

- から応用への橋渡し”（北海道上川郡美瑛町白金温泉 国立大説青少年交流の家） 特別講演 ノロウイルス研究のトピックス
6. 片山和彦 平成 26 年 7 月 28 日 メディア意見交換会 “知っているようで知らないノロウイルス” 感染研戸山庁舎
 7. 片山和彦 平成 26 年 8 月 23 日 ノロウイルス感染症の高齢者施設における実態と対策 ノロウイルスの最近の流行状況 第 6 回 J 感染制御ネットワークフォーラム 教育セミナー10 宮城県仙台市
 8. 片山和彦 平成 26 年 8 月 1 日 第 39 回食品衛生懇話会 “食品安全行政の現状と最近の諸問題について・ノロウイルスの最近の知見について 日本食品衛生協会 渋谷区神宮前
 9. 片山和彦 平成 26 年 8 月 18 日 愛知県感染症予防指導者セミナー ノロウイルスの最近の知見について 愛知県名古屋市
 10. 片山和彦 平成 26 年 9 月 8 日 小金井市医師会講演会 “知っているようで知らないノロウイルス” 東京都小金井市
 11. 片山和彦 平成 26 年 10 月 4 日 感染研公開 クイズ・これであなたもノロ博士 感染研戸山庁舎
 12. 片山和彦 平成 26 年 10 月 19 日 小児感染症学会 ランチョンセミナー ノロウイルスの最近の知見 東京都京王プラザホテル
 13. 片山和彦 平成 26 年 10 月 21 日 ノロウイルス 郡山市保健課・日本食品衛生協会 福島県郡山市
 14. 片山和彦 平成 26 年 10 月 22 日 医師卒後研修会 下痢症ウイルスについて 感染研戸山庁舎
 15. 片山和彦・染谷雄一 IPV 検定について WHO 研修 マレーシア研修生受け入れ、講義 感染研村山庁舎
 16. 片山和彦 平成 26 年 11 月 25 日 第 15 回北多摩北部感染対策研究会 ノロウイルス感染症 国立療養所東京病院 講義室
 17. 片山和彦 平成 26 年 11 月 9 日 ウイルス学会サテライトセミナー 横浜市民講座 “ノロウイルス” 日本ウイルス学会・神奈川県横浜市
 18. 片山和彦 平成 26 年 11 月 15 日 “知っているようで知らないノロウイルス” 健康公開講座 NHK 横浜放送局共催横浜市民講座・神奈川県横浜市
 19. 片山和彦 平成 26 年 11 月 27 日 特定非営利活動法人食の安全を確保するための微生物検査協議会 “知っているようで知らないノロウイルス” 日本橋
 20. 片山和彦 平成 27 年 2 月 7 日 第 11 回日本小児消化管感染症研究会 教育講演 大阪大学中之島センター・大阪市
(新聞) 指導、監修
 21. 北海新聞 ノロウイルス 相次ぐ胃腸炎の集団発生 2014 年 1 月 28 日
 22. 西日本新聞 ノロ感染源あなたかも 2014 年 1 月 28 日 夕刊
 23. 新潟新聞 ノロ誰でも感染源に 2014 年 1 月 27 日
 24. 秋田さきがけ 誰もが感染源に ノロウイルス相次ぐ集団発生 2014 年 1 月

30日

25. 岐阜新聞 あなたもノロ感染源？
2014年2月3日
26. 京都新聞 ヒトからヒトへノロウイルス
2014年2月4日
27. 山梨新聞 ノロウイルス感染防げ
2014年2月3日
28. 四国新聞 ノロウイルス意識変えて
2014年1月31日
29. 千葉日報 あなたも感染源に？ 2014
年2月7日
30. 毎日新聞 封じ込め難しいノロ 2014
年3月15日
31. 少年写真新聞 中学保健ニュース ノ
ロウイルスの感染経路を知ろう 2014
年12月18日
32. 少年写真新聞 高校保健ニュース ノ
ロウイルスの感染経路を知ろう 2014
年12月18日
(その他)
33. ロタウイルス検出マニュアル

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

「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	寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部
研究協力者	石原 朋子	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	伊豫田 淳	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所 細菌第一部
研究協力者		地方衛生研究所

研究要旨 BioNumerics (BN) server によるオンラインシステムのデータベースの継続的な運用を行った。2014 年に分離された EHEC について MLVA および PFGE 解析を行い、その遺伝子型別に基ついて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 1447 株に対して、537 の MLVA 型が付与された。このうち 695 株について PFGE 解析を行い、356 のサブタイプが付与された。解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 639 株であった。コンプレックスは 0157 12 種類、026 1 種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは 0157 で 3 種類、026 で 2 種類、0111 で 1 種類であった。

A. 研究目的

細菌性食品由来感染症の調査において、食品或いは患者由来株の解析から得られた科学的データが迅速に共有されることが重要である。また、日進月歩の解析手法を検証しながら、迅速高解像度の解析手法に基づく結果を関係機関で共有することで、当該事例の早期探知、拡大阻止に結びつけることを目的とした。

B. 研究方法

平成 26 年に感染研に送付された腸管出血性大腸菌に対して PFGE 解析および MLVA を行った。解析結果のデータベース化を

BioNumerics (Applied Maths 社) により行った。結果については、電子メールにより菌株送付機関に還元した。広域事例が疑われる場合には、必要に応じて、電子メールにより全国 6 ブロックの研究代表者を介して各地方衛生研究所への配信を行ったり、食中毒調査支援システム (NESFD) において情報共有を行ったりした。

