

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金  
新興・再興感染症及び予防接種政策推進 研究事業

「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

研究分担報告書

研究代表者	泉谷秀昌	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	石原朋子	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	李 謙一	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	寺嶋 淳	国立医薬品食品衛生研究所	
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。2015 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づいて分離株の動向について調べた。EHEC 0157 1404 株、026 602 株、0111 69 株について MLVA 法を用いて解析し、それぞれ、514、192、42 のタイプが同定された。このうち、2 株以上検出された型は 0157 で 181 (35%)、026 (40%) で 76、0111 で 15 (36%) であった。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 749 株であった。当該コンプレックスは 0157 13 種類、026 2 種類、0111 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 5 種類、026 で 2 種類であった。複数の地研で同一の MLVA 型を示す株、もしくはコンプレックスに含まれる株が検出された場合には関係機関、もしくは研究分担者を介して情報を提供し注意喚起を行った。コンプレックスの中には 10 を超える MLVA 型を含むものもあり、より分かりやすい情報提供の仕方について検討の必要があると考えられた。

A. 研究目的

細菌性食品由来感染症への対応においては、患者から分離された菌株の解析から得られる病原体情報に基づいた菌株同士の類縁性の比較、さらに食品等の推定原因材料からの分離菌株の病原体情報との比較、そして得られた情報の迅速な共有化が重要で

ある。

こうした病原体情報という科学的エビデンスに基づく事例対応および感染症対策に資するため、病原体情報に関する解析手法並びに情報共有化システムの構築が本研究の目的である。

本研究では特に EHEC 感染症の中でも発

生頻度の高い3大血清群(0157, 026, 0111)を対象に、新規に導入された multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)法を用いて解析し、類縁菌株の情報取得、複数の機関で検出される所謂広域株の解析、及び情報共有について検討を行った。

## B. 研究方法

平成27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ブロックの研究分担者を介して各地方衛生研究所への配信および/もしくは、食中毒調査支援システム(NESFD)において情報共有を行った。

MLVAについては Izumiya ら(2008)に記載の遺伝子座を用いて、PFGE については Pulsenet International に準拠した方法で解析した。なお、PFGE 解析の詳細については研究分担者(伊豫田)の報告書を参照されたい。

## C. 研究結果

平成26年度より EHEC3 大血清群(0157, 026 及び 0111)については MLVA を実施し、その一部について PFGE 解析を実施している。(なお、本結果は平成27年分離株で平成28年1月末におけるものである。)

### 1. MLVA

EHEC 0157 1404 株、026 602 株、0111 69 株を MLVA で解析した。それぞれ、514、192、

42 のタイプが同定された。このうち、2 株以上検出された型は 0157 で 181 (35%)、026 (40%) で 76、0111 で 15 (36%) であった。

## 2. 広域株の解析

MLVA では、得られた型から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。平成27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 749 株であった。このうちコンプレックスは 16 種類(0157 が 13 種類、026 が 2 種類、0111 が 1 種類)であり、コンプレックスに含まれない広域タイプとしては 7 種類(0157 で 5 種類、026 で 2 種類)であった(表1および表2)。

このうち、関与した機関数の多い上位6種類のコンプレックス 15c020、15c011、15c010、15c017、15c041、15c025 の分布状況は図1に示すとおりである。このうち、15c041 は9月に発生した集団事例関連株を含んでいた。

## 3. 広域株に関する情報提供

複数地研で共通の MLVA タイプもしくはコンプレックスが検出された場合には、検出菌株リストおよび MLVA 型間の関係を示す minimum spanning tree (MST) をまとめ、関係機関に還元した。必要に応じて IS-printing system および PFGE 解析に関する病原体情報を収集し、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(図2)。

## D. 考察

平成26年度から稼働し始めた EHEC3 大血清群の MLVA の結果から、集団事例、家族内

事例における病原体情報の一致もしくは類似が認められ、本法の事例解析の有用性が示された。

上記事例関連株および散発事例株において2株以上検出されたMLVAタイプは全タイプの4割程度であった。これは菌株数にして約7割となり、病原体情報から、互いに何らかの関連性を有していることを示唆している。

MLVAの結果は広域株の探知にもつながった。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18種類、026で4種類、0111で1種類であった。広域株には集団事例関連株も含まれるが、集団事例に関連が示されていない菌株も含まれており、病原体情報の迅速な解析と還元および共有をより一層推し進める必要があると考えられる。

リアルタイムに分離菌株を解析していくに当たり、コンプレックスの中には15c011などのように、含まれる型数が10を超える複雑なものもあり、MLVA型同士の近縁性、発生時期および地域の情報を考慮して各々の関連性を検討する必要があると考えられる。こうしたコンプレックスに関しては、病原体情報の共有化について検討し、よりわかりやすいものにしていく必要があると考えられる。

#### E. 結論

EHEC感染症におけるMLVA法を活用することで、より迅速に病原体情報が獲得され、その情報還元および共有が図られることが期待された。

現在EHEC感染症ではMLVA法、IS-PS法、およびPFGE法が利用されている。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

1. Nguyen VH, Pham HT, Diep TT, Phan CD, Nguyen TQ, Nguyen NT, Ngo TC, Nguyen TV, DO QK, Phan HC, Nguyen BM, Ehara M, Ohnishi M, Yamashiro T, Nguyen LT, Izumiya H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004. *Epidemiol Infect.* 2015 Nov 11:1-7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26554547.

