

中部大学大学院応用生物学研究科博士学位論文

腸管病原菌の迅速簡便な分子疫学解析法の
研究

Development and establishment of novel rapid
and simple PCR-based molecular epidemiology
analysis method for intestinal pathogenic
microorganisms

山田 和弘

Kazuhiro Yamada

2015

目次

第1章 序論

第2章 大腸菌の迅速簡便な分子疫学解析法の研究

1節 大腸菌のクローン大別法の開発と評価

2-1-1 諸言

2-1-2 大腸菌クローン大別法の開発

(1) 材料及び方法

(2) 結果

2-1-3 大腸菌クローン大別法の性能評価

(1) 材料及び方法

(2) 結果

2-1-4 考察

2節 腸管出血性大腸菌の菌株識別法の開発と評価

2-2-1 諸言

2-2-2 腸管出血性大腸菌菌株識別法の開発

(1) 材料及び方法

(2) 結果

2-2-3 腸管出血性大腸菌菌株識別法の性能評価

(1) 材料及び方法

(2) 結果

2-2-4 考察

第3章 カンピロバクターの分子疫学解析法の研究

1節 諸言

2節 カンピロバクター菌株識別法の開発と性能評価

(1) 材料及び方法

(2) 結果

3節 考察

第4章 総括

引用文献

研究業績

謝辞

略語表

CC : Clonal complex

ESBL : Extended spectrum beta lactamase

IS : Insertion sequence

MLST : Multilocus sequence typing

MLVA : Multilocus variable number tandem repeat analysis

ORF : Open reading frame

PFGE : Pulsed-field gel electrophoresis

POT : PCR-based open reading frame typing

ST : Sequence type

STEC : Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

第1章 序論

背景

腸管病原菌は下痢症などの腸管症状を引き起こす病原菌であり、食中毒等の集団発生を引き起こし、社会的な問題になることがある。代表的な腸管病原菌には、我が国においても 1990 年代に甚大な被害を経験した腸管出血性大腸菌 (1) や、細菌性食中毒の原因菌として最も検出率の高いカンピロバクター (2)、細菌性赤痢の原因菌である赤痢菌 (3)、現在 7 回目の世界的流行が発生しているコレラ菌 (4) などが含まれる。これらの腸管病原菌が集団感染発生を起こした際には感染経路・原因食品の特定のため、喫食調査や渡航調査といった疫学調査や分子疫学解析が行われる。分子疫学解析とは菌株が保有するゲノムの特徴を検出し菌株を特定 (菌株識別、あるいは遺伝子型別分類という) することで、病原体伝播の解析をすることである。分子疫学解析を行うことで伝播の順序は分らないが、菌株の異同や遺伝的バックグラウンドがわかり、感染経路・原因食品の特定のための科学的根拠を提供することができる。

これまでの分子疫学解析法の限界

分子疫学解析法としては従来、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 法が多用されている。PFGE 法はゲノム DNA を制限酵素で切断し、その断片の電気泳動パターンにより菌株の遺伝子型を決定する方法である。PFGE 法は菌株識別能力が高く、再現性があることから、多くの菌種で菌株識別の定法として用いられている (5)。しかし、PFGE 法はパルスフィールドゲル電気泳動装置などの高額で特殊な装置が必要であり、作業が煩雑で作業者の熟練を要することから実施できる施設が限られている。また、複雑なバンドパターンの比較による判定が必要であることに加え、PFGE パターンは変化しやすく同一集団感染由来株であっても時間経過に伴いバンドパターンが変化していることが多い。そのため主観的な要素が入りがちであり、異なる時刻、または別の施設で得られた PFGE 解析の結果を比較することで、

複数の分離株の遺伝子型が同等か否かを判定することは非常に困難である。さらに PFGE 法は結果が出るまでに菌株分離同定後 1 週間程度の時間がかかり、検査結果が出たときにはすでに感染拡大が終了していることが多い。

このような PFGE 法の問題点を克服するために、様々な分子疫学解析法が開発されてきた。既存の分子疫学解析法の長所及び短所を表 1 にまとめた。Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 法は任意に設計したプライマーを用いて PCR を行い、得られたバンドパターンにより菌株を識別する方法である (6)。標的 DNA の予備知識を必要とせず、全ての微生物で使用可能という利点があるが、再現性に乏しくバンドパターンが一定でないため、他の実験室で得られた結果と比較することは難しい (7)。

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法は制限酵素で断片化したゲノムフラグメントにアダプター配列を結合させ、アダプター配列を標的とした PCR を行い、得られたバンドパターンを比較することで菌株識別を行う方法である (8, 9)。菌株識別能も高く、RAPD 法と同様に標的 DNA 配列の情報が必要ないが、手技が煩雑で時間がかかることに加え、使用する試薬が非常に高価であるという欠点がある (7)。繰り返し配列を検出することによる菌株識別法 (multilocus variable number tandem repeats analysis (MLVA) 等) は汎用性高く検出系を設計できる (10, 11) が、タイピング結果の読み取りにはわずかなバンドサイズの違いを正確に決定する必要があり、誤判定を引き起こしやすい。また使用する繰り返し配列の種類や位置を標準化しなければ、全施設で統一プロトコールを作成するのが難しい。挿入配列を用いて菌株識別をする方法 (insertion sequence typing) は、ゲノム中に多コピー存在する移動性の挿入配列 (IS) の有無を確認することによるタイピング方法である (7)。この方法は迅速に実施でき、結果の比較も容易という利点はあるが、多コピーの挿入配列を保有する菌種またはクローンに限られ、例えば大腸菌では腸管出血性大腸菌 O157 や O26 などといった特定のクローンのみしか実現できない (12, 13)。加えてそれぞれのクローン毎に検出位置を設定する必要があり、汎用性のあるプライマーを設計することはできないという問題点がある。Multilocus sequence typing (MLST) 法は 7 カ所のハウスキーピング遺伝

子の塩基配列についてシーケンス解析することで、sequence type (ST) を決定し、近縁な ST の集団を clonal complex (CC) としてまとめることで、同一の遺伝的バックグラウンドを持つ株を識別可能な方法である (14-17)。しかし、多検体のシーケンス解析にはコスト、時間、労力がかかる。また、MLST 法はクローン分類を目的としているため、同一クローン内の菌株識別には、さらに別の方法を用いる必要がある。

表 1 既存の分子疫学解析法の長所及び短所

| | 長所 | 短所 | |
|---------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| 分子疫学解析法 | pulsed field gel electrophoresis(PFGE) | ほぼ全ての菌種に使用できる 高い菌株識別能力 | コスト・労力がかかる 特殊な機器が必要、比較が困難 |
| | randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) typing | ほぼ全ての菌種に利用可能 PCRを用いた単純で安価な方法 | 標準化が難しい 再現性が悪く、比較が困難 |
| | amplified fragment length polymorphism(AFLP) | ほぼ全ての菌種に使用できる 高い菌株識別能力 | コスト・労力がかかる 特殊な機器が必要 |
| | multilocus variable number tandem repeats analysis(MLVA) | 識別能力が高い 安価、迅速性がある | 標準プロトコールの決定が難しい 誤判定を引き起こしやすい |
| | Insertion sequence typing | 安価、迅速性がある 結果の比較が容易 | 菌種に限られる 標準化が難しい |
| | multilocus sequence typing(MLST) | ほぼ全ての菌種に使用できる 結果の比較が容易 | コスト・労力がかかる 菌株識別能に劣る |

本研究の目的及び課題

このようにそれぞれの分子疫学解析法に特徴があり、解決すべき問題点が残されている。そのため、より簡便かつ迅速に遺伝子型別分類することができる方法の開発が強く望まれている。これらの問題点を解決すべく新規分子疫学解析法の開発を目指した。新規分子疫学解析法に求められるものは大きく分けて以下の 5 点である。

1. 特殊な装置を必要としない
2. 既存の方法と同等の菌株識別能があり、相関性が見られる
3. 迅速に結果が得られる
4. 多検体処理も可能である
5. 数値化により情報共有が簡単にできる

本博士論文では上記 1 から 5 を検証するにあたって、①腸管出血性大腸菌 115 株及び院内感染等で問題となっている第 3 世代セファロスポリン耐性を獲得した基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ産生大腸菌を含む臨床分離株 80 株、②カンピロバクター臨

床分離株 65 株を本実験に供し、実際の現場においても適用可能となりうるかの評価を行い、実用化の促進を念頭において研究を遂行した。具体的にはこれら 1 から 5 の要求を満たす分子疫学解析法として利用可能な方法として以下に示す仮説を立てた。ゲノム情報より適切なオープンリーディングフレーム (ORF) を選出し、選出した ORF の有無 (プラスマイナス) をマルチプレックス PCR で調べる。通常の電気泳動後、ORF の有無を数値化することであると考えた。即ち、特殊な機器などを必要とせず、菌株識別能力にも優れ、多検体処理も容易で、迅速に結果が得られる。得られた遺伝子のプラスマイナスを数値へと変換することで情報も簡単に共有できる。そこで本博士論文で提案した分子疫学解析法の開発を、集団発生が起きると社会的にも被害の大きい腸管出血性大腸菌が含まれる大腸菌と、我が国において 2003 年以降細菌性食中毒で最も発生件数が多い病原菌であるカンピロバクターについて行い、集団感染発生時の汚染源や原因食品の特定や感染管理等がスムーズに行えるように開発法の性能評価を行った。

本論文では第 2 章で大腸菌の新規分子疫学解析法の開発を「大腸菌の迅速簡便な分子疫学解析法の研究」として、第 3 章でカンピロバクターの新規分子疫学解析法の開発を「カンピロバクターの分子疫学解析法」の研究として章立てて記述することにす

第2章 大腸菌の迅速簡便な分子疫学解析法の研究

1 節 大腸菌のクローン大別法の開発と評価

2-1-1 諸言

大腸菌はヒトや動物の腸管正常細菌叢の一つであるが、その一部のクローンは病原性が高く、消化管症状や尿路感染症、時には敗血症をはじめとした侵襲性感染症の起炎菌となる(18)。腸管病原性大腸菌とされるグループだけでも数十種類の血清型が挙げられ、血清型が異なる株はクローンが異なることが多い。また、抗菌薬耐性を獲得したクローンも見いだされ医療現場において問題となっている(19-21)。このように大腸菌には、多様な遺伝的バックグラウンドの株が存在するため、感染症や集団感染の原因となった株の遺伝子的な特徴付けには、どのようなクローンに分類される株であるかを決定することも重要となる。

現在使用されているクローン分類法である multilocus sequence typing (MLST) 法は7カ所のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を読むことで sequence type (ST)を、近縁なSTの集団を集めることで clonal complex (CC)を決定する方法である(22, 23)。MLST法は結果を数値として得られるためデータの比較が簡単であるが、実施にはシーケンス解析が必要であり、多検体処理の際にコスト・時間がかかるといった問題点がある。さらに、大腸菌では phylogenetic group と呼ばれる系統解析も行われる。Phylogenetic group の決定には *chuA*、*yjaA*、TspE4.C2 と呼ばれる3つの遺伝子を検出し、その保有パターンから系統解析する(24, 25)。しかし phylogenetic group 解析は病原性に関連した4つのグループに大分類することを目的としており、分子疫学解析としては補助的な役割にとどまる。

抗菌薬耐性を獲得したクローンのうち、特に問題となっているのが基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ(ESBL)を産生する大腸菌である。ESBLはクラスAβ-ラクタマーゼの遺伝子に変異が起こり、セフォタキシム(CTX)やセフトジジム(CAZ)等の第三世代セファロsporin系薬剤を含む種々のβ-ラクタム系抗生物質を分解する

能力を獲得した β -ラクタマーゼのことである(58, 59)。第三世代セファロスポリン系薬剤は、第一世代、第二世代よりも抗菌範囲が広がっており、グラム陰性桿菌に対しても抗菌力が増している薬剤であるため、第一選択薬として使用されることが多い抗菌薬である。その薬剤に耐性を持つ菌の蔓延は、治療方針等の観点からも非常に大きな問題となる。我が国における健常者の ESBL 産生大腸菌保有率は現在数%程度であるが、今後 ESBL 産生大腸菌の保有率の増大に伴い院内感染・医療現場での感染拡大が危惧されている。さらに世界的には広く蔓延している地域もあり(26-31)、その動向を調べる上でクローンの識別は重要な意義がある。また、集団感染発生時に迅速に流行クローンであるか否かを知ることも重要である。そのため、MLST 法のように増幅産物の塩基配列を決定する方法ではなく、簡便にクローンを識別する方法が求められている。

本研究では大腸菌において genomic islet を構成する ORF の保有パターンを検出することにより、遺伝子型を決定することでクローン大別が可能になると仮説を立てた(32-34)。Genomic islet とは、細菌のゲノム同士を比較した場合に、5 kbp 程度、またはそれ以下の大きさで配列が異なる部分であり、ゲノム全体に散在している。個体の生存確率に影響せず、進化の過程で取り残されたものと考えられる。具体的にはデータベース上に蓄積されつつある大腸菌の遺伝子情報を比較し、clonal complex を反映する遺伝子、つまりは genomic islet を構成する ORF を複数個選択、検出し、それらの遺伝子をマルチプレックス PCR で増幅した後、増幅産物の塩基配列を決定することなく、通常の電気泳動により遺伝子産物の泳動パターンを比較することにより大腸菌のクローンを識別することが可能だと考えた。しかし、自然界に存在する大腸菌のゲノムは多様であり、実用的な検出 ORF 数でクローンを大別する方法が実現可能か否かは明確ではなかった。そのため genomic islet の分布パターンを検出することによってクローン大別が可能であるという仮説を立証するため、ESBL 産生大腸菌を含む臨床分離株を本実験に供し、開発を行った。さらに開発法と MLST 法を比較することにより、開発法の性能評価を行った。

2-1-2 大腸菌クローン大別法の開発

(1) 材料及び方法

使用菌株

健康人及び食中毒関連事例より分離された大腸菌 16 株、ESBL 産生大腸菌 9 株、毒素原性大腸菌 (ETEC) 1 株、腸管出血性大腸菌 (STEC) 7 株 (O157 4 株、O26 2 株、O111 1 株) の計 33 株を用いた (表 2)。

表 2 ORF スクリーニングの使用菌株

| No. | Strain Name | O | ST | CC | 備考 | No. | Strain Name | O | ST | CC | 備考 |
|-----|-------------|-----|------|-----|------------------------|-----|-------------|-----|-----|-----|---------------------|
| 1 | 04N061 | 1 | 38 | 38 | ESBL ^(a) 産生 | 18 | 12A049 | UT | 538 | 538 | |
| 2 | 11A026 | 1 | 59 | 59 | | 19 | 11A018 | UT | | | |
| 3 | 12A008 | UT | 648 | | ESBL ^(a) 産生 | 20 | 12A001 | 1 | 95 | 95 | |
| 4 | 12A007 | 153 | 68 | | ESBL ^(a) 産生 | 21 | 12A034 | 18 | 95 | 95 | |
| 5 | 11A016 | UT | 155 | 155 | | 22 | 12A095 | 1 | 95 | 95 | |
| 6 | 11A030 | UT | 348 | 156 | | 23 | 11A003 | 74 | 135 | | |
| 7 | 12A038 | UT | UT | | ESBL ^(a) 産生 | 24 | 11A013 | 74 | | | |
| 8 | 12A140 | UT | 57 | 350 | ESBL ^(a) 産生 | 25 | 12A012 | 1 | | | |
| 9 | 12A166 | UT | 2172 | | | 26 | 12A162 | 18 | | | |
| 10 | 12A185 | 148 | 94 | 448 | ETEC ^(b) | 27 | 00-059 | 157 | | | STEC ^(c) |
| 11 | 07N742 | 25 | 10 | 10 | ESBL ^(a) 産生 | 28 | 02-051 | 157 | | | STEC ^(c) |
| 12 | 09N348 | UT | 131 | | ESBL ^(a) 産生 | 29 | 06-021 | 157 | | | STEC ^(c) |
| 13 | 11A041 | 25 | 131 | | ESBL ^(a) 産生 | 30 | 10-098 | 157 | 11 | 11 | STEC ^(c) |
| 14 | 12A131 | UT | 131 | | | 31 | 08-011 | 26 | | | STEC ^(c) |
| 15 | 12A138 | UT | | | ESBL ^(a) 産生 | 32 | 12-109 | 26 | 21 | 29 | STEC ^(c) |
| 16 | 12A125 | 6 | 73 | 73 | | 33 | 08-027 | 111 | 16 | 29 | STEC ^(c) |
| 17 | 12A102 | UT | 357 | | | | | | | | |

(a) ESBL: extended spectrum beta lactamase、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ

(b) ETEC: enterotoxigenic *Escherichia coli*、毒素原性大腸菌

(c) STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*、腸管出血性大腸菌

DNA 抽出

全ての株を、Tris-EDTA 緩衝液 100 μ L (pH8.0) に McFarland1 程度になるように懸濁し、10 分間 95 $^{\circ}$ C でインキュベートし、1 分間 16000 \times g で遠心分離した。上清を PCR のためのテンプレートとして使用した。