PFGE については Pulsenet International に準拠した方法で、MLVA については Izumiya ら (2008) に記載の遺伝子座を用いて解析した。

C. 研究結果

本年度より血清群 0157、026 及び 0111 については MLVA を実施し、一部について PFGE 解析を実施した。(なお、本結果は 2014 年分離・送付株で 2015 年 1 月末におけるものである。)

1. MLVA

EHEC 0157 1447 株、026 438 株、0111 48 株を MLVA で解析した。それぞれ、537、163、29 のタイプが同定され集団事例由来株はそれぞれクラスターを形成した(図 1、図 3、図 5)。

2. PFGE 解析

EHEC 0157 695 株、026 283 株、0111 46 株については PFGE も実施した。0157 は 356 のサブタイプが同定され、うち 300 が 2014 年に新規に同定された。026 は 185 のサブタイプが同定された。PFGE においても集団事例由来株の多くが MLVA 同様にクラスターを形成した(図 2、図 4、図 6)。

3. 広域株の解析

MLVA では関連が疑われるタイプ同士をコンプレックスとして包括している。2014 年分離、解析した EHEC 株のうち、5 地研以上で検出された MLVA コンプレックスもしくはタイプに含まれる株は 639 株であった。コンプレックスは 0157 12 種類、026 1 種類であり、コンプレックスに含まれない広域タイプは 0157 で 3 種類、026 で 2 種類、0111 で 1 種類であった。

このうち、構成菌株数の多い上位 5 種類のコンプレックス 14c007、14c001、14c018、14c013、14c016 の分布状況は図 7 に示すとおりである。このうち、14c001 は 2014 年 4 月に発生した広域食中毒事例、14c018 は 8 月に発生した広域集団事例の株を含んでい

た。また、14c007 は 171 株からなり、2014 年 7 月をピークに 18 都府県、23 機関からの株を含んでいた。このうち、71 株について PFGE を行った結果、15 パターンが得られ、互いに類似した i133 (n=17) および i327 (n=34) が大勢を占めた。

0157、026、0111 以外の血清群でも広域株が検出されており、0121 では 3 地研以上で検出された PFGE 型が 2 種類あった。

4. 広域株に関する情報提供

複数地研以上で共通パターンを示す株について、構成菌株リストおよび MLVA 型間の関係を示す MST をまとめ、関係機関に還元し、必要に応じて NESFD 内掲示板ならびに全国 6 ブロックの研究分担者を介した各ブロックの地研への情報提供を行った。

D. 考察

本年度から 0157、026、0111 について、MLVA を主体とした解析システムの導入を行った。MLVA の結果から関連が疑われる株、および上記 3 血清群以外の菌株については PFGE 解析を行った。集団事例株については MLVA も PFGE も同様のクラスターを形成した。

5 地研以上から検出された MLVA コンプレックス/タイプは 0157 で 15 種類、026 で 3 種類、0111 で 1 種類であった。上記 14c007 の例にあるように、MLVA と PFGE の結果が必ずしも一致しない場合もあるが、類似パターンを含めた一致の程度は 7 割程度と考えられる。

E. 結論

現在 IS printing system による 0157 迅速解析が普及してきており、4 月に発生した広域食中毒事例でも PFGE、MLVA を併用しつつ迅速な情報共有が行われた。

今後も各解析法の長所を生かし、迅速な情報共有に結び付けて感染源の究明に努めることが肝要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 誌上発表

なし

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図 1. 0157 MLVA クラスター解析
下、集団事例株および広域 MLVA コンプレックス

