

## (2) 平成 25 年度の結果

患者等由来 EHEC O157 株の計 128 株について疫学情報を収集した。同一 IS コードの株が複数の県から分離されたケースは、集団事例由来株を含めて 9 種類であった。岡山県と広島県で分離された IS コード 341057-310652 ( PFGE 型 g501) と 717555-611657 ( PFGE 型 i399) は、IS コード及び PFGE 型が同一の株であった。(表 5)

## (3) 平成 26 年度の結果

EHEC O157 等による感染事例の患者等由来株 168 株について疫学情報を収集した。IS-printing System による解析で、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、より詳細に識別された。MLVA 型による O26 株の解析では、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。(表 6-1、6-2)

## D. 考察

これまでの精度管理の結果から、各施設とも IS-printing System 及び PFGE 法の解析結果は、年々良好になっている。PFGE 法では、泳動像はクリアであるが、デンドログラムの解析で、バンド位置の認識に個

人差が生じ、多少の類似度の差が出てきていたため、注意が必要である。IS-printing System による解析では、泳動写真及び解析結果ともほぼ良好であった。頻繁に見られる誤判定の原因は、2nd set primer で増幅される高分子量の領域で、増幅産物のバンド間の泳動距離が短いため、読み違えが出てくることである。当センターでは以前から泳動距離の長いゲルを使用しており、長時間泳動することでバンド間の距離を十分とることにより、誤判定を回避している。キット化された検査法においても、安定した結果を得るための工夫が必要であると思われる。また、泳動像で対照のバンドに比べ、位置が少しでも異なっていたり、薄く細いバンドの場合は、目的のバンドでは無い可能性が高いと思われるので、再検査を行う必要がある。一方、非特異バンドであることが明らかな太いバンドは、疫学マーカーとして利用可能であった。両法は分子疫学的手法として重要であり、また正確な結果に基づくデータベースの構築のため、引き続き精度管理を実施していく必要があると考える。

中四国地域の EHEC O157 感染事例については、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。

平成 24 年度からは国立感染症研究所に IS-printing system の解析データに基づくデータベースを構築して試行を行っており、広域の発生事例などにおけるスクリーニング的な迅速解析に、有用である。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

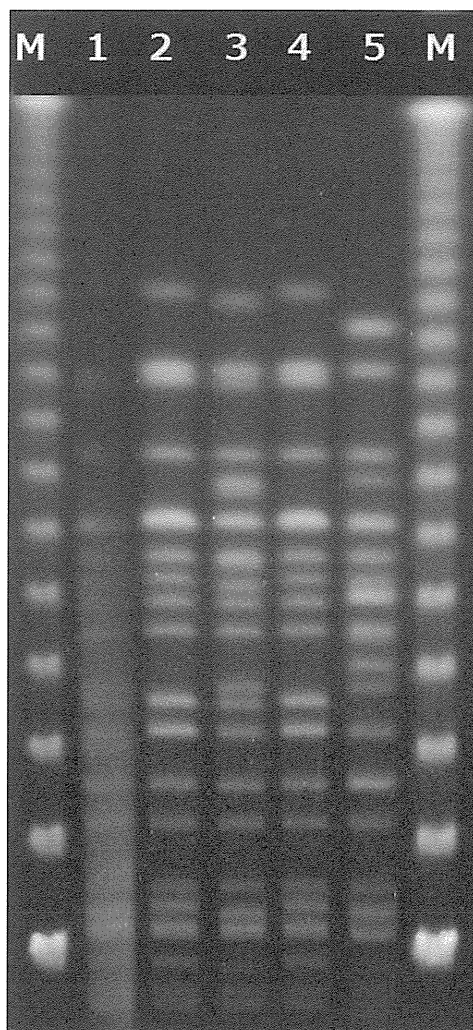
と、O26 及び O111 株の MLVA 型による解析が可能となった。MLVA 法は、中四国地域では現在一部の施設でのみ実施しているが、PFGE 法に比べて迅速で結果がコードで表示されるため、菌株の比較が容易なことなど、今後 MLVA 法への依存度が高くなると思われる。分子疫学的解析において、比較的操作简单で迅速にスクリーニングが可能な IS-printing System、すでにほとんどの施設に機器が導入され、検査が実施可能な PFGE 法、迅速でより詳細な解析が可能で今後その導入施設が増加するであろう MLVA 法など、各解析法の長所を生かして有効に使用することが重要である。また、解析法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、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、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ことが重要である。

#### E. 結論

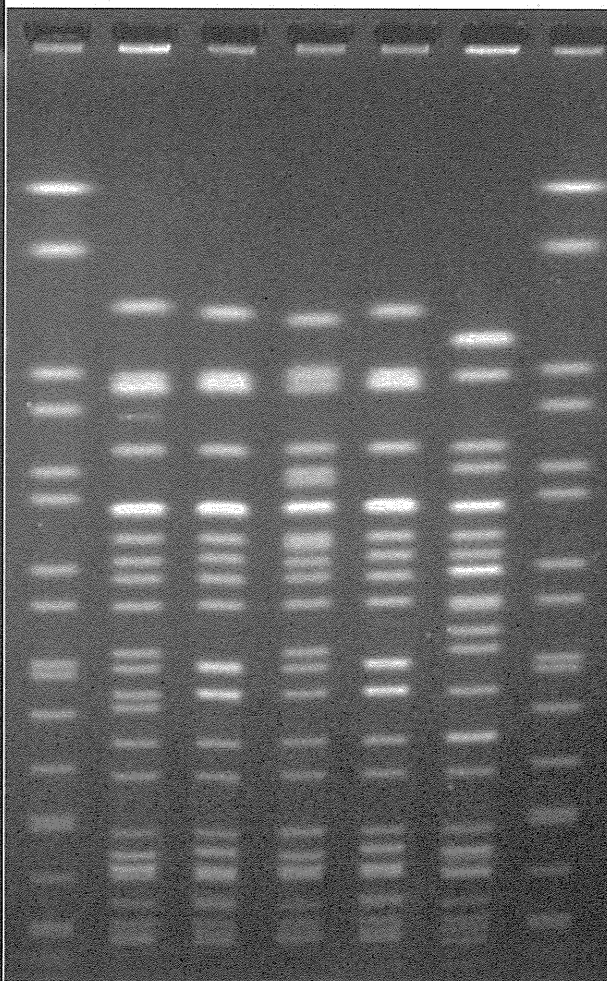
1. 平成 24 年度～26 年度に、PFGE 法および IS-printing System の精度管理を行い、両法とも概ね良好な結果であった。
2. 両法の誤判定の原因となるポイントを把握して、検査を行う必要がある。
3. 中四国地域で発生した EHEC O157 等の感染事例において、PFGE 法および IS-printing System 等の分子疫学的手法は、疫学解析に有用であった。
4. IS-printing System、PFGE 法及び MLVA 法などの分子疫学的手法は、各解析法の長所を生かして、有効に使用することが重要であると思われた。

