

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食中毒調査の迅速化・高速化及び広域食中毒発生時の早期探知に資する研究

研究代表者 大西真 国立感染症研究所

### 分担研究報告書

### 食品由来株の収集

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

#### 研究要旨

MLVA 法は広域食中毒を迅速に探知する調査手法として有用であり、PFGE と並行して全国自治体で解析が行われている。しかし、同一食品に由来する菌株において、MLVA 型がどの程度一致するかについては、十分な解析がなされていない。本研究では食品から分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の同一検体由来株間における MLVA 型の多様性を明らかにするため、検体ごとに分離株の多様性を解析した。腸管出血性大腸菌食中毒事例 D 由来株 30 株の MLVA 解析の結果、17 遺伝子座の各リピート数が全株で同一であった。また、食品 E（国産牛肉）から分離した STEC 0157:H7 30 株の MLVA 解析の結果、17 遺伝子座の各リピート数が全株で同一であった。加えて、食品 F（国産牛肉）から分離した STEC 0157:H7 30 株の MLVA 解析の結果、17 遺伝子座の各リピート数が全株で同一であった。しかし、同一 MLVA 型の菌株であっても、腸管出血性大腸菌用選択分離培地上でのコロニーの生育性に違いが認められ、同一の性質ではないことが示唆された。患者と同一 MLVA 型の株を食品で調査する際には、株の多様性を想定して複数の選択分離培地の使用が有用であると考えられる。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品検体における STEC の MLVA 型多様性の解析を進める予定である。

#### 研究協力者

国立医薬品食品衛生研究所

廣瀬昌平

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌の集団感染事例の発生時には、感染源や感染経路

の把握のため、また散発的集団発生事例の早期探知のために患者や食品から分離された菌株の解析が求

められる。近年では、反復配列多型解析法 (MLVA 法) が迅速性、精微性に優れていることから、国内では主に MLVA 法を用いた解析が行われている (Microbiol. Immunol., 2010, 54(10), 569-77)。MLVA 型による広域食中毒の早期探知には、食中毒事例の原因食品から分離された株の MLVA 型の迅速な報告が必須である。しかし、仮に原因食品中に多様な MLVA 型の株が存在する場合、MLVA 解析に供試する株数が少ないと、複数地域で食中毒事例に関連する同一 MLVA 型の株を見逃し、広域食中毒の早期探知に支障をきたす可能性がある。そのため、昨年度に引き続き、本研究では食中毒事例から分離された複数の菌株について MLVA 法による比較解析を行い、多様性を解析した。また、食中毒事例発生時に感染源や感染経路を調査・特定する際に必要な情報を蓄積するため、食品由来株を収集し MLVA 解析を行った。

## B. 研究方法

過去の食中毒事例由来の原因食品から分離した保存株について、MLVA 解析を行い患者株との一致率と多様性について検討した。加えて国産牛肉から STEC の分離を試み、同一検体からの分離株について同

様に MLVA 型の多様性を検討した。

### 1) 菌株

食中毒事例 D 由来の腸管出血性大腸菌 0157:H7 を 30 株、食品 E 由来の STEC 0157:H7 (*eae* 陽性) を 30 株、食品 F 由来の STEC 0157:H7 (*eae* 陽性) を 30 株、合計 90 株を供試した (表 1)。食中毒事例 D は 2009 年 8 月から 9 月にかけて発生した腸管出血性大腸菌 0157 による広域食中毒である。同一系列の飲食店を利用し、下痢や嘔吐等の症状を呈する患者は 16 自治体で 37 名認められた。食品 E 由来株および食品 F 由来株は国産牛肉の培養液から国衛研にて分離した。

### 2) DNA 抽出

カジトン培地に保存していた株を Tryptone soya agar (OXOID) に画線し、37°C にて 18 時間培養した。滅菌爪楊枝でコロニーを釣菌し、わずかに濁る程度の量を滅菌蒸留水 100  $\mu$ l に懸濁した。ヒートブロックで 100°C 10 分間加熱した後、加熱したサンプルを氷で急冷し、10,000  $\times g$  10 分間遠心した上清を DNA 溶液として保存した。