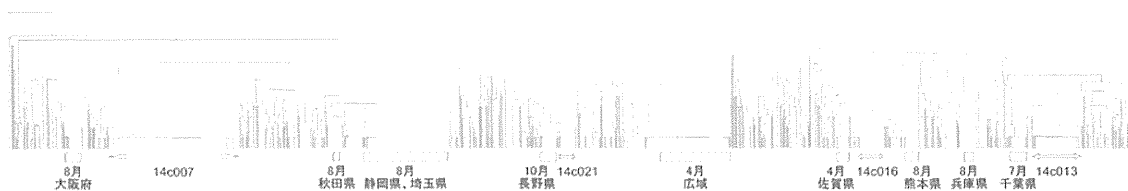


図 2. 0157 PFGE クラスター解析
中段、集団事例株。下、広域 MLVA コンプレックスに対応する主要クラスター。

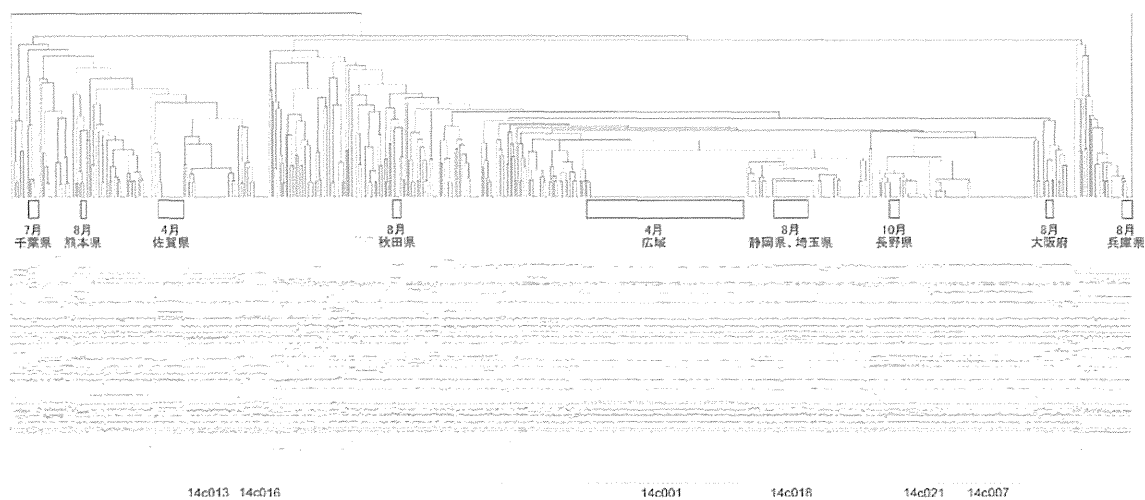


図 3. 026 MLVA クラスター解析

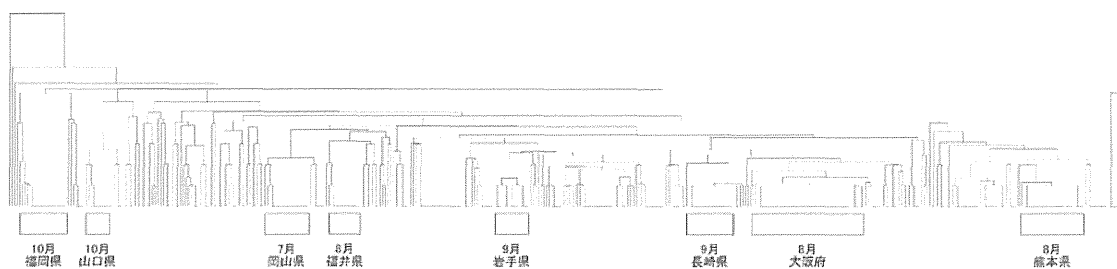


図 4. 026 PFGE クラスター解析

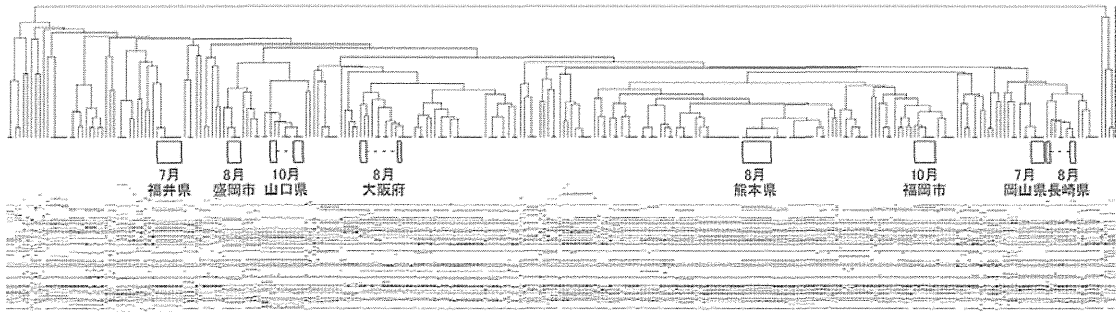


