

量や電気泳動時間について検討を重ねた。誤判定は、サイズの大きいバンドに多く、泳動量が過剰な場合は近接のバンドとの区別が難しい。バンドの太さが Standard DNA と同程度になるよう泳動量を少なくし、50V での泳動と 100V での泳動を組み合わせることによって、十分なバンド間隔の泳動像が得られるようになった。しかしながら、試薬のロットによっては Standard DNA や陽性対照テンプレートの泳動像が不明瞭な場合があった。陽性対照テンプレートは PCR 反応の成否を確認するものであり、メーカーには十分な品質管理を求めたいが、ロット不良に気付くためにも複数施設での精度管理が必要である。

近畿 IS データベースは、最終年度になってようやく全施設のデータが登録されるようになった。2 年目である 2010 年は 4 施設以上から 13 株以上登録された IS 型が 9 タイプあったが、発症日からかなり遅れて登録されることが多く、積極的に疫学情報を交換することはなかった。各施設で分離株を入手して IS 型別を実施し、データベースに登録するまでに相当の日数がかかることが課題であると考えられた。3 年目である 2011 年は、8 月に入って大阪府で届出数が急増し、分離株の多くが IS 型 11A あるいは 11E を示したことから、研究協力者に速やかなデータベース登録と同タイプの分離株について情報提供を呼びかけた。2 週間以内に 6 施設から返信があり、PFGE 画像や喫食調査の情報等を積極的に交換した。11A は PFGE 実施株の泳動パターンが一致したが、共通の食材やエピソードは見つからなかった。感染

源は不明であったが、7 月中旬から下旬にかけて流通した食品による diffuse outbreak であった可能性が高く、次回からは管理者から研究協力者への情報提供をより迅速に行うべきであると考えられた。

近畿 IS データベースは、多発する EHEC O157 感染症の関連性を探知するだけでなく、溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症率が高いと言われる clade 8 の探知にも有用である。データベースに登録された 1,550 株は 300 タイプ以上に型別されたが、clade 8 はこのうちの 32 タイプに限局しており、non-8 と clade 8 が同じ IS 型を示す例はなかった。

IS 法の長所を活かし、データベースから最新の情報を得るためには、各施設で分離株を迅速に収集し、IS 型別を実施して登録することが重要である。特定病原体の収集には様々な制約があるが、型別結果を行政に還元することで行政の理解と協力を得られるよう取り組みたい。

PFGE 法は専用の電気泳動装置と実施者のある程度の熟練が必要であるが、汎用性が高く、多くの地研にとって欠かせない分子疫学手法である。EHEC O157 を用いた精度管理からは、異なる施設で実施した PFGE 画像を交換することで、同一性を判定することが十分可能であると考えられた。EHEC O26 はバンド数が多く、バンド認識の困難な画像もみられたことから、ゲルブロック作製の菌液濃度などプロトコールを再確認するとともに、電気泳動装置の維持管理に注意が必要であると考えられた。また、前培養時に再分離を実施した場合の影響や血清群による違いについても検討課題である。

EHEC O157 の MLVA 法は、6–18bp の短い repeat unit のくり返し数の違いで型別するため、正確な増幅サイズの測定にシーケンサーが必要であり、実施している地研は全国的にもまだ少ない。他施設の成績と比較するには、プロトコールの標準化や施設間差の検証が必須であるが、解析能力が高いうえ、結果が数値で得られることから、広域流行株を探知するための有効な手段になり得る。

近畿ブロックの2年間の検討では16株とわずかな供試数ではあるが、少なくともサイズマーカーを統一する必要があると考えられた。1年目の検討では、施設3の測定値が複数の Locus で2–7bp 小さい傾向がみられたが、サイズマーカーとして GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems) を使用していた。施設7と施設11は GeneFlo を、施設9は LIZ を使用していたが、施設9ではプライマー等が異なるため独自の方法で補正した測定値を報告していた。これらのことから、2年目にサイズマーカーを GeneFlo に統一したところ、測定値の施設間差は最大で2.4bp に改善された。さらに、施設5で LIZ を用いた測定も実施し、GeneFlo を使用した測定値に比べ4–12bp 小さい値になること、この傾向は増幅産物のサイズが大きいほど強くなることが明らかになった。本検討は同一の機器を使用して実施されたことから、機器による測定誤差の可能性は考えられず、使用するサイズマーカーが測定値に大きく影響を与えることを示している。9か所の Locus のうち8か所の repeat unit は6bp または7bp であり、サイズマーカーによる測定

誤差は判定結果に直結すると考えられる。2年目の検討でも、わずかに施設間差がみられたが、特定の Locus で供試した全株に同じ傾向がみられたことから、各施設でフラグメント解析ソフトを用いてリピート数を算出する場合には解消されることが考えられる。

1株で施設5の Locus 36の測定値が極端に異なっていた点については、増幅産物の塩基配列を確認していないが、非特異バンドが増幅された可能性が考えられた。今回は4施設で同じ菌株を解析したため、「極端に異なる」ことに気付いたが、各施設分離株の測定結果を比較する場合には、「異なる MLVA 型」と判定される可能性がある。この点を解消するためには、できるだけ由来の異なる多数の菌株についてデータを蓄積し、Locus ごとに「bp レンジ」を把握してレンジを外れる場合は塩基配列を確認することが必要である。

近畿ブロックの各地研では、本研究により EHEC の遺伝型別法の信頼性が増し、O157については複数の型別方法を実施できるようになった。PFGE 法と MLVA 法は EHEC 以外の食品由来感染症調査においても使用される分子疫学手法であり、EHEC での経験が活かされるものと期待される。

E. 結論

EHEC O157 の遺伝子型別法である IS 法については、精度管理の実施により非特異バンドの誤判定が解消され、迅速な遺伝子型別法としての信頼性を確保できた。また、近畿ブロック IS データベースを構築し、3年間で1,500株以上の型別結果が登録され

た。本データベースは、diffuse outbreak の探知だけでなく、HUS 発症率が高いと言われている clade 8 の探知にも有用であると考えられた。データベースの情報をさらに有効に活用するためには、迅速な分離株の収集と型別結果の登録が必要であり、さらに登録者や管理者からの積極的な情報発信も求められる。

PFGE 法は、EHEC O157 については、異なる施設で実施された PFGE 画像であつても菌株の異同を判定することが十分可能であるとの結果が得られたが、EHEC O26 については課題が残った。PFGE 法は汎用性が高く、他の遺伝子型別法が確立されていない血清群についても有用である。血清群に関係なく安定した結果が得られるよう、プロトコルの再確認と電気泳動装置の維持管理が課題である。