クローン大別のための ORF スクリーニング

大腸菌及び赤痢菌 3 株 (*E.coli* 55989 (Genbank Accession No. CU928145、ST678)、Sakai (Genbank Accession No. BA000007、ST11)、*S. flexneri* 2457T (Genebank Accession No. AE014073、ST245)) の全ゲノム塩基配列をインターネットデータベース (National Center for Biotechnology Information (NCBI) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) より取得し、MBGD web site (<http://mbgd.nibb.ac.jp/>) にて相互比較した。クローン大別に利用可能と考えられる染色体上の genomic islet を構成する ORF 候補として、比較に利用した 3 株中いずれか 2 株が保有しているもの、またはいずれか 1 株のみが保有しているものをあわせて 24 個を選別した (表 3 ORF No. GI_01-24)。選別した 24 個の ORF について PCR 用プライマーを設計し、ORF 保有状態を PCR 増幅の有無を指標として調査した。PCR は PCR 反応緩衝液 (Mg^{2+} 1.5 mM)、dNTP(それぞれ 0.2 mM)、2 pmol の各プライマー、0.4 単位の *Taq* DNA ポリメラーゼ (コスモバイオ社製、東京、日本) 及びテンプレート 2 μ L を含む総容量 20 μ L の系で行った。PCR の反応条件は 94 $^{\circ}$ C での熱変性を 30 秒間、60 $^{\circ}$ C でのアニーリングを 30 秒間、72 $^{\circ}$ C での伸長反応を 30 秒間、これを 1 サイクルとし、30 サイクル行った。その後、サンプルがサーマルサイクラーから除去されるまで 4 $^{\circ}$ C で保持した。PCR 産物は 2%アガロースゲル (タカラバイオ株式会社、大津、日本) を用いて 0.5 \times TBE 中 100 V で 30 分間電気泳動した後、UV トランスイルミネーター下で臭化エチジウムにより可視化した。

しかし、ESBL 産生大腸菌に多い ST 型である ST131 の分離能が不十分だったため、さらに大腸菌 3 株 (NA114(Genbank Accession No. CP002797、ST131)、LF82(Genbank Accession No. CU651637、ST135)、ABU 83972(Genbank Accession No. CP001671、ST73))

の全ゲノム塩基配列をインターネットデータベースより取得し、MBGD web site にて相互比較し、genomic islet を構成する ORF の候補をさらに 8 個を選択し（表 3 ORF No. GI_25-32）、同様に ORF 保有状態を PCR 増幅の有無を指標として調査した。PCR の反応条件は先と同様の条件で行った。

表 3 スクリーニングに使用した ORF

| ORF No. | ORF name | ORF No. | ORF name | ORF No. | ORF name |
|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|
| GI_01 | EC55989_0018 | GI_13 | EC55989_0636 | GI_25 | ECNA114_0007 |
| GI_02 | ECS0053 | GI_14 | EC55989_0699 | GI_26 | ECNA114_0140 |
| GI_03 | EC55989_1089 | GI_15 | ECS2436 | GI_27 | ECNA114_1457 |
| GI_04 | EC55989_1577 | GI_16 | EC55989_2719 | GI_28 | ECNA114_4208 |
| GI_05 | ECS4300 | GI_17 | ECS4731 | GI_29 | ECNA114_0460 |
| GI_06 | EC55989_4085 | GI_18 | EC55989_4374 | GI_30 | ECABU_c34730 |
| GI_07 | EC55989_0068 | GI_19 | EC55989_0830 | GI_31 | LF82_085 |
| GI_08 | EC55989_0189 | GI_20 | ECS0914 | GI_32 | LF82_248 |
| GI_09 | EC55989_1649 | GI_21 | ECS3904 | | |
| GI_10 | EC55989_1821 | GI_22 | ECS4280 | | |
| GI_11 | ECS4528 | GI_23 | ECS4827 | | |
| GI_12 | EC55989_4248 | GI_24 | EC55989_4548 | | |

マルチプレックス PCR による選択 ORF の検出

スクリーニングの結果から選出した 10 個の ORF (表 3 ORF No. GI_01、ORF No. GI_02、ORF No. GI_03、ORF No. GI_06、ORF No. GI_13、ORF No. GI_17、ORF No. GI_27、ORF No. GI_28、ORF No. GI_29、ORF No. GI_31) に対してマルチプレックス PCR で検出可能にするために、プライマーの再設計を行った。さらに、大腸菌のマーカとして *uidA* 遺伝子 (35)、及び *yhbX* 遺伝子を、遺伝子型大分類としての phylogenetic group を決定する ORF (*chuA*、*yjaA*、TspE4.C2) (24) を組み込み、大腸菌のクローン大別用に 14-plex PCR の反応系を作製した。*uidA* 遺伝子は β -グルクロニダーゼをコードする遺伝子であり、*yhbX* 遺伝子 (例えば *E. coli* 55989 株の EC55989_3592 に相当) は、hydrolase をコードする遺伝子である。この 2 つの遺伝子のうち、いずれか一方は大腸菌に普遍的

に見出されるので、大腸菌を識別する共通マーカーとして用いることができる (36)。

この反応系を MLST 相当のクローン大別が可能な Islet Pattern 法 (IP 法) とした (表 4)。

表 4 Islet Pattern 法 (IP 法) で使用した ORF 及びプライマー

| multi ORF No. | ORF name | amplicon size | coefficient | Forward Primer | Reverse Primer |
|---------------|--------------|---------------|-------------|--------------------------|-------------------------|
| 1 | <i>uidA</i> | 652 | | GCAAAGTGTGGGTCAATAATCAG | ACCATCAGCACGTTATCGAATC |
| | EC55989_3592 | | | CAGAGTGATCCGGATGAAGTTG | CGAAAAGCGGATTGCGAG |
| 2 | ECNA114_4208 | 510 | 512 | TTGACTGCATTTTCGTCGCC | TTCCTGCACTGACAATGGC |
| 3 | EC55989_4085 | 433 | 256 | GACATTGGTAGAGGGGATTGG | GAGTTACATTTGGCTTACGGC |
| 4 | EC55989_0018 | 377 | 128 | CTGCGATAAAATTCACCATTCC | TGGTTCCTGACTCCTGTATCG |
| 5 | ECNA114_1457 | 339 | 64 | GCGGCGAATGCAAGTTTCT | GTGATCGAGCGCCTGATTAAG |
| 6 | EC55989_1089 | 274 | 32 | TCAGCCGCAGCCAGTGAAAC | GTTATCCACCGCCAGGAAG |
| 7 | LF82_085 | 241 | 16 | TTCCTGCCTGTGTGAGTTIG | GATTTTCGCGTGGAGTCG |
| 8 | ECS4731 | 209 | 8 | CATTGCCGACATTACGCC | TTTCCACCATGCAGTCGCC |
| 9 | ECS2436 | 191 | 4 | TGGTAGTGAAATTCGGATAAGAGG | TTTGAATCGCAGCAAAAATG |
| 10 | ECNA114_0460 | 162 | 2 | ATCTGCAAAATCCGCCGTC | GAAATCTTGCATCGTAATCGC |
| 11 | ECS0053 | 148 | 1 | GCCGCGTTTCCCTTTGTTAT | GCCGTCTACCAGTAAAAGGATTG |
| 12 | <i>chuA</i> | 124 | | GACCTTCAGCATTACTGTATGGC | CCGCCAGTACCAAAGACAC |
| 13 | <i>yjaA</i> | 101 | | CGCCAATTTCTTTGTTGCAG | TATCCATACGTTTTGCTGGC |
| 14 | TspE4.C2 | 80 | | GTAATGTCTGGGGCATTTCAG | AAACGCGGGTAGATATTCAGAC |

(2) 結果

24 個の候補 ORF のうち、1 つの ORF では同一 ST 間で保有に差が生じた (ORF No. GI_11) が、残りの 23 個の ORF では ST と相関が見られた。ESBL 産生大腸菌に多い ST 型である ST131 の分離能の向上のために選出した 8 個の ORF (表 3 ORF No. GI_25-32) の中には、先に選出した 24 個の ORF では識別できなかった ST 型を識別可能にする ORF が 4 個存在した (ORF No. GI_27、ORF No. GI_28、ORF No. GI_29、ORF No. GI_31)。これらの結果より合計 32 個の ORF の中から、10 個の ORF を選出し、クローン大別法に利用することとした (表 5)。

表 5 選出 ORF のスクリーニング結果

| No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Strain Name | 04N061 | 11A026 | 12A008 | 12A007 | 11A016 | 11A030 | 12A038 | 12A140 | 12A166 | 12A185 | 07N742 | 09N348 | 11A041 | 12A131 | 12A138 | 12A125 | 12A102 |
| O | 1 | 1 | UT | 153 | UT | UT | UT | UT | UT | 148 | 25 | UT | 25 | UT | UT | 6 | UT |
| H | | UT | UT | 6 | 51 | 28 | UT | UT | UT | 28 | | | 4 | UT | 5 | 12 | 4 |
| ST | 38 | 59 | 648 | 68 | 155 | 348 | UT | 57 | 2172 | 94 | 10 | 131 | 131 | 131 | | 73 | 357 |
| CC | 38 | 59 | | | 155 | 156 | | 350 | | 448 | 10 | | | | | | 73 |

| ORF No | ORF name | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
|--------|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| GI_01 | EC55989_0018 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| GI_02 | ECS0053 | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| GI_03 | EC55989_1089 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| GI_06 | EC55989_4085 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| GI_15 | ECS2436 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| GI_17 | ECS4731 | + | + | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + |
| GI_27 | ECNA114_1457 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| GI_28 | ECNA114_4208 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| GI_29 | ECNA114_0460 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| GI_31 | LF82_085 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |

| No. | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Strain Name | 12A049 | 11A018 | 12A001 | 12A034 | 12A095 | 11A003 | 11A013 | 12A012 | 12A162 | 00-059 | 02-051 | 06-021 | 10-098 | 08-011 | 12-109 | 08-027 |
| O | UT | UT | 1 | 18 | 1 | 74 | 74 | 1 | 18 | 157 | 157 | 157 | 157 | 26 | 26 | 111 |
| H | 4 | 4 | 7 | 7 | UT | 12 | 12 | UT | UT | 7 | 7 | 7 | 7 | NM | 11 | NM |
| ST | 538 | | 95 | 95 | 95 | 135 | | | | | | | 11 | | 21 | 16 |
| CC | 538 | | 95 | 95 | 95 | | | | | | | | 11 | | 29 | 29 |

| ORF No | ORF name | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 |
|--------|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| GI_01 | EC55989_0018 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| GI_02 | ECS0053 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| GI_03 | EC55989_1089 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| GI_06 | EC55989_4085 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| GI_15 | ECS2436 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| GI_17 | ECS4731 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| GI_27 | ECNA114_1457 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GI_28 | ECNA114_4208 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GI_29 | ECNA114_0460 | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| GI_31 | LF82_085 | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

2-1-3 大腸菌クローン大別法の性能評価

(1) 材料及び方法

使用菌株

開発法の性能評価には ESBL 産生大腸菌 19 株 (CTX-M-1 group 産生 6 株、CTX-M-2 group 産生 3 株、CTX-M-9 group 産生 10 株)、STEC 3 株、ETEC 2 株、2004 年から 2012 年の間に健常人より分離された大腸菌 51 株、環境由来株 1 株、食品由来株 4 株の計 80 株 (表 6) を用いた。

表 6 IP 法の性能評価に使用した菌株

| | | No. of isolates |
|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| ESBL ^(a) 産生大腸菌 | CTX-M-1 group | 6 |
| | CTX-M-2 group | 3 |
| | CTX-M-9 group | 10 |
| | STEC ^(b) | 3 |
| | ETEC ^(c) | 2 |
| | Others ^(d) | 56 |
| | Total | 80 |

(a) ESBL: extended spectrum beta lactamase、基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ

(b) ETEC: enterotoxogenic *Escherichia coli*、毒素原性大腸菌

(c) STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*、腸管出血性大腸菌

(d) 健常者由来株51株、食品由来株4株、環境由来株1株

MLST 法

MLST 分析は Warwick Medical School のプロトコール (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/>) に従って行い、7 か所のハウスキーピング遺伝子(*adhA, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA*) を PCR で増幅後、シーケンス解析をすることで ST を決定した。関連 ST のクラスタリング (CC の決定) は eBURST プログラム (<http://www.mlst.net/>) を用いて行った。

IP 法

IP 法は PCR 緩衝液 (Mg²⁺ 3 mM) 2 μL、dNTP ミックス (それぞれ 0.2 mM)、1 単位の FastStart Taq DNA ポリメラーゼ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、および 2 pmol の各プライマー (表 4)、テンプレート DNA 2 μL を含有する総容量 20 μL の系で実施した。反応条件は 94 °C で 4 分間、初期変性の後、94 °C での熱変性を 30 秒間、60 °C でのアニーリングを 30 秒間、72 °C での伸長反応を 120 秒間、これを 1 サイクルとし、30 サイクル反応させ、72°C で 7 分間の最終伸長を行った。サンプルがサーマルサイクラーから除去されるまで 4 °C で保持した。PCR 産物は 4% アガロースゲル (KANTO HC、関東化学株式会社、東京、日本) を用いて 0.5×TBE 中 120 V で 60 分間電気泳動した。

PCRの結果は、目的のサイズのバンド（各 ORF に対応するバンドおよびポジティブコントロールに対応するバンド）が増幅していれば 1、増幅が見られない場合を 0 とし、2 進法のコードを作成した（バイナリーコード）。作成したバイナリーコードを 10 進数に変換し、遺伝子型コード（IP スコア）を得ることで、クローン大別を行った（表 7、図 1）。例えば図 1 の No.1 の株では multi ORF No. 2 の ECNA114_4208 から順に（+）、EC55989_4085（-）、EC55989_0018（-）、ECNA114_1457（+）、EC55989_1089（-）、LF82_085（-）、ECS4731（+）、ECS2436（-）、ECNA114_0460（+）、ECS0053（+）となり、これを 1、0 の 2 進数コードとすると 1001001011 となる。このコードを 10 進数へと変換、つまりは次式のような計算を行い、 $512 \times 1 + 256 \times 0 + 128 \times 0 + 64 \times 1 + 32 \times 0 + 16 \times 0 + 8 \times 1 + 4 \times 1 + 2 \times 1 + 1 \times 1 = 587$ という IP スコアが得られる。各 IP スコアは、0（0000000000）から 1023（1111111111）の範囲内の数値で表現される(32)。

また phylogenetic group の決め方は文献 24 に従い、*chuA* 遺伝子、及び *yjaA* 遺伝子が共に陽性ならば phylogenetic group B2、*chuA* 遺伝子陽性、*yjaA* 遺伝子陰性ならば phylogenetic group D、*chuA* 遺伝子陰性、TspE4.C2 遺伝子陽性ならば phylogenetic group B1、*chuA* 遺伝子、及び TspE4.C2 遺伝子が共に陰性ならば phylogenetic group A とした。例えば、図 1 の No.1 の株の phylogenetic group は multi ORF No. 12 の *chuA* 遺伝子から順に（+）、*yjaA* 遺伝子（+）、TspE4.C2（+）であることから、phylogenetic group B2 となる。

表 7 IP 法の代表株の結果と IP スコアへの変換例

| No. | O | ST | multi ORF number | | | | | | | | | | | | | | Binary code | IP score | Phylogenetic group |
|-----|-----|-----|------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|-------------|----------|--------------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | | |
| 1 | UT | 131 | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | + | + | + | + | 1001001011 | 587 | B2 |
| 2 | 1 | 95 | + | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + | + | 0000001011 | 11 | B2 |
| 3 | 157 | 11 | + | - | + | + | - | + | - | + | + | - | + | + | - | - | 0110101101 | 429 | D |
| 4 | 26 | 21 | + | - | + | + | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | 0110100100 | 420 | A |

