

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

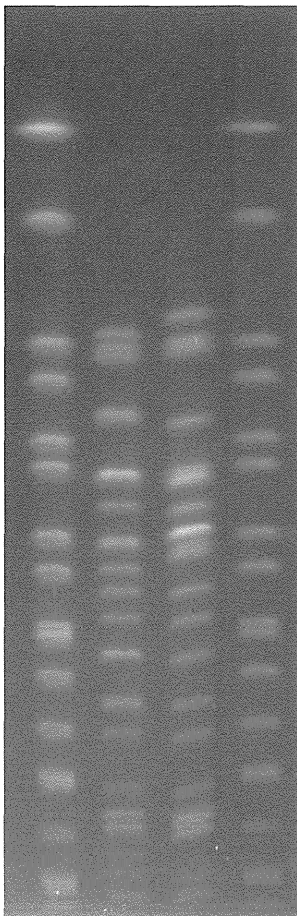
行ラベル	データの個数 / IS パターン番号
AA016	5
岐阜県保健環境研究所	4
岐阜市衛生試験所	1
AA017	3
岡崎市保健所	3
AA020	2
石川県保健環境センター	2
AA022	2
岡崎市保健所	2
AA023	5
愛知県衛生研究所	4
豊田市衛生試験所	1
AA027	1
富山県衛生研究所	1
AA028	1
岡崎市保健所	1
AA031	1
岐阜県保健環境研究所	1
AA039	1
富山県衛生研究所	1
AA040	4
岡崎市保健所	1
石川県保健環境センター	2
福井県衛生環境研究センター	1
AA044	1
岐阜県保健環境研究所	1
AA046	2
岐阜県保健環境研究所	2
AA047	15
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
AA048	1
石川県保健環境センター	1
AA060	3
三重県保健環境研究所	2
富山県衛生研究所	1
AA063	6
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
AA064	3
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
AA071	2
福井県衛生環境研究センター	2
AA076	4
三重県保健環境研究所	4
AA078	8
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
AA088	1
岐阜県保健環境研究所	1
AA091	6
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
AA103	2
豊田市衛生試験所	1
名古屋市衛生研究所	1
AA118	1
石川県保健環境センター	1
AA123	1
富山県衛生研究所	1
AA128	1
富山県衛生研究所	1
AA178	1
岐阜県保健環境研究所	1
AA202	1
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

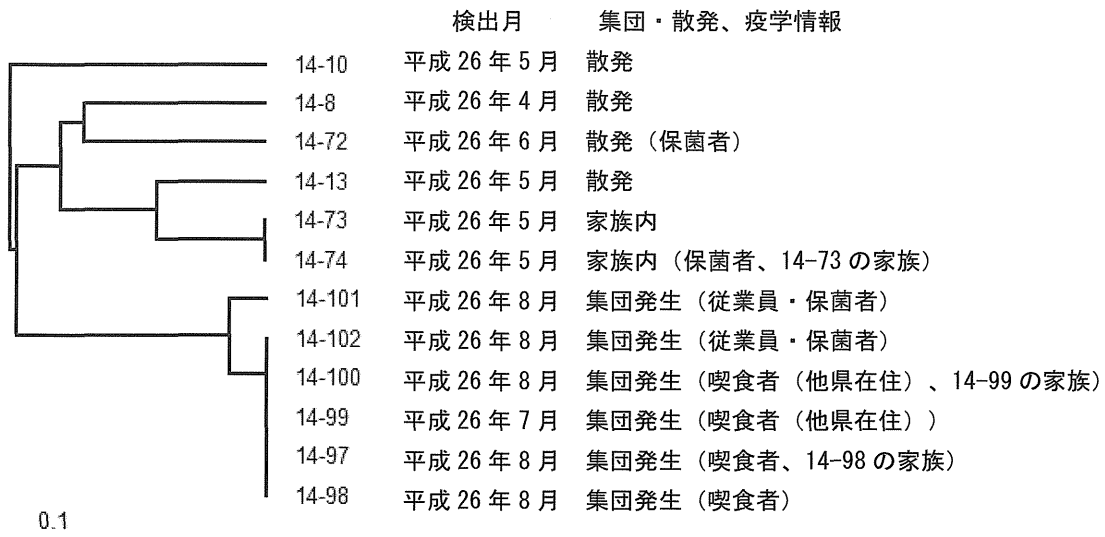
図1 岐阜市



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 岐阜県 0157 VT2 の MLVA 結果 (クラスター解析)



