	Locus	Dye	Sequence (5'-3')	Repeat size (bp)	Offset
Mix 1	O157-9	F	VIC GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	6	466
		R	TTCATTAATAAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTTTG		
	EHC-1	F	VIC GTGCGTAACCTGCTGGCACA	6	75
		R	CGCGGCTGCCGGAGTATC		
	EHC-2	F	VIC CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	6	214
		R	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT		
EHC-5	F	NED ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	6	109	
	R	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC			
Mix 2	O157-37	F	PET AATCAGAGCGGCAGGAAAAAGAAGA	6	84
		R	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG		
	EH26-7	F	PET CCCCTATCAAAACTGATACCCGATAAG	22	292
		R	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT		
	EHC-6	F	NED ATGGAGAACCGTCTGAGTGC	9	387
		R	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC		



-はPCR産物なし

図1 2013~2017年分離菌株の *Xba* I 処理による PFGE クラスタ及び MLVA RN 解析結果

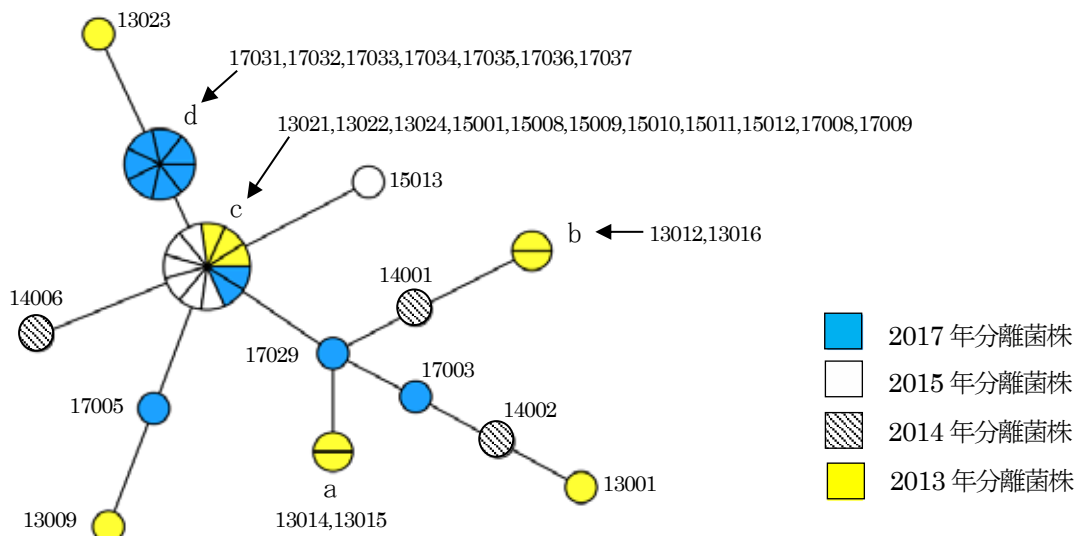


図2 2013~2017年分離菌株 32 株の MLVA 解析結果(7 座位)に基づく MST 系統樹

2017年に発生した腸管出血性大腸菌 O157、O26 における
MLVA 解析結果の迅速な還元の試み

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 恭晴

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 (以下 O157) の分子疫学的解析法において、簡便で迅速な IS-printing System 法(IS)は、地衛研で活発に実施されている事は周知のことである。

しかし、O157 以外の血清群では疫学的調査において時間的、距離的集積、共通食等の関連性を疑う情報がないと散発事例として処理され、早急に解析されないのが実情である。

さらに、解析結果も時期を逸すると活かされず、diffuse outbreak の解明は難しくなる。

昨年、県内で発生した O26 を解析し、集団・散発事例を含む 6 事例中 4 事例において菌株が同一株あるいは極めて類似していたことを報告した。密な関連性が疑われたが、追加疫学的調査とはならなかった。

これを踏まえ、2017 年は迅速性、解像度にも優れる Multi-locus variable-number tandem repeat analysis 法(MLVA)を通常検査で実施し、早急に解析結果を担当部署に還元出来るか試みた。