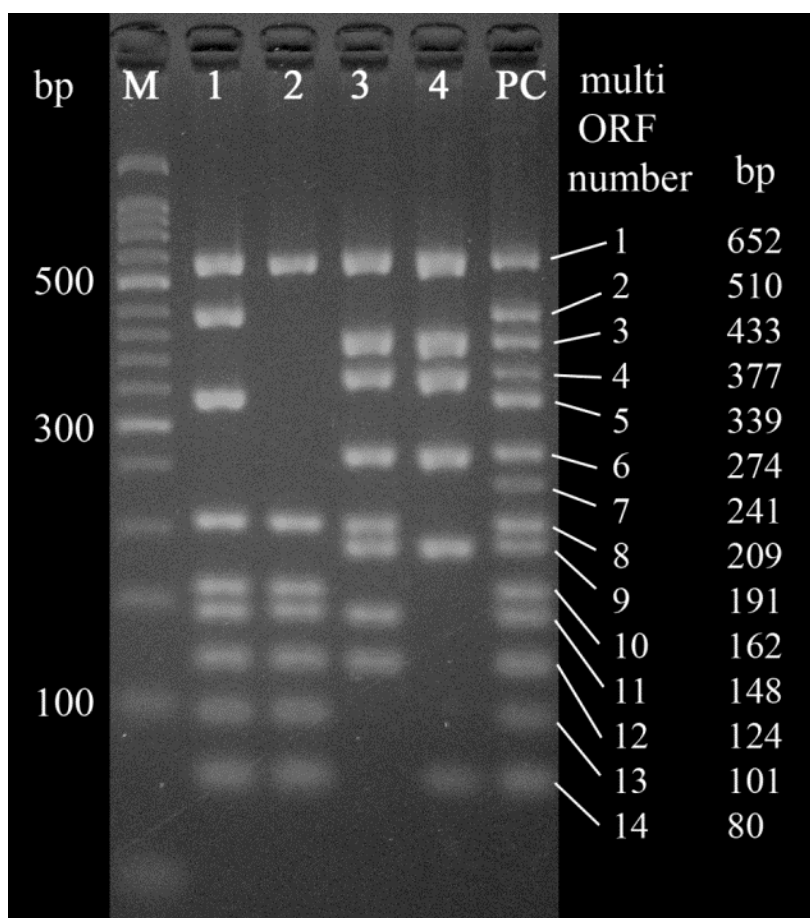


図 1 代表株と陽性対照の IP 法の泳動図

IP score は multi ORF number 2 から 11 によって作成する。multi ORF number 1 は大腸菌識別マーカーであり、multi ORF number 12 から 14 は phylogenetic typing に用いる。

M:50bp DNA Ladder (Dye Plus) (タカラバイオ株式会社) ; PC : 陽性対照

(2) 結果

MLST 法

大腸菌 80 株は MLST 法で 41 ST 型に分類された。ESBL 産生株のうち CTX-M-1 group 産生 6 株は ST57、ST2003、ST2172 が 1 株ずつ、ST648 が 3 株に、CTX-M-2 group 産生 3 株は ST10、ST38、ST131 に、CTX-M-9 group 産生 10 株は ST38、ST95、ST405 が 1 株ずつ、ST68 が 2 株、ST131 が 5 株に分類された。今回供試した大腸菌 80 株の中では ST131 が 8 株と最も多く、ST357 (7 株)、ST95 (6 株) の順で多く識別された。MLST 法で既存の ST 型に型別できなかつた株が 7 株存在した (表 8)。

IP 法

IP 法で 26 IP 型に分類された。ESBL 産生株のうち CTX-M-1 group 産生 6 株は IP スコア 44、141、164、221 が 1 株ずつ、IP スコア 205 が 2 株に、CTX-M-2 group 産生 3 株は IP スコア 141、300、523 に、CTX-M-9 group 産生 10 株は IP スコア 11 が 1 株、IP スコア 140、141 が 2 株ずつ、IP スコア 587 が 5 株に分類された。今回供試した大腸菌 80 株の中では IP スコア 73 及び IP スコア 420 が 9 株ずつで最も多く、IP スコア 164 及び IP スコア 587 が 7 株ずつで次いで多く分離された。IP 法では少なくともいずれか 2 つの ORF は検出できており、全ての ORF が検出できず型別不能となる株は存在しなかつた (表 8)。ESBL 産生大腸菌によく見られる ST131 は全て IP スコアが 512 以上となった。また、IP スコア 141 に分類された 6 株中 5 株は異なる ST 型 (ST38、405、2003) であったが ESBL を産生していた。

IP 法と MLST 法の比較

IP 法と MLST 法はおおよその相関関係のある結果を示した。同一 ST 型で異なる IP スコアが含まれたのは ST131 (IP スコア 523、587)、ST648 (IP スコア 205、221) の 2 つであった。これらの IP スコアは 1 バンド違いであった。一方、同一 IP スコアで異なる ST 型が含まれたのは IP スコア 27 (3 株、ST135、ST420)、IP スコア 73 (9 株、ST357、

ST538)、IP スコア 140 (3 株、ST68、ST362)、IP スコア 141 (6 株、ST38、ST59、ST405、ST2003)、IP スコア 164 (7 株、ST155、ST472、ST607、ST1795、ST2172、ST2768)、IP スコア 420 (9 株、ST16、ST21、ST101、ST130、ST191、ST348、ST1056、ST2166、ST2175)、IP スコア 428 (4 株、ST218、ST697、ST2345) の 7 IP スコアであった。

表 8 IP 法と MLST 法の比較

| ST | IP_Pattern | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
|-------|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|----|
| | 9 | 11 | 25 | 27 | 41 | 44 | 73 | 75 | 89 | 140 | 141 | 160 | 164 | 172 | 173 | 205 | 221 | 237 | 300 | 329 | 396 | 420 | 428 | 429 | 523 | 587 | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | 1 | |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| 16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 38 | | | | | | | | | | | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | 3 |
| 57 | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 59 | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 68 | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 69 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4 | | | | | | | 4 |
| 73 | | | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 4 |
| 94 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 95 | | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 6 |
| 101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 117 | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 130 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 131 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 7 | | 8 |
| 135 | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 155 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 191 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 218 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | 1 |
| 348 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 352 | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 357 | | | | | | | 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 7 |
| 362 | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 405 | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 420 | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 472 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 538 | | | | | | | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| 607 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 648 | | | | | | | | | | | | | | | | 3 | 1 | | | | | | | | | | | 4 |
| 697 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| 1056 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 1193 | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 1795 | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 1873 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | 1 |
| 2003 | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 2166 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 2172 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| 2175 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 |
| 2345 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | 1 |
| 2768 | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | 1 |
| UT | | | | | | | 1 | | | | | 1 | 2 | 1 | | | | 1 | | | | | 1 | | | | 7 | |
| Total | 1 | 6 | 4 | 3 | 1 | 1 | 9 | 1 | 1 | 3 | 6 | 1 | 7 | 2 | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 | 9 | 4 | 1 | 1 | 7 | 80 |

2-1-4 考察

大腸菌のクローン大別は特に薬剤耐性菌で重要となる。現在クローン識別に使用されている MLST 法では ST 型は 5000 程度存在するが、流行・蔓延しているのは一部のクローン（例えば ESBL 産生大腸菌に多く、院内感染等集団発生の問題となることが知られている ST131 (phylogenetic group B2) や ST69 (phylogenetic group D) など）であることが知られている (37)。表 8 に示された結果から考察すると ST131 に識別されたクローンは IP 法で全て IP スコアが 512 以上となり、簡便に識別が可能であった。使用した菌株数が 8 株と少ないため、さらなる検討の余地は残されているが、IP 法に使用している multi ORF No.2 (ECNA114_4208) が ST131 の特異的マーカーとなる可能性が考えられた。また、ST95 (IP スコア 11)、ST69 (IP スコア 396)、ST73 (IP スコア 25) では MLST 法と IP 法が 1 対 1 の関係となっていた。ST95 には血清型 O1 や O18 の株が含まれ、一般には常在菌によく見られる ST 型であるが、尿路感染症や新生児髄膜炎の原因となる株も存在している。また、ST73 には尿路感染症を引き起こす株が含まれることが知られている(22)。本研究で開発した IP 法は ORF 10 個の有無によるタイピング法なので 1024 パターン (2 の 10 乗) にしか識別できないため、MLST 法の約 5000 の ST 型全てを識別することは不可能である。しかし、ST131、ST69 や ST95 といった感染症を引き起こす可能性のある重要な ST 型は確実に識別可能であり、クローン大別を行う際の識別能は純分であると考えられた。さらには MLST 法で ST 型が決まらなかった株も IP 法では識別できたことより、IP 法では新規 ST 型もおおまかに分類することが可能であると考えられた。

IP 法には病原性の大分類である phylogenetic group を決める遺伝子を検出するプライマーを組み込んである。Phylogenetic group は疫学的には補助的な役割にとどまっているが、クローン識別と phylogenetic group を同時に決定できることは、大腸菌の流行等を調べる上で非常に有用であると考えられた。

IP スコア 141 に分類された 6 株中 5 株は異なる ST 型であったが ESBL を産生していた。ESBL をコードする遺伝子はプラスミド上にあるとされており、IP スコアにより

ESBL をコードするプラスミドが導入されやすい大腸菌のクローンを探す方法として利用できる可能性が示唆された。また、同一 ST 型で異なる IP スコアが含まれた ST 型も存在し、選択した genomic islet に不安定な部分のある可能性があった。これらはさらに供試菌株数を増やし、検討の必要があると考えられた。

本研究で開発した IP 法は感染症を引き起こす恐れのある重要な ST 型の識別が可能であり、さらに MLST 法で型別不能となった株も識別が可能であった。また、バイナリータイピング法を用い 1 系統のマルチプレックス PCR でクローンを大別できることから、既存のクローン識別法である MLST 法に比べコスト、時間、労力を大幅に削減することができた。さらに IP 法は phylogenetic group も同時に判別できるため、クローン情報に加え病原性の大分類も知ることができ、疫学情報としての活用の範囲を広げることができると考えられた。今後、供試株数を増やし、MLST 法との相関や genomic islet の安定性調査など、さらなる検討の余地も残しているが、これらのことから IP 法は大腸菌のクローン大別法として有効な方法であり、今後 ESBL 産生大腸菌等の薬剤耐性大腸菌のサーベイランスにおいて使用可能であると考えられた。

2 節 腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法の開発と評価

2-2-1 諸言

志賀毒素を産生する腸管出血性大腸菌（STEC）は病原性が高く、出血性大腸炎などの消化管症状や溶血性尿毒症候群（HUS）などを引き起こす。我が国においても 1990 年代に O157 の集団感染が発生し、死者を出すなど大きな被害をもたらした（38）。近年でも 2011 年に北陸地方で O111、2012 年に札幌で O157 の集団感染が発生し、社会的にも大きな問題になっている（39-41）。このように STEC は集団感染の原因となるのだが、散発的に見られる下痢症などからも分離されるため、集団感染発生時には感染ルートの特特定や、感染規模の確定を行うために、分子疫学解析が必要となる。

一般に STEC の分子疫学解析には、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法が用いられる。PFGE 法は菌株識別能力の高さや疫学情報とよい一致を示すことから菌株識別法の定法として用いられている。しかし、PFGE 法は特殊な装置が必要であること、時間がかかること、手技が煩雑であること、および他施設との比較が困難であることなどの課題が残っている。これらの課題の解決のために、分離割合の多い O157 や O26 に対しては、種々の分子疫学解析法が開発されている。日本でよく用いられるのは挿入配列を用いて菌株識別をする方法である（12, 13）。この方法は、大腸菌ゲノム中に多コピー存在する移動性の挿入配列（IS）の内側と外側にプライマーを設計し、マルチプレックス PCR で IS の有無を確認することによるタイピング方法である。特殊な装置の必要もなく、迅速に結果が得られるという利点はあるが、この方法は多コピーの挿入配列を保有する血清型に限られ、血清型毎に検出位置を設定する必要がある。そのため、汎用性のあるプライマーを設計することはできず、全ての血清型の STEC を菌株識別することはできない。世界的には *multilocus variable number tandem repeats analysis* (MLVA) 法が迅速性や高い菌株識別能、PFGE 法と相関関係がみられることから、今後 PFGE に変わるタイピング法となる可能性があるとされている（50）。しかし、MLVA 法はタイピング結果の読み取りにはわずかなバンドサイズの違いを正確に決める必要があり、誤判定を引き起こしやすい。また、使用する繰り返し配列の数や位置

も現在までに標準的に決まっておらず、血清型毎に繰り返し配列の数や位置を決めなければならない。

近年酵素基質培地の開発等もあり (51, 52)、O157・O26 以外の血清型の分離割合が増加してきている。そのため、血清型に依存せずに利用ができ、PFGE 法よりも迅速に同等の結果が得られる分子疫学解析法の必要性が高まってきている。

本研究では STEC において genomic island を構成する ORF の保有パターンを検出することにより、菌株識別が可能になると仮説を立てた (32-34)。Genomic island とは 5～100 個の外来遺伝子からなる遺伝子クラスターのことであり、溶原ファージや病原アイランド、耐性アイランドに加え機能が不明なものが含まれる。個々の genomic island はモザイク状に ORF が組み合わされ、ORF の構成に多様性が見られる場合が多い。具体的にはデータベース上に蓄積されつつある大腸菌の遺伝子情報を比較し、菌株識別に利用可能な遺伝子、つまりは genomic island を構成する ORF を複数個選択、検出し、それらの遺伝子をマルチプレックス PCR で増幅した後、増幅産物の塩基配列を決定することなく、通常の電気泳動により遺伝子産物の泳動パターンを比較することにより、STEC の菌株識別が可能だと考えた。しかし、自然界に存在する大腸菌のゲノムは多様であり、実用的な検出 ORF 数でクローンを大別する方法が実現可能か否かは明確ではなかった。そのため genomic island を構成する ORF の分布パターンを検出することによって菌株識別が可能であるという仮説を立証するため、日本において分離頻度の高い 7 つの血清型 (O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165) の STEC を本実験に供し、新規分子疫学解析法の開発を行った。さらに開発した方法と STEC の分子疫学解析として最も一般的な方法である PFGE 法をそれぞれの血清型毎に比較することで、開発法の性能評価を行った。

2-2-2 腸管出血性大腸菌菌株識別法の開発

(1) 材料及び方法

使用菌株

ORF スクリーニングには食中毒関連事例より分離された STEC 12 株 (O157 6 株、O26 4 株、O111 2 株) を用いた (表 9)。

表 9 ORF スクリーニングに使用した腸管出血性大腸菌使用菌株

| No. | Strain Name | O | H | <i>stx1</i> | <i>stx2</i> |
|-----|-------------|-----|----|-------------|-------------|
| 1 | 00-059 | 157 | 7 | + | + |
| 2 | 00-179 | 157 | - | + | + |
| 3 | 02-051 | 157 | 7 | - | + |
| 4 | 04-085 | 157 | 7 | + | + |
| 5 | 06-021 | 157 | 7 | + | + |
| 6 | 10-098 | 157 | 7 | + | + |
| 7 | 07-005 | 26 | 11 | + | - |
| 8 | 08-011 | 26 | NM | + | + |
| 9 | 10-117 | 26 | 11 | + | - |
| 10 | 12-109 | 26 | 11 | + | - |
| 11 | 08-027 | 111 | NM | + | - |
| 12 | 10-086 | 111 | - | + | + |

DNA 抽出

全ての株を、Tris-EDTA 緩衝液 100 μ L (pH8.0) に McFarland1 程度になるように懸濁し、10 分間 95 $^{\circ}$ C でインキュベートし、1 分間 16000 \times g で遠心分離した。上清を PCR のためのテンプレートとして使用した。

菌株識別のための ORF スクリーニング

大腸菌及び赤痢菌 3 株 (*E.coli* 55989 (Genbank Accession No. CU928145)、Sakai (Genbank Accession No. BA000007)、*S. flexneri* 2457T (Genbank Accession No. AE014073))

の全ゲノム塩基配列をインターネットデータベース（NCBI）より取得し、MBGD web site にて相互比較した。菌株識別に利用可能と考えられる染色体上の genomic island を構成する ORF 候補として、比較に利用した 3 株中いずれか 2 株が保有しているもの、またはいずれか 1 株のみが保有しているものをあわせて 72 個を選別した（表 10）。

表 10 選出した genomic island を構成する ORF

| ORF No. | ORF name | ORF No. | ORF name | ORF No. | ORF name |
|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|
| GP_01 | ECS1592 | GP_25 | ECS1663 | GP_49 | EC55989_3400 |
| GP_02 | EC55989_0314 | GP_26 | ECS1933 | GP_50 | EC55989_3509 |
| GP_03 | EC55989_0762 | GP_27 | S2103 | GP_51 | S4832 |
| GP_04 | EC55989_0766 | GP_28 | EC55989_2188 | GP_52 | ECS5305 |
| GP_05 | ECS1102 | GP_29 | S0913 | GP_53 | EC55989_4972 |
| GP_06 | ECS1937 | GP_30 | EC55989_2641 | GP_54 | EC55989_5004 |
| GP_07 | EC55989_1406 | GP_31 | S3222 | GP_55 | ECS0797 |
| GP_08 | ECS1662 | GP_32 | EC55989_3396 | GP_56 | ECS0813 |
| GP_09 | EC55989_2104 | GP_33 | EC55989_4041 | GP_57 | EC55989_1022 |
| GP_10 | EC55989_2129 | GP_34 | EC55989_4278 | GP_58 | ECS1516 |
| GP_11 | ECS2927 | GP_35 | EC55989_4963 | GP_59 | ECS2171 |
| GP_12 | ECS1597 | GP_36 | EC55989_4969 | GP_60 | EC55989_1399 |
| GP_13 | EC55989_3358 | GP_37 | S0692 | GP_61 | ECS5272 |
| GP_14 | EC55989_3371 | GP_38 | EC55989_0685 | GP_62 | EC55989_2099 |
| GP_15 | EC55989_4034 | GP_39 | EC55989_0805 | GP_63 | EC55989_2256 |
| GP_16 | EC55989_4038 | GP_40 | ECS1564 | GP_64 | EC55989_2311 |
| GP_17 | EC55989_4941 | GP_41 | ECS1694 | GP_65 | ECS3501 |
| GP_18 | EC55989_4958 | GP_42 | ECS2283 | GP_66 | ECS5304 |
| GP_19 | EC55989_0547 | GP_43 | S1482 | GP_67 | ECS0288 |
| GP_20 | S0497 | GP_44 | EC55989_1636 | GP_68 | S4314 |
| GP_21 | ECS2996 | GP_45 | ECS2792 | GP_69 | EC55989_4878 |
| GP_22 | EC55989_0799 | GP_46 | EC55989_2249 | GP_70 | EC55989_4903 |
| GP_23 | ECS1299 | GP_47 | ECS1176 | GP_71 | EC55989_5006 |
| GP_24 | EC55989_1258 | GP_48 | ECS1301 | GP_72 | ECS4458 |

