

IS-printing system などの方法が開発された。これらのうち、IS-printing system は宮崎大学の林教授らにより開発された方法であり、EHEC O157 の IS 流域を標的としたマルチプレックス PCR である。この方法では、得られる結果がデジタル的なデータであるためにデータベース化が容易である。また、PFGE と比較して解析結果が得られるまでの時間が大幅に短縮されることから、多くの地方衛生研究所において EHEC O157 の分子疫学解析に応用されている。特に、全国地方衛生研究所技術協議会、九州ブロックと大阪ブロックにおいては独自のデータベースシステムを既に構築し、ブロック内で分離された EHEC O157 の解析データを蓄積している。しかし、北海道・東北・新潟ブロックでは IS-printing system の普及が十分進んでいない。

本研究では、全国地方衛生研究所技術協議会、北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所に IS-printing system を普及させると共に、国立感染所研究所が構築している IS-printing データベースシステムへの参画を可能とすることを目的として、ブロック内地方衛生研究所における IS-printing system の基礎的な精度管理に関する共同研究を実施した。

B. 研究方法

1. 参加機関

北海道立衛生研究所、札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課、青森県環境保健センター、岩手県環境保健研究センター、山形県衛生研究所、宮城県保健環境センター、仙台市衛生研究所、福島県衛生研究所、新潟県保健環境科学研究所、新潟市衛生環境研究所、秋田県健康環境センターの 11 機関が参加し、10 機関のデータを解析した。

2. 供試菌株と DNA 溶液

秋田県で分離された EHEC O157 分離株 4 株 (表 1) を供試した。これらの株から

QIAamp DNA Mini Kit により DNA を抽出し、15 μ g/ml の濃度に調製した溶液を試料として参加機関に送付した。

3. IS-printing system

TOYOBO 製 IS-printing system (Lot.No. 2601A、有効期限 2014/11)、5 \times TBE (ニッポンジーン)、NuSieve 3:1 アガロース (ロンザジャパン) を一括購入し、参加機関に配布した。IS-printing はキット付属の取り扱い説明書に従い実施した。但し、電気泳動用ゲルには NuSieve 3:1 アガロースを使用した。参加機関で使用した PCR 装置の一覧を表 2 に示す。

4. 結果の集計

集計用エクセルファイルを作成し、参加機関に配布した。記載項目は IS-printing の結果 (1st Set、2nd Set)、使用 PCR 装置、テンプレート量、IS-printing 実施経験等とした。

C. 研究結果及び考察

表 3 に供試 4 株の IS-printing 1st set PCR の結果を示す。4 株共に 10 機関中 9 機関で同一の結果が得られたが、1 機関では hly の増幅がマイナスとなり、結果が他 9 機関と異なった。一方、表 4 に供試 4 株の IS-printing 2nd set PCR の結果を示す。EC15388 と EC15423 については、10 機関の結果が一致したが、EC15419 と EC15468 では 1 機関で 2-02 と 2-03 の結果が他 9 機関の結果と異なった。

今回の検討では、キット付属のプロトコールに従い IS-printing を実施した場合、高分子側と低分子側の増幅断片で PCR 産物の量が大きく異なる傾向がみられた。特に、高分子側のバンドで増幅断片の量が過剰となり、バンドが著しく太くなる、あるいはバンド周辺がスメアーになるなどのため、判定が困難となる傾向が顕著であった。この様子を秋田県で実施した例に示す (図 1 A)。他機関においてもこの傾向は同様で

あり、多くの機関が判定に困難を来した。泳動像は示さないが、2nd set で EC15419 と EC15468 の高分子側 2-02 と 2-03 の結果が他 9 機関の結果と一致しなかった 1 機関の泳動像では、特に 2-02、2-03 を含む高分子側増幅断片の量が過剰な傾向が顕著であり、このことが当該機関において 2-02 と 2-03 の結果が他 9 機関と異なった原因と考えられた。

この問題を克服するために、いくつかの検討が行われた。図 1B に示すように、秋田県ではゲルへのアプライ量を $5\mu\text{l}$ から $2\mu\text{l}$ としたところ、高分子側増幅断片の判定が著しく容易となった。ゲルへのアプライ量を減らすことにより高分子側の判定が容易となったことを示した機関は他にもあり、判定を容易にするために有効な手法と考えられたが、1st set の低分子側で hly 増幅断片などが視認し難くなるなどの問題が発生することも同時に指摘された。山形県では各 set の電気泳動に 2 枚のゲルを使用し、ゲル濃度、アプライ量、泳動時間を最適化することにより、高分子側と低分子側どちらの断片の判定も容易となることを示した (図 2A、図 2B)。この方法によると、全てのバンドの判定が容易且つ確実となると思われる。福島県においては、泳動バッファーに $1\times\text{TAE}$ を使用することにより高分子側バンドの判定が容易となることを示したが、 $1\times\text{TAE}$ ではプロトコール指定の $0.5\times\text{TBE}$ と比較して低分子側バンドの先鋭度と分離が劣ることを指摘している。

一方、秋田県では BIO-RAD 製 PCR 装置を使用した場合、供試株全てで hly 増幅断片が得られず、AB GeneAmp PCR System 9700 を使用すると hly 増幅断片が得られることを経験した。また、高分子側断片の判定を容易とするためにゲルへのアプライ量を減らした場合にも hly 増幅断片を視認す

ることが困難になる傾向がみられることが指摘された。EHEC O157 は hly と eaeA を保有し、通常は IS-printing system でこれらの遺伝子が陽性となるが、PCR 装置の種類とアプライ量によっては hly 遺伝子が偽陰性となる場合があり得ると考えられる。実際、今回、供試 4 株全てが hly 陰性と判定した 1 機関では PCR 産物を 3 倍に希釈してアプライしていた。この機関では、反応液の希釈により高分子側断片の判定が容易となったものの hly 増幅断片の視認が困難となり、hly 陰性と判定されたものと推察された。

D. 結論

今回参加した 10 機関のうち、5 機関の担当者が IS-printing を行うのが初めてであった。IS-printing system は既に市販の試薬キット化されており、再現性なども十分検討されていると思われるが、今回の検討で正確な判定を可能にするためには電気泳動条件等を最適化する必要のあることが浮き彫りとなった。山形県が今回示した泳動条件 (図 2) によると判定が容易且つ確実になるとと思われることから、今後、判定が困難な場合にはこの条件での試行が推奨される。全国地方衛生研究所技術協議会、北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所に IS-printing system を普及させると共に、ブロック内で得られたデータを国立感染症研究所で構築している IS-printing データベースに継続して登録していくためには、ブロック内における IS-printing system の実験条件の検討と精度管理を継続する必要がある。

E. 健康危険情報

該当なし。

F. 研究発表

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

表1 EHEC O157 供試株 (秋田県)

菌株番号	分離年月日	由来	病原遺伝子
EC15388	2012. 9. 28	散発下痢患者	VT-1, 2 eaeA
EC15419	2012. 10. 30	散発下痢患者	VT-2 eaeA
EC15423	2012. 11. 2	牛便	VT-2 eaeA
EC15468	2012. 11. 29	散発下痢患者	VT-1, 2 eaeA

表2 使用 PCR 装置

北海道	AB 2720 Thermal Cyclcr	山形県	BIO-RAD My Cyclcr
札幌市	Takara Model TP600	福島県	BIO-RAD iCyclcr
青森県	AB GeneAmp PCR System 9700	仙台市	BIO-RAD PTC-220
岩手県	Takara Model TP600	新潟県	AB GeneAmp PCR System 9700
秋田県	AB GeneAmp PCR System 9700	新潟市	AB Veriti Thermal Cyclcr