(A)



(J)

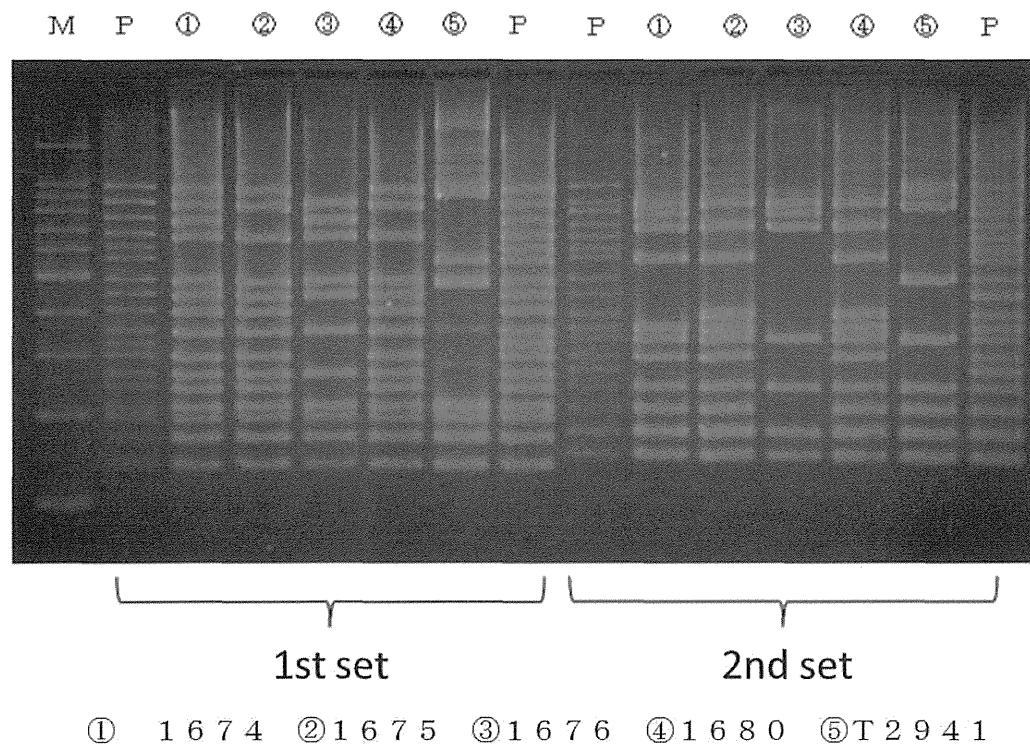
M 1674 1675 1676 1680 T2941 M



レーン 1 : No1674  
2 : No1675  
3 : No1676  
4 : No1680  
5 : No T2941  
M : スタンダード DNA  
(LONZA 社製)

図 1 EHEC O157 株の PFGE 法による精度管理結果(平成 24 年度)

(B)



(H)

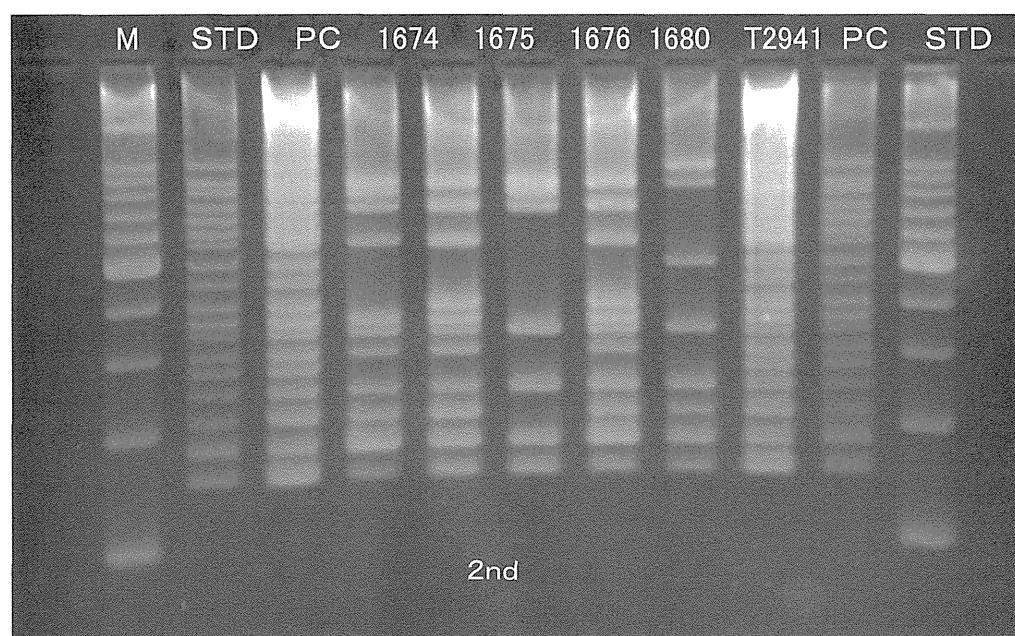
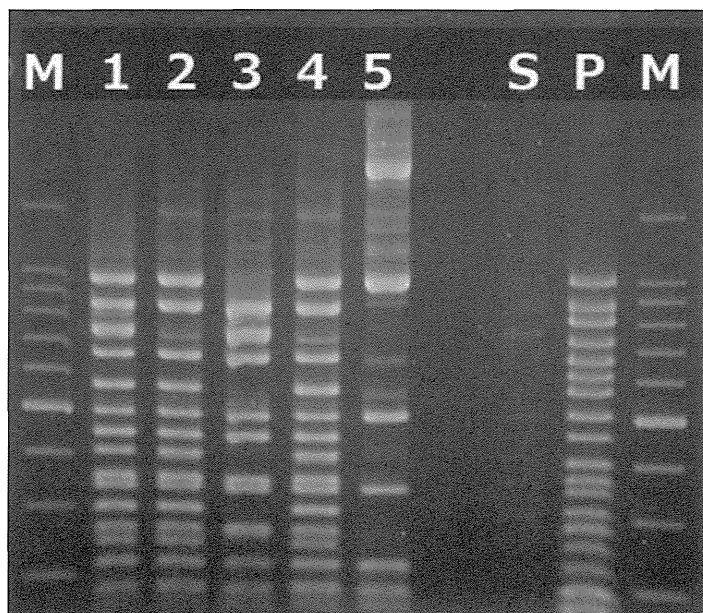