選別した 72 個の ORF について PCR 用プライマーを設計し、PCR 増幅の有無を指標

として ORF 保有状態を調査した。PCR は PCR 反応緩衝液 (Mg^{2+} 1.5 mM)、dNTP(それぞれ 0.2 mM)、2 pmol の各プライマー、0.4 単位の *Taq* DNA ポリメラーゼ (コスモバイオ社) 及びテンプレート 2 μ L を含む総容量 20 μ L の系で行った。PCR の反応条件は 94 °C での熱変性を 30 秒間、60 °C でのアニーリングを 30 秒間、72 °C での伸長反応を 30 秒間、これを 1 サイクルとし、30 サイクルで行った。その後、サンプルがサーマルサイクラーから除去されるまで 4 °C で保持した。PCR 産物は 2% アガロースゲル (タカラバイオ株式会社) を用いて 0.5×TBE 中 100 V で 30 分間電気泳動した後、UV トランスイルミネーター下で臭化エチジウムにより可視化した。

菌株識別能が不十分であったため、さらに STEC O157 4 株 (EC4115 (Genbank Accession No. CP001164)、EDL933 (Genbank Accession No. AE005174)、Sakai (Genbank Accession No. BA000007)、TW14359 (Genbank Accession No. CP001368)) の全ゲノム塩基配列をインターネットデータベース (同上) より取得し、MBGD web site にて相互比較し、さらなる候補 ORF として 24 個を選別した (表 11 ORF No. GP_73 – ORF No. GP_96)。プライマー設計後、ORF 保有状態を調査した。PCR の反応条件は先と同様の条件で行った。

表 11 菌株識別能を向上させるために追加選択した genomic island を構成する ORF

| ORF No. | ORF name | ORF No. | ORF name |
|---------|---------------|---------|--------------------|
| GP_73 | ECH74115_3039 | GP_97 | 00-059_ORF_4091224 |
| GP_74 | ECH74115_2899 | GP_98 | 12-163_ORF_264991 |
| GP_75 | ECH74115_3056 | GP_99 | 13-181_ORF_832681 |
| GP_76 | Z2415 | GP_100 | 13-189_ORF_714587 |
| GP_77 | ECH74115_3024 | GP_101 | 13-200_ORF_4852662 |
| GP_78 | Z2404 | GP_102 | 13-206_ORF_1448707 |
| GP_79 | Z1432 | GP_103 | 13-206_ORF_1454802 |
| GP_80 | ECH74115_3237 | | |
| GP_81 | ECH74115_3569 | | |
| GP_82 | ECH74115_3238 | | |
| GP_83 | ECS1189 | | |
| GP_84 | Z1797 | | |
| GP_85 | ECS1190 | | |
| GP_86 | ECH74115_2877 | | |
| GP_87 | Z1456 | | |
| GP_88 | ECH74115_1791 | | |
| GP_89 | ECH74115_2915 | | |
| GP_90 | Z2384 | | |
| GP_91 | ECS1527 | | |
| GP_92 | ECH74115_1860 | | |
| GP_93 | Z1854 | | |
| GP_94 | Z3358 | | |
| GP_95 | ECH74115_1587 | | |
| GP_96 | Z3362 | | |

さらに菌株識別能を高めるために、選択した ORF 保有パターンが同じ 9 株について、次世代シーケンサーを用いて、全ゲノム解析を行った。得られた全ゲノムデータの検討・比較を行い、さらなる候補 ORF として 7 個を選別した ((表 11 ORF No. GP_97 - ORF No. GP_103)。プライマー設計後、ORF 保有状態を調査した。PCR の反応条件は先と同様の条件で行った。

マルチプレックス PCR による選択 ORF の検出

スクリーニングの結果から選出した 11 個の ORF (表 10 ORF No. GP_10、ORF No. GP_30、ORF No. GP_65、表 11 ORF No. GP_76、ORF No. GP_79、ORF No. GP_84、ORF No. GP_85、ORF No. GP_86、ORF No. GP_95、ORF No. GP_97、ORF No. GP_101) に対してマルチプレックス PCR で検出可能にするために、プライマーの再設計を行った。さらに、大腸菌のマーカーとして *uidA* 遺伝子 (35)、及び *yhbX* 遺伝子を、STEC 識別用には志賀毒素遺伝子 (*stx1* 及び *stx2* 遺伝子) とインチミン遺伝子 (*eae* 遺伝子) を組み込み、14-plex PCR の反応系を作製した。この反応系を腸管出血性大腸菌 PCR based ORF typing (STEC-POT) 法とした (表 12)。

表 12 STEC PCR based ORF typing (STEC-POT) 法で使用した ORF 及びプライマー

| multi ORF No. | ORF name | amplicon size | coefficient | Forward Primer | Reverse Primer |
|---------------|--------------------|---------------|-------------|-------------------------|--------------------------|
| 1 | <i>uidA</i> | 652 | | GCAAAGTGTGGGTCAATAATCAG | ACCATCAGCACGTATCGAATC |
| | EC55989_3592 | | | CAGAGTGATCCGGATGAAGTTG | CGAAAAGCGGATTGCGAG |
| 2 | ECS1190 | 527 | 1024 | GTGCATGAGAAAAAGCCCG | ACCCAATAATCGCAATCCTGTTC |
| 3 | Z2415 | 418 | 512 | GGAAAGTGAAAAAGGACAGAGCC | GCGAATACCAGCACGTTTTAC |
| 4 | Z1432 | 356 | 256 | GAATGCCATGTTGCTGAACTG | GCTTCACTTTGTTCCCAAAACC |
| 5 | ECS3501 | 324 | 128 | GCACACAAGGTATCGGGGAAAT | CTTAACAGTGCCTGACCAGG |
| 6 | ECH74115_1587 | 286 | 64 | GGTTAACAATGCAATTAGCCAG | TTTAACCACTCCCTTTTAAGCC |
| 7 | EC55989_2129 | 248 | 32 | CAGGATCAACTGGTTATCGGTG | TTGAATTTCTGGCGGTAGG |
| 8 | Z1797 | 211 | 652 | AAGAACGGCATACTATGATCTGG | CTTCGCGCTGCTATTG |
| 9 | EC55989_2641 | 174 | 8 | AATGCCTGTTTTCTGGAGATTC | TTTGTTCCTTCCCTGTAACCAC |
| 10 | ECH74115_2877 | 156 | 4 | TCCAGTATCAGGAAGAGTGTGAC | GAGACTGACCGGACTCAT |
| 11 | 13-200_ORF_4852662 | 140 | 2 | CAGCGGAGATGGAAACCTATATG | ATATTCCTGCATGACGCCAGC |
| 12 | 00-059_ORF_4091224 | 121 | 1 | TGGACATCCTTTCATGGCTG | GCACGGGGTACGGATAAAAA |
| 13 | <i>stx2</i> | 99 | | TTTCCATGACAACGGACAGC | ATGATGAAACCACTGAGTGACG |
| | <i>stx1</i> | | | ATCGCTTTGCTGATTTTTCAC | TCCCTGCAACACGCTGTAAC |
| 14 | <i>eae</i> | 83 | | CAGGCTTCGTACAGTTGC | CCGTCAAAGTTATTACCACTCTGC |

(2) 結果

72 個の候補 ORF のうち、同一血清型の菌株間で保有状態に差異が見られた ORF は 6 個のみであった (表 10 ORF No. GP_06、ORF No. GP_10、ORF No. GP_26、ORF No. GP_30、ORF No. GP_62、ORF No. GP_65)。STEC の菌株識別能向上のために選出した 24 個の候補 ORF のうち、17 個の ORF については保有状態に菌株間で差が見られたが、4 個の ORF は全ての株が保有しておらず (表 11 ORF No. GP_73, GP_81, GP_82, GP_89)、3 個の ORF は同一血清型の菌株間で保有状態に差異が見られなかった (表 11 ORF No. GP_80, GP_91, GP_93)。これらの結果から STEC の菌株識別に有効だと考えられる 9 個の ORF を選択した。さらに次世代シーケンサーによる全ゲノム解析より得られた 7 個の候補 ORF のうち、菌株識別能の向上が見込まれた ORF は 2 個 (表 11 ORF No. GP_97、ORF No. GP_101) のみであった。これらの結果より合計 108 個の genomic island を構成する候補 ORF の中から、11 個の ORF を選出し、菌株識別法に利用することとした (表 13)。

表 13 選出 ORF のスクリーニング結果

| Strain Name | | 00-059 | 00-179 | 02-051 | 04-085 | 06-021 | 10-098 | 07-005 | 08-011 | 10-117 | 12-109 | 08-027 | 10-086 |
|-------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| O | | 157 | 157 | 157 | 157 | 157 | 157 | 26 | 26 | 26 | 26 | 111 | 111 |
| H | | 7 | - | 7 | 7 | 7 | 7 | 11 | NM | 11 | 11 | NM | - |
| ORF No. | ORF name | | | | | | | | | | | | |
| GP_10 | EC55989_2129 | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| GP_30 | EC55989_2641 | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| GP_65 | ECS3501 | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| GP_76 | Z2415 | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | - |
| GP_79 | Z1432 | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| GP_84 | Z1797 | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| GP_85 | ECS1190 | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + | + |
| GP_86 | ECH74115_2877 | - | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| GP_95 | ECH74115_1587 | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + |
| GP_97 | 00-059_ORF_4091224 | + | - | + | - | + | + | + | + | - | + | - | + |
| GP_101 | 13-200_ORF_4852662 | - | - | + | - | - | + | - | + | - | + | - | - |

2-2-3 腸管出血性大腸菌菌株識別法の性能評価

(1) 材料及び方法

使用菌株

開発法の性能評価には 2000 年から 2014 年に分離された STEC 115 株(O157 52 株(うち集団感染由来株 1 事例 4 株)、O26 40 株(同 2 事例 26 株)、O111 10 株(同 1 事例 5 株)、O103 5 株、O121 4 株、O145 2 株、O165 2 株)を用いた (表 14)。

表 14 STEC-POT 法の性能評価に使用した腸管出血性大腸菌使用菌株

| O serotype | No. of isolates |
|------------|-----------------|
| 26 | 40 |
| 103 | 5 |
| 111 | 10 |
| 121 | 4 |
| 145 | 2 |
| 157 | 52 |
| 165 | 2 |
| Total | 115 |

PFGE 法

PFGE 法は、基本的には鈴木らの方法に従って行った (53)。制限酵素は *Xba*I を用い、スイッチング時間は 2.2 秒から 52.4 秒とし、6V/cm で 20 時間泳動した。系統樹は BioNumerics ver.6.1 (Applied Maths NV、Keistraat、Sint-Martens-Latem、Belgium) 用いて描いた。ペアワイズ比較はダイスの相関係数を用いて行い、UPGMA クラスタリングアルゴリズムを用いてクラスター分析を行った。バンド分析のための optimization 及び position tolerance の両方を 1.5% に設定し、PFGE 分析の相同性についてのカットオフ値を 95% とした。

STEC-POT 法

STEC-POT 法は PCR 緩衝液 (Mg^{2+} 3 mM) 2 μ L、dNTP ミックス (それぞれ 0.2 mM)、1 単位の FastStart *Taq* DNA ポリメラーゼ (Roche Diagnostics)、および 2 pmol の各プライマー (表 12)、テンプレート DNA 2 μ L を含有する総容量 20 μ L の系で実施した。反応条件は 94 °C で 4 分間、初期変性の後、94 °C での熱変性を 30 秒間、60 °C でのアニーリングを 30 秒間、72 °C での伸長反応を 120 秒間、これを 1 サイクルとし、30 サイクル反応させ、72°C で 7 分間の最終伸長を行った。サンプルがサーマルサイクラーから除去されるまで 4 °C で保持した。PCR 産物は 4% アガロースゲル (KANTO HC、関東化学株式会社) を用いて 0.5×TBE 中 120 V で 60 分間電気泳動した。

PCR の結果は、目的のサイズのバンド (各 ORF に対応するバンドおよびポジティブコントロールに対応するバンド) が増幅していれば 1、増幅が見られない場合を 0 とし、2 進法のコードを作成した (バイナリーコード)。作成したバイナリーコードを 10 進数に変換し、遺伝子型コード (STEC-POT スコア) を得ることで、菌株識別を行った (表 15、図 2)。例えば図 2 の No. 1 の株では multi ORF No. 2 の ECS1190 から順に (+)、Z2415 (+)、Z1432 (+)、ECS3501 (+)、ECH74115_1587 (-)、EC55989_2129 (-)、Z1797 (-)、EC55989_2641 (-)、ECH74115_2877 (-)、13-200_ORF_4852662 (+)、00-059_ORF_4091224 (+) となり、これを 1、0 の 2 進数コードとすると 11110000011 となる。このコードを 10 進数へと変換、つまりは次式のような計算を行い、 $1024 \times 1 + 512 \times 1 + 256 \times 1 + 128 \times 1 + 64 \times 0 + 32 \times 0 + 16 \times 0 + 8 \times 0 + 4 \times 0 + 2 \times 1 + 1 \times 1 = 1923$ という STEC-POT スコアが得られる。各 STEC-POT スコアは、0 (0000000000) から 2047 (1111111111) の範囲内の数値で表現される (32)。

表 15 STEC-POT 法の代表株の結果と STEC-POT スコアへの変換例

| No. | Strain name | O | H | multi ORF No. | | | | | | | | | | | | | | Binary code | STEC_POT score |
|-----|-------------|-----|----|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|-------------|----------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | | |
| 1 | 13-198 | 157 | 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 11110000011 | 1923 |
| 2 | 13-199 | 157 | 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 11110000011 | 1923 |
| 3 | 13-200 | 157 | 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 11110000011 | 1923 |
| 4 | 13-163 | 157 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 00011100100 | 228 |
| 5 | 13-195 | 157 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 00011101100 | 236 |
| 6 | 02-051 | 157 | 7 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 00100101011 | 299 |
| 7 | 12-163 | 157 | 7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 11110110011 | 1971 |
| 8 | 12-164 | 157 | 7 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 01011100110 | 742 |
| 9 | 12-171 | 157 | 7 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 01110111001 | 953 |
| 10 | 12-101 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 01110101111 | 943 |
| 11 | 12-103 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 01110101111 | 943 |
| 12 | 12-117 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 01110101111 | 943 |
| 13 | 13-238 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 01011101001 | 745 |
| 14 | 13-240 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 01011101001 | 745 |
| 15 | 13-251 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 01011101001 | 745 |
| 16 | 08-011 | 26 | NM | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 00010101111 | 175 |
| 17 | 12-147 | 26 | 11 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 00010101101 | 173 |
| 18 | 13-154 | 26 | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 01010001000 | 648 |
| 19 | 08-014 | 111 | - | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 11010110100 | 1716 |
| 20 | 08-026 | 111 | - | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 11010110100 | 1716 |
| 21 | 08-027 | 111 | NM | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 11010110100 | 1716 |
| 22 | 10-086 | 111 | - | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 10011101110 | 1262 |
| 23 | 14-004 | 111 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 11110111100 | 1980 |
| 24 | PC | - | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 11111111111 | 2047 |