EHEC O157 の MLVA 法については、使用するサイズマーカーが測定値に大きく影響を与えること、Locus によっては測定結果に若干の施設間差が生じることが明らかになった。施設間で共通の遺伝子型別法として使用するためには、試薬や反応条件の統一は不可欠であると考えられた。また、各施設の測定機器の特性を把握し、レポート数の算出時に結果を補正できるよう、多数の菌株について検討し、データを蓄積する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 誌上発表

- 1) Kanki M, Seto K, Sakata J, Harada T, Kumeda Y: Simultaneous enrichment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 and *Salmonella* in food samples using universal preenrichment broth. *J. Food Prot.*, 72: 2065-2070, 2009
- 2) Sukhumungoon P, Nakaguchi Y, Ingviya N, Pradutkanchana J, Iwade Y, Seto K, Son R, Nishibuchi M, Vuddhakul V: Investigation of *stx2⁺ eae⁺ Escherichia coli* O157:H7 in beef imported from Malaysia to Thailand. *Int. Food Res. J.*, 18: 381-386, 2011
- 3) Kanki M, Seto K, Harada T, Yonogi S, Kumeda Y: Comparison of four enrichment broths for the detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91, O103, O111, O119, O121, O145 and O165 from pure culture and food samples. *Lett. Appl. Microbiol.*, 53: 167-173, 2011
- 4) Harada T, Sakata J, Kanki M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Molecular epidemiological investigation of a diffuse outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Montevideo isolated in Osaka prefecture, Japan. *Foodborne Pathog. Dis.*, 8: 1083-1088, 2011
- 5) Iguchi A, Shirai H, Seto K, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Osawa K, Osawa R: Wide distribution of O157-antigen biosynthesis gene clusters in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6: e23250, 2011
- 6) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M: Emergence of a novel Shiga toxin-producing

- Escherichia coli* O-serogroup cross-reacting with *Shigella boydii* type 10. J. Clin. Microbiol., 49: 3678-3680, 2011
- 7) 勢戸和子: STEC, 食品由来感染症と食品微生物 (仲西寿男, 丸山務監修). 中央法規出版, 東京, 2009
 - 8) 勢戸和子: 食品検体からの下痢原性大腸菌の分離・同定, NEXT 食品安全・衛生学実験 (岡崎眞, 大澤朗, 川添禎浩 編集). 講談社, 東京, 2010
 - 9) 勢戸和子: 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 5. 下痢原性大腸菌. 防菌防黴誌, 38: 339-350, 2010
 - 10) 勢戸和子: 食水系感染症病原体の検査法 8 腸管出血性大腸菌 (志賀毒素産生性大腸菌). モダンメディア, 56: 337-340, 2010
 - 11) 勢戸和子: 下痢原性大腸菌の検査. 検査と技術 39: 659-664, 2011
 - 12) 神吉政史, 勢戸和子, 原田哲也, 久米田裕子: チーズにおける腸管出血性大腸菌の増菌培養法の比較. 食品微生物学雑誌, 28: 133-138, 2011
2. 学会発表
- 1) 勢戸和子, 田口真澄, 坂田淳子, 原田哲也, 寺嶋淳: 志賀毒素産生性大腸菌 O157 の遺伝子型別における IS-printing System と PFGE 法の比較, 第 13 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2009 年 10 月, 大阪)
 - 2) 勢戸和子, 田口真澄, 寺嶋淳: IS-printing System による志賀毒素産生性大腸菌 O157 遺伝子型別の有用性, 第 83 回日本細菌学会 (2010 年 3 月, 横浜)
 - 3) 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 田口真澄: 市販食品からの志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 検出方法の検討と分離株の性状, 第 14 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム (2010 年 7 月, 宮崎)
 - 4) 神吉政史, 勢戸和子, 原田哲也, 余野木伸哉, 久米田裕子: Universal preenrichment broth を用いた食品中の O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の検出, 第 31 回日本食品微生物学会 (2010 年 11 月, 大津)
 - 5) 勢戸和子, 田口真澄, 河原隆二, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 大阪府における STEC O157 クレド 8 の分離状況, 第 85 回日本感染症学会総会 (2011 年 4 月, 東京)
 - 6) 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 田口真澄: 市販食品から分離された志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の性状—ヒト由来株との比較, 第 50 回感染性腸炎研究会 (2011 年 6 月, 東京)
 - 7) 勢戸和子, 田口真澄, 河原隆二, 原田哲也, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 近畿ブロック IS データベースを用いた STEC O157 の流行株の探知, 第 85 回日本細菌学会 (2012 年 3 月, 長崎)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 近畿ブロックで使用されている EHEC の分子疫学手法

	PFGE	IS-printing System	MLVA (感染研プロトコール)
原理	全ゲノムを制限酵素で切断し、断片の電気泳動パターンを比較する	IS629挿入部位の分布を比較する	9か所のVNTRにおける「くり返し数」の多型を比較する
機器など	パルスフィールド・ゲル電気泳動装置 画像解析には専用ソフトが必要	遺伝子増幅装置 電気泳動装置 (Mupid など)	遺伝子増幅装置 シーケンサー フラグメント解析ソフト
主な試薬類	Proteinase K Pefabloc SC 制限酵素 アガロース (SeaKem Gold agarose)	IS-printing System (東洋紡) アガロース (NuSieve GTG, SeaKem GTG)	蛍光プライマー サイズマーカー
方法	菌液とアガロースを混合して、ゲルブロックを作製 タンパク質を分解・洗浄し、制限酵素で切断 電気泳動 染色、脱色、写真撮影	2組の反応液でマルチプレックスPCRを実施 (各最大18本のバンドが増幅される) 電気泳動 染色、写真撮影	3組の反応液でPCRを実施 キャピラリー電気泳動により各PCR産物サイズを測定 くり返し数を算出
所要時間	最短44時間	3~4時間	4~5時間
データ解析	バンドパターンの比較 (画像解析による近似度の算出)	バンドパターンの比較 バンドの有無を数値化して比較	各VNTRのくり返し数を比較
備考	他の下痢原性大腸菌や赤痢菌にも応用できる	O157に限る	O157に限る