2. 泉谷秀昌、石原朋子、伊豫田淳、大西真：2014年に分離された腸管出血性大腸菌0157、026および0111株のMLVA解析について。IASR、第36巻、83-84、2015年5月

##### 2) 学会発表

泉谷秀昌、石原朋子、李謙一、石嶋希、伊豫田淳、大西真：腸管出血性大腸菌の分子疫学解析について（血清群0157、026、0111を中心に）。第36回日本食品微生物学会学術総会、2015年11月、神奈川県川崎市。

#### 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

表 1. 2015 年広域コンプレックス検出状況 (5 機関以上)

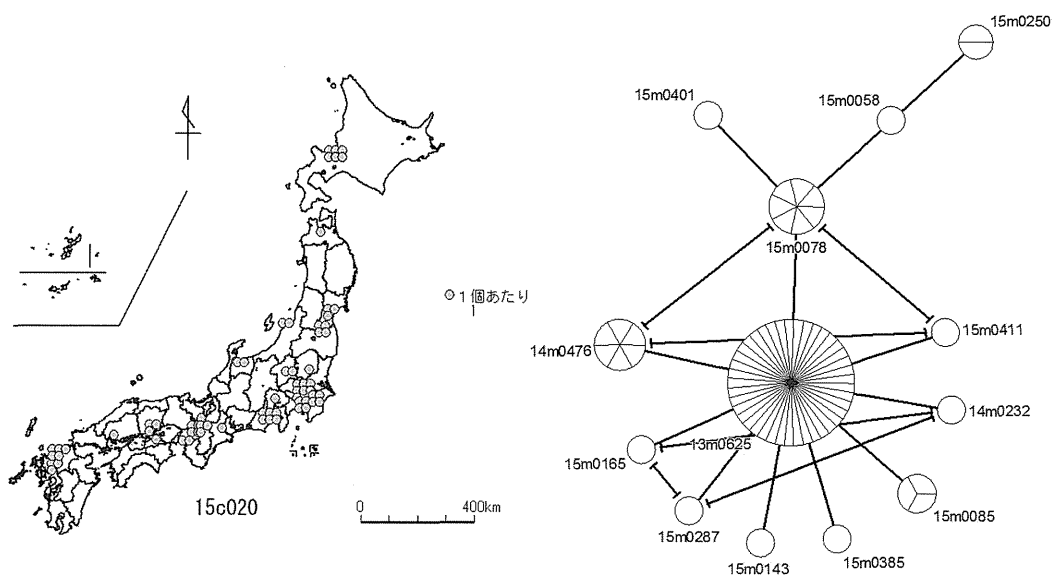
Complex	株数	機関数	都道府県	O群	VT型
15c020	67	29	23	O157	VT1+VT2
15c011	109	25	19	O157	VT1+VT2
15c010	49	15	11	O157	VT1+VT2
15c017	62	14	12	O157	VT2
15c041	95	10	9	O157	VT2
15c025	17	10	8	O157	VT1
15c067	13	9	8	O157	VT1+VT2
15c073	35	7	6	O26	VT1+VT2
15c064	12	7	6	O157	VT2
15c030	38	6	5	O157	VT2
15c083	184	5	5	O26	VT1
15c046	37	5	4	O157	VT2
15c012	9	5	5	O111	VT1+VT2
15c014	9	5	3	O157	VT1+VT2
15c045	7	5	5	O157	VT1+VT2
15c037	6	5	5	O157	VT2

表 2. 2015 年広域 MLVA 型検出状況 (5 機関以上、表 1 コンプレックスに含まれない型)

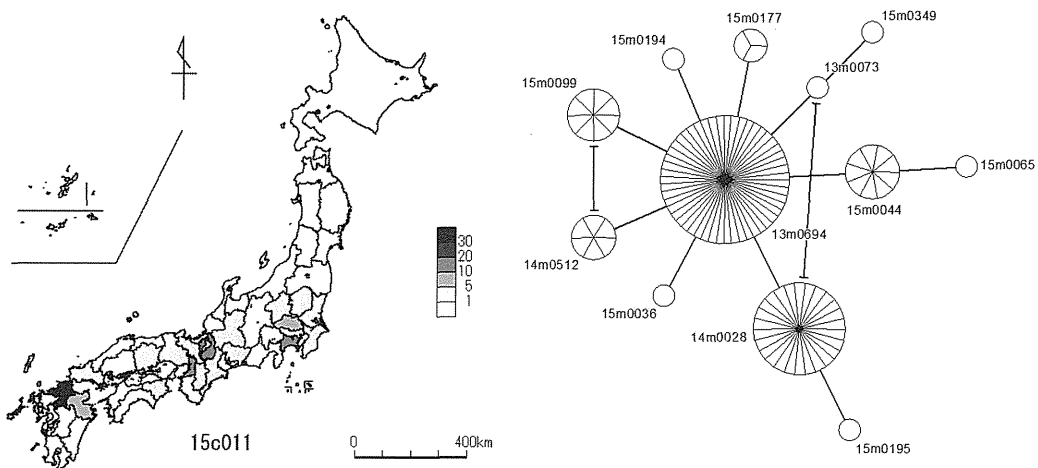
MLVA型	株数	機関数	都道府県	O群	VT型
13m0327	16	9	8	O157	VT2
15m0037	19	7	5	O157	VT1+VT2
15m0071	9	6	6	O157	VT1+VT2
15m0101	9	6	4	O157	VT1+VT2
15m0107	8	6	6	O157	VT1+VT2
15m2006	8	6	6	O26	VT1
14m2016	7	5	5	O26	VT1

図 1. 広域コンプレックス分布状況 (左: ○の数もしくは塗りつぶしの濃さで表示) ならびにその MST (右: 線上の数字は異なる遺伝子座の数を表す。示されていない場合は 1)

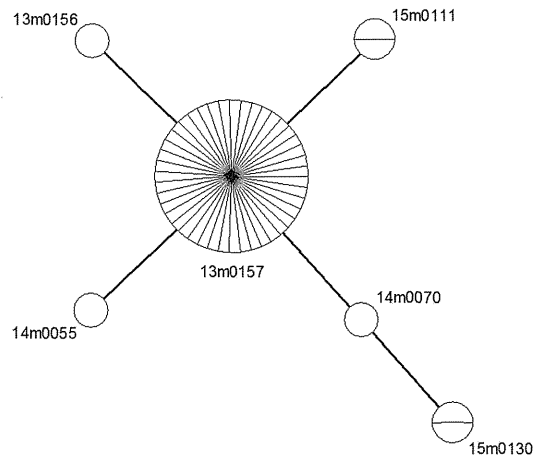
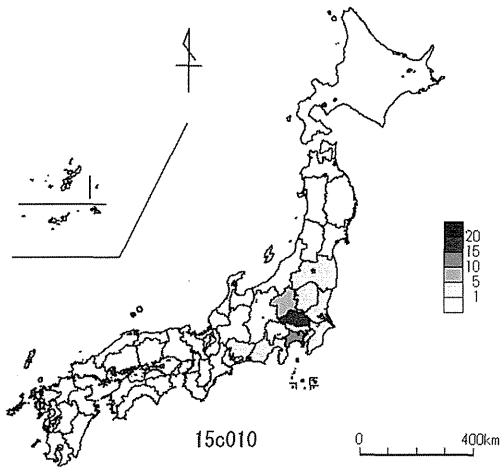
a) 15c020