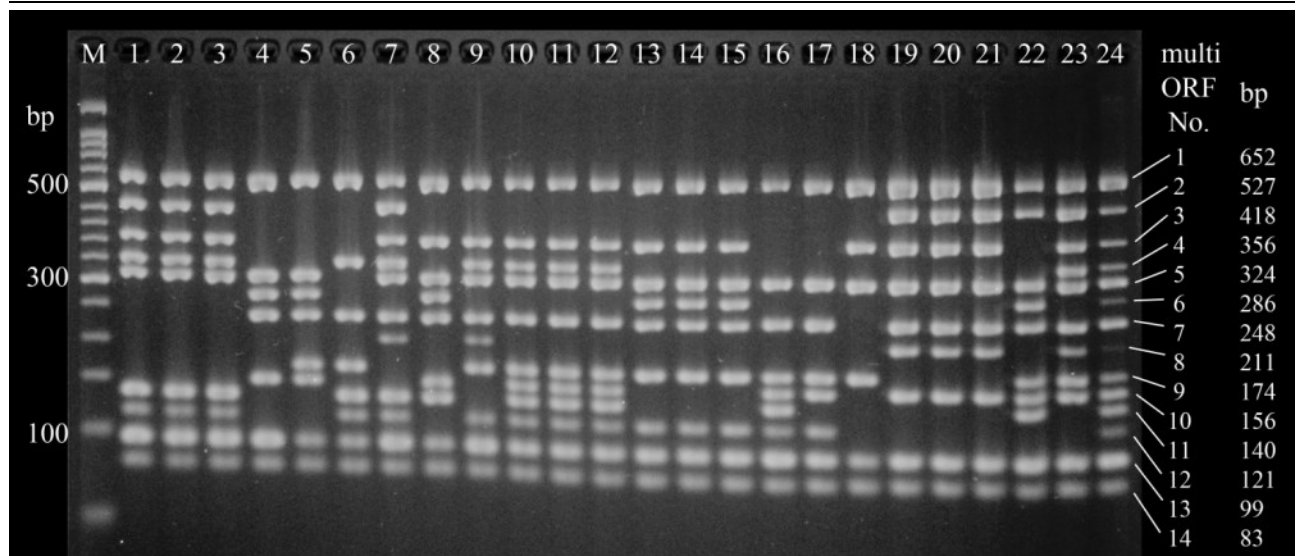


図 2 代表株と陽性対照の STEC-POT 法の泳動図

STEC-POT score は multi ORF number 2 から 12 によって作成する。multi ORF number 1 は大腸菌 識別マーカーであり、multi ORF number 13 は志賀毒素遺伝子、multi ORF number 14 はインチミン 遺伝子である。

M:50bp DNA Ladder (Dye Plus) (タカラバイオ株式会社) ; PC : 陽性対照

タイピングデータの比較

各血清型について STEC-POT スコアは BioNumerics ver.6.1 を使用して、PFGE 法と比較した。菌株識別能力を評価するために、血清型 O157 については互いに関連のない 2 株をタイピングした時に異なる株であると判定される確率である Simpson's index (D index) を Hunter と Gaston の式に従って STEC-POT 法と PFGE 法でそれぞれ計算した (42)。

(2) 結果

PFGE 法

STEC O157 52 株は PFGE 法で 26 遺伝子型に識別された。散発事例より分離されたと考えられる 44 株より求めた D index は 0.957 であった (図 3)。集団感染事例由来から分離された 4 株は、同一の PFGE 型を示した (図 3 ボックス内)。O26 40 株は PFGE 法において、13 遺伝子型に識別された (図 4)。集団感染事例由来から分離された 1 事例由来 16 株は同一の PFGE 型を示したが、1 事例由来 10 株では 2 つの PFGE 型に識別された (図 4 下段ボックス)。O111 は 5 遺伝子型に分類され、集団感染事例由来 5 株は同一の PFGE 型を示した (図 5 ボックス内)。

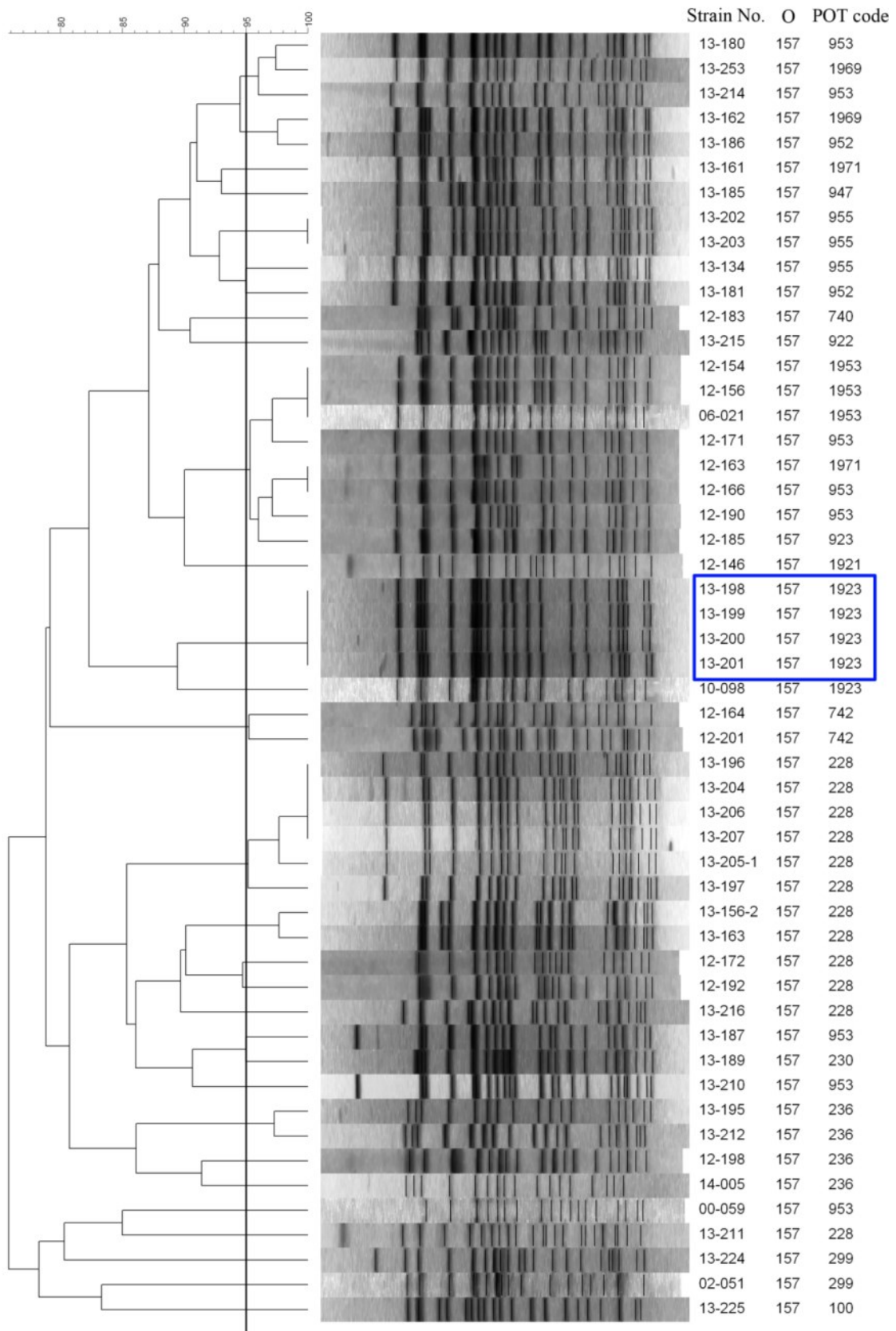


図3 0157 における PFGE 法のクラスター解析

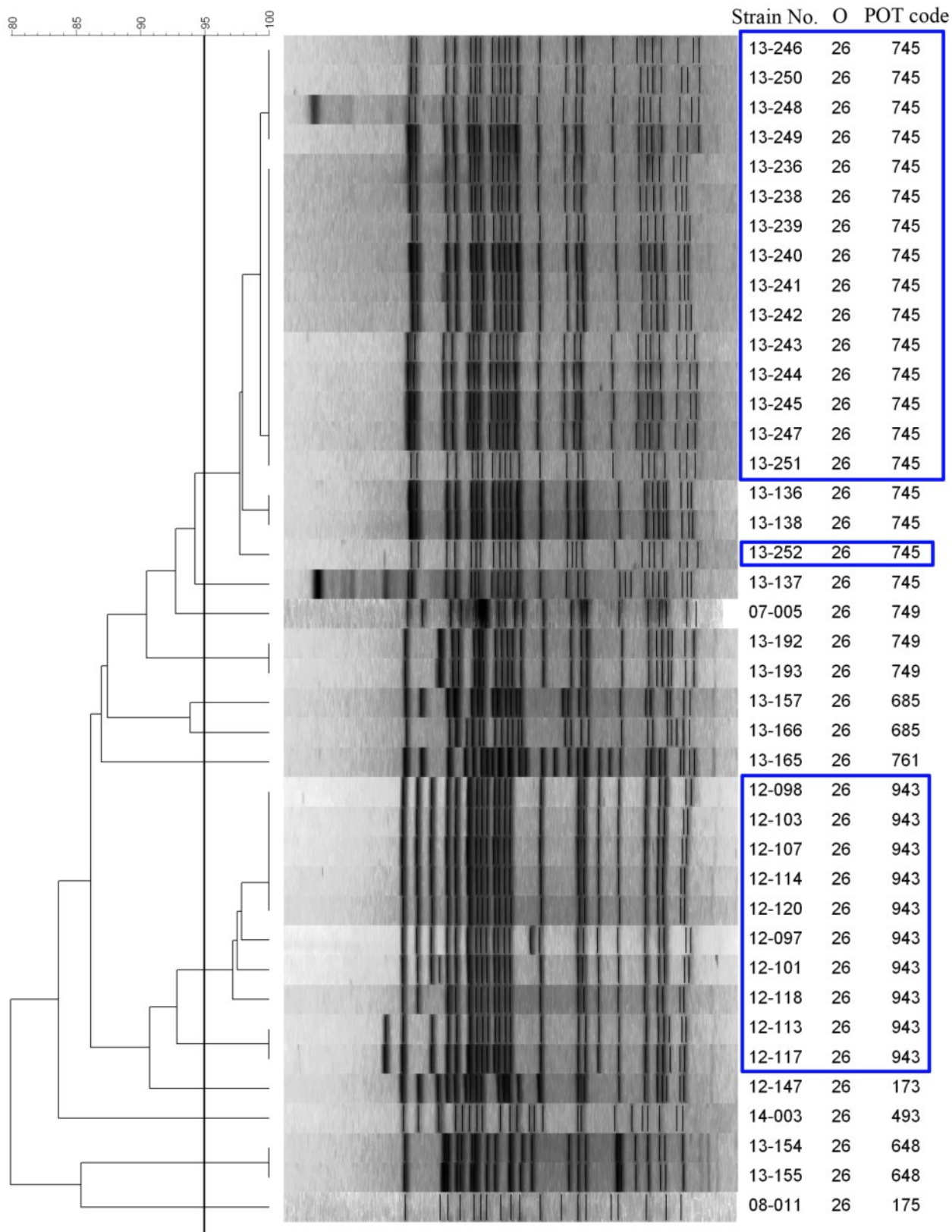


図 4 026 における PFGE 法のクラスター解析

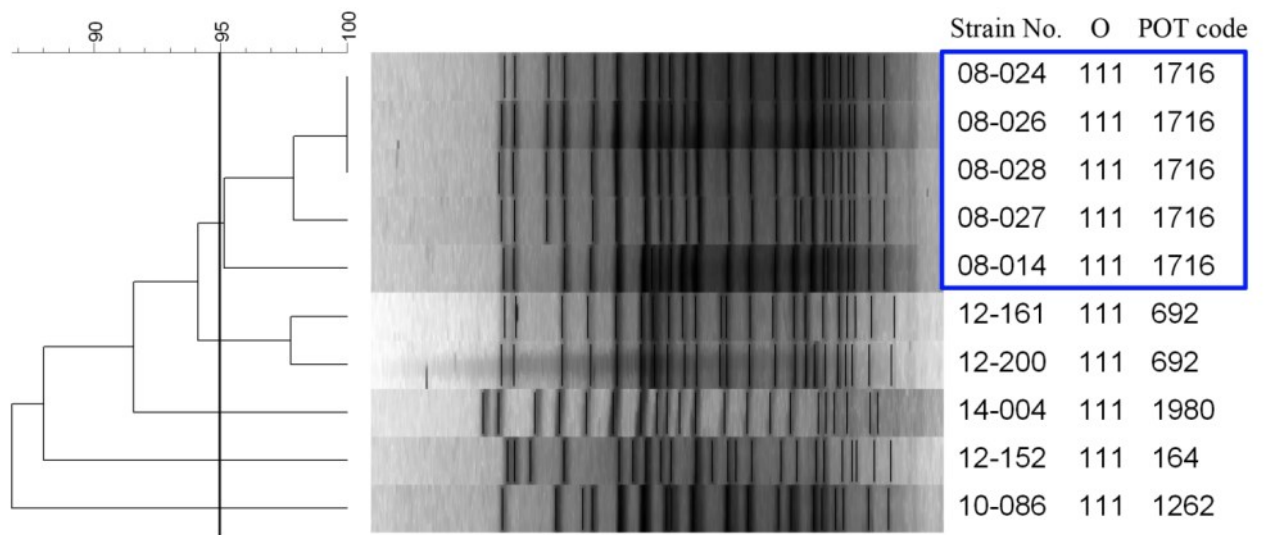


図5 O111 における PFGE 法のクラスター解析

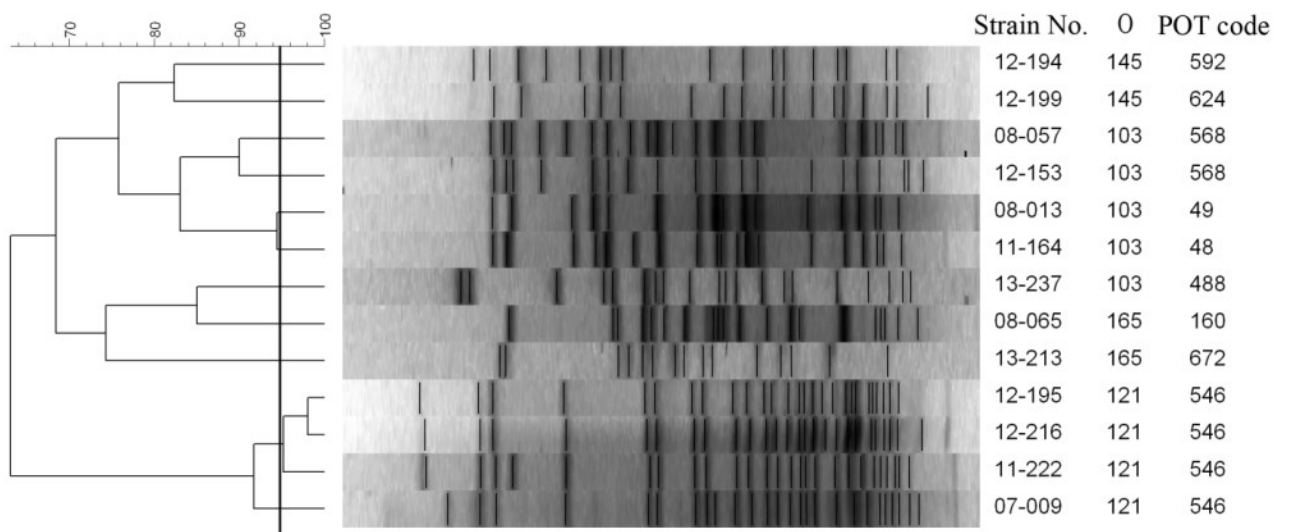


図6 O157、O26 及び O111 以外の腸管出血性大腸菌における PFGE 法のクラスター解析

STEC-POT 法

STEC115 株は STEC-POT 法において 41 遺伝子型に分類され、各血清型でスコアは独立であった（表 16）。血清型毎にみると O157 52 株は 18 遺伝子型に識別された。単一の株が含まれる STEC-POT スコアは 7 種類あり、STEC-POT スコア 228 となった株が 12 株と最も多く、次いで STEC-POT スコア 953 となった株（8 株）が多く分離された。O157 52 株中散発事例より分離されたと考えられる 44 株より求めた D index は 0.918 であった。

O26 は 9 遺伝子型、O111 は 5 遺伝子型に分類され、その他の血清型も今回使用した株は全て STEC-POT 法でタイピングが可能であった。集団感染事例由来から分離された O157 1 事例 4 株、及び O26 2 事例 26 株、O111 1 事例 5 株は、それぞれの事例で同一の STEC-POT スコアを示した（図 3, 4, 5 ボックス内）。