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 24～26 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、福島敬介	滋賀県衛生科学センター
	浅井紀夫、平田佐知、杉浦伸明	京都府保健環境研究所
	清水麻衣、木澤正人	京都市衛生環境研究所
	荻田堅一、秋山由美、齋藤悦子	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹、宮本園子	神戸市環境保健研究所
	高澤木綿子、横山北斗	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、小笠原準	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
	琴原優輝、松井恵梨子	奈良県保健研究センター
	廣岡真理子、金澤祐子	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

近畿ブロック内の 13 か所の地方衛生研究所（地衛研）で、IS-printing System（IS）法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法を腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の共通の遺伝子型別法として使用するため、精度管理を実施するとともに、発生状況や流行菌型を迅速に把握するため、近畿 IS データベースの充実と活用を図った。IS 法では毎年少ないながらも誤判定があり、精度管理により間違いやすい非特異バンドやテンプレートの調製に注意を促すことができた。PFGE 法では一部で未消化バンドやレーンの歪みなどもみられたが、画像解析で自動バンド認識を手動で補正することにより、近似度の高い結果が得られた。近畿 IS データベースには約 2,300 株の登録があり、それまでにないタイプが分離された場合や、一時期に集中して同じタイプが分離された場合は、関連性が強く示唆された。しかし、毎年 10 株以上登録されるような高頻度の IS 型については、分離時期が集中していても PFGE タイプが異なることがあり、あくまでも IS 法はスクリーニング法であると考えられた。今後も近畿 IS データベースを活用するために、迅速な菌株収集とデータ登録が望

まれる。さらに、Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法については、O157 だけでなく O26 や O111 にも使用可能な国立感染症研究所 (感染研) プロトコールについて、地衛研での実施が可能か検討した。感染研から配布された 24 サンプルの MLVA コントロール DNA について解析したところ、サンプルによっては増幅効率の悪い遺伝子座がみられた。また、蛍光漏れや非特異増幅も測定され、これらの問題点を改善するプロトコールの検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

近畿ブロック内で発生する食品由来感染症について、その感染源を究明し迅速な感染拡大防止対策を行うため、患者の聞き取り調査に加えて、分離株を精査し科学的に症例間の関連性を明らかにすることが求められる。腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症では、全国的に分離株の遺伝子型別が実施されており、近畿ブロックでも、最も届出数の多い血清群 O157 については、スクリーニング法として IS-printing System (IS) 法を、より詳細な解析法として O157 以外の血清群でも解析可能なパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法を実施している。これらの方法を近畿 2 府 4 県の地方衛生研究所 (地衛研) で共通の遺伝子型別法として用いるため、精度管理を実施した。また、EHEC O157 の発生状況や流行菌型を迅速に把握するため、IS 法の型別結果を数値化した近畿 IS データベースの充実と活用を図った。これらの方法は各施設で様々な事例にも応用し、疫学解析の一助とした。さらに、PFGE 法と同等の解析能力を有する Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法についても、国立感

染症研究所 (感染研) のプロトコールについて地衛研での実施が可能か検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には、大阪府で分離された EHEC O157 を使用した。毎年、その年の分離株から異なる遺伝子型の株を選択し、トリプトソイ寒天培地 1 ml を分注したマイクロチューブに接種して研究協力者に配布した。

2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2 (東洋紡) を使用し、電気泳動は説明書に記載の条件 (3%アガロースゲルと 0.5xTBE バッファーを使用) または自動電気泳動装置 (QIAxcel; QIAGEN、MultiNA; 島津製作所) を用いた。プライマーごとに増幅の有無を「1」「0」で記入した判定表と電気泳動画像を研究分担者に送信した。

3. 近畿 IS データベースと高頻度 IS 型の精査

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。

データ入力は、IS法の判定結果に加えて、菌株番号、血清型、日付（分離日、発症日など）、管轄保健所を必須項目とし、感染研 PFGE タイプや備考欄を設けた。また、判定結果は十進法に変換した「ISコード」としてデータベース上に表示した。

さらに、毎年複数の施設から登録される高頻度の IS 型がみられることから、2年目には、前年までで最も多く登録された IS 型について、各施設保存株で PFGE 法を実施し、泳動パターンを比較した。

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、TIFF ファイルにして研究分担者に送信した。

画像解析は、1 年目は 3 施設で、それ以降は研究分担者が実施した。画像解析ソフトは Fingerprinting II ver. 3 (Bio-Rad) または 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手動で補正した後、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% または 1.5% でデンドログラムを作成した。

