

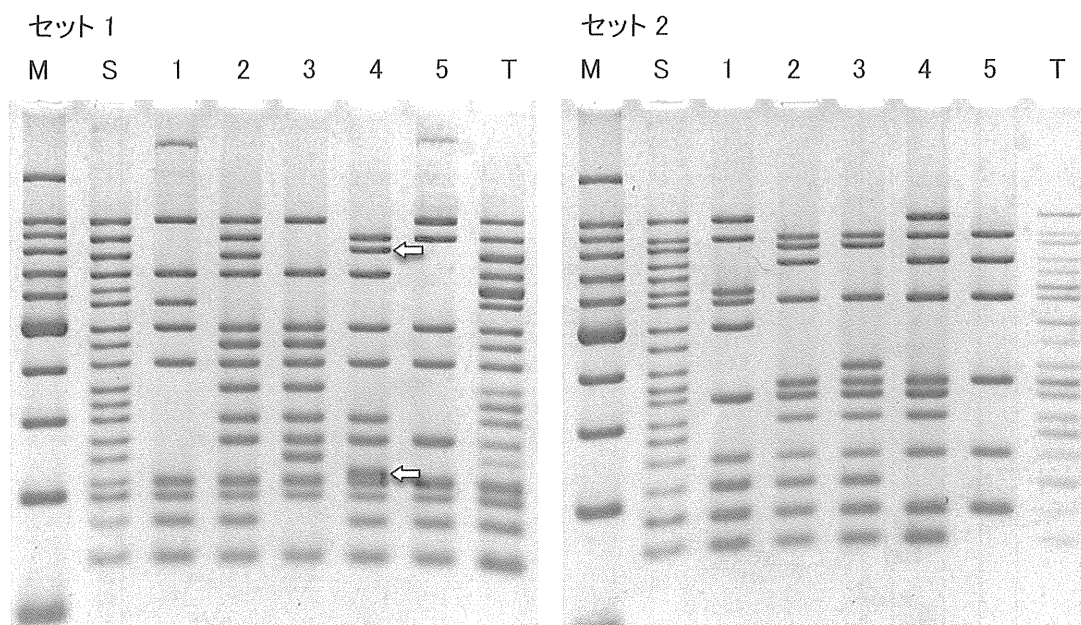
表 4 MLVA 法の検討—感染研測定値との比較(つづき)

2) Mix 2

コントロール DNA	遺伝子座																				
	EH111-14		EH111-11		O157-17		O157-36				O157-19		EHC-6			O157-37			EH26-7		
	感染研 測定値	近畿 測定値 ^a		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	C		A	C		A	C		A	B	C		D	A	C		D	A	C
14R001	163.0	5	439.3	5					1	279.0	5	409.9	5	140.9	5				1		
14R002	156.2	5	428.2	5		1				279.0	5	1				3	335.8	5			
14R003			428.3	5					1	278.7	5			93.6	5				1		
14R004			428.3	5						278.7	5	566.3	5	93.0	5						
14R005	156.3	5	433.8	5		1			1	279.1	5	462.5	5	135.1	5				1		
14R006	156.3	5	433.8	5						279.2	5	410.0	5	117.4	5						
14R007			428.3	5	161.3	5	147.1	4	1	304.4	5			117.2	5				1		
14R008		1	428.3	5	161.4	5	120.3	5		304.5	5			117.4	5						
14R009		1	428.3	5	161.4	5	174.9	5		304.6	5			165.1	5				1		
14R010		2	428.4	5	161.4	5	120.2	5		304.5	5			117.3	5						
14R011	156.2	5	428.1	5		1				279.0	5					3	358.0	5			
14R012		1	428.6	5	161.4	5	202.6	5		292.9	5			117.4	5						
14R013			428.5	5	186.1	5	1	140.4	5	1	310.5	5		129.2	5	1			1		
14R014		2	428.4	5	155.1	5				2	304.5	5	514.1	5	236.5	5					
14R015	156.2	5	428.0	5		1			2	279.0	5			205.9	4	1			1		
14R016		1	428.3	5	161.4	5	1	174.9	5	1	304.5	5		135.0	5	1					
14R017	156.3	5	428.0	5		1				279.1	5		1			3	424.5	5			
14R018	156.2	5	433.6	5		1			1	279.1	5	409.9	5	123.2	5				1		
14R019		2	428.4	5	155.1	5				1	316.4	5		1	140.9	5	1		1		
14R020			428.3	5	136.4	5	1	140.3	5	1	310.3	5		123.2	5	1			1		
14R021	156.2	5	428.1	5		1			4	279.1	5					1	380.2	5			
14R022	156.2	5	428.0	5		1			1	279.0	5		2			3	402.3	5			
14R023		1	428.4	5	155.2	5	1	181.8	5		334.2	5		111.4	5	1			1		
14R024			428.2	5	186.1	5	1	133.6	5	1	298.7	5		123.2	5	1			1		

a A: 感染研測定値と同じサイズが検出された施設数, 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

11) 電気泳動画像



M: 100bp ladder, S: Standard DNA, 1~5: 精度管理株, T: Template Mix, 矢印: 非特異バンド

2) 判定

菌株	セット1 判定 ^a																セット2 判定																						
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30									
1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
2	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1					
3	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
4	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	800, 220	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				

a 1:増幅あり, 0:増幅無し
b 非特異バンドの増幅サイズ

図1 EHEC O157 精度管理株の IS-printing System 実施例(施設6)

