

資料7 Unique IS-pattern consisting of more than 50 strains

IS pattern	# of strains in DB	PFGE pattern
AA023	76	c293, c483, d483, e555, f211, f468, f822, f823, f853, g37, g89, g90, g107, g172, g190, g283, g526, g606, h63, h258, h374, i130, i164, i172
AA039	58	c293, e807, f467, h82, h150, h345, h380, i133, i179,
AA047	71	a259, c357, d482, e593, f220, f229, f433, f818, g131, g153, g391,
AA063	115	d92, d837, e181, e216, e479, e628, e772, f14, f95, f427, f429, f430, f431, f469, f554, f555, f556, f586, f819, g152, g174, h7, h24, h101, h108, h129, i87, i100, i101, i102, i112, i113
AA064	61	b423, b858, c253, d86, e208, e398, f15, f215, f369, f370, f548, g429, g714, i22, i92, i137
AA076	71	b423, d192, e89, e184, e355, e542, e707, e791, f84, f98, f157, f250, f268, f279, f369, f461, f813, g383, i171,

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興研究事業研究事業）

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
研究分担報告書

研究分担者	八柳 潤	(秋田県健康環境センター)
研究協力者	清水俊一、池田徹也	(北海道立衛生研究所)
	坂本裕美子	(札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課)
	武沼浩子、福田 理	(青森県環境保健センター)
	岩渕香織、梶田弘子	(岩手県環境保健研究センター)
	瀬戸順次、鈴木 裕	(山形県衛生研究所)
	山口友美	(宮城県保健環境センター)
	松原弘明、牛水真紀子	(仙台市衛生研究所)
	千葉一樹、菊地理慧	(福島県衛生研究所)
	川瀬 雅雄	(新潟県保健環境科学研究所)
	足立 玲子	(新潟市衛生環境研究所)

研究要旨.

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、国立感染症研究所に構築された IS-printing system データベース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。秋田県で分離された EHEC O157 分離株 4 株と米国で 1982 年に発生した集団事例の原因菌である EHEC O157:H7 EDL933 株から抽出した DNA 溶液を供試し、キット付属のプロトコールに従い IS-printing を実施した。今年度は参加 11 機関の結果がほぼ一致したが、参加 11 機関中 1 機関が牛由来株の 1st Set 1-10 の位置の近傍に出現したエキストラバンドと思われるバンドの判定において 10 機関と異なる判定となった。エキストラバンドについては実験条件や供試株によっては判定に苦慮する場合も発生することを今後念頭に入れる必要があり、エキストラバンドか否か判断がつかない場合の報告方法について一定のルールを策定する必要があると考えられる。今後もブロック内における IS-printing system の精度管理を継続し、各機関が所属する自治体での EHEC O157 感染症対策における実用化を目指すと共に、国立感染症研究所で構築している IS プリンティングデータシステムへのデータ登録を行う基盤を構築する必要がある。

A. 研究目的

食中毒・感染症原因細菌の分子疫学解析は、感染経路や感染源の特定に有用である。1996 年に腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 による大規模食中毒が発生したことを契機として、EHEC の分子疫学解析手法として

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) が地方衛生研究所に普及し、国立感染症研究所が PFGE パターンデータベースを構築してきた。PFGE は病原細菌分子疫学解析の「ゴールドスタンダード」といえる位置にあるが、結果が得られるまでの時間が長

く、行政対応支援に際して迅速性に欠けること、そして得られる結果がアナログデータの泳動像であるため、データベース化する場合の精度管理が難しいことに加えて、異なる実験室で異なる時に得られたデータを比較することも困難であるという問題が存在する。

PFGE が抱えるこれらの問題を克服するために Variable Number of Tandem Repeat 解析、IS-printing system などの分子疫学解析法が開発されてきた。IS-printing system は EHEC O157 の IS 領域を標的としたマルチプレックス PCR 法であり、宮崎大学の林教授のグループにより開発された。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り、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というメリットがあることから、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。しかしながら、全国地方衛生研究所技術協議会のブロックにより IS-printing system への取り組みには大きな違いが認められる。例えば、九州ブロックと近畿ブロックにおいては独自の IS-printing system データベースを構築し、ブロック内で分離された EHEC O157 の解析データを蓄積し、行政対応にも応用してきた。これに対して、北海道・東北・新潟ブロックでは IS-printing system の普及が十分に進んでいるとは言い難い状況にある。国立感染所研究所は IS-printing system データベースを構築し、実際の運用を行う段階に至っていることから、北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所においてもこのデータベースへのデータ集積に参画することが急務であり、そのためにはブロック内における IS-printing system の精度管理を行うことが課題となる。

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、国立感染所研究所に構築された IS-printing system データベースへの参画を可能とすることを目的として、昨年引き続きブロック内地方衛生研究所における IS-printing system の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（北海道）、札幌市保健福祉局衛生研究所保健科学課（札幌市）、青森県環境保健センター（青森県）、岩手県環境保健研究センター（岩手県）、山形県衛生研究所（山形県）、宮城県保健環境センター（宮城県）、仙台市衛生研究所（仙台市）、福島県衛生研究所（福島県）、新潟県保健環境科学研究所（新潟県）、新潟市衛生環境研究所（新潟市）、秋田県健康環境センター（秋田県）の 11 機関が参加した。

2. 供試菌株と DNA 溶液

秋田県で分離された EHEC O157 分離株 4 株と米国で 1982 年に発生した集団事例の原因菌である EHEC O157:H7 EDL933 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、5 μ g/ml の濃度に調製した DNA 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)、NuSieve GTG アガロース (Lonza)、SeaKem GTG Agarose (Lonza) 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。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、テンプレート量とした。

C. 研究結果及び考察

表 3 に供試 5 株の IS-printing 1st set PCR 結果を示す。5 株中、牛便由来 EC15657 を除く 4 株の結果が 11 機関で全て一致した。牛便由来 EC15657 の結果は 11 機関中 10 機関で一致したが、機関 6 では 1-10 の近傍に出現したバンドが陽性と判定されたことにより、他 10 機関と異なる結果となった (表 3: ***部分。機関 6 のみ+と判定)。一方、表 4 に供試 5 株の IS-printing 2nd set PCR 結果を示す。2nd Set の結果は 11 機関全てで一致した。