5. MLVA 法

Izumiya らの方法 (Microbiol. Immunol. 2010) に準じて実施した。プライマーは公衛研で購入し、希釈液あるいは Multiplex PCR 用の混合液に調製して配布した。3 年目は、一部のプライマーを感染研が 2014 年 4 月から実施している配列に変更して検討した。

供試サンプルは、1 年目はボイル法で作製したテンプレート 2 検体、2 年目はボイル法および DNeasy® Blood&Tissue Kit (QIAGEN) で作成したテンプレート 11 検体、3 年目は感染研から配布された MLVA コントロール DNA 24 検体を使用した。

Multiplex PCR Kit (QIAGEN) または同等品を使用して PCR 反応を実施し、PCR 産物を希釈してフラグメント解析を行い、遺伝子座ごとの増幅サイズ (bp) を測定して感染研測定値と比較した。分子量マーカーには GeneScan-600LIZ Size Standard (Applied Biosystems) を使用した。

C. 研究結果

1. IS 法の精度管理

1 年目は 10 施設、2 年目以降は 11 施設で実施した。EHEC O157:HNM には 1-03 および 1-15 よりやや大きい約 800 bp と約

220 bp の非特異バンドが増幅される株があり、毎年精度管理株として配布し、本来の増幅バンドとの区別に注意を促した。その他の株では、Standard DNA や Template Mix とわずかに移動度が異なるバンドを非特異増幅と判定する施設が1年目に2施設、3年目に1施設あった。また、1年目には2施設で1-*eae*または1-*hlyA*の増幅が陰性となった株があったが、1施設ではテンプレートの作製をやり直し改善された。2年目と3年目に配布した株では、一部の施設で毒素遺伝子の判定が異なり、前培養で遺伝子脱落株を選択したものと考えられた。

2. 近畿 IS データベース

2009年10月に開始したデータベースは、2015年2月20日現在で2,329株が登録された。2009年からの登録数をみると、施設1、施設2、施設11では減少傾向がみられたが、変化のない施設もあった(表1)。

2012年からの3年間に登録された主なIS型(表2)について、2009年からの登録数の推移を図1に示した。AA023は3年間で68株と最多であったが集団事例は含まれず、毎年数か月間にわたって分離されていた。2013年8月にはAA069とAA091の登録数が増え、9月にかけてそれぞれ8施設から27株、6施設から25株で分離されていたが、感染源につながる情報は得られなかった。AA257は2013年6月に2施設から登録され、それ以前にないタイプであったことから、関連性

が強く疑われた。情報交換の結果、保育園関連事例の初発患者と散発下痢症患者が同時期に飲食チェーン店の別店舗を利用していることが判明し、感染研PFGEタイプも一致していた。2014年に多く登録されたAA078は、6~10月に5施設で分離されていたが、6~7月に分離された13株中12株は感染研MLVAタイプ14c016で2014年夏の流行タイプであった。

3. 高頻度 IS 型の精査

2012年までに最も多く登録されたIS型はAA018(近畿ISコード249727 116975)で、これまでに124株が型別されている。各施設の保存株について、なるべく感染研PFGEタイプの異なる株を選択してPFGE法を実施し、画像を研究分担者に電送して画像解析を行った。9施設から集まった53株のPFGEパターンは多様で、デンドログラムを作成したところ、50株は近似度88%以上の5つのクラスターを作った。分離時期や登録施設が異なってもほぼ同一のPFGEパターンを示す株がある一方で、分離時期を2011年7月に限っても、PFGEパターンは大きく2タイプに分かれた。

4. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGEの精度管理には毎年9~11施設が参加した。電送された画像のファイルサイズやコントラストは様々で、制限酵素による切断が不十分であると推察されるバンドやレーンの歪み、スマイリング

も見られた。画像解析は、自動バンド認識のままでは、菌株ごとの近似度が 80%程度、あるいはクラスターから外れる画像があり、未消化バンドや小さいサイズのバンド認識を手動で補正することにより、菌株ごとに 94%以上の近似度をが得られた。

5. MLVA 法の検討

Izumiya らの MLVA 法は、解析に使用する 18 か所の遺伝子座を 2 組の Multiplex PCR 法 (Mix 1、Mix 2) で増幅する。近畿ブロックでは、すでに感染研で解析された株について検討したが、1 年目は 4 施設中 3 施設で十分な増幅産物が得られない遺伝子座が複数あり、単独プライマーによる PCR が必要であった。

