

第3章 調査研究・報告

第1節 原 著

温泉水の電気伝導率について

植田 直隆・市川 啓子

Electric Conductivity of Spring Water

Naotaka UEDA and Noriko ICHIKAWA

緒 言

温泉水のように高濃度でイオン成分が含まれている場合、電気伝導率は各イオン濃度とその当量伝導率の積の和から求めた計算値と測定値は一致しない。しかしKohlrauschの平方根則および近距離間のイオン相関を考慮したDaviesの式から求めた電気伝導率の計算値と測定値はほぼ一致し、両者を比較することによって、温泉水分析の精度管理に適用できることがわかった。一方、酸性雨のような低濃度の試料については $EC_{cal} = \sum \lambda_{0i} \cdot C_i$ で十分説明できた。

緒 言

酸性雨の分析では、データの精度管理として陽イオンと陰イオンのイオンバランスおよび各イオン成分から求めた計算値と測定値の電気伝導率(EC)の比較が用いられている。一方、温泉水では陽イオンと陰イオンのイオンバランスは用いられるが、ECは精度管理には一般に用いられていない。

そこで各イオン濃度とその当量伝導率の積の和、Extended Debye-Hückelの式およびDaviesの式から求めた EC_{cal} と測定値のECを比較検討し、温泉水分析の精度管理にECを用いた方法が適用できるかどうかを検討した。

方 法

1. 使用データ

温泉データとしては下記に示すデータを用いた。なおそれらのデータのうち、ECが測定されていないデータについては検討から省略した。また参考比較するために酸性雨のデータについても検討した。

函館のデータは北海道立地質研究所¹⁾が分析した函館市とその周辺地域の温泉で、検討には2005年分析の30データを用いた。

神奈川のデータは神奈川県温泉地学研究所²⁾が分析した神奈川県下の箱根湯本地区、箱根中央地区、箱根山岳地区、湯河原地区、丹沢山地付近および臨海部付近の温泉で、1988年から1996年分析の30データを用いた。

岩手・宮城のデータは神奈川県温泉地学研究所³⁾が分析した2008年岩手・宮崎内陸地震の震源地周辺における温泉で震災後の2008年7月24日から26日分析の7データを用いた。

新潟のデータは新潟県衛生公害研究所⁴⁾が分析した新潟県下のデータで、1988年から1994年分析の30データを用いた。

奈良のデータは奈良県保健環境研究センターが分析した奈良県下のデータで、1995年から2009年分析の55データを用いた。

今回検討した温泉データでは、イオン濃度は陽イオン量と陰イオン量合わせて2.02meq/kg～1.15eq/kg、ECは0.11～43.2mS/cmであった。

また酸性雨については森林総合研究所⁵⁾が平成11年度に実施した林外雨の分析データ(73データ)を用いた。陽イオン量と陰イオン量合わせて0.054meq/kg～1.46meq/kg、ECは0.0035～0.130mS/cmであった。

検討に用いた項目はpH(水素イオン濃度)、EC、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 F^- 、 Cl^- 、 NO_3^- および SO_4^{2-} である。その他に Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 NO_2^- および PO_4^{3-} についても分析値がある場合は検討に用いた。

2. 計算方法

次の3式を用いて、 EC_{cal} を計算した。

- 1) $EC_{cal} = \sum \lambda_{0i} \cdot C_i$ … 各イオン濃度とその当量伝導率の積の和

$$2) -\log f_i = \frac{A \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + B \cdot r_i \cdot \sqrt{I}}$$

・・・Extended Debye-Hückelの式

$$3) -\log f_i = \frac{A \cdot z_i^2 \cdot \sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.2 \cdot A \cdot z_i^2 \cdot I$$

・・・Daviesの式⁶⁾

Daviesの式の最後の項の係数は、一般に0.3あるいは0.2が用いられているが、ここでは0.2を用いた。

なおExtended Debye-Hückelの式およびDaviesの式でのEC_{cal}はf_iを用いて次式で計算される。その際用いる基本定数は表1に示した。

$$EC_{cal} = \sum \lambda_{oi} \cdot f_i \cdot m_i$$

EC_{cal}: ECの計算値

f_i: イオンiの活動度係数

A = 0.509 (25℃での値)

B = 0.329 (25℃での値)

r_i: イオンiのイオンサイズパラメーター

z_i: イオンiの荷電数

m_i: イオン濃度

I: 溶液のイオン強度 (I = 1/2 ∑ m_i · z_i²)

λ_{oi}: 無限希釈におけるイオン当量伝導率

表1 計算に用いた基本定数

イオン名	当量イオン電導度 10 ⁻⁴ Sm ²	分子量	B · r _i	価数
H ⁺	349.81	1.008	3.0	1
Na ⁺	50.1	22.99	1.3	1
K ⁺	73.5	39.098	1.0	1
NH ₄ ⁺	73.56	18.039	1.0	1
Mg ²⁺	53.05	24.312	2.6	2
Ca ²⁺	59.5	40.08	2.0	2
Fe ²⁺	53.5	55.847	2.0	2
Fe ³⁺	68.4	55.847	3.0	3
Mn ²⁺	53.5	54.938	2.0	2
Al ³⁺	63	26.982	3.0	3
Zn ²⁺	52.8	65.37	2.0	2
OH ⁻	198.3	17.007	1.0	1
CO ₃ ²⁻	69.3	60.008	1.3	2
HCO ₃ ⁻	44.5	61.016	1.3	1
F ⁻	55.4	18.998	1.0	1
Cl ⁻	76.35	35.453	1.0	1
NO ₃ ⁻	71.46	62.004	1.0	1
NO ₂ ⁻	71.8	46.005	1.0	1
SO ₄ ²⁻	80.02	96.06	1.3	2
PO ₄ ³⁻	69.0	94.97	1.3	3