図に参加機関で得られた電気泳動像を示す。昨年度の検討では異なる機関で得られた結果に不一致が目立ったが、今年度の検討では異なる機関で異なるサーマルサイクラー、テンプレート量を使用して得られた結果が非常に良く一致する傾向がみられた。機関 1 では 2 人の担当者がそれぞれ異なる種類のサーマルサイクラーを使用して解析を行ったところ、両解析の結果が一致することも確認された。昨年の検討では、高分子と低分子の増幅断片で PCR 産物の量が大きく異なる傾向がみられ、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により判定が困難となる傾向が顕著であった。そのため、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、バンドの分離と判定が著しく改善されることが示された。今年度の検討では昨年度と比較して高分子と低分子の増幅断片で PCR 産物の量が大きく異なる傾向はそれ程顕著ではなく、判定に支障を来す例は見られなかった。しかし、機関 6 の泳動像にみられるように、今年度

の条件でも、PCR 反応液をゲルにアプライする量を減らすことにより、高分子側のバンドが著しく明瞭となり判定が容易・確実となる傾向はみられた。

昨年度の検討では 1st Set の hly 増幅断片が十分に視認できずに偽陰性と判定される例が散見された。今年度はこの点に留意した結果、全ての機関で hly の増幅断片は陽性と判定された。判定に際して hly 増幅断片が他の遺伝子の断片と比較して輝度が低いことには留意する必要がある。

今年度供試した牛便由来 EC15657 では、ほぼ全ての参加機関において 1st Set の 1-9 のバンドのやや下の位置に輝度の低いバンドが認められた。このバンドの判定については参加機関により判断が分かれ、11 機関中 1 機関では 1-10 のバンド陽性と判定され、他 10 機関はエキストラバンドと判定された。エキストラバンドの扱いについてはキットの添付文書にも説明はあるものの、実験条件や供試株によっては判定に苦慮する場合も発生することを今後念頭に入れる必要があることが改めて確認されたことになる。Diffuse outbreak の際に、エキストラバンドの判定基準が異なることに起因する施設間の結果の不一致を防ぐためにも、エキストラバンドか否か判断がつかない場合の報告方法について一定のルールを策定する必要があると考えられる。

D. 結論

昨年度は共同研究に参加した 11 機関のうち、5 機関の担当者が IS-printing を行うのが初めてという状態であった。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、昨年度の検討では結果の不一致も散見され、精度管理に課題が存在することが浮き彫りとなった。今年度の検討結果

からは当ブロック内での IS-printing system による解析結果の再現性と精度に明らかな改善が認められた。一方、エキストラバンドについては実験条件や供試株によっては判定に苦慮する場合も発生することを今後念頭に入れる必要があり、エキストラバンドか否か判断がつかない場合の報告方法について一定のルールを策定する必要があると考えられる。今後もブロック内における IS-printing system の精度管理を継続し、各機関が所属する自治体での EHEC O157 感

染症対策における実用化を目指すと共に、国立感染症研究所で構築している IS プリンティングデータシステムへのデータ登録を行う基盤を構築する必要がある。

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

菌株番号	分離年月日	由来	病原遺伝子
1. EC15746	2013. 8. 28	散発下痢患者	VT-2 eae
2. EC15763	2013. 9. 10	散発下痢患者	VT-1, 2 eae
3. EC15696	2013. 7. 22	散発下痢患者（脳炎・死亡）	VT-2 eae
4. EC15657	2013. 5. 31	牛便	VT-2 eae
5. EHEC O157:H7 EDL933		米国 1982 年集団事例	VT-1 eae

表2 使用 PCR 装置

北海道	AB 2720 Thermal Cycler	山形県	BIO-RAD My Cycler
	AB Veriti 96-Well Thermal Cycler	宮城県	AB 2720 Thermal Cycler
札幌市	Takara Model TP600	仙台市	AB GeneAmp PCR System 9700
青森県	AB Veriti	福島県	BIO-RAD iCycler
岩手県	AB Veriti 200	新潟県	AB GeneAmp PCR System 9700
秋田県	AB GeneAmp PCR System 9700	新潟市	AB Veriti 200 Thermal Cycler

表3 供試5株のIS-printing 1st set PCR 結果

1st Set	EC15746	EC15763	EC15696	EC15657	EDL933
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	+	+	+	+	+
集計	11/11機関	11/11機関	11/11機関	10/11機関	11/11機関

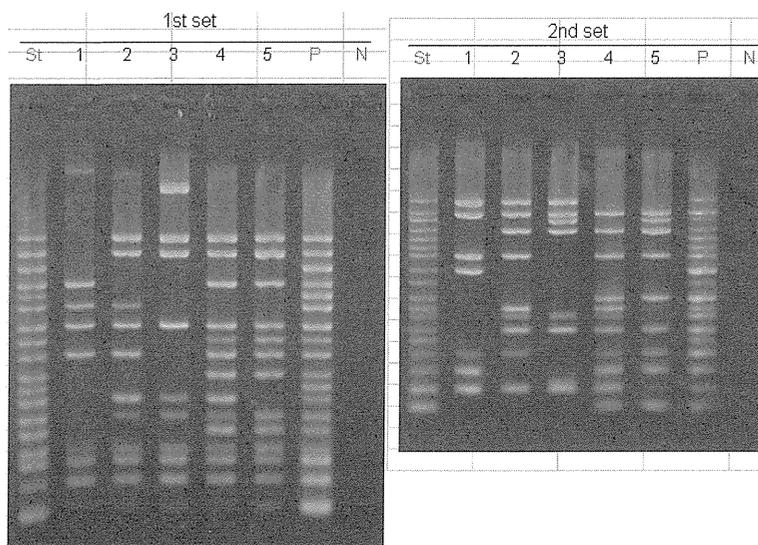
*** : 1 機関陽性判定、10 機関陰性判定

表4 供試5株の IS-printing 2nd set PCR 結果

2nd Set	EC15746	EC15763	EC15696	EC15657	EDL933
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		+			+
集計	11/11機関	11/11機関	11/11機関	11/11機関	11/11機関

