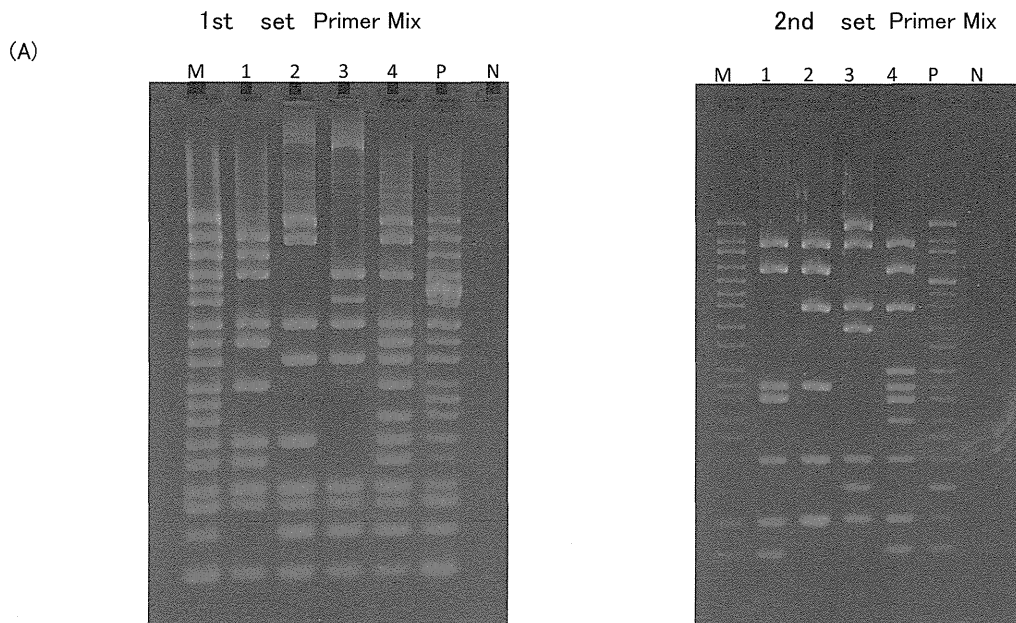


表4 秋田県における EHEC O157 集団感染サーベイランスの結果

分離日	菌株No.	分離地域	ISコード	
			1st set	2nd set
8/1	EC16469	a	0-1-1-1-0-0-1-1-0-1-0-0-1-1-1-1-0-1	0-1-0-1-0-0-0-0-0-0-1-1-0-0-1-0-1-1
8/6	EC16470	b	1-1-0-0-0-0-1-0-1-0-0-0-1-0-1-1-1-1	0-1-0-1-0-0-1-0-0-0-1-0-0-0-1-0-1-0
8/12	EC16473	a	0-0-0-1-0-1-1-0-1-0-0-0-0-0-1-1-1-1	1-1-0-0-0-0-1-1-0-0-0-0-0-0-1-1-1-0
8/17	EC16477	c	1-1-0-0-0-0-1-0-1-0-0-0-1-0-1-1-1-1	0-1-0-1-0-0-1-0-0-0-1-0-0-0-1-0-1-0
8/21	EC16484	d	0-1-1-1-0-0-1-1-0-1-0-0-1-1-1-1-0-1	0-1-0-1-0-0-0-0-0-0-1-1-0-0-1-0-1-1
8/26	EC16488	b	0-1-1-1-0-0-1-1-0-1-0-0-1-1-1-1-0-1	0-1-0-1-0-0-0-0-0-0-1-1-0-0-1-0-1-1
8/27	EC16494	a	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
9/8	EC16506	e	1-0-0-1-0-0-1-1-1-1-0-0-1-1-1-1-1-1	0-1-1-0-0-0-1-0-0-1-1-1-0-0-1-1-1-1
9/25	EC16513	a	1-1-0-0-0-0-1-0-1-0-0-1-1-0-1-1-1-1	0-1-0-1-0-0-1-0-0-0-1-1-0-0-1-0-1-0
9/29	EC16519	a	1-1-1-0-0-0-1-1-1-1-0-1-1-1-1-1-1-1	0-0-1-1-0-0-1-0-0-0-1-1-1-0-1-1-1-1

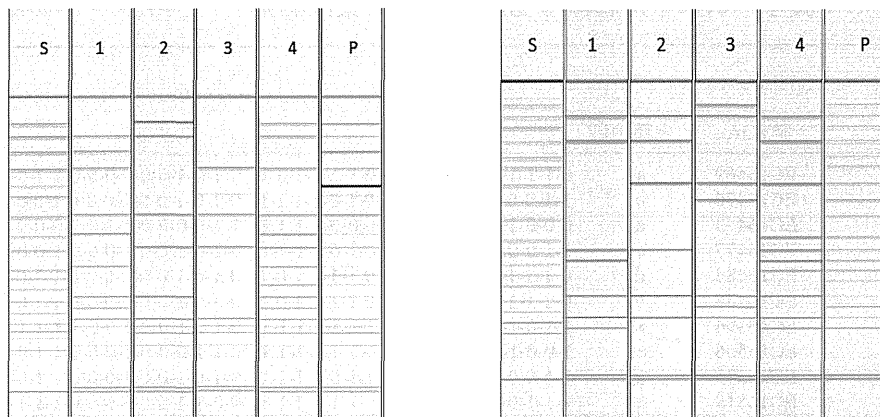
図 1 各施設の IS-Printing System による 精度管理結果

(A)~(K): 実施施設電気泳動像

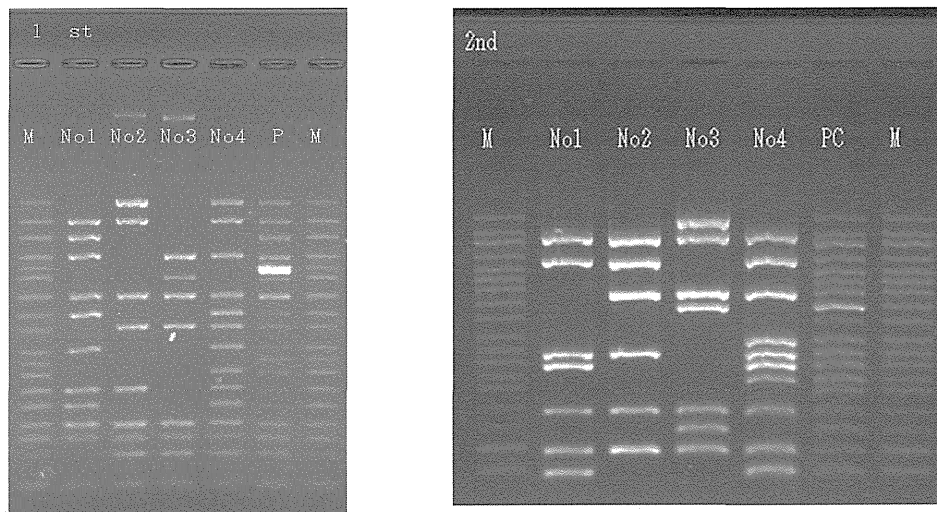


レーン 1: EC16469
 レーン 2: EC16470
 レーン 3: EC16473
 レーン 4: EC16494

(B)