1) 制限酵素処理が2~4時間の施設

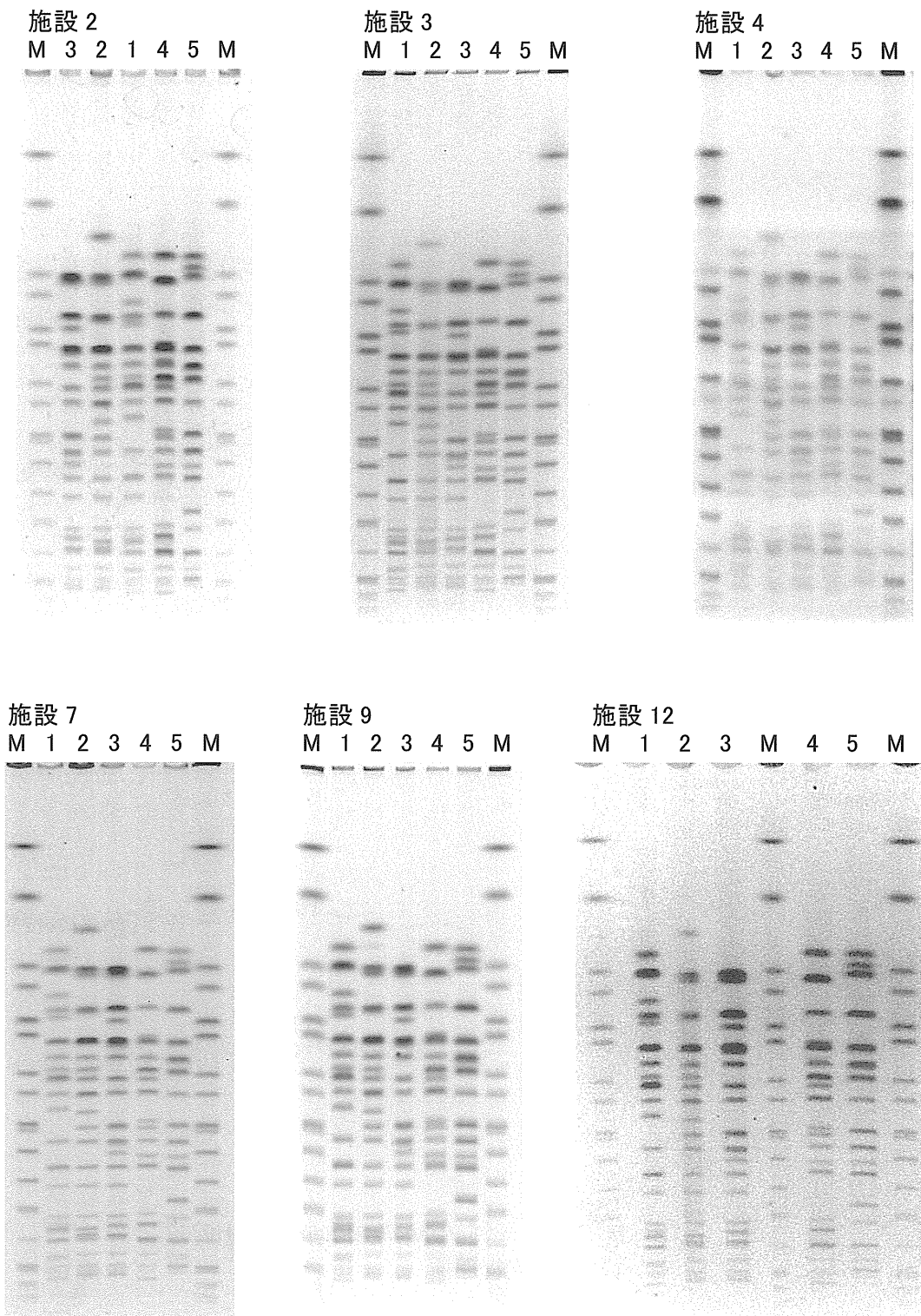


図2 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像

2) 制限酵素処理が 17~19 時間の施設

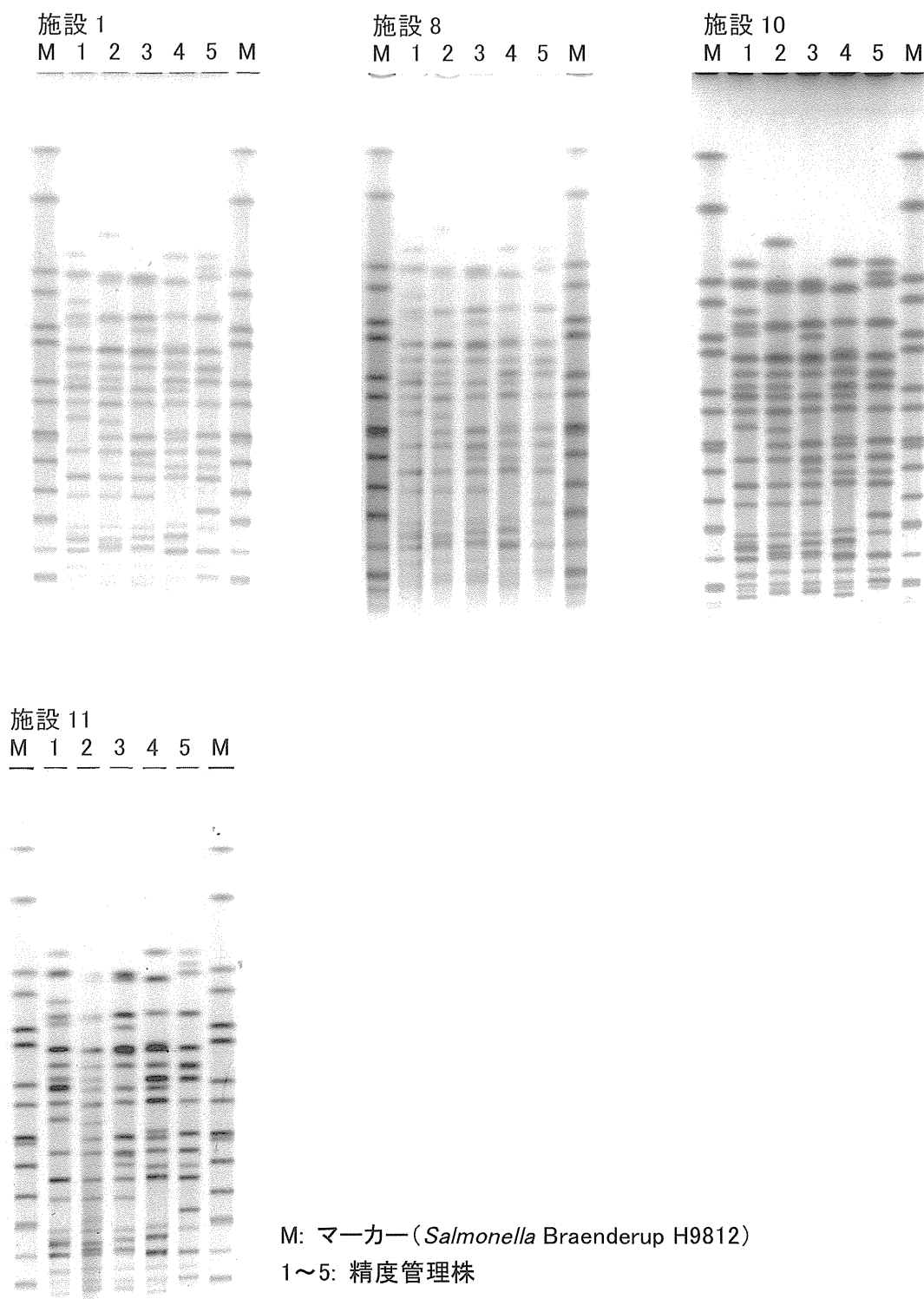


図 2 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像(つづき)