図 2-1 EHEC O157 株の IS-printing System による精度管理結果(平成 24 年度)

(A)

2ns primer set



1: 菌株No1674

2: 菌株No1675

3: 菌株No1676

4: 菌株No1680

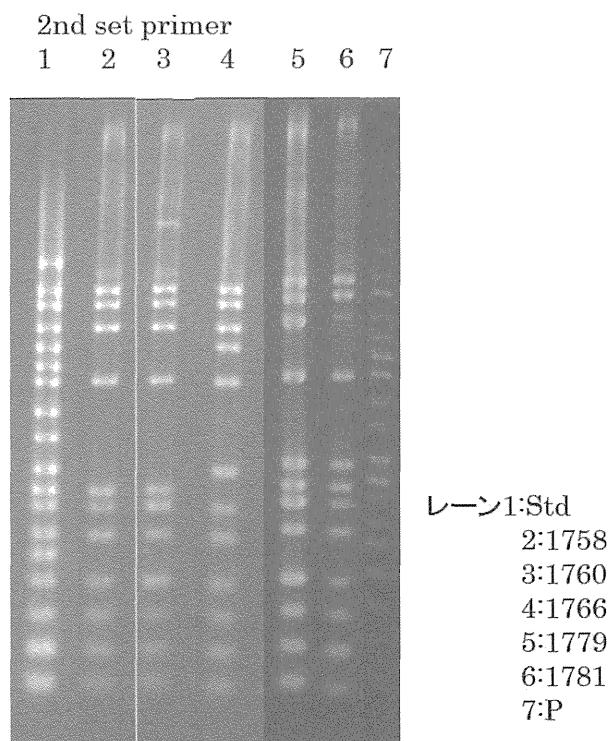
5: 菌株NoT2941

M: 100bpマーカー

S: スタンダードDNA P: テンプレートMIX

図 2-2 EHEC O157 株の IS-printing System による精度管理結果(平成 24 年度)

(C)



(E)

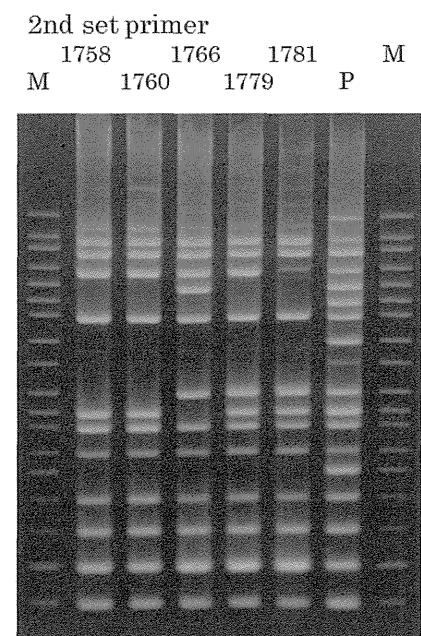


図3 EHEC O157株の IS-printing System による精度管理結果(平成25年度)

表 1 EHEC O157 株の IS-printing system による 精度管理結果(平成 25 年度)

施設	菌株No				
	1758	1760	1766	1779	1781
A	IS-printing sysytem精度管理不参加				
B	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757
C	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	611757
D	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757
E	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	611757
F	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757
G	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757
H	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757
I	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757
J	717555	717577	717577	317477	117577
	611657	611657	631557	611757	601757

上段: 1st primer code、下段: 2nd primer code、赤字はISコードが異なったもの。

表 2 EHEC O157 株の PFGE 法による 精度管理結果(平成 26 年度)

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





表 4 中四国地域で患者等から多数分離された EHEC O157 の IS コード(平成 24 年度)

ISコード(1st)	ISコード(2nd)	H型	VT型	株数	発生月	発生県
305577	211757	7	1, 2	14	11~1	岡山、広島、香川
307577	211757	7	1, 2	5	10, 1	広島、山口
317477	611756	7	1, 2	7	7~9	山口
613157	610446	7	1, 2	18	6~7	山口、広島、岡山
717557	611657	7	1, 2	10	4~8, 11, 12	山口、広島、香川、愛媛
717577	611657	7	1, 2	13	5~10	広島、島根、岡山、香川

表 5 中四国地域で患者等から多数分離された EHEC O157 の IS コード(平成 25 年度)

パターンNo	No	1st code	2nd code	PFGE型	関連事項	県名		
①	1780	317477	611756	i253		岡山県		
	1795			i615				
	13Y13			i355				
②	1793	317577	211757	i614		岡山県		
	E180			f514				
	E212			f173		愛媛県		
	ka-17			i491			Ka-17関連	香川県
	ka-20							
③	1763	317577	611557	i266		岡山県		
	ka-02			i319		Ka-02関連、3バンド違い	香川県	
	ka-12							
④	ko-01	317577	611756	未実施		高知県		
	13Y29			i356		山口県		
⑤	1746	341057	310652	i448	1746関連	岡山県		
	1747			g501				
	1748			i447				
	1749			g501				
	13-07			g501	13-07関連	岡山県		
	13-08							
	13-12							
	13-14							
	13-10							
	13-11			g501	13-10関連	広島県		
	13-13							
	13-16							
	⑥			1738	615457	311656	i443	
1784		i444						
E063		i218	愛媛県					
⑦	1758	717555	611657	i399		岡山県		
	13-21					広島県		
	13-22							
⑧	13Y05	717557	611657	i100	ステーキ店集発	山口県		
	13Y06			i100				
	13Y07			i101				
	13Y08			i102				
	13Y09			i100				
	13Y10			i101				
	13Y11			i101				
	13Y12			i101				
	ka-01			i317			香川県	
	⑨			1737	717577	611657	i434	保育園集発
1739		i439						
1760		i446						
13Y18		i347						
13Y19		i348						
13Y20		i348						
13Y21		i348						
13Y22		i348						
13Y23		i348						
13Y24		i349						
13Y25		i348						
13Y26		i348						
13Y27		i350						
13Y28		i351						
13Y35		i347						
13Y36		i351						
13Y37		i352						
13Y38		i348						
13Y39		i575						
13Y01		i103						
13Y02		i103						
13Y31		i348						
13Y32		i348						
13Y41		i351						
13-19		i206	広島県					