3. 精度管理

東アジア酸性沈着物モニタリングネットワークでは、1)イオンバランス(R₁),2)電気伝導率バランス(R₂)について、次の基準を満たすことを提案している⁷⁾。

1) イオンバランス (Cation:陽イオン量, Anion:陰イオン量)

$$R_1(\%) = 100 \times (\text{Cation} - \text{Anion}) / (\text{Cation} + \text{Anion})$$

(Cation + Anion): < 50 μ eq/Lの場合

$$-30\% \leq R_1 \leq 30\%$$

(Cation + Anion): 50 ~ 100 μ eq/Lの場合

$$-15\% \leq R_1 \leq 15\%$$

(Cation + Anion): > 100 μ eq/Lの場合

$$-8\% \leq R_1 \leq 8\%$$

2) 電気伝導率バランス (EC_{cal}:計算値, EC:測定値)

$$R_2(\%) = 100 \times (\text{EC}_{cal} - \text{EC}) / (\text{EC}_{cal} + \text{EC})$$

EC: < 5 μ S/cmの場合

$$-20\% \leq R_2 \leq 20\%$$

EC: 5 ~ 30 μ S/cmの場合

$$-13\% \leq R_2 \leq 13\%$$

EC: > 30 μ S/cmの場合

$$-9\% \leq R_2 \leq 9\%$$

この範囲外にある測定値については、再分析や標準試料での確認、検量線の検討など適切な対応が必要としている。

一方、温泉水については、鉱泉分析法指針説明会テキスト⁸⁾では、陽イオンと陰イオンの当量値の合計を比較し、その差が5%を超える際には分析結果を再検討すること。ただし、強アルカリ性や強酸性の温泉や成分総計が低い温泉(陽イオン、陰イオンの合計がそれぞれ1[mval/kg]程度以下)では、陽イオンと陰イオンの当量値の合計の差が10%を超えることもあるとしている。

今回検討した温泉データでは、(Cation+Anion)が100 μ eq/L以上、ECが30 μ S/cm以上であったので、-8% ≤ R₁ ≤ 8%および-9% ≤ R₂ ≤ 9%として検定を試みた。

結果および考察

1. 温泉水

酸性雨では精度管理を行う場合、ECの計算値として各イオン濃度とその当量伝導率の積の和が用いられ、マニュアル化⁷⁾もされている。しかしこの式が適用できるのは濃度が十分に低い場合に限られる。一方、温泉水は濃度が高いためこの式は成立しない。

強電解質のモル伝導率λは濃度Cが低い範囲においては、次のKohlrauschの平方根則が成立する。

$$\lambda = \lambda_0 - k \cdot \sqrt{C}$$

ここで

λ : モル伝導率

λ_0 : 無限希釈におけるモル伝導率

k : 定数

C : 濃度

この式を理論的に証明したのがDebye, HückelおよびOnsagerで、一般にDebye-Hückelの式と呼ばれているが、0.005M程度までしか適用できない。

$$-\log f_{\pm} = A \cdot z_{\pm}^2 \cdot \sqrt{I} \cdots \text{Debye-Hückelの式}$$

上式を改良したExtended Debye-Hückelの式では0.1M程度まで適用できるといわれている。

更に高濃度の場合には、補正項を加えたDaviesの式がよく用いられ、0.5M程度まで適用できるといわれている。

そこでこれら3式でECの計算結果と測定値を比較した結果を図1.1～図1.3に示した。また R_1 および R_2 の頻度分布図を図2および図3.1～図3.3に示した。また表2には R_1 および R_2 の統計基本量を示した。

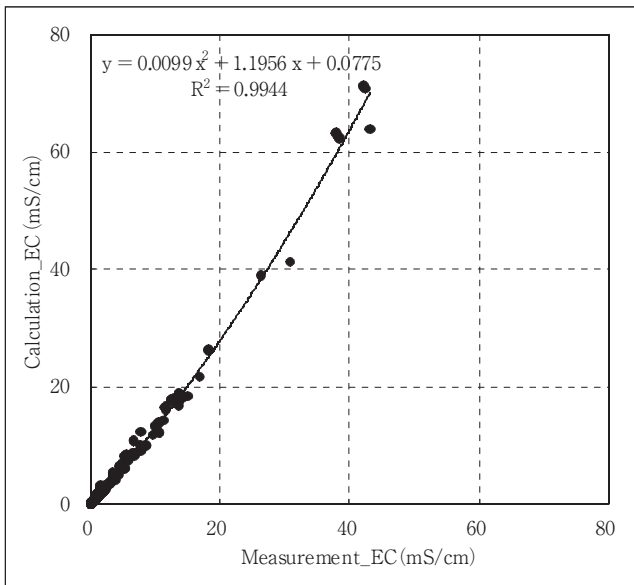


図1.1 $EC_{cal} = \sum \lambda_{oi} \cdot C_i$ による計算値と測定値の比較 (温泉水)

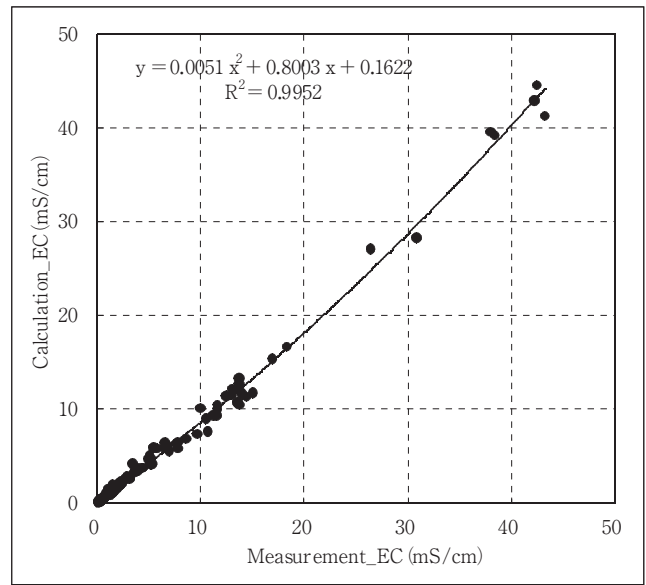


図1.3 Daviesの式による計算値と測定値の比較 (温泉水)