その結果、時間的集積の見られた O157 の散発事例 3 事例や、O26 の家族感染事例 2 事例について関連性のないことを早急に報告した。

また、O26 において MLVA 同リピート数の株が、2015 年から毎年検出されていることを確認した。2 種類の制限酵素によるパルスフィールド・ゲル電気泳動法(PFGE)により、これらの菌株において遺伝的関連性のあることが示唆された。

A.研究目的

山口県では腸管出血性大腸菌の分子疫学的解析法として、IS-printing System 法(IS)、パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE) を実施してきた。加えて昨年度までに、迅速性、解像度にも優れる MLVA による解析手法を検討してきた。

分子疫学的解析は、疫学的調査の裏づけや、新たな感染経路、感染源の掘り起しに役立ち diffuse outbreak の探知が可能となることがある。このためには、速やかに解析結果を担当部署へ還元する必要がある。

MLVA の検査体制が整った今年度は、県内で発生した O157、O26 について菌株受領後 MLVA 解析等が速やかに実施可能か、予備的に

検討した。

また、同一遺伝子型を示す株が特定の地域で複数年にわたって検出される事例が他県で報告されている (Emerging 現象)。本県においても MLVA 同リピート数を示す O26 株が、2015 年以降 3 年間続けて検出されていることを確認し、PFGE による詳細な解析を行い、遺伝的関連性があるか検証した。

B.研究方法

1.供試菌株

2017 年 6 月～9 月に山口県内で発生した O157 8 株、O26 10 株を供試した。

2.解析方法

(1) DNA 抽出

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) IS 法

IS-printing System (東洋紡) を用い、取扱説明書に従い実施した。

解析は、2 種類のプライマーセット

(1stSet、2ndSet) と陽性コントロールの 18 本のバンドの増幅を調べ、増幅ありは「1」増幅なしは「0」とした。サイズの大きいバンドから順に 3 バンド毎に「1」、「2」、「4」の係数を加算し、12 桁の IS コードとした。

(3) 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)、*Bln* 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。

(4) 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)]以内の場合を、同一コンプレックスとした。

解析結果の還元において、MLVA リピート数が一致した場合「菌株の遺伝的関連性が考えられる」ことを知らせることとした。

C.研究結果

1.MLVA 解析終了までの経過日数

O157、O26 18 株の検体受領から MLVA 解析終了までの経過日数を図 1 に示す。

18 検体中 9 検体 (50%) について、検体受領後 7 日以内に終えることができた。

7 検体は、解析終了に 10 日以上を要した。

2.O157 の解析

(1)IS 法、MLVA 法 (表 1)

O157 の 8 株は、全て散発事例であった。

17Y09、17Y21 は IS コードが一致、MLVA も SLV でコンプレックス(a)を形成した。

その他の株はいずれの方法でも、全て不一致であった。

(2)PFGE 法 (図 2)

PFGE により 7 パターンに型別され、2 つのクラスターを形成した。

17Y09、17Y21 は 3 バンド以内の相違、類似度 94.7%でクラスター (A) を形成した。17Y02、17Y08 は一致、さらに 17Y11 と 3 バンド以内の相違、類似度 94.7%でクラスター (B) を形成した。

3.O26 の解析

(1)MLVA 法 (表 2)

O26 の 10 株は、3 件の家族感染によるものであった。

同一事例由来の株は、リピート数が全て一致した。事例ごとのリピート数は、3 ヶ所以上異

なっていた。

(2)PFGE 法 (図 3)

同一事例由来の株のパターンは一致した。家族感染 (17Y15~19) において、17Y17 は相違があったが 3 バンド以内であり、類似度 97.8% で同一事例とクラスター(III)を形成した。

4.県内に蔓延する O26 株の解析

2017 年に発生した家族感染事例由来 3 株 (17Y12~14) の MLVA リピートパターン ii (以下、MLVA ii 型) と同型の株が、2015 年から 3 年間続けて検出され、県内に蔓延していることを確認した。

(1)MLVA ii 型の県内における発生概要と、全国での発生状況(表 3)