表3 供試4株の IS-printing 1st set PCR 結果

1st Set	EC15388		EC15419		EC1542		EC15468	
	9/10機関	1/10機関	9/10機関	1/10機関	9/10機関	1/10機関	9/10機関	1/10機関
1-01	+	+	-	-	+	+	+	+
1-02	+	+	-	-	+	+	-	-
1-03	-	-	-	-	-	-	-	-
1-04	-	-	+	+	-	-	+	+
1-05	-	-	-	-	-	-	-	-
1-06	-	-	+	+	-	-	-	-
1-07	+	+	+	+	-	-	+	+
1-08	+	+	-	-	-	-	-	-
1-09	+	+	+	+	-	-	-	-
1-10	+	+	-	-	-	-	-	-
1-11	-	-	-	-	-	-	-	-
1-12	+	+	-	-	+	+	-	-
1-13	+	+	-	-	+	+	+	+
1-14	-	-	-	-	-	-	-	-
1-15	+	+	+	+	+	+	+	+
eae	+	+	+	+	+	+	+	+
1-16	+	+	+	+	-	-	+	+
hlyA	+	-	+	-	+	-	+	-

表4 供試4株の IS-printing 2nd set PCR 結果

2nd Set	EC15388	EC15419		EC15423	EC15468	
	10/10機関	9/10機関	1/10機関	10/10機関	9/10機関	1/10機関
2-01	—	+	+	+	+	+
2-02	+	+	—	—	+	—
2-03	—	—	+	—	—	+
2-04	+	—	—	+	—	—
2-05	—	—	—	—	—	—
2-06	—	—	—	—	—	—
2-07	+	+	+	—	—	—
2-08	—	+	+	—	—	—
2-09	—	—	—	—	—	—
2-10	+	—	—	—	—	—
2-11	+	—	—	—	—	—
2-12	+	—	—	+	+	+
2-13	+	—	—	+	—	—
2-14	—	—	—	—	—	—
2-15	+	+	+	—	+	+
2-16	+	+	+	—	+	+
stx2	+	+	+	+	+	+
stx1	+	—	—	—	+	+

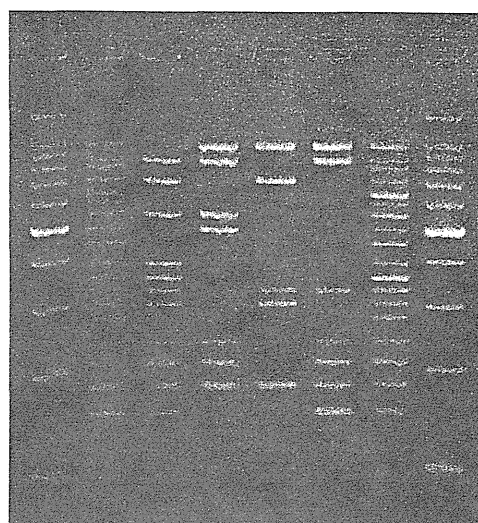
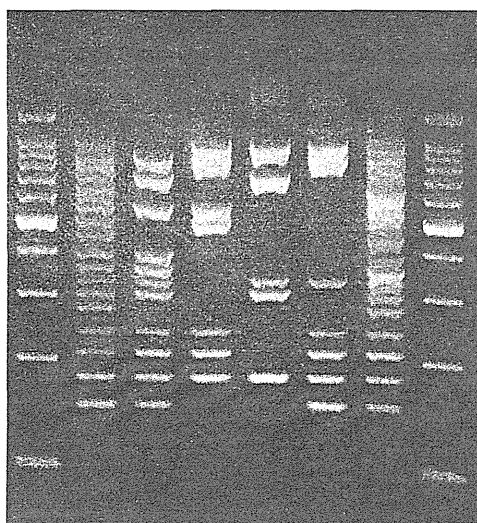
図1 異なるアプライ量で実施した 2nd set PCR 電気泳動像 (秋田県)

A 5 μ l アプライ

B 2 μ l アプライ

M S 1 2 3 4 P M

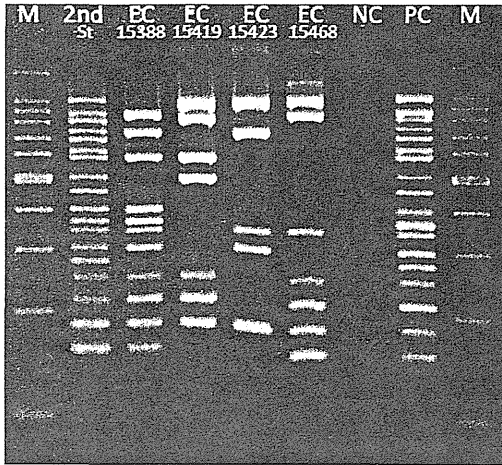
M S 1 2 3 4 P M



M: 100bp ladder, S: standard DNA, 1: EC15388, 2: EC15419, 3: EC15423, 4: EC15468, P: template mix

図2 ゲル濃度、アプライ量、泳動時間を至適化して実施した 2nd set PCR 電気泳動像 (山形県)