(C)



(D)

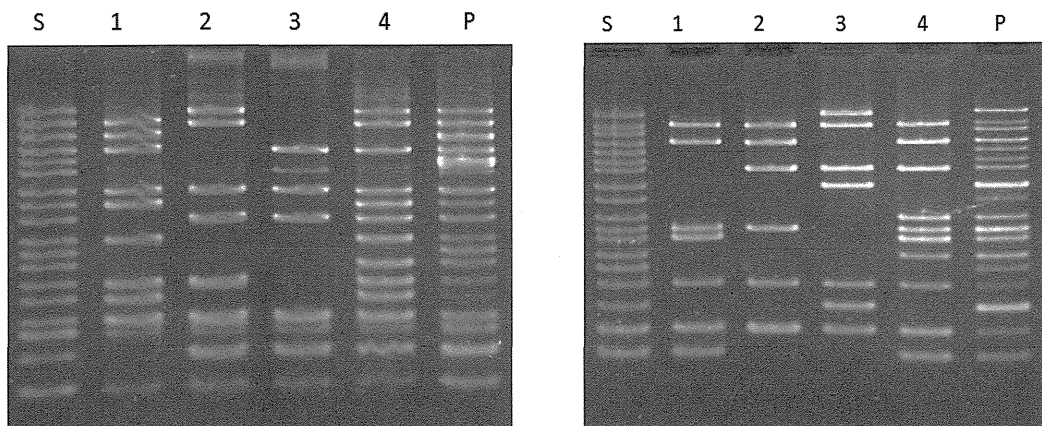
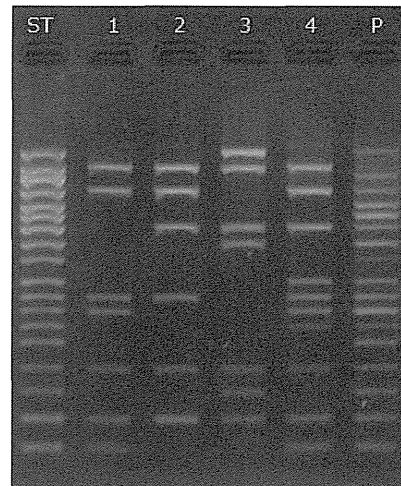
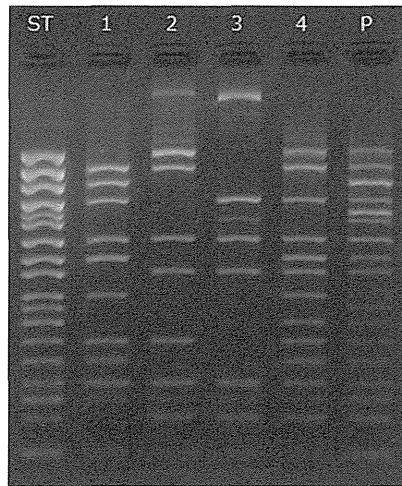


図 1 続き

(E)



(F)

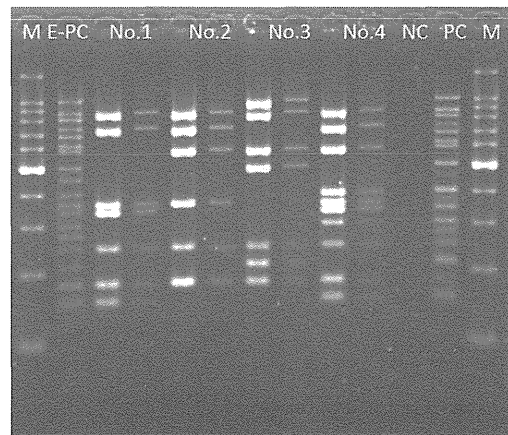
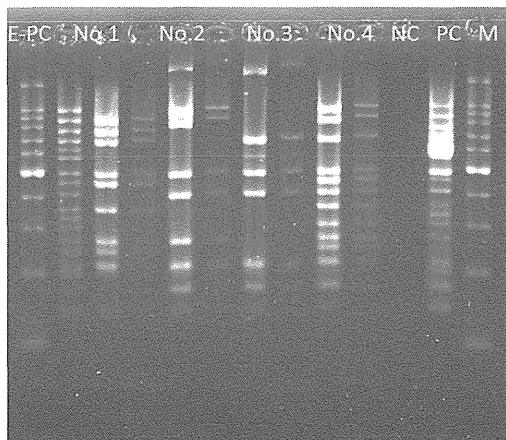
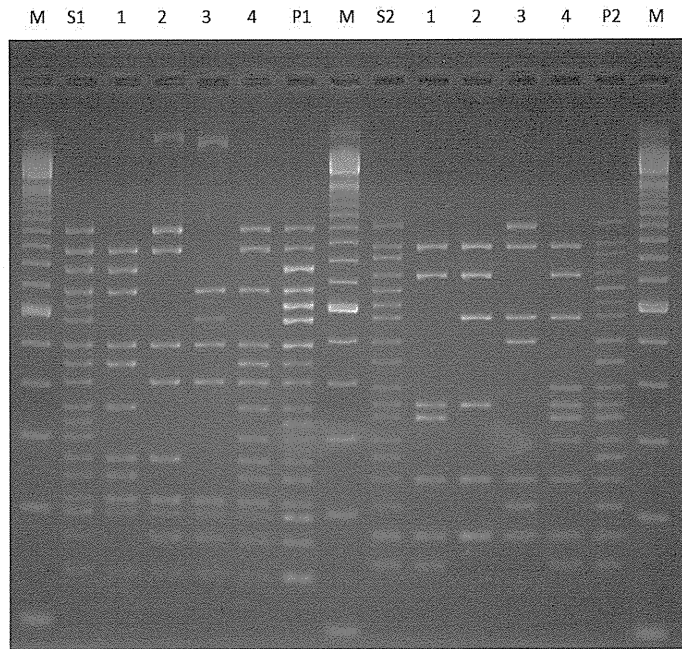


図 1 続き

レーン 1: EC16469
レーン 2: EC16470
レーン 3: EC16473
レーン 4: EC16494

(G)