### 3) マルチプレックス PCR および増幅産物の MLVA 解析

2 種類のプライマーミックスを調製した (表 2)。上記にて抽出した DNA を鋳型として供試し、PTC-200

Peltier Thermal Cycler (MJ research)を用いてマルチプレックス PCR 反応を行った。PCR 反応には 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen) を使用した。95°C の 15 分の熱変性ののち、95°C 20 秒—60°C 90 秒—72°C 60 秒を 30 サイクルの増幅反応後、72°C で 10 分間反応させた。増幅産物は Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer(サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いた高精度電気泳動によってフラグメント解析を行い、GeneMapper Software 6.0 を用いて各遺伝子座のリポート数を決定した。各遺伝子座ごとのリポート数を菌株間で比較した。

#### 4) Stx サブタイプ型別試験

Scheutz らの PCR 法 (J Clin Micro, 2012 50(9)2951) に従い、分離された菌株が保有する Stx サブタイプ (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) の型別を実施した。3)にて抽出した DNA を鋳型として供試し、機器は PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ research) および (Applied Biosystems) を使用した。PCR 反応には HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) を使用した。Stx サブタイプ型別用のプライマーを用いた

(表 3)。95°C 15 分、94°C 50 秒—64°C 40 秒—72°C 60 秒 35 サイクル および 74°C 3 分で増幅反応させた後、PCR 産物の有無をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

#### 5) 腸管出血性大腸菌用分離培地での生育性

食中毒 D 由来株 30 株、食品 E 由来株 30 株および食品 F 由来株 30 株をカジトン培地からクロモアガー-STECC 培地、セフェキシムおよび亜テルル酸添加クロモアガー-STECC 培地 (CT-クロモアガー-STECC)、ソルビトール添加マッコンキー培地 (SMAC) およびセフェキシムおよび亜テルル酸添加 SMAC (CT-SMAC) にニードルで少量接種し画線した。画線した培地を 37°C で 22±2 時間培養した後にコロニー数をカウントしコロニー生育状況を観察して比較した。生育コロニーがない場合を「非生育」、生育コロニーが 20 個以下の場合を「生育少数」、生育コロニーが 21 個以上の場合を「生育多数」と判定した。

#### C. 研究結果

食中毒事例 D 由来の腸管出血性大腸菌 O157 菌株 30 株の MLVA 解析では、17 遺伝子座の各リポート数が全株で同一であった (表 4)。保有する Stx サブタイプは *stx1a* お

よび *stx2a* であった(表 1)。また、食品 E 由来の STEC 0157 菌株 30 株でも、17 遺伝子座の各リポート数が全株で同一であった(表 5)。保有する Stx サブタイプは *stx2a* のみであった(表 1)。さらに、食品 F 由来の STEC 0157 菌株 30 株でも、17 遺伝子座の各リポート数が全株で同一であった(表 6)。保有する Stx サブタイプは *stx2a* のみであった(表 1)。

菌株のクロモアガーSTEC、CT-クロモアガーSTEC、SMAC および CT-SMAC 上での生育状況を比較した。食中毒事例 D 由来の 30 株は、クロモアガーSTEC、SMAC、CT-SMAC 上ではほとんどの株で多数のコロニーの生育が認められたが、CT-クロモアガーSTEC 上では 30 株中 16 株で多数のコロニーの生育が認められ、残りの 14 株で少数のコロニーの生育が認められた(図 1)。また、食品 E 由来の 30 株は、クロモアガーSTEC、SMAC、CT-SMAC 上ではほとんどの株で多数のコロニーの生育が認められたが、CT-クロモアガーSTEC 上では 30 株中 11 株で多数のコロニーの生育が認められ、他の 11 株で少数のコロニーの生育が認められ、残りの 9 株は非生育であった(図 1)。さらに、食品 F 由来の 30 株は、クロモアガーSTEC、SMAC 上ではほと

んどの株で多数のコロニーの生育が認められ、CT-SMAC 上では多くの株で多数のコロニーの生育が認められたが、CT-クロモアガーSTEC 上では 30 株中 7 株で多数のコロニーの生育が認められ、他の 10 株で少数のコロニーの生育が認められ、残りの 13 株は非生育であった(図 1)。

#### D. 考察

本研究に供試した STEC は、現在の MLVA 解析で用いられている 17 遺伝子座の各リポート数が由来ごとに同一であることが示された。しかし、複数種類の寒天培地での生育性を比較すると、その生育状況には違いがあることが示され、同一 MLVA 型であっても性質が単一ではないことが示唆された。このため、患者と同一 MLVA 型の株を食品で調査する際には、株の多様性を想定すると複数の選択分離培地の使用が有用であると考えられる。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品内における MLVA 型の多様性の解析を進める予定である。また、今年度の MLVA 解析において、通常検出されるはずの EH111-8 のリポート数が検出されなかったため、次年度に改善する予定である。

