

は福井県（1株）、石川県（2株）からも検出されていた。

### 3) 豊田市

4株について型別を行った。その内訳は全て患者由来株であった。これら4株は全て異なったIS型に型別された。このうちAA023型は、愛知県（1株）、AA063型は岐阜県（3株）、富山県、福井県（それぞれ1株）、AA103型は名古屋市（1株）からも検出されていた。

### 4) 豊橋市

3株について型別を行った。これら3株は全て異なったIS型に型別された。また、最も多く検出されたAA078型（3株）は、愛知県、三重県（それぞれ3株）、名古屋市（1株）からも検出されていた。

### 5) 名古屋市

10株について型別を行った。これらは全て由来不明であった。これら10株は9つのIS型に分類された。複数の株が含まれたIS型は1つでAA047が2株であった。このIS型は愛知県、石川県（それぞれ1株）、岐阜県（4株）、福井県（7株）からも検出されていた。

### 6) 岐阜県

23株について型別を行った。その内訳は患者由来14株、保菌者由来9株であった。これら23株は12のIS型に分類された。複数の株が含まれたIS型は6つでAA016とAA047がそれぞれ4株、AA063が3株、AA046、AA332、AA611がそれぞれ2株であった。AA016型は岐阜市（1株）、AA047型は愛知県、石川県（それぞれ1株）、名古屋市（2株）、福井県（7株）、AA063型は富山県、福井県、豊田市（それぞれ1株）、AA332型は名古屋市（1株）からも検出された。

### 7) 岐阜市

2株について型別を行った。これら2株は何れも患者由来株であったが、そのIS型は異なっていた。AA016型は岐阜県（4株）、AA064型は愛知県、三重県（それぞれ1株）からも検出されていた。

### 8) 三重県

14株について型別を行った。その内訳は患者由来9株、保菌者由来5株であった。複数の株が含まれたIS型は5つでAA076が4株、AA078が3株、AA060、AA091、AA612がそれぞれ2株

であった。AA078型は愛知県（3株）、豊橋市、名古屋市（それぞれ1株）、AA060型は富山県（1株）、AA064型は愛知県、岐阜市（それぞれ1株）、AA091型は愛知県、岡崎市（それぞれ2株）からも検出された。

### 9) 石川県

13株について型別を行った。その内訳は患者株が12株、保菌者株が1株であった。複数の株が含まれたIS型は3つでAA020、AA040、AA599がそれぞれ2株であった。AA040型は岡崎市、福井県（それぞれ1株）、AA047型は愛知県（1株）、名古屋市（2株）、岐阜県（4株）、福井県（7株）からも検出された。

### 10) 富山県

8株について型別を行った。その内訳は患者株が7株、保菌者株が1株であった。これら8株は全て異なったIS型に型別された。AA060型は三重県（1株）、AA063型は岐阜県（3株）、福井県、豊田市（それぞれ1株）からも検出された。

### 11) 福井県

12株について型別を行った。その内訳は患者株が11株、保菌者株が1株であった。これら12株は5つのIS型に分類された。複数の株が含まれたIS型は2つでAA047が7株、AA071が2株含まれた。AA047型は愛知県、石川県（それぞれ1株）、名古屋市（2株）、岐阜県（4株）AA063型は岐阜県（3株）、富山県、豊田市（それぞれ1株）からも検出された。

## 1-2. 複数の市県から検出されたIS型

表2に各IS型が検出された施設とその数を示した。

最も多くの市県から検出されたIS型はAA047型（5市県由来15株）であった。その内訳は福井県7株、岐阜県4株、名古屋市2株、愛知県、石川県それぞれ1株であった。以下、多くの市県から検出されたIS型はAA078型（4市県由来8株で、その内訳は愛知県、三重県それぞれ3株、豊橋市、名古屋市それぞれ1株。）、AA063型（4市県由来6株で、その内訳は岐阜県3株、富山県、福井県、豊田市それぞれ1株。）であった。

2. PFGE、MLVA 解析結果の疫学解析に活用された事例に関する調査

今年度は PFGE に関して 2 施設から報告があった。

#### 1) 富山県 (図)

平成 26 年 6 月と 8 月に 0157 (VT1、以下 0157) の感染事例が 2 件発生した。VT1 単独保有型 0157 は、全国の 2013 年の 0157 感染事例 1077 件の 4.5%しか報告されておらず<sup>\*1</sup>、稀な毒素型であった。そこで本県で発生したこれらの 0157 (VT1)2 件について、IS-Printing による遺伝子型別を行った。その結果、IS-Printing の型別は 1 バンド違いであった。さらに分離株の PFGE を行った結果、PFGE パターンは 3 バンド (バンド位置、輝度の相違を含む) 違いであり、菌株間の類似性が極めて高い<sup>\*2</sup>と考えられた (図)。また、国立感染症研究所による MLVA 型別においても、これらの菌株の MLVA 型は一致していた。しかし、これらの 2 件の感染事例は散发事例であり、その関連性や感染経路は不明であった。

<sup>\*1</sup>病原微生物検出情報 (2014), 35, 119

<sup>\*2</sup>J. C. M. (1995), 33, 2233-2239.