(H)

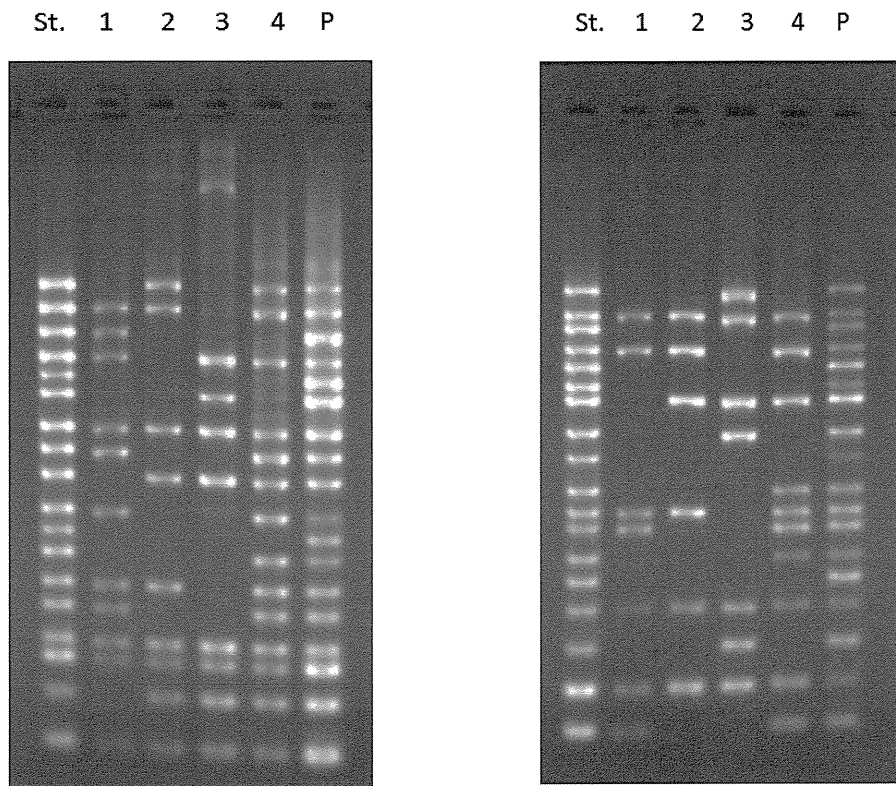


图 1 続き

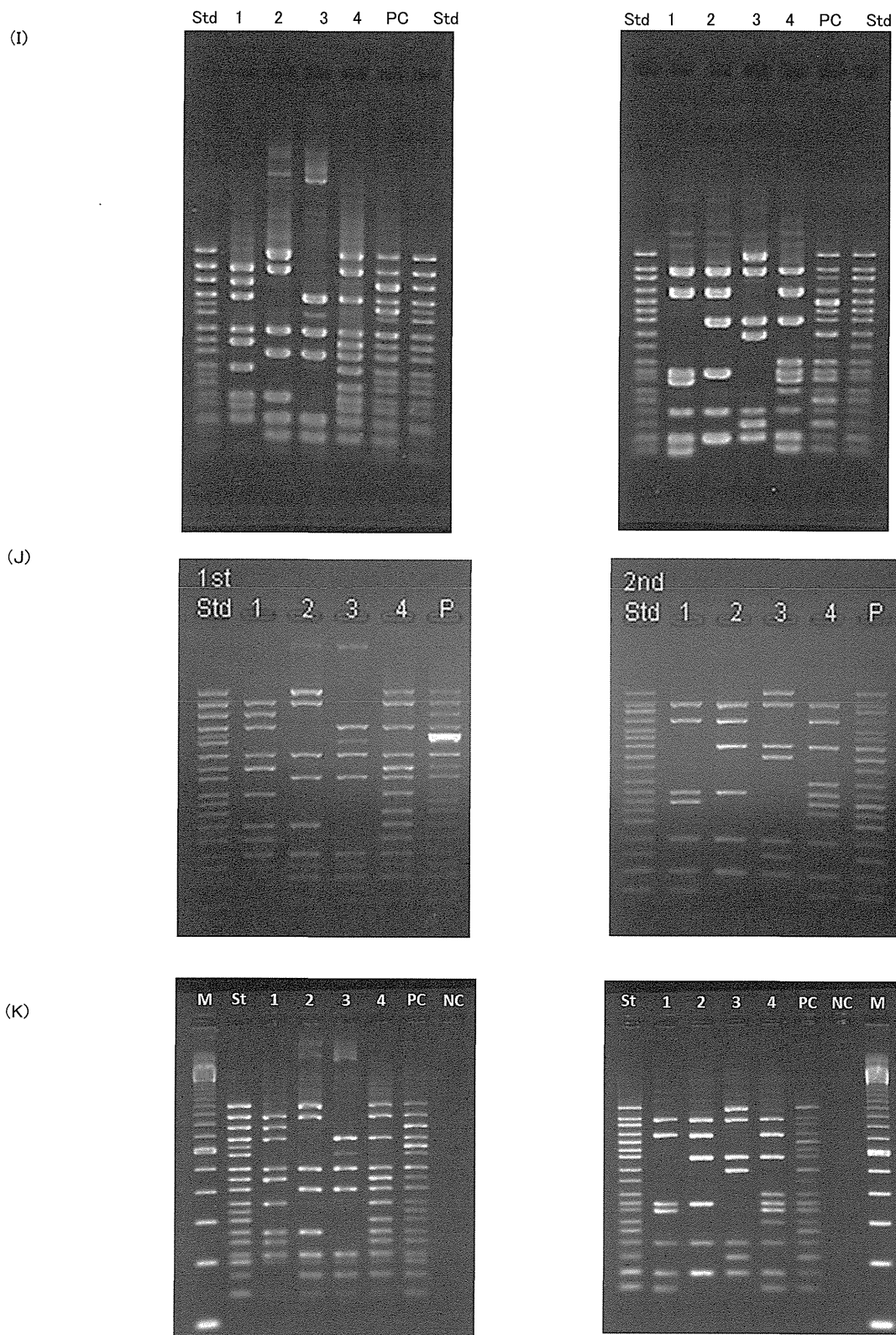


図 1 続き

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

関東ブロックにおける腸管出血性大腸菌の疫学解析及び共有化システムの構築に
関する研究

研究分担者	東京都健康安全研究センター	甲斐 明美
研究協力者	茨城県衛生研究所	山城 彩花
	栃木県保健環境センター	桐谷 礼子
	群馬県衛生環境研究所	松井 重憲
	埼玉県衛生研究所	倉園 貴至
	千葉県衛生研究所	平井晋一郎
	神奈川県衛生研究所	古川 一郎
	横浜市衛生研究所	松本 裕子
	山梨県衛生環境研究所	植松 香星
	長野県環境保全研究所	関口 真紀
	静岡県環境衛生科学研究所	松橋 平太
	東京都健康安全研究センター	小西 典子, 尾畑 浩魅, 平井 昭彦