MLVA ii 型は県内において、約 1 年間隔で発生していた。

全国において、MLVA ii 型が続けて発生している自治体は山口県のみであった。

(2)PFGE 法

MLVA ii 型と同型であった 2017 年家族感染の 3 株 (17Y12~14) と、2015 年家族感染の 3 株 (15Y28~30)、2016 年保育園集団感染の 12 株 (MLVA ii 型: 16Y19~21、23~28、30、SLV: 16Y22、29) 計 18 株の、制限酵素 Xba I による PFGE の結果を図 4 に示す。

18 株中 17 株は一致し、16Y19 は 2 バンド以内の相違で同じクラスター (IV) を形成した。

さらに、2015、2017 年の各 3 株と、2016 年の 12 株中 MLVA ii 型 2 株 (16Y19、20) と、SLV であった 2 株 (16Y22、29) を抽出し 10 株について、制限酵素 Bln I による PFGE 解析結果を図 5 に示す。

2016、2017 年の 7 株は 3 バンド以内の相違で同じクラスター(V)形成し、2015 年は 4 バンドの相違でクラスター(VI)を形成した。

D.考察

解析結果について、IS は散発事例においても迅速法として有用であるが、解像度が低いため PFGE または MLVA により確認が必要とされる³⁾。MLVA は PFGE に比べ迅速に結果を還元できるメリットがある。

このため MLVA を積極的に活用し、早い段階で菌株の異同結果について報告することは、行政判断の材料として貢献できる可能性がある。

当センターでは O157 等の EHEC 菌株を受領後、コンタミネーションの有無を確認し、生化学的性状試験、血清型別及びベロ毒素産生能、vt 遺伝子の検出を行い、検査終了まで通常 5~7 日程度を要する。

今年度は MLVA をこの通常検査に追加し、迅速な解析結果の還元が可能か検討した。

検体の半数において、菌株受領後 7 日以内に解析し結果を還元することが可能であった。ただ、発生届日から当センターに検体が搬入されるまで平均 6.2 日、患者発症から検体搬入までとなると平均 12.5 日経過していた。菌株の送付方法や、当センターでの検査工程の見直しをすることで、さらなる検査期間の短縮が可能と考える。

また、解析に 10 日以上要した検体もあった。これは、当センターに設置してあるシーケンサーが 8 本キャピラリータイプであるため運用効率を考え、ある程度検体数をまとめる必要があった。そのため、年度初発検体や、同一事例株がすでに解析済みの検体、IS コードが不一致等から他の株と遺伝的関連性が低いと判断した検体をまとめて検査したことが、長期間要した理由である。

O157 において、1 週間の内に発生した散発 3 事例 (17Y08、09、10) は、IS コードは不一致、MLVA で 5 ヶ所異なることから関連性はないことを早急に報告した。その後の、PFGE 解析でも関連性は見られなかった。

17Y09、21 について、当初疫学的調査からは

関連性が疑われる情報はなく IS コード一致、その後 MLVA で SLV、PFGE も 3 バンド以内の相違で遺伝的関連性があることが示唆された。

17Y21 の解析結果の還元において、17Y09 と IS コードの一致は確認できたが、MLVA が SLV であり、管轄保健所が異なったこと、2 か月間の発症間隔があることから、追加疫学的調査の必要性を報告しなかった。

疫学的関連性がある MLVA で SLV の場合、密接に関連性があると解釈されるが⁴⁾疫学的関連性のない事例間において客観的なクラスター形成があった場合も、追加疫学的調査の必要性を報告すべきであった。

17Y02、08 について PFGE が一致したが、当初 IS コード不一致、MLVA のリピート数が 9 ヶ所異なり、疫学的調査からも 17Y08 は他県での感染が強く疑われるため関連性はないと報告した。

O26 について、3 件の家族感染事例毎に MLVA リピート数は一致し、PFGE も同じクラスターを形成した。

発症日の近い 2 事例について、MLVA により関連性がないことを早急に報告した。

事例 (17Y12~14) の MLVA ii 型が、2015 年より続けて検出される蔓延株であることを確認した。この蔓延株について制限酵素 Xba I、Bln I による PFGE でも、これら菌株の遺伝的関連性に可能性があると解釈された。また、全国において MLVA ii 型の株が 3 年続けて発生している自治体は他になく、山口県内に蔓延している O26 株の可能性が示唆された。