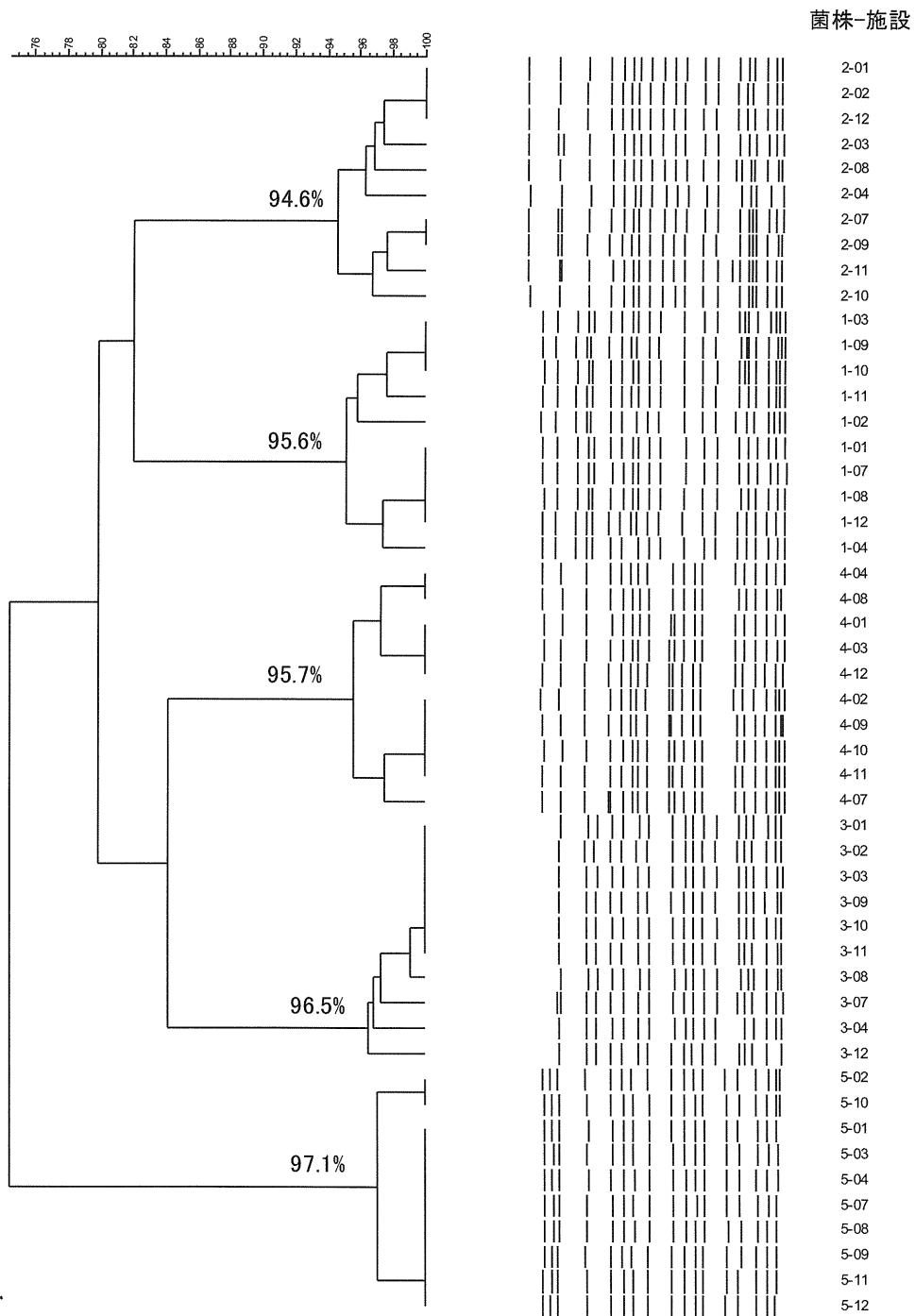


図 3 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム

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

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	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
研究協力者	川上 優太	島根県保健環境科学研究所
	川瀬 遵	〃
	大畠 律子	岡山県環境保健センター
	河合 央博	〃
	檀上 博子	〃
	山田 裕子	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	増田 加奈子	〃
	今井 佳積	〃
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	千神 彩香	〃
	築地 裕美	〃
	児玉 実	〃
	石村 勝之	〃
	野村 恭晴	山口県環境保健センター
	亀山 光博	〃
	矢端 順子	〃
	富永 潔	〃
	石田 弘子	徳島県立保健製薬環境センター
	小山 絵理子	〃
	嶋田 啓司	〃
	福田 千恵美	香川県環境保健研究センター
	仙波 敬子	愛媛県立衛生環境研究所
	木村 千鶴子	〃
	金山 知代	高知県衛生研究所

研究要旨

中四国地域の分子疫学的手法の維持・向上と、より精度の高いデータベースの構築を目的として、腸管出血性大腸菌(EHEC) O157 菌株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)及び IS-printing System による精度管理を実施した。PFGE 法による解析では、泳動像はどの施設もクリアで、デンドログラム解析はやや類似度に違いが見られたが、ほぼ一致した結果であった。IS-printing system による解析では、1st set primer で増幅されたバンドの 1 つが 1 施設で異なった結果であったが、それ以外はすべての施設の結果が一致した。

中四国地域で発生した EHEC 感染事例について、疫学情報を収集して解析した。本年度より、国立感染症研究所での分子疫学的解析は、O157 等の血清群については、PFGE 法に代わり MLVA 法による型別が行われることになったため、収集した情報を MLVA 型および IS コードにより解析した。その結果、O157 では 7 種類の同一 IS コードの菌により、複数の県で感染事例が発生しており、このうち 1 つの IS コードによる事例では、県境を越えて疫学的な関連性が見られた。解析能の比較では、MLVA 型がより詳細な分子疫学的解析が可能であった。

A. 研究目的

本研究班は、感染症や食中毒事例の広域あるいは同時多発的な発生において、それらの事例由来株の疫学解析を迅速に行うことを可能にするため、遺伝子による分子疫学的解析結果を統合・集積し、必要時にアクセスできるデータベースの構築を目指している。一方、データベース構築にはデータの高い精度が要求され、データの精度を向上し維持するために、分子疫学的手法の精度管理が重要である。このため、腸管出血性大腸菌(以下、EHEC と言う) O157 菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法と言う)や、IS-printing System による精度管理を行い、分子疫学的解析結果を用いたデータベースの構築と事例対応に向けた検討を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株

精度管理：岡山県で平成 26 年度にヒトから分離された EHEC O157 : H7 VT1,2 菌株 3 株(No.1826、1827、1835)、EHEC O157 : H7 VT2 菌株 1 株(No.1847-1)、EHEC O157 : H- VT1 菌株 1 株(No.1859)を使用した。

事例解析：岡山県で平成 26 年度に分離された EHEC O157 株等 67 株を使用した。また、中四国地域で発生した事例の疫学情報を収集し、岡山県の情報と合わせて解析した。

2. 分子疫学的手法及び精度管理

(1) PFGE 法

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、画像解析ソフト(BioNumerics)を使用して泳動像の解析を行った。