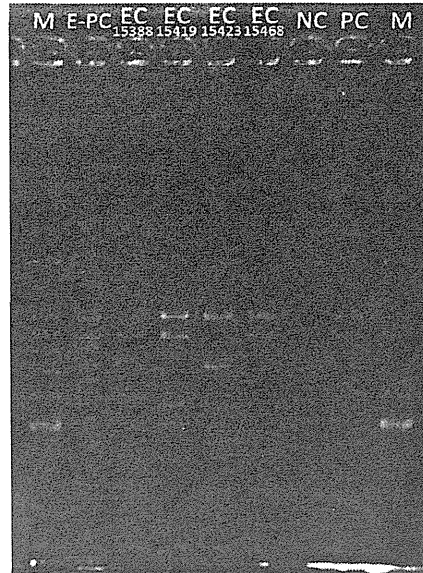
A 低分子判別用



3% NuSieve GTG Agarose (EtBr -) 80 mins
 コーム幅 4mm、産物 5 μ l アプライ

E-PC・・・電気泳動用陽性コントロール
 PC・・・PCR用陽性コントロール

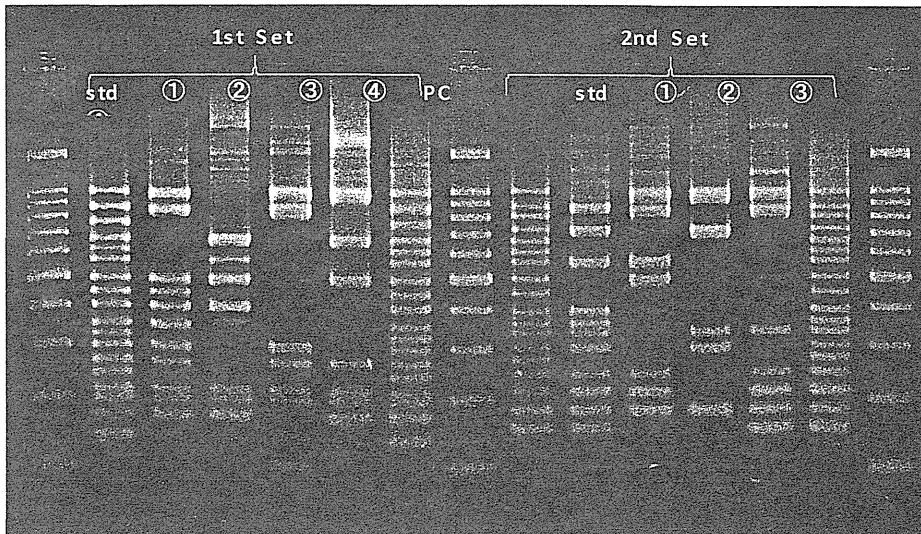
B 高分子判別用



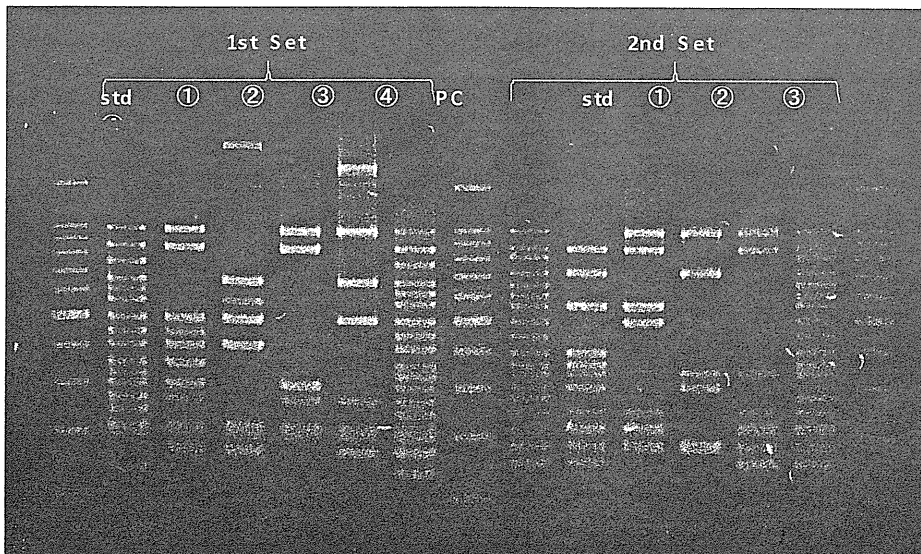
2% NuSieve 3:1 Agarose (EtBr -) 70 mins
 コーム幅 2mm、産物 1 μ l アプライ

図3 異なるバッファーを使用した電気泳動像 (福島県)

A 0.5×TBE 3% NuSieve3:1



B 1×TAE 3% NuSieve3:1



厚生労働科学研究費助成金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「病原体解析手法の高度化による効率的な食品由来感染症探知システムの構築に関する
研究」

平成 24 年度 研究分担報告書

関東ブロックで分離された食中毒起因菌の分子疫学解析法の検討と PFGE 法の精度管理

研究分担者	東京都健康安全研究センター	甲斐 明美
研究協力者	茨城県衛生研究所	山本 和則
	栃木県保健環境センター	内藤 秀樹
	群馬県衛生環境研究所	河合 優子
	埼玉県衛生研究所	倉園 貴至
	千葉県衛生研究所	平井晋一郎
	神奈川県衛生研究所	古川 一郎
	横浜市衛生研究所	松本 裕子
	山梨県衛生環境研究所	植松 香星
	長野県環境保全研究所	上田 ひろみ
	静岡県環境衛生科学研究所	柴田 真也
	東京都健康安全研究センター	小西 典子, 齊木 大
		尾畑 浩魅, 仲真 晶子

研究要旨：

腸管出血性大腸菌(EHEC)の分子疫学的解析を関東ブロックの地方衛生研究所間で、相互に行うために、PFGE 法及び IS-printing system (IS) 法の精度管理を実施した。EHEC O157 の共通株 2 株を用いて PFGE 解析を行った結果、概ね良好な泳動像が得られたが、染色が薄くバンドがはっきりしない写真もあった。約 100kb 以下の小さいサイズのバンドは不明瞭な場合が多く、BioNumerics での解析でバンドの選択が困難な施設が多かった。近年、地方衛生研究所では職員の異動も頻繁に行なわれ、一定技術の確保が課題となっている。本研究班を通じて精度管理を実施することで、各地研の PFGE 解析技術の向上と情報交換が行われ、非常に有意義であった。

EHEC O157 の新しい解析法である IS 法について、共通菌株を用いて地研間でその有用性の検討を行なった。本法は、PCR 法を基本とした解析法であり、その結果判定は遺伝子バンドの有無で行なうため、非常に迅速、簡便に菌株の解析を行うことが可能であり、地研間で相互比較を容易に行うことができた。しかし、菌株によっては同じ IS パターンでも PFGE 型が異なる株が存在するので、結果の解釈には注意が必要である。

A. 研究目的

食中毒・感染症の発生時、患者や調理従事者、食品等から分離された病原体を詳細に解析し比較することは、感染経路や原因食品を特定するために重要である。また、腸管出血性大腸菌感染症では、しばしば広域的集団発生 (Diffuse outbreak) が発生し問題となる。その際、迅速に原因食品を特定し、感染の拡大防止策を講じなければならぬ。特に患者が複数自治体に渡る事例では、各地方衛生研究所で解析した PFGE 画像を相互に電送し、比較解析する方法が試みられている。そのため、各地研には一定レベルの PFGE 解析精度が求められているが、頻繁に異動が行なわれる施設では解析技法の伝承が課題となっている。

本研究では、関東ブロック 10 地方衛生研究所間で PFGE 法の精度管理を実施した。

一方、腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 の新しい解析法である IS-printing system (IS) 法は、PCR 法を基本とした解析法であり、その結果判定は遺伝子バンドの有無で行なうため、非常に迅速、簡便に菌株の解析を行うことが可能であると期待されている。そこで IS 法の有用性について検討を行なった。

B. 研究方法

1. PFGE 法の精度管理

1) 供試菌株

共通菌株として各地研に EHEC O157 を 2 株送付し、PFGE 解析を実施した。供試菌株は菌株 A (VT1+VT2 産生菌, E12-309) および菌株 B (VT2 産生菌, E12-311) である。

2) PFGE 解析

国立感染症研究所プロトコールにより実施した。

アガロースゲルの作製: 0.7mm プラグキャスターを使用し、Seakem Gold Agarose (TAKARA, 1%) で作製した。使用する菌液の調整は各施設の方法で行なった。

DNA 抽出法: Proteinase K (1mg/ml), 1% N-lauroylsarcosine-0.5M EDTA (pH8.0) で 50°C, 18~20 時間行なった。

制限酵素処理: 制限酵素 *Xba* I (30U/ブロック) で 37°C, 4 時間処理した。

電気泳動用アガロース: 電気泳動用アガロースは、Seakem Gold Agarose (1%) を使用した。

泳動条件: 6V/cm, 2.2~54.2 sec, 20~22 時間, buffer 温度 12°C で行なった。泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの下から 1.0 cm~1.5 cm になるように、各施設で調整した。

サイズマーカー: *S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したものを、泳動用アガロースの両端に入れた。

PFGE 写真の撮影: 各地研で通常行なっている方法で撮影した。写真中の泳動像が小さいと解析ソフトを用いた解析が困難になるため、アガロースゲルを写真画面いっぱい、大きく写るように撮影した。

PFGE 解析成績の電送: 各地研で撮影した画像は、解像度 400~600dpi 程度、グレースケールで取り込み、tiff 形式で保存後、電子メールで送付した。

画像解析: 解析ソフト BioNumerics を使用した。78Kb 以上のバンドを対象とし、バンドの選択は目視で行った。相同性は Dice 法、トレランス 1.2% で解析し、クラスター解析は、UPGMA 法で実施した。

2. IS-printing system 解析

1) 共通株を用いた解析

PFGE 法の精度管理用に用いた O157 株 2 株について、各施設で IS 法を実施した。結果はバンドが認められた場合を「1」、バンドが認められない場合は「0」と記入し、結果表に記入した。