図 5. 0111 MLVA クラスタ解析

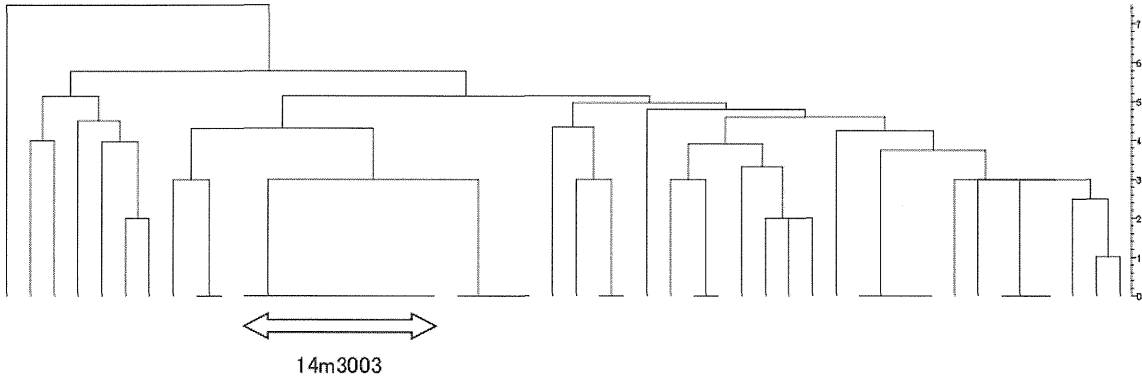


図 6. 0111 PFGE クラスタ解析

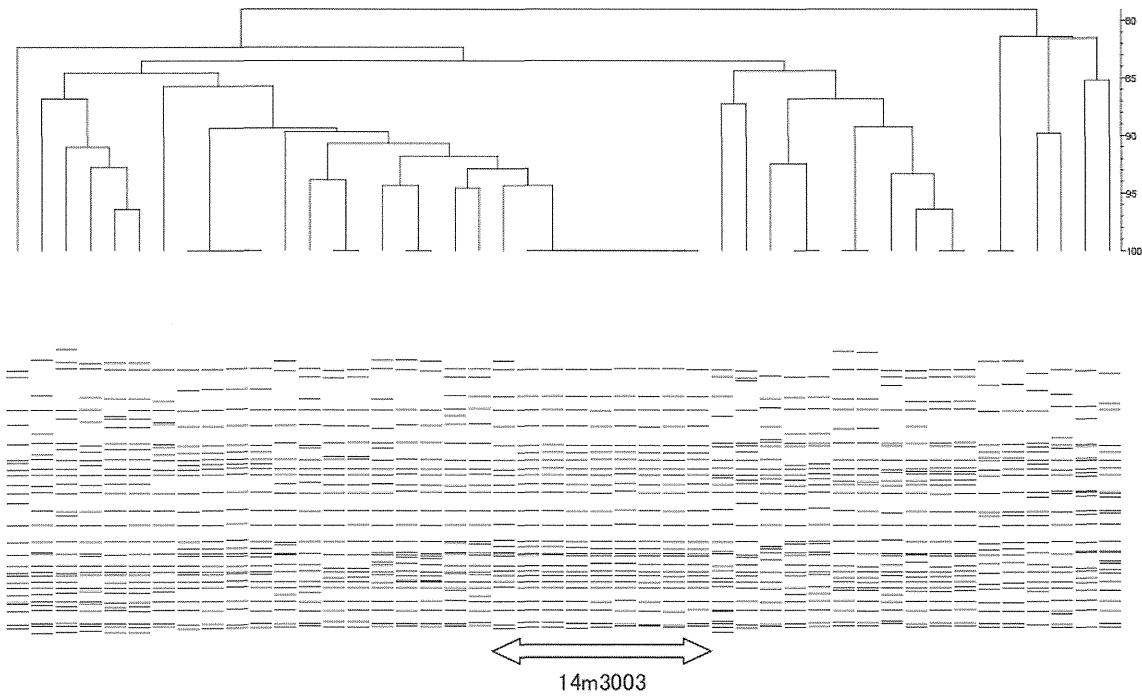
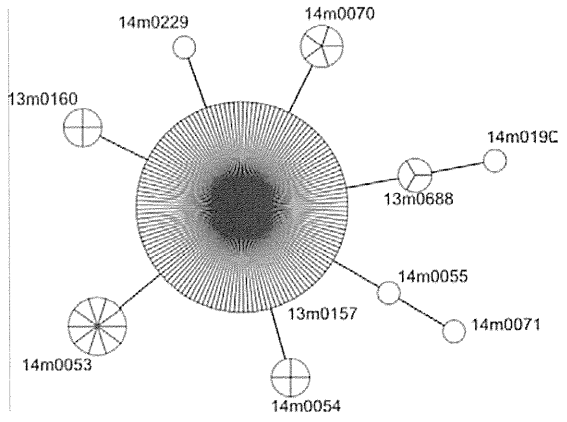
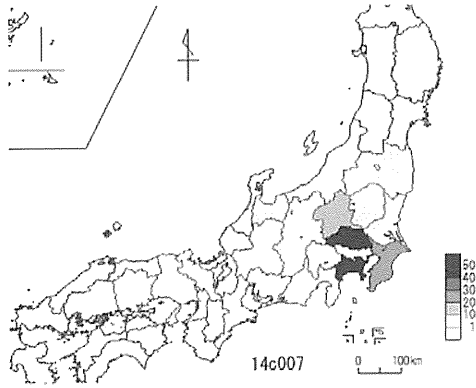
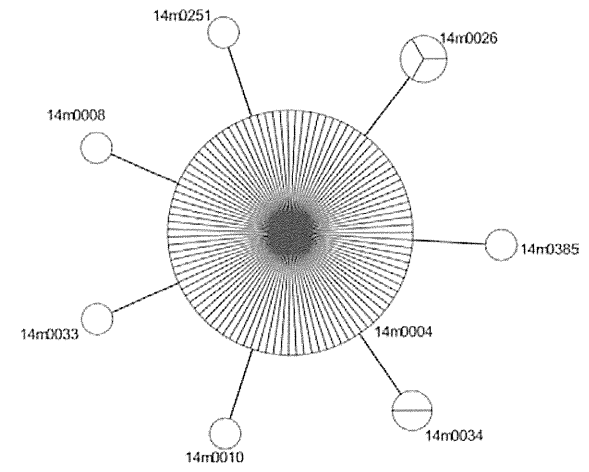
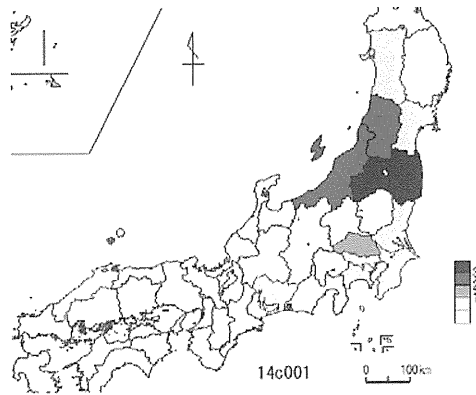