(2) IS-printing System

IS-printing System (Version2 : TOYOBO 製)を用いて、取扱説明書に従って実施した。なお、岡山県環境保健センターでは、PCR反応に供するDNA量を最適化するため、菌のアルカリ熱抽出液の遠心上清を5倍希釈して用いた。本法の各プライマーにより増幅される産物は、プライマーセット毎に高分子量側から3つごとに区切り、迅速同定キット(Api)の同定コード化にならって、各区分の増幅バンドについて順番に「1」「2」「4」の数字を当てた。それぞれの産物が増幅された場合、その数字を各区分毎に足してコード化し、コードによる解析を行った。

(3)MLVA法

国立感染症研究所では、本年度よりO157、O26、O111の血清群について、PFGE法にかわりMLVA法を実施しており、菌株を送付してMLVA型別を実施した。

(4)精度管理

本年度精度管理に参加した施設は、中四国地域10施設(A~J)中、PFGE法は8施設(C~J)、IS-printing Systemは9施設(B~J)であった。精度管理用に送付した菌株5株について、各施設でPFGE法及びIS-printing Systemにより解析した。PFGE法は、解析ソフトを使用して作成したデンドログラムを、IS-printing Systemは、1st及び2nd set primerごとに増幅産物のバンドをコード化した表を、いずれも泳動像と共に岡山県環境保健センターにメールで送付してもらい、結果を比較検討した。

3. 疫学情報の収集と解析

データベース構築に向けた試行として、中四国地域で発生した患者由来EHEC O157等168菌株について、MLVA型及び

IS-printing system結果を、疫学情報とともに収集し、解析した。

C. 研究結果

1. 精度管理

(1) PFGE法による解析

中四国地域の10施設中8施設(C~J)が参加して、PFGE法の精度管理を実施した。その泳動像とデンドログラムを、図1に示した。また、それらの結果をまとめて、表1に示した。昨年度に引き続き、本年度も各施設で実施したPFGEの泳動像はクリアで、ほぼ同じ泳動パターンを示した。デンドログラム解析の結果は、No1826、1827、1835とNo1847-1、1859の2つのグループの株間で、類似度に差が出た施設が5施設、そうでない施設は3施設であった。遺伝子パターンの類似度の範囲は100%~59.0%で、泳動パターンが最も類似していた株間では100%~95.0%、最も異なっていた株間では76.0%~59.0%の範囲の類似度であった。

(2) IS-printing Systemによる解析結果

IS-printing Systemの精度管理は、中四国地域の9施設(B~J)が参加して実施した。各施設の泳動像及びISコードによる解析結果は、図2及び表2に示した。すべての施設が見やすい泳動像を示し、解析結果もほぼ一致して良好であった。ただ、1st set primerにより増幅された最も高分子量の1つのバンドについて、1施設の泳動像では他の施設のそれに比べて、バンドの位置がやや高分子量側にずれており、これにより他の施設と異なった結果を示した。

2. 中四国地域の発生状況と解析結果

中四国地域で平成 26 年度に発生した EHEC O157 等による感染事例の患者等由来株について、各県の施設で実施した IS-printing System による解析結果と、国立感染症研究所の MLVA 型、さらに疫学情報を収集して、表 3 にまとめた。

収集した EHEC168 株のうち、分子疫学的解析を実施したのは、O157 株 86 株、O26 株 58 株、O111 株 5 株であった。O157 株の IS-printing System による解析結果から、複数の株が同一の IS コードを示したものは 12 種類(①～⑫)あった。このうち、7 種類(①、②、③、⑦、⑩、⑪、⑫)は、複数の県から分離され、1 種類(⑫)の事例については、県境を越えて疫学的な関連性が見られた。MLVA 型は、同一 IS コードの株間でも異なった型が存在し、IS-printing system による解析に比べて、より詳細な解析が可能であると思われた。MLVA 型による O26 株の解析では、8 種類(⑬～⑳)の同一 MLVA 型のグループが見られた。これらのグループ内では、MLVA 型が完全に一致しない場合でも、ほとんどの株で Complex(関連性が非常に強い MLVA 型の集団：⑮v、⑰v、⑱v)が一致しており、疫学的な関連性が見られた。一方、O111 については MLVA 型は異なっており、株間の疫学的な関連性は見られなかった。

D 考 察

本年度の PFGE 法及び IS-printing System による精度管理の結果は、昨年を引き続いて良好であった。PFGE 法は、毎回施設によって泳動像の各バンド位置の認識に多少の差が見られ、これによりデンドログラム解析の類似度の差として反映され

る。泳動パターンの類似度が高い方が、類似度の範囲は 100%～95.0%と差が少なく、類似度の低い泳動パターン間では、76.0%～59.0%と類似度の差の範囲が大きくなる傾向が見られた。IS-printing System による泳動写真及び解析結果も良好であったが、1 施設において 1st set primer による 1 つの増幅産物の泳動位置が異なっており、これにより他施設と異なった結果となった。2nd set primer で増幅される高分子量の領域では、特にバンドの間隔が詰まって狭いため、以前から判定が難しいケースが出てきていたが、本年度は問題なく判定されていた。泳動距離の長いゲルの使用など、キット化された検査法ではあるが、安定した結果を得るための工夫が必要であると考え

る。中四国地域の EHEC O157 感染事例については、IS-printing system のデータベース構築に向けて、数年前から IS-printing system による各県の事例解析結果を収集し、中四国地域の疫学解析に利用している。さらに本年度より、国立感染症研究所では O157、O26、O111 の血清群について、PFGE 法にかえて MLVA 法を実施し、MLVA 型別結果を各県に還元している。このため、IS コードと合わせた O157 株の分子疫学的解析と、O26 及び O111 株の MLVA 型による解析が可能となった。MLVA 法の導入は、解析機器やソフトなどが必要となり、中四国地域では現在一部の施設のみで実施している。MLVA 法による解析は PFGE 法に比べて迅速で、結果がコードで表示されるため、菌株の比較が容易なことなど、今後 MLVA 法への依存度が高くなるものと思われる。分子疫学的解析において、比較的操作简单で迅速にスクリーニングが可能な IS-printing System、す

でほとんどの施設に機器が導入され、検査が実施可能な PFGE 法、迅速でより詳細な解析が可能で今後その導入施設が増加するであろう MLVA 法など、各解析法の長所を生かして有効に使用することが重要である。また、それらの解析法ごとの精度管理を十分行って、解析結果をデータベースとして構築して、事例発生に役立てることが必要と考える。今後も分子疫学的手法の技術向上を図り、さらに精度の高いデータベースの構築と EHEC による感染症対策に努めていく必要がある。