表 6-1 中四国地域で患者等から多数分離された EHEC O157 等の感染事例  
(平成 26 年度)

グループ	No.	年齢	性別	血清型	Stx	発病日	MLVA type	MLVA comp	IS-printing (1)	IS-printing (2)	備考
①	T-6	40才代		O157:H-	1,2	2014/9/1	14m0346 (14c046)		215457	311656	保健所の調査では関連性不明
	T-7	30才代		O157:H-	1,2	2014/9/1	14m0347 (14c046)		215457	311656	
	14Y34	3	女	O157:H-	1,2	2014/11/4	14m0454		215457	311656	
②	EH14-12	28	M	O157:H7	2	2014/7/30	14m0170	14c053	245457	611242	家族SE1
	SE14005	5	男	O157:H7	2	2014/7/30	14m0170	14c53	245457	611242	
	SE14006	2	女	O157:H7	2	2014/8/2	14m0170	14c53	245457	611242	
	SE14007	35	女	O157:H7	2	2014/8/2	14m0170	14c53	245457	611242	
	SE14011	58	女	O157:H7	2	2014/9/8	14m0380		245457	611242	
	SE14010	33	男	O157:H7	2	2014/8/26	14m0381	14c53	245457	611242	
③	14Y17	1	F	O157:H7	2	2014/9/23	14m0056	14c013	305457	211642	家族Y1
	14Y19	7	M	O157:H7	2	2014/9/26	14m0056	14c013	305457	211642	
	14Y20	3	M	O157:H7	2	2014/9/19	14m0056	14c013	305457	211642	
	K142246	81	F	O157:H7	2	2014/10/6	14m0357		305457	211642	家族K1
	K142248	50	M	O157:H7	2	2014/10/9	14m0357		305457	211642	
④	K141186	64	F	O157:H7	2	2014/6/27	14m0110	14c048	341057	310652	
	K142247	9	F	O157:H7	2	2014/9/29	14m0356	14c048	341057	310652	
⑤	1861	1	女	O157:H7	1,2	2014/10/15			117575	601757	
	1866	3	女	O157:H7	1,2	2014/10/26			117575	601757	
	1867	36	女	O157:H7	1,2	2014/10/28			117575	601757	
⑥	14Y01	49	F	O157:H7	1,2	2014/6/4	14m0131		317475	611756	家族Y2
	14Y02	2	F	O157:H7	1,2	2014/6/16	14m0131		317475	611756	
	14Y03	4	F	O157:H7	1,2	2014/6/18	14m0131		317475	611756	
	14Y05	18	F	O157:H7	1,2	2014/7/5	14m0131		317475	611756	
⑦	H26E083	11	男	O157:H7	1,2	2014/11/6	14m0449		317575	611757	家族E2
	H26E084	4	男	O157:H7	1,2	2014/11/2	14m0449		317575	611757	
	H26E085	39	女	O157:H7	1,2	-	14m0449		317575	611757	
	K142617	4	M	O157:H7	1,2	2014/11/6	14m0449		317575	611757	家族K2
	K142618	39	F	O157:H7	1,2	2014/11/9	14m0449		317575	611757	
⑧	1848	33	女	O157:H7	1,2	2014/7/30	13m0157	14c007	317577	211756	
	1849	36	男	O157:H7	1,2	2014/8/1	14m0272		317577	211756	
	1855	2	男	O157:H7	1,2	2014/8/15	14m0275		317577	211756	
⑨	14Y11	17	M	O157:H7	1,2	2014/8/23	14m0236		517557	201657	同一飲食店利用Y
	14Y13	37	F	O157:H7	1,2	2014/8/26	14m0236		517557	201657	
⑩	EH14-10	16	M	O157:H7	1,2	2014/7/28	14m0177		707557	611657	
	1868	22	男	O157:H7	1,2	2014/12/14			707557	611657	
⑪	1835	26	女	O157:H7	1,2	2014/7/15	13m0694	14c021	717557	611657	
	14Y09	13	F	O157:H7	1,2	2014/8/10	13m0694	14c021	717557	611657	
	14Y24	20	M	O157:H7	1,2	2014/10/11	13m0694	14c021	717557	611657	
	1810	3	男	O157:H7	1,2	2014/5/10	13m0697		717557	611657	
	EH14-09	22	M	O157:H7	1,2	2014/7/24	14m0196		717557	611657	
⑫	K141185	12	M	O157:H7	1,2	2014/7/9	13m0694	14c021	717577	611657	託児所関連株O-2
	T-3	10才代		O157:H7	1,2	2014/6/1	14m0088		717577	611657	
	1815	1	女	O157:H7	1,2	2014/6/24	14m0129		717577	611657	
	1822	27	男	O157:H7	1,2	2014/6/24	14m0129		717577	611657	
	1823	2	男	O157:H7	1,2	2014/7/8	14m0129		717577	611657	
	1825	3	女	O157:H7	1,2	2014/7/3	14m0129		717577	611657	
	1826	6	女	O157:H7	1,2	2014/7/13	14m0129		717577	611657	
	1827	2	女	O157:H7	1,2	2014/7/14	14m0129		717577	611657	
	1838	1	女	O157:H7	1,2	2014/7/12	14m0129		717577	611657	
	1839	36	女	O157:H7	1,2	2014/7/25	14m0129		717577	611657	
	EH14-06	2	M	O157:H7	1,2	2014/7/8	14m0129		717577	611657	
	SE14012	72	男	O157:H7	1,2	2014/9/25	14m0387		717577	611657	
	SE14013	70	女	O157:H7	1,2	2014/9/29	14m0387		717577	611657	

表 6-2 中四国地域で患者等から多数分離された EHEC O157 等の感染事例  
(平成 26 年度)