E. 結論

2017 年に山口県で分離された O157、O26 について通常検査期間内に MLVA を実施し、解析結果を担当部署に還元できた。時間的集積がみられた O157 の散發事例、O26 の家族感染事例

について早急に事例間の関連性がないことを報告した。

厚生労働省は 2017 年 8 月の EHEC 広域発生事例を受け、早期探知のため解析法を MLVA に統一するとした⁵⁾。今後も、MLVA を積極的に活用し、事例間の関連性を解明する科学的データとして解析結果の共有、還元を行っていく。

F. 研究発表 なし

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)
- 2) Izumiya H, et al : Microbiol.Immunol,54,569-577(2010)
- 3) 伊豫田淳：病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する研究(課題番号：H24-新興-一般-005)平成 26 年度総括・分担研究報告書及び平成 24~26 年度同号研究報告書,190-198(2015)
- 4) 病原微生物検出情報(IASR)35 : 129-130(2014)
- 5) 薬事・食品衛生審議会(平成 29 年 11 月 17 日開催)：食品分科会資料

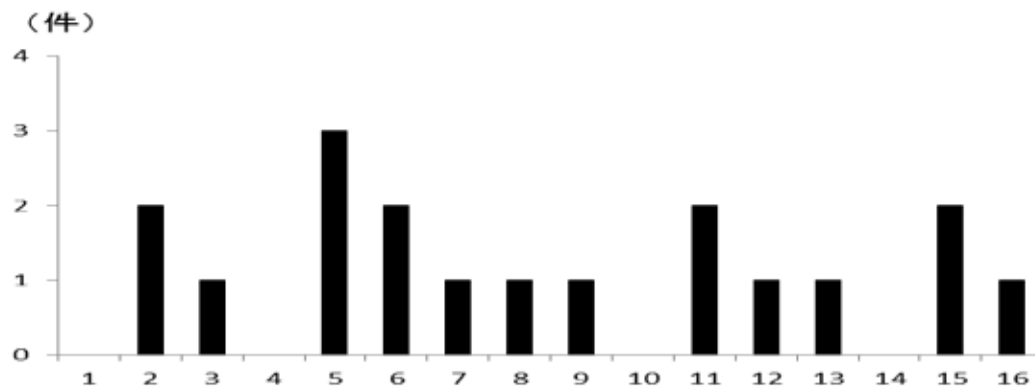


図1 検体受領から MLVA 解析終了までの経過日数

表1 O157のIS、MLVA、PFGEの解析結果

菌株番号	届出日	疫学的 関連性	血清型	IS-Printing法		MLVA (NID-17 loci)															MLVA complex	PFGE クラスター		
				1st	2nd	O157-	EHC-	EHC-	O157-	EHC-5S		O157-	O157-	EH111-	EH157-	EH111-	EH111-	O157-	O157-	EHC-			O157-	EH26-
						34Y	1Q	2C	9M	3W	25J	80	12N	14BB	11T	17Z	36AA	19L	6U	37V			7D	
17Y01	2017/6/21	散発	O157:H7	114057	303443	9	8	5	12	2	7	3	1	1	-2	2	3	7	5	-2	6	-2		
17Y02	2017/6/28	散発	O157:H7	317477	611756	13	6	5	17	12	10	5	1	4	-2	2	11	6	7	-2	8	-2		B
17Y08	2017/8/12	散発	O157:H7	317577	211757	12	6	4	10	-2	11	5	1	4	-2	2	7	8	6	-2	6	-2		B
17Y09	2017/8/12	散発	O157:H7	317555	301755	12	6	4	11	2	9	5	1	3	-2	2	8	6	6	-2	6	-2	a	A
17Y10	2017/8/18	散発	O157:H7	617555	611647	12	5	4	13	-2	8	8	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2		
17Y11	2017/9/5	散発	O157:H7	317577	611756	12	6	4	12	6	10	5	1	4	-2	2	7	6	6	-2	7	-2		B
17Y20	2017/10/19	散発	O157:H7	717557	611657	12	5	4	12	-2	8	7	1	4	-2	2	7	3	6	-2	6	-2		
17Y21	2017/10/25	散発	O157:H7	317555	301755	12	6	4	11	2	9	5	1	3	-2	2	8	6	6	-2	6	-2	a	A