#### 2) 岐阜市

散发事例 2 株について PFGE を実施した。両者のバンドパターンは 7 本以上異なっており由来は異なると推察された (図 1)。

#### 3) 岐阜県

岐阜県では腸管出血性大腸菌 0157 全株について MLVA 解析を実施している。そのうち、飲食店が関連した集団感染事例について報告する。

##### 事例の概要

- ・原因施設：各務原市内の飲食店
- ・感染者数：6 名 (喫食者 4 名 (うち 2 名は他県在住者) 及び従業員 2 名)
- ・発生日：平成 26 年 7 月 24 日
- ・原因菌：腸管出血性大腸菌 0157:H7 VT2

##### MLVA 解析方法

MLVA は既報 (岐阜県保健環境研究所報, 20, p1-6, 2012) に従い 9 遺伝子座の繰り返し配列のリポート数を算出し、そのうち 0157-10 を除いた 8 遺伝子座の繰り返し数を比較に用いた。株同士の距離をリポート数の異なった遺伝子座数に基づき算出し (2 株のリポート数が 7 遺伝子座で一致し、残りの 1 遺伝子座で違っていた場合の距離は  $1 \div 8 = 0.125$  となる)、UPGMA 法によりデンドログラムを作成してクラスター解

析を行った。リポート数が 8 遺伝子座すべてで一致、または 1 遺伝子座の違い (single locus variant; SLV) を同一パターンと判定した。

##### MLVA 解析結果

当該飲食店と関連があった感染者 6 名から検出された 0157 VT2 (6 株)、及び平成 26 年 4 月から 9 月までに県内で発生があった 0157 VT2 散发および家族内感染事例の 6 株について MLVA を実施した。その結果、飲食店関連 6 株のうち 5 株が同一 MLVA パターンを示し、1 株が他の 5 株のパターンと SLV であったことから同一株による集団感染事例であると判断した。また、その他の散发・家族内感染事例の 6 株とは 5 遺伝子座以上の違いがあり同一パターンを示す株は認められなかった (図 2)。

#### 4) 0111 の MLVA 解析に基づく食品関係従事者検便

国立感染症研究所で実施した 0111 の MLVA 解析の結果、複数の市県から検出された患者由来株の MLVA Type が一致した。疫学調査の結果、患者はいずれも同一チェーン店の焼肉店を利用していた。そこで、食材を加工している施設従業員 98 名の検便を保健所にて実施した。その結果、0111 は検出されなかった。

#### D. 考察

##### 1) 各施設の IS printing System の型別結果と他の市県分離株との関連

東海・北陸地方 11 施設において今年度に検出された 119 株の 0157 について IS printing System を実施した。本データベースを用いて解析を行ったところ、119 株は 57 の異なった IS 型に型別された。これら IS 型のうち 11 の IS 型は 2 施設以上から検出されていた。このうち 7 つの IS 型は東海地方の市県から検出されていたが、残りの 4 つの IS 型は東海・北陸両地方の市県から検出されていた。今回の解析から最も多くの市県から検出された IS 型は AA047 型で東海・北陸両地方にまたがる 5 市県で 15 株検出された。その内訳は福井県 7 株、岐阜県 4 株、名古屋市 2 株、愛知県、石川県それぞれ 1 株であった。次に多くの市県から検出された IS 型は AA078 型で 4 市県由来 8 株検出され、その内訳は東海地方愛知県、三重県それぞれ 3 株、豊橋

市、名古屋市それぞれ 1 株であった。また、AA063 型は東海・北陸両地方にまたがる 4 市県由来 6 株が検出され、その内訳は岐阜県 3 株、富山県、福井県、豊田市それぞれ 1 株であった。

## 2) PFGE 等の疫学解析への活用に関する調査

平成 26 年度東海・北陸 11 施設の疫学解析への活用に関する調査に関する調査では 2 施設で PFGE の結果が疫学解析へ活用されていた。これら 2 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解析もスムーズに進んだものと思われる。対象とした病原菌は腸管出血性大腸菌 0157 であった。また、1 施設で MLVA の結果が集団事例発生時等に活用されていた。今後、PFGE に加え MLVA も疫学解析に用いられるようになると思われる。

## 3) 0111 の MLVA 解析に基づく食品関係従事者検便の実施

国立感染症研究所で実施した 0111 の MLVA 解析の結果、複数の市県から検出された患者由来株の MLVA Type が一致した。患者はいずれも同一チェーン店の焼肉店を利用していたことから、食材を加工している施設従業員 98 名の検便を実施したが、0111 は検出されなかった。今後も国立感染症研究所からの情報を活用して腸管出血性大腸菌感染症の防止に努めたい。

## E. 結論

### 1) 各施設の IS printing System の型別結果と他の市県分離株との関連

東海・北陸地方 11 施設において今年度に検出された 119 株の 0157 について IS printing System を実施し、本データベースを用いて解析を行った。その結果、119 株は 57 の異なった IS 型に型別された。これら IS 型のうち 11 の IS 型は 2 施設以上から検出されていた。このうち 7 つの IS 型は東海地方の市県から検出されていたが、残りの 4 つの IS 型は東海・北陸両地方の市県から検出されていた。今回の解析から最も多くの市県から検出された IS 型は AA047 型で東海・北陸両地方にまたがる 5 市県で 15 株検出された。

### 2) PFGE 等の疫学解析への活用に関する調査

平成 26 年度東海・北陸 11 施設の行政への還元に関する調査では 2 施設で腸管出血性大腸菌

0157 の PFGE、1 施設で腸管出血性大腸菌 0157 の MLVA の結果が集団事例発生時等に疫学解析のため活用されていた。今後もこれら 2 つの方法が集団事例等の疫学解析に活用されるものと思われる。

### 3) 0111 の MLVA 解析に基づく食品関係従事者検便の実施

国立感染症研究所で実施した 0111 の MLVA 解析の結果、複数の市県から検出された患者由来株の MLVA Type が一致した。患者はいずれも同一チェーン店の焼肉店を利用していたことから、食材を加工している施設従業員 98 名の検便を実施したが、0111 は検出されなかった。今後も国立感染症研究所からの情報を活用して腸管出血性大腸菌感染症の防止に努めたい。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

1. 鈴木匡弘、山田和弘、松本昌門ら 国内分離された *Acinetobacter baumannii* international clone II の全ゲノムによる系統解析 第 88 回日本感染症学会学術講演会 平成 26 年 6 月 18 日～20 日、福岡市
2. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門ら 腸管出血性大腸菌 multiplex PCR typing 法 (EHEC\_mPT 法) の開発 第 35 回日本食品微生物学会学術総会 平成 26 年 9 月 18 日～19 日 堺市