研究要旨:2015年に東京都で分離された O157 の 233 株について PFGE 解析を行った結果、86 パターンに分類された。また PFGE 解析を実施した 230 株について IS 解析を実施した結果、75 パターンに分類された。いずれも、ほぼ同等の型別能であることが確認された。

IS 法による解析は、マルチプレックス PCR 法を用いた解析であるため、バンドの有無を判定しやすい写真を撮影することが重要である。そこで、判定しやすい泳動条件について検討した結果、分子量マーカーの先端がアガロースゲルの下から 2 cm の位置まで泳動することで判定しやすい写真が得られることが判明した。

共通菌株を用いた精度管理は、PFGE 法、IS 法いずれも良好な成績を得ることができた。しかし、一部の施設で染色が薄く判定が困難である写真があった。

各地研では PFGE 法や IS 法による解析が行政に活用された事例を数多く経験した。パルスネットを通じた情報共有は、食中毒・感染症の早期解明に繋がるものと考えられた。

A. 研究目的

食品媒介感染症が発生した時に最も重要なことは、感染源・感染経路の早期解明と感染拡大防止である。特に腸管出血性大腸

菌やサルモネラによる食中毒では散在的集団発生 (Diffuse Outbreak) が問題となることが多いことから、特に重要である。感染経路や原因食品を特定するためには、患

者や調理従事者、食品等から分離された病原体の詳細な解析が必要である。腸管出血性大腸菌の解析には、PFGE 法や近年開発された IS-printing System (IS) 法等が用いられている。異なる施設で解析した結果を相互に比較するためには、どの施設においても一定レベル以上の解析レベルになっていることが必須である。そこで各地研の技術向上と技術水準の均一化を目的として、共通菌株を用いた精度管理を実施した。また、IS 法でバンドの有無を判定しやすい電気泳動像を得るための検討を行った。

B. 研究方法

1. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の PFGE 法による解析

1) 供試菌株

2015 年に東京都で分離された O157 の 233 株、O26 の 49 株を供試した。

2) PFGE 解析

国立感染症研究所プロトコールにより実施した。

アガロースゲルの作製：0.7mm プラグキヤスターを使用し、Seakem Gold Agarose (Lonza, 1%) で作製した。

DNA 抽出法：Proteinase K (1mg/ml), 1%N-lauroylsarcosine-0.5M EDTA (pH8.0) で 50°C, 18~20 時間行なった。

制限酵素処理：制限酵素 *Xba* I (30U/ブロック) で 37°C, 4 時間処理した。

電気泳動用アガロース：電気泳動用アガロースは、Seakem Gold Agarose (1%) を使用した。

泳動条件：6V/cm, 2.2~54.2 sec, 20~22 時間, buffer 温度 12°C で行なった。泳動時間は、泳動後のバンドの先端がゲルの

下から 1.0 cm~1.5 cm になるように調整した。サイズマーカー：*S. Braenderup* H9812 株を *Xba* I で消化したのを用い、泳動用アガロースに入れた。

3) PFGE 型別方法

O157 については電気泳動後、100kb 以上のバンドを対象として目視で型別を行った。T-1501~T-1540 まで大まかな型別を行い、更にバンドが数本異なるものには亜型 (a~p) をつけた。同様に O26 については T-2615-1~T-2615-25 まで型別を行った。

2. EHEC O157 株を対象とした IS-printing System 法による解析

1) 供試菌株

2015 年に東京都内で分離され、PFGE 解析を実施した O157 株のうち 230 株について実施した。

2) IS 法マニュアル作製のための検討

PCR 後の電気泳動結果の判定において、バンドの有無を判定しやすい写真を得ることを目的として、泳動条件の検討を行った。具体的には、泳動時間、泳動温度、分子量マーカーの位置等について検討した。

3. 共通菌株を用いた精度管理の実施

1) 供試菌株

関東ブロック 11 施設に共通菌株として 2015 年に分離された O157 の 5 株を送付した (表 1)。

2) PFGE 法による解析

各施設で実施している方法で PFGE 解析を行い、写真を東京都健康安全研究センターに電送してもらい解析を行った。

3) IS-printing System 法を用いた解析

各施設で IS 法を実施し、結果はバンドが

認められた場合を「1」、バンドが認められない場合は「0」と記入し、東京都健康安全研究センターに送付してもらった。

4. 遺伝子解析の実施状況に関するアンケート

分離菌株の疫学解析に用いられている方法のうち、現在、最も汎用されている PFGE 法、IS 法および今後の採用が検討されている MLVA 法について、各地研での実施状況を把握する目的で、アンケート調査を実施した。

5. EHEC 食中毒・感染症の発生状況と分離菌株の分子疫学解析の活用事例

東京都で発生した EHEC 食中毒・感染症発生状況をまとめ、PFGE 解析成績が行政に活用された事例についてまとめた。

C. 研究結果

1. EHEC の PFGE 法による解析

2015 年に分離された O157 の 233 株について PFGE 解析を行った結果、100kb 以上のバンドを対象とした分類で 40 パターン、バンド 1 本違いを含めると 86 パターンに分類された。東京都健康安全研究センターの型別番号 T-1506 および T-1505 はバンド 1 から数本違いの株が多く、亜型として型別を行った（写真 1）。これらは同じ集団事例由来株ではなく、それぞれ散発事例として分離されたものであった。O26 の 49 株は 25 パターンに分類された。

2. IS-printing System 解析

1) 2015 年東京都分離株の解析成績

2015 年に分離された O157 株のうち 230

株について IS 法で解析した結果、75 パターンに分類された。10 株以上で同じ IS 型を示したのは 5 パターンであった。最も多く分離された A タイプ（30 株）について PFGE 型との比較を行った結果、27 株は同じ PFGE 型に分類され、3 株は異なるタイプであった。