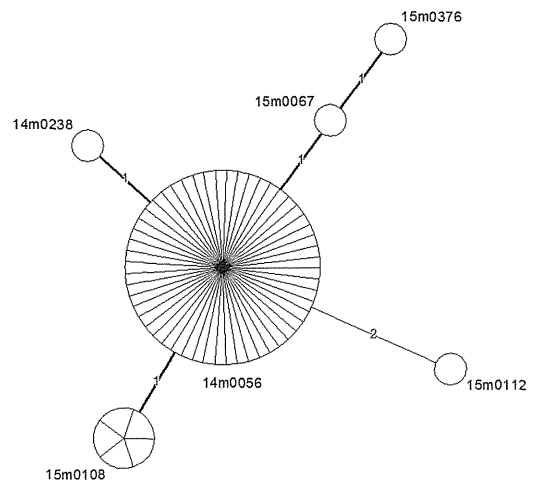
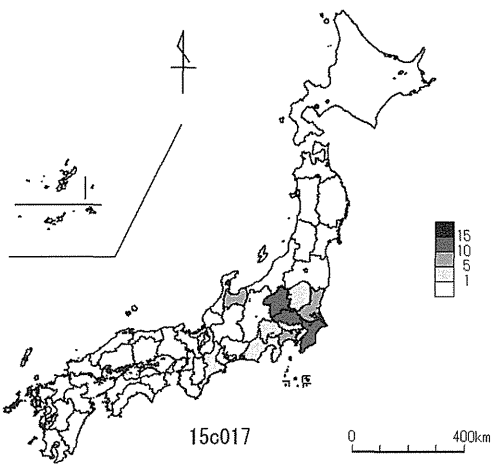
b) 15c011



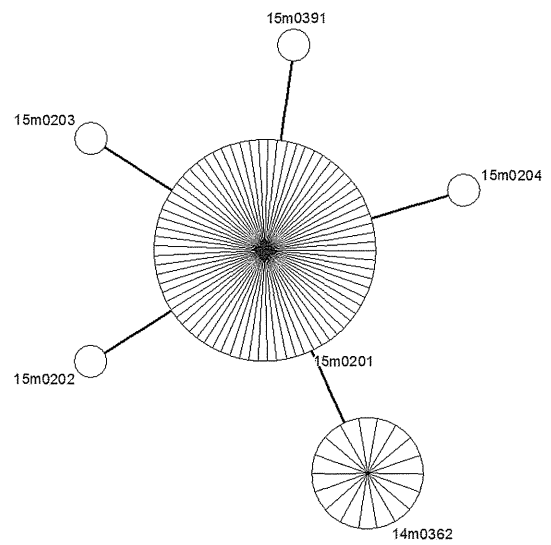
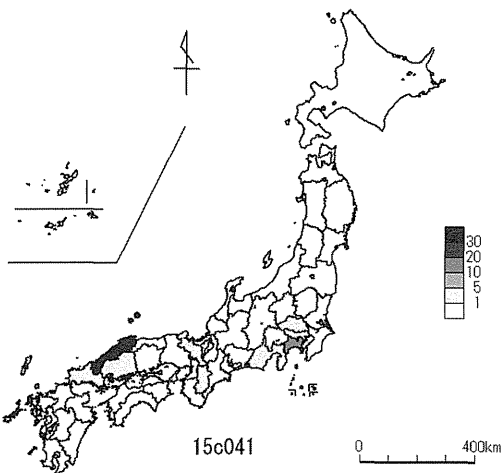
c) 15c010



d) 15c017



e) 15c041



f) 15c025

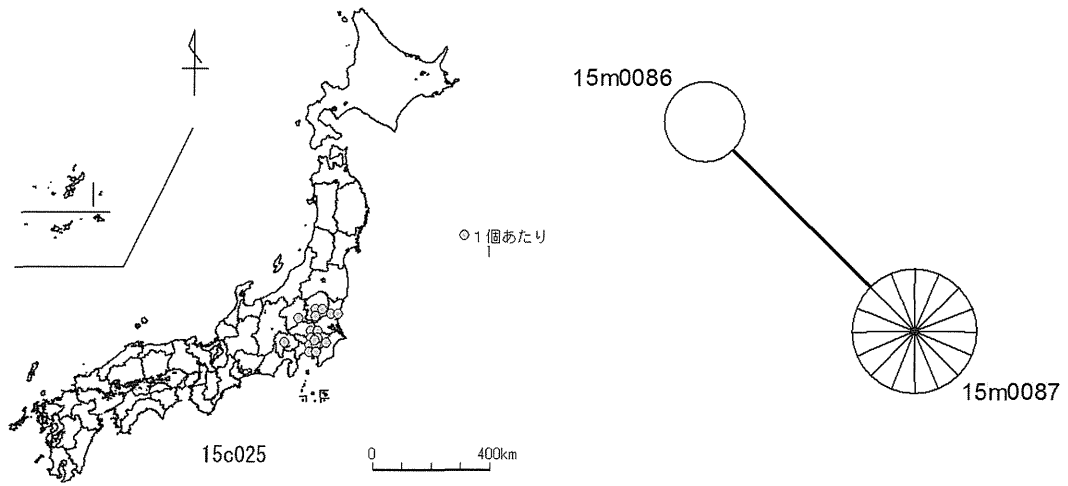
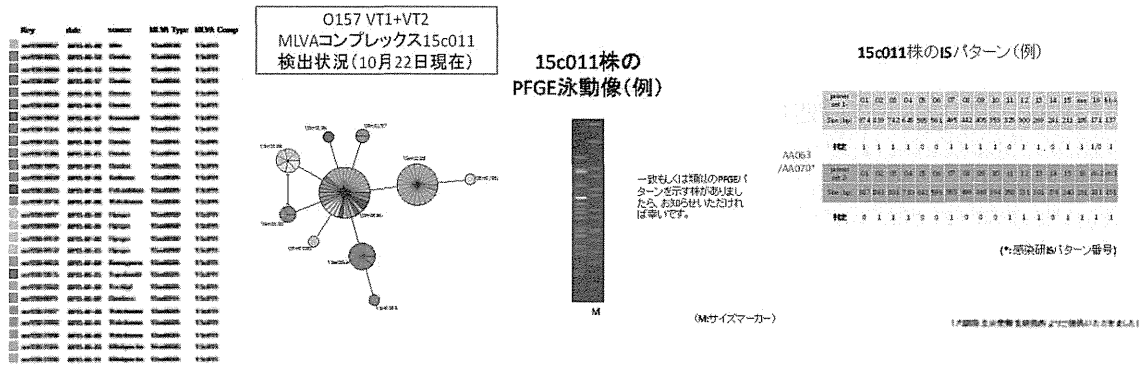