表1 東海・北陸各施設で検出された IS 型

行ラベル	データの個数 / IS パターン番号
<b>愛知県衛生研究所</b>	<b>20</b>
AA023	4
AA047	1
AA064	1
AA078	3
AA091	2
AA382	1
AA401	1
AA414	1
AA489	1
AA525	2
AA604	1
AA605	1
AA606	1
<b>岡崎市保健所</b>	<b>10</b>
AA017	3
AA022	2
AA028	1
AA040	1
AA091	2
AA607	1
<b>岐阜県保健環境研究所</b>	<b>23</b>
AA016	4
AA031	1
AA044	1
AA046	2
AA047	4
AA063	3
AA088	1
AA178	1
AA332	2
AA403	1
AA610	1
AA611	2
<b>岐阜市衛生試験所</b>	<b>2</b>
AA016	1
AA064	1
<b>三重県保健環境研究所</b>	<b>14</b>
AA060	2
AA064	1

AA076	4
AA078	3
AA091	2
AA612	2
<b>石川県保健環境センター</b>	<b>13</b>
AA020	2
AA040	2
AA047	1
AA048	1
AA118	1
AA598	1
AA599	2
AA600	1
AA601	1
AA602	1
<b>富山県衛生研究所</b>	<b>8</b>
AA027	1
AA039	1
AA060	1
AA063	1
AA123	1
AA128	1
AA596	1
AA597	1
<b>福井県衛生環境研究センター</b>	<b>12</b>
AA040	1
AA047	7
AA063	1
AA071	2
AA603	1
<b>豊橋市保健所</b>	<b>3</b>
AA078	1
AA608	1
AA609	1
<b>豊田市衛生試験所</b>	<b>4</b>
AA023	1
AA063	1
AA103	1
AA202	1
<b>名古屋市衛生研究所</b>	<b>10</b>
AA047	2
AA078	1
AA103	1

AA311	1
AA332	1
AA500	1
AA613	1
AA614	1
AA615	1

総計 119

表2 各 IS 型が検出された施設

行ラベル	データの個数 / IS パターン番号
<b>AA016</b>	<b>5</b>
岐阜県保健環境研究所	4
岐阜市衛生試験所	1
<b>AA017</b>	<b>3</b>
岡崎市保健所	3
<b>AA020</b>	<b>2</b>
石川県保健環境センター	2
<b>AA022</b>	<b>2</b>
岡崎市保健所	2
<b>AA023</b>	<b>5</b>
愛知県衛生研究所	4
豊田市衛生試験所	1
<b>AA027</b>	<b>1</b>
富山県衛生研究所	1
<b>AA028</b>	<b>1</b>
岡崎市保健所	1
<b>AA031</b>	<b>1</b>
岐阜県保健環境研究所	1
<b>AA039</b>	<b>1</b>
富山県衛生研究所	1
<b>AA040</b>	<b>4</b>
岡崎市保健所	1
石川県保健環境センター	2
福井県衛生環境研究センター	1
<b>AA044</b>	<b>1</b>
岐阜県保健環境研究所	1
<b>AA046</b>	<b>2</b>
岐阜県保健環境研究所	2
<b>AA047</b>	<b>15</b>
愛知県衛生研究所	1
岐阜県保健環境研究所	4
石川県保健環境センター	1
福井県衛生環境研究センター	7

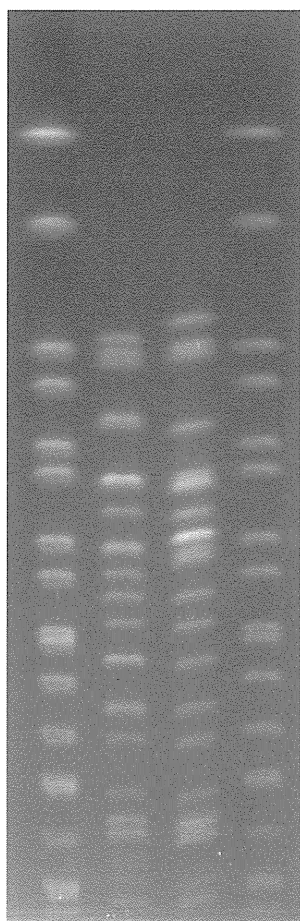
名古屋市衛生研究所	2
<b>AA048</b>	<b>1</b>
石川県保健環境センター	1
<b>AA060</b>	<b>3</b>
三重県保健環境研究所	2
富山県衛生研究所	1
<b>AA063</b>	<b>6</b>
岐阜県保健環境研究所	3
富山県衛生研究所	1
福井県衛生環境研究センター	1
豊田市衛生試験所	1
<b>AA064</b>	<b>3</b>
愛知県衛生研究所	1
岐阜市衛生試験所	1
三重県保健環境研究所	1
<b>AA071</b>	<b>2</b>
福井県衛生環境研究センター	2
<b>AA076</b>	<b>4</b>
三重県保健環境研究所	4
<b>AA078</b>	<b>8</b>
愛知県衛生研究所	3
三重県保健環境研究所	3
豊橋市保健所	1
名古屋市衛生研究所	1
<b>AA088</b>	<b>1</b>
岐阜県保健環境研究所	1
<b>AA091</b>	<b>6</b>
愛知県衛生研究所	2
岡崎市保健所	2
三重県保健環境研究所	2
<b>AA103</b>	<b>2</b>
豊田市衛生試験所	1
名古屋市衛生研究所	1
<b>AA118</b>	<b>1</b>
石川県保健環境センター	1
<b>AA123</b>	<b>1</b>
富山県衛生研究所	1
<b>AA128</b>	<b>1</b>
富山県衛生研究所	1
<b>AA178</b>	<b>1</b>
岐阜県保健環境研究所	1
<b>AA202</b>	<b>1</b>
豊田市衛生試験所	1