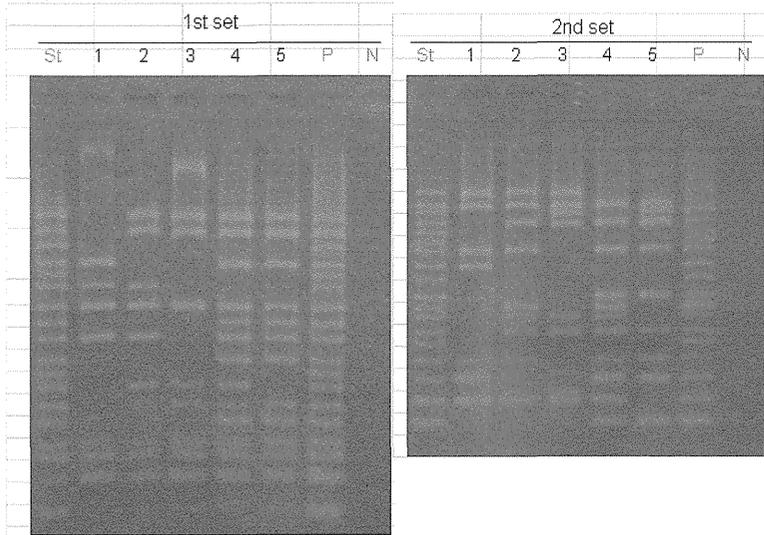
図1 各機関で得た電気泳動像

機関1 (ABI 2720)



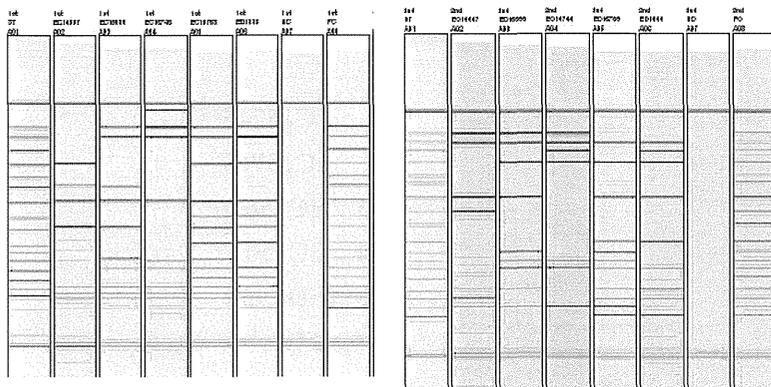
1 : EC15657
 2 : EC15696
 3 : EC15746
 4 : EC15763
 5 : EDL933
 テンプレート 1 μ l

機関 1 (Veriti)



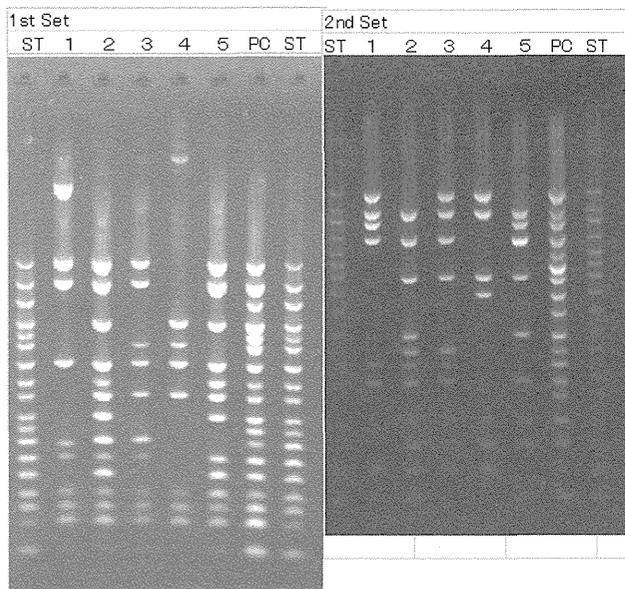
- 1 : EC15657
- 2 : EC15696
- 3 : EC15746
- 4 : EC15763
- 5 : EDL933
- テンプレート 1 μ l

機関 2



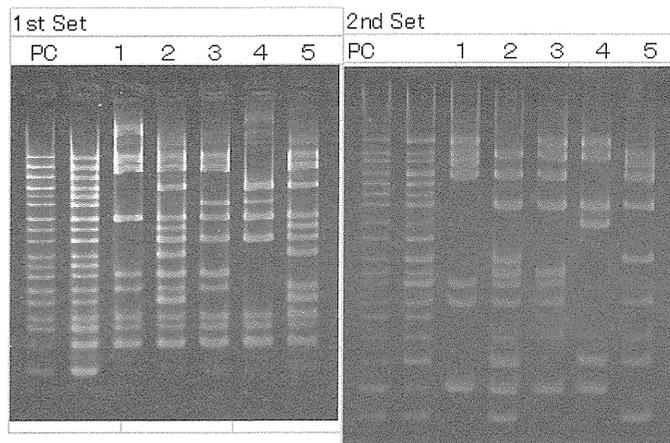
- 1 : EC15657
- 2 : EC15696
- 3 : EC15746
- 4 : EC15763
- 5 : EDL933
- テンプレート 5 μ l

機関 3



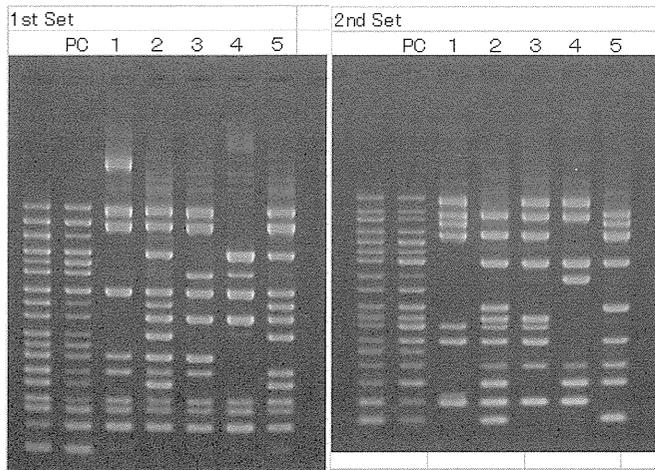
- 1 : EC15746
- 2 : EC15763
- 3 : EC15696
- 4 : EC15657
- 5 : EDL933
- テンプレート 1 μ l