図 2. 広域株パルスネット回覧例 (左: MLVA 情報、中央: PFGE 情報、右: IS-PS 情報)



厚生労働省科学研究費補助金 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業  
「食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究」

(H27-新興行政-一般-002)

研究分担報告書

研究分担者 伊豫田 淳 (国立感染症研究所 細菌第一部)

研究協力者 石原 朋子 (国立感染症研究所 細菌第一部)、  
地方衛生研究所等

研究要旨

2015年に国内で分離された腸管出血性大腸菌 (EHEC) についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析を行い、そのパターンに基づいて各血清群における分離株の動向について調べた。EHEC 0157 の 447 株、026 の 199 株については、それぞれ 274、144 種類のサブタイプが付与された。0157、026、0111 以外の血清群の EHEC のうち、検出頻度の高い血清群として、0103 は 48 種類、0121 は 32 種類、0145 は 19 種類、076 は 6 種類、091 は 18 種類、0146 は 8 種類の PFGE パターンが確認された。これらの PFGE パターンのうち、4 血清群 (05、0103、0121、0146) において、2 ヶ所以上の都道府県で検出された同一 PFGE パターンが 8 種類 (サブタイプ名: TN5L1、TN103i1、TN103L1、TN103L2、TN121k6、TN121k9、TN121L1、TN146k1) 確認された。

A. 研究目的

食品由来の細菌感染症の調査において、患者および食品・食材由来株の解析から得られた科学的データが関係機関内で迅速に共有されることが重要である。感染症研・細菌第一部では、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の分子疫学的解析について、分離数の多い 3 つの血清群 (0157、026、0111) については 2014 年度より multi locus variable tandem repeat analysis (MLVA) 法による解析を優先的に導入しているため、PFGE による解析はその他の 0 群を優先的に実施している。本研究ではパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による解析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

2015年に国立感染症研究所(感染研)に送付された EHEC に対して PFGE 解析を行った。PFGE 解析は Pulsenet International に準拠した方法を用いて実施し、解析結果のデータベース化については BioNumerics (Applied Maths 社) により行った。0157、026、0111 以外の血清群 (non-0157/026/0111) の EHEC については、解析結果を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、電子メールによる全国の地方衛生研究所等 (地衛



研) もしくは事例に関連する地衛研が属するブロックの各地衛研への配信や、食中毒調査支援システム (NESFD) における公開によって情報共有を行った。

## C. 研究結果

### 1. 血清群 0157、026 及び 0111 の EHEC

感染研に送付された 2015 年分離株のうち、血清群 0157、026 及び 0111 については MLVA による解析を優先して実施しているため、一部の菌株 (0157 447 株、026 199 株、0111 68 株) で PFGE 解析を実施した。0157 と 026 については、デンドログラムによるサブタイピング (感染研において継続的に実施しているサブタイプの付与) を行った。0157 株では 274 種類のサブタイプが同定され、うち 227 種類が 2015 年に新規に同定された。026 株では 144 種類のサブタイプが同定された (2016 年 2 月 15 日時点)。

### 2. non-0157/026/0111 の EHEC

感染研に送付された 2015 年分離株のうち、non-0157/026/0111 は 304 株で、血清群は 43 種類であった (2015 年 12 月末時点)。non-0157/026/0111 の血清群は検出頻度の高い順に 0103 (67 株)、0121 (64 株)、0145 (29 株)、076 (24 株)、091 (19 株)、0146 (13 株) であり、これらの菌株の PFGE パターンは、それぞれ 0103 48 種類、0121 32 種類、0145 19 種類、076 6 種類、091 18 種類、0146 8 種類であった (表 1)。0103、0121、0145、0146 の菌株については、2015 年以前に検出された PFGE パターンが 1 種類以上存在したが、non-0157/026/0111 株の多くの PFGE パターンは 2015 年に初めて検出されたパターンであった。各血清群のデンドログラム

においては、集団事例由来株等がクラスターを形成した。

広域で共通 PFGE パターンを示す株 (広域株と呼ぶ) の解析を行った結果、2ヶ所以上の地域 (都道府県) で検出された同一 PFGE 型 (広域 PFGE 型と呼ぶ) は 4 血清群 (05、0103、0121、0146) において 8 種類 (TN5L1、TN103i1、TN103L1、TN103L2、TN121k6、TN121k9、TN121L1、TN146k1) が確認された (表 1-2、図 1-4)。0121 株の広域 PFGE 型 TN121k6 は、2014 年 12 月に複数の地域において検出された PFGE パターンで、2015 年には 1 月および 3 月にそれぞれ異なる地域において検出された (表 2、図 2)。0146 株の広域 PFGE 型 TN146k1 は、2013 年に初めて検出された PFGE パターンで、2014 年には数か月にわたって複数の地域において多数検出されており、2015 年も 9 ヶ月間にわたって 4ヶ所の地域で検出された (表 2、図 3)。また、0121 株の広域 PFGE 型のうち、TN121k9 は 2015 年に 5ヶ所以上の地域で検出され、TN121k9 を示す菌株は 5 月中旬から 1 ヶ月以内の短期間に集中して分離されていた (表 2、図 2)。