表 2 近畿ブロック分担研究への参加状況

	IS法 ^{a)}			PFGE法 ^{b)}			MLVA法 ^{c)}	
	H21 ^{d)}	H22	H23	H21	H22	H23	H22	H23
施設1	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
施設2	◎	◎	◎	○	○	○		
施設3	○	○	◎	○	○	○	○	○
施設4	◎	◎	◎	○	○	○		
施設5	◎	△	◎					○
施設6	◎	◎	◎	○	○	○		
施設7		△	△	○	○	○	○	○
施設8	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
施設9	◎	◎	◎	○	○	○	○	
施設10	◎	◎	◎	◎	◎	◎		
施設11	◎	◎	◎	◎	◎	◎	○	○

a) ◎: 精度管理とデータベース登録に参加、○: 精度管理に参加、△: データベース登録に参加

b) ◎: 精度管理と画像解析に参加、○: 精度管理に参加

c) ○: 施設間差の検討に参加

d) 年度

表 3 MLVA 法の標的 Locus と増幅サイズ

PCR反応液	VNTR ^{a)}	Repeat unit	Off set (bp)
Reaction 1	Locus 25	6 bp	110
	Locus 3	6 bp	323
	Locus 34	18 bp	99
	Locus 9	6 bp	466
Reaction 2	Locus 17	6 bp	121
	Locus 19	6 bp	273
	Locus 36	7 bp	102
	Locus 37	6 bp	142
Reaction 3	Locus 10	6 bp	178

a) variable-number tandem repeat

表 4 近畿ブロックにおける IS 法精度管理の結果

菌株番号	精度管理株		参加 施設数	セット1		セット2	
	血清型	毒素型		判定一致 施設数	判定不一致プライマー (施設数)	判定一致 施設数	判定不一致プライマー (施設数)
H21-1	O157:H7	1+2	10	10		8	2-03(2)
H21-2	O157:HNM	1+2	10	6	1-03(2), 1-15(2)	9	2-01(1), 2-03(1)
H21-3	O157:H7	2	10	10		8	2-02(1), 2-03(2), 2-06(1)
H21-4	O157:H7	2	10	8	1-10(2)	6	2-01(2), 2-02(2), 2-03(3), 2-04(1), 2-09(1)
H21-5	O157:H7	2	10	9	1-03(1)	8	2-01(1), 2-02(1), 2-03(3), 2-04(1)
H21-6	O157:H7	1+2	10	10		8	2-02(2), 2-03(1), 2-04(1)
H22-1	O157:H7	2	9	9		9	
H22-2	O157:H7	2	9	9		9	
H22-3	O157:H7	1+2	9	9		8	2-10(1)
H22-4	O157:H7	1+2	9	9		9	
H22-5	O157:HNM	1+2	9	6	1-03(3)	9	
H22-6	O157:H7	2	9	9		8	2-09(1)
H23-1	O157:HNM	1+2	10	10		10	
H23-2	O157:H7	1+2	10	10		10	
H23-3	O157:H7	1+2	10	9	1-hlyA(1)	10	
H23-4	O157:H7	2	10	10		10	
H23-5	O157:H7	2	10	10		10	

表 5 近畿ブロックで分離された EHEC O157 の主な IS 型

IS型名	ISコード	登録 菌株数	登録 施設数	分離時期	備考		
2009年	09A	17455	82506	15	3	7~8月	5つの家族事例を含む
	09B	84591	215275	13	2	5月, 7~11月	2つの家族事例を含む
	09C	216893	117231	17	4	8~9月	角切りステーキ事例
	09D	216957	117231	15	5	4~5月, 7~11月	2つの家族事例を含む
	09E	249727	116975	15	4	2~3月, 9~12月	1つのグループ事例を含む
2010年	10A	17455	82510	18	5	2月, 6~9月	4つの家族事例を含む
	10B	84591	215275	37	6	4月, 6~12月	1つの集団事例と4つの家族事例を含む
	10C	118143	114891	20	7	6~9月	2つの家族事例を含む
	10D	216959	84463	13	6	3月, 7~9月	1つの家族事例を含む
	10E	216959	117231	41	4	7~10月	13の家族事例を含む
	10F	249711	116975	22	6	1~2月, 6~9月, 11月	5つの家族事例を含む
	10G	249725	116975	16	5	4~6月, 8~10月	
2011年	10H	249727	116974	13	4	5月	1つのグループ事例を含む
	10I	249727	116975	30	8	3~10月	7つの家族事例を含む
	11A	118141	114763	45	8	7~8月	5つの家族事例と1つの集団事例を含む
	11B	216959	84463	21	7	3月, 5~8月, 12月	2つの家族事例を含む
	11C	249711	116975	15	6	5~9月, 11月	1つの家族事例を含む
	11D	249725	116975	13	3	7~9月	1つの家族事例を含む
	11E	249727	116975	39	10	1月, 3月, 7~8月, 10~12月	3つの家族事例を含む

表 6 病原微生物検出情報への報告

発表者	タイトル	掲載ページ	掲載年
中嶋智子, 浅井紀夫, ほか	<i>Campylobacter jejuni</i> による食中毒事例と「生食」用合鴨肉の疫学的考察—京都府	31: 11-13	2010
平野 隆, ほか	施設で集団発生した腸管出血性大腸菌感染症—京都市	31:167-168	2010
小笠原 準, 中村寛海, ほか	2か所の保育施設における腸管出血性大腸菌O26発生事例—大阪市	32: 137-138	2011