#### E. 結論

令和 3 年度に MLVA 解析に供試し

た菌株は、由来ごとに 17 遺伝子座で各リピート数が同一であった。しかし、寒天培地上での生育には違いが認められたことから、MLVA 型が同一の菌株でも性質が単一でないことが示唆された。次年度は、食中毒原因食品由来株および食品由来株の収集を進め、同一食品検体における STEC の MLVA 型多様性の解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1. 腸管出血性大腸菌用分離培地上での供試菌株の生育性

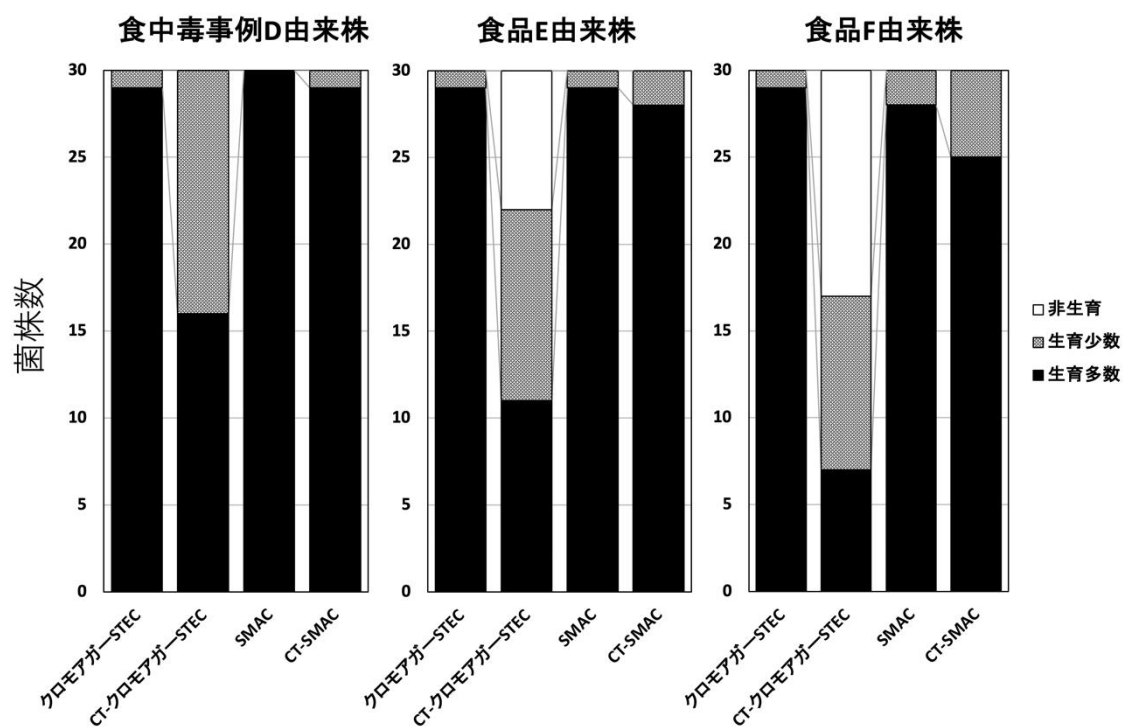


表 1. 供試菌株

菌株	血清型	菌株数	Stxサブタイプ
食中毒事例D由来株	O157:H7	30株	<i>stx1a, 2a</i>
食品E由来株	O157:H7	30株	<i>stx2a</i>
食品F由来株	O157:H7	30株	<i>stx2a</i>
合計		90株	