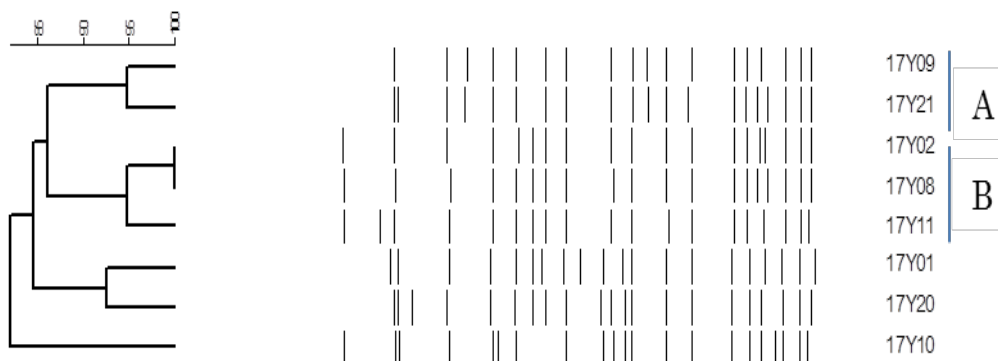


図2 O157のPFGE(Xba I)による解析結果

表2 O26のMLVA、PFGEによる解析結果

菌株番号	分離日	疫学的 関連性	血清型	MLVA(NIID-17 loci)														MLVA クラスター	PFGE クラスター			
				0157- 34Y	EHC- 10	EHC- 2C	0157- 9M	EHC- 5S	0157- 3W	0157- 25J	EH111 -8O	EH137 -12N	EH111 -14BB	EH111 -11T	0157- 17Z	0157- 36AA	0157- 19L			EHC- 6U	0157- 37V	EH26- 7D
				17Y05	2017/6/23	家族 事例	O26:H11	1	11	17	9	-2	-2	2	1	2	1			2	-2	-2
17Y06	2017/6/23		O26:H11	1	11	17	9	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	2		
17Y12	2017/9/8	家族 事例	O26:H11	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y13	2017/9/8		O26:H11	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	ii	II
17Y14	2017/9/5		O26:H11	1	12	14	8	-2	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y15	2017/9/15		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y16	2017/9/22	家族 事例	O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y17	2017/9/22		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3	iii	III
17Y18	2017/9/28		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		
17Y19	2017/9/28		O26:H11	1	8	21	13	10	-2	2	1	2	1	2	-2	-2	1	-2	-2	3		