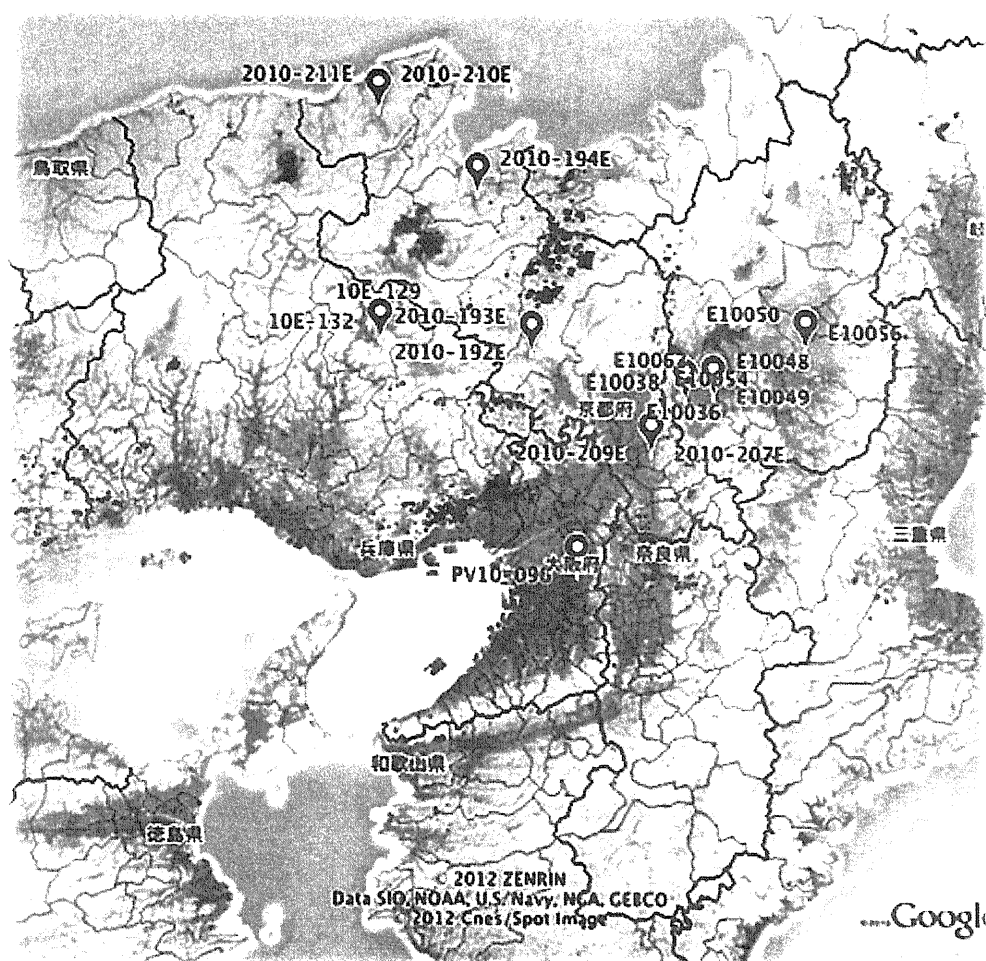


図 1 2010 年に分離された EHEC O157 IS 型 10E の分布

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

平成21年度～23年度 総合研究報告書(分担報告)

食品由来感染症調査における分子疫学手法に関する研究

研究分担者	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	上田 豊	鳥取県衛生環境研究所
	花原 悠太郎	〃
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	檜本 孝史	〃
	大島 律子	岡山県環境保健センター
	石井 学	〃
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	山田 裕子	〃
	河村 美登里	〃
	末永 朱美	広島市衛生研究所
	京塚 明美	〃
	田内 敦子	〃
	富永 潔	山口県環境保健センター
	野村 恭晴	〃
	矢端 順子	〃
	亀山 光博	〃
	下野 生世	徳島県立保健製薬環境センター
	石田 弘子	〃
	久保 由美子	香川県環境保健研究センター
	内田 順子	〃
	宮本 孝子	〃
	関 和美	〃
	有塚 真弓	〃
	浅野 由紀子	愛媛県立衛生環境研究所
	松本 純子	〃
	藤戸 亜紀	高知県衛生研究所
	鍋島 民	〃

研究要旨

平成21年度は、前年度まで検討してきた IS-printing System による検査法を用いて、中四

国地域で分離された腸管出血性大腸菌 O157 株について迅速な疫学解析を行い、感染予防や感染拡大防止に役立てた。同時に、PFGE 型別や MLVA 法を用いた疫学解析結果とも比較を行った。これらの結果から、IS-printing System により疫学情報と一致した迅速な疫学解析を、行うことが出来た。また、マイクロチップ電気泳動装置を使用した、IS-printing System の迅速化や MLVA 法への応用を検討した結果、IS-printing System での使用は今後さらに検討が必要であり、MLVA 法においては現状では、同一施設内での解析に限定すれば使用可能であることが示された。平成 22～23 年度は、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE 法) および IS-printing System による腸管出血性大腸菌 O157 菌株の精度管理と、各県で発生した事例においてこれらの分子疫学手法を応用して解析し、その有用性を評価した。精度管理では、各施設とも両方法によりほぼ同様の結果を示し、おおよそ良好であった。IS-printing System は、簡単・迅速な疫学解析ツールとして有用性が確認され、特殊な機器も不要なことから、応用の場が広がるものと考えられる。精度管理は、事例対応において正確で安定した結果を得るために、今後も継続して実施することが必要である。各県で発生した事例に分子疫学手法を応用し、IS-printing System の解析結果および PFGE 型を含む疫学情報を中四国ブロックの各施設が共有して、中四国地域の発生状況を把握できるよう試みた。将来的にデータベースによる疫学情報の管理と、それへの個別のアクセスを可能にすることが必要である。一部の県で検討しているシークエンサーを用いた MLVA 法については、特別な機器が必要であるため、今後機器等の整備ができた県を加えながら、順次検討していく予定である。

A. 研究目的

全国で毎年多数の患者が発生している腸管出血性大腸菌(以下 EHEC) 感染症について、分子疫学解析法としてパルスフィールドゲル電気泳動法(以下 PFGE 法)および IS-printing System の導入をはかり、それぞれの長所を活かした疫学解析を実施している。これら解析法の安定した解析精度を保つために、毎年精度管理を実施している。これにより、国立感染症研究所に PFGE 法および IS-printing System の正確なデータの集積を行い、データベースを構築することによって、将来的に広域な発生に対する疫学解析をどの地方衛生研究所からも可能にするため、準備を進めている。中四国ブロックでは、このような目的を達成するため、PFGE

E 法および IS-printing System の精度管理と、中四国地域で発生した事例に両方を適用して疫学解析を行い、データベース構築の準備段階として、地域内で解析結果の共有化を行った。

B. 研究方法

(1) 材料

平成 21 年度～平成 23 年度に中四国地域の各県で分離された EHEC O157 株を用いて、IS-printing System、PFGE 法およびマイクロチップ電気泳動装置を用いた MLVA 法、シークエンサーを用いた MLVA 法により、菌株相互の遺伝子解析を行った。また、EHEC O157 株を用いて、中四国地域の各施設の PFGE 法および

び IS-printing System による精度管理を実施した。

(2)方法

IS-printing System は、TOYOBO 製のキット (Version 2) を用い、取扱説明書に従って実施した。検査結果は、バンドが検出された場合を「+」、検出されなかった場合は「-」と表記した。さらに各プライマーセット毎にスタンダードのテンプレートで増幅されるバンドの分子量の大きい物から3つずつに区切り、それぞれについて順に 1, 2, 4 ポイントを与え、検出されたバンドのポイントを足した数字を Api の同定コードに準じてコード化して表記した(表 1)。PFGE 法は感染研ニュープロトコール(集菌はプレート法により行った。詳細は平成 18 年度の本報告書に準じた)に従って実施し、泳動像を画像解析ソフト (Fingerprinting II、Bio-Rad) で解析した。シークエンサーを用いた MLVA 法は、広島市衛生研究所および山口県環境保健センターにおいて実施した。

PFGE 法および IS-printing System の精度管理は、岡山県環境保健センターから EHEC 菌株 5 株を 9 施設に配付し、PFGE 法は 9 施設で実施し、泳動像と画像解析結果を、IS-printing System は 10 施設で解析した泳動像と IS コードをメールで当センターに返信してもらい、すべての施設の結果を解析した。

中四国地域で発生した EHEC O157 による事例由来株について、IS-printing System により解析し、結果をメールで岡山県環境保健センターに集積し、これらをまとめた中四国地域の発生状況を、各施設に還元して、広域発生の解析に利用し