機関 4



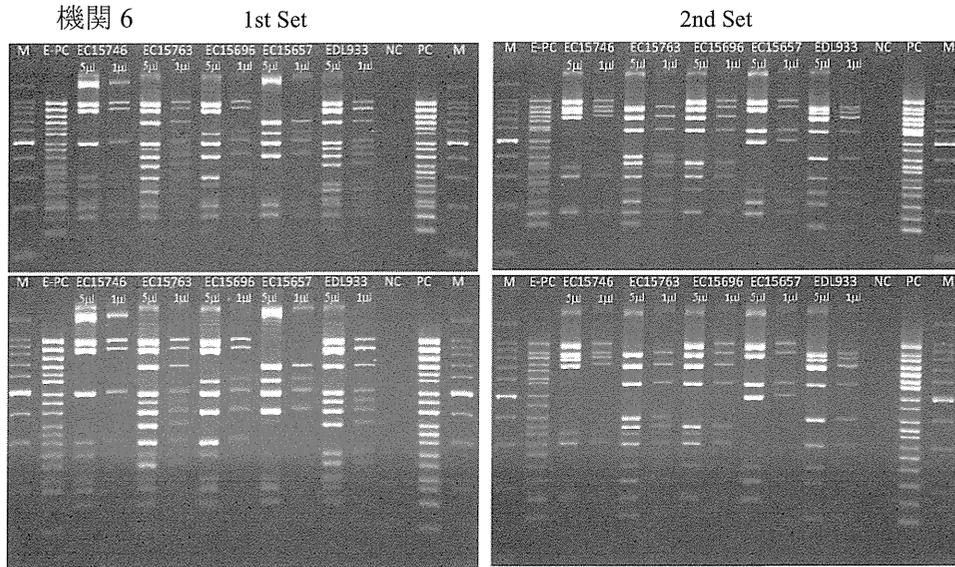
1 : EC15746
 2 : EC15763
 3 : EC15696
 4 : EC15657
 5 : EDL933
 テンプレート 4 μ l

機関 5



1 : EC15746
 2 : EC15763
 3 : EC15696
 4 : EC15657
 5 : EDL933
 テンプレート 5 μ l

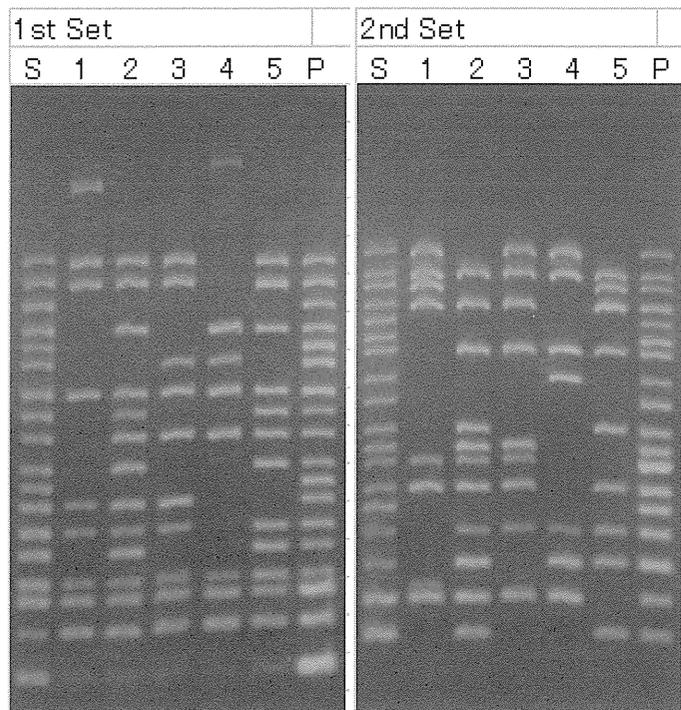
機関 6



75 分泳動
 テンプレート : 5 μ l
 アプライ
 : 5 μ l, 1 μ l

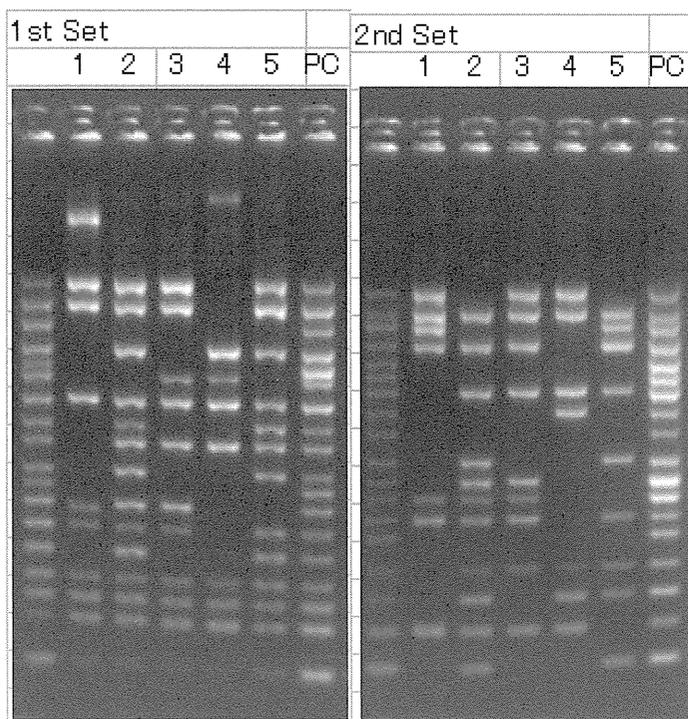
30 分追加泳動

機関 7



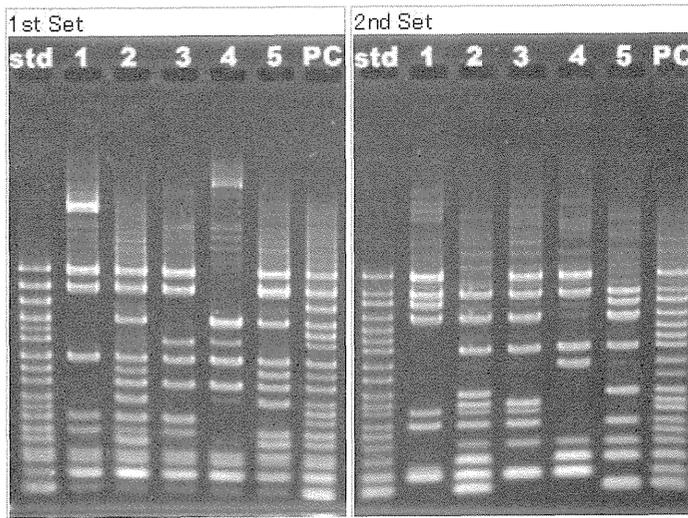
- 1 : EC15746
- 2 : EC15763
- 3 : EC15696
- 4 : EC15657
- 5 : EDL933
- テンプレート 5 μ l