E 結論

1. 腸管出血性大腸菌 O157 菌株を用いて、

PFGE 法と IS-printing System による精度管理を実施した。

2. PFGE 法による泳動パターンはクリアであったが、バンド位置の認識の差が dendrogram 解析の類似度の差となって示された。

3. IS-printing System による解析は、各施設ともほぼ良好な結果であった。

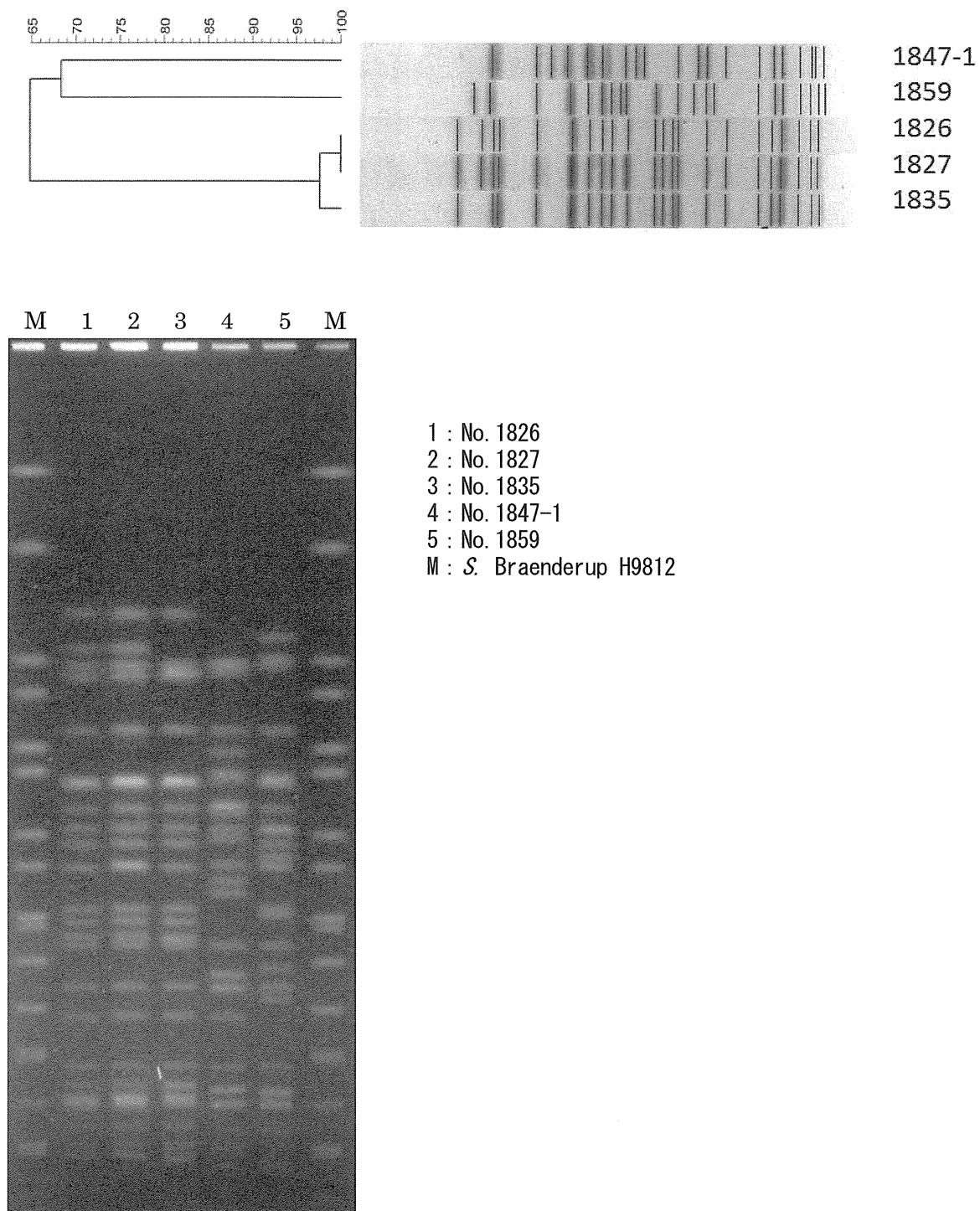
4. 事例解析において、MLVA 型と IS-printing System による解析の有用性が示された。

F. 研究発表

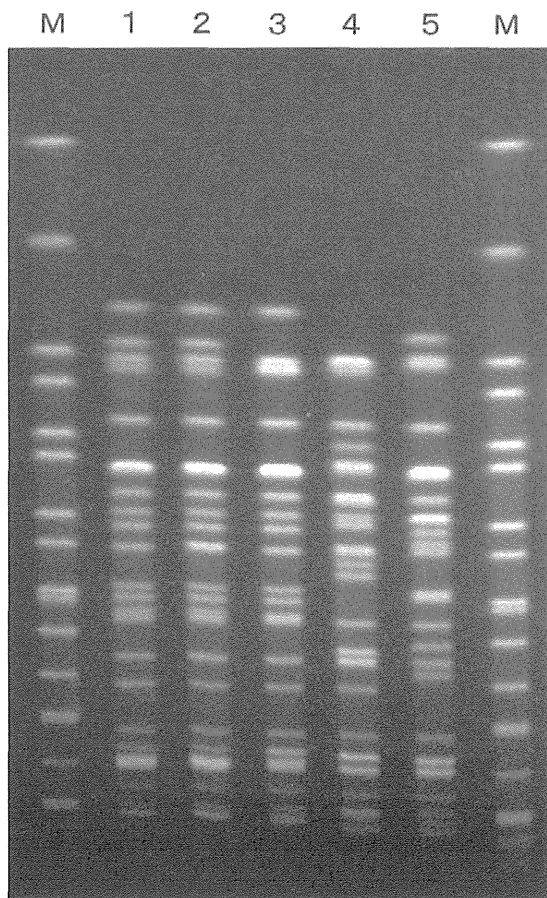
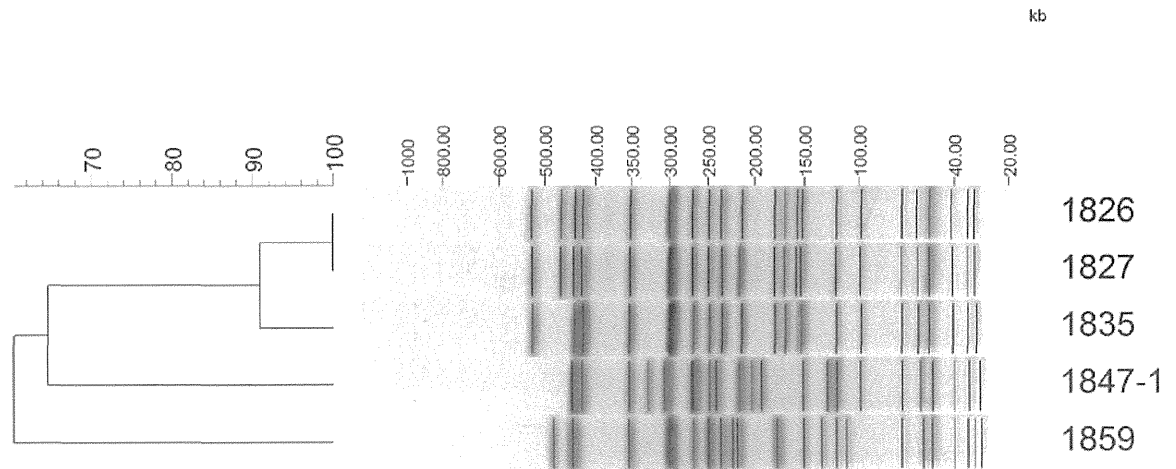
なし。