2) マニュアル作製のための検討

電気泳動後、バンドの有無が判定しやすい写真を得るための検討を行った。すなわち、IS 法は 1 つのプライマーセットで最大 18 本のバンドが得られるマルチプレックス PCR 法である。このためバンドとバンドの間隔が狭いと非常に判定し難く、誤りが生じてしまう。そこでバンドとバンドの間隔をできるだけ広げるための条件を検討した。まず、通常の泳動用アガロースゲルよりも泳動距離が長い（約 10 cm）アガロースを使用し、50V・50 分→100V・50 分と泳動条件を変えて行った。その結果、これまでの方法（100V・90 分）と比較して差が認められなかった。次に 135V・120 分と長めの泳動を行ったが、分子量の大きいバンドでは間隔があまり広くならず、低分子量のバンドが薄くなってしまふことから、判定は困難であった。そこで、通常の大さの泳動用アガロース（約 6 cm）を用い、電気泳動時間ではなく、分子量マーカーの位置を基準にする方法に変更した。その結果、分子量マーカーとして TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen) を用い、キシレンシアノール（青色色素）の位置がアガロースの下から約 2 cm のところで泳動を終了すると、バンドの間隔が開き、判定しやすい写真が得られることが判明した。

3. 共通株を用いた精度管理の実施

1) PFGE 解析

関東ブロック 10 施設で共通菌株について PFGE 解析を実施した。いずれの施設もシャープなバンドが得られており、バンドの分離も良好であった（写真 1）。しかし染色が薄いと思われる写真（施設 5, 7）もあった。

2) IS 法による解析

関東ブロック 11 施設で共通菌株について IS 法による解析を実施した。11 施設で実施した IS 結果は、ほぼ一致していた。しかし「Primer set 1」の *hly* 遺伝子が検出できていない施設が 1 施設あった。また、「Primer set 2」の *stx1* を陽性とした 1 施設があった。

菌株 No.1 では約 2000bp の位置にエキストラバンドが認められるが、エキストラバンドについての記載があったところは 6 施設であった。

4. 遺伝子解析の実施状況に関するアンケート

関東ブロック 11 施設を対象にアンケートを実施した結果、PFGE 法と IS 法は、全ての施設で実施していた（表 2）。「年間、どの程度行っているか？」との質問では、PFGE 法と IS 法については、分離あるいは搬入された全ての菌株について実施すると答えた施設が 6 施設（54.5%）、一部の株について実施していると答えたのは 5 施設（45.5%）であった。実施の頻度については、「菌株がたまり次第実施」、「MLVA で一致した O157 菌株」、「O157 以外の EHEC 菌株」について実施しているが各 1 施設であった。IS 法についても「菌株がたまり次

第実施」「散発事例が集中した時に実施」との回答が各 1 施設あった。

MLVA 法は、11 施設中 4 施設（36.4%）で実施していると回答し、全株実施が 2 施設、一部の株について実施が 2 施設であった。「試行的に実施している」あるいは「導入を試みたが、他の検査との兼ね合いでしばらくは難しい」という意見があった。

5. EHEC 食中毒・感染症の発生状況と菌株の分子疫学解析活用事例

1) EHEC 食中毒・感染症の発生状況

2015 年に東京都内の病院あるいは医療機関で分離され、保健所を通じて搬入されたヒト由来 EHEC は 311 株であった。搬入状況をみると、6 月から 9 月前半までの 3 か月間に 239 株（76.8%）が搬入されていた。

血清群ごとに分離数をみると、O157 が 225 株（72.3%）、O26 が 44 株（14.1%）、以下 O111、O121 等 10 種類の血清群が認められた（表 3）。

2) 分子疫学解析が行政に活用された事例

各地研では、PFGE 解析および IS 法による解析が、行政処分に活用された事例を多数経験した。その 1 例（事例 1）の概要を別紙にまとめた。

EHEC O26 の多くの株は VT1 単独産生株であるが、2015 年 11 月～12 月に O26（VT1+VT2）で同一 PFGE パターンを示す複数株が分離された。感染研とも情報交換、菌株の送付等を行った結果、MLVA でも同一パターンを示す株が埼玉県や相模原市でも検出されていることが判明した。しかし、感染源を明らかにすることはできなかった。この事例の概要を事例 2 として別

紙に記載した。

D. 考察

2015年に東京都で分離された O157 の 233 株について PFGE 解析を行った結果、86 パターンに分類された。また、PFGE 解析を行った O157 のうち 230 株について IS 法での解析を実施した結果、75 パターンに分類された。このことから、PFGE 解析法の型別能の方がやや高いものの、IS 法もほぼ同等の型別能であることが確認された。IS 法で最も多く型別された A タイプは 30 株あったが、このうち 27 株は同じ PFGE 型であった。3 株は異なる PFGE 型であったが、いずれも主流なタイプに非常に近いパターンであった。30 株中 13 株は同じ集団事例由来株であり、1 株は PFGE 型でバンドが 1 本異なっていたが、その他は PFGE 型、IS 型共に一致していた。今後更に PFGE 型と IS 型について比較する必要はあると思われるが、IS 法の迅速性等の利点を生かしながら、PFGE 解析と IS 法の 2 手法を組み合わせれば、より詳細な解析が可能になると考えられた。

自治体間をまたぐ **Diffuse outbreak** が発生した際、迅速に菌株の交換を行い解析できればよいが、分離施設からの菌株搬入が遅れ、更に分与申請等の事務処理に時間がかかる場合がある。このような場合は、各施設で実施した分子疫学解析結果を電送し比較することが有効である。

異なる施設で解析した結果を、相互に比較するためには、いずれの施設でも一定以上の解析レベルになっていることが必須である。そこで、共通菌株を用いた PFGE 法の精度管理を継続的に実施してきた。今回

は 2015 年に分離された O157 のうち、IS 法でエキストラバンドが少なく、判定しやすい株を選択した。

PFGE 解析は、ほとんどの施設で分離が良く、シャープなバンドが得られていた。目視による方法であれば、十分に比較できる写真であった。しかし、染色が薄く判定しにくい写真も認められた。

IS 法による解析では、2 施設を除き、全て同じ成績になった。1 施設では、Primer set 1 の *hly* 遺伝子を陰性（本来は陽性）とした株が 2 株あった。また他の 1 施設では、Primer set 2 の *stx1* を陽性（本来は陰性）としていた。今後、その原因について確認する予定である。

主な解析法である PFGE 法、IS 法および MLVA 法の実施状況についてのアンケート調査を実施した。PFGE 法および IS 法は全ての施設で実施していた。しかし MLVA 法は 4 施設 (36.4%) のみで、実施していない施設の方が多かった。実施していない理由として「他の検査との兼ね合いで難しい」という意見があった。人員が減少されていく中で、新しい事を検討する余裕がないのも一因である。

IS 法はマルチプレックス PCR 法を用いた解析であるため、バンドの有無を判定しやすい写真を撮影することが最も重要である。そこで各バンドとバンドの間隔が十分に開いている泳動条件を検討した。通常の泳動用アガロースよりも長いアガロースを用い、泳動条件を変えて行ったが、判定しやすい写真を得ることはできなかった。検討の結果、TrackIt™ 100bp DNA Ladder (Invitrogen) を用い、キシレンシアノール (青色色素) の位置がアガロースの下か