機関 8



- 1 : EC15746
- 2 : EC15763
- 3 : EC15696
- 4 : EC15657
- 5 : EDL933
- テンプレート 5 μ l

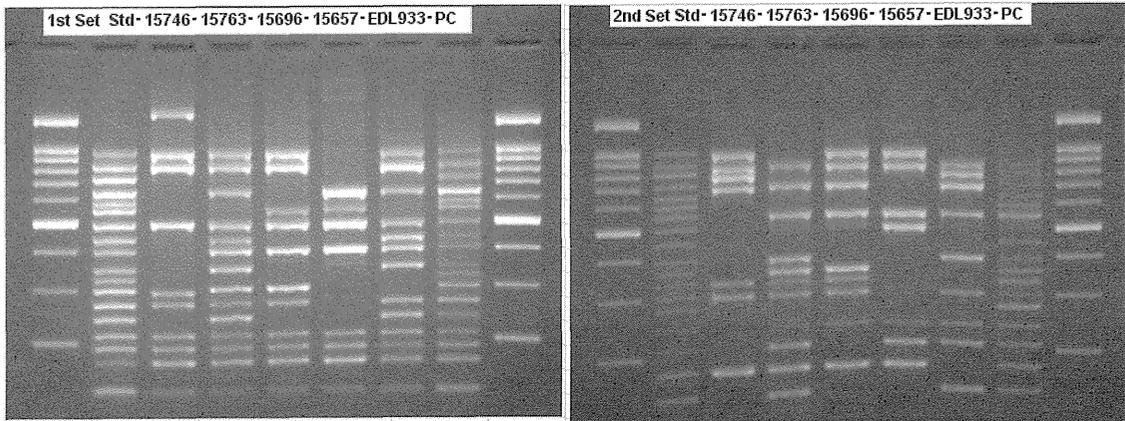
機関 9



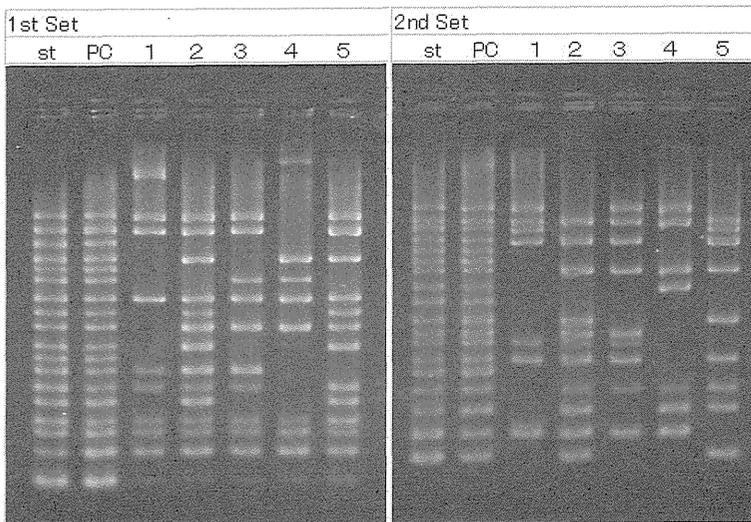
- 1 : EC15746
- 2 : EC15763
- 3 : EC15696
- 4 : EC15657
- 5 : EDL933
- テンプレート 4 μ l

機関 10

テンプレート 3 μ l



機関 11



- 1 : EC15746
- 2 : EC15763
- 3 : EC15696
- 4 : EC15657
- 5 : EDL933
- テンプレート 1 μ l

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 25 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	関口 真紀
	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：

食中毒の広域的散在発生（Diffuse outbreak）を早期に探知し、拡大防止するためには、迅速に共通の原因食品を特定し、拡大防止策を講じる必要がある。その手段として、患者等からの菌株情報は非常に有用である。腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の菌株間の比較には PFGE 法が用いられているが、近年開発された IS-printing system (IS) 法は、迅速・簡便に解析を行うことができ、その活用が期待されている。

本研究では、実際に食中毒等で分離された EHEC O157 菌株を対象として、IS 法と PFGE 法を比較検討した。IS 法においても、PFGE 法と同様に、鮮明な電気泳動像を得ることが重要であると考えられた。また、IS 型が一致した株について PFGE パターンを比較した結果、同一 IS 型の中で PFGE パターンは 2～9 種類に分類される場合もあった。

本法は、PCR 法を原理としており、デジタルデータとして結果が出るため、異なる施設間でのデータ共有が PFGE データに比べ格段に容易である。実施状況に関するアンケートの結果、既に多くの地研で IS 法を導入し、多くの株の解析が行われている現状も明らかとなった。今後は IS 法の長所・短所を十分に把握し、データベースの積極的活用や実際の行政に反映できるように整備する必要がある。

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が、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る必要がある。腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 菌株間の比較には PFGE 法が用いられているが、近年開発された IS-printing system (IS) 法は、迅速・簡便に解析を行うことができ、異なる施設間での比較も非常に容易な方法である。

そこで今回、分離された株について IS 法と PFGE 法の比較を行った。

B. 研究方法

1. PFGE 法による解析

1) 供試菌株

2013 年に東京都内で分離された EHEC O157 を供試した。

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 プラグキャストスターを使用し、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 で消化したものをを用い、泳動用アガロースの両端に入れた。