2) PFGE 法でバンド数が数本異なる株の IS 解析

2012 年に分離された株のうち、PFGE 解析でバンドが数本異なる菌株について IS 解析を実施し、PFGE 結果との比較を行なった。

3. 各地研で分離された O157 株の解析

2012 年に各地研で分離された O157 株 10 株程度について PFGE 法および IS 法を実施し、結果を送付してもらい解析した。

C. 研究結果

1. PFGE 法の精度管理

EHEC O157 の共通株 2 株を用いて、9 施設で解析を行った (写真 1)。全体には非常に分離も良く、シャープなバンドが得られている写真であった。しかし中にはバンドが太く、ピントが合っていないような写真や、染色が薄い写真、ブロックの埋め込み時に曲がってしまったため、バンドが曲がったまま泳動された写真も認められた。また、約 100kb 以下の小さいサイズのバンドは不明瞭な場合が多く、解析ソフトを用いた解析でバンドの選択が困難であった施設が多かった。そのため 78.2kb 以上のバンドを対象にデンドログラム解析を実施した。デンドログラム解析結果を図 1 に示した。菌株 A、菌株 B でそれぞれクラスターを形

成しており、いずれも近似度は 92% 以上であった。しかし、菌株 B の 1 株は近似度が低く 75% になったしまった。これは分離が悪く、更に染色が薄かったためにバンドの選択が困難であったためと考えられた。

2. IS-printing system 解析

1) 共通株を用いた解析

PFGE 法の精度管理用共通株について各施設で IS 法による解析を行った。共通株 2 株の解析結果を写真 2 および表 1 に示した。解析結果は、9 施設中 8 施設では一致していたが、1 施設で異なる結果であった。結果が異なっていたのは、1st プライマーセットの *hly* 遺伝子で、菌株 A、B とともに陰性であった。また、菌株 B では 561bp (6 番目) のバンドと *eae* 遺伝子が陰性であった。

菌株 A は 1st プライマーセットの分子量の大きい位置に特徴的な非特異的なバンドが認められるが、ほとんどの施設でこの非特異的バンドの記入がされていなかった。各施設の IS 解析写真を確認したところ、全ての施設で非特異的バンドが認められているため、異なる自治体でパターンを比較を行なう場合は、結果を判定した表だけでなく、写真も合わせて確認することで、より正確に比較することが可能であることが明らかとなった。

2) PFGE 法でバンド数が数本異なる株の IS 解析成績

東京都で分離された株のうち、PFGE 法でパターンは類似しているが、バンドが数本程度異なる株について IS 解析を実施した。PFGE 画像を写真 3 に示した。東京都では独自に PFGE 型を付けており、レーン 1 の株を T-1206 として基準とし、数本異なる

る株はサブタイプ (b~z) として型別している。今回これらの株について IS 解析を実施した結果、レーン 1 (T-1206) とレーン 5 (T-1206 f) の株が同じ IS パターンを示した他は、全て異なる IS パターンを示した (表 2)。IS 法は PFGE パターンと比較的パラレルな結果を示すが、異なる PFGE パターンでも同じ IS 型を示す株があることが明らかとなった。

3. 各施設で分離された EHEC O157 株の解析

各施設で分離された O157 の 10 株程度について IS 解析を実施し、IS パターンを比較した。その結果、2 施設以上で同じパターンが検出された例が 14 パターンあった。中でもパターン 2 は 5 施設から 6 株分離されていた。今後、PFGE 画像ともあわせて詳細な検討を行なう予定である。

D. 考察

各地方衛生研究所で実施する PFGE 法の標準化を目的として、EHEC O157 2 株を共通菌株として各地研へ配布し、PFGE 解析を行った。PFGE の写真は、各施設で電子化し、東京都健康安全研究センターに電送後、解析を試みた。例年、施設によって写真の大きさやファイル形式が異なるため、今年度は画面いっぱい泳動像が写るように撮影してもらった。更に、施設によって画像の取り込み方法が異なるため、統一した方法を示し、それに従って電子化・電送する方法で行なった。そのため今回は極端に小さい画像は無く、BioNumerics 解析でバンドを選択するのは比較的容易であった。全体的にシャープできれいな泳動像であっ

たが、一部の施設では染色が非常に薄い写真や酵素処理が不十分だと思われる写真、ブロック作製時の菌濃度が菌株間で異なる写真等が認められた。今年度は関東ブロック 11 施設中、異動等で担当者の交代があった施設が 4 施設あった。PFGE 法はマニュアルの整備だけでなく、実際に解析を行い慣れることでコツをつかんでいく部分があるため、技術の引継ぎは重要である。本研究班を通じて、最低 1 年に 1 度は精度管理を行ない、情報交換を行なっていくことが重要であると考えられた。

IS 法は PCR ベースの解析で、プライマーもキット化されているため、PFGE 法と比較して解析し易い方法である。また、結果がデジタル表記のため、情報交換・共有が容易である。今回、共通株 2 株の解析において 10 施設中 9 施設で、全て同じ成績となった。異なった成績であった 1 施設では、1st プライマーセットの *eae* 遺伝子、*hly* 遺伝子および 561bp のバンドの 3 本で、本来陽性であるが陰性と判定されていた。この施設では DNA 抽出の問題、あるいは PCR 反応、試薬調整等に問題があった可能性も否定できない。

1st プライマーセットの *eae* 遺伝子および *hly* 遺伝子、2nd プライマーの *stx1*、および *stx2* は内部コントロール (IPC) という意味もあるので、陽性にならない場合は再度検討する必要があることを確認しなければならない。今回の IS 法に関して、キットのロットによって *hly* 遺伝子のバンドが非常に薄く判定困難であったという意見があった。キットのロット間でバンドの出方に大きな差があることは問題であるので、今後メーカーにも連絡をとり改良が必要かと思

われた。

菌株 A の IS パターンをみると 974bp より大きいサイズの非特異バンドが認められた。しかし各施設で記入した判定表に、非特異バンドの記載がない施設が多かった。2012年北海道で発生した O157 集団食中毒由来株は、非特異バンドを有することが大きな特徴であった。判定表だけで比較を行なうと、こうした特徴が落ちてしまうことがあるので、今後非特異バンドの記載を徹底していく必要がある。他自治体と遺伝子型を比較する際、迅速性、簡便性から IS 法は非常に有用であるが、菌株によっては同じ IS パターンでも PFGE 型が異なる株が存在するので結果の解釈には注意が必要である。

今回、各施設で分離された株について PFGE 解析および IS 解析を実施した結果、2施設以上で同じ IS パターンを示す例が 14 パターンあった。今後、これらの株について PFGE パターンとあわせた解析を行っていく予定である。

E. 結論

EHEC O157 の共通株 2 株を用いて PFGE 解析を行った。概ね良好な泳動像が得られたが、染色が薄くバンドがはっきりしない写真もあった。約 100kb 以下の小さいサイズのバンドは不明瞭な場合が多く、BioNumerics での解析でバンドの選択が困難な施設が多かった。近年、地方衛生研究所では異動が頻繁に行なわれ、一定技術の確保が課題となっている。本研究班を通じて精度管理を実施することで、各地研の PFGE 解析技術の向上と情報交換が可能になるものと思われる。

O157 の新しい解析法である IS 法は非常に簡便であり、PFGE 法と比較して非常に迅速に解析することが可能である。しかし、菌株によっては同じ IS パターンでも PFGE 型が異なる株が存在するので、結果の解釈には注意が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

上田ひろみ，笠原ひとみ，宮坂たつ子，藤田 暁，小野倫子，他：飲料水が原因となった複数の腸管出血性大腸菌による食中毒事例—長野県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）33, 5, 120-121, 2012.

内藤秀樹，船渡川圭次，人見美子，石川信一，豊田史郎，他：腸管出血性大腸菌 O157, O145 の混合感染が認められた食中毒事例—栃木県，病原微生物検出情報（国立感染症研究所）33, 5, 122-123, 2012.