図 7. 広域 MLVA コンプレックス分布および MST。

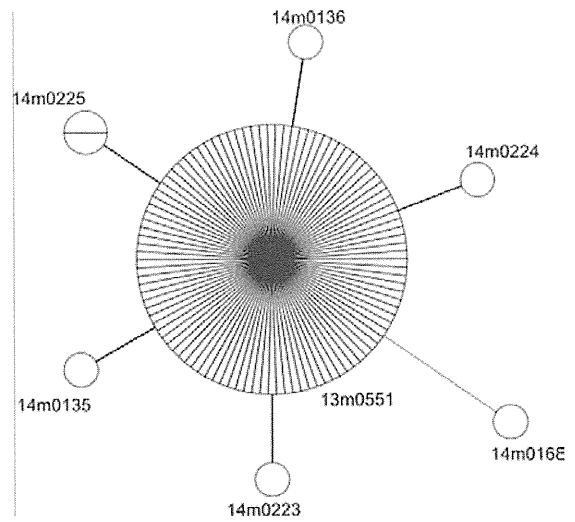
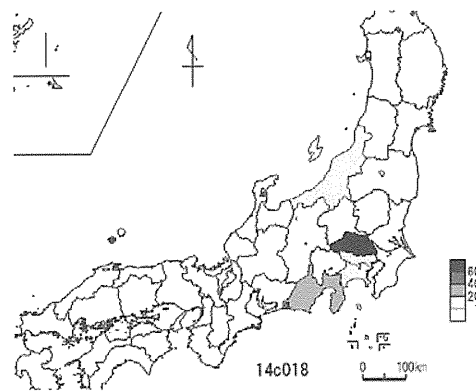
a) 14c007



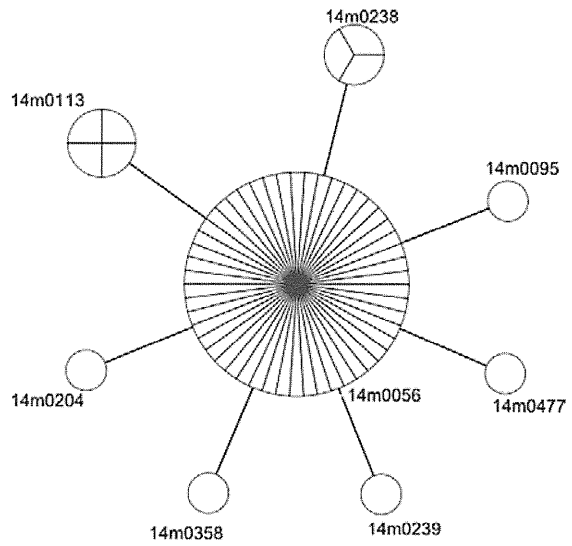
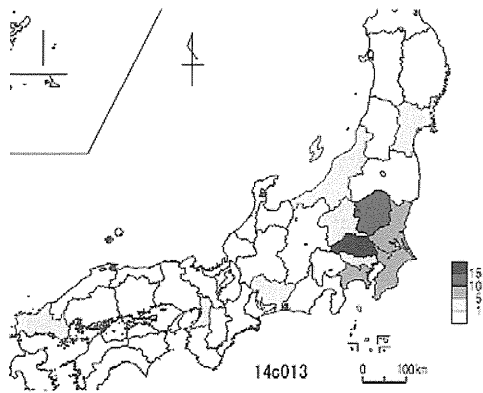
b) 14c001



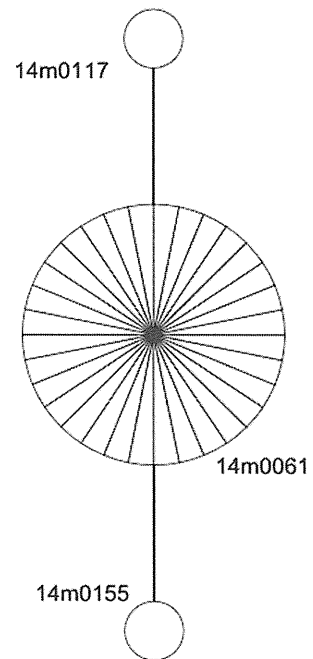
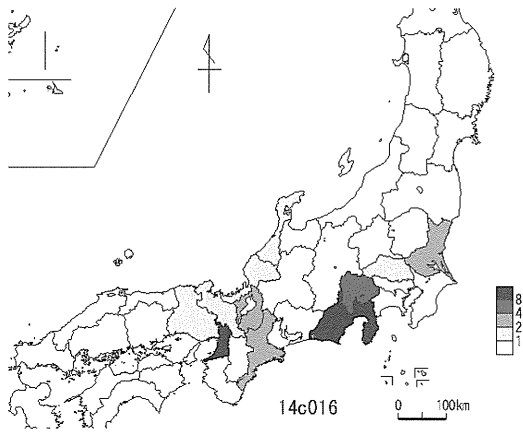
c) 14c018



d) 14c013



e) 14c016



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)

研究課題名(課題番号):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 (H24-新興-一般-005)

平成 26 年度 分担研究報告書

分担研究課題名:「国内分離 O157:H7 の系統解析に関する研究」

研究分担者:伊豫田淳(国立感染症研究所・細菌第一部)

協力研究者:勢戸和子(大阪府公衆衛生研究所)、木全恵子、磯部順子(富山県衛生研究所)、江藤良樹、市原祥子(福岡県保健環境研究所)、右田雄二(長崎県環境保健研究センター)、緒方喜久代(大分県衛生環境研究センター)、本田己喜子(福岡市保健環境研究所)、久保田勉(北九州市環境科学研究所)、河野喜美子(宮崎県衛生環境研究所)、松本一俊(熊本県食肉衛生検査所)、久高潤(沖縄県衛生環境研究所)、浅井紀夫(京都府保健環境研究所)、矢端順子、富永潔(山口県環境保健センター)、寺嶋淳(国立医薬品食品衛生研究所)、石原朋子、泉谷秀昌(国立感染症研究所)、小椋義俊(宮崎大学)、齊藤剛仁(国立感染症研究所)、井口純(宮崎大学)、小林秀樹(動物衛生研究所)、工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所)、大西真((国立感染症研究所)、EHEC ワーキンググループ(詳細略)