3) PFGE 型別方法

電気泳動後、100kb 以上のバンドを対象として目視で型別を行った。T-1301~T-1349 まで大まかな型別を行い、更にバンドが数本異なるものには亜型 (a~t) をつけた。

2. IS-printing system 解析

1) 供試菌株

2013 年に東京都内で分離され、PFGE 解析を実施した EHEC O157 株について IS 解析を実施した。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) IS-printing system 解析と PFGE 解析の比較

IS 法で同じパターンであった株について PFGE 解析を実施し、結果を比較した。

3. IS-printing system の実施状況に関するアンケートの実施

各地研での実施状況についてアンケートを実施した。

4. PFGE 解析および IS printing system 解析が有効に活用された事例

各地研で経験した事例についてまとめた。

C. 研究結果

1. PFGE 解析および IS 解析の解像度

2013年に分離された O157 の 283 株について PFGE 解析を行った結果、バンド 1 本違いを含めると 114 パターンに分類することができた。そのうち 269 株について IS-printing system 解析を行った結果、87 のパターンに分類された。またエキストラバンドが出現した株を異なるパターンとして判定すると、90 パターンに分けることができた (写真 1)。

2. 同じ IS 型を示した株の解析

2013年に分離された株のうち、複数株が同一の IS 型を示した株を対象に PFGE 解析との比較を行った。分離株が多かった IS パターンのうち、上位 5 パターンを A 型～E 型とした (表 1)。

A 型：保育園で発生した集団下痢症由来株 16 株を含む 30 株で、全て O157 : H7 (VT1+VT2 産生) 株であった。このパターンは 5 月から 8 月に関東地方で流行した株で、PFGE 型は 19 株が T-1307, 1 株は T-1307-2 であった (感染研 PFGE Type h406) (写真 2)。

B 型：食中毒事例由来株を含む 23 株で、全て O157 : H7 (VT1+VT2 産生) であった。PFGE パターンは 5 パターンに分類された。

C 型：G 居酒屋を原因とした食中毒事例由来株 13 株を含む 19 株で、全て O157 : H7 (VT2 産生) であった。PFGE パターン

は 1 株でバンド 1 本異なっていたが、他は全て同一であった。

D 型：18 株分離され、全て O157 : H7 (VT1+VT2 産生) 株であった。これら菌株の PFGE パターンは 9 種類に分類された。

E 型：11 株分離され、全て O157 : H7 (VT1+VT2 産生) 株であった。PFGE パターンは 6 種類に分類された (写真 3)。

3. IS-printing system の実施状況に関するアンケート結果

各地研での IS-printing system 法の実施状況は、11 施設中 9 施設が「導入している」と回答し、ほとんどの施設で IS 法を実施していることが明らかになった。また、「実施している」と回答した 9 施設中 5 施設は「分離された全ての株について実施」、4 施設は「必要時のみ実施」であった。

その他の要望・意見としては、Outbreak の早期発見のためには IS データベースの活用が望まれるとの意見があった。

4. PFGE 解析および IS printing system 解析が有効に活用された事例

東京都で発生した「G 居酒屋を原因とした食中毒事例」(事例 1)、長野県で発生した「保育所における腸管病原性大腸菌 O55 : H7 による食中毒事例」(事例 2) の概要を別紙のとおりまとめた。特に、東京都で発生した事例においては、関連自治体との情報交換あるいはパルスネットを通じた連携が原因解明に非常に寄与できた例であった。

D. 考察

2013年に東京都で分離された EHEC O157 269 株について IS-printing System

解析を行った結果、87パターンに分けることができた。IS型はPFGE型と比較して、やや解像度は劣る場合もあるが、ほぼ同程度に菌株間の識別が可能であった。IS法はPCR法でVT遺伝子、*eae*、*hly*遺伝子を含め36箇所のバンドの有無を比較する方法である。36箇所以外に特徴的なエキストラバンドが出現する株があり、このエキストラバンドも考慮に入れて分類すると90パターンとより細かく分類することができた。エキストラバンドは、100bあるいは1kb付近に出現することが多く、これらは判別に利用価値がある。しかし、1stセットの14本目と15本目の間に出現する株も少なくない。このバンドは、電気泳動時間が短く、バンドとバンドの間隔が狭い写真だと判定が困難であり、見落としてしまう可能性が高い。PFGE法と同様に、鮮明な電気泳動像を得ることが重要であると考えられた。

IS型が一致した株についてPFGEパターンを比較した結果、それぞれのIS型でPFGEパターンは2~9種類に分類された。IS型A型のようにPFGEパターンはバンド数本違いであり、同一集団由来の可能性が高い場合もある一方、IS型E型のように判定が難しい場合もあるので注意が必要である。

IS-printing System法はPCR法を原理としており、非常に簡便・迅速に型別することが可能である。実施状況に関するアンケートの結果、多くの地研でIS法が受け入れられ、既に多くの株の解析が行われている現状が明らかとなった。

今後はIS法の長所・短所を把握し、データベースの積極的活用や実際の行政に反映できるように整備する必要がある。

E. 結論

腸管出血性大腸菌O157の分子疫学的解析法として開発されたIS-printing System法を、PFGE法と比較検討した。本法は、PCR法を原理としており、非常に簡便・迅速に型別することが可能である。さらに、デジタルデータとして結果が出るため、異なる施設間でのデータ共有がPFGEデータに比べ格段に容易である。実施状況に関するアンケートの結果、既に多くの地研でIS法を導入し、多くの株の解析が行われている現状も明らかとなった。

今後はIS法の長所・短所を十分に把握し、データベースの積極的活用や実際の行政に反映できるように整備する必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