⑬	14Y35	1 女	O26:H11	1 *		13m2040	14c072			集団発生(保育園)Y-H
	14Y37	1 女	O26:H11	1	2014/11/5	13m2040	14c072			
	14Y38	1 男	O26:H11	1	2014/11/7	13m2040	14c072			
	14Y39	38 女	O26:H11	1 *		13m2040	14c072			
⑭	14Y06	2 M	O26:H11	1	2014/8/1	13m2123				保育園関連事例Y-U 14Y06と14Y16は同一人
	14Y07	30 F	O26:H11	1 *		13m2123				
	14Y14	1 M	O26:H11	1	2014/9/12	13m2123				
	14Y16	2 M	O26:H11	1 *		13m2123				
⑮	14Y08	1 F	O26:H11	1	2014/8/10	13m2123				保育園関連株O-1
	1816		O26:H11	1		14m2016	14c020			
	1818	2 女	O26:H11	1	2014/7/6	14m2016	14c020			
	1819	2 女	O26:H11	1	2014/6/30	14m2016	14c020			
	1820	3 男	O26:H11	1	2014/7/3	14m2016	14c020			
	1821	1 女	O26:H11	1	2014/7/2	14m2016	14c020			
	1828	3 女	O26:H11	1	2014/7/7	14m2016	14c020			
	1829	2 男	O26:H11	1	2014/7/8	14m2016	14c020			
	1830	2 男	O26:H11	1	2014/7/8	14m2016	14c020			
	1831		O26:H11	1		14m2016	14c020			
	1832		O26:H11	1		14m2016	14c020			
	1833		O26:H11	1		14m2016	14c020			
	1834		O26:H11	1		14m2016	14c020			
1836	2 男	O26:H11	1	2014/6/15	14m2016	14c020				
⑮v	1846		O26:H11	1		14m2016	14c020			保育園関連株O-1
	1817		O26:H11	1		14m2038	14c020p			
⑯	H26E063	20 女	O26:H11	1	-	14m2044				家族E1 家族E1の接触者
	H26E064	1 女	O26:H11	1	2014/7/14	14m2044				
	H26E065	1 男	O26:H11	1	2014/7/17	14m2044				
⑰	14Y26	3 M	O26:H11	1	2014/10/27	14m2104	14c071			集団発生(認可外保育施設)Y
	14Y27	2 M	O26:H11	1	2014/10/20	14m2104	14c071			
	14Y28	5 F	O26:H11	1	2014/10/20	14m2104	14c071			
	14Y29	2 M	O26:H11	1	2014/9/28	14m2104	14c071			
	14Y30	1 F	O26:H11	1 *		14m2104	14c071			
	14Y32	22 F	O26:H11	1	2014/10/18	14m2104	14c071			
⑱	EH14-17	2 M	O26:H11	1	2014/9/20	14m2108	14c061			家族EH
	EH14-19	8 M	O26:H11	1	2014/9/9	14m2108	14c061			
	EH14-20	5 F	O26:H11	1	2014/9/12	14m2108	14c061			
⑱v	EH14-18	34 F	O26:H11	1	2014/9/9	14m2109	14c061			
⑲	14Y36	2 女	O26:H11	1 *		14m2125	14c072p			集団発生(保育園)Y-H
	14Y40	40 男	O26:H11	1 *		14m2125	14c072p			
⑳	14Y41	5 男	O26:H11	1	2014/11/8	14m2126				家族Y4
	14Y42	3 女	O26:H11	1	2014/11/2	14m2126				
㉑v	14Y25	2 M	O26:H11	1	2014/10/17	14m2127	14c071			集団発生(認可外保育施設)Y
	14Y31	61 M	O26:H11	1 *		14m2128	14c071			

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

九州地区におけ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  
—IS 型別データベースの運用、EHEC 検出状況、精度管理 (ISPS、PFGE) 及び  
集団発生事例の解析 (平成 24-26 年度まとめ) —

研究代表者	泉谷秀昌	国立感染症研究所
研究分担者	世良暢之	福岡県保健環境研究所
	堀川和美	福岡県保健環境研究所
研究協力者	麻生嶋七美	福岡市保健環境研究所
	藤田景清	北九州市環境科学研究所
	世戸伸一	北九州市環境科学研究所
	寺西泰司	北九州市環境科学研究所
	吉武俊一	佐賀県衛生薬業センター
	成瀬佳菜子	佐賀県衛生薬業センター
	浦山みどり	長崎県環境保健研究センター
	右田雄二	長崎県環境保健研究センター
	江原裕子	長崎市保健環境試験所
	緒方喜久代	大分県衛生環境研究センター
	古川真斗	熊本県保健環境科学研究所
	福司山郁恵	熊本県保健環境科学研究所
	徳岡英亮	熊本県保健環境科学研究所
	杉谷和加奈	熊本市環境総合センター
	黒木真理子	宮崎県衛生環境研究所
	吉野修司	宮崎県衛生環境研究所
	穂積和佳	鹿児島県環境保健センター
	濱田まどか	鹿児島県環境保健センター
	高良武俊	沖縄県衛生環境研究所
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	村上光一	福岡県保健環境研究所
	西田雅博	福岡県保健環境研究所
	江藤良樹	福岡県保健環境研究所
	大石明	福岡県保健環境研究所
	前田詠里子	福岡県保健環境研究所
	岡元冬樹	福岡県保健環境研究所

要旨

九州地区では、1. IS-printing System (以下、ISPS とする) による IS 型別データベースの運用、2. 腸管出血性大腸菌 (以下、EHEC) 検出状況の

解析、3. EHEC による集団発生事例の集約、4. 精度管理 (ISPS、PFGE) 及び 5. 集団発生事例の詳細な解析の 5 項目について取り組んだ。

九州地区における腸管出血性大腸菌 0157 (以下 0157EHEC) の IS 型別の登録数は平成 26 年 12 月現在で 1194 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件及び平成 26 年度 203 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移している。九州地区で平成 24~26 年度に収集された EHEC は 1753 株であった。その内訳は、0157EHEC が 729 株、非 0157 EHEC が 989 株及び血清型別不能が 35 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率が 56.4%であり、本研究で 0157EHEC に加えて非 0157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。平成 24~26 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例は 65 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 28 事例で、非 0157EHEC によるものは 37 事例であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。精度管理では例年行っている ISPS と併せて、PFGE についても今回初めて実施した。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数で、全 4 株一致した地衛研はなかった。バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