H. 知的所有権の取得状況

なし

PT1

PT1

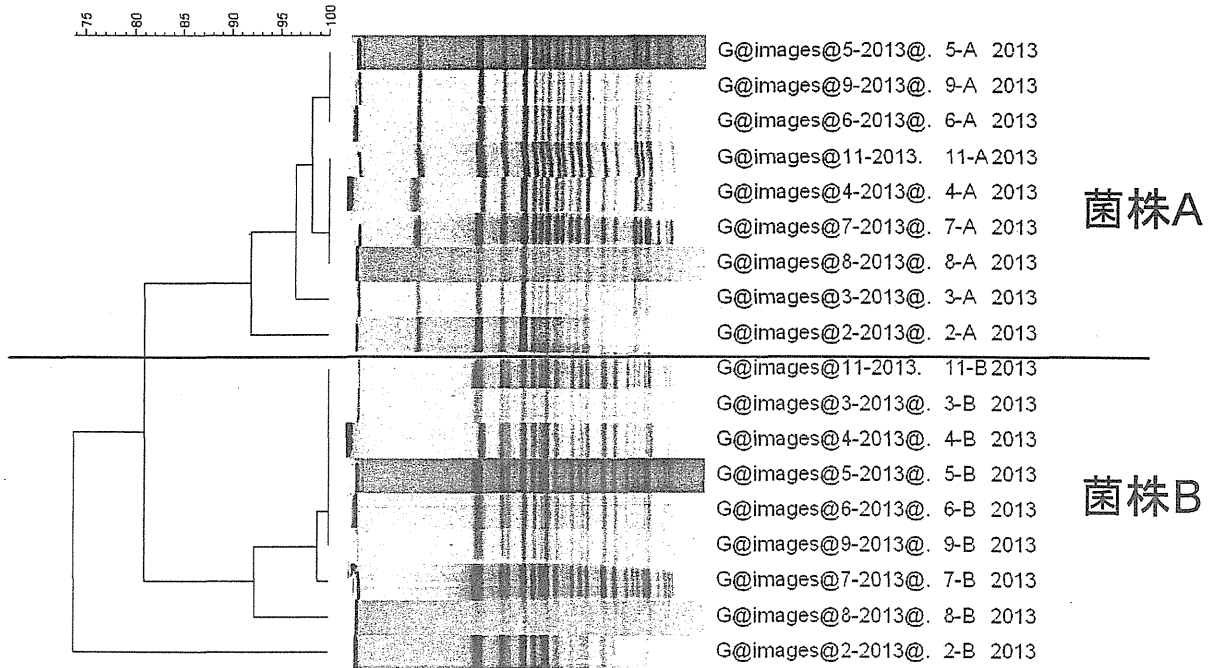
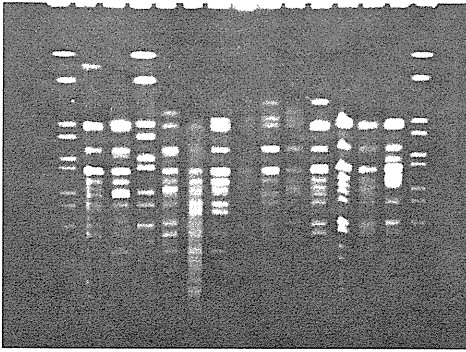
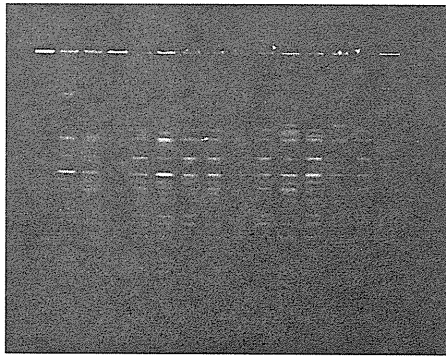