た。

C.研究結果

1.平成21年度の結果

ISコードが一致した 115 株および PFGE 型が一致した 99 株について、これらの疫学指標相互の関連について、表 2 および表 3 にまとめた。

ISコード(表 2)は 33 グループに分かれ、15 グループ (45. 5%) はそれぞれ 1 種類の PFGE 型と対応していた。疫学的な関連(家族、接触者、同じ店で喫食など)が明らかな菌株間で ISコードが一致したグループは 23 グループで、このうち 1 種類の PFGE 型が対応したのは 20 グループ (87. 0%) で、PFGE 型が異なったのは 3 グループ (13. 0%) であった。PFGE 型(表 3)は 35 タイプに分かれ、25 タイプ (71. 4%) がそれぞれ 1 種類の ISコードと対応した。疫学的に関連のある株の PFGE 型は 21 タイプで、すべてのタイプが PFGE 型に対応する ISコードは 1 種類であった。

2.平成22年度の結果

当センターで実施した PFGE 法による精度管理では、遺伝子パターンは、① No.1555、No.1556、No.1562 と ② No.1563、No.1564 の 2 グループに大きく分かれ、さらに①は No.1556 の 220Kb 付近のバンドと No.1562 の高分子量域のバンドの有無により、②では No.1563 の 30 および 50Kb 付近のバンドの有無により、各パターン内で差が見られた(図 1 の円で囲んだ部分)。各施設の結果は、図 1 に示した。

IS-printing System による精度管理は

すべての施設が参加して実施した。当センターで実施した泳動像を図 2 に示した。また、各施設で実施した結果を増幅バンドの有無によりコード化し、図 2 の表に示した。

PFGE 法および IS-printing System とも、ほとんどの施設が同様の精度管理結果であったが、一部施設は IS-printing System の結果が異なっていた。

3.平成 23 年度の結果

当センターの PFGE 法による精度管理結果では、遺伝子パターンの類似度は、① (No.1609、No.1629) は 100%、② (No.1635 と No.1642) は約 97.5%、③(①と No.1638) は約 95.5%、②と③は約 91.5% で、いずれの株もかなり類似した PFGE パターンを示した。他県の 7 施設の解析結果も、多くの施設がほぼ同様な遺伝子パターンを示し、デンドログラムによる類似度は 87%以上であった(図 3)。施設のデンドログラムによる解析結果と PFGE 型について、表 4 にまとめた。菌株 No1609、1629 および 1638 のデンドログラムによる解析結果は、すべての施設が、これらの菌株中 2~3 株の類似度が 100%であるとした。No1635 と 1642 の類似度は 3 施設が 100%としたが、5 施設では異なった PFGE パターンであるとした。国立感染症研究所で実施した精度管理株の PFGE 型別結果は、それぞれ異なっていた。参加した 9 施設のうち、1 施設の PFGE 法による泳動像はやや不鮮明であった。

IS-printing System による精度管理は、中四国ブロックの 10 施設すべてが参加した。各施設の泳動像および IS コード一覧表は、図 4 および表 5 に示した。当センターの結果

では、菌株 No1609 と 1635 の IS コードが一致した。この 2 株に対して、No1629 と 1638 は 1st primer set による増幅バンドのうち、それぞれ異なったバンドが 1 つ、No1642 は 2nd primer set による増幅バンドのうちの一つが、異なっていた。他の 8 施設の解析結果も当センターと一致したが、1 施設は 1st primer set による増幅バンドのうち 2 つと、2nd set primer による増幅バンドのうち 6~8 つが異なっていた。この施設の泳動像は、1st set primer による低分子側の増幅産物が見られず、2nd set primer による泳動像はやや不鮮明で、増幅産物の確認が難しい状態であった。

平成 23 年度に中四国地域で発生した EHEC O157 による事例について、各県の施設で患者由来株を用いて IS-printing System による分子疫学的解析を行った。その結果と、PFGE 型を含む疫学情報を収集・解析し、結果を表 6~8 に示した。これらの株は 51 種類の IS コードに分類され、このうち多数の同一 IS コード株が、ほぼ同時期に複数の県で患者等から分離された事例は、613575-610446 が 7~8 月に 3 県で、717557-611657 が 7~9 月に 5 県で、717575-611657 は 7~10 月に 3 県で、717577-611657 も 6~9 月に 3 県で発生した事例などである。(表 8)。特に、IS コード (2nd) が 611657 の株は、IS コード (1st) も非常に類似しており、遺伝子型が非常に類似した多数の株が、広範囲な地域で 6~10 月に分離されていた。

D.考察

これまでの検討の結果、IS-printing

System は PFGE 法に比べて、迅速で手技が簡単であり、特殊な機器を必要としないため、広範な検査の場で利用可能な分子疫学解析法として、有用な検査法であることがわかった。しかしながら、両方とも一長一短があり、スクリーニング的な解析や詳細な解析など、必要とされる分析に応じて利用する必要がある。これらの分子疫学解析法を利用するに当たっては、きれいな泳動像と正確で安定した解析結果が要求される。このため、精度管理は重要であり、これを継続実施することで、担当者が代わっても検査法の精度を維持する目安となりうる。平成 22 年度から実施している精度管理は、ほとんどの施設から同様の結果を得ており、おおよそ良好な結果であった。結果が異なっていた一部の施設には、今後検査法の検討や手技の点検が必要であると思われる。

中四国地域で発生した EHEC O157 事例由来株について、各施設で実施した PFGE 法および IS-printing System による解析結果を収集し、それらをまとめて全ての情報を各施設に還元した。これは、将来国立感染症研究所に設置・整備されるデータベースについて、試行したものである。データベースの運用が始まれば、どの施設からも事例発生時にアクセスして、発生事例由来株の情報と全国の分離株の情報を比較し、広域発生の有無や感染源推定の端緒となる情報を得ることを可能とするものとする。現在はメールによる情報の収集と還元のため、タイムリーな情報提供ができないが、平成 21 年度と 23 年度に行ったこの試行により、遺

伝子的に非常に近い菌株による広域な発生例があったことが示された。このデータベースの構築にあたり、IS-printing System による解析結果は、現状は一応コード化されているため比較しやすいが、もともなる泳動像が不鮮明であったり、バンドの認識が違っていた場合は、間違ったデータを提供することになる。また、PFGE 法の場合は、泳動像そのものをデータとして提供するため、その鮮明さや正確さなどを安定して提供できる技術が必要になる。すなわち、将来の分子疫学解析に必要とされるデータベースの構築には、両法の結果の正確さが求められる。このため、今後一層、精度管理の重要性を認識し、精度管理を継続して実施することで、正確で安定した結果を得ることができるよう、努力する必要がある。