2 年目は、施設 11 で Multiplex PCR 法についての基礎的な検討を行った。テンプレートの調整方法については、ボイル法と DNA 抽出キットを使用した方法との間に差はほとんどみられなかった。プライマーを滅菌水または TE で希釈して比較したところ、TE 希釈プライマーでは 1~2 か所の遺伝子座で十分な増幅産物が得られないサンプルが見られた。また、滅菌水希釈プライマーでも増幅効率が悪い遺伝子座 (O157-34、EH111-11、O157-10) については、この 3 組のプライマーだけを混合した Multiplex PCR (Mix 3) を実施することで、十分な増幅産物が得られた。

2014 年 4 月から、感染研で実施される EHEC の遺伝子型別が Izumiya らの MLVA 法に変更され、一部のプライマー

の配列変更や追加があった。各遺伝子座において様々なリピート数が得られる株を組み合わせた 24 サンプルの MLVA コントロール DNA が感染研で準備されたことから、3 年目は MLVA コントロール DNA の分与を受け、5 施設で検討した。17 か所の遺伝子座のうち、Mix 1 で増幅される 4 か所と Mix 2 で増幅される 6 か所では、全施設で感染研の解析で得られた測定値とほぼ同じサイズの増幅産物が得られた。残りの遺伝子座のうち、E111-8 については、5 サンプルで全施設で増幅がない、あるいは非常に低い Height 値を示していた。また、全施設で非特異的増幅が、3 施設で蛍光漏れが検出された。「蛍光漏れ」は、ある傾向で標識されたプライマーの増幅産物が異なるフィルターにおいても検出される現象で、特に施設 11 ではすべてのサンプルの 1~10 か所の遺伝子座で、施設 3 でも 19 サンプルの 1~4 遺伝子座で検出されていた。

6. 遺伝子型別法を利用した事例解析

各自治体で発生した集団感染症や食中毒について、聞き取り調査に加えて分離株の遺伝子型別解析を実施し、事例間の関連性や原因食品を明らかにした。成果の一部は病原微生物検出情報に報告した。

(1) EHEC O26

2012 年 5 月に大阪市の保育園で EHEC O26 の集団感染が発生した。調査の結果、園児 75 名、職員 15 名、家族 25 名の合計 115 名から EHEC O26 (VT1) が分離された。このうち、6 名は陰性確認後に再度菌

分離陽性となったが、分離株はホスホマイシンやシプロフロキサシンなど12薬剤に感受性であった。1回目の分離株と再度分離された株、その家族から分離された株の PFGE パターンは一致していた。発症状況から保育園の厨房を原因施設とする食中毒と断定されたが、園内や家族内で二次感染により感染が拡大し、再感染が起こったと考えられた。

(2) *Staphylococcus aureus*

2012年9月、仕出し料理による食中毒が姫路市で発生した。有症者の嘔吐物および便、調理従事者の手指、食品残品から合計11株の *S. aureus* が分離され、全株とも A 型エンテロトキシン陽性、コアグラゼ型は IV 型で、PFGE パターンも一致していた。当該菌が分離された食品はおにぎり、焼き鯖、すじ肉煮込みであったが、統計学的におにぎりの関与が強く疑われ、調理従事者の手指からおにぎりを汚染したと考えられた。

(3) 毒素原生大腸菌 O169

2012年9月に大阪府内で仕出し弁当が原因と考えられる食中毒が発生した。患者便、調理従事者便、食品残品から STp 遺伝子陽性の毒素原生大腸菌 (ETEC) O169:H41 が分離された。本事例で分離された22株と2004~2012年に大阪府内で分離された18株の ETEC O169 について PFGE 法を実施したところ、本事例株の PFGE パターンは一致し、他の18株とは異なっていた。

(4) EHEC O157

2013年8月に兵庫県内で行われたスポ

ーツ合宿で、EHEC O157 の集団感染症が発生した。本合宿には兵庫県、福井県、愛知県の小学生24名と保護者や監督など大人17名が参加しており、小学生は HUS 患者1名を含む18名が発症していた。兵庫県では二次感染者など含む8名から EHEC O157:H7 (VT1, VT2) が分離され、IS 型および PFGE パターンは一致していた。福井県、愛知県の分離株も同じ IS 型を示し、3県で分離された20株について感染研で実施した PFGE パターンは18株で一致、2株は1バンド違いで同一由来であることが確認された。当該小学生が参加したスポーツ大会の観客からも同一遺伝子型の EHEC O157 が分離されており、ドアノブや階段の手すりなどを介した偶発的な感染であったと推察された。