図1. 各施設で実施したO157共通株のデンドログラム解析

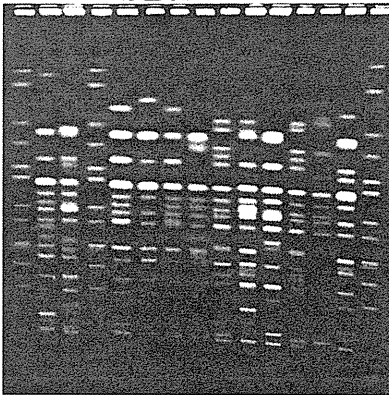
施設2



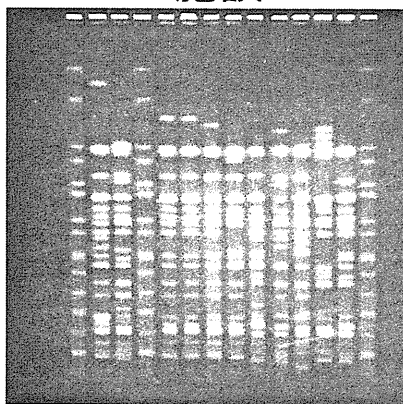
施設3



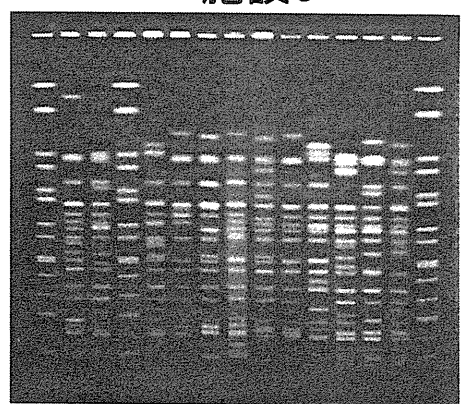
施設4



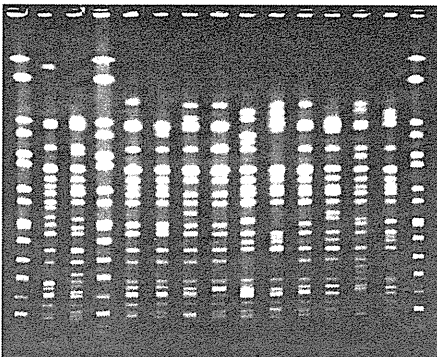
施設5



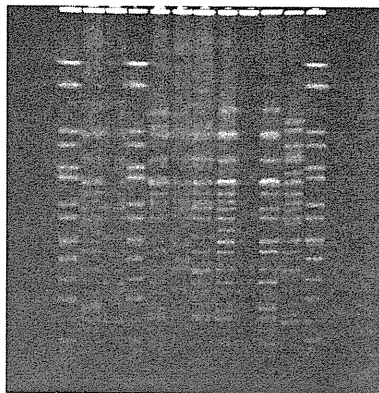
施設6



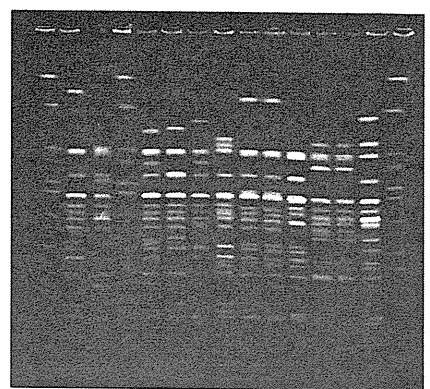
施設7



施設8



施設9



施設11

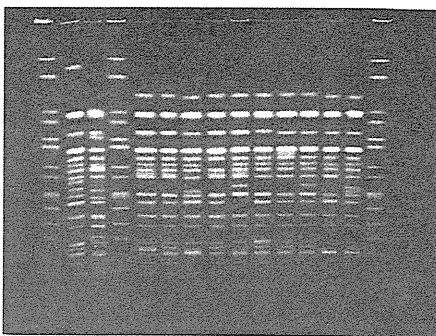


写真1.
共通株2株および各施設で分離された
O157のPFGE画像

写真2. 共通株2株のIS解析写真

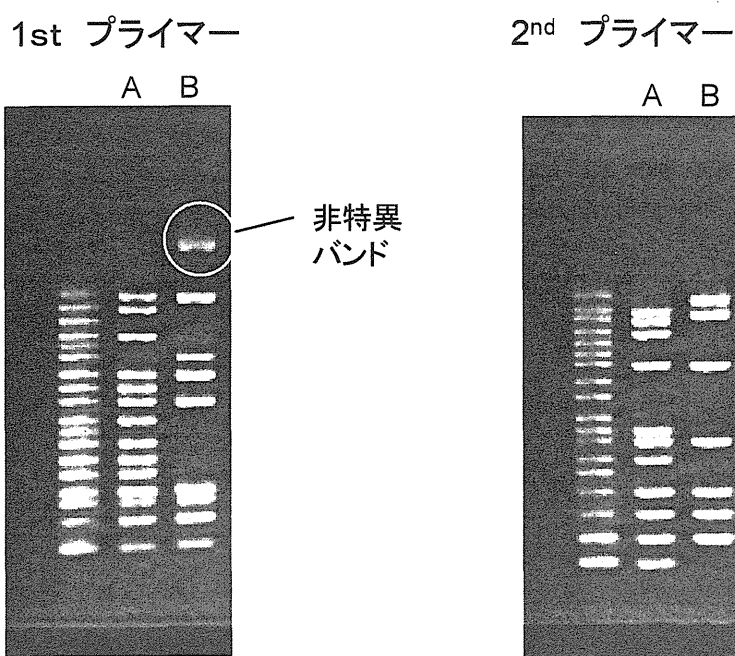


表1. 共通株2株のIS解析成績

Primer set 1										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Primer No.	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10
菌株No. Size(bp)	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353
菌株A	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
菌株B	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0

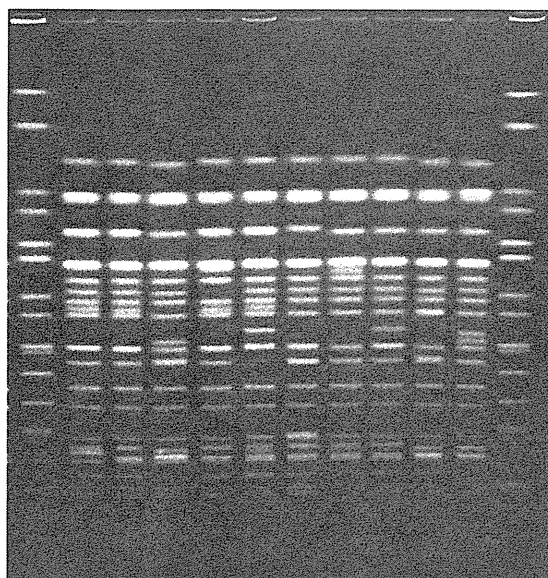
	11	12	13	14	15	16	17	18	
Primer No.	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hly	備考 非特異バ ンド
菌株No. Size(bp)	325	300	269	241	211	185	171	137	
菌株A	0	1	1	1	1	1	1	1	
菌株B	0	0	0	0	1	1	1	1	有

Primer set 2										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Primer No.	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10
菌株No. Size(bp)	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394
菌株A	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
菌株B	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0

	11	12	13	14	15	16	17	18	
Primer No.	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1	備考 非特異バ
菌株No. Size(bp)	358	331	301	278	240	211	181	151	
菌株A	1	1	1	0	1	1	1	1	
菌株B	0	1	0	0	1	1	1	0	

写真3. 2012年に東京都内で分離されたPFGE型類似株のPFGE画像

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



レーンNo	PFGE型
1	T-1206
2	T-1206c
3	T-1206d
4	T-1206d-2
5	T-1206f
6	T-1206g
7	T-1206h
8	T-1206i
9	T-1206k
10	T-1206L

レーン1とレーン5が同じISパターンを示した

表2. 2012年に東京都内で分離されたPFGE型類似株のIS解析成績
1stプライマー

No.	菌株No	Primer No. Size(bp)	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	eae	1-16	hly
			974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137
1	EH4304		1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	EH4330		1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3	EH4333		1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
4	EH4338		1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
5	EH4360		1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
6	EH4371		1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
7	EH4380		1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	EH4383		1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9	EH4419		1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
10	EH4449		1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1

2ndプライマー

No.	菌株No	Primer No. Size(bp)	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	stx2	stx1
			987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151
1	EH4304		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
2	EH4330		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
3	EH4333		0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
4	EH4338		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
5	EH4360		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
6	EH4371		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
7	EH4380		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
8	EH4383		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
9	EH4419		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
10	EH4449		0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による IS printing System の実施とデータベースへの登録、及びパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）活用状況調査

主任研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所
研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所
山田和弘 愛知県衛生研究所
加藤真美 石川県保健環境センター
白木 豊 岐阜県保健環境研究所
土屋美智代 岐阜市衛生試験所
木全恵子 富山県衛生研究所
中根邦彦 岡崎市総合検査センター
石畝 史 福井県衛生研究所
岩出義人 三重県保健環境研究所
藪谷充孝 名古屋市衛生研究所
多和田光紀 豊田市衛生試験所
山本新也 豊橋市保健所衛生試験所

研究要旨

1) 各施設の IS printing System の型別結果と他の都県市分離株との関連

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）において各施設で検出された 0157 について IS printing System を実施した（合計 124 株）。このうち 10 施設由来 112 株について IS printing System データベースへの登録を行った。本データベースを用いて解析を行ったところ、10 施設中 9 施設で他の都県市と同一の IS 型が検出された。さらに東海・北陸地方以外の東京都、岡山県から検出された 0157 と同一の IS 型も検出された。これらの結果は既に PFGE を用いた「パルスネットジャパン」でも明らかにされているが、複数の都県市から 2 から 3 ヶ月の比較的短い期間に検出される特定の 0157 の存在を明らかにした。最も多くの都県市から検出された IS 型は AA 039 であった。この型は東海・北陸、東京都を含む 6 都県市から検出され、その期間は 6 月から 10 月であった。

2) PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査

平成 24 年度東海・北陸 11 施設の行政への還元に関する調査では 4 施設で PFGE の結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。これら 4 施設の泳動図は疫学調査等に活用されるに十分な画質を有していたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われる。行政に還元された集団事例由来病原菌は 0157、0121 等の腸管出血性大腸菌であった。また、1 施設では病院から分与された 0157 を含めた集団事例の解析を PFGE を用いて実施していた。

A. 研究目的

我が国で腸管出血性大腸菌 0157 による diffuse outbreak (散在的集団事例) を迅速に検出するシステムである「パルスネットジャパン」の稼働に向けた研究班活動が平成 12 年度から平成 20 年度まで行われた。

愛知県衛生研究所(愛知衛研)ではこれまでの研究班活動として、0157、サルモネラ、赤痢菌の PFGE 実施統一プロトコール作成、及び愛知県下で過去 10 年間に検出されたサルモネラ、赤痢菌それぞれ約 150 株について PFGE を行い、そのバンドパターンのデータベース作成を行った。また東海・北陸ブロック内の活動として 1) PFGE 精度管理、2) 東海・北陸ブロック地方衛生研究所(地研)及び衛生試験所 PFGE 担当者を愛知衛研に集め、PFGE 実施手順に関する研修会の実施、3) 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁(市役所)に報告した代表事例(行政への還元)の調査を行った。