#### A. 研究目的

食中毒や感染症等の緊急事例発生時には、科学的根拠に基づいた感染源及び感染経路を解明し、原因究明や拡大防止等の行政対応をすることが求められる。科学的根拠としては、有症者、調理従事者及び推定原因食品等から分離された病原細菌について、分子疫学的手法を用いて関連性を鑑別することが最も一般的である。腸管出血性大腸菌の分子疫学解析法として汎用されているパルスフィールド・ゲル電気泳動法 (以下、PFGE 法) は、国立感染症研究所 (以下、感染研) を中心に全国規模の PFGE 型別データベースの構築が進んでいる。九州地区では、従来からの PFGE 法と比較して操作が簡便で迅速性に優れ、デジタル結

果が得られるといった特徴がある IS 型別データベースを構築し、菌株識別のためのデジタル情報の共有、流行菌株の探知及び監視等を目的に研究を実施している。また、EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例についても集約し、解析している。

#### B. 研究方法

ISPS は、IS-printing system (東洋紡 (株)) を用い、取扱い説明書に従って実施した。IS 型別は、IS の分布に由来する 32 の増幅バンド (No. 1-01~1-16/2-01~2-16) 及び病原性関連遺伝子 (*stx*<sub>1</sub>、*stx*<sub>2</sub>、*eae* 及び EHEC-*hlyA*) の合計 36 種の遺伝子の検出の有無を 1 及び 0 の 2 進数で置き換えた後、10 進数に再変換した 11 桁の整数

として数値化した。

EHEC 検出状況及び EHEC による集団発生事例の集約については、メールを利用したエクセルデータ等のやりとりにより実施した。

ISPS については、平成 25 年度に配分した「IS-printing 電気泳動マニュアル（最終版）-九州パルスネット ver. 2-(本報告書の最後に掲載)により実施した。PFGE については各地衛研が通常行っている方法にて行った。平成 23～25 年度は 0157EHEC の DNA を配布していたが（表 1）、平成 26 年度は PFGE を行うことから、0157EHEC 4 菌株（A-D；ISPS で明瞭なエクストラバンドをもつ株を含む）を参加地衛研に配布した（表 2）。

## C. 研究結果及び考察

### 1. IS 型別データベースの運用

ここでは平成 22 年 4 月から平成 26 年 12 月までの IS 型別の登録状況等について解析したものを報告する。

九州地区における 0157EHEC の IS 型別の登録数は平成 26 年 12 月現在で 1194 件（平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 227 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 223 件及び平成 26 年度 203 件）であり、毎年 200 件前後の登録で推移している（表 3）。

平成 22～26 年度に登録された 1194 株の 0157EHEC の IS 型別は 241 型に分類され、4 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 12 型（5.0%）でそれに属する株は合計 534 株（44.7%）であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 102 株（8.5%）が 11 地衛研から、登録された（表 4）。また、5 年

間で 20 株以下しか登録が無い 0157EHEC の IS 型別は 229 型（95.0%）で、それに属する株は合計 660 株（55.3%）で、その内訳は 11～20 株登録されている 0157EHEC の IS 型別が 9 型、6～10 株の登録が 17 型、5 株以下の登録が 203 型、そのうち 1 株だけ登録されている 0157EHEC の IS 型別が 123 型と最も多かった。

また ISPS は操作が簡便で迅速性に優れた特徴を有する一方で、PFGE 型別が同一で IS 型別が異なる株等も報告されていることから、ISPS の精度管理等で解析能力の向上に努める必要がある。IS 法の迅速性が生かされているかどうかを推察するため、0157EHEC が分離されてから IS 型別がデータベースに登録されるまでの期間について検討した。その結果、図 1 に示すように 2 峰性を示した。1 峰目は 0157EHEC が分離後、迅速な行政判断が必要であったため、直ちに ISPS を実施し、IS 型別のデータベースに登録及び解析したものと推定された。2 峰目はある程度の 0157EHEC をまとめて処理することで ISPS を効率的に実施したためと推測された。

ISPS の実施状況についてのアンケート集約の結果（表 5）、12 地衛研中 6 地衛研が全株について実施、4 地衛研が一部の株について実施及び 2 地衛研が必要時のみ実施であった。ISPS の実施は、人的及び予算的問題、PFGE 法の実施等を考慮し、効率的な運用という観点から、各地衛研において判断され、実施されていると考えられた。

### 2. 九州地区での EHEC 検出状況

九州地区の地衛研における EHEC の O 群血清型別の検出状況について解析した。

九州地区 12 地衛研にて平成 24 年 4 月から平成 26 年 12 月までに 1753 株の EHEC 菌株が収集された (表 6.1-3)。平成 24 年度は 0157EHEC が 258 株 (42.9%)、非 0157EHEC が 323 株 (53.7%)、O 群血清型別不能 EHEC が 20 株であった。平成 25 年度は 0157EHEC が 216 株 (35.8%)、非 0157EHEC が 373 株 (61.9%) 及び O 群血清型別不能 EHEC が 14 株であった。平成 26 年度は 0157EHEC が 255 株 (46.4%)、非 0157EHEC が 293 株 (53.4%) 及び O 群血清型別不能 EHEC が 1 株であった。九州地区で収集される EHEC の O 群血清型の内訳に大きな変化は無く、例年、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC、0121EHEC 及び 0145EHEC など、全体の 9 割を占めている。九州地区は本研究で 0157EHEC に加えて非 0157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われた。また、九州地区 12 地衛研にて平成 25 年 4 月から 12 月までに収集された 603 株の 0157EHEC 及び非 0157EHEC 菌株のうち、年齢が記載してあった 391 株についての男女別の年齢構成をみると、表 7 に示すように、男女比は 180 人 : 211 人で 1 : 1.17 と大きな開きは無かった。年齢構成は 0~4 歳が全体の 47.6% と全体のほぼ半分を占め、5~9 歳が 16.9% とこれに次いでおり、この傾向は全国の傾向 (病原微生物検出情報、34(5)、2013 年 5 月) とほぼ同じであった。

### 3. EHEC による集団発生事例数

平成 24 年度から平成 26 年度の 3 年間の EHEC による集団発生事例はそれぞれ 23、27、15 事例であった (表 8.1-3)。平成 24 年度は、0157EHEC によるものが 7 事例で、