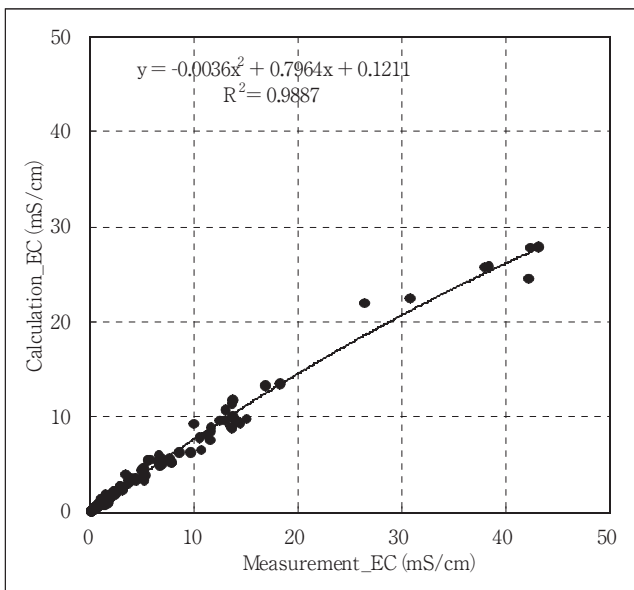


図1.2 Extended Debye-Hückelの式による計算値と測定値の比較 (温泉水)

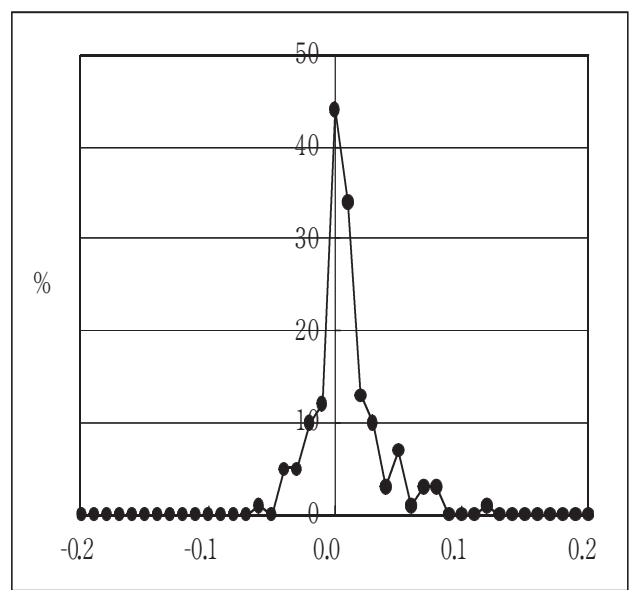


図2 R_1 の頻度分布図

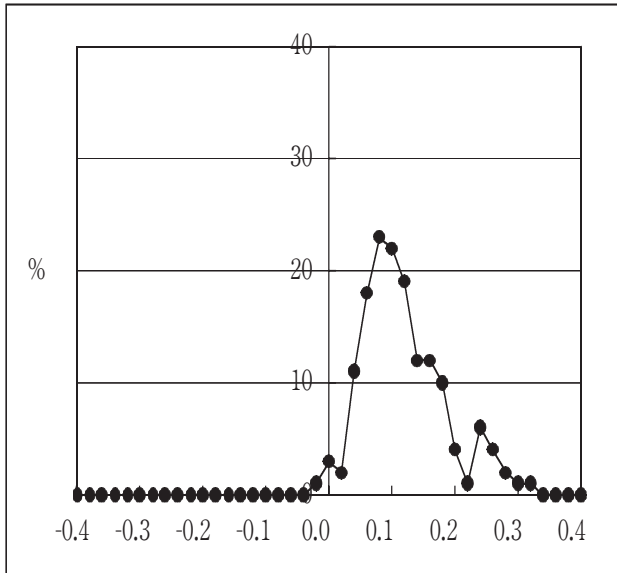


図3.1 R_2 の頻度分布図 ($EC_{cal} = \sum \lambda_{oi} \cdot C_i$)

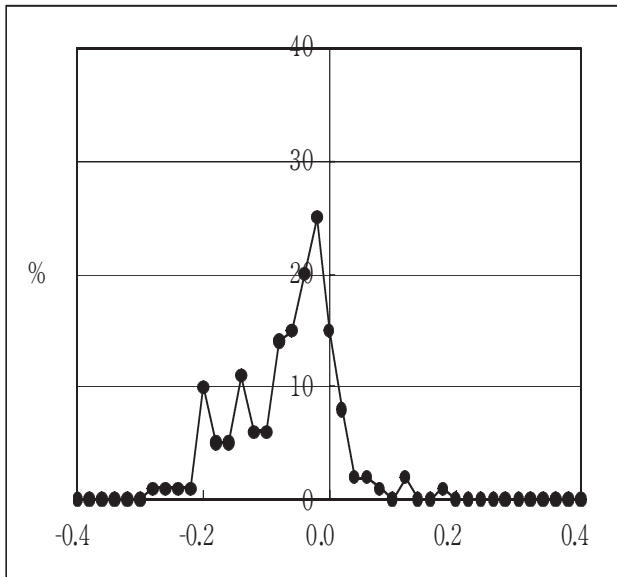


図3.2 R_2 の頻度分布図 (Extended Debye-Hückelの式)