研究要旨

国内でヒトから分離される腸管出血性大腸菌(EHEC)のうち、血清群 O157(血清型 O157:H7/H-)は依然として全体の半数以上を占め、EHEC 感染による重症例である溶血性尿毒症候群(hemolytic uremic syndrome: HUS)発症例の 80%以上は血清型 O157:H7/H-によるものである。国内で分離される O157 株の系統解析を行う目的で、塩基配列ベースによる系統解析法(clade 1-9 型別法)を用いて 1999-2011 年までに国内で分離された計 656 株(パルスフィールドゲル電気泳動パターンがそれぞれ異なる無症状保菌者由来株 387 株と HUS 患者由来株 269 株)について clade 型および *stx* 遺伝子型型の分布解析を行った。その結果、1) clade 3, 6, 8 は HUS 患者由来株に有意に多いこと、2) clade 7 は無症状保菌者由来株に有意に多いこと、3) *stx2a* 保有株は clade 8 であれば HUS 由来株に有意に多く、clade 7 であれば無症状保菌者由来株に有意に多いこと、4) *stx2a stx2c* 保有株は clade 6/8 であれば HUS 由来株に有意に多く、clade 7 であれば無症状保菌者由来株に有意に多いことが明らかとなった。以上の結果から、HUS 発症リスクの高い clade と *stx* 型の組み合わせは、clade 8 + *stx2a* または clade 6/8 + *stx2a stx2c* であることが明らかとなった。

A. 研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大

腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) の半数以上は血清群 O157 (血清型 O157:H7/H-) によるものであり、EHEC 感染による重症例である溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS) 発症例の 80%以上は O157 が原因とされている。

Manning ら (Proc. Nat. Acad. Sci. 105: 4868-4873, 2008.) は様々な集団発生由来の O157 株を用いて 96 遺伝子座の一塩基置換 (single nucleotide polymorphism: SNP) 解析に基づく DNA 型別法 (clade typing) を開発した。この clade 型別法によって、これまでに主として米国で分離された集団発生由来の O157:H7/H-株はおおよそ 9 つの遺伝学的 clade (clade 1-9) に分類され、2006 年に米国で発生したハウレン草やレタスの喫食に由来する二つの集団発生由来株は clade 8 として型別された。EHEC 感染による HUS の発症率(全患者数に対する HUS 発症数)は、通常の事例では 5%程度と見積もられているが、clade 8 が関連した上記の 2 つの集団発生事例ではそれぞれ 15%と 11%であることが報告されており、このため clade 8 は高病原性であると推定されている。しかし、これらの集団発生では、原因食材となったハウレン草やレタスへの EHEC による汚染度は明らかになっておらず、患者あたりの菌の暴露率も不明であることから、必ずしも菌側に必要条件があるとは結論できない。Manning らは過去の米国での分離株のうち、HUS 患者由来株として 10 株を解析し、このうち 7 株までが clade 8、残り 3 株が clade 2 であったと述べているが、これらの解析は HUS 由来株の解析数が少ない上、無症状保

菌者 (asymptomatic carrier: AC) 由来株の解析も十分ではないため、clade 8 の HUS 発症への関与については不明な点が多い。

そこで本研究では、国内で分離された O157 株のうち、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE) 型の異なる HUS 患者由来株と AC 由来株を用いて clade 型別を行うと共に、これらの株が保有している志賀毒素遺伝子 (*stx*) の亜型 (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) の解析を行い、重症者に有意に多く見られる clade と *stx* の亜型の分布について解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) 使用した O157 株の選定

全国の地方衛生研究所・保健所等から送付された EHEC O157 株 (1999 年から 2011 年までに分離) のうち、HUS 患者由来株と AC 由来株に絞り、散发事例由来株または集団発生事例由来の代表株 1 株のみを選択した。次に、これまでに本研究班の成果として蓄積してきた PFGE 型を比較し、すべての菌株が異なる PFGE 型である株を選択した。その結果、無症状保菌者由来株 387 株と HUS 患者由来株 269 株について解析を行った。

2) clade 8 型別法

本研究成果を発表した論文 (Iyoda et al., 2014) に記載の通り、clade 8 については特異的な mismatch amplification mutation assay (MAMA)-PCR 系を構築し、PCR ベースで型別を行った。

3) その他の clade 型別法

32箇所 の SNPs によって clade 1-7, 9 の型別を行った。

カイ二乗検定またはフィッシャーの正確性検定を実施した。

C. 研究結果

1) clade の分布

clade 3, clade 6, clade 8 は AC 由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多く、中でも clade 8 は最も有意差が大きい。一方、clade 7 は AC 由来株に有意に多い clade であることが判明した (表 1)。

2) *stx* 遺伝子型

stx 型が *stx1a stx2a* および *stx2a stx2c* の株は AC 由来株と比較して HUS 患者由来株に有意に多い。一方、*stx* 型が *stx1a stx2c* および *stx2c* の株はほとんどが clade 7 であり、AC 由来株に有意に多いことが判明した (表 2)。

重症者由来株に多く見いだされると考えられている *stx2a* 型株は HUS 由来株と AC 由来株で差はなかった (表 2)。

3) clade と *stx* 遺伝型

2) で有意差が見いだせなかった *stx2a* の株は、clade 7 の場合には AC 由来株に有意に多いことが、clade 8 の場合には HUS 株に有意に多いことが明らかとなった (表 3)。