D. 考察

EHEC O157 の遺伝子型別は、IS 法、PFGE 法、MLVA 法で行われており、地衛研では IS 法と PFGE 法が実施されることが多い。IS 法は、試薬がキット化されていること、2組の Multiplex PCR とアガロース電気泳動で型別できることから、簡便性、迅速性に優れており、さらに結果を数値化できることから、近畿 IS データベースを立ち上げて、型別情報を共有している。PFGE 法に比べて型別能力は低い、AA257 のようにこれまでにないタイプが分離された場合や、一時期に集中して分離された場合は、関連性が強く示唆される。しかし、AA018 や AA023 のように毎年10株以上登録されるようなタイ

プでは、同時期に登録が集中しても PFGE タイプが異なることもあり、あくまでも IS 法はスクリーニング法であると考えられる。IS 法で同一タイプの株が多数登録された場合には、疫学情報やより詳細な遺伝子型別結果について情報交換する必要があるが、近畿ブロックでは EHEC O157 の発生が減少傾向にあり、2014 年 6～7 月には同一 IS 型の集積に気づかなかった。全国的な流行タイプについての照合依頼もあり、引き続き迅速な菌株の収集とデータベースへの登録に努めるべきであった。また、IS 法は結果を数値化するため、正確な判定が求められる。Standard DNA や Template Mix とバンドの濃さを揃え、十分なバンド間隔の電気泳動像が必要であり、*1-eae* など EHEC O157 では必ず陽性となるバンドが増幅されない場合は、再検査を行わなければならない。

PFGE 法は、平成 15 年度から同じプロトコルを使用して精度管理を行っているが、全施設で安定して明瞭なコントラストの画像を得ることは困難である。レーンによる濃淡のばらつきや未消化バンド、スマイリングなどは、菌株の濃度を揃える、Proteinase K を失活させるステップで Pefabloc SC 溶液を残さない、ゲル作製台を水平にするなど、プロトコルの再確認により解消できるが、電気泳動装置や UV トランスイルミネーター、画像撮影装置の保守管理も課題である。研究協力者の交代などにより PFGE 法の実施を見送る施設もあったが、PFGE 法は汎用

性が高く、EHEC 以外の大腸菌や赤痢菌、レジオネラなどでも利用できることから、積極的に実施して手技や機器の管理を継承していくことが望まれる。

MLVA 法については、高い解析能力を有し結果を数値化できることから、PFGE 法に代わる方法として、導入を希望する地衛研も少なくない。しかし、現在の感染研プロトコルでは、菌株によって増幅効率の悪い遺伝子座があり、特に EH111-8 ではすべての施設で増幅されないか非常に低い Height 値を示した。また、蛍光漏れについては、解析機器の点検や PCR 産物の希釈率の変更で、非特異的増幅については、解析数を増やして bin を構築することで、ある程度解消される可能性もあるが、増幅されない遺伝子座で、菌株によっては本来の増幅と考えられるサイズの蛍光漏れや非特異的増幅が測定された場合は誤判定につながると推察された。これらの問題点を改善するために、Multiplex PCR を 3 組に変更するなど、プロトコルの見直しを含めた検討が必要であると考えられた。

近畿ブロックの各地研では、本研究により遺伝子型別法の信頼性を担保し、実際の事例解析に利用している。特に PFGE 法は EHEC O157 以外の食品由来感染症においても使用可能であり、EHEC での経験が活かされるものと期待される。

E. 結論

近畿ブロックで、IS 法および PFGE 法を共通の遺伝子型別法として使用するた

め、基本的な手技の確認や機器の保守管理が重要であり、精度管理の継続に加えて研修会など各施設のノウハウを交換する機会が必要であると考えられた。また、近畿ISデータベースを有効に活用するため、速やかな菌株の収集とデータベースへの登録が求められる。

MLVA 法については、サンプルによって増幅効率の悪い遺伝子座があり、蛍光漏れや非特異増幅を最小限に抑えるためにも、プロトコールの見直し含めた検討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) Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Harada T, Kumeda Y: Extended-Spectrum β -Lactamase- and AmpC β -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Strains Isolated from Domestic Retail Chicken Meat from 2006 to 2011. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2012, 65: 555-557.
- 2) Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, Kaneko A, Isobe J, Yamaguchi K, Horikawa K, Gomes TAT, Linden A, Bardiau M, Mainil JG, Beutin L, Ogura Y, Hayashi T: Clinical Significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18: 488-492.
- 3) Osawa K, Shigematsu K, Iguchi A, Shirai H, Imayama T, Seto K, Raharjo D,

Fujisawa M, Osawa R, Shirakawa T: Modulation of O-antigen chain length by the *wzz* gene in *Escherichia coli* O157 influences its sensitivities to serum complement. *Microbiol. Immunol.* 2013, 57: 616-623.