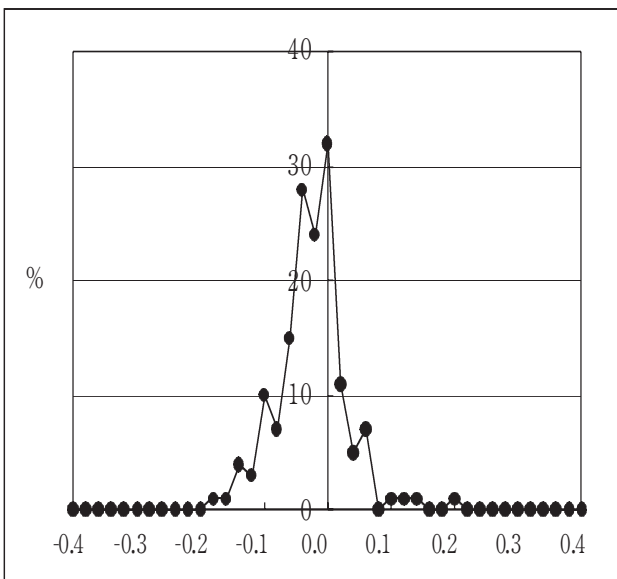


図3.3 R_2 の頻度分布図 (Daviesの式)

表2 R_1 および R_2 の統計基本量

	R_1	R_2		
		$\sum \lambda_{oi} \times C_i$	Extended Debye-Hückel	Davies
平均値	0.003	0.108	-0.075	-0.039
中央値	0.000	0.096	-0.059	-0.037
最大値	0.112	0.306	0.169	0.180
最小値	-0.066	-0.023	-0.280	-0.188
標準偏差	0.026	0.065	0.078	0.055
データ数	152	152	152	152
0.09以上のデータ数	1	83	3	4
-0.09以下のデータ数	0	0	54	26
歪度	0.94	0.82	-0.26	0.27
尖度	2.54	0.47	0.26	2.10

但し、 R_1 については「0.08以上」および「-0.08以下」

図2で表した陽イオンと陰イオンのイオンバランスを示す R_1 の頻度分布ではやや陽イオンの方に偏る傾向があるものの、152データのうち151データは R_1 は8%以下であった。超過したデータについては陽イオンの方が陰イオンより高く測定していた。

次に R_2 の検討をした。図1.1および図3.1から $EC_{cal} = \sum \lambda_{oi} \cdot C_i$ では計算値の方が測定値に比べて大きくなることがわかった。この傾向は以前から指摘⁹⁾されていた。濃度が高くなるに従ってその傾向は一層強くなった。この原因はKohlrauschの平方根則が考慮されなかったためと考えられる。 R_2 の値は152データ中83データが9%を超えた。

図1.2および図3.2では逆にExtended Debye-Hückelの式では計算値の方が測定値に比べて小さくなることを示した。濃度が高くなるに従ってその傾向は更に強くなった。一般に活動度係数 f_i は濃度が高くなるに従って小さくなっていくが、NaClのように0.5Mないし1.0M付近から再び大きくなる化合物¹⁰⁾もある。これはイオン濃度が高まるとともにイオン間の距離が短くなり、近距離間のイオン相関が強まるためと思われる。Extended Debye-Hückelの式では、 R_2 の値は152データ中3データが9%を超え、54データが9%未満であった。従って温泉水のような高濃度の場合にはExtended Debye-Hückelの式でも十分な結果が得られないことがわかった。

次に上記の近距離間のイオン相関を補正したDaviesの式⁶⁾について検討した。図1.3および図3.3からわかるようにDaviesの式はこれらの3式の中では最も $EC_{cal}=EC$ に近い結果が得られた。また相関も一番高かった。しかし7~20mS/cm付近では計算値の方がやや低い値を示し、ECが20mS/cm以上になると、再び両者はほぼ一致するようになった。 R_2 の値は152データ中4データが9%を超え、26データが-9%未満であった。これは R_2 の平均値が-3.9%で、ややマイナスの値を示したためである。 σ を標準偏差として、 2σ までを許容範囲とすると、 R_2 の標準偏差は5.5%なので許容範囲は-14.9~7.1%になり-14.9%未満が4データ、7.1%を超えるデータが6データあった。正規分布する集合については 2σ を超えるデータはプラス側とマイナス側を合わせて4.56%なので、152データでは約7データが 2σ を超えることになる。今回の分布は歪度0.27、尖度2.10で正規分布からややずれていたため、それよりやや多い10データが 2σ を超えた。

また上述したように、全体的に計算値の方がやや小さいマイナスの値(R_2 の平均値は-3.9%)を示すが、それはECが7~20mS/cm付近で両者の値がやや乖離することに由来がある。この原因には次のことがあげられる。基本定数の一つである当量イオン電導度の値が不明だったため、今回の計算対象からメタケイ酸(H_2SiO_3)、メタホウ酸(HBO_2)および硫化水素(H_2S)を除外した。しかしこれら成分を含有する温泉も多く、pHが高く、高濃度で含む温泉水については考慮を要すると思われる。また分析項目のうち CO_3^{2-} および HCO_3^- では分析法は滴定法¹¹⁾が主で、他の項目が機器分析であるのに比べて、精度や客観性にやや劣る。更に CO_3^{2-} および HCO_3^- は弱電解質で、しかも HCO_3^- は主成分である場合が多い。弱電解質は強電解質に比べて低濃度ほど電離が進むため、前述のKohlrauschの平方根則は成立しない。Extended Debye-Hückelの式やDaviesの式はあくまでも強電解質で成立する法則である。