AA311	1
名古屋市衛生研究所	1
AA332	3
岐阜県保健環境研究所	2
名古屋市衛生研究所	1
AA382	1
愛知県衛生研究所	1
AA401	1
愛知県衛生研究所	1
AA403	1
岐阜県保健環境研究所	1
AA414	1
愛知県衛生研究所	1
AA489	1
愛知県衛生研究所	1
AA500	1
名古屋市衛生研究所	1
AA525	2
愛知県衛生研究所	2
AA596	1
富山県衛生研究所	1
AA597	1
富山県衛生研究所	1
AA598	1
石川県保健環境センター	1
AA599	2
石川県保健環境センター	2
AA600	1
石川県保健環境センター	1
AA601	1
石川県保健環境センター	1
AA602	1
石川県保健環境センター	1
AA603	1
福井県衛生環境研究センター	1
AA604	1
愛知県衛生研究所	1
AA605	1
愛知県衛生研究所	1
AA606	1
愛知県衛生研究所	1
AA607	1
岡崎市保健所	1



AA608	1
豊橋市保健所	1
AA609	1
豊橋市保健所	1
AA610	1
岐阜県保健環境研究所	1
AA611	2
岐阜県保健環境研究所	2
AA612	2
三重県保健環境研究所	2
AA613	1
名古屋市衛生研究所	1
AA614	1
名古屋市衛生研究所	1
AA615	1
名古屋市衛生研究所	1
総計	119

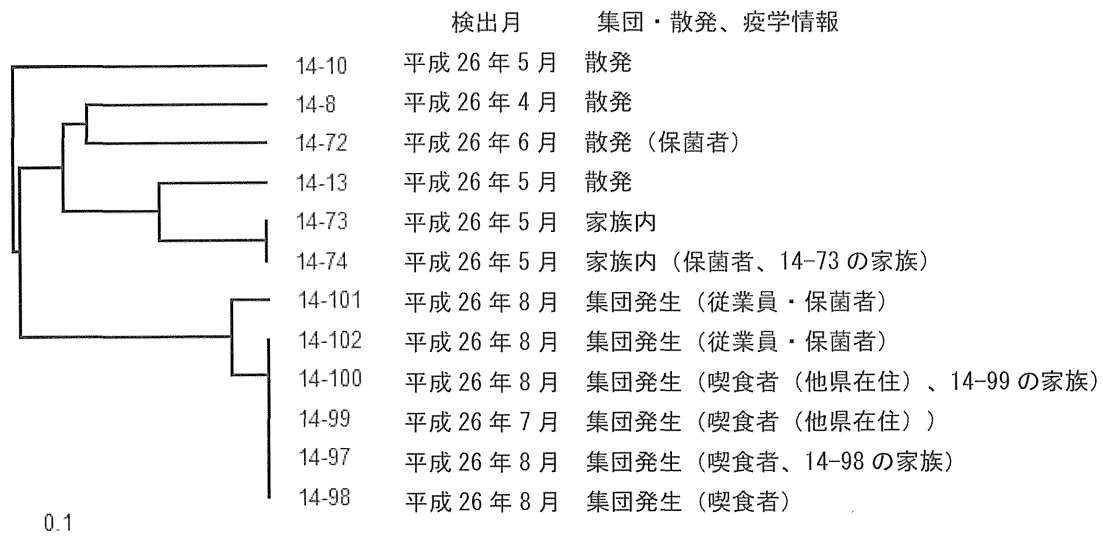
図 1

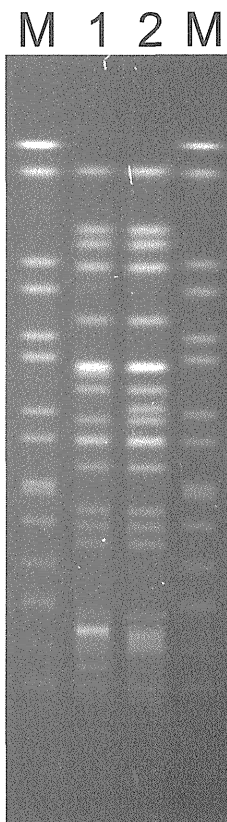


実施条件

Seakem Gold Agarose (1%)、制限酵素 : Xba I 37°C 21時間、PFGE : 6V/cm 2.2-54.2s 20時間、染色 : SYBR Safe DNA gel Stain in 0.5×TBE

図2 0157 VT2 の MLVA 結果 (クラスター解析)