図1 各施設の PFGE 法による精度管理結果

(C)



(D)



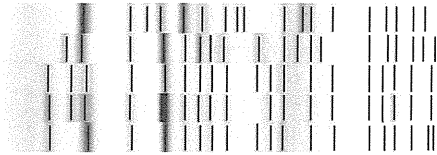
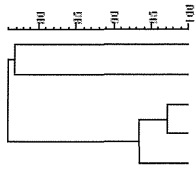
レーン 1 : No. 1826
2 : No. 1827
3 : No. 1835
4 : No. 1847-1
5 : No. 1859
M : マーカー
(*Salmonella* Braenderup H9812 株)

(E)

Dist 1 1.05-1.05 (0.000 820.00) (0.01-100.00)

marker XbaI

marker XbaI



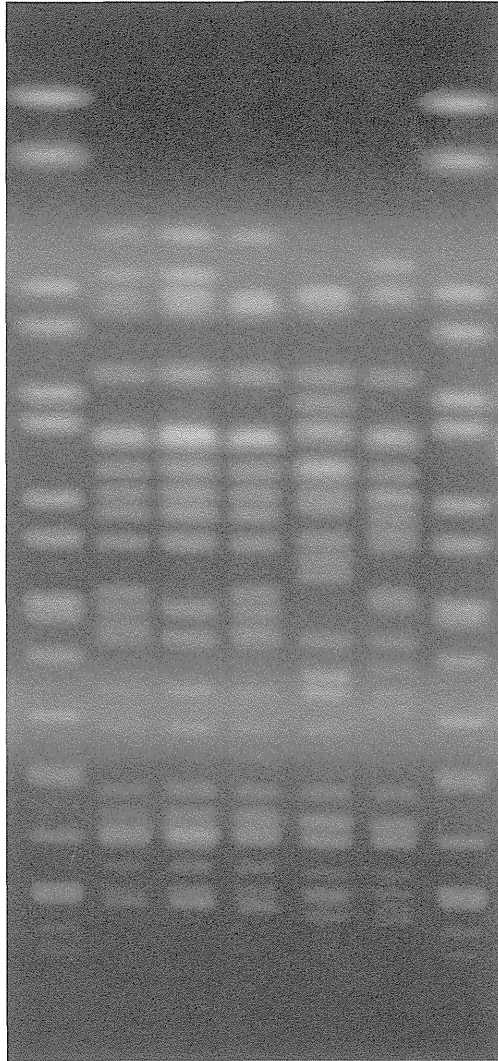
H26パルスネット班精度管理 1847-1

H26パルスネット班精度管理 1859

H26パルスネット班精度管理 1826

H26パルスネット班精度管理 1827

H26パルスネット班精度管理 1835



レーン 1 : 1826

2 : 1827

3 : 1835

4 : 1847-1

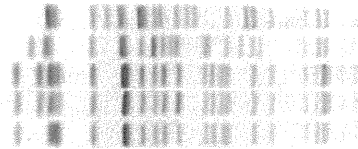
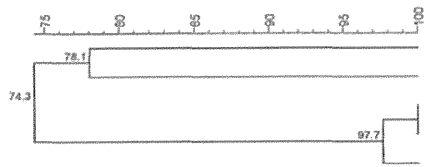
5 : 1859

M 1 2 3 4 5 M

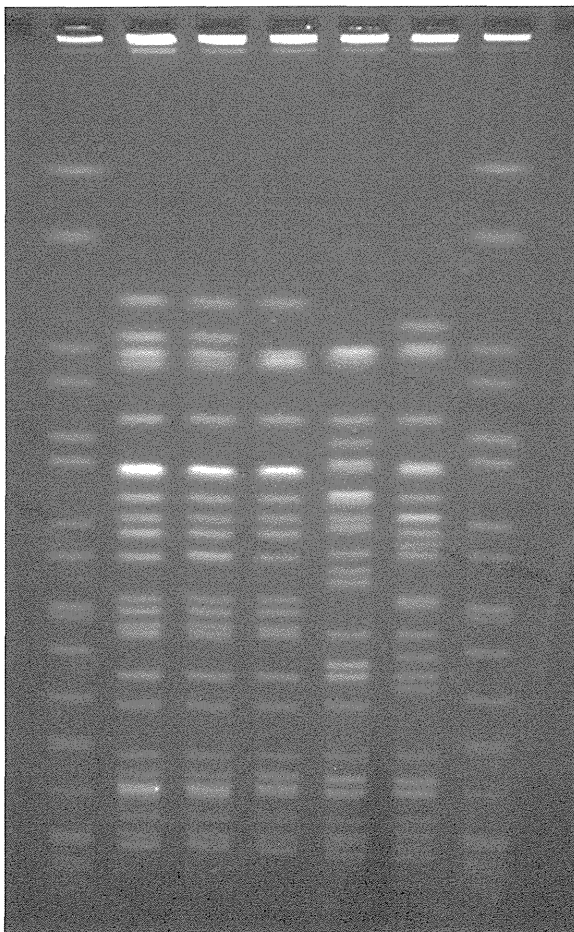
(F)