ら約 2 cm のところで泳動を終了すると、バンドの間隔が開き、判定しやすい写真が得られることが判明した。

各施設では、PFGE および IS 法による解析が行政に有効に活用された事例を数多く経験した。パルスネットを通じた情報共有は、食中毒・感染症の早期解明、拡大防止に繋がるものと考えられる。

E. 結論

2015 年に東京都で分離された O157 233 株について PFGE 解析を行った結果、86 パターンに分類された。PFGE 解析を実施した 230 株について IS 解析を実施した結果、75 パターンに分類された。いずれも、ほぼ同等の型別能であることが確認された。

IS 法による解析は、マルチプレックス PCR 法を用いた解析であるため、バンドの有無を判定しやすい写真を撮影することが重要である。そこで、判定しやすい泳動条件について検討した結果、分子量マーカーの先端がアガロースゲルの下から 2 cm の位置まで泳動することで判定しやすい写真が得られることが判明した。

共通菌株を用いた精度管理は、PFGE 法、IS 法いずれもほぼ良好な成績を得ることができた。

また、各地研では PFGE 法や IS 法による解析が行政に活用された事例を数多く経験した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 市川健介, 小西典子, 甲斐明美他: 生サ

ラダが原因と推定されたチフス菌による食中毒事例—東京都, 病原微生物検出情報(国立感染症研究所), 36, 162-163, 2015.

2) 関口真紀, 笠原ひとみ, 粕尾しず子, 中沢春幸: 知的障害者施設においてインフルエンザウイルスおよび肺炎球菌による重複感染が認められた集団事例, 第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会, 2016 年 2 月, 静岡県

3) 松下明子, 倉園貴至, 砂押克彦, 青木敦子: 2015 年に発生した腸管出血性大腸菌 O26 について, 第 28 回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会, 2016 年 2 月, 静岡県

表1. 共通供試菌株(2015年分離株)

No.	菌株No.	血清型	毒素型
1	EH5083	O157:H7	VT2
2	EH5135	O157:H7	VT1+VT2
3	EH5193	O157:H7	VT2
4	EH5216	O157:H7	VT1+VT2
5	EH5244	O157:H7	VT1+VT2