### 3. 広域株に関する情報提供

複数の地衛研で共通パターンを示す株について、構成菌株の情報 (検出が確認された地衛研数、菌株数、PFGE パターンの泳動像など) を関係機関に還元し、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て各ブロックの地衛研へ情報提供した。

## D. 考察

0157、026、0111 株については、2014 年度から MLVA を主体とした解析システムが導入され、MLVA の解析結果から関連が

疑われる株など、一部の菌株に限り PFGE 解析が行われている。0157、026、0111 の 2015 年分離株の PFGE 解析結果は、PFGE データベースの継続的な更新と活用により用いられたほか、関係機関と共有可能な情報として、あるいは MLVA の補助的解析として活用された。今後も、同様な解析結果の活用が適切であると考えられる。

non-0157/026/0111 株については、分離頻度の高い血清群 0103 と 0121 で複数の広域 PFGE 型が存在することが明らかとなった。近年、国内外において non-0157 株の分離が増加傾向にあり、今後、当該株の分離増加に伴い non-0157/026/0111 の広域株も増える可能性が示唆される。加えて、これまでは検出頻度が低かった血清群においても広域株が出現する可能性が考えられる。血清群 0146 は、2013 年以前は毎年 5 株前後の分離であったが、2013 年以降は毎年 10 株以上の分離が認められた。2013 年には初めて TN146k1 が検出され、TN146k1 を示す菌株は 2014 年以降の 0146 株の半数ほどを占めた。いずれも散発事例由来株（家族内事例株を含む）であったが、PFGE 解析結果から近縁と推測される 0146 株が近年広域で流行していることが示唆された。血清群 05 は、2015 年以前は毎年 5 株未満の分離であったが、2015 年には 10 株の分離が認められ、そのうち 5 株が広域 PFGE 型 TN5L1 を示した。TN5L1 を示す菌株は、短期間に 1 ブロックに集中して分離されていたが、いずれも散発事例由来株（家族内事例を含む）であり、当該株に関連する感染事例の発生について原因究明には至らなかった。血清群 05 は、国内の多くの地衛研において

実施される O 型別試験法で型別不能な血清群であり、早期に 05 株の国内分離状況を把握することは難しい状況にあった。そのため、TN5L1 が最初に確認された時点において、国内の OUT 株かつ VT 型が一致する菌株を把握することによって疑い事例を抽出し、菌株情報の共有を行った。本事例は、今後、同様の事例が発生した場合のモデルケースになると考えられる。

non-0157/026/0111 の 2015 年分離株においては、8 種類の広域 PFGE 型が検出され、PFGE 解析結果から近縁と推測される non-0157/026/0111 株が広域で分離されている現状が明らかとなった。いずれの広域株も散発事例由来（家族内事例由来を含む）であったが、いくつかは短期間に集中して分離されており、疫学的関連性が推測される。今後、このような PFGE 解析結果が感染源の究明や拡大阻止に寄与することが期待される。

#### E. 結論

現在、感染研では、広域発生事例を迅速に探知するために、MLVA、PFGE 解析法を併用し、各解析法の長所を生かして活用している。事例の早期探知に加え、有益な情報を関連機関と迅速に共有することが重要である。

#### 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

石原朋子、伊豫田淳、泉谷秀昌、大西真  
；最近のEHECの発生動向について 衛生微生物技術協議会第36回研究会、仙台、

2015

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

表 1

血清群	解析株数	PFGE型 の種類	広域PFGE型		
			Type No.	(株数)	血清型及びVT型
O103	67	48	TN103i1	(3)	O103:H2 VT1
			TN103L1	(4)	
			TN103L2	(2)	
O121	64	32	TN121k6	(3)	O121:H19 VT2
			TN121k9	(6)	
			TN121L1	(5)	
O145	29	19			
O76	24	6			
O91	19	18			
O146	13	8	TN146k1	(6)	O146:H21 VT1
O5	10	7	TN5L1	(5)	O5:H- VT1
O165	8	8			
O115	4	3			
O69		1			
O8	各3	2			
O74, O100, O113, O156, O152, O168		各3			
O63, O150	各2	各1			
O9, O84, O128		各2			
O3, O38, O39, O49, O55, O71, O78, O79, O82, O98, O101, O110, O112, O130, O136, O159, O171, O174, O182, O183, O186	各1	各1			
OUT	11				

表 2

血清群	広域 PFGE型	ブロック別菌株数(都道府県数)						総菌株数 (都道府県数)	分離時期
		北海道 東北新潟	関東 甲信静	東海北陸	近畿	中国四国	九州		
O5	TN5L1						5 (2)	5 (2)	5月
	TN103i1			2 (2)		1 (1)		3 (3)	6-7月
O103	TN103L1	1 (1)	3 (1)					4 (2)	7-10月
	TN103L2				1 (1)	1 (1)		2 (2)	5月
	TN121k6	1 (1)	1 (1)		1 (1)			3 (3)	1-3月
O121	TN121k9		1 (1)	1 (1)	4 (3)			6 (5)	5-6月
	TN121L1	1 (1)	3 (1)	1 (1)				5 (3)	6-8月
O146	TN146k1	1 (1)	5 (3)					6 (4)	1-9月