しかしながら弱電解質と強電解質が高濃度(陽イオン量+陰イオン量:2.02meq/kg~1.15eq/kg)で混在するような温泉水の場合でもECの計算値はDaviesの式ではほぼ説明できた。このため温泉水分析の精度管理のために、Daviesの式で計算した EC_{cal} が適用できることがわかった。しかしECの測定値と EC_{cal} の値が7~20mS/cm付近でやや乖離する問題については今後更に検討する必要がある。

2. 酸性雨

次に酸性雨についても同様に計算し、その結果を図4.1~図4.3に示した。上記の3式を用いた計算では、 $EC_{cal}=\sum \lambda_{oi} \cdot C_i$ がほぼ $EC_{cal}=EC$ に近い結果で、満足な値が得られた。一方Extended Debye-Hückelの式およびDaviesの式ではやや後者の方が良好だったものの、両者はほぼ類似した結果で計算値の方が測定値に比べて低くなった。これらの結果からマニュアル⁷⁾のとおり、酸性雨のような低濃度の試料については $EC_{cal}=\sum \lambda_{oi} \cdot C_i$ の計算でECが十分説明できることがわかった。

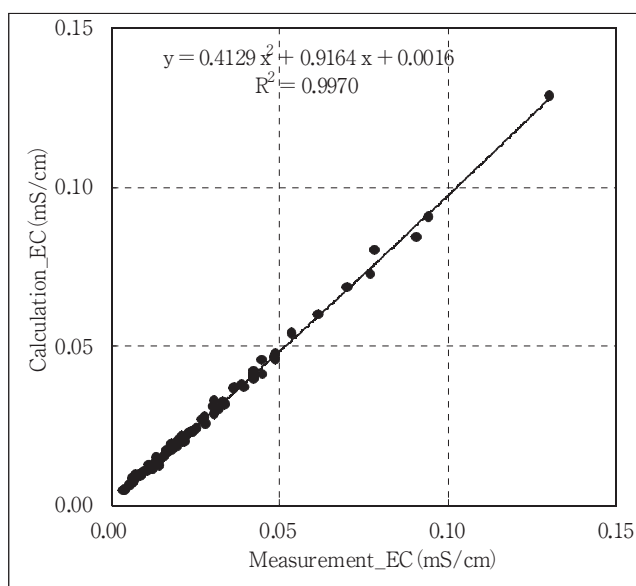


図4.1 $EC_{cal}=\sum \lambda_{oi} \cdot C_i$ による計算値と測定値の比較(酸性雨)

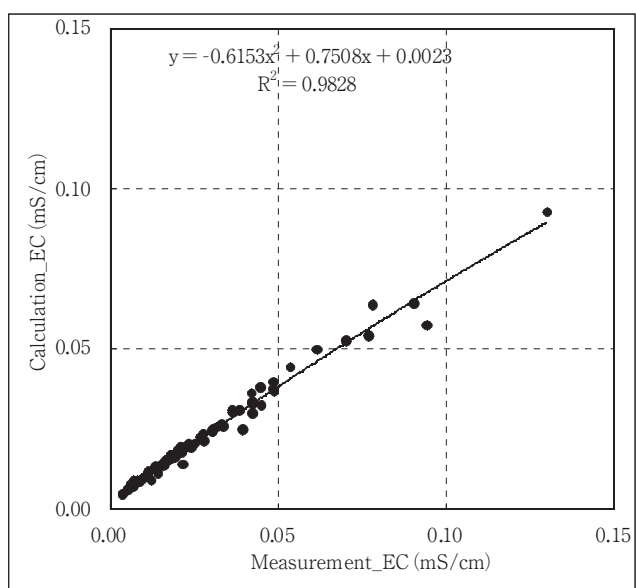


図4.2 Extended Debye-Hückelの式による計算値と測定値の比較(酸性雨)

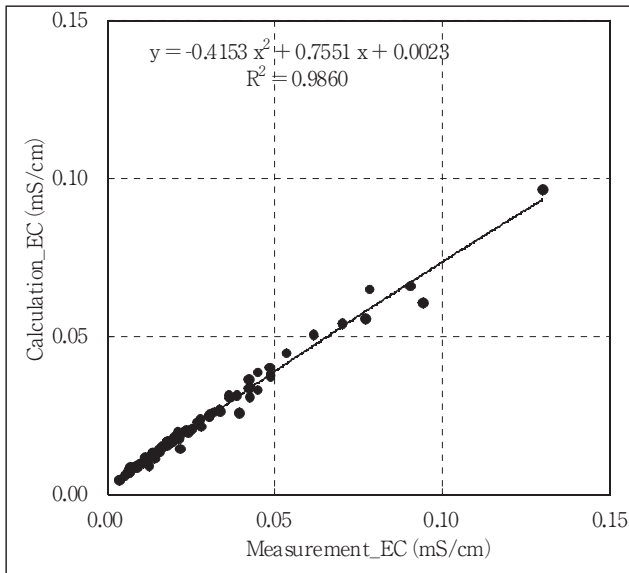


図4.3 Daviesの式による計算値と測定値の比較 (酸性雨)