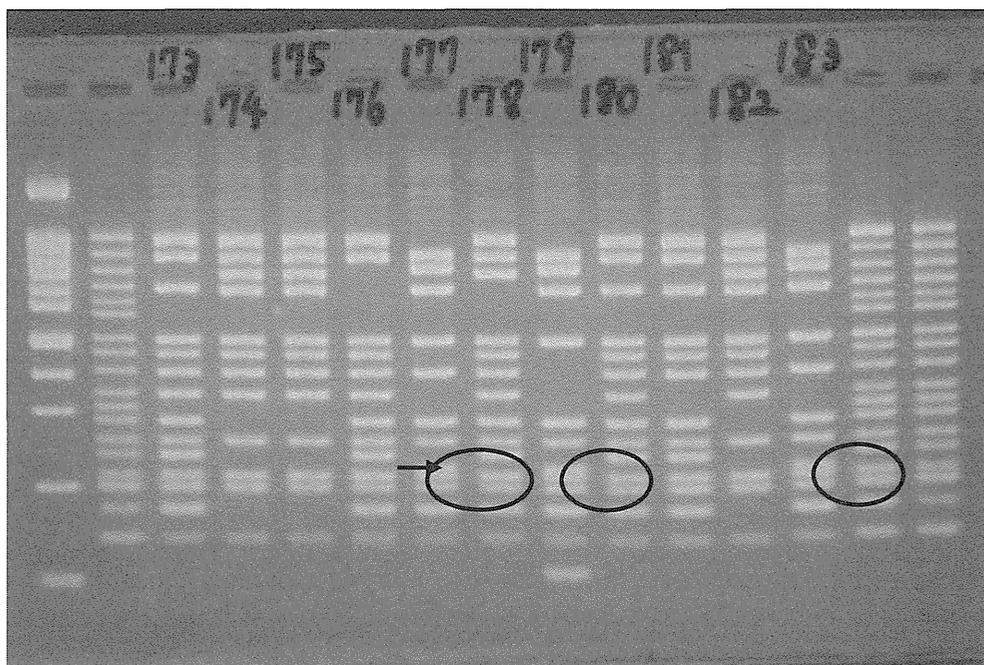
小嶋由香, 平井有紀, 松葉友美, 石井圭, 平井晋一郎, 横山栄二, 他: 中国北京ツアー参加者における複数の腸管出血性大腸菌感染症事例, 病原微生物検出情報(国立感染症研究所) 34, 5, 137-139, 2013.

笠原ひとみ, 上田ひろみ, 宮坂たつ子, 藤田暁, 小野諭子, 関映子, 他: プール水が原因と推定された腸管出血性大腸菌O28集団感染事例ー長野県, 病原微生物検出情報(国立感染症研究所) 34, 5, 132-133, 2013.

H. 知的所有権の取得状況

なし

写真1. IS-printing System 法で出現するエキストラバンド



○ 1stセットの14本目と15本目の間にエキストラバンドがある。
電気泳動時間が短い場合には間隔が詰まってしまう、判定困難となる。

表1. 2013年に東京都で分離されたO157のIS型とPFGE型との比較

IS型	菌株数	IS結果	エキストラバンド	PFGE型の数	血清型	毒素型
A型	30	110000101001101111	有り	2	O157:H7	VT2
		011100100011001010	-			
B型	23	111100111100101101	-	5	O157:H7	VT1+VT2
		011100100011101111	-			
C型	19	110000101000101111	有り	2	O157:H7	VT2
		011100100011001010	-			
D型	18	110100111101111111	-	9	O157:H7	VT1+VT2
		010100100111101111	-			
E型	11	110000111101111111	-	6	O157:H7	VT1+VT2
		010100100111101111	-			

写真2. IS-printing A型 (感染研PFGE type h406)
 PFGE型はバンド1本違いで2パターンに分類された

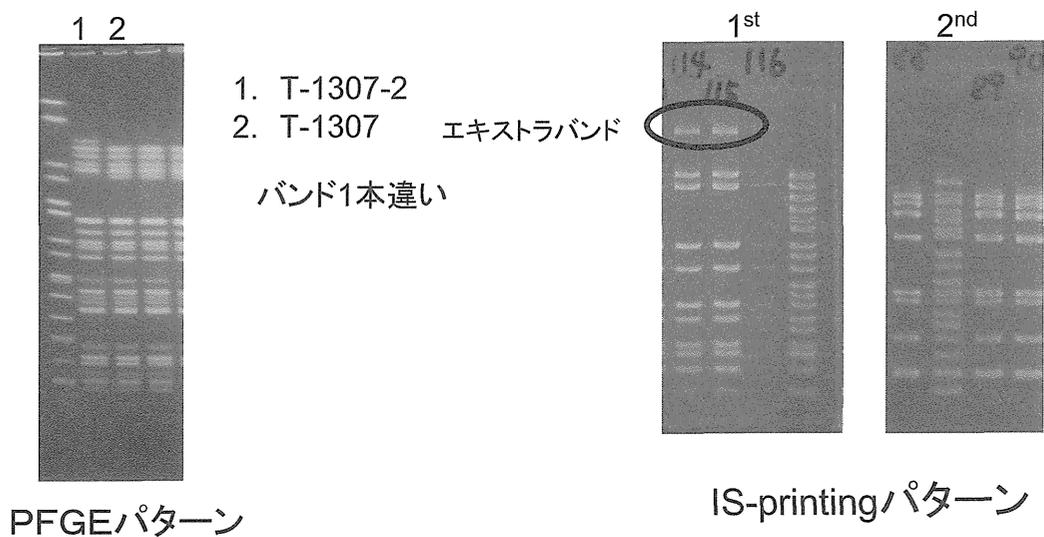
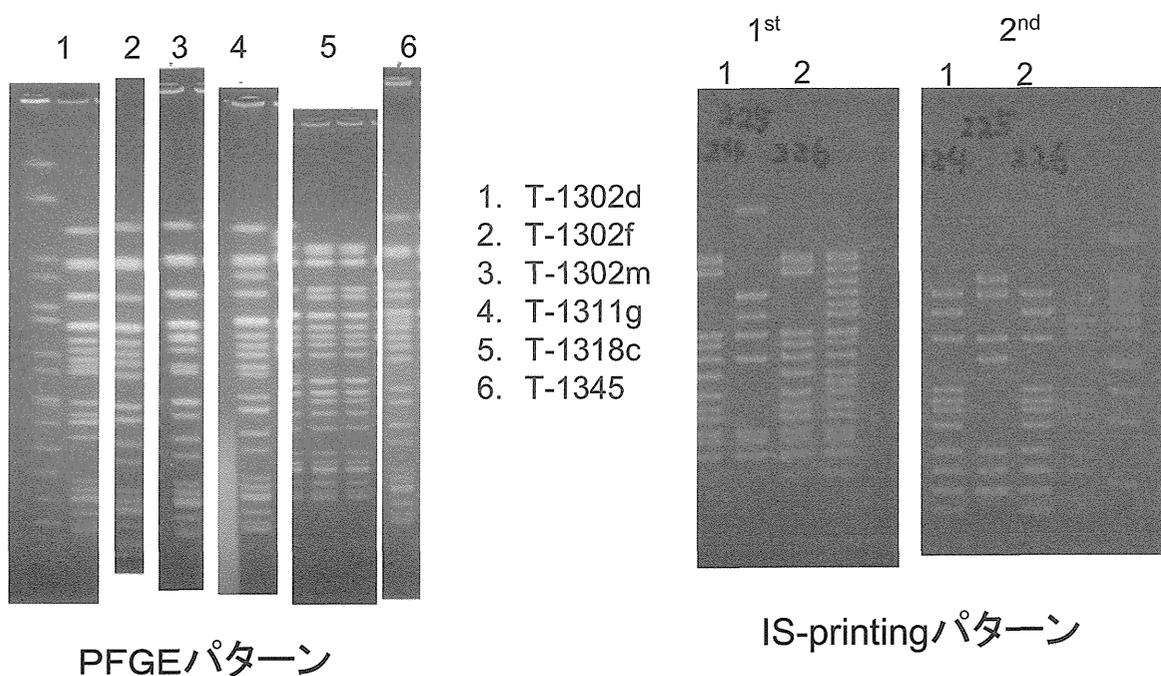