- 4) Harada T, Hirai Y, Itou T, Hayashida M, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: Laboratory investigation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain possessing a *vtx2c* gene with an *IS1203* variant insertion sequence isolated from an asymptomatic food handler in Japan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013, 77: 176-178.
- 5) Harada T, Itoh K, Yamaguchi Y, Hirai Y, Kanki M, Kawatsu K, Seto K, Taguchi M, Kumeda Y: A foodborne outbreak of Gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169: H41 in Osaka, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013, 66: 530-533.
- 6) Kanki M, Seto K, Kumeda Y: Simultaneous immunomagnetic separation method for the detection of *Escherichia coli* O26, O111, and O157 from food samples. *J. Food Protect.* 2014, 77: 15-22.
- 7) Themphachana M, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Seto K, Rattanachua 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.

- 8) 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.
- 9) 勢戸和子: O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌の重要性. *FFI ジャーナル* 2012, 217:67-75.
- 10) 勢戸和子, 伊豫田淳, 寺嶋淳: 腸管出血性大腸菌の迅速診断法と確定診断. *小児科臨床* 2012, 65: 2583-2587.
- 11) 川津健太郎, 勢戸和子, 久米田裕子: 食中毒細菌の簡易迅速検査法. *微生物の簡易迅速検査法(株式会社テクノシステム)* 2013, 521-530.
- 12) 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) 勢戸和子: 近畿ブロックISデータベースを用いたEHEC O157の流行株の探知, 衛生微生物技術協議会第33回研究会 (2012年7月, 横浜)
- 2) 勢戸和子, 田口真澄, 原田哲也: 大阪府における STEC 感染症への抗菌薬治療の現状, 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2012 年 7 月, 秋田)
- 3) 勢戸和子, 神吉政史, 原田哲也, 田口真澄: 大阪府で分離された O157 以外の志賀毒素産生性大腸菌 (non-O157 STEC) の特徴—ヒト由来株と食品由来株の比較, 第 17 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2013 年 7 月, つくば)
- 4) 勢戸和子, 田口真澄, 河原隆二: EHEC O157 流行株探知に向けた近畿 IS データベースの運用, 第 87 回日本細菌学会 (2014 年 3 月, 東京)
- 5) 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 近畿 IS データベース登録数の推移

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
施設1	25	61	51	16	28	24
施設2	12	48	11	10	6	11
施設3			24	26	33	21
施設4	37	53	26	36	56	21
施設5	7	43	31	13	23	6
施設6	7	23	5	3	8	25
施設7		74	28	30	47	19
施設8	5	13	29	9	12	11
施設9	46	33	20	13	26	17
施設10	8	5	5	3	7	4
施設11	103	136	84	54	42	69
施設13				7	7	5
計	250	489	314	220	295	233

表 2 近畿 IS データベースに登録された EHEC O157 の主な IS 型(2012~2014 年)

IS/パターン 番号 ^a	ISコード ^b	セット1 判定 ^c																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									
AA071	17453 82510	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
AA064	17455 82506	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	
AA257	18479 213007	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
AA078	84591 215275	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	800, 220	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
AA017	118141 114891	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
AA031	137743 198734	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1		1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
AA069	216703 117227	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
AA105	216957 84463	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AA039	216959 84459	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
AA023	216959 84463	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AA091	216959 117231	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
AA063	249711 116975	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
AA066	249725 116975	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
AA018	249727 116975	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1