M    サルモネラマーカ  
lane 1    平成26年8月  散発  
lane 2    平成26年6月  散発

図 O157(VT1)感染事例PFGE 泳動図

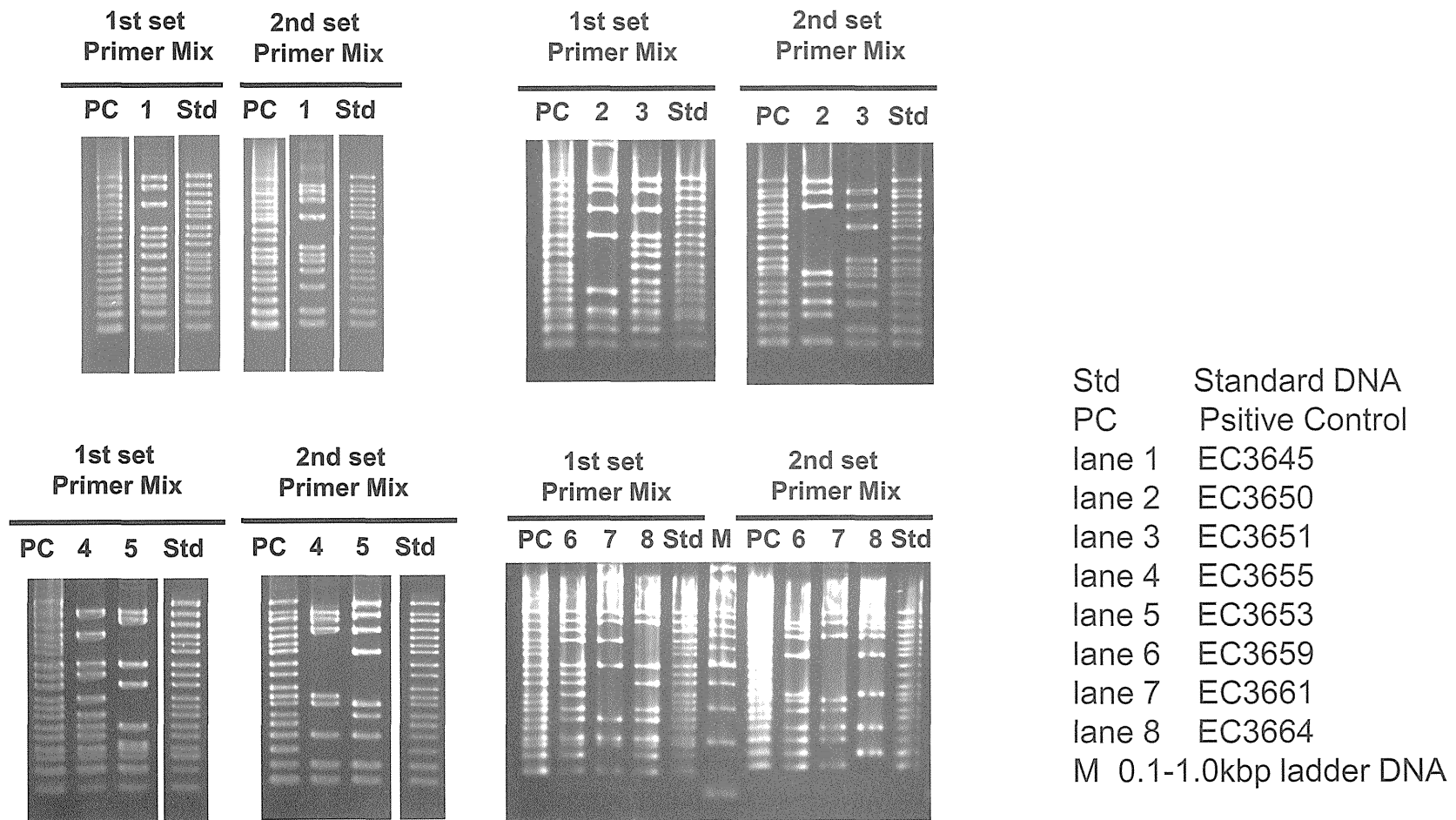


図1 IS-Printing PCR 泳動図

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 26 年度分担研究報告書

近畿ブロックにおける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

研究分担者	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	梅原成子、河野智美	滋賀県衛生科学センター
	浅井紀夫、平田佐知	京都府保健環境研究所
	清水麻衣	京都市衛生環境研究所
	萩田堅一	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹	神戸市環境保健研究所
	高澤木綿子	姫路市環境衛生研究所
	村山隆太郎	尼崎市衛生研究所
	中村寛海	大阪市立環境科学研究所
	下迫純子、岩崎直昭	堺市衛生研究所
	田辺純子、辻本真弓、阿部剛士	奈良県保健研究センター
	廣岡真理子	和歌山市衛生研究所
	中岡加陽子	和歌山県環境衛生研究センター
	田口真澄、原田哲也、河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の遺伝子型別法について、IS-printing System（IS）法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法の精度管理を実施するとともに、発生状況や流行菌型を把握するため、近畿 IS データベースの充実と活用を図った。さらに、国立感染症研究所（感染研）が実施している Multilocus variable-number tandem repeat analysis（MLVA）法について、地方衛生研究所への導入が可能か検証した。IS 法の精度管理は 1 施設で判定の不一致がみられ、電気泳動量が均一でないために生じた移動度のずれを誤判定したと考えられた。PFGE 法の精度管理では一部でバンドが不明瞭な画像もあったが、自動バンド認識を手動で補正して作成したデンドログラムでは、菌株ごとに 94%以上の近似度を示した。どちらの方法も、電気泳動量や供試菌株の濃度を揃える、歪みのないように泳動するなどの注意点を共有することが望ましいと考えられた。近畿 IS データベースには、2015 年 2 月 6 日現在で 2,326 株の登録があり、2014 年分離株は 12 施設から 233 株登録され、IS 法で 79 タイプに型別された。5 施設から 20 株登録された IS コード「84591 215275」のうち 6～7 月に分離された 12 株は感染研 MLVA タイプ 14c016 で、今夏の全国的な流行型の

ひとつであったが、同一型の集積に気づかず情報交換に至らなかった。近畿 IS データベースへの照合依頼もあり、ブロック内での流行の有無にかかわらず、迅速なデータの登録と情報交換に務めるべきであった。MLVA 法の検証は、感染研から配布された 24 株のコントロール DNA について解析したが、少ないながらサンプルによって増幅産物が得られない遺伝子座があり、蛍光漏れや非特異的増幅などの問題点も明らかになった。

## A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は、潜伏期間が比較的長い原因食品や感染源を推定できないことが多く、患者分離株の精査によって症例間の関連性を把握し、感染拡大の防止につなげる必要がある。このため、近畿ブロックの地方衛生研究所 (地衛研) では、IS-printing System (IS) 法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた遺伝子解析を実施しており、共通の疫学指標として信頼性を確保するため精度管理を実施した。また、EHEC O157 の発生状況や流行菌型を把握するため、近畿 IS データベースの充実と活用を図った。国立感染症研究所 (感染研) で確立された EHEC O157, O26 および O111 の Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法について、感染研から配布されたコントロール DNA を解析し、地衛研への導入が可能か検証した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には 2014 年に分離された EHEC O157 5 株 (菌株 1~5) を用い、トリプトソイ寒天培地 (TSA) 1ml を分注したマイクロチューブ (輸送培地) に接種して研究協力者に配布した (表 1)。