図 1

EHEC O103:2015年分離株 n=67\*

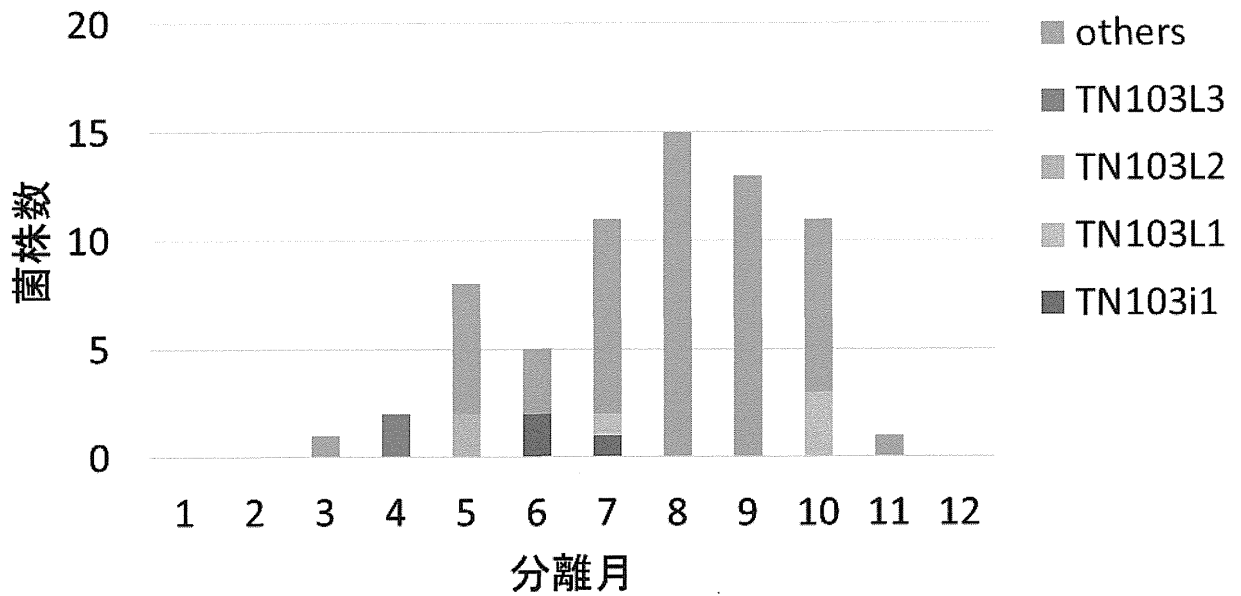
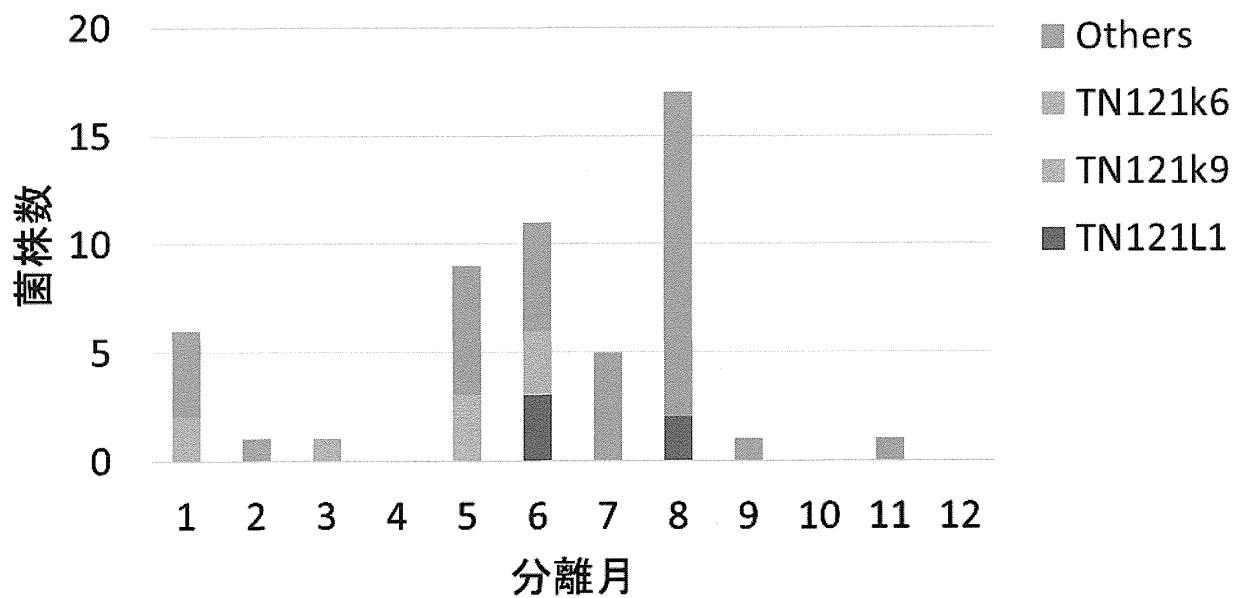


図 2

EHEC O121:2015年分離株 n=64\*



\*分離月不明の分離株を含む

図3 EHEC O146:2015年分離株 n=13\*

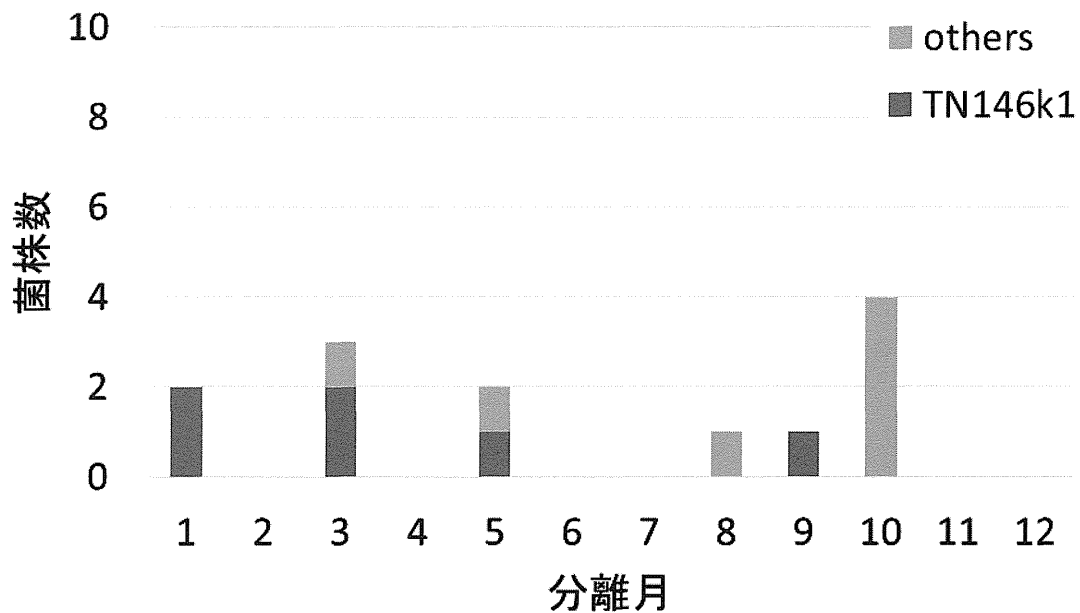
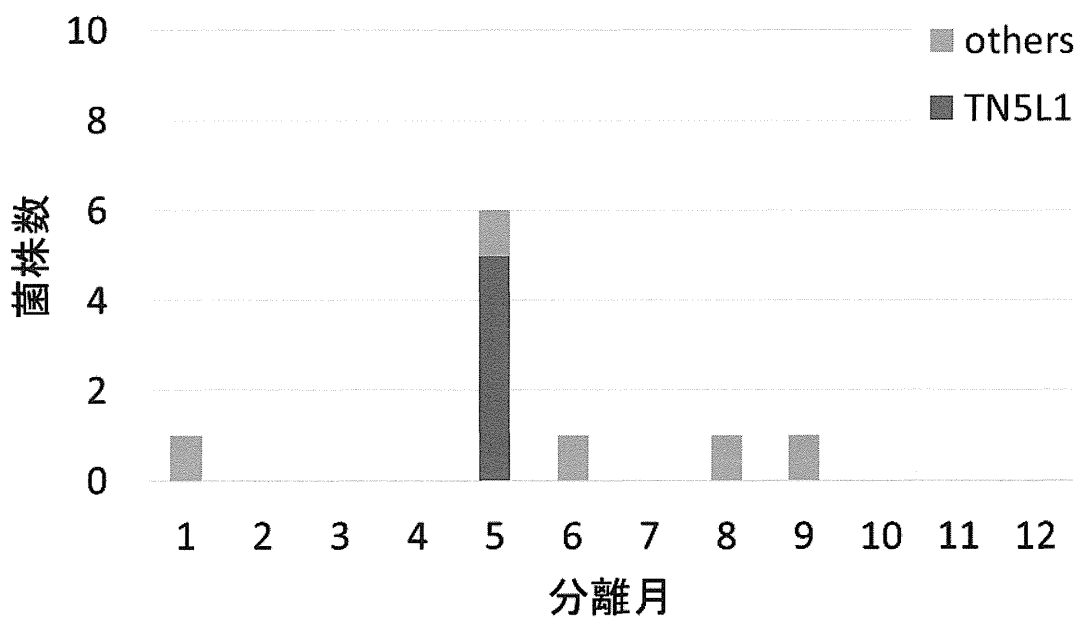