pulsennet seidokanri

pulsennet seidokanri

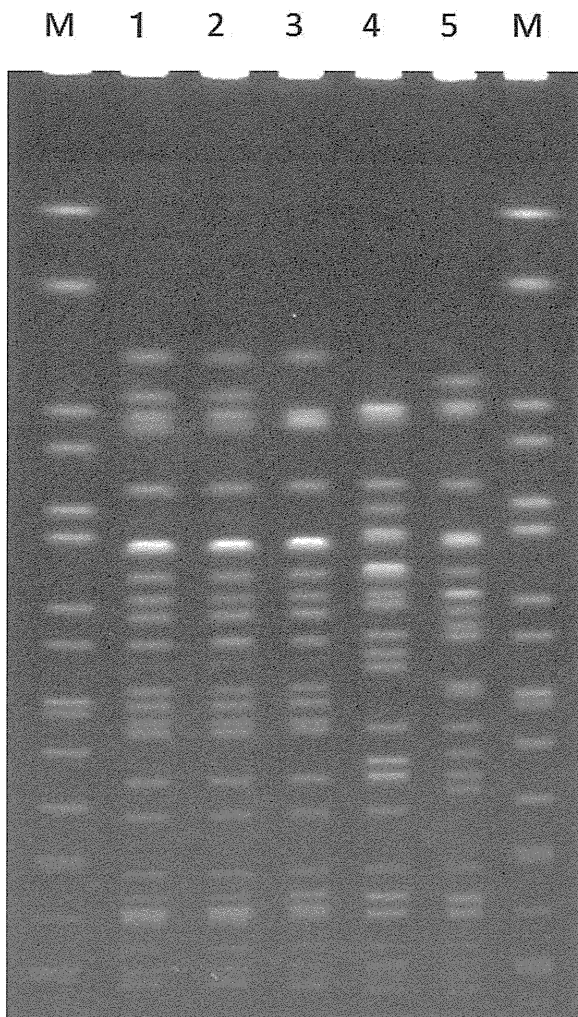
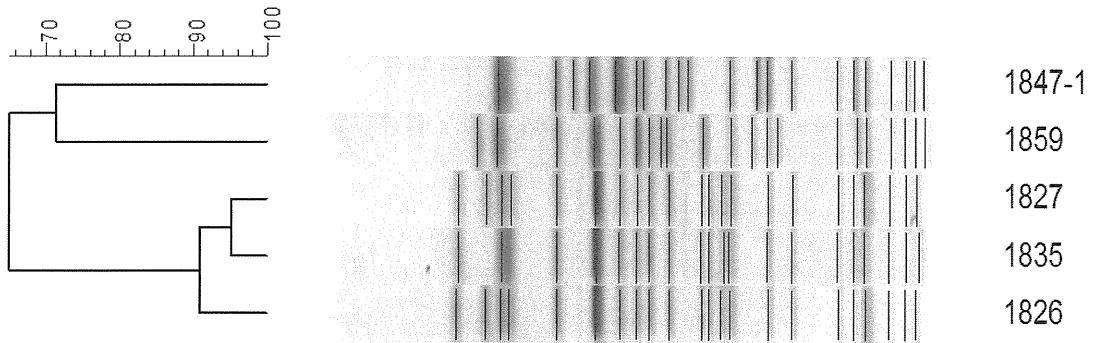


stec_1847-1
stec_1859
stec_1826
stec_1827
stec_1835



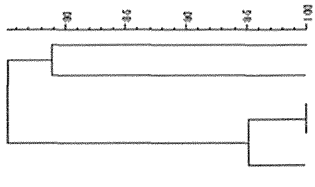
marker
1859
1847-1
1835
1827
1826
marker

(G)

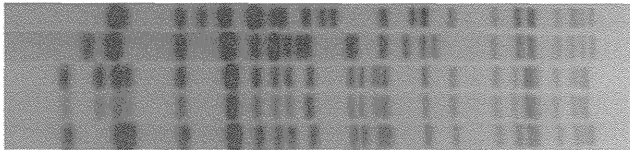
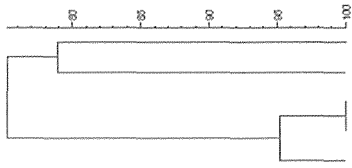


レーン 1 : 1826
2 : 1827
3 : 1835
4 : 1847-1
5 : 1859
M : Marker (S. Braenderup H9812)

(H)

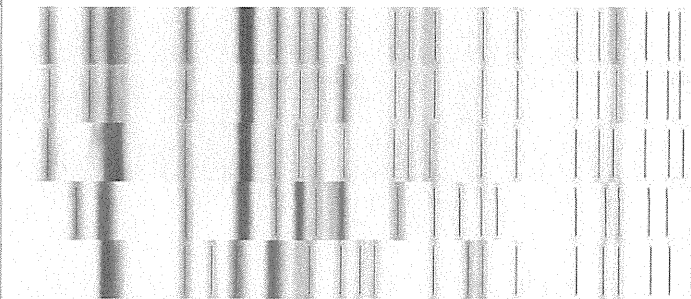
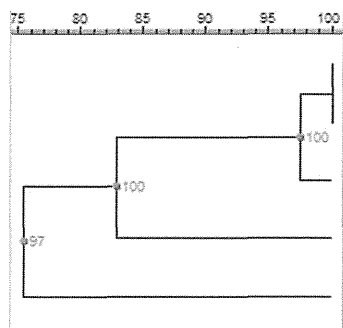


- .26年度精度管理 1847-1
- .26年度精度管理 1859
- .26年度精度管理 1826
- .26年度精度管理 1827
- .26年度精度管理 1835



- 26年度精度管理 1847-1
- 26年度精度管理 1859
- 26年度精度管理 1826
- 26年度精度管理 1827
- 26年度精度管理 1835

(I)



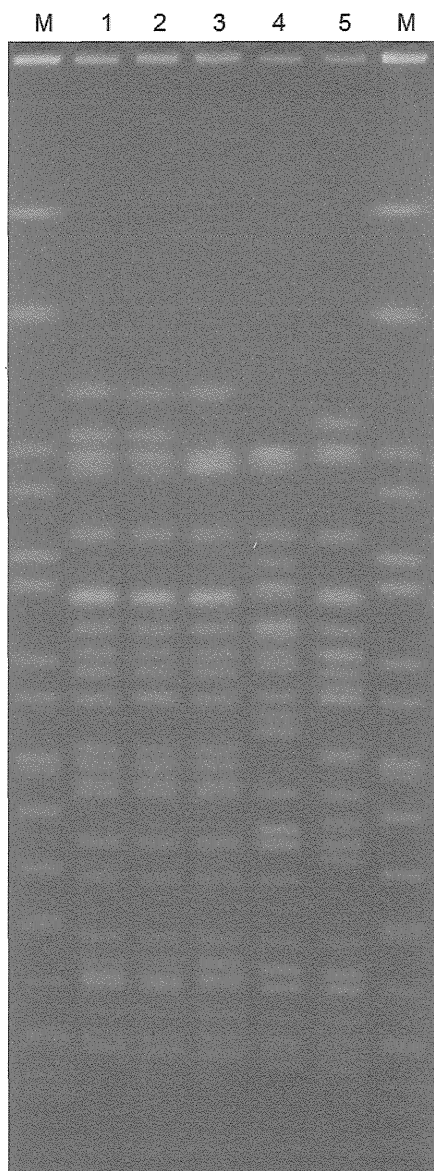
1826

1827

1835

1859

1847-1



M : Marker (S.Braenderup H9812)

1 : No.1826

2 : No.1827

3 : No.1835

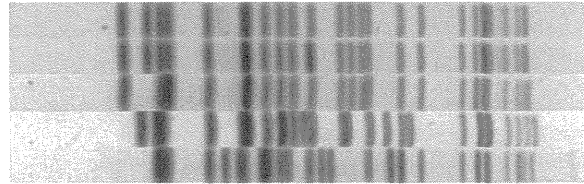
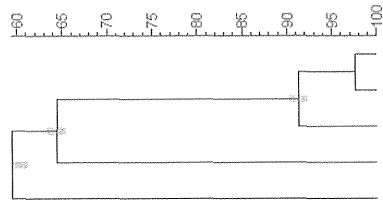
4 : No.1847-1