### 2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2 (東洋紡) を使用し、プライマーごとに増幅の有無を記入した判定表と電気泳動画像の提出を求めた。

### 3. 近畿 IS データベース

各自治体に届出のあった EHEC O157 感染症について、分離株を収集して IS 法を実施し、その結果を施設内データベースに登録した。更新した施設内データベースは、レファレンス用データとして大阪府立公衆衛生研究所 (公衛研) に送付し、公衛研では各施設から送付されたデータをもとにレファレンス・データベースを更新して、最新版を研究協力者に電子メールで配布した。

### 4. PFGE 法の精度管理

平成 15 年度から使用している「PFGE New Protocol-Kinki」に従って実施した。電気泳動画像は、サイズマーカー (*Salmonella* Braenderup H9812 PulseNet Standard Strain の *Xba* I 切断) の Band 9 と Band 10 が明瞭に 2 本に分かれ、Band 16 が認識できることを条件とした。

画像解析は、BioNumerics ver. 6.1 (Applied Maths) を使用し、ソフトウェアの自動バン

ド認識を目視で補正した後、類似係数 Dice、デンドログラムタイプ UPGMA、トレランス設定は最適化 0%、トレランス 1.2%でデンドログラムを作成した。

## 5. MLVA 法

Izumiya らの方法 (Microbiol. Immunol. 2010) に準じ、一部のプライマーは感染研が平成 26 年 4 月から実施している方法に変更して実施した。

プライマーは 2 組の Multiplex PCR 用に公衛研で混合し (Mix 1 および Mix 2)、感染研から配られた 24 株のコントロール DNA (14R001~14R024) とともに参加施設に配布した。各サンプルについて、17 か所の遺伝子座における増幅産物の分子量と Height 値を比較した。

## C. 研究結果

### 1. IS 法の精度管理

IS 法の精度管理には 11 施設が参加し、菌株 2、菌株 3、菌株 5 については一致した判定結果が得られた (図 1)。施設 8 では、菌株 1 の 2-02 と 2-07 および菌株 4 の 1-03 に不一致がみられたが、5 株のプレート量を揃えて再検査を実施し、他と一致した判定結果が得られた。また、菌株 4 については、施設 1 と施設 2 で *stx2* が陰性と判定された。

### 2. 近畿 IS データベース 2014 年分離株の傾向

2014 年分離株は 12 施設から 233 株登録され、IS 法で 79 タイプに型別された。10 株以

上登録されたタイプは表 2 の 5 タイプであった。このうち、5 施設から 20 株が登録された IS コード「84591 215275」については、6~7 月に分離された 13 株中 12 株は感染研 MLVA タイプ 14c016 で、今夏の流行型のひとつであったが、8~10 月に分離された 7 株に 14c016 はなかった。IS コード「249711 116975」は 7 施設から 36 株が登録されたが、このうちの 19 株は 8~9 月に発生した保育園集団事例由来、7 株は 10 月に発生した家族事例由来で、感染研 MLVA タイプは異なっていた。残りの 3 タイプも分離時期が集中することはなかった。また、5 タイプとも 2013 年以前にも登録のあるタイプであった。

### 3. PFGE 法の精度管理

PFGE の精度管理には 10 施設が参加した。「PFGE New Protocol-Kinki」では制限酵素処理の反応時間を 2 時間としているが、「一夜 incubate してもよい」とも記載しており、4 施設は反応時間が 17~19 時間であった。反応時間が長い施設ではバックグラウンドがスミアになる傾向がみられたが、小さいサイズのバンドまで明瞭な画像もあった (図 2)。うすいバンドや小さいサイズのバンドは目視でバンド認識を補正し、デンドログラムを作成したところ、どの菌株も 94%以上の近似度を示した (図 3)。

### 4. MLVA 法の検討

MLVA 法は 5 施設で検討した。各施設で使用した機器と PCR 産物の希釈率は表 3 に示したが、施設 5 では、各遺伝子座の Height 値によって希釈率を 14.3 倍、27.7 倍、54.3

倍に適宜変更して解析した。

感染研で測定値が得られた遺伝子座は 24 サンプルの合計で Mix 1 に 186、Mix 2 に 110 あり、このうち Mix 1 で 175、Mix 2 で 108 の遺伝子座では、5 施設ともにほぼ同じ分子量の増幅が検出されていた（表 4、近畿測定値 A）。検出されなかった遺伝子座のうち、特に EH111-8 は 14R001、14R005、14R006、14R015、14R018 の 5 サンプルですべての施設で増幅がない、あるいは他の遺伝子座に比べて非常に低い Height 値を示していた。また、施設 5 と施設 7 では、サンプルによって 6~10 bp とわずかに異なる測定値で検出された遺伝子座がそれぞれ 4 か所と 2 か所に見られた（表 4、近畿測定値 B）。

一方、ある蛍光で標識されたプライマーの増幅産物が異なる波長のフィルターにおいても検出される「蛍光漏れ」が 3 施設で、サイズの異なる非特異的増幅が全施設で見られた。特に施設 11 は蛍光漏れが著しく、すべてのサンプルにおいて 1~10 か所の遺伝子座で測定され、施設 3 でも 19 サンプルで 1~4 遺伝子座に蛍光漏れがみられた。非特異的増幅は、施設 3、施設 4、施設 5、施設 11 では 7~11 サンプルの 1~2 遺伝子座で検出され、特に O157-34 では 5 サンプルで真の増幅とは別に 4 施設でほぼ同じ分子量の非特異増幅が検出された（表 4、近畿測定値 D）。また、O157-36 に増幅産物のない 14R021 でも、4 施設で約 140 bp の非特異増幅が検出された（表 4、近畿測定値 D）。