E. 結論

1. 分子疫学指標として、PFGE 法および IS-printing System は有用であり、必要とされる分析に応じて使い分けが必要である。
2. PFGE 法および IS-printing System の精度管理は、おおよそ良好な結果であった。
3. 精度管理の継続は、広域発生や感染源推定の解析に利用できるデータベースを将来構築するにあたり必要であり、データの精度を担保するものとして重要である。

表1 IS printing systemによる増幅バンドサイズとコード化のためのポイント

1st set 結果

菌株No.		コード化のためのpoint
PFGE型		
Primer No	Size (bp)	
1-01	974	1
1-02	839	2
1-03	742	4
1-04	645	1
1-05	595	2
1-06	561	4
1-07	495	1
1-08	442	2
1-09	405	4
1-10	353	1
1-11	325	2
1-12	300	4
1-13	269	1
1-14	241	2
1-15	211	4
eae	185	1
1-16	171	2
hlyA	137	4

2nd set 結果

菌株No.		コード化のためのpoint
PFGE型		
Primer No	Size (bp)	
2-01	987	1
2-02	861	2
2-03	801	4
2-04	710	1
2-05	642	2
2-06	599	4
2-07	555	1
2-08	499	2
2-09	449	4
2-10	394	1
2-11	358	2
2-12	331	4
2-13	301	1
2-14	278	2
2-15	240	4
2-16	211	1
stx2	181	2
stx1	151	4

表2 同一ISグループにおけるPFGE型と分離地域

IS グループ	ISコード		PFGE型	分離県(月)[関連事項]
	1st	2nd		
1	012057	214442	d192	香川県[家族]★
2	012057	214443	d833	山口県[家族]★
3	016057	216443	e721	岡山県(11月)[家族]★
4	105357	711642	e321, e322	高知県(8月)[家族等]☆
5	105457	711642	e322	香川県[家族]★
6	116575	201757	e291	愛媛県(9月)[家族]★
7	117177	601757	e225, e630	山口県(7月)[接触者]★、徳島県(11月)
8	144047	301443	e328	山口県(8月)[家族]★
9	201457	310242	e417	広島県(3月)[家族]★
10	211555	710403	e98	広島県(6月)[家族等]★
11	213577	610747	e201, e406	徳島県(9月)、岡山県(9月)
12	215555	710403	e98	山口県(6月)[家族]★
13	305457	611642	c47, e297	愛媛県(7月)[家族等]★、香川県[家族]★
14	307555	611657	e426	広島県(8月)、島根県(8月:PFGE検査中)
15	311057	310457	検査中	島根県(9月)[家族]
16	311557	710413	e377, e416, e423, e424	広島県(8月)、香川県
17	315577	611757	d527, e127	徳島県(6月)
18	317175	611757	e241	岡山県*(8月)★、山口県*(8月)★、愛媛県*(9月)★、 広島県(8・10月)、香川県
19	317557	611756	d501, e410	岡山県(7月)[家族等、食品]★
20	317575	611757	e265, e325, e330, e331	高知県(5月)[家族]☆、岡山県(7月)
21	317577	211757	e243, e274, e376	岡山県(6月)、香川県
22	317577	611756	d73, e627	愛媛県(7、10月)
23	317577	611757	e16, e429, e483, e626	愛媛県(2・10月)、広島県(8月)、香川県
24	613575	610646	e550	山口県(9月)[家族]★
25	613577	610646	a259, b216, d298, e738	岡山県(10月)、香川県[家族]★、広島市
26	703577	610657	e267	山口県(8月)[焼肉店事例]★
27	707555	611653	e402, e503	岡山県(8月)、徳島県(9月)[焼肉店事例等]★
28	717057	231557	e269, e270	岡山県(7月)、広島県(7月)[接触者]★
29	717557	611653	e419	広島県(6月)[接触者]★
30	717557	611657	d27, d92, e554	岡山県(10月)、山口県(7月)[家族]☆(8、10月)
31	717575	611657	e203, e273, e409	岡山県(7・8月)、広島県(9月)[接触者]★(10月)
32	717577	611457	e219	岡山県(6、7月)
33	717577	611657	d111, e230, e389, e430, e431	岡山県(7、9月)、広島県(8、9月)、山口県(8月)

*ISグループ21：全国的レストランチェーンによる発生事例関連株

★疫学的関連株のISコード及びPFGE型が一致(20グループ)

☆疫学的関連株のISコード及びPFGE型が不一致(3グループ)