同様に、*stx2a stx2c* の株は clade 6/8 であれば HUS 由来株に、clade 7 であれば AC 由来株に有意に多いことが明らかとなった (表 3)。

D. 考察

これまでの研究から、重症例に多く見られると考えられていた *stx2a* 型株は、本研究で用いた菌株では HUS 患者由来株と AC 由

4) 統計解析

来株ではほぼ同数であった。しかし、本研究の clade 解析の結果、clade 7 の場合には AC 由来株に有意に多いことが、clade 8 の場合には HUS 株に有意に多いことが明らかとなった。重症化リスク解析には *stx* 型のみならず、clade 型別が重要であることを示唆している。

E. 結論

HUS 発症リスクの高い clade と *stx* 型の組み合わせとして、clade 8 + *stx2a*, *stx6/8* + *stx2a stx2c* であると考えられた。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

Iyoda S, Manning SD, Seto K, Kimata K, Isobe J, Etoh Y, Ichihara S, Migita Y, Ogata K, Honda M, Kubota T, Kawano K, Matsumoto K, Kudaka J, Asai N, Yabata J, Tominaga K, Terajima J, Morita-Ishihara T, Izumiya H, Ogura Y, Saitoh T, Iguchi A, Kobayashi H, Hara-Kudo Y, and Ohnishi M, EHEC Working Group in Japan: Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular *stx* subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers. Open Forum Infectious Diseases, 1 (2): first published online July 18, 2014.

表1

Distribution of clade type of O157:H7 isolates from HUS patients and asymptomatic carriers (AC)			
clade	Strains derived from:		OR (95% CI), <i>p</i> value for HUS
	HUS (n=269)	AC (n=387)	
1	9	5	2.64 (0.88-7.98), 0.13
2	75	75	1.61 (1.11-2.32), 0.014
3	84	66	2.21 (1.53-3.2), <0.0001
4/5	4	2	2.91 (0.53-16), 0.23*
6	24	10	3.69 (1.74-7.86), 0.00062
7	23	216	0.074 (0.046-0.12), <0.0001
8	50	13	6.57 (3.49-12.4), <0.0001

*: Fisher's exact test value (two-tailed)

表2

Association of <i>stx</i> genotypes with clinical outcome			
<i>stx</i> genotype	strains from:		OR (95% CI), <i>p</i> value for HUS
	HUS (n=269)	AC (n=387)	
<i>1a</i>	1	3	0.48 (0.049-4.62), 0.65*
<i>2a</i>	53	53	1.55 (1.02-2.35), 0.04
<i>2c</i>	10	131	0.075 (0.04-0.15), <0.0001
<i>1a 2a</i>	152	139	2.32 (1.69-3.19), <0.0001
<i>1a 2c</i>	2	30	0.06 (0.02-0.27), <0.0001*
<i>1a 2a 2c</i>	1	9	0.16 (0.02-1.24), 0.05*
<i>2a 2c</i>	50	22	3.79 (2.23-6.43), <0.0001

*: Fisher's exact test value (two-tailed)

表3

<i>stx</i> genotype of strains belonging to each clade group							
clade	<i>stx</i> genotype of isolates from HUS/AC						
	<i>1a</i>	<i>2a</i>	<i>2c</i>	<i>1a 2a</i>	<i>1a 2c</i>	<i>1a 2a 2c</i>	<i>2a 2c</i>
1	0 / 0	1 / 0	0 / 0	8 / 5	0 / 0	0 / 0	0 / 0
2	1 / 1	11 / 3	0 / 0	62 / 69	0 / 0	1 / 2	0 / 0
3	0 / 2	2 / 2	0 / 0	82 / 62	0 / 0	0 / 0	0 / 0
4/5	0 / 0	3 / 0	0 / 2	0 / 0	0 / 0	0 / 0	1 / 0
6	0 / 0	2 / 1	3 / 1	0 / 0	0 / 3	0 / 0	19 / 5
7	0 / 0	11 / 40	7 / 128	0 / 3	2 / 27	0 / 7	3 / 11
8	0 / 0	23 / 7	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	27 / 6

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	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	(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)
	坂本 宣子	(仙台市衛生研究所)
	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.

本研究では、平成 24 年度と平成 25 年度に引き続き、北海道・東北・新潟ブロックの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。秋田県で分離された EHEC O157 分離株 4 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。1st Set PCR の結果において、テンプレートを $4\mu\text{l}$ と他機関より多く反応系に添加した機関が EC16130 株の 1-08 と 1-09、EC16169 株の 1-09 を陽性と判定したのに対して、他の 9 機関はこれらを陰性と判定した。EC16180 株に発生した、1-03 と同等の輝度のエキストラバンドを 3 機関が陽性と判定し、他の 7 機関が陰性と判定した。2nd Set PCR の結果は 10 機関全てで一致した。以上の結果から、結果不一致の要因の一つに、反応系に添加する DNA 量が関与すること、また、正規のバンドと同等の輝度を呈するエキストラバンドにより、結果不一致が発生することが示された。以上の結果から、IS プリンティングの精度管理に未だに課題が存在することが浮き彫りとなり、今後もブロック内における IS-printing system の精度管理の取り組みを継続し、問題点を洗い出すことによりブロック内地方衛生研究所の IS プリンティング精度向上を目指す必要があると考えられた。