参考文献

- 1) 柴田智郎, 高橋徹哉, 藤本和徳: 北海道立地質研究所報告書, **78**, 169-174 (2007)
- 2) 栗屋徹, 石坂信之, 平野富雄: 神奈川県温泉地学研究所報告, **28**, 9-32 (1997)
- 3) 坂寺一洋, 原田昌武, 小田原啓, 代田寧: 神奈川県温泉地学研究所報告, **40**, 59-64 (2008)
- 4) 大野茂, 佐藤繁, 水谷直樹, 白井文雄: 新潟県衛生公害研究所年報, **10**, 105-110 (1994)
- 5) 酒井寿夫, 仙石鐵也, 原光好, 森澤猛, 埜田宏, 岩本宏二郎, 荒井國幸, 小澤孝弘: 森林総合研究所研究報告, **Vol.3-No.4 (No.393)**, 365-407 (2004)
- 6) Craig Bethke: "Geochemical Reaction Modeling", p107-114, 1996, Oxford University Press
- 7) 東アジア酸性雨データ報告書「2005年湿性沈着モニタリング」, 2006年11月, 東アジア酸性沈着物モニタリングネットワーク
- 8) 鉱泉分析法指針説明会テキスト, 2009年7月, 環境省自然環境局
- 9) 石塚伸一, 木村淳子, 野村真美, 高橋政教, 小林栄一: 青森県環境保健センター研究報告, **2**, 21-27 (1991)
- 10) 理科年表, p574, 平成13年版2001, 国立天文台編, 丸善株式会社
- 11) 鉱泉分析法指針 (改訂), 平成14年3月, 環境省自然環境局

腸管出血性大腸菌O157に関する3種の遺伝子型別法の比較

榮井 毅・田邊純子・橋田みさを・大前壽子

Comparison of Three Genotyping Methods for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

Takeshi SAKAI・Sumiko TANABE・Misao HASHIDA and Hisako OHMAE

平成21年度に奈良県で確認された集団性が疑われる5事例28株と散発事例18株の腸管出血性大腸菌O157を対象に、PFGE法、MLVA法とIS-printing法の3種の遺伝子型別法について解析比較を実施した。その結果、集団事例では、IS-printing法で1株、PFGE法で2株、MLVA法で6株が型別違いとなり、うち1株は3手法に共通していた。散発事例においてIS-printing法の型別が一致した2株は、PFGE法、MLVA法ともに異なる型別となった。以上の結果から、原理の異なる手法を組み合わせることで、より菌株間の関連性が明確になることが判明した。

緒 言

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) O157は、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症をはじめ重篤な症状を誘発するとともに、ヒトからヒトへ感染しやすいという特徴を有する病原細菌であり、毎年多くの集団・散発感染が全国各地で発生している。EHEC O157感染症は感染症法の3類に指定され、社会的影響が非常に大きいため、しばしば迅速な対応が求められる。

EHEC O157の潜伏期間は、摂食から発症まで通常3～5日間であり、少ない菌量で感染が成立するため、

原因食品を特定できないことが多く、感染経路等の究明のために、患者等から検出した菌株の遺伝子解析が不可欠となっている。国際標準法としてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法が用いられている¹⁾が、労力と時間に多くを要するなど難点が指摘されている。

本報では、新たな迅速遺伝子型別法として注目される、縦列反復配列多型 (Variable-Number Tandem Repeats: VNTR) を利用したMLVA (Multiple-Locus VNTR analysis) 法とIS-printing法²⁾に関する、解析能の比較検討を行ったので概要を報告する。

表1 MLVA プライマー

VNTR				最終濃度
領域	Dye	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	(μ M)
マルチプレックス反応1				
K3	6-FAM	GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTGTTGAATTG	GAACAACCTAAAACCCGCCTCGCCATCG	0.2
K9	PET	GCGCTGGTTTAGCCATCGCCTTCTTCC	GTGTCAGGTGAGCTACAGCCCGCTTACGCTC	0.2
K25	VIC	GCCGGAGGAGGGTGATGAGCGGTTATATTTAGTG	GCGCTGAAAAGACATTCTCTGTTTGGTTTACACGAC	0.1
K34	PET	GACAAGGTTCTGGCGTGTACCAACGG	GTTACAACCTCACCTGCGAATTTTTTAAGTCCC	0.2
マルチプレックス反応2				
K17	NED	GCAGTTGCTCGGTTTTAACATTGCAGTGATGA	GGAAATGGTTTACATGAGTTTGACGATGGCGATC	0.06
K19	NED	GCAGTGATCATTATTAGCACCGCTTTCTGGATGTTT	GGGGCAGGGAATAAGGCCACCTGTTAAGC	0.04
K36	6-FAM	GGCGTCTTCATCGGCTGTCCGTTAAAC	GCCGCTGAAAGCCACACCATGC	0.03
K37	6-FAM	GCCGCCCTTACATTACGGGACATTC	GCAGGAGAACAACAAAACAGACAGTAATCAGAGCAGC	0.04
反応3				
K10	VIC	CAGCCTCCTGCAAACCTTACTGTTCATTTCTACAGTCTC	GGATCTGTCTGTATCATCATTGAATGAACAACCCATTTTC	0.3