写真1. 東京都型別番号T-1506およびT-1505型のPFGE写真

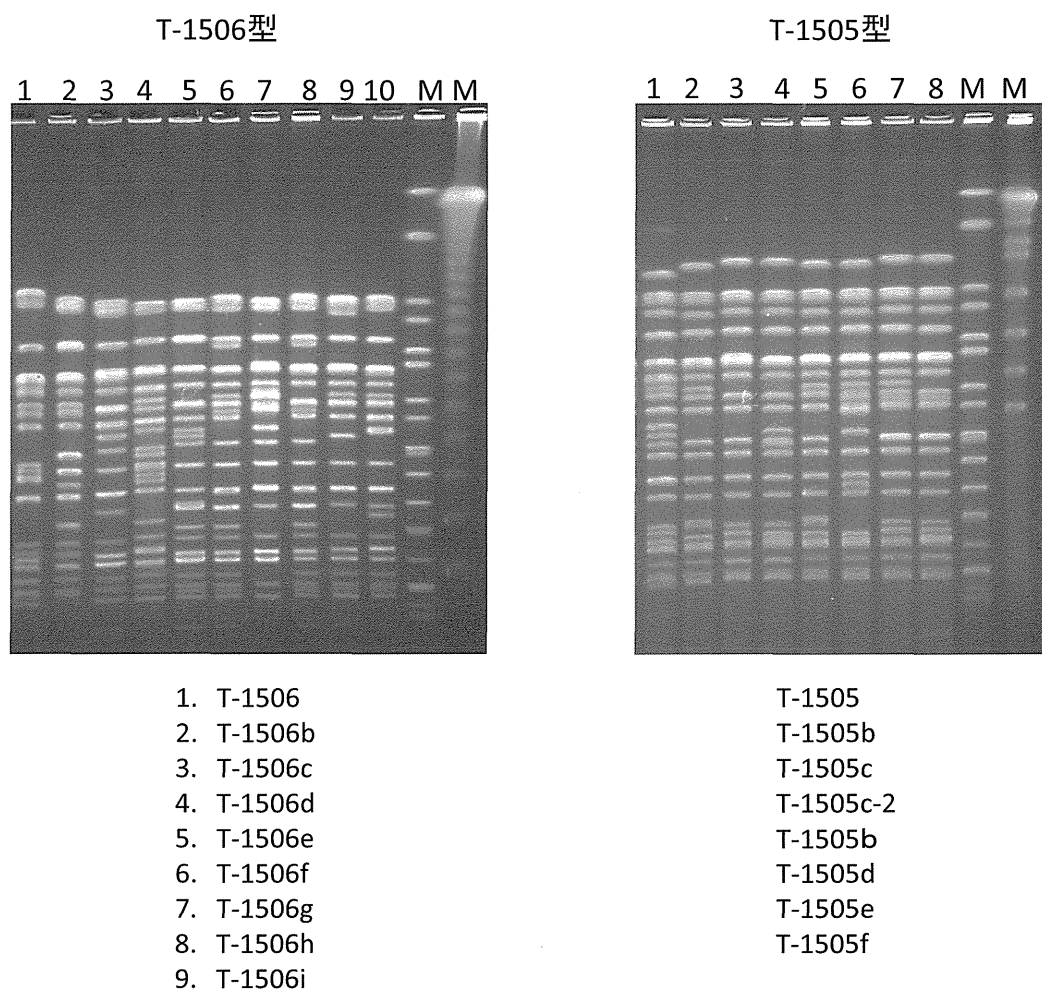


写真2. 共通菌株5株を用いて各施設で実施したPFGE解析画像

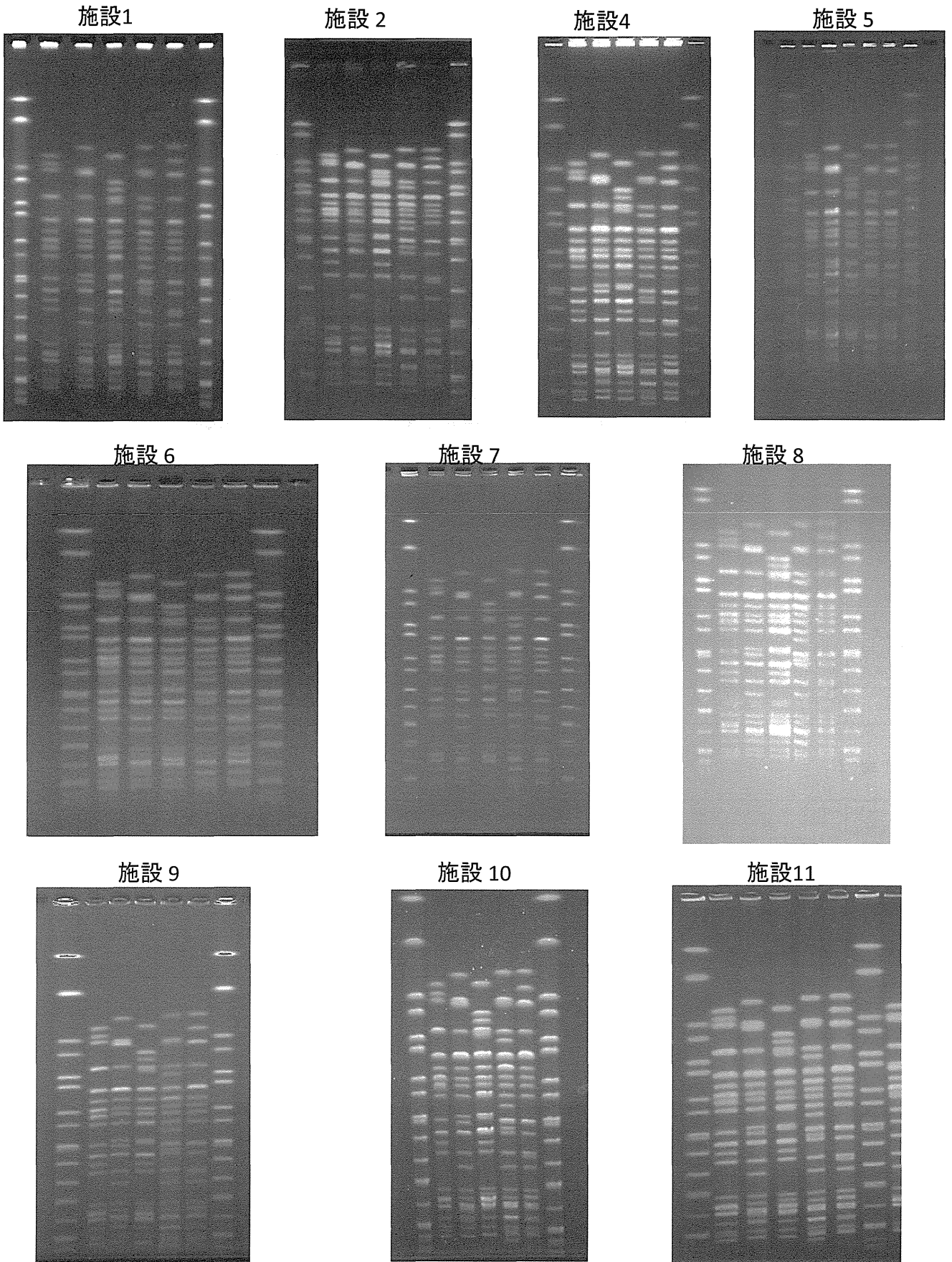
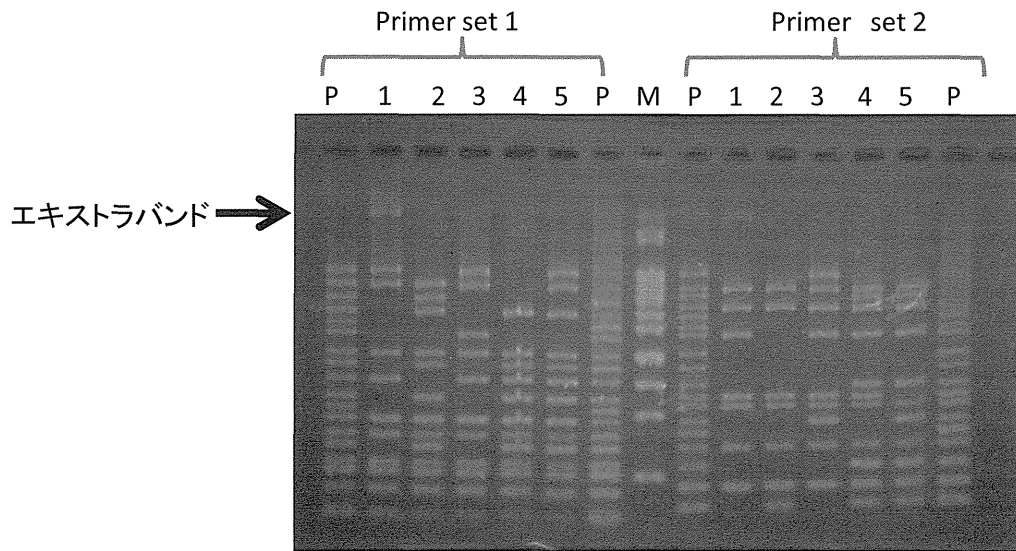


写真3. 共通菌株5株のIS 解析結果



Primer set 1

No.	Primer No. 菌株No. Size(bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	備考 非特異バンド
		1-01 974	1-02 839	1-03 742	1-04 645	1-05 595	1-06 561	1-07 495	1-08 442	1-09 405	1-10 353	1-11 325	1-12 300	1-13 269	1-14 241	1-15 211	eae 185	1-16 171	hly 137	
1	No.1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1500bp
2	No.2	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
3	No.3	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
4	No.4	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
5	No.5	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	

Primer set 2

No.	Primer No. 菌株No. Size(bp)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	備考 非特異バンド
		2-01 987	2-02 861	2-03 801	2-04 710	2-05 642	2-06 599	2-07 555	2-08 499	2-09 449	2-10 394	2-11 358	2-12 331	2-13 301	2-14 278	2-15 240	2-16 211	stx2 181	stx1 151	
1	No.1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
2	No.2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	
3	No.3	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	
4	No.4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
5	No.5	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	

表2. 疫学的遺伝子解析の実施状況(アンケート結果)

方法	施設数		
	実施(%)	全株(%)	一部の株(%)
PFGE法	11 (100)	6 (54.5)	5 (45.5)
IS法	11 (100)	6 (54.5)	5 (45.5)
MLVA法	4 (36.4)	2 (18.2)	2 (18.2)

対象:11施設

表3. ヒト由来腸管出血性大腸菌の血清群と毒素型(2015年, 東京都)