表 16 STEC-POT 法の結果

| POT score | O serotype | | | | | | | Total |
|-----------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| | 26 | 103 | 111 | 121 | 145 | 157 | 165 | |
| 49 | | 2 | | | | | | 2 |
| 100 | | | | | | 1 | | 1 |
| 162 | | | | | | | 1 | 1 |
| 164 | | | 1 | | | | | 1 |
| 173 | 1 | | | | | | | 1 |
| 175 | 1 | | | | | | | 1 |
| 228 | | | | | | 12 | | 12 |
| 230 | | | | | | 1 | | 1 |
| 236 | | | | | | 4 | | 4 |
| 299 | | | | | | 2 | | 2 |
| 488 | | 1 | | | | | | 1 |
| 493 | 1 | | | | | | | 1 |
| 544 | | | | 3 | | | | 3 |
| 546 | | | | 1 | | | | 1 |
| 571 | | 2 | | | | | | 2 |
| 592 | | | | | 1 | | | 1 |
| 624 | | | | | 1 | | | 1 |
| 648 | 2 | | | | | | | 2 |
| 674 | | | | | | | 1 | 1 |
| 685 | 2 | | | | | | | 2 |
| 692 | | | 2 | | | | | 2 |
| 740 | | | | | | 1 | | 1 |
| 742 | | | | | | 2 | | 2 |
| 745 | 19 | | | | | | | 19 |
| 749 | 3 | | | | | | | 3 |
| 761 | 1 | | | | | | | 1 |
| 922 | | | | | | 1 | | 1 |
| 923 | | | | | | 1 | | 1 |
| 943 | 10 | | | | | | | 10 |
| 947 | | | | | | 1 | | 1 |
| 952 | | | | | | 2 | | 2 |
| 953 | | | | | | 8 | | 8 |
| 955 | | | | | | 3 | | 3 |
| 1262 | | | 1 | | | | | 1 |
| 1716 | | | 5 | | | | | 5 |
| 1921 | | | | | | 1 | | 1 |
| 1923 | | | | | | 5 | | 5 |
| 1953 | | | | | | 3 | | 3 |
| 1969 | | | | | | 2 | | 2 |
| 1971 | | | | | | 2 | | 2 |
| 1980 | | | 1 | | | | | 1 |
| Total | 40 | 5 | 10 | 4 | 2 | 52 | 2 | 115 |

STEC-POT 法と PFGE 法の比較

STEC-POT 法と PFGE 法は各血清型において、おおよそ相関関係のある結果を示した (図 3-6)。菌株識別能は O157 では PFGE 法が高かったが、O26 や O111 では PFGE 法と同等の菌株識別能を示した。O157 において 2 株以上の株を含む PFGE 型は 10 個あり、そのうち 6 つの PFGE 型は STEC-POT スコアと一致し、残りの 4 つの PFGE 型には 2 から 4 種類の STEC-POT スコアを含んでいた。同一 PFGE 型で STEC-POT スコアが違う株は血清型 O157 でのみ見られ、O26 及び O111 では見られなかった。一方、同一 STEC-POT スコアで PFGE 型が異なる株は O157 では 8 個の STEC-POT スコア (STEC-POT スコア: 228、230、952、953、955、1969、1971) で、O26 では 4 個の STEC-POT スコア (STEC-POT スコア: 685、745、749、943) で見られた。O157 で分離割合が多かった STEC-POT スコア 228 (12 株) 及び 953 (8 株) に識別された株のみでクラスタ解析をすると、相同性はそれぞれ 82.43%、84.05%であった。

2-2-4 考察

これまでに STEC O157 の菌株識別法は種々開発されてきた (55)。近年、世界的に O157 以外の血清型の分離割合が増加してきており、全ての血清型の STEC の菌株識別を行える方法が求められていた。本研究で開発した STEC-POT 法は 11 個の ORF の有無による菌株識別法であり、O157 以外の腸管出血性大腸菌で多くを占める血清型である O26、O111、O103、O121、O145、O165 についても、PFGE 法と同等の菌株識別能を保持しつつ菌株識別が可能であった。PFGE 法の系統樹解析によると STEC-POT 法の菌株識別能力はおおよそ 85%の相同性なると考えられた。今回 PFGE 法の判定は相同性 95%で同じ菌株 (PFGE 型) として扱っているため、STEC-POT 法は PFGE 法よりも菌株識別能が劣る結果となったが、本来 PFGE 法の判定は疫学情報を加味した上で、バンドの差異によって判定する (54)。同一 STEC-POT スコアで PFGE 型が異なった株はバンドの差異は 4 本以内であり、これは疫学情報を加味した際には同一事例と判断できる差の内であった。そのため STEC-POT 法の D index はやや PFGE 法よりも低く

なったが、菌株識別能は同等だと考えられた。

また、腸管出血性大腸菌は、同一汚染食品が広範囲に流通した結果、一見散发事例と思われる同時多発的な集団事例 (diffuse outbreak) を起こすことも知られている (56、57)。今回供試した菌株は全て愛知県内で分離されており、分離日が近い株も存在するため、diffuse outbreak 由来の株も D index の算出に使用している可能性がある。そのため PFGE 法、STEC-POT 法ともに D index がやや低い数字 (D index 0.957、0.918) になったと考えられた。

O26 の集団感染事例由来株は STEC-POT 法では全て同一の株として識別されたが、PFGE 法では 1 つの事例は 2 つの遺伝子型に識別されてしまった。PFGE 法は数値化ができないため、目視によるバンドパターンの確認が必要となる。このような結果となった場合は菌株を並べての再泳動を行うのだが、PFGE 法の再泳動は時間がかかり、現実的ではない。また、STEC-POT 法は PFGE 法よりも迅速に結果を得られることで、警鐘を早期に鳴らすことができるため、集団発生事例の早期終息や diffuse outbreak の早期感知が期待できる。これらのことから、迅速に数値として結果を得ることができる STEC-POT 法はアウトブレイク調査において PFGE 法よりも優れていると考えられた。

今回使用した菌株では全て型別が可能であったが、O157、O26、O111 以外の血清型の腸管出血性大腸菌は供試株数が少なかったため、今後ウシやブタより分離された菌株や、さらなる多くの血清型で菌株識別が可能かを検討する必要があると考えられた。今回開発した STEC-POT 法は 1 系統のマルチプレックス PCR だけで菌株識別が可能な迅速、簡便なタイピング法である。今回調査した全ての血清型 (O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165) において菌株識別が可能であり、それぞれの血清型で PFGE 法と相関関係が見られた。また STEC-POT 法は全ての血清型において集団感染由来株で同一遺伝子型のみが確認できた。このように迅速性、簡便性に加え菌株識別能においても、PFGE 法と同等以上の結果が得られる STEC-POT 法は全ての血清型の腸管出血性大腸菌のアウトブレイクの際に第一選択として利用可能であり、今後、腸管出血性大腸菌のサーベイランス調査に使用できる有効な方法であると考えられた。

第3章 カンピロバクターの分子疫学解析法の研究

1節 諸言

日本において2003年以降カンピロバクター感染症は細菌性食中毒で最も発生件数が多い病原菌であり、そのうち *Campylobacter jejuni* が、約9割と大部分を占めている(43)。カンピロバクター感染症の感染ルートは、加熱が不十分な鶏肉、汚染された水や野菜の接触、または感染したヒト及びペットの糞便との接触によるものが多いとされる

(44)。これらのうち、家禽はヒトにおけるカンピロバクターの主な感染源であると考
えられている。しかし、カンピロバクター症のほとんどは散发事例であり、感染経路
を追跡することは難しい。

表現型及び遺伝子型タイピング方法は多くの場合、種や亜種レベルで細菌を区別し、
感染源や感染経路を特定するために使用されている。血清型別は良好な再現性を示し
ているが、高価な試薬を必要とし、型別不能株の割合が高いという問題点がある。

血清型別の型別能力が貧しいため、これまでに種々の *C. jejuni* の分子疫学解析法が
開発されてきた(45)。例えば、PFGE法は周知の技術であり、疾病管理予防センター
(CDC)によって、*C. jejuni* のサブタイピングのための標準化されたプロトコールの一
つが公開されている。PFGE法は *C. jejuni* を識別する非常に有用な方法であるが、時間
がかかること、手技が煩雑であること、低いスルーputレベル、および他施設との
比較が困難であることなどの課題がある(46)。さらに、いくつかの *C. jejuni* では、特
定の制限酵素で処理した際にDNAが分解してしまいPFGE法でタイピングができない
ことがある(47)。そのため、PFGE法は日常的に行われるサーベイランスでは使用さ
れていない。

PCR binary typing (P-BIT) 法は、近年報告されたカンピロバクターのためのタイピ
ング方法であり、PFGE法とほぼ同等の識別能を有している(47)。P-BIT法はカンピ
ロバクターのゲノム中に分布する18の変異要素(細胞表面、運動性、毒素産生に関与
する遺伝子等)の有無によるタイピング方法であり、これらの要素はコアゲノムの構

成要素ではなく、病原因子と関連しているとされる。Cornelius により報告された P-BIT 法は、18 モノプレックス PCR を用いて構築されている。

本研究では、P-BIT 法を低コストで簡便な方法へと変換するために、18 個のモノプレックス PCR から 2 系統のマルチプレックス PCR で検出を可能とするために改良を行った。その後、マルチプレックス P-BIT (mP-BIT) 法を PFGE 法の結果 (使用制限酵素は *SmaI* または *KpnI*) と比較をし、mP-BIT 法が地域的、時間的に離れた場所においても菌株識別能を維持しているか、また *C. jejuni* の日常的なサーベイランスとアウトブレイクの調査のために使用可能かを評価した。

2 節 カンピロバクターの分子疫学解析法の開発と評価

(1) 材料及び方法

使用分離株

2011 年から 2013 年の間、愛知県で分離された *C. jejuni* 65 株 (散発事例由来株 62 株、食中毒事例由来株 3 株) を用いた。

DNA 抽出

全ての株を、Tris-EDTA 緩衝液 100 μ L (pH8.0) に McFarland1 程度になるように懸濁し、10 分間 95 $^{\circ}$ C でインキュベートし、1 分間 16000 \times g で遠心分離した。上清を PCR のテンプレートとして使用した。

mP-BIT 法

モノプレックス PCR からマルチプレックス PCR へと改良を行うために、論文記載の 18 のプライマーセットのうち 7 つのプライマーを変更した(表 17) (47)。

表 17 マルチプレックス P-BIT 法で使用したプライマー

| Primer mixture number | ORF number | target gene | PCR amplicon size(bp) | coefficient | Forward primers | Reverse Primers | Reference |
|-----------------------|------------|--------------------|-----------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|------------|
| mix1 | 1 | CJE1500 | 545 | 256 | ACGATTTCGTTTTCCCTAAACTC | AGGACTAAAATCCCCATAAGGATAA | 47 |
| | 2 | CJE1733 | 447 | 128 | GATGTATCCGCCTTTGGCTA | GGGTTCTTGTATATAAGCCCAT | 47 |
| | 3 | <i>virB8/comB1</i> | 345 | 64 | AATGGATATGAGAGCCGATGA | AGTCCATTGGTATAAAATCAAAAA | this study |
| | 4 | Cj1135 | 303 | 32 | TTAGAATTTGCAAAACGCAAAG | ATCTTCCCTACCCAGCCTA | 47 |
| | 5 | Cj1136 | 252 | 16 | TGGTTTGACCATGCTTGATTT | CAAAACCATGCCAAAATGAA | 47 |
| | 6 | <i>cfrA</i> | 203 | 8 | AGCAGGGATAAGCCCTCTTG | AGCGATCTATTTGCCAYTCG | 47 |
| | 7 | Cj0265 | 175 | 4 | AAGCGAAAATAACAGGGTTTTGC | GCTTACCTTATCCCATTTGCCA | 47 |
| | 8 | <i>maf5/pseE</i> | 146 | 2 | TTGGGGCTAGACGATTATGG | TGAGAATGTGTTTGCCCATC | this study |
| | 9 | Cj0008 | 100 | 1 | AGTCCTGAAGCGTTTGCTGT | TATATGCGGACTCTGGATGC | this study |
| | 10 | <i>hipO</i> | 76 | - | GGAAAAACAGGYGTTGTGG | CATCCATATCTGCACGAAGTC | this study |
| mix2 | 1 | <i>cgtA</i> | 555 | 256 | CCTTTGAATCCTTGGGCTTT | TGAAGAAAAACTTGTGTTTGTGTCT | 47 |
| | 2 | <i>tetO</i> | 448 | 128 | TTTCCCGTTTATCACGGAAG | CAAGCAATATTTCCCGCTGT | 47 |
| | 3 | <i>flgE2</i> | 354 | 64 | TAACGCGAAAGGAC AAGGAC | TCTGTAGTACCATCGGCATTATC | this study |
| | 4 | <i>gmhA2</i> | 289 | 32 | TAGCAGGAAATGGTGGCAGT | GCTTGCAAGAAAAACCTTTACC | this study |
| | 5 | Cj1321 | 249 | 16 | TTTATACATCCTCAATCTTTTGTTC | GCAAGGCAACAGGCTAATC | 47 |
| | 6 | <i>wlaN</i> | 209 | 8 | AGCATTAGAAAGTTGCATTAACCA | AAAACATGATATAAGGTGAAGTTGC | this study |
| | 7 | <i>panB</i> | 181 | 4 | ATGGATGAAATGTTGATTTTTACC | CGATTTCTATACCCCTTCCA | this study |
| | 8 | Cj0423 | 148 | 2 | GCAAGTGGCGGGTCTATTT | CAAGCCAAACAATAATAGTCCAA | 47 |
| | 9 | Cj0122 | 103 | 1 | CGAGGGTTCATAGAAGATAAGC | CCAACGAGGGTGTITAGCAT | this study |
| | 10 | <i>hipO</i> | 76 | - | GGAAAAACAGGYGTTGTGG | CATCCATATCTGCACGAAGTC | this study |

代表分離株 8 株の P-BIT 型は、論文記載のプライマーを用いてモノプレックス PCR で確認した。モノプレックス PCR は PCR 反応緩衝液 (Mg^{2+} 1.5 mM)、dNTP(それぞれ 0.2 mM)、2 pmol の各プライマー、0.4 単位の *Taq* DNA ポリメラーゼ (コスモバイオ社) 及びテンプレート 2 μ L を含む総容量 20 μ L の系で行った。PCR の反応条件は 94 $^{\circ}$ C での熱変性を 1 分間、60 $^{\circ}$ C でのアニーリングを 1 分間、72 $^{\circ}$ C での伸長反応を 1 分間、これを 1 サイクルとし、35 サイクルで行った。その後、サンプルがサーマルサイクラーから除去されるまで 4 $^{\circ}$ C で保持した。PCR 産物は 2% アガロースゲル (タカラバイオ株式会社) を用いて 0.5 \times TBE 中 100 V で 30 分間電気泳動した後、UV トランスイルミネーター下で臭化エチジウムにより可視化した。

結果を比較した後、マルチプレックス PCR 用プライマー及び *C. jejuni* の陽性対照として馬尿酸分解酵素をコードする遺伝子 (*hipO* 遺伝子) のプライマーを各プライマーの最終濃度が 0.2 μ M となるように混合した(表 17)。マルチプレックス PCR は QIAGEN マルチプレックス PCR キット (Qiagen 社、東京、日本) を用いて取扱説明書に従って行った。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C で 15 分間、初期変性の後、94 $^{\circ}$ C での熱変性を 15 秒間、60 $^{\circ}$ C でのアニーリングを 90 秒間、72 $^{\circ}$ C での伸長反応を 90 秒間、これを 1 サイクルとし、

30 サイクル反応させ、72 °Cで 10 分間の最終伸長を行った。サンプルがサーマルサイクラーから除去されるまで 4 °Cで保持した。PCR 産物は、4%アガロースゲル (KANTO HC、関東化学株式会社) を用いて、0.5×TBE 中 120 V で 60 分間電気泳動した。2 系統のプライマーミックスによる PCR の結果は、それぞれ、アンプリコンの有無に応じて 1 または 0 でスコア化した。菌株識別を容易にするために、作成したバイナリーコードは、係数を乗じて 10 進数に変換した (mP-BIT スコア) (表 17, 18、図 7)。mP-BIT スコアは 0-0 (000000000-000000000) から 511-511 (111111111-111111111) の範囲内の数値で表現される(32)。

表 18 代表 11 株の結果と mP-BIT スコアへの変換例

| Isolate No. | ORF number (mix1) | | | | | | | | | | ORF number (mix2) | | | | | | | | | | Binary code | mP-BIT score |
|-------------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|---------------------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| CJ13A-1-1 | - | + | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + | 010001010-010110111 | 138-183 |
| CJ13A-2-2 | - | + | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + | - | + | + | + | + | 010001010-010110111 | 138-183 |
| 3302 | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | 110001000-100100100 | 392-292 |
| 3311 | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 000111110-011111111 | 62-255 |
| 3317 | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + | - | + | - | - | + | + | + | + | 010001000-010100111 | 136-167 |
| 3325 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | 000001111-110110111 | 15-139 |
| 3330 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + | + | + | - | - | + | - | - | + | 000001000-011100100 | 8-228 |
| 3344 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + | + | 001001111-000110111 | 79-55 |
| 3352 | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + | + | + | + | 000001010-010111111 | 10-191 |
| 3395 | - | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | 010111010-100110100 | 186-308 |
| 3398 | + | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | + | - | + | + | 110001000-000100101 | 392-37 |