方 法

1. 対象菌株

平成21年度、当センターへ搬入された46株のEHEC O157菌株を解析対象とした。内28株は集団性が疑われる5事例由来株、残り18株は散発事例由来株である。

2. PFGE解析

PFGE法は、国立感染症研究所細菌第一部による型別結果を参照し、型別タイプ番号を表記した。

3. MLVA解析

1) 菌体からのDNA抽出

表2 平成21年度 腸管出血性大腸菌 O157 菌株の遺伝子解析データ

菌株番号	PFGE法									IS-printing法		
	K25	K3	K34	K9	K17	K19	K36	K37	K10	(感染研)	1st Set	2nd Set
H21-V01	5	12	9	17	8	6	9	7	21	e64	111100111101111101	011100100011101111
H21-V02	8	12	11	14	7	6	3	6	26	e65	111100111101111111	011100100011101111
H21-V03	4	20	9	16	9	6	10	6	20	e30	100100110100101111	011000000011101101
H21-V04	4	11	9	13	11	6	10	6	22	e66	110100111101101101	011100100011101111
H21-V05	3	4	7	0	5	8	6	5	0	e184	000100010000101111	010100001001001101
H21-V06	5	6	7	10	3	5	7	10	32	e152	100100101000101111	110000110001001101
H21-V07	5	6	7	10	3	5	7	10	30	e152	100100101000101111	110000110001001101
H21-V08	5	6	7	10	3	5	7	10	30	e152	100100101000101111	110000110001001101
H21-V09	5	6	7	10	3	5	7	10	30	e152	100100101000101111	110000110001001101
H21-V10	3	6	6	11	3	5	11	8	30	e206	100100001000101111	110000110001001101
H21-V11	2	18	8	12	3	7	4	8	37	e204	000100101001101111	110100100011101011
H21-V12	2	18	8	12	3	7	4	8	36	e204	000100101001101111	110100100011101011
H21-V13	2	18	8	12	3	7	4	8	39	e204	000100101001101111	110100100011101011
H21-V14	4	0	7	10	3	6	7	8	58	e99	100001101000001111	110000110001001101
H21-V16	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V17	5	10	9	12	7	4	6	9	28	e238	110000111101111111	011100100011101111
H21-V18	2	12	9	17	9	6	10	7	61	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V19	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V20	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e239	110100111100111101	011100100111101111
H21-V21	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V22	2	12	9	8	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V25	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V26	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V27	2	12	9	17	9	6	10	7	59	e241	110100111100111101	011100100111101111
H21-V23	3	14	8	15	9	7	4	7	36	d40	010100101001101111	110100100011101011
H21-V24	5	13	9	14	7	4	13	6	20	e341	011100110101111111	011110000011001011
H21-V15	2	15	8	15	11	7	4	7	36	d594	010100101001101111	110000100011101011
H21-V28	2	15	8	15	11	7	4	7	36	d594	010100101001101111	110000100011101011
H21-V29	2	15	8	15	11	7	4	7	36	d594	010100101001101111	110000100011101011
H21-V30	2	15	8	13	11	7	4	7	19	e575	011100101001101101	110100100011101011
H21-V31	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V32	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V33	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V35	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V36	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V37	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V38	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V39	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V40	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e579	110100111101111101	011100100111101111
H21-V34	5	6	8	12	3	4	9	21	34	e574	100100101000101101	110000110001001101
H21-V41	5	9	10	11	6	6	6	4	28	c293	110100111101111111	010100100111101111
H21-V42	5	15	11	16	7	6	11	11	23	e759	111100111101111111	011100100011101111
H21-V43	4	4	7	0	5	8	6	5	0	e765	0001000000010111	010100001001001101
H21-V44	5	9	10	9	7	6	6	6	41	e492	110100111101111101	011100100111101111
H21-V45	5	15	8	8	4	6	5	4	25	c512	100100100000101111	110100000001010111
H21-V46	2	14	8	16	12	7	4	8	44	e755	011100101001101111	110100100011101011

(注) IS-printing法の結果は増幅バンドの有無を「1」、「0」で表記した。セット1は1-01から1-15, *eae*, 1-16, *hlyA*の順であり、セット2は2-01から2-16, *stx2*, *stx1*の順である。

表3 各VNTR領域の配列及びOff set値

VNTR領域	マルチプレックス反応1				マルチプレックス反応2				反応3
	K 25	K 3	K 34	K 9	K 17	K 19	K 36	K 37	K 10
繰返し単位	6 bp	6 bp	18 bp	6 bp	6 bp	6 bp	7 bp	6 bp	6 bp
VNTR配列	TGCAA	AAGGTG	*	AAATAG (AAATAT)	TCTTTA	CCACGA	TCACACC (TCACAAC)	TGCTAC	GGCTCT
オフセット値	110 bp	323 bp	99 bp	466 bp	121 bp	273 bp	102 bp	142 bp	178 bp

*K34のVNTR配列は、AAATAATCTACAGAAGTT, AAATAATTCGCAGGAGTT, AAATAATCATCAGAAGTT, AAATAATATACAGAAGTT, AAATAATATACAGGAGTTのいずれか。

MLVA 法には、菌体を滅菌蒸留水に懸濁し、沸騰水浴中10分間加熱後、10,000rpm、10分間遠心した上清を使用した。塩基配列解析には、DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン) を使用した。ただし、菌体の前処理は直接180 μ LのBuffer ATLに懸濁し、Proteinase Kの作用時間は2時間以上とした。

2) PCR

国立感染症研究所(感染研)のプロトコール³⁾に準拠し、プロトコール中の蛍光色素の組合せなどを若干改変⁴⁾して、二種類のマルチプレックスPCR反応と一種類のPCR反応を実施した。ノンラベル側プライマーはテイルドプライマーとし、表1のプライマーを、マルチプレックス反応1はHPLC精製グレード、その他は脱塩精製グレードのプライマーとして、ライフテクノロジーズ社に合成委託した。

3) DNAサイズの測定及びリピート数の解析

PCR産物は、各反応液と滅菌蒸留水を混合して100倍希釈した。この希釈液1 μ LとGeneScan 600 LIZ Size Standard (ライフテクノロジーズ) 0.4 μ LにHi-Di Formamide (ライフテクノロジーズ) 12 μ Lを加え、95 $^{\circ}$ C、2~5分間加熱後、急冷を行い泳動用サンプルとした。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(ライフテクノロジーズ)を用い、15.0kVで5秒間インジェクションを行い、60 $^{\circ}$ C、15.0kVで28~32分間泳動し、GeneMapper Software v. 4.0 (ライフテクノロジーズ)を用いてDNAサイズの測定とリピート数の対応を解析した。