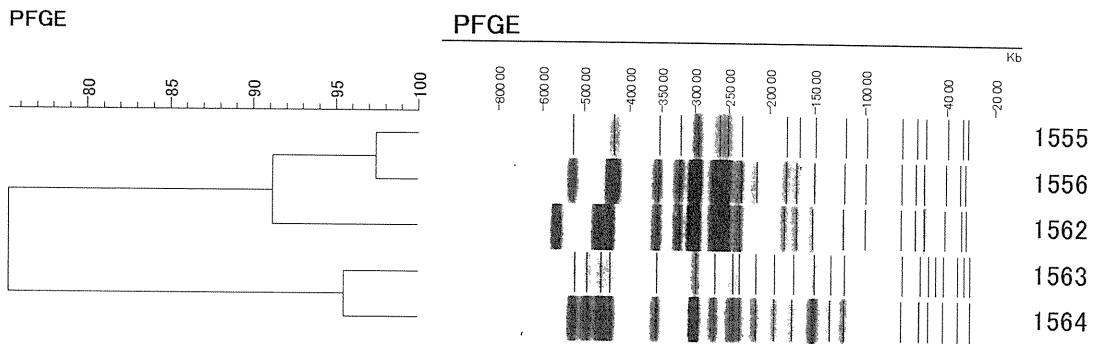
表3 同一PFGE型におけるISコードと分離地域

PFGE型	IS グループ	ISコード		分離県(月)[関連事項]
		1st	2nd	
c293		317457	611757	岡山県(8月)[食品]
		317577	213757	岡山県(8月)
		317577	411757	山口県(1月)
c47		305457	001642	岡山県(7月)
	13	305457	611642	愛媛県(7月)[家族等]★
c536		717057	211557	岡山県(7、8月)
d111	33	717577	611657	広島県(8、9月)
d192	1	012057	214442	香川県[家族]★
d27	30	717557	611657	岡山県(10月)、山口県(7月)
d298	25	613577	610646	香川県[家族]★
d501	19	317557	611756	岡山県(7月)[家族等、食品]★
d833	2	012057	214443	山口県[家族]★
d92	30	717557	611657	山口県(7、8月)
e203	31	717575	611657	広島県(9月)[接触者]★
e219		717577	411457	岡山県(7月)
	32	717577	611457	岡山県(6、7月)
e225	7	117177	601757	山口県(7月)[接触者]★
e230	33	717577	611657	岡山県(7月)、山口県(8月)
e241*	18	317175	611757	岡山県*(8月)★、山口県*(8月)★、愛媛県*(9月)★、 広島県(8・10月)、香川県
e265	20	317575	611757	岡山県(7月)
e266		615457	011656	岡山県(7月)
		615457	211656	岡山県(7月)
e267	26	703577	610657	山口県(8月)[焼肉店事例]★
e270	28	717057	231557	岡山県(7月)、広島県(7月)[接触者]★
		717057	233557	岡山県(7月)
e272		117175	601757	岡山県(8月)
		117175	701757	岡山県(8月)
e273	31	717575	611657	岡山県(7月)、広島県(10月)
e291	6	116575	201757	愛媛県(9月)[家族]★
e297	13	305457	611642	香川県[家族]★
e322	4	105357	711642	高知県(8月)
	5	105457	711642	香川県[家族]★
e328	8	144047	301443	山口県(8月)[家族]★
e417	9	201457	310242	広島県(3月)[家族]★
e419	29	717557	611653	広島県(6月)[接触者]★
e426	14	307555	611657	広島県(8月)
e503	27	707555	611653	徳島県(9月)[焼肉店事例等]★
e550	24	613575	610646	山口県(9月)[家族]★
e554	30	717557	611657	山口県(10月)
e626		317557	611757	愛媛県
	23	317577	611757	愛媛県(10月)
e721	3	016057	216443	岡山県(11月)[家族]★
e98	10	211555	710403	広島県(6月)[家族等]★
	12	215555	710403	山口県(6月)[家族]★
e99		145047	103443	山口県
		145047	303443	山口県

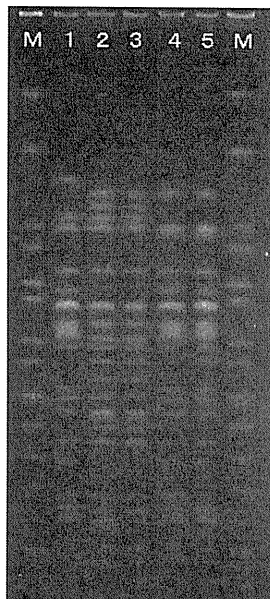
*PFGE型(e241): 全国的レストランチェーンによる発生事例関連株

★疫学的関連株のISコード及びPFGE型が一致(21グループ)

図1 精度管理菌株の PFGE 法による遺伝子解析結果(平成 22 年度)



(A)



1 : 菌株 No 1562

2 : 菌株 No 1563

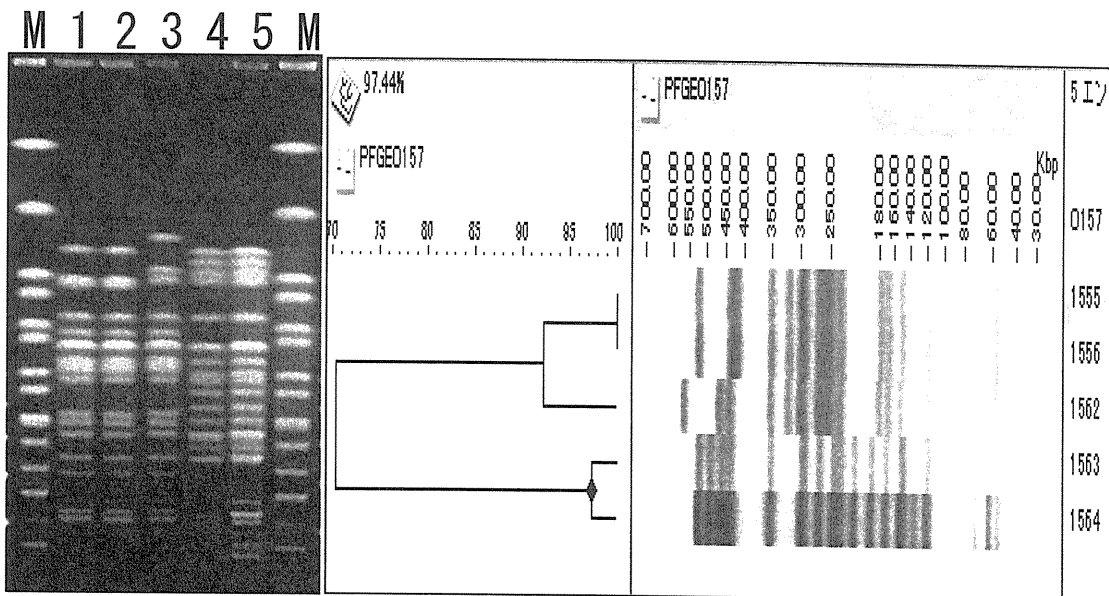
3 : 菌株 No 1564

4 : 菌株 No 1555

5 : 菌株 No 1556

M : マーカー (Salmonella Braenderup H9812 株)

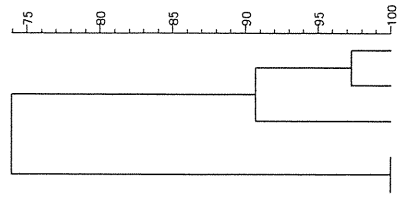
(B)



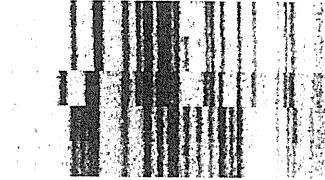
PFGE 法泳動像とデンドログラム

(C)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
marker_Xbal

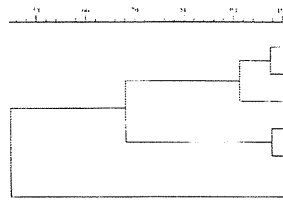
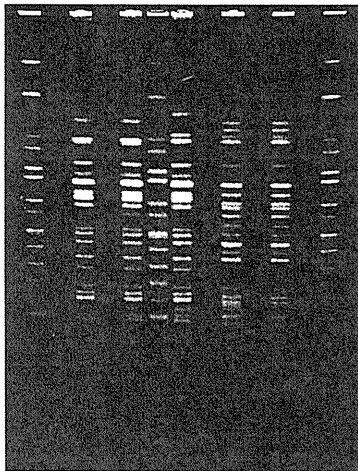