a 感染研データベース(試用版)のISパターン番号

b 近畿ISデータベースのISコード

c 1: 増幅あり, 0: 増幅なし

d 非特異バンドの増幅サイズ

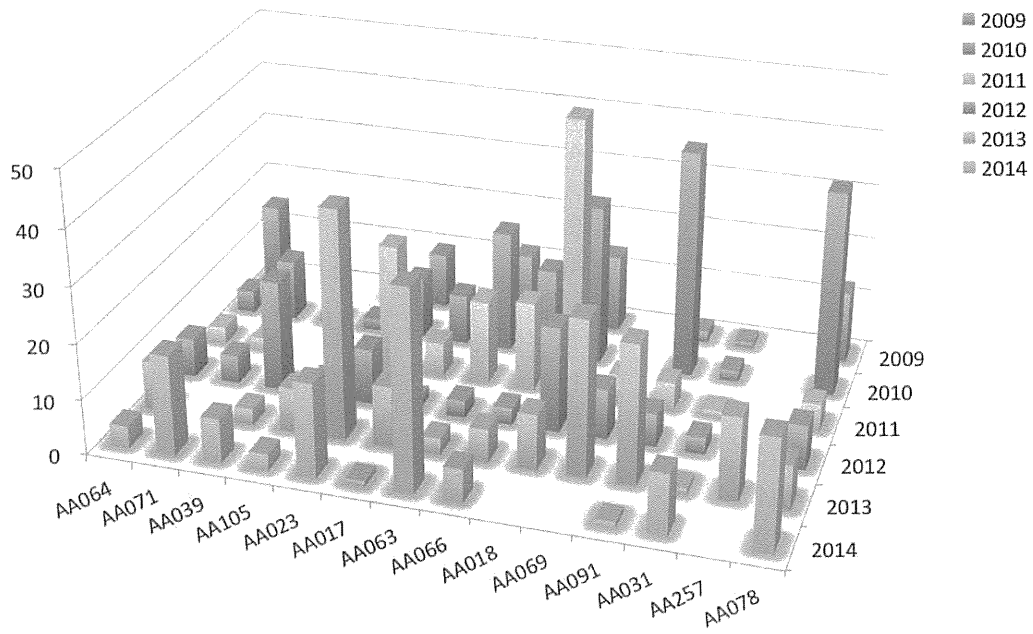


図 1 近畿 IS データベースに登録された主な IS 型の登録数の推移

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 24 年度～26 年度 総合研究報告書 (分担報告)

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	花原 悠太郎	鳥取県衛生環境研究所
	黒崎 守人	島根県保健環境科学研究所
	樫本 孝史	〃
	川上 優太	〃
	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	〃
	竹田 義弘	広島県立総合技術研究所保健環境センター
	山田 裕子	〃
	河村 美登里	〃
	増田 加奈子	〃
	今井 佳積	〃
	東久保 靖	〃
	田内 敦子	広島市衛生研究所
	千神 彩香	〃
	築地 裕美	〃
	佐多 俊子	〃
	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	〃
	下野 生世	〃
	嶋田 啓司	〃
	福田 千恵美	香川県環境保健研究センター
	宮本 孝子	〃
	岩下 陽子	〃
	有塚 真弓	〃

研究協力者	内田 順子	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
	松本 純子	〃
	木村 千鶴子	〃
	金山 知代	高知県衛生研究所
	藤戸 亜紀	〃
	鍋島 民	〃

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、平成24年度～26年度の3年間に腸管出血性大腸菌(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法では、どの施設の泳動像も比較的クリアであったが、一部スメアになって判定しにくいケースも見られた。デンドログラム解析は、バンド位置の認識に個人差が生じ、個々の類似度は多少異なっていたが、全体としてはおおそ一致した結果であった。IS-printing systemは、2nd set primerで増幅される高分子量のバンド領域において、各バンドの間隔が狭くなっているため、異なった判定をしたケースが見受けられた。このため、長めのゲルを用いて長時間泳動することによりバンド間隔が広がり、判定が容易になった。本法の結果は、どの施設も概ね良好であった。

本研究班では、以前よりPFGE法による型別結果を用いたデータベースの構築を試行してきた。平成24年度からは、IS-printing systemによる解析結果を用いたデータベースの構築に向けた試行を実施している。中四国地域でも、地域内で発生したEHEC O157の患者情報と、PFGE型及びIS-printing system解析結果などの疫学情報を収集し、解析した結果を各県に還元して、複数県に広がる同一菌による流行状況の把握や感染源の究明に役立っている。IS-printing systemによる解析は、操作の簡便性や結果の迅速性から、事例発生時のスクリーニング的な利用が、有用であると思われた。本法は、PFGE法のような操作の煩雑さや個人差による解析結果への影響が少なく、結果がコード化表記されるため菌株間の比較が容易で、解析結果は疫学情報とよく一致していた。一方、PFGE法はIS-printing systemに比べてより詳細な解析が可能であり、MLVA法はさらに検査の迅速性や、コード表記により結果の比較が容易である。各解析法の長所を生かして、状況に応じた効率的な疫学解析に使用することが、重要である。