4) シーケンス解析

塩基配列解析は、DigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (v 1.1, v 3.1) による反応液をBigDye XTerminator精製キット(ライフテクノロジーズ)を用いて精製し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにより解析した。

4. IS-printing解析

IS-printing法は東洋紡(株)製の試薬キットを使用し、取扱説明書に従って実施した。本法は、挿入配列(IS629)の32箇所における分布パターン及び4種類の

病原遺伝子を標的とした、2組のマルチプレックスPCRであるため、合計36箇所のDNA増幅の有無をそれぞれ“1”、“0”として表記した。

結 果

3手法によるEHEC O157の型別結果を表2に示す。尚、菌株番号は当センターに搬入された順とし、疫学的に何らかの共通原因が疑われる集団・家族などの5事例を破線で囲んで明示したため、表中の菌株の順序を一部入れ替えた。

PFGE法では、1事例(事例3)の2株の型別違いを除き、集団事例ごとに同一型別であった。散発事例には型別一致は検出されなかったが、1株(H21-V31)が集団事例5の株と同じ型別であった。

MLVA法では、3つの集団事例の合計6株が型別違いとなった。散発事例では2株(H21-V31, H21-V44)の型別が一致し、集団事例5の株と同じ型別であった。

IS-printing法では、1事例(事例3)の1株の型別違いを除き、集団事例ごとに同一型別となった。散発事例では2株(H21-V02とH21-V42)の型別が一致したほか、別の2株(H21-V31, H21-V44)の型別が一致して集団事例5と同じ型別であった。

集団事例の型別違いの株のうち、1事例の1株(H21-V17)は、3手法に共通していた。

散発事例の株うち、IS-printing型別が一致したH21-V02株とH21-V42株は、PFGE法では一致せず、MLVA法で9領域中6領域でリピート数が不一致であった。

測定したDNAサイズと実際のリピート数との対応は、塩基配列解析により検証された。その際確認したVNTR配列及びオフセット値(増幅したDNAフラグメントのうちVNTRを除いた領域の塩基対数)を表3に示す。領域K9は“AAATAG”の繰返しであるが、最後の1リピートのみ“AAATAT”であった。また、領域K36の繰返し単位は“TCACACC”であるが、最後の1リピートのみ“TCACAAC”であった。

表4 遺伝子型別法の特徴比較

	PFGE 法	MLVA 法	IS-printing 法
結果判明の時期	コロニー分離から3～4日	コロニー分離当日～翌日	コロニー分離当日
解析手法	泳動パターンによる比較	9組のリピート数（整数）による比較	36標的PCRの有無による比較
実施時の安全性	大量培養し、生菌のままブロック化	菌体を少量採取後、すぐに溶菌	菌体を少量採取後、すぐに溶菌
集団事例中の変異型	1から2バンド違いの泳動パターンとなる	変異型の検出が多い（特にVNTR-10, 次いでVNTR-9）	完全に一致することが多い

考 察

本研究では、3種の遺伝子型別法を実施したが、型別の原理が異なるため、菌株比較における型別の一致・不一致について、手法による違いが表れることが予想されていた。実際に、集団事例中の型別違いの株は、IS-printing法で1株、PFGE法で2株、MLVA法で6株という、手法による違いが際立った結果となった。

その中でも、事例3の1株（H21-V17）は3手法に共通していたため、他の株との違いがより明確となった。この事例の詳細は、他誌に報告した⁵⁾。

散発事例の中でIS-printing型別が一致したH21-V02株とH21-V42株は、PFGE法、MLVA法ともに型別が不一致であったことから、患者情報については関連性が認められなかったことから、偶然の一致である可能性が高いことが考えられた。IS-printing法の解析能の限界は以前から報告されている²⁾が、今回の結果からも、IS-printing法単独で遺伝子型別を決定することは難しいと示唆された。それ以外の散発事例株では、菌株の関連性について、表2に示した以上の情報は得られなかった。

図4は、本研究で用いた3種の解析法の特徴比較である。PFGE法ではコロニー分離から3～4日間かかるのに対し、他の2手法では基本的にコロニー分離当日に結果が判明する利点がある。さらに、両手法は数値化が可能であり、散発事例や複数都道府県にまたがる事例に対応する際に、多施設間の比較が容易である点が非常に有利である。安全面についても、二つの手法の方が実施者に危険性が少ないなどの利点がある。

本研究の結果から、標準法であるPFGE法と、原理の異なる遺伝子解析手法を併用することは、菌株間の関連性をこれまで以上に明確に把握することができ、非常に有用であることが示唆された。PFGE法にない多くのメリットを持つこの2手法が、今後の実績の蓄

積によって確立されることが強く期待される。

謝 辞

本研究全般にわたり、パルスネット研究班のサポートをいただきました。PFGE解析結果をご提供いただいた感染研の寺嶋淳先生他、ご協力いただいた方々に深謝いたします。また、菌株提供にご協力いただいた奈良市保健所、県内保健所、医療機関及び関係機関の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) B. Swaminathan, T. J. Barrett, S. B. Hunter, et al. : *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 382-389(2001)
- 2) T. Ooka, J. Terajima, M. Kusumoto, et al. : *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2888-2894(2009)
- 3) Y. Pei, J. Terajima, Y. Saito, et al. : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **61**, 58-64(2008)
- 4) T. Sakai, H. Ohmae and Y. Kitahori : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **63**, 217-219(2010)
- 5) T. Sakai, S. Tanabe, M. Hashida, et al. : *Jpn. J. Infect. Dis.*, **63**, 152-153(2010)