marker_Xbal



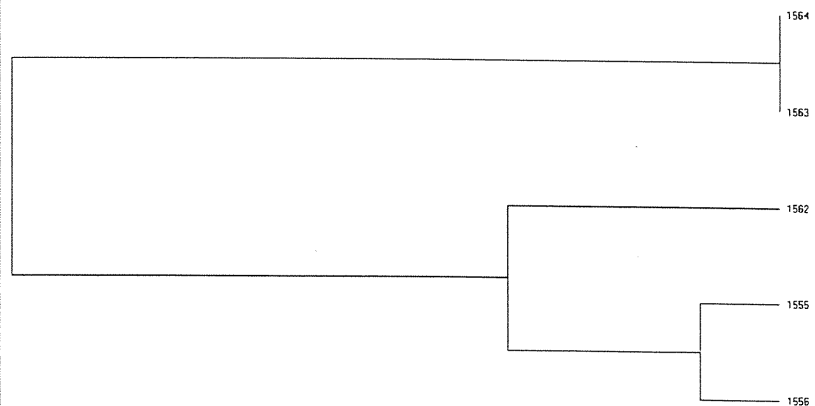
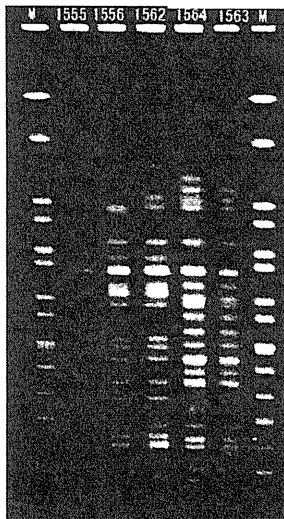
精度管理1	1555	VT1,2
精度管理2	1556	VT1,2
精度管理3	1562	VT1,2
精度管理4	1563	VT2
精度管理5	1564	VT2

(D)



1555
1556
1562
1563
1564
SBr
SBr

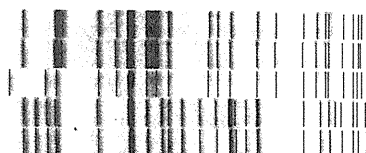
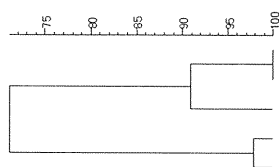
(E)



(F)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
EHEC

EHEC

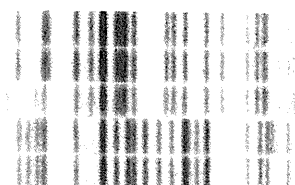
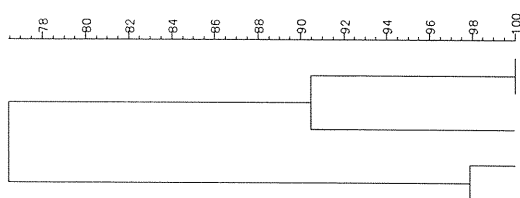


.1555精度管理2010
.1556精度管理2010
.1562精度管理2010
.1563精度管理2010
.1564精度管理2010

(G)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
O157

O157

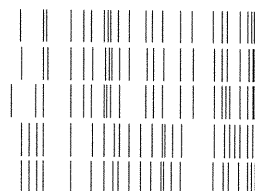
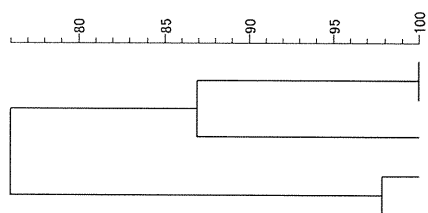


.No.1555
.No.1556
.No.1562
.No.1563
.No.1564

(H)

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
O157

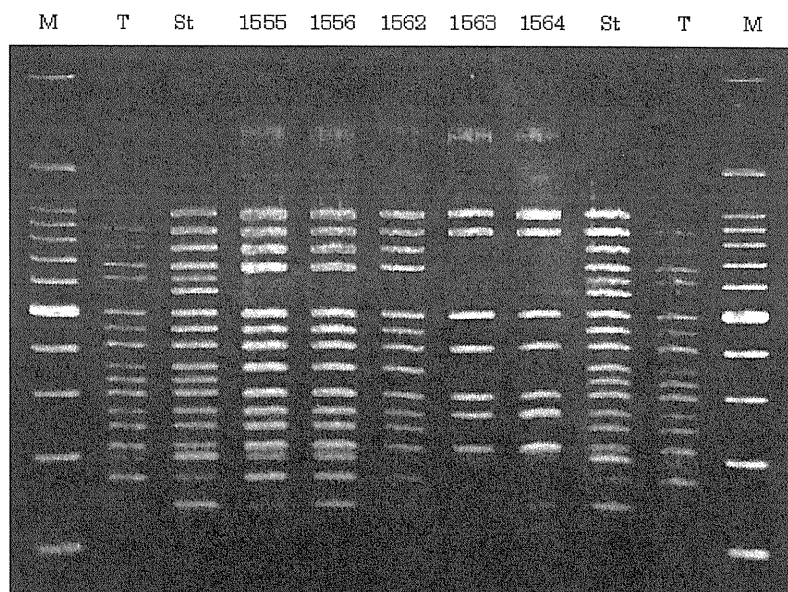
O157



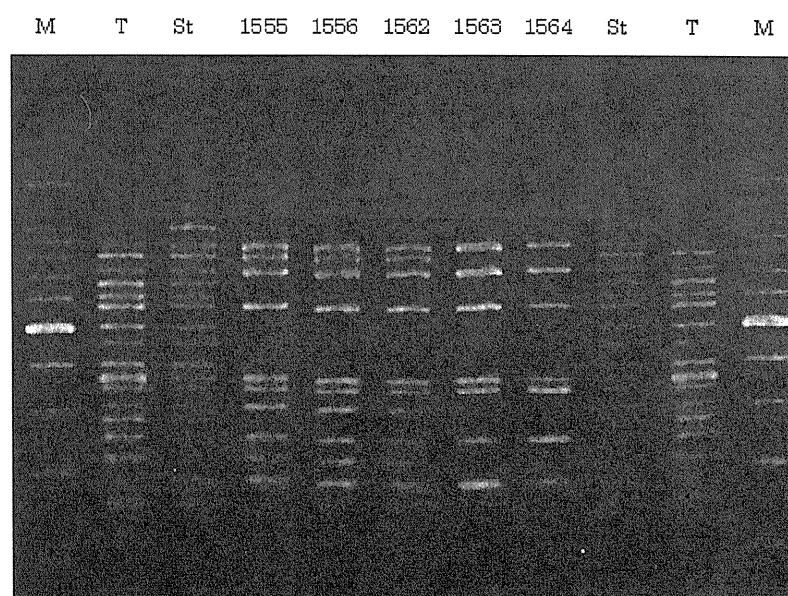
2010パルスネット精度管理 1555
2010パルスネット精度管理 1556
2010パルスネット精度管理 1562
2010パルスネット精度管理 1563
2010パルスネット精度管理 1564

図2 精度管理菌株の IS-printing System による遺伝子解析結果(平成 22 年度)

菌株 No	施設	1st primer code	2nd primer code	備考
1555	A	717577	737777	
1556	B~I		611657	
1562				
1563	A	305455	313777	*1 一部施設で code の換算ミス あり
1564	B~I		211642 *1	



1st set Primer



2nd set Primer