#### D. 考察

近畿ブロックでは IS 法を EHEC O157 遺

伝子型別のスクリーニングに使用しており、毎年精度管理を実施している。EHEC O157:HNM の中には、セット 1 で約 800 bp（1-03 よりやや大きい）と約 220bp（1-15 よりやや大きい）の 2 本の非特異バンドが増幅される株があり、今年も精度管理株として配布した（図 1、菌株 4）。約 800 bp のバンドは、Standard DNA や Template Mix の泳動像に比べると 1-02 バンドとの間隔が明らかに狭いが、施設 8 では 1-03 バンドの増幅と判定されていた。施設 8 では菌株 2 のセット 2 にも誤判定があったが、他のレーンに比べて電気泳動量が多く移動度にずれが生じたためと考えられた。また、今年も 2 施設で *stx2* が陰性と判定されたが、1 施設ではテンプレート濃度が少なかったこと、もう 1 施設では前培養で *stx2* 脱落コロニーを選択したことが原因であった。

近畿 IS データベースからは、近畿ブロックにおける 2014 年の EHEC 157 感染症は、6~7 月に分離されていた IS コード「84591 215275」のほかは、多様な遺伝子型の株による散発的な発生であったと考えられた。上記 IS コードについては、同一型の集積に気づかず、情報交換に至らなかった。全国的な流行タイプについては近畿 IS データベースへの照合依頼もあり、ブロック内での流行の有無にかかわらず、迅速なデータの登録と情報交換に務めるべきであった。

近畿 IS データベースは、各施設のデータベースを集約してレファレンス・データベースを作成しているが、2 施設で蓄積されたデータの欠失が起こった。一方、全国版データベースへの登録には、感染研番号や感



染研 MLVA タイプを記載するフィールドの追加が望ましい。これらの点を改善したデータベースのバージョンアップが今後の課題である。

PFGE 法についても毎年精度管理を実施しており、実施経験の少ない施設や担当者が変わる施設では手技の継承や機器の状態をチェックする機会になっている。明瞭なコントラストの画像を得るための条件について、制限酵素処理の反応時間を比べたが、必ずしも反応時間が長い方が不明瞭になるわけではなく、他にもいくつかの要因があると考えられた。また、マーカークの電気泳動像に極端なバンドの濃淡や Band 9 と Band 10 の区別が不明瞭な画像もあり、やり直した施設もあったが明らかな改善は見られなかった。画像解析はバンド認識を手動で補正して実施し、良好な結果が得られたが、補正しない場合は、特に施設 4 の菌株 1 や 2 により極端にバンドが薄い場合やレーン内で歪みや湾曲がある画像で近似度の低い結果となり、菌株の濃度やゲルブロックの扱いなど細かい点に注意が必要であると推察された。

MLVA 法の検討では、増幅されるべき遺伝子座で増幅産物が得られない、あるいはわずかに異なる分子量で検出されるサンプルがあり、近畿ブロックでは PCR 反応を含めた再検討が必要であると考えられた。特に EH111-8 は、全施設で増幅されない、あるいは Height 値が非常に低いサンプルが 5 つあり、このうちの 4 サンプルは O111 であった。EH111-8 のプライマーは、Izumiya らが報告したプライマーから変更されたが、

何らかの改善が必要かもしれない。また、蛍光漏れと非特異的増幅についても解決すべき課題である。施設 11 の蛍光漏れについては、フィルターの劣化など解析機器を点検する必要があるが、本方法は 9 か所あるいは 8 か所の遺伝子座を標的とする Multiplex PCR で、増幅されない遺伝子座も存在することから、ある程度の蛍光漏れは避けられない現象であると考えられる。真の増幅と同時に検出される場合は、Height 値の比較でどのピークが「真の増幅」なのか判断できるが、増幅されない遺伝子座では、分子量によっては他の遺伝子座の増幅産物だと判断できない場合が生じると推察された。ただ、施設 4 と施設 7 では蛍光漏れがまったく検出されておらず、PCR 産物の希釈率の変更である程度排除できる可能性もある。非特異的増幅についても、Height 値の比較や bin の構築により真の増幅と区別できると考えられる。しかし、14R021 の O157-36 で測定された約 140 bp の非特異的増幅は、14R020 では真の増幅と同じ分子量であり、増幅されない遺伝子座では誤判定につながる可能性も考えられた。今回の検討では、すべてのサンプルで感染研測定値と一致した結果が得られた施設はなかったが、解析能力の高い遺伝子型別法として MLVA 法の活用を希望する地衛研もあり、問題点の解消をめざしたい。

## E. 結論

IS 法を EHEC O157 遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、近畿 IS データベースを有効に活用するため、精度管理の継

続と速やかなデータベースへの登録が求められる。

PFGE法はEHEC以外にも利用可能な汎用性の高い方法であるが、基本的な手技や細かい注意点を共有あるいは情報交換する機会が必要である。

MLVA法については、サンプルによって増幅効率の良くない遺伝子座についてはPCR条件の検討が、蛍光漏れや非特異的増幅と真の増幅とを判別するためにはデータと経験の蓄積が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 誌上発表

- 1) Themphachana M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Seto K, Rattanachauy P, Singkhamanan K, Sukhumungoon P: First report in Thailand of a *stx*-negative *Escherichia coli* O157 strain from a patient with diarrhea. Southeast Asian J Trop. Med. Public Health 2014, 45:881-889..

- 2) 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, 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 Disease 2014, 1.

- 3) 大平文人, 勢戸和子, 笹井康典: 保育所における細菌性赤痢集団発生事例. 小児科 2014,77:1027-1035.