表 2. MLVA 解析用プライマーミックス

プライマー	遺伝子座	Dye	Forward	Reverse
	EHC-2	VIC	CCAGTTCGGCAGTGAGCTG	ACGCTGGTCCGGGAGATTAT
	O157-25	PET	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATT AGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTGGTTTACAC
	O157-9	VIC	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	TTCATTAATAAAAAATCCCATGGAAAATATTTTT TG
	O157-9			GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC
Mix1	EH157-12	PET	ACAGTACCCATGCCAGCAA	GAAAGCTGGGTGAAAACACCGATGC
	EH111-8	PET	CCGGACGAGAGGGAGTAAATGAA	CATAAATTATGCTTAATGGAATTAGTAACGCTG
		PET	CCGGGCGAGTAGGAGTAAATGAA	CATGAATTATGCTTAATGGAATTAGTCAAGCTG
	EHC-1	VIC	GTGCGTAACCTGCTGGCACA	CGCGGCTGCCGGAGTATC
	EHC-5	NED	ATACTACAGACGTCTGCTGATGA	CCGCTTTGTTACCGGTCTTTTTTC
	O157-3	NED	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCTCGCCATCG
	O157-34	5-FAM	TGTTACCAACGCGAAGCTAACAAG	AGGCATTAATAGCAGATGTTTC
	EH26-7	PET	CCCCTATCAAAACTGATACCCGATAAG	CGCCGGAAGGCAAAAGATCAT
	O157-19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTCTGGA TGTTTC	CGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC
Mix2	EH111-11	5-FAM	GTCAGTAGTTGCGGCTGTAATATTGAAGA	CCTTGTCATTGAGTTCTGTACATAG
	EHC-6	NED	ATGGAGAACCCTGTGAGTGC	TCAGAAATCATCTCCCGGCTCAAC
	O157-37	PET	AATCAGAGCGGAGGAAAAAGAAGA	GGGCTTCTGTCTTTTCAGACCTG
	O157-17	VIC	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATG A	AGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC
	O157-36	NED	GGCGTCCTTCATCGGCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC
	EH111-14	5-FAM	ATGAAATTATCGCAGCATACAATCG	GGGTTTCCATTTCTTTACCTTCAGG

表 3. Stx サブタイプ型別用プライマー配列

遺伝子	Forward	Reverse
<i>stx1a</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG
<i>stx1c</i>	CCTTTCCCTGGTACAACAGCGGTT	CAAGTGTGTACGAAATCCCCTCTGA
<i>stx1d</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	CTCTTCTCTGGTTCTAACCCCATGATA
<i>stx2a</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG GCCACCTTCACTGTGAATGTG
<i>stx2b</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	CAGCAAATCCTGAACCTGACG
<i>stx2c</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA
<i>stx2d</i>	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG GCCTGATGCACAGGTAAGTGC
<i>stx2e</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	CTTCCTGACACCTTACAGTAAAGGT
<i>stx2f</i>	TGGGCGTCATTCAGTGGTTG	TAATGGCCGCCCTGTCTCC
<i>stx2g</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT

表 4. 食中毒事例 D 由来の腸管出血性大腸菌 O157:H7 (30 株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
1	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
2	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
3	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
4	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
5	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
6	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
7	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
8	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
9	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
10	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
11	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
12	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
13	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
14	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
15	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
16	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
17	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
18	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
19	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
20	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
21	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
22	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
23	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
24	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
25	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
26	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
27	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
28	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
29	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7
30	-2	5	4	4	-2	2	12	11	17	2	-2	-2	-2	9	6	10	7



表5. 食品 E 由来の STEC 0157:H7 (30株) の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
1	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
2	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
3	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
4	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
5	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
6	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
7	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
8	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
9	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
10	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
11	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
12	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
13	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
14	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
15	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
16	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
17	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
18	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
19	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
20	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
21	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
22	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
23	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
24	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
25	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
26	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
27	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
28	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
29	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7
30	-2	7	9	5	-2	5	8	9	7	-2	-2	-2	-2	4	7	12	7

表6. 食品 F 由来の STEC 0157:H7(30 株)の MLVA 解析

菌株	MLVA リピート数																
	EH111 -8	EH157 -12	EHC-1	EHC-2	EHC-5	O157 -25	O157 -3	O157 -34	O157 -9	EH111 -11	EH111 -14	EH26 -7	EHC-6	O157 -17	O157 -19	O157 -36	O157 -37
1	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
2	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
3	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
4	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
5	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
6	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
7	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
8	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
9	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
10	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
11	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
12	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
13	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
14	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
15	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
16	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
17	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
18	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
19	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
20	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
21	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
22	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
23	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
24	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
25	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
26	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
27	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
28	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
29	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6
30	-2	6	12	5	-2	4	11	9	12	2	-2	-2	-2	4	7	9	6