非 0157EHEC によるものは 16 事例、平成 25 年度は、0157EHEC によるものが 14 事例で、非 0157EHEC によるものは 13 事例、平成 25 年度は 0157EHEC によるものが 7 事例で、非 0157EHEC によるものは 8 事例であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

### 4. 精度管理 (ISPS、PFGE)

PFGE 法による遺伝子解析は、病原細菌の疫学調査に必要な標準的な手段である。その一方で、迅速性に優れず、画像による情報共有は①解析に手間がかかる、②解析を実施する担当者によって解析結果が異なるなどの難点がある。近年、腸管出血性大腸菌 0157 の遺伝子型別には IS629 によるゲノム構造多型を利用した、遺伝子型別手法である ISPS が広く用いられている。この手法は、①迅速であること、②数値化が容易であることが最大の利点であり、九州ブロックでは、この利点を生かし、平成 22 年より共有データベースを用いたリアルタイムな情報共有を実施している。ISPS 遺伝子型別結果の共有においては、各施設において正確に数値化されていることが、データの信頼性を確保する上で非常に重要となる。そこで九州ブロックでは、検査技術の向上・維持と正確な数値化を行うためのトレーニングを目的とし、12 地衛研を対象に精度管理を実施している。平成 23 年度は、ISPS 標的領域に起きた挿入、または、欠失が原因で現れる「明瞭なエクストラバンド」が観察される、判定が非常に困難な 7 株の試料を用いて精度管理を実施した。その結果、エクストラバンドを原因とする誤判定が多くみられていた。また、平成 24 年度は、再度同じ試料を用い精度管理



を実施したところ、正解率は大幅に改善したが、誤判定を無くすことはできなかった(表 9)。そこで平成 25 年度は、平成 24 年度までの精度管理で誤判定が少なかった施設のプロトコルを参考に統一プロトコルを作成し実施した。その結果、正解率はさらに改善した。泳動時間の延長(90 分程度)、泳動サンプルの濃度調整、もしくは、アプライ量の調整などを行うことを明記したことによるものと考えられた(図 2、表 10)。平成 26 年度は、昨年度と同様に ISPS の精度管理を実施した。併せて今回初めて PFGE の精度管理も同 10 地衛研で行った。A と B は PFGE が同一で ISPS が異なる菌株、C は無作為に選択した菌株、D は ISPS において 1st セットの 1-02 と 1-03 の間、及び、1-14 と 1-15 の間にエクストラバンドが現れる株を選択した。しかし、送付した A の PFGE パターンが変化(バンドが 1 本増加)していたため、A と B を同一パターンとして各地衛研で判定出来るか、今回は判断できなかった。

ISPS の精度管理の結果、エクストラバンドのない A-C については全施設で正しく判定された。しかし、2 つのエクストラバンドを含む D については、3 地衛研で誤判定がみられた(図 3)。ゲル上部(1-02・1-03 間)のエクストラバンドについては、定規等を利用して判定を行うことで、正確に判定できると考えられた。一方、下部のエクストラバンド(1-14・1-15 間)については、1-15 のバンドと重なるため、注意深く判定を行う必要がある。また、ポジティブコントロールを設定していない施設が 2 施設あった。ISPS には、何らかの不具合があると増幅されないバンド(1-06、2-09)があるため、試験毎にポジティブコントロールを設定することが望ましい。

一方、今回実施の PFGE については、泳動は概ね良好に行われていたが(図 4.1-4)、地衛研 12 はバックグラウンドに薄いバンドが見られた。サンプルプラグの作成過程において、何らかの問題があった可能性が考えられたが、これらが出現した原因は不明であった。一方、A と B のバンド本数は、それぞれ 19 本と 18 本を想定していたが、A が B のバンド数より 1 本多いと判定したのは、10 地衛研中 6 地衛研だった(表 11)。また、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった。一致しなかった原因として、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

#### D. 結論

九州地区における 0157EHEC の IS 型別の登録数は毎年 200 件前後の登録で推移している。平成 22~26 年度に登録された 1194 株の 0157EHEC の IS 型別は 241 型に分類され、4 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 12 型(5.0%)でそれに属する株は合計 534 株(44.7%)であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 102 株(8.5%)が 11 地衛研から、登録された。

九州地区で平成 24~26 年度に収集された EHEC は 1753 株であった。その内訳は、0157EHEC が 729 株、非 0157 EHEC が 989 株及び血清型別不能が 35 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率が 56.4%であり、本研究で 0157EHEC に加えて非 0157EHEC の情報収集にも積極的に取り組んでいる成果が現れているものと思われる。平成 24~26 年度の 3 年間の EHEC に

よる集団発生事例は 65 事例であった。その内訳は、O157EHEC によるものが 28 事例で、非 O157EHEC によるものは 37 事例であった。集団発生事例は、保育所など、従来から多発している施設での事例が多い傾向は変わらなかった。

精度管理では、例年実施している ISPS に加えて、PFGE についても今回初めて行った。ISPS では、エクストラバンドがある菌株では誤判定も見られた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、10 地衛研の各担当者が判定したバンド数がすべて一致した地衛研はなかった。バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、また担当者によりバンドの有無の判定に差があることが原因と考えられた。

#### E. 研究発表

- 1) 前田詠里子、村上光一、江藤良樹、市原祥子、大石明、濱崎光宏、堀川和美、麻生嶋七美、本田己喜子:Antimicrobial resistance and lineage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91 isolates from humans in Fukuoka Prefecture, Japan, 28th International Congress of Chemotherapy and Infection (2013 年 6 月、横浜)
- 2) 江藤良樹、市原祥子、前田詠里子、平井晋一郎、横山栄二、世良暢之、堀川和美:福岡県で分離された腸管出血性大腸菌 O157 の clade 解析と志賀毒素産生量の比較、第 17 回腸管出血性大腸菌感染

症研究会 (2013 年 7 月、つくば市)

- 3) Okamoto F, Murakami K, Maeda E, Oishi A, Etoh Y, Kaida M, Makigusa M, Nakashima K, Jinnouchi Y, Takemoto H, Kakegawa H, Yamasaki C, Manabe S, Sasaki M, Ogata K, Ikebe T and Sera N. A foodborne outbreak of group A streptococcal infection in Fukuoka Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(4):321-2
- 4) Maeda E, Murakami K, Etoh Y, Onozuka D, Sera N, Asoshima N, Honda M, Narimatsu H, Iyoda S, Watahiki M and Fujimoto S. Does Sequence Type 33 of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O91 cause only mild symptoms? *J Clin Microbiol.* 2015 Jan;53(1):362-4.
- 5) Noda T, Murakami K, Etoh Y, Okamoto F, Yatsuyanagi J, Sera N, Furuta M, Onozuka D, Oda T, Asai T and Fujimoto S. Increase in resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Salmonella* isolated from retail chicken products in Japan. *PLoS One* 2015 in press.