##### 2. 学会発表

- 1) 原田哲也, 勢戸和子, 田口真澄: すべてのVTサブタイプを検出するためのリアルタイムPCR法の確立と食品検査への応用, 第35回日本食品微生物学会(2014年9月, 大阪)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 IS-printing System および PFGE の精度管理に使用した株

菌株 番号	菌種(毒素型)	分離年	近畿ISデータベース		感染研遺伝子型別	
			ISコード	ISパターン番号 <sup>a</sup>	MLVA type	
1	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2014	154127	203855	AA248	14m0048
2	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2014	249711	116975	AA063	13m0075
3	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2014	151421	100847	AA136	14m0052
4	EHEC O157:HNM (VT1, VT2)	2014	84591	215275	AA078	14m0061
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2014	199215	84106	AA616	14m0112

a 感染研データベース(試用版)のISパターン番号

表 2 2014 年分離株の主な IS 型

ISコード <sup>a</sup>	登録数	登録 施設数	ISパターン 番号 <sup>b</sup>	分離時期	備考
17453	82510	18	3	AA071	7~9月 幼稚園集団事例を含む
84591	215275	20	5	AA078	6~10月 4つの家族事例を含む
137743	198734	11	4	AA031	1, 4, 6~8月 2つの家族またはグループ事例を含む
216959	84463	17	5	AA023	1, 6~8, 10月 2つの家族事例を含む
249711	116975	36	7	AA063	5, 7~10月 保育園集団事例および1つの家族事例を含む

a 近畿ISデータベースのISコード

b 感染研データベース(試用版)のISパターン番号

表 3 MLVA 法に使用した機器と PCR 産物の希釈率

施設	サーマルサイクラー	泳動装置	PCR産物希釈率
3	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600	Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	13.7倍
4	Applied Biosystem Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Veriti 200)	Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer	約40倍
5	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer	14.3-54.3倍
7	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	100倍
11	ASTEC PC-812	Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer	13.3倍

表 4 MLVA 法の検討—感染研測定値との比較

1) Mix 1

コントロール DNA	遺伝子座																																	
	O157-34				EHC-1		EHC-2			O157-9		EHC-5		O157-3			O157-25		EH111-8		EH157-12													
	感染研 測定値	近畿測定値 <sup>a</sup>			感染研 測定値	近畿 測定値	感染研 測定値	近畿 測定値		感染研 測定値	近畿 測定値	感染研 測定値	近畿 測定値		感染研 測定値	近畿 測定値		感染研 測定値	近畿 測定値		感染研 測定値	近畿 測定値												
		A	B	C				D	A				C	A		B	A		C	A			C	D	A	C	A	C	A					
14R001	190.1	5		4	105.8	5			265.6	5			526.9	5			183.0	5			121.4	5			271.8	(4)			411.2	5				
14R002	147.1	5		1	135.4	5			326.9	5			527.0	5			118.4	3	1		1	121.4	5			235.6	5			411.3	5			
14R003	190.2	5			207.5	5			259.6	5									1		1	121.5	5							411.1	5			
14R004	190.2	5		1	105.8	5	1		228.3	5										2		1	121.8	5							411.2	5		
14R005	190.2	5		1	4	159.5	5	1	290.1	5			497.4	5			159.4	5	1		1	121.5	5	1		298.9	(2)	1		411.2	5			
14R006	190.1	5		1	4	111.8	5		228.9	5			521.1	5						2		1	121.4	5			317.1	(4)			411.2	5		
14R007	351.3	5		2	94.0	5			233.9	5			490.2	5			217.1	5	1		368.3	5	1		144.0	5			235.4	5			427.8	5
14R008	351.4	5		1	100.3	5			234.3	4	1		572.4	4	1		188.9	5	1		380.2	5	1		150.1	5			235.6	5			428.3	5
14R009	369.4	4	1	2	94.3	5			234.5	5		1	555.0	4	1		200.8	5	2		410.1	5	1		138.4	5			235.6	5			428.6	5
14R010	369.3	5		1	100.3	5			234.5	5			537.5	5			159.5	5	1		380.3	5	1		161.9	5			235.6	5			428.7	5
14R011	147.2	5			118.0	5			375.8	5			515.2	5						1		2	121.5	5			235.7	5			411.5	5		
14R012	333.6	5		1	100.3	5			234.5	5		1	560.9	5			2			2	404.2	5	1		138.4	5			235.6	5			428.7	5
14R013	369.3	5		1	100.3	5			234.5	5		1	526.0	5						2	380.2	5	1		138.4	5			235.6	5			428.7	5
14R014	351.5	5		2	106.5	5			234.5	5		1	514.2	5			177.1	5	1		392.3	5	1		138.5	5			235.6	5			428.7	5
14R015	190.1	5		1	4	111.9	5		290.1	5							148.0	5	1			2	121.4	5			280.9	(1)	2		411.4	5		
14R016	369.4	4	1	1	94.3	5			234.4	5		1	555.0	5			200.8	5	2		398.3	5	1		138.4	5			235.6	5			428.5	5
14R017	147.2	5		1	118.0	5	1		314.4	5			515.2	5						1		1	121.5	5			235.7	5	1		411.4	5		
14R018	190.1	5		1	4	112.0	5		229.1	5			521.1	4(1)						2		1	121.4	5			317.2	(4)	1		411.5	5		
14R019	297.7	5		2	88.1	5			234.5	5		1	526.0	5						2	457.8	5	2		132.7	5			235.6	5			446.1	5
14R020	297.7	5		1	142.1	5			240.7	5		1	549.1	5						1	428.0	5	1		138.5	5	1		235.6	5	1		454.8	5
14R021	147.1	5		1	117.9	5			339.1	5			515.2	5			171.2	5	1			2	2	121.4	5			235.6	5	1		411.5	5	
14R022	147.2	5		1	111.9	5			284.1	5			515.2	5						1		1	121.4	5			235.6	5	1		411.4	5		
14R023	297.7	5		2	106.5	5			240.6	5		1								2	344.4	5	1		138.4	5			235.6	5	1		419.9	5
14R024	351.4	5		2	112.6	5			234.5	5		1	502.3	5			159.5	5	1		380.3	5	1		138.5	5			235.6	5			428.5	5

a A: 感染研測定値と同じサイズが検出された施設数(カッコはHeight値が低い施設数), B:異なる測定値で検出された施設数, C: 蛍光漏れが検出された施設数, D: 非特異的な増幅が検出された施設数