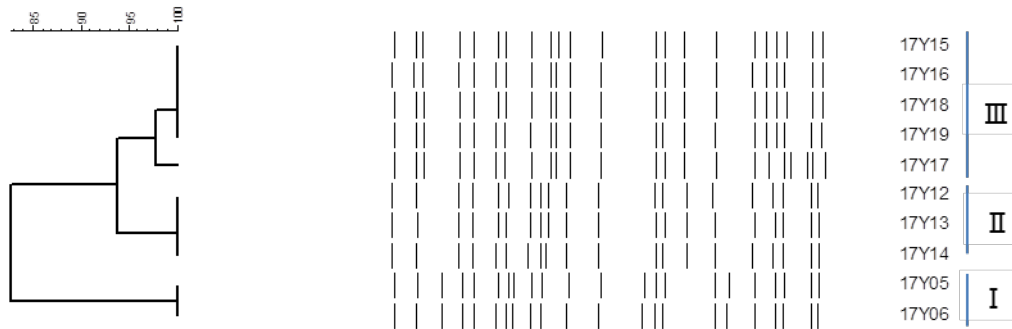


図3 O26のPFGE(Xba I)による解析結果

表3 MLVA ii型の山口県における発生概要と、全国での発生状況

発生状況	2015年	2016年	2017年
	11/2~6発生	8/1~9/11発生	9/5~8発生
	家族感染	保育園 集団感染	家族感染
	No 年齢	No 年齢	No 年齢
山口県	15Y28 2	16Y19 0~4	17Y12 34
	15Y29 41	~30	17Y13 93
	15Y30 67	(うち2株はSLV)	17Y14 2
	山口県(3)	山口県(10)	山口県(3)
全 国	石川県(2)	三重県(2)	兵庫県(4)
	福井県(1)	岡山県(1)	熊本県(1)
	福岡県(1)		
	大阪府(2)		
	宮城県(2)		

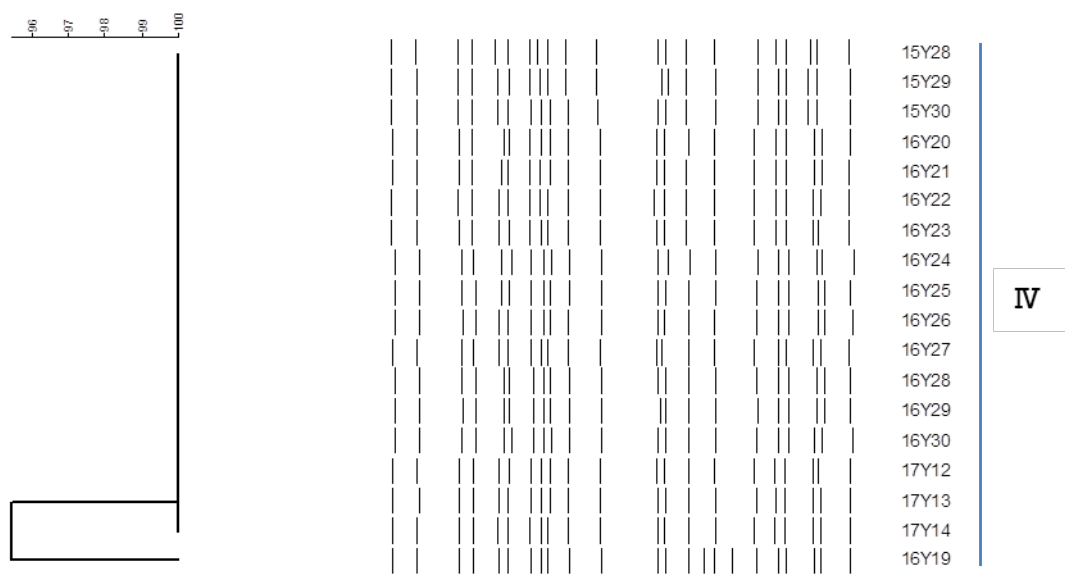


図 4 蔓延株の PFGE (Xba I) による解析結果

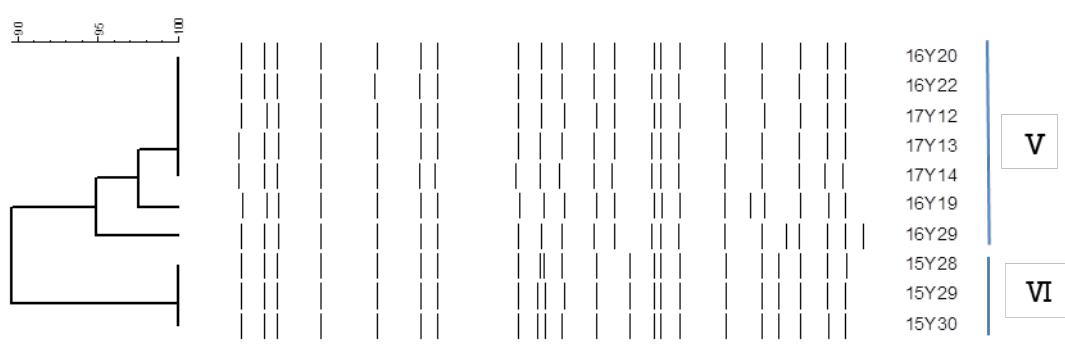


図 5 蔓延株の PFGE (Bnl I) による解析結果