図4 EHEC O5:2015年分離株 n=10\*



\*分離月不明の分離株を含む

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究

平成 27 年度分担研究報告書

研究分担者	熊谷 優子	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
	武沼 浩子	青森県環境保健センター
	今野 貴之	秋田県健康環境センター
	岩渕 香織	岩手県環境保健研究センター
	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
	山田 香織	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
	菊池 綾子	新潟市衛生環境研究所

研究要旨

北海道・東北・新潟ブロック内の分子疫学的解析手法の検査精度向上と病原体情報の共有化システム構築を目的として、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設の参加のもと IS-Printing System の精度管理を実施した。検体としては、平成 27 年度に秋田県で検出された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 4 株を用いた。病原体情報をブロック内で迅速に共有化するための基礎的検討として行い、精度管理時に調査したアンケート結果から各施設の IS-Printing System の検査実施条件設定やエキストラバンドの判断基準など日頃抱えている問題点を集約し、今後の情報共有化システムの構築に向けてブロック内地方衛生研究所における課題を明らかにした。また、秋田県の EHEC 感染症流行期における集団感染のサーベイランスへの IS-Printing System の有用性を検証した。

A. 研究目的

食中毒や感染症の発生時において、原因病原体の検出と感染経路や原因食品の特定を迅速に行う事が、感染拡大の防止に繋がることから行政対応上重要とされ



ている。腸管出血性大腸菌（EHEC）O157の分子疫学解析法として、従来行われてきたパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法に比べ、短時間でデジタルな解析結果が得られる IS-Printing System（東洋紡）の普及により、各地方衛生研究所による検査結果の比較が容易となり、本法は広域食中毒事例においても活用され始めている。しかしながら、北海道・東北・新潟ブロックは全国的にも他の地区ブロックに比べ事例数が少ないこともあり、IS-Printing System の利用が進んでいない。広域事例対応の為にも検査体制の整備が必要と思われる。

検査がキット化され、プロトコールに従って操作すればデジタル化されたデータが出るという簡便さの一方で、検査結果の信頼性には基本操作と精度管理が重要となっている。そこで、北海道・東北・新潟ブロックにおいても今後精度の高い検査結果を情報共有する為のシステム構築に向け、ブロック内における IS-Printing System の精度管理を行った。

また、秋田県においては EHEC 感染症の流行期における EHEC 分離株について IS-Printing System を実施し、同一感染源による集団事例の可能性についてサーベイランスを行った。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

精度管理用菌株として、平成 27 年度に秋田県内で分離された EHEC O157 4 株を用いた（表 1）。試料は、IS-Printing System（東洋紡）の取扱説明書に従い DNA 溶液を作成し、ブロック内の地方衛生研

究所に配布した。

秋田県においては、2015 年 8 月から 9 月までに分離された EHEC O157 10 株について、IS-Printing System による解析を実施した。

### 2. IS-Printing System による解析

各施設で付属の取扱説明書を参照し実施した。結果はエクセルファイルに入力し画像とともに提出を求めた。

### 3. アンケート調査

IS-Printing System の実施条件設定やバンド判定時の注意点など、次の 10 項目についてアンケート調査を行った。

- ・細菌検査担当年数
- ・IS-Printing System 実施経験年数
- ・IS-Printing System 年間実施件数
- ・サンプル調製時の工夫
- ・PCR 反応液の調製
- ・PCR サイクル条件
- ・電気泳動条件
- ・バンド判定時の注意点
- ・ブロック内の情報共有の方法
- ・検査実施後の疑問や他の施設への質問

## C. 研究結果

### I IS-Printing System の精度管理

#### 1. 共通菌株を用いた精度管理結果

IS-Printing System の解析結果は供試菌株 4 株全て、参加した全地方衛生研究所で一一致し、表 2 に示す結果であった。図 1 に参加施設 A~K の電気泳動像を示す。各施設での使用機器等については、表 3 のとおりであった。