A.研究目的

本研究班は、感染症や食中毒事例の広域の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な解析結果を患者等の情報と統合・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。腸管出血性大腸菌(以下 EHEC) 感染症は、全国で毎年多数の患者が発生しており、分子疫学的手法としてパルスフィールドゲル電気泳動法(以下 PFGE 法)および IS-printing System を用いて、疫学解析を実施している。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 とする) O157 菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法(以下、PFGE 法とする)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、将来的な広域発生への対応に向けた検討を行った。

B.研究方法

(1)材料

平成 24 年度～平成 26 年度に、岡山県で患者等から分離された EHEC O157 株を用いて、中四国地域の各施設の PFGE 法および IS-printing System による精度管理を実施した。また、中四国地域の各県で患者等から分離された EHEC O157 等の菌株を用いて、各県の施設で IS-printing System、PFGE 法および MLVA 法により、菌株相互の遺伝子解析を行った。

(2)方法

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。

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。

MLVA 法は、中四国地域の実施可能な一部施設で実施した。また、国立感染症研究所では、平成 26 年度より O157、O26、O111 の血清群について、PFGE 法にかわり MLVA 法による解析を実施しており、菌株を送付して MLVA 型別を実施した。

PFGE 法および IS-printing System の精度管理は、岡山県環境保健センターから年度ごとに EHEC 菌株 5 株を各施設に配付した。PFGE 法は泳動像と画像解析結果を、IS-printing System は泳動像と IS コードをメールで当センターに返信してもらい、すべての施設の結果を解析した。

中四国地域で各年度に発生した EHEC O157 による事例由来株について、IS-printing System による解析結果や、PFGE 型及び MLVA 型を患者の疫学情報とともにメールで岡山県環境保健センターに送付し、中四国地域全体の疫学情報を、

各施設に還元して、広域発生の解析に利用した。

C.研究結果

1.精度管理結果

(1)平成 24 年度の結果

中四国地域の 10 施設中 9 施設が参加して、PFGE 法の精度管理を実施した。PFGE の泳動像について、(A)施設では No1674 のレーンのみスメアーになってバンドの確認が難しい状況であった。また、(J)施設の No1674 の泳動像に見られた高分子量側の 4 番目のバンドは、他の施設では見られなかった。(図 1)

IS-printing System の精度管理は、10 施設すべてが参加して実施した。一部の施設では泳動像がややスメアーになってバンドが確認しづらいもの(図 2-1 : B、H 施設)や、泳動時間が長すぎて、スタンダード及び陽性対照の低分子量のバンドがゲル外へ出てしまったケース(図 2-2 : A 施設)も見られた。また、泳動距離の短いゲルを使用した場合に、バンドが不鮮明なときは、バンド同士の間隔が狭いため、スタンダードや陽性対照のバンドとの位置関係が判定しにくい傾向が見られ、バンドを読み違えるなど、異なった結果を報告した施設が例年より多かった。

(2) 平成 25 年度の結果

中四国地域の 10 施設中 8 施設が参加して、PFGE 法の精度管理を実施した。どの施設も PFGE の泳動像は良好で、目視によりほぼ同一の泳動パターンを示した。

IS-printing System の精度管理は、9 施設が参加して実施した。No1781 株の 2nd set primer により増幅される高分子量側か

ら 4 本目のバンドについて、6 施設の泳動像は増幅産物のバンドが見られないか増幅の弱いごく薄いバンドが観察された。他の 2 施設では、比較的是っきりしたバンドが確認されたが、当該バンドは 2nd set primer で増幅された他のバンドに比べてやや薄いか、泳動位置がやや高分子量側にあるように見えた。(図 3 : No1781 の上から 3 番目のバンド、表 1)

(3) 平成 26 年度の結果

中四国地域の 10 施設中 8 施設が参加して、PFGE 法の精度管理を実施した。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、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。(表 2)

IS-printing System の精度管理は、9 施設が参加して実施した。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。1 施設の泳動像で、1st set primer により増幅された最も高分子量の 1 つのバンドが、他の施設に比べて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。(図 4、表 3 : No1847-1)

2. 中四国地域の発生状況と解析結果

(1)平成 24 年度の結果

患者等由来 EHEC O157 株の計 155 株について疫学情報を収集した。IS-printing System による解析では、これらの株は 51 種類の IS コードに分類され、このうち 6 種類の IS コードの株が、中四国地域の患者等から多数分離された。(表 4)