これらの研究班活動の成果として毎年 PFGE 担当者が 1 名～2 名程度変わることのある東海・北陸ブロック内地研においても精度管理の実施によって同一 PFGE 型 0157 の PFGE バンドパターンの各地研相同性を約 90%若しくはそれ以上まで高めることができた。このことから東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の 0157 等集団発生の際にも疫学的資料として用いるに足る良質な画質を提供することが可能であると思われる。また PCR を用いた型別法である IS-printing System についても PFGE と同様にこれまで精度管理の実施、各施設で検出された 0157 の型別を行い、東海・北陸ブロック内地研では diffuse outbreak のみならず県内の 0157 等集団発生の際にも疫学的データとして PFGE 解析結果と共に提供することが可能であると思われる。

平成 24 年度の活動内容は 1) 東海・北陸地方 11 施設(地方衛生研究所、及び衛生試験所)において今年度検出された 0157 (該当株がない場合は過去に検出された株を用いた。)について IS printing System を実施し、その結果と泳動図を愛知県衛生研究所(愛知衛研)に電送した。愛知衛研ではそれらの結果を IS データベース

に登録し解析を行った。2) 東海・北陸ブロック各地研が 0157 及び他の病原菌による集団発生時に PFGE を行い、その結果を保健所、及び県庁(市役所)に報告した事例(行政への還元)の調査を行い、PFGE 画像がどの程度活用されているかを調査した。

B. 研究方法

1. IS printing System の実施

添付のプロトコールに従い、東海・北陸 11 施設地研で今年度若しくは過去に検出された 0157 について IS printing System を行い、その泳動図、菌株情報(集団・散発、分離年月)及びエクセルファイルに記入した IS printing System 結果を愛知衛研に送付した。愛知衛研において結果のエクセルファイルを CSV ファイルに変換し、IS データベースに入力した。このデータベースを用いて東海・北陸地方各施設で検出された 0157 と同じ IS 型が検出された都県市を検索した。

2. 行政への還元に関する調査

平成 24 年 4 月から 12 月までの間に東海・北陸各地研で各種病原菌による集団事例の際に PFGE を行い保健所、及び県庁(市役所)に報告した事例について事例の概要、PFGE 泳動図を愛知衛研に送付した。

C. 研究結果

1. 各施設の IS printing System の型別結果と他の都道府県分離株との関連

1) 愛知県

23 株について型別を行った。その内訳は散発患者株 11 株、集団事例(家庭内事例) 4 事例由来 12 株であった。これら 23 株は 11 の IS 型に分類された。集団事例 4 事例のうち 3 事例では同一事例内の 0157 の IS 型は同一であったが、残り 1 事例では 3 株のうち 2 株はバンド 1 本違いであったが、残り 1 株とは 3 本以上異なっていた。また、4 つの IS 型(6 株)は同一の IS 型が愛知県以外の県(東京都、岡山県、岐阜県)から検出されていた。分離年月の間隔は 4 ヶ月以内であった。残り 2 つの IS 型(5 株)は同一の IS 型が県内の岡崎市、豊田市、豊橋市から検出された。分離年月の間隔は 1 つの IS 型(AA04

0) は約2年と離れていた。

2) 岡崎市

7株について型別を行った。その内訳は散发患者株4株、集団事例(家庭内事例)1事例由来3株であった。これら7株は4つのIS型に分類された。集団事例1事例は同一事例内の0157のIS型は同一であった。また、1散发事例由来株のIS型(AA040)は同一のIS型が愛知県、及び豊田市から検出されていた。分離年月の間隔は3ヶ月以内であった。残り3つのIS型は同一のIS型は他の都府県市から検出されなかった。

3) 豊田市

9株について型別を行った。その内訳は散发患者株2株、集団事例2事例由来7株であった。これら7株は4つのIS型に分類された。集団事例2事例のうち1事例では同一事例内の0157のIS型は同一であったが、残り1事例では4株のうち3株は同一のIS型であったが、残り1株はバンド1本異なっていた。9株は5つのIS型に型別された。このうち1つ(AA047)は東京都、岐阜県、名古屋市から同一のIS型が検出されていた。また、分離年月の間隔は2ヶ月以内であった。散发事例から検出されたIS型AA040は愛知県、岡崎市から同一型が検出され、岡崎市由来株とは約1年検出間隔があった。

4) 豊橋市

5株について型別を行った。その内訳は散发患者株1株、集団事例2事例由来4株であった。これら5株は3つのIS型に分類された。集団事例2事例では何れも同一事例内の0157のIS型は同一であった。また、これらのIS型は他の都府県市と同一のIS型は認められなかった。散发事例1株(IS型AA042)は同一のIS型が岡山県、愛知県、岐阜県、東京都から検出されていた。その検出間隔は約3ヶ月であった。

5) 名古屋市

11株について型別を行った。その内訳は散发患者株2株、集団事例4事例由来9株であった。これら11株は6つのIS型に分類された。集団事例4事例では同一事例内の0157のIS型は全て同一であった。また、これら集団事例株と同一のIS型は他の都府県市由来株には認められなかった。散发事例株1株のIS型は同一の型が豊田市、岐阜市、東京都から検出されていた。

その検出間隔は約2ヶ月であった。

6) 岐阜県

22株について型別を行った。その内訳は全て散发患者株であった。これら22株は8つのIS型に分類された。これらIS型のうちAA039型が最も多く検出され10株に認められた。これら10株は7月から8月の2ヶ月間に集中していた。以下、AA045が3株、AA009、AA044、AA046がそれぞれ2株検出された。その分離間隔は、AA045が2ヶ月、AA009、AA044、AA046は同じ月に検出されていた。9月に検出されたAA046は岐阜市から1月と9月に検出された。他の都府県市で同一のIS型が検出された型は、AA009が東京都、富山県、岐阜市(検出月は4月から10月)、AA023が東京都、愛知県、豊橋市、岡山県であった。東京都由来株は保育園での集団事例株であった。その検出間隔は約4ヶ月であった。AA047は東京都、名古屋市、豊田市から7月から9月に検出されていた。

7) 岐阜市

6株について型別を行った。その内訳は散发患者株2株、集団事例2事例由来4株であった。これら6株は3つのIS型に分類された。集団事例2事例では何れも同一事例内の0157のIS型は同一であった。さらに散发事例株1株はそのIS型がひとつの集団事例株と同一であった。このIS型(AA009)は東京都、富山県、岐阜県からも4月から10月に検出されていた。残りの集団事例由来株と同じ型(AA046)は同じ月(9月)に岐阜市から検出されていた。

8) 三重県

12株について型別を行った。その内訳は散发患者由来1株、2つの集団事例由来11株であった。これら12株は3つのIS型に分類された。それぞれの集団事例で同一事例内ではIS型は全て一致した。また、これら3つのIS型で他の都府県市由来株と同一の型は検出されなかった。

9) 石川県

10株について型別を行った。その内訳は散发患者株が3株、2集団事例由来株は7株であった。これら10株は3つのIS型に分類された。これらIS型のうちAA065型が最も多く検出され、1集団事例4株と散发事例1株、計5株であっ

た。次に AA039 が 4 株認められ、1 集団事例 3 株と散発事例 1 株に認められた。他の都府県市で同一の型が認められたのは AA039 と AA065 で後者は富山県から同じ月（7 月）に検出されていた。

1 0) 富山県

7 株について型別を行った。その内訳は散発患者株が 5 株、1 集団事例由来株は 2 株であった。これら 10 株は 6 つの IS 型に分類された。集団事例由来株は同一の IS 型であった。これら IS 型のうち他の都府県市由来株と同一の型が認められたのは 3 つの型で AA063 は愛知県、岐阜県、石川県から 7 月から 10 月の間に、AA039 は 6 つの異なった都府県市から、集団事例由来 AA009 は東京都、岐阜県、岐阜市から 4 月から 10 月に検出されていた。