#### 2. アンケート調査

検査担当者のうち 3 名は今年度から担当であり、職員の世代交代や配置替えが

頻繁に行われている施設も多いことが明らかになった。4施設が今年度の実施件数0件であり、ブロック内でも実施状況に差があることが分かった。

サンプル調整時の工夫として、DNA量を一定にする為にコロニーを液体培地で増菌している施設があった。

PCRの工程についての各施設の工夫としては、反応液の調製を氷上で行う、検査件数が多い時には半量で行う、*eae*、*hlyA*等のバンドが薄い場合にアニーリング温度を62℃に下げて実施しているなどがあった。

電気泳動の条件については、ゲル濃度やゲルのサイズ、泳動前までゲルとBufferを冷却する、アプライ量を減らす等の工夫が見られた。

バンド判定では、高分子のバンド判定や薄いバンド、明光度があってもエキストラバンドの可能性のあるものなどの判定に苦慮している施設があることが分かった。バンドの出方は菌株によって異なることから、実際の検査時には、これらのバンド判定は共通の認識のもと注意して判定する必要があると考えられる。

ブロック内において広域にわたる事例の情報共有の方法としては、関連施設の担当者レベルの個別メール対応やデータを入力したファイルを担当者のメーリングリストで一斉メールするなど、メール利用を希望する施設が多いが、公文書による遺伝子情報提供依頼が必要な施設もあった。

## II 流行期における EHEC 感染源サーベイランス

秋田県において、2015年8月から9月の2ヵ月間に分離された EHEC O157 10株の解析結果を表4に示す。ISコードが一致したのは、EC16070/EC16077、EC16469/EC16484/EC16488の2組であった。これらの結果は、行政の担当部局に報告し、管轄保健所間で情報共有した。EC16070/EC16077の分離された地域は、隣接した地域であり、共通の感染源が疑われたが疫学調査では共通性を見つめることができなかった。また、EC16469/EC16484/EC16488のうち、EC16469とEC16484は隣接した地域であり、共通の感染源が疑われたが、疫学調査では共通性を見つめることができなかった。

### D. 考察

平成27年度に秋田県内で分離された EHEC O157 菌株4株について IS-Printing Systemの精度管理を行った結果、参加11施設全ての解析結果が一致した。供試菌株は、実際に EHEC 感染事例から分離された株であり、日常的に検査する可能性の高い菌株である。これらの菌株の解析結果が一致したことは、今後、北海道・東北・新潟ブロック内でも IS-Printing Systemの情報を共有することが可能であることを示している。しかしながら、使用機器や泳動条件などには多様性があり、広域事例発生時における情報共有の為に統一した判断基準が必要であると考えられた。

使用機器では、AB Veritiが11施設中5施設と最も多いが、同じ機器でも泳動条件の違い等により泳動写真におけるバンドの鮮明度等には差があるように思われ

た。今後、泳動像が比較的明瞭な施設の手順作業書を他施設でも参照できるようにするなど、結果以外の情報共有の可能性についても検討する必要があると考えられた。

また、解析結果のデータ共有については、施設により希望する情報提供方法が異なることが判明し、今後検討が必要と考えられた。

秋田県において、およそ2ヵ月の間に分離された10株の解析では、2組にISコードの一致がみられた。特に夏季においては、EHEC O157 感染症事例が多発するが、単発事例の場合は感染源が不明となるものがほとんどであり、事例間の関連性を推定することは困難である。今回、ISコードの一致した2組については、その後の疫学調査でも関連性を見いだすことはできなかったが、菌株の中には分離された地域が地理的に隣接している株もあり、共通の感染源があることは否定できないと考えられた。IS-Printing System は事例間の関連の可能性を示すことによりその後の疫学調査に繋げる上で有用と考えられた。ただし、IS-Printing System は PFGE 法や MLVA といった他の分子疫学解析手法に比べ、解析能がやや劣ることも指摘されているため、結果の解釈には疫学調査の結果等も踏まえて、慎重に行う必要があると考えられた。

## E.結論

北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所11施設におけるEHEC O157 4株のIS-Printing Systemの解析結果は全て一致した。IS-Printing Systemは、EHEC O157の感染事例のサーベイランスに有用であり、広域にわたる事例発生時の疫学調査における病原体情報として有用性が高く、今回、北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所11施設においても一定の検査精度が保たれていることが明らかになった。今後さらに解析技術を向上させ、判断の難しいエキストラバンドの判定基準などを統一し、データの活用と情報の共有化システムの構築に向けて、データの集積を継続したい。

## F.健康危機情報

なし

## G.研究発表

なし

表1 精度管理供試菌株

菌株番号	分離年月日	由来	病原遺伝子
1. EC 16469	2015.8.01	散発下痢症患者	VT 1,2 <i>eae</i>
2. EC 16470	2015.8.06	散発下痢症患者	VT 2 <i>eae</i>
3. EC 16473	2015.8.12	無症状保菌者	VT 2 <i>eae</i>
4. EC 16494	2015.8.27	散発下痢症患者	VT 1,2 <i>eae</i>

表2 精度管理供試菌株の IS-Printing System 結果

1st set

	1-01	1-02	1-03	1-04	1-05	1-06	1-07	1-08	1-09	1-10	1-11	1-12	1-13	1-14	1-15	<i>eae</i>	1-16	<i>hlyA</i>
No.1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
No.2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
No.3	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
No.4	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

2nd set

	2-01	2-02	2-03	2-04	2-05	2-06	2-07	2-08	2-09	2-10	2-11	2-12	2-13	2-14	2-15	2-16	<i>stx2</i>	<i>stx1</i>
No.1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
No.2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
No.3	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
No.4	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1

表3 各施設使用 PCR 装置及び泳動条件

NO	施設名	使用PCR装置名	泳動時間	備考
1	A	AB Veriti 96-Well	105分	
2	B	TaKaRa TP600	27分	QIAxcel typeS使用
3	C	AB Veriti	1st:210分 2nd:140分	
4	D	AB Veriti	120分	
5	E	AB 9600	80分	
6	F	BIO-RAD My Cyclor	65分	
7	G	AB 2720	約120分	
8	H	BIO-RAD PTC-0220	100分	
9	I	Bio-RAD iCyclor	50分	
10	J	AB Veriti	120分	100V
11	K	AB Veriti 96-Well (Veriti200)	76分30秒	