写真3. IS-printing E型
 PFGE型はバンド数本違いで6種類のパターンに分類された



PFGE 解析および IS 解析が有効に活用された事例

「事例 1」

G 居酒屋で発生した腸管出血性大腸菌 O157 食中毒事例

東京都健康安全研究センター

2013 年 5 月、保健所に EHEC O157(VT2) の発生届が提出された。患者は大学のクラブ仲間 24 名と G 居酒屋を利用していることが判明し、調査の結果、同行者 7 名が発症していることが確認された。5 月の 1 ヶ月間に収集された O157 株 15 株および同行者糞便から検出された 2 株の合計 17 株について PFGE 解析を実施した結果、14 株が同じパターンを示した。更にパルスネットを通じて PFGE パターンおよび IS 型の情報を自治体間で共有し、同じパターン株の分離状況を調べた結果、群馬県分離株で同じパターンを示す株が分離されていることが判明した。喫食調査から G 居酒屋を利用していたことが明らかとなった。最終的に G 居酒屋を利用した 7 グループ 17 名の患者が確認された。

今回、散発患者として届出があった中には、喫食場所を正確に記憶していない患者も認められた。しかし分離株の PFGE 型が一致したことで改めて調査したところ、喫食場所を思い出すことが出来た事例もあった。また G 居酒屋は昼と夜で店名が異なっており、一見喫食場所が異なっていると考えられたが、実は同じ G 居酒屋であった例もあった。

5 月前半、千葉県でも焼肉店利用者複数名から O157(VT2) が分離されているという情報があった。菌株を交換し PFGE 解析を行ったところ G 居酒屋由来株とほぼ同じ PFGE パターンであった。千葉県事例の共通食は不明であったが、G 居酒屋で喫食した患者はセンマイ刺し、ホルモン、牛握り等、牛肉やホルモンを喫食していたことが確認された。遡り調査の結果、提供されていたホルモンは、東京都内のと場で処理後、内臓卸業者を通じて G 居酒屋と千葉県患者が喫食した焼肉店に提供されていることが判明した。

今回の事例では、東京都で把握していた O157 の散発患者情報を基に、分離された O157 を分子疫学解析し、その結果をもって更に詳細に行った患者の遡り調査により原因施設を特定することができた。また関連自治体との情報交換あるいはパルスネットを通じた連携が原因解明に寄与できた事例であった。

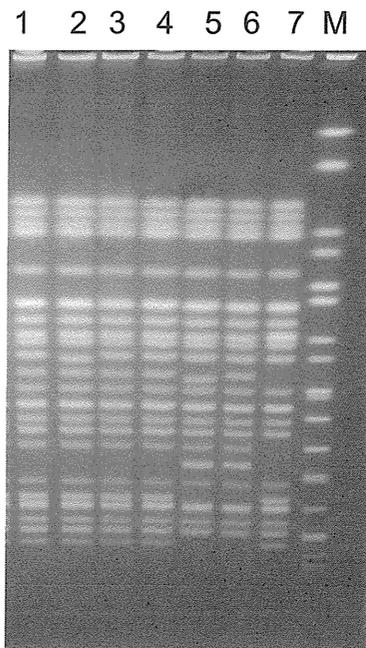
G居酒屋で発生した腸管出血性大腸菌O157食中毒事例（2013年5月）

喫食者数:61名, 患者数:17名, 原因食品:G居酒屋で提供された食事
原因菌: O157(VT2産生)

グループ	1	2	3	4	5	6	7
	会社同僚	大学生	友人	友人	会社同僚	友人	友人
喫食日	5月10日 夜	5月11日 夜	5月7日 夜	5月11日 夜	5月9日 夜	5月9日 昼	5月6日 昼
喫食者数	14名	24名	3名	2名	9名	2名	7名
患者数	3名	7名	3名	1名	1名	1名	1名
菌検出者	1名	5名	3名	1名	1名	1名	1名
居住地	東京都	東京都	金沢市	神奈川県	東京都	東京都	群馬県

- ・ 5月前半からO157(VT2産生)分離数が増加
- ・ この時期に分離された菌株のPFGE型が一致
- ・ 患者の中にG居酒屋利用者がいたことから調査を開始
- ・ 昼と夜で店名が異なっていたが、実は同じ店であった

4月～5月に分離されたO157(VT2)のPFGEパターン



1～2. G居酒屋関連株(東京都患者)

3. 千葉県患者A (市川, K焼肉店利用)
4. 千葉県患者B (市川, K焼肉店利用)
5. 千葉県患者C
6. 千葉県患者D
7. 千葉県患者E

千葉県で実施したVNTR型も一致