5 : No.1859

(J)

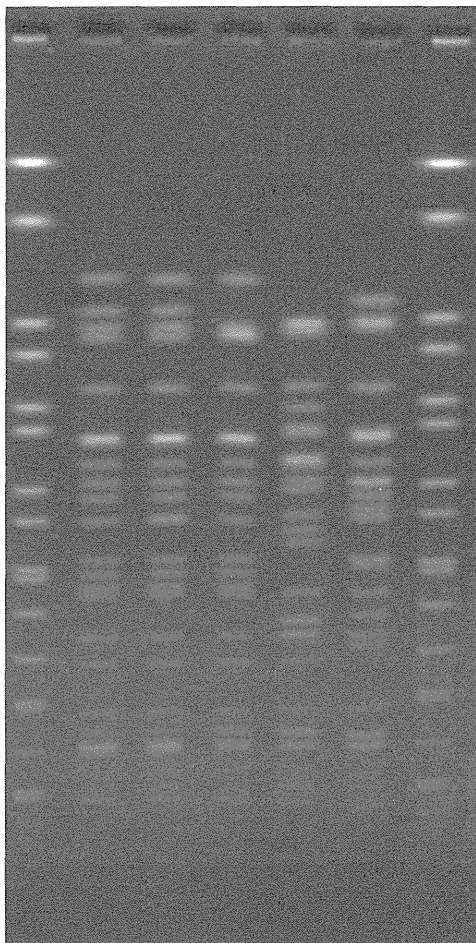
PFGE-XbaI

PFGE-XbaI



1826
1827
1835
1859
1847-1

GS 1 2 3 4 5 GS



1: 1826
2: 1827
3: 1835
4: 1847-1
5: 1859
GS: Gold standard

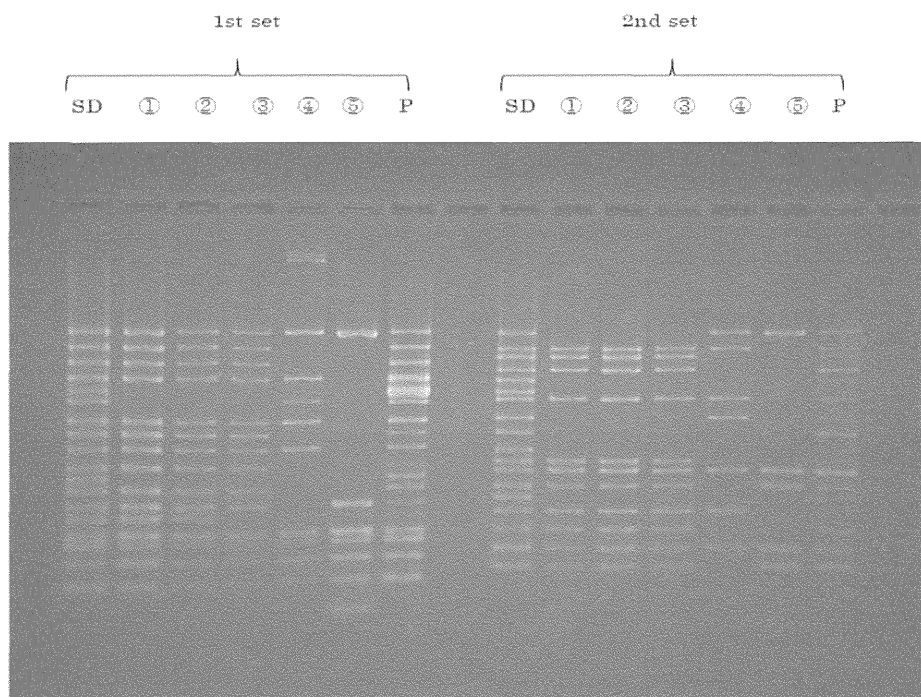
表1 平成26年度 PFGE精度管理結果

菌株No	1826	1827	1835	1847-1	1859
施設	菌株Noとデンドログラム解析結果(%)				
A	PFGE精度管理不参加				
B	PFGE精度管理不参加				
C	No1826→1827→1835⇒1847-1→1859 (100-65.0)				
D	No1826→1827→1835→1847-1→1859 (100-65.0)				
E	No1826→1827→1835⇒1847-1→1859 (97.0-76.0)				
F	No1826→1827→1835⇒1847-1→1859 (100-74.3)				
G	No1826→1827→1835⇒1847-1→1859 (95.0-65.0)				
H	No1826→1827→1835⇒1847-1→1859 (100-75.0)				
I	No1826→1827→1835→1859→1847-1 (100-75.5)				
J	No1826→1827→1835→1859→1847-1 (97.5-59.0)				

* ⇒: 矢印の左右の株でグループ形成、 →: 矢印の方向へ類似度は低くなる

図2 各施設の IS-printing system による精度管理結果

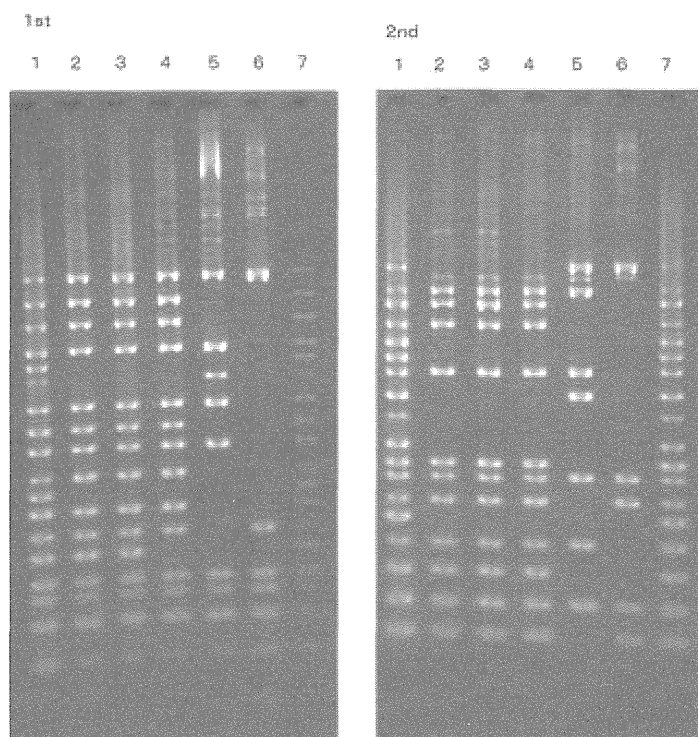
(B)



SD : 泳動コントロール P : ポジティブコントロール

① : 1826、② : 1827、③ : 1835、④ : 1847-1、⑤ : 1859

(C)



レーン1	: Std
レーン2	: 1826
レーン3	: 1827
レーン4	: 1835
レーン5	: 1847-1
レーン6	: 1859
レーン7	: P.C.