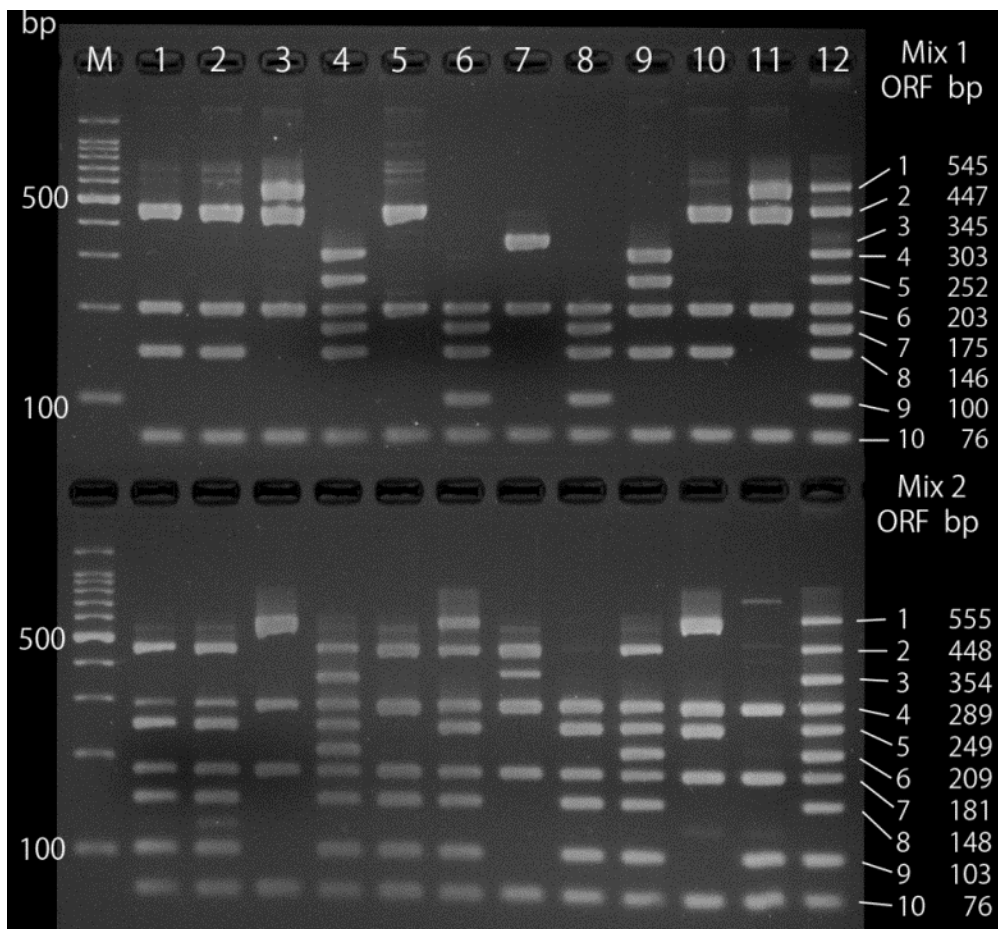


図 7 代表 11 株と陽性対照の mP-BIT 法の泳動図

mP-BIT score は Mix1 及び Mix2 の ORF 1 から 9 によって作成する。ORF 10 は *C. jejuni* のマーカーである。Lane1 から Lane11 は表 18 の検体であり、Lane12 は陽性対照である。

M:100bp DNA Ladder (Dye Plus) (タカラバイオ株式会社)

PFGE 法

PFGE 法は、基本的には松本らの方法に従って行った (43)。制限酵素は *SmaI* または *KpnI* を用い、6 V/cm で 20 時間泳動した。スイッチング時間は *SmaI* を使用した際には 6.8 秒から 38.4 秒、*KpnI* を使用した際には 5.2 秒から 42.3 秒とした。*SmaI* または *KpnI* をそれぞれ単独で使用した PFGE パターンに加え、*SmaI* と *KpnI* を組み合わせた分析 (*SmaI*/*KpnI* 遺伝子型) も行った。*SmaI*、*KpnI* 及び *SmaI*/*KpnI* 遺伝子型での系統樹は BioNumerics ver.6.1 (Applied Maths NV) を用いて作成した。ペアワイズ比較はダイスの相関係数を用いて行い、UPGMA クラスターリングアルゴリズムを用いてクラスター分析を行った。バンド分析のための optimization 及び position tolerance を 1% に、PFGE 分析の相同性についてのカットオフ値を 90% に設定した (48)。

タイピングデータの比較

mP-BIT のデータは BioNumerics ver.6.1 を使用して、PFGE 法と比較した。菌株識別能力を評価するために、互いに関連のない 2 株をタイピングした時に異なる株であると判定される確率である Simpson's index (D index) を Hunter と Gaston の式に従って計算した (42)。

(2) 結果

mP-BIT 法

代表分離株 8 株では、論文記載のプライマーを用いたモノプレックスの PCR と今回作成したプライマーを用いたマルチプレックス PCR で同様の結果が得られた。散发事例由来 62 株は 40 mP-BIT タイプに識別された (表 19、図 8)。このうち、27 タイプは単一の *C. jejuni* が含まれ、mP-BIT スコアが 15-55 に識別された株が 6 株と最多であった (表 19)。mP-BIT 法の D index は 0.980 であった。食中毒事例由来から分離された 3 株は、同じ mP-BIT スコアを示した (CJ13A-1-1、CJ13A-1-2、CJ13A-2-2、mP-BIT スコア : 138-151) (図 8 ボックス内)。

表 19 散発事例由来 62 株の mP-BIT 法の結果

| mP-BIT score | Number of isolates |
|-----------------------|--------------------|
| 15-55 | 6 |
| 62-127 | 4 |
| 15-439 | 3 |
| 62-255 | 3 |
| 0-260 | 3 |
| 11-183 | 2 |
| 11-55 | 2 |
| 126-127 | 2 |
| 138-55 | 2 |
| 186-159 | 2 |
| 58-191 | 2 |
| 58-239 | 2 |
| 62-191 | 2 |
| Others ^(a) | 27 |

(a)Othersにはそれぞれ1株ずつ27のmP-BITスコアが含まれている

PFGE 法

散発事例由来 62 株は、*Sma*I を用いた PFGE 法で 40 遺伝子型 (D index 0.975)、*Kpn*I を用いた PFGE 法で 42 遺伝子型 (D index 0.987) に識別された。*Sma*I と *Kpn*I を組み合わせた分析では 48 *Sma*I/ *Kpn*I 遺伝子型、D index 0.990 となった (図 7)。48 *Sma*I/ *Kpn*I 遺伝子型のうち 39 *Sma*I/ *Kpn*I 遺伝子型が、単一の分離株を含んでいた。5 つの *Sma*I/ *Kpn*I 遺伝子型は 3 株、4 つの *Sma*I/ *Kpn*I 遺伝子型は 2 株の分離株を含んでいた。食中毒事例由来から分離された 3 株は、同一の PFGE パターンを示した (CJ13A-1-1、CJ13A-1-2、CJ13A-2-2) (図 8 ボックス内)。

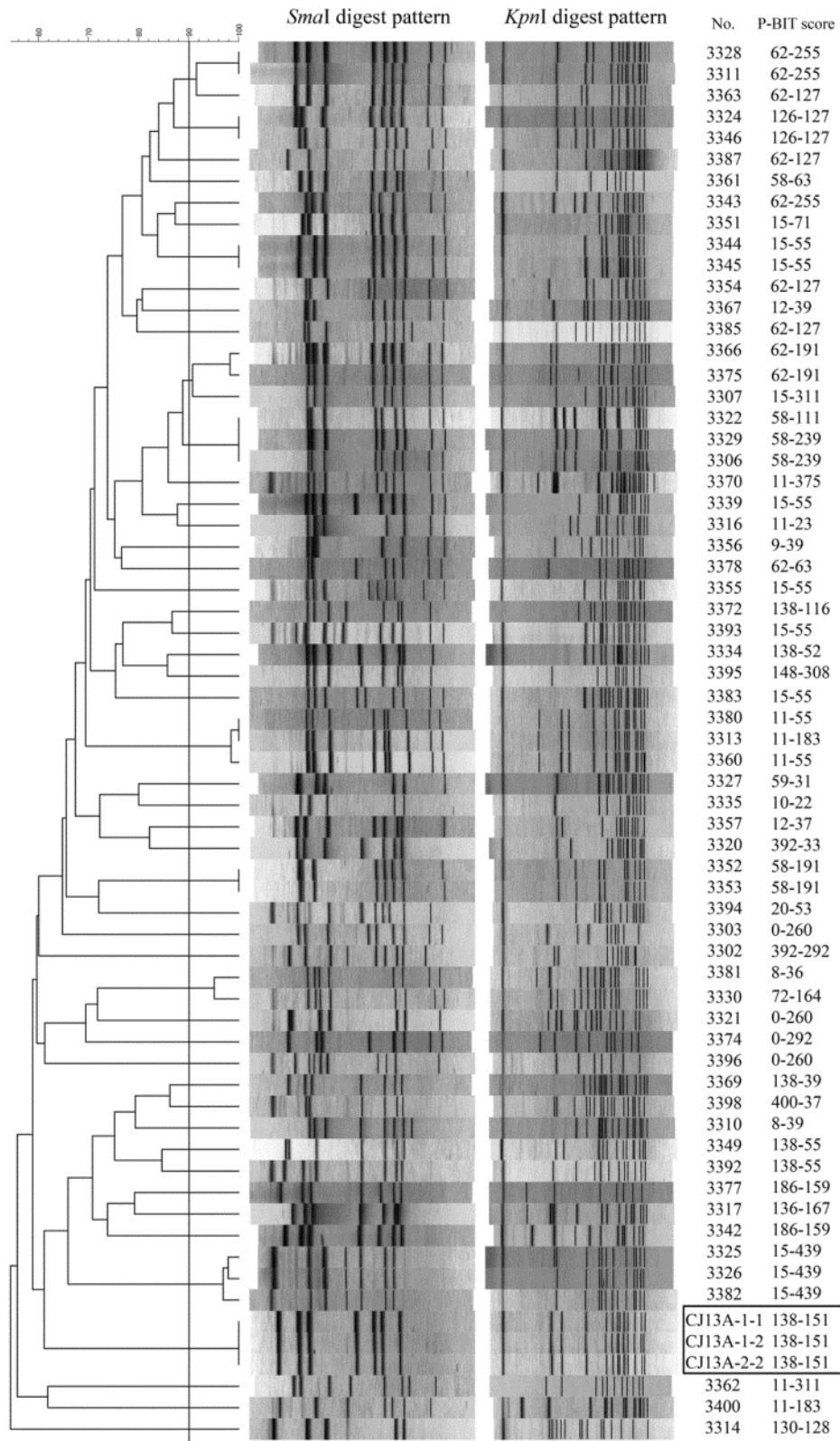


図 8 *Sma*I / *Kpn*I 遺伝子型を用いた PFGE 法のクラスター解析

mP-BIT 法と PFGE 法の比較

mP-BIT 法と PFGE 法はおおよそ相関関係のある結果を示した。mP-BIT 法の識別能力 ($D=0.980$) は、*SmaI* ($D=0.975$)、または *KpnI* ($D=0.987$) を単独使用した PFGE 法と同等の菌株識別能を示した。9 つの *SmaI/ KpnI* 遺伝子型は、複数の分離株を含んでおり、そのうち 4 つの *SmaI/ KpnI* 遺伝子型は mP-BIT タイプと一致した。残りの 5 つの *SmaI/ KpnI* 遺伝子型のうち 3 つは単一の標的遺伝子 (*tetO* 遺伝子) のみ異なる 2 つの mP-BIT タイプを含んでいた。一方で 3 つの mP-BIT スコアに識別された 13 株 (mP-BIT スコア : 62-127、4 株、mP-BIT スコア : 62-255、3 株、mP-BIT スコア : 15-55、6 株) は異なる *SmaI/ KpnI* で遺伝子型を示した。この 3 つの mP-BIT タイプの分離株の *SmaI/ KpnI* 遺伝子型における相同性は、それぞれ 77.94%、80.96% 及び 77.13% であった。

3 節 考察

PFGE 法の課題の解決を目的とする新規 PCR タイピング方法には、comparative genomic fingerprinting (CGF) 法や P-BIT 法が開発されている(46, 47, 49)。これらのバイナリータイピング法は細菌遺伝子の有無を調べることによるタイピング法であり、短時間かつ低コストで実行でき、菌株識別能力が高く、データベース作成が簡単であるといった利点がある。

バイナリータイピング法の一つである CGF 法は、高い菌株識別力 (D index 0.994) を示すが、実施には 5 プレックス PCR を 8 反応も行われなければならない (49)。Cornelius らが報告した P-BIT 法は *C. jejuni* ゲノムの比較分析によって 68 個の ORF を抽出し、菌株識別を行う方法である。最終的には 18 個の ORF まで絞られたが、検出はモノプレックス PCR によるものであった (46)。これらの PCR タイピング法は手間や時間がかかるため、本研究では P-BIT 法に 2 点の改良を加えた。まず、マルチプレックス PCR システムを構築することを可能にするために、P-BIT 法の一部のプライマーを変更した。このマルチプレックス PCR システム、mP-BIT 法は、96 ウェル PCR プレー

トを使用して、一度に48株までテストすることができるため、非常に効率的となった。さらに *C. jejuni* のマーカーとして *hipO* 遺伝子を検出するプライマーを組み込み、菌株識別と同時に *C. jejuni* の菌種同定を可能にした。オリジナルの P-BIT 法は *C. jejuni* と *Campylobacter coli* の両方の遺伝子型を決定することができるが、菌種のマーカー遺伝子は含まれていないため、種を区別するには追加の検査を必要とする (47)。本研究では、代表株においてオリジナルの P-BIT 法と mP-BIT 法で同じ結果を得た。したがって、mP-BIT 法は、迅速、かつ簡便で容易であり、マルチプレックス PCR システムになったことにより、低コストで行うことができるようになる。言い換えれば、mP-BIT 法は所要時間、簡便さ、およびコストに関して *C. jejuni* の他の PCR タイピング方法よりも優れていると考えられる。

また、mP-BIT 法は *SmaI* または *KpnI* を単独使用した PFGE 法と同等の菌株識別能を持っており、異なる地域や異なる時系列の株においても菌株識別能が保持されていた。*SmaI/ KpnI* 遺伝子型における系統樹解析によると、mP-BIT 法の菌株識別能力は約 80% 程度の相同性になると考えられる。*C. jejuni* の PFGE 法を CDC プロトコールで行う際、制限酵素の第一選択は *SmaI* であり、*KpnI* は第二選択の制限酵素として推奨されている。したがって、mP-BIT 法は *SmaI* または *KpnI* を単独使用した PFGE 法と同等の菌株識別能を有しているため、集団発生時に迅速に結果を提供するために、より効果的に使用することができると考えられる。

mP-BIT 法に含まれている 2 つの標的遺伝子 (*tetO* 遺伝子、*virB8/ comB1* 遺伝子) はプラスミド上にコードされている。 散発事例由来 62 株における *tetO* 遺伝子、及び *virB8/ comB1* 遺伝子の保有率は、それぞれ 33.8% (22/62)、4.6% (3/62) であった。プラスミド上にコードされた遺伝子は、長期間のサーベイランスにおいてプラスミドの脱落により失われる危険性がある。*tetO* 遺伝子は、プラスミド損失が起こりにくいような短期の疫学的研究においては重要なマーカーであると考えられていた (47)。また、GenBank に登録されているプラスミドのうち、1 つのプラスミドにしか *virB8/ comB1* 遺伝子は登録されておらず、*C. jejuni* はこの遺伝子をあまり保有していないと考えられ

ていた (47)。しかし、今回の研究では短期間における散発事例より分離された *C. jejuni* の中で *tetO* 遺伝子、または *virB8/ comB1* 遺伝子が唯一の差異となっている株がみられた。そのため、プラスミド上にコードされている *tetO* 遺伝子、及び *virB8/comB1* 遺伝子は、疫学的マーカーのために適切であるかどうかをさらに検討する必要性がある。

今回作成した mP-BIT 法は P-BIT 法の 18 の標的遺伝子を 2 系統のマルチプレックス PCR システムに組みこんだものである。18 のモノプレックス PCR を 2 系統のマルチプレックス PCR へと変換することで、mP-BIT 法は簡便、迅速、かつ効率的な *C. jejuni* の菌株識別方法となった。mP-BIT 法は *C. jejuni* の第一選択として利用可能なタイピング法であり、今後の *C. jejuni* のサーベイランスやアウトブレイクの調査のために使用することができると考えられた。

第 4 章 総括

今回の研究では選択した ORF の有無をマルチプレックス PCR で増幅した後、増幅産物の塩基配列を決定することなく、通常の電気泳動により遺伝子産物の泳動パターンを比較することによる 3 種類の迅速かつ簡便な菌株識別法を開発した。開発した方法は実際の臨床分離株を用いて、実際の現場で使用可能かの評価を行った。

1. 大腸菌のクローン大別法 (Islet Pattern 法 : IP 法)

IP 法は 1 系統のマルチプレックス PCR で genomic islet を構成する ORF の有無を検出し、数値化することでシーケンス解析なしに大腸菌のクローン大別をする方法である。全てのクローンを識別することはできないが、感染症を引き起こす可能性のあるクローンや ESBL 産生菌として蔓延しているクローンの識別が IP 法の開発により既存のクローン大別法である MLST 法に比べ短時間、低コストで実現可能となった。さらに、IP 法はクローン大別と同時に phylogenetic group も決定することができるため、IP 法を行うことで MLST 法よりも多くの菌株解析情報を得ることができるようになった。MLST 法よりも短時間・低コストでより多くの分子疫学解析情報を取得でき、でーたの持ち運びも容易な IP 法は大腸菌のクローン大別法として有効な方法で考えられた。