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。

EHEC O157 の IS 領域を標的としたマルチプレックス PCR 法である IS-printing system は、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共に、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というメリットのため、現在、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。国立感染症研究所は 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、平成 24 年度と平成 25 年度に引き続き 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）、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 10 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（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、10ng/ μ l 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 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 4 株の IS-printing 1st set PCR 結果を示す。表には 10 機関中陽性（+）と判定した機関数と陰性（-）となった機関数を供試株毎にそれぞれ示した。EC16018 株は 10 機関の結果が全て一致した。EC16130 株は 1 機関が 1-08 と 1-09 を陽性と判定し、他の 9 機関は陰性と判定した。EC16169 株は 1 機関が 1-09 を陽性と判定し、他の 9 機関は陰性と判定した。EC16180 株については、1-03 を 3 機関が陽性と判定し、他の 7 機関が陰性と判定した。なお、3 機関が 1-03 に該当すると判定したバンドは、複数の機関において泳動位置の違いからエキストラバンドと判断された。一方、表 4 に供試 4 株の IS-printing 2nd set PCR 結果を示す。2nd Set PCR の結果は 10 機関全てで一致した。

図 1 に参加機関で得られた電気泳動像を示す。EC16130 株の 1-08 と 1-09、EC16169 の 1-09 を陽性と判定した機関は同一機関（機関 H）であり、反応系に添加したテンプレート量が 4 μ l と、他機関と比較して多いことに注目された。EC16180 株の 1-03 近傍のエキストラバンドは、他のバンドと同様に輝度が強いことが特徴であった。昨年度までの検討と同様に、分子量が大きい領

域ではバンドの幅が拡大する傾向がみられ（機関 D）、ゲルへのアプライ量を調整するなどによりこの点に留意して検討した、あるいは、泳動時間を延長してバンドの位置を慎重に確認した等の機関においては、当該バンドがエキストラバンドであると判定された。昨年度、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念頭に入れる必要があること、そして、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ことが指摘された。今年度供試した EC16180 株は、秋田県で散発下痢患者から分離された株であり、今回の結果は、日常の行政検査で遭遇する可能性のある、一見何の特徴もない EHEC O157 株が判定に注意を要するエキストラバンドを生じることがを平常時から想定して実験条件を設定する必要があることを強く示すものであった。とりわけ、食中毒や Diffuse outbreak の際に、エキストラバンドの判定に起因する施設間の結果の不一致を防ぐためにも、この点について今後特に留意する必要がある。

D. 結論

IS-printing system は市販の試薬キットであり、再現性なども十分検討されていると思われるが、今回の検討において、正規のバンドと同等の輝度を呈するエキストラバンドの出現により、判定の不一致が発生した。また、判定不一致の要因の一つに、反応系に添加する DNA 量が関与することが示された。これらのことから、IS プリンティングの精度管理に未だに課題が存在することが浮き彫りとなり、今後もブロック内における IS-printing system の精度管理の取り組みを継続し、問題点を洗い出すことによりブロック内地方衛生研究所の IS プリンティング精度向上を目指す必要があると考えられた。

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. EC16018	2014. 4. 7	食中毒患者	VT-1, 2 eae
2. EC16130	2014. 6. 25	散発下痢患者	VT-1 eae
3. EC16169	2014. 7. 25	散発下痢患者	VT-2 eae
4. EC16180	2014. 8. 5	散発下痢患者	VT-1, 2 eae

表 2 使用 PCR 装置

北海道	AB 2720 Thermal Cycler	山形県	BIO-RAD My Cycler
		宮城県	AB 2720 Thermal Cycler
札幌市	Takara Model TP600	仙台市	BIO-RAD PTC-0220
青森県	AB Veriti	福島県	BIO-RAD iCycler
岩手県	AB Veriti 200	新潟県	AB Veriti
秋田県	AB GeneAmp PCR System 9700	新潟市	AB Veriti 200Thermal Cycler

表3 供試4株の IS-printing 1st set PCR 結果

1st Set	EC16018		EC16130		EC16169		EC16180	
	+	-	+	-	+	-	+	-
1-01		10	10			10		10
1-02	10		10			10	10	
1-03	10			10		10	3	7
1-04	10		10		10		10	
1-05		10		10		10		10
1-06		10		10		10		10
1-07	10		10			10	10	
1-08	10		1	9	10			10
1-09		10	1	9	1	9	10	
1-10	10			10		10		10
1-11		10		10		10		10
1-12	10			10		10	10	
1-13	10		10		10		10	
1-14		10		10		10		10
1-15	10		10		10		10	
eae	10		10		10		10	
1-16	10		10		10			10
hlyA	10		10		10		10	

表4 供試4株の IS-printing 2nd set PCR 結果

2nd Set	EC16018		EC16130		EC16169		EC16180	
	+	-	+	-	+	-	+	-
2-01		10	10			10	10	
2-02	10		10		10		10	
2-03	10			10		10		10
2-04	10		10		10		10	
2-05		10		10		10		10
2-06		10		10		10		10
2-07		10		10		10	10	
2-08		10		10		10		10
2-09		10		10	10			10
2-10		10		10		10		10
2-11	10			10		10	10	
2-12	10		10		10		10	
2-13		10	10			10	10	
2-14		10		10		10		10
2-15	10		10		10		10	
2-16		10	10			10		10
stx2	10			10	10		10	
stx1	10		10			10	10	

図1 各機関で得た電気泳動像

機関 A テンプレート量 1 μ l