1) 福井県

12 株について型別を行った。その内訳は散発患者株 5 株、集団事例 2 事例由来 7 株であった。これら 12 株は 8 つの IS 型に分類された。集団事例 2 事例ではひとつの集団事例由来 2 株は同一の IS 型であったが、他の集団事例株は 5 株のうち 2 株は同一の型であったが、残り 3 つの型はバンド 1 から 2 本異なる型であった。これら 12 株は *eae* 遺伝子陰性となっていたため IS データベースへの登録を行うことが出来なかった。

図 1 に 11 施設の泳動図と結果のエクセルシートを示した。但し、施設名は明記しなかった。

2. PFGE 解析結果の行政への還元に関する調査

今年度は 4 施設から報告があった。

1)

<概要>

平成 24 年 7 月に K 保健所管内で患者 2 名から腸管出血性大腸菌 0157 (VT1, 2) が検出された。また、同時期に I 保健所管内でも腸管出血性大腸菌 0157 (VT1, 2) 感染症の患者が 2 名発生し、疫学調査より関連が疑われた。また、K 保健所管内で直近に分離された腸管出血性大腸菌 0157 (VT1, 2) 菌株を関連性の有無をみるために加え、計 5 株の PFGE の依頼があった。（別紙 2-2 参照）

PFGE による解析結果より K 保健所で分離された菌株 No. 2、3 及び I 保健所で分離された

菌株 No. 4、5 の DNA 切断パターンは全て同一であったことから、これらは同一感染源による集団事例と判断されたが、感染源の特定には至らなかった。また、直近に発生した菌株 No. 1 については上記 4 株の DNA 切断パターンと異なっていたため関連性はないと判断された。

<PFGE による解析結果>

K 保健所で分離された菌株 No. 2、3 及び I 保健所で分離された菌株 No. 4、5 の DNA 切断パターンは全て同一であった。

2)

富山県では腸管出血性大腸菌感染症全事例について PFGE 解析を行っている。このうち、本年は腸管出血性大腸菌 0121 による集団感染事例について PFGE による解析を行ったので報告する。

平成 24 年 8 月に、0121 (VT2、以下 0121) 感染者 3 名および 098 (VT1) 感染者 1 名の集団感染事例が発生した。0121 感染者 3 名のうち 1 名は乳糖代謝陰性の 0121 のみが検出された。しかし、他の 2 名の 0121 感染者からは乳糖代謝陽性・乳糖代謝陰性の双方の 0121 が検出された。これらの乳糖代謝陽性および乳糖代謝陰性の 0121 の PFGE パターンは同一であった。

また、6 月と 7 月に 0121 による感染事例が 2 件発生した。しかし、上記の集団感染事例分離株の PFGE パターンはこれらの 2 件の分離株とは異なっていた。このことからこれらの事例は由来の異なる 0121 による感染事例であると推定された。

3)

事例 1:平成 23 年 12 月 28 日に福井県で EHEC 感染症 (0157:H7 Stx1+2) が発生し、患者の接触者 3 名のうち 1 名からも菌が分離された。患者らは福井県内のスキー場 a でのケバブ喫食を含め、複数の施設で食肉を喫食していた。

事例 2:平成 24 年 1 月 6 日に富山県で EHEC 感染症 (0157:H7 Stx1+2) が発生し、患者が福井県内のスキー場 a でケバブ喫食があったため、福井県に情報提供がなされた。

事例 3:事例 1 および 2 を踏まえて、福井県が近隣の EHEC 感染症発生状況を調査したところ、平成 24 年 1 月 7 日に大阪府で発生した EHEC 感染症 (0157:H7 Stx1+2) の患者およびその接触者

(菌分離)が、スキー場 a でケバブを喫食していた。

事例 1、2 および 3 について、分離菌の血清型および毒素型が同一であったことおよび 3 事例の共通食がスキー場 a のケバブのみであったことから、ケバブを調理した施設を原因とする散発的集団食中毒と断定された。

事例 4:平成 24 年 1 月 17 日に福井県で EHEC 感染症 (O157:H7 Stx1+2) が発生し、接触者 4 名のうち 2 名からも菌が分離された。患者の家族 (菌陰性) が平成 23 年 12 月 26 日にスキー場 a でケバブを喫食し、平成 24 年 1 月 1~2 日にかけて下痢等を発症していたことが判明した。

4)

平成 24 年に 1 施設で分離した O157 および病院より分与された 6 株の O157 の PFGE を実施した。その結果、集団事例 2 事例 (4 株) では同一事例内で O157 の PFGE は一致していた。また、散発事例 1 株の PFGE パターンは 1 集団事例由来株と一致していた。2 つの集団事例株でそれぞれ 1 株は病院より分与された。これら事例の PFGE 泳動図は図 2 に示した。

D. 考察

1) 各施設の IS printing System の型別結果と他の都県市分離株との関連

東海・北陸地方 11 施設において今年度若しくはそれ以前に検出された 124 株の O157 について IS printing System を実施した。このうち 10 施設 112 株について IS printing System データベースへの登録を行った。1 施設では *eae* 遺伝子が陰性となり登録が出来なかった。これは IS printing System で見られる問題点の 1 つであり、DNA を再抽出することで解決できることが多い。該当施設には情報提供を行い、改善していきたい。

本データベースを用いて解析を行ったところ、10 施設中 9 施設で他の都県市と同一の IS 型が検出された。さらに東海・北陸地方以外の東京都、岡山県から検出された O157 と同一の IS 型も検出された。これらの結果は既に PFGE を用いた「パルスネットジャパン」でも明らかにされているが、複数の都県市から比較的短い期間に検出される特定の O157 の存在を明らかにした。

今回の解析から最も多くの都県市から検出された IS 型は AA039 であった。この型は東海・北陸、東京都を含む 6 都県市から検出され、その期間は 6 月から 10 月であった。興味あることに東京都由来株は焼肉店関連であったことから流通した肉を介した流行であった可能性も考えられる。

2) 行政への還元に関する調査

平成 24 年度東海・北陸 11 施設の行政への還元に関する調査では 4 施設で PFGE の結果が集団事例発生時に行政に還元されていた。これら 4 施設の泳動図は疫学調査等に活用されるに十分な画質を有していたことから行政への還元もスムーズに進んだものと思われる。行政に還元された集団事例由来病原菌は O157、O121 等の腸管出血性大腸菌であった。1 施設では分離した O157 および病院より分与された O157 の PFGE を実施し、集団事例 2 事例では同一事例内で O157 の PFGE は一致していた。また、散発事例 1 株の PFGE パターンは 1 集団事例由来株と一致していた。

E. 結論

1) 各施設の IS printing System の型別結果と他の都県市分離株との関連

東海・北陸地方 11 施設において今年度若しくはそれ以前に検出された 124 株の O157 について IS printing System を実施した。

このうち 10 施設 112 株について IS printing System データベースへの登録を行った。本データベースを用いて解析を行ったところ、10 施設中 9 施設で他の都県市と同一の IS 型が検出された。さらに東海・北陸地方以外の東京都、岡山県から検出された O157 と同一の IS 型も検出された。これらの結果から複数の都県市から比較的短い期間に検出される特定の O157 の存在を明らかにした。今回の解析から最も多くの都県市から検出された IS 型は AA039 であった。この型は東海・北陸、東京都を含む 6 都県市から検出され、その期間は 6 月から 10 月であった。興味あることに東京都由来株は焼肉店関連であったことから流通した肉を介した流行であった可能性も考えられる。

IS printing System は迅速性、簡便性の利点