2. 腸管出血性大腸菌の菌株識別法 (STEC PCR based ORF typing 法 : STEC-POT 法)

STEC-POT 法は 1 系統のマルチプレックス PCR で genomic island を構成する ORF の有無を検出し、数値化することによる STEC の菌株識別法である。実際の臨床分離株 (O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165) を用いた実験の結果より、調査した全ての血清型において菌株識別が可能であった。また、STEC の菌株識別に一般的に使用される PFGE 法と相関関係が見られ、集団感染由来株で同一遺伝子型のみが確認できた。さらに、STEC-POT 法は PFGE 法と異なり、結果を数値として迅速に得ることができる。そのため、他施設との比較が容易となり、diffuse outbreak のような広域で

発生している集団発生を早期に検知可能である。PFGE 法よりも短時間かつ容易に結果を得ることができ、データの比較・共有が容易な STEC-POT 法は STEC のアウトブレイク調査に利用可能な方法であると考えられた。

3. カンピロバクターの菌株識別法（マルチプレックス P-BIT 法：mP-BIT 法）

mP-BIT 法は 18 のモノプレックス PCR を 2 系統のマルチプレックス PCR へと改良した方法である。実際の臨床分離株を用いた実験の結果より、mP-BIT 法と PFGE 法はおおよそ相関関係のある結果を示しており、識別能力（D index 0.980）は、*SmaI*（D index 0.975）、または *KpnI*（D index 0.987）を単独使用した PFGE 法と同等の菌株識別能を示した。さらにはさらに *C. jejuni* のマーカーとして *hipO* 遺伝子を検出するプライマーを組み込み、菌株識別と同時に *C. jejuni* の菌種同定を可能にした。PFGE 法よりも簡便、迅速、かつ効率的な菌株識別法である mP-BIT 法は今後の *C. jejuni* のサーベイランスやアウトブレイクの調査のために使用することができる方法であると考えられた。

これらの方法は全て特殊な装置を必要とせず、上記に示したようにこれまでに使用されていたクローン大別法及び菌株識別法よりもコスト・時間を大幅に削減することができる新規の分子疫学解析法である。また、本研究で開発した方法は全て結果を数値化することで他施設との比較が簡単に行えるようになっている。これは 1 章にあげた新規分子疫学解析法に求められる 5 点の要求をみたすものである。

新規分子疫学解析法を利用することにより、集団感染等の早期感知が可能になることが期待される。また、開発法は得られた情報の共有・集積が簡便であるため、集団感染調査だけでなくサーベイランス調査にも利用可能である。サーベイランス調査による菌株情報の集積がスムーズになることで、食中毒や感染症の予防として活用されるようになることが期待される。

今回、開発した大腸菌のクローン大別法及び腸管出血性大腸菌の菌株識別法はその有用性が認められ、愛知県と中部大学との共同特許として出願した（「大腸菌の遺伝子

型タイピング法及びこれに用いるプライマーセット（特願 2014-175414）」)。また 2014 年 12 月現在、1 社より実施許諾申請があり、今後商品化されることが見込まれる。商品化されることにより、試薬の組成変動による誤判定の減少し、利用施設が増加していくと思われる。そのため今回開発した IP 法及び STEC-POT 法は今後、大腸菌の分子疫学解析法の第一選択となると考えられる。

また、赤痢やコレラといった腸管病原菌は現在の日本では分離件数が減少しているが、世界的には猛威を振るっている国も存在する。今回の研究で得た知見をもとに、分子疫学解析法及び公衆衛生の発展のために、さらなる腸管病原菌の菌株識別法を開発が可能であると考えられる。

参考文献

1. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, Clin Microbiol Rev., 2:15-38, 1989.
2. Nachamkin I, Szymanski CM, Blaser MJ. *Campylobacter*, 3rd ed. ASM Press, Washington DC, 2008.
3. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion, Clin Microbiol Rev., 21:134-156, 2008.
4. 吉田眞一 A. ビブリオ属, 戸田新細菌学改訂 34 版 (吉田眞一、柳雄介、吉開泰信編), 南山堂, 東京, 352-364, 2013.
5. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States, Emerg Infect Dis., 7:382-389, 2001.
6. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18:6531-6535, 1990.
7. Riley, LW. Molecular epidemiology of infectious diseases principles and practices, ASM Press, Washington DC, 2004.
8. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M, Kersters K., Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy.

Microbiology., 142:1881-1893, 1996.

9. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M ., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23:4407-4414, 1995.

10. Stern MJ, Ames GF, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF., Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37:1015-1026, 1984.

11. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR., Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831, 1991.

12. Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Iyoda S, Watanabe H, Hayashi T., Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J Clin Microbiol.*, 47:2888-2894, 2009.

13. Mainil JG, Bardiau M, Ooka T, Ogura Y, Murase K, Etoh Y, Ichihara S, Horikawa K, Buvens G, Piérard D, Itoh T, Hayashi T., Typing of O26 enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from humans and cattle with IS621 multiplex PCR-based fingerprinting. *J Appl Microbiol.*, 111:773-786, 2011.

14. Jolley KA, Maiden MC., BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level., *BMC Bioinformatics*, 11:595, 2010.

15. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC., mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases., BMC Bioinformatics 5:86, 2004.
16. Spratt BG, Hanage WP, Li B, Aanensen DM, Feil EJ., Displaying the relatedness among isolates of bacterial species - the eBURST approach., FEMS Microbiol Lett. 241:129-134, 2004.
17. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG, eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data., J Bacteriol. 186:1518-1530, 2004.
18. National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare, Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Japan, Infect. Agents Surveillance Rep., 33, 1-3, 2012.
19. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N., CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe., J Antimicrob Chemother. 59:165-174, 2007.
20. Cosgrove SE., The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs., Clin Infect Dis. 42 Suppl 2:S82-89, 2006.
21. Tumbarello M, Spanu T, Di Bidino R, Marchetti M, Ruggeri M, Treccarichi EM, De Pascale G, Proli EM, Cauda R, Cicchetti A, Fadda G., Costs of bloodstream infections caused by

Escherichia coli and influence of extended-spectrum- β -lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy., *Antimicrob Agents Chemother.* 54:4085-4091, 2010.

22. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M., Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective., *Mol Microbiol.*, 60:1136-1151, 2006.

23. Jaureguy F, Landraud L, Passet V, Diancourt L, Frapy E, Guigon G, Carbonnelle E, Lortholary O, Clermont O, Denamur E, Picard B, Nassif X, Brisse S., Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains., *BMC Genomics.*, 26:560, 2008.

24. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E., Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group., *Appl Environ Microbiol.*,66:4555-4558, 2000.

25. Ciccozzi M, Giufre' M, Accogli M, Lo Presti A, Graziani C, Cella E, Cerquetti M., Phylogenetic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* clones isolated from humans and poultry., *New Microbiol.*, 36:385-394, 2013.

26. Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, Yagi M, Nishio T, Kanda T, Kawamori F, Sugiyama K, Masuda T, Hara-Kudo Y, Ohashi N., Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals., *J Vet Med Sci.*, 74:189-195, 2012.

27. Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, Yagi T, Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Ishikawa S, Kato H, Ozawa Y, Shibayama K, Kai K, Konda T, Arakawa Y., PCR classification

of CTX-M-type β -lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative bacilli in Japan., *Antimicrob Agents Chemother.*, 50:791-795, 2006.

28. Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J., Extended-spectrum β -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands., *Emerg Infect Dis.*, 17:1216-1222, 2011.

29. Tham J, Walder M, Melander E, Odenholt I., Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria in food., *Infect Drug Resist.*, 5:143-147, 2012.

30. Randall LP, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ., Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum β -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009., *J Antimicrob Chemother.*, 66:86-95, 2011.

31. Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D, Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG., Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production., *Appl Environ Microbiol.*, 77:3715-3719, 2011.

32. Suzuki M, Tawada Y, Kato M, Hori H, Mamiya N, Hayashi Y, Nakano M, Fukushima R, Katai A, Tanaka T, Hata M, Matsumoto M, Takahashi M, Sakae K., Development of a rapid strain differentiation method for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Japan by detecting phage-derived open-reading frames., *J Appl Microbiol.*, 101:938-947, 2006.

33. Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Hayakawa Y, Minagawa H., Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets., J Appl Microbiol., 107:1367-1374, 2009.
34. Suzuki M, Hosoba E, Matsui M, Arakawa Y., New PCR-based open reading frame typing method for easy, rapid, and reliable identification of *Acinetobacter baumannii* international epidemic clones without performing multilocus sequence typing., J Clin Microbiol., 52:2925-2932, 2014.
35. Maheux AF, Picard FJ, Boissinot M, Huppé V, Bissonnette L, Bernier JL, Cantin P, Huletsky A, Bergeron MG., Analytical limits of three β -glucosidase-based commercial culture methods used in environmental microbiology, to detect enterococci., Water Sci Technol. , 60:943-955, 2009.
36. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、倉根隆一郎、腸管病原性 *Escherichia* 属の簡便な同定鑑別法の開発、第 66 回日本生物工学会大会講演要旨集、107、2014.
37. Novais Â, Sousa C, de Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, Coque TM, Cantón R, Peixe L., MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393)., Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 33:1391-1399, 2014.
38. Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K., Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996., Lancet., 348:831-832, 1996.

39. Watahiki M, Isobe J, Kimata K, Shima T, Kanatani J, Shimizu M, Nagata A, Kawakami K, Yamada M, Izumiya H, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Mitobe J, Terajima J, Ohnishi M, Sata T., Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan., *J Clin Microbiol.*, 52:2757-2763, 2014.
40. Isobe J, Shima T, Kanatani J, Kimata K, Shimizu M, Kobayashi N, Tanaka T, Iyoda S, Ohnishi M, Sata T, Watahiki M., Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157., *J Clin Microbiol.*, 52:1112-1118, 2014.
41. 飯島義雄、坂本裕美子、綿引正則、大西貴弘、五十君静信、事例に学ぶ細菌学、日本細菌学雑誌、69(2):349-355, 2014.
42. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity., *J Clin Microbiol.*, 26:2465-2466, 1988.
43. Matsumoto M, Hiramatsu R, Yamada K, Suzuki M, Miwa Y, Yabutani M, Nagai Y, Tsuchiya M, Noda M, Nagata A, Kawakami K, Shima T, Tatsumi N, Minagawa H., Phenotypic and genetic analyses of *Campylobacter jejuni* Lior serotype 76 isolated from chicken meat and clinical specimens., *Jpn J Infect Dis.*, 66:72-75, 2013.
44. Eberle KN, Kiess AS. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry., *Poult Sci.*,91:255-264, 2013.
45. Taboada EN, Clark CG, Sproston EL, Carrillo CD. Current methods for molecular typing

of *Campylobacter* species., J Microbiol Methods., 95:24-31, 2013.

46. Huang B, Zhao D, Fang NX, Hall A, Eglezos S, Blair B. An optimized binary typing panel improves the typing capability for *Campylobacter jejuni*. Diagn Microbiol Infect Dis., 77:312-315, 2013.

47. Cornelius AJ, Gilpin B, Carter P, Nicol C, On SL. Comparison of PCR binary typing (P-BIT), a new approach to epidemiological subtyping of *Campylobacter jejuni*, with serotyping, pulsed-field gel electrophoresis, and multilocus sequence typing methods., Appl Environ Microbiol., 76:1533-1544, 2010.

48. de Boer P, Duim B, Rigter A, van Der Plas J, Jacobs-Reitsma WF, Wagenaar JA., Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*., J Clin Microbiol., 38:1940-1946, 2000.

49. Taboada EN, Ross SL, Mutschall SK, Mackinnon JM, Roberts MJ, Buchanan CJ, Kruczkiewicz P, Jokinen CC, Thomas JE, Nash JH, Gannon VP, Marshall B, Pollari F, Clark CG., Development and validation of a comparative genomic fingerprinting method for high-resolution genotyping of *Campylobacter jejuni*., J Clin Microbiol., 50:788-797, 2011.

50. Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H., New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111., Antimicrob Agents Chemother., 55:623-630, 2011.

51. Hirvonen JJ, Siitonen A, Kaukoranta SS., Usability and performance of CHROMagar

STEC medium in detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains., J Clin Microbiol., 50:3586-3590, 2012.

52. Wylie JL, Van Caesele P, Gilmour MW, Sitter D, Guttek C, Giercke S., Evaluation of a new chromogenic agar medium for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and relative prevalences of O157 and non-O157 STEC in Manitoba, Canada., J Clin Microbiol., 51:466-471, 2013.

53. Suzuki M, Matsumoto M, Hata M, Takahashi M, Sakae K., Development of a rapid PCR method using the insertion sequence IS1203 for genotyping Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157., J Clin Microbiol., 42:5462-5466, 2004.

54. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B., Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing., J Clin Microbiol., 33:2233-2239, 1995.

55. Karama M, Gyles CL., Methods for genotyping verotoxin-producing *Escherichia coli*., Zoonoses Public Health., 57:447-462, 2010.

56. National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare, Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Japan, Infect. Agents Surveillance Rep., 22, 135-136, 2001.

57. National Institute of Infectious Diseases and Tuberculosis and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health, Labour and Welfare, Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in

Japan, Infect. Agents Surveillance Rep., 29, 119-120, 2008.

58. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA., A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure., Antimicrob Agents Chemother. 39:1211-1233, 1995.

59. Bush K, Jacoby GA., Updated functional classification of β -lactamases., Antimicrob Agents Chemother., 54:969-976, 2010.

研究業績

誌上発表

1. Yamada K, Ibata A, Suzuki M, Matsumoto M, Yamashita T, Minagawa H, Kurane R
Designing multiplex PCR system of *Campylobacter jejuni* for efficient typing by improving monoplex PCR binary typing method
J Infection and Chemotherapy. 21(1), 2015, 50-54.
2. Matsumoto M, Hiramatsu R, Yamada K, Suzuki M, Miwa Y, Yabutani M, Nagai Y, Tsuchiya M, Noda M, Nagata A, Kawakami K, Shima T, Tatsumi N, Minagawa H.
Phenotypic and genetic analyses of *Campylobacter jejuni* Lior serotype 76 isolated from chicken meat and clinical specimens.
Jpn J Infect Dis. 2013; 66(1):72-75.
3. 井畑亜仁、山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、平松礼司、皆川洋子
クロモアガーSTECによる志賀毒素産生性大腸菌の発育性の検討
愛知県衛生研究所報, 2013; 63, 9-16.

学会発表

1. 愛知県における糞便からの ESBL 遺伝子陽性大腸菌分離状況
山田和弘、鈴木匡弘、井畑亜仁、青木美耶子、柘植亜衣子、松本昌門、平松礼司、皆川洋子、倉根隆一郎
日本食品微生物学会学術総会、2012、福岡
2. 愛知県におけるヒト糞便からの ESBL 産生大腸菌の分離状況
山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、倉根隆一郎
日本農芸化学会大会、2013、宮城
3. *Campylobacter jejuni* の PCR 型別法の有効性検討
山田和弘、井畑亜仁、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、倉根隆一郎、皆川洋子
日本食品微生物学会学術総会、2013、江戸川区

4. 腸管病原性 *Escherichia* 属の簡便な同定鑑別法の開発

山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、倉根隆一郎

日本生物工学会大会、2014、札幌

5. 腸管出血性大腸菌 multiplex PCR Typing 法(EHEC_mPT 法)の開発

山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門、山下照夫、倉根隆一郎、皆川洋子

日本食品微生物学会学術総会、2014、堺市

6. 食中毒患者、ウシおよびトリ由来カンピロバクターの PCR binary typing (P-BIT)

法による解析

山本香織、中村寛海、藤原淳史、山田和弘、鈴木匡弘、小笠原準、西尾孝之

日本食品微生物学会学術総会、2014、堺市

特許

1. 大腸菌の遺伝子型タイピング法及びこれに用いるプライマーセット

(特願 2014-175414) 出願日：2014年8月29日

鈴木匡弘、山田和弘、倉根隆一郎

謝辞

本学位論文を作成するにあたり、終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました中部大学大学院応用生物学研究科 倉根隆一郎教授に深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、数々の有益なご校閲およびご助言を賜りました中部大学大学院応用生物学研究科 宮田茂准教授に厚くお礼申し上げます。同じく本論文を作成するにあたり、数々の有益なご校閲およびご助言を賜りました中部大学大学院応用生物学研究科 金政真准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くの有益なご助言、ご指導を頂きました愛知県衛生研究所生物学部細菌研究室 松本昌門室長、鈴木匡弘主任研究員に厚く御礼申し上げます。また種々の検討にご協力いただきました愛知県衛生研究所生物学部細菌研究室の方々に深謝いたします。