表1 平成23-25年度の精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

試料番号	株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子
A	97E8-1	1997	保菌者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>
B	04E053	2004	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>
C	02E024	2002	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>
D	06E032	2006	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>
E	10E134	2010	患者	O157:HNM	<i>stx</i> <sub>2</sub>
F	03E030	2003	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>
G	04E116	2004	患者	O157:HNM	<i>stx</i> <sub>1</sub>

表2 精度管理に用いた腸管出血性大腸菌

試料名	菌株名	分離年	由来	血清型	志賀毒素遺伝子	IS型別
A	7E006	2007	保菌者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>	66324257743
B	7E032	2007	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>	66458474955
C	8E048	2008	患者	O157:H7	<i>stx</i> <sub>2</sub>	22081687690
D	13E079	2013	患者	O157:HNM	<i>stx</i> <sub>1</sub> + <i>stx</i> <sub>2</sub>	57733470538

表3 九州地区地衛研におけるIS型別登録数

地衛研	IS型別登録数						合計
	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	平成26年度		
1	112	48	61	26	28	275	
2	50	53	44	24	29	200	
3	30	15	12	15	38	110	
4	12	10	17	51	28	118	
5	23	18	11	28	26	106	
6	6	5	4	8	2	25	
7	13	16	24	18	11	82	
8	16	10	5	30	25	86	
9	5	3	7	2	4	21	
10	20	17	16	4	3	60	
11	19	25	21	15	8	88	
12	6	7	7	2	1	23	
合計	312	227	229	223	203	1194	

表4 九州地区での登録数が多いIS型別(年度別、地衛研別)

No.	IS型別	登録数																合計	
		登録年度					登録地衛研												
		22	23	24	25	26	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
1	66324257743	22	32	4	11	33	20	13	23	7	9		9	6	1	5	8	1	102
2	57733536074	3	15	23	8	16	13	14	4	12	10	5		2	1	4			65
3	56643812046	31	14	3	13	3	19	17	7	3	6	2	8			1	1		64
4	30671622280	33	11	1	7	11	31	5	3		11	3	1		1	6	2		63
5	30653010185	9	4	4	14	6	6	5	3	2	7		1	8		4		1	37
6	27384601163	26	3		7		8	1	4		8	6		2	3	2	2		36
7	57733470538		2	12	1	16	10	4		16			1						31
8	22081687688	12			2	16	9	7	8		3				2	1			30
8	66323217359	10	8	8	4		4	14	1	1			9				1		30
10	66457435083	6	2	9	10	1	9	5	3	1	1		2			3	4		28

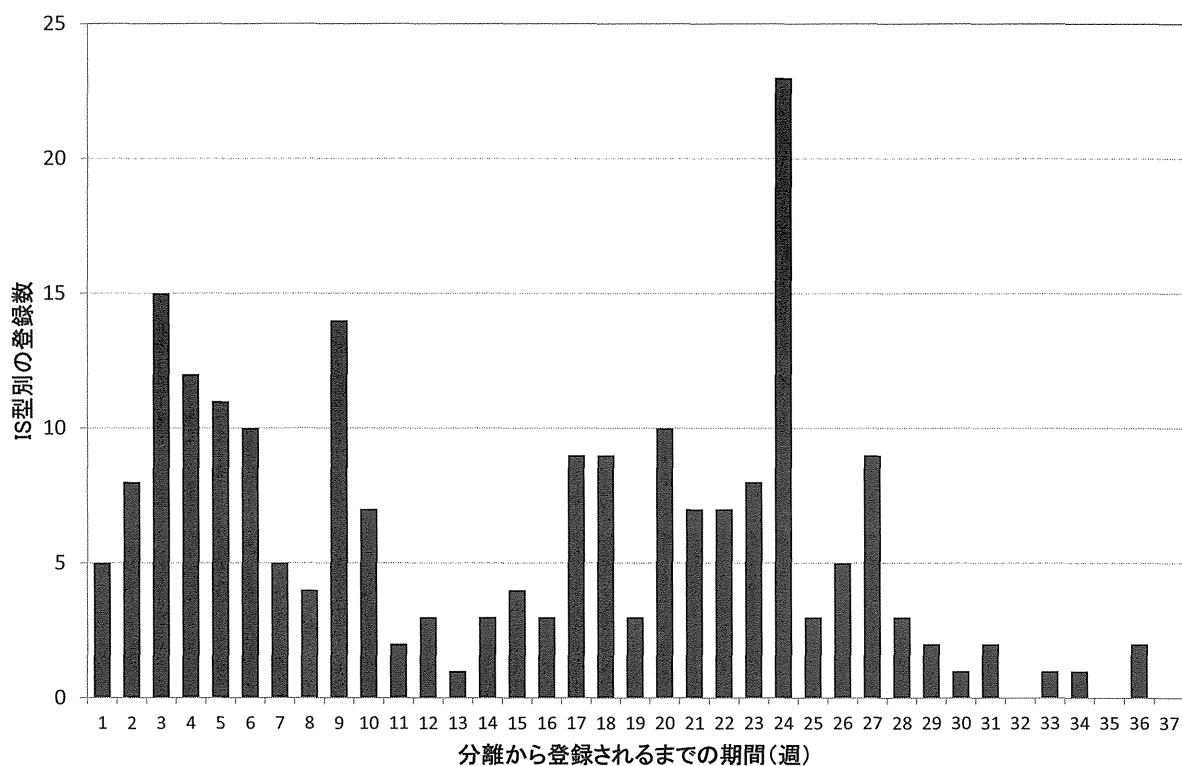


図1 O157EHEC が分離されてから IS 型別が登録されるまでの期間について