血清群	菌株数(%)	産生毒素		
		VT1+VT2	VT1	VT2
O157	225 (72.3)	123	11	91
O26	44 (14.1)	8	36	
O111	9 (2.9)	7		2
O121	6 (1.9)			6
O145	6 (1.9)	1		5
O91	4 (1.3)	1	3	
O103	2 (0.6)		2	
O166	2 (0.6)			2
O159	1 (0.3)	1		
O165	1 (0.3)	1		
OUT	11 (3.5)	1	3	7
合計	311 (100)	143 (46.0%)	55 (17.7%)	113 (36.3%)

事例1. 焼肉店を原因とした食中毒事例(2015年6月, 東京都)

喫食日 : 2015年6月24日
喫食者数 : 31名(2グループ)
患者数 : 17名(入院患者4名)
原因施設 : 焼肉店(バイキング形式)
原因食品 : 焼肉店での食事
原因菌 : 腸管出血性大腸菌O157:H7(VT2産生)

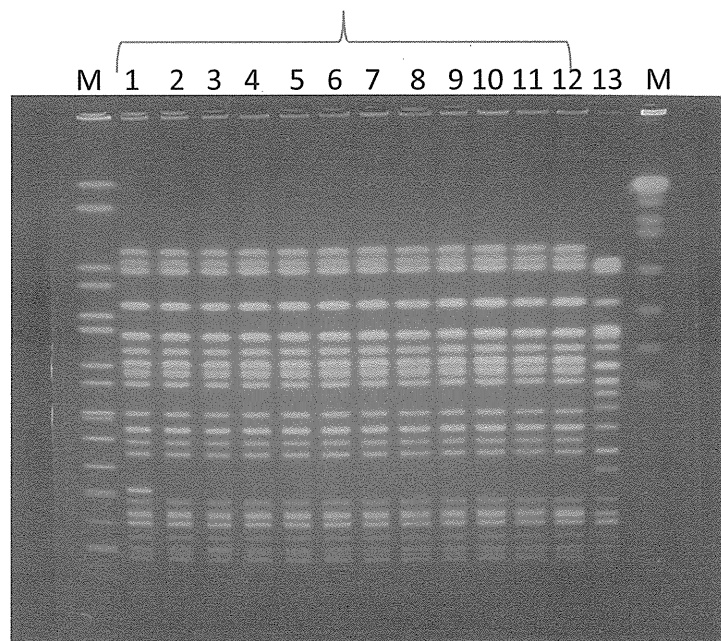
探知:

7月3日(金)都内N保健所に医療機関からEHEC O157の発生届が出された(グループ1)。
7月6日(月)F保健所にもEHEC O157の発生届が出された(グループ2)。
両事例の共通性について調査を実施したところ, 6月24日にバイキング形式の焼肉店を利用していたことが判明した。

感染源調査:

食品3検体	}	腸管出血性大腸菌O157検出
拭き取り14検体		
患者糞便15検体		
調理従事者糞便12検体		
		患者9名
		調理従事者1名

食中毒事例由来株



1. 患者(グループ1)T-1509-2
- 2~11. 患者(グループ1)T-1509
12. 患者(グループ2)T-1509
13. 散発事例T-1506b

事例2. O26による広域散発疑い事例について(2015年)

12月4日 千葉県衛研から情報提供

11月後半からO26(VT1+VT2)が検出されている。

EHEC発生が少ない時期に、珍しいO26(VT1+VT2)が2事例発生したことから食品等を介した広域散発事例の可能性も疑っている。

東京都では、12月に1株分離のみ。

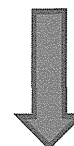
12月11日 東京都でも3事例の報告が入ったことから千葉県衛研へ連絡。

12月20日～22日 千葉県とPFGE写真を電送して比較した結果、非常に似ているパターンであることが判明。

12月25日 感染研に菌株送付

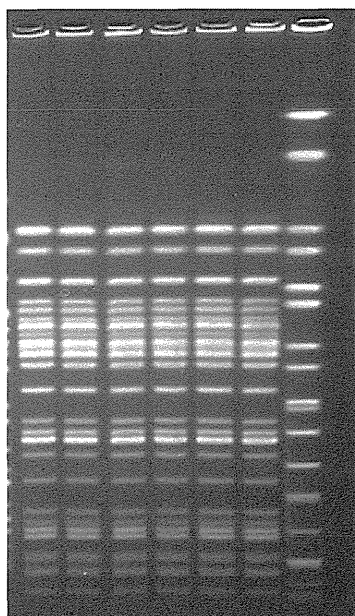
感染研MLVAの結果: MLVA Type 15m2154

12月に入ってから埼玉県でも4株分離



疫学解析状況を行政側に報告

O26(VT1+2)のPFGEパターン



O26(VT1+VT2)の分離状況(2015年, 東京都)

No	菌株搬入日	血清型	備考	PFGE型*
1	9/4	O26:H11	子供	2615-19
2	9/8	O26:NM		2615-19-2
3	10/23	O26:NM	高齢者	2615-19-2
4	12/4	O26:H11		2615-21
5	12/8	O26:H11	子供	2615-21
6	12/11	O26:H11	子供	2615-21
7	12/15	O26:H11	幼稚園児	2615-21
8	12/16	O26:H11	幼稚園児	2615-21

* 東京都健康安全センターの型別番号

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

研究分担報告書

研究分担 東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所及び衛生試験所）による IS printing System
等活用状況調査および情報共有に関する研究

主任研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所
研究分担者 鈴木匡弘 愛知県衛生研究所
研究協力者 松本昌門 愛知県衛生研究所
山田和弘 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
北川恵美子 石川県保健環境センター
東方美保 福井県衛生研究所
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
野田万希子 岐阜県保健環境研究所
田中保知 岐阜市衛生試験所
永井佑樹 三重県保健環境研究所
山本新也 豊橋市保健所衛生試験所
中根邦彦 岡崎市総合検査センター
多和田光紀 豊田市衛生試験所

研究要旨

東海・北陸地方 11 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研）において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

1. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE 及び IS-printing は outbreak 発生時の分子疫学解析として実施されている。従って IS-printing によるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVA については一部の地研が実施しているにとどまり、MLVA による地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

過半数の地研で非特異バンドの誤判定または hly の増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いた IS-printing の情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は死亡に至ることもある腸管感染細菌として、公衆衛生上対策を必要とする主要な病原体の一つである。EHEC はいわゆる食中毒の原因菌であると共に、食品を介した diffuse outbreak 例も報告されている。diffuse outbreak は散発事例に紛れることが多く、発見が困難であるため、対策には迅速な分子疫学解析と、情報共有が重要となる。東海・北陸地方では従来情報共有が十分ではなく、diffuse outbreak の把握に問題があった。かつて分子疫学解析手法がパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) に限られていた時は、分子疫学情報を共有するためには、複雑な PFGE パターンの比較を行う必要があり、迅速な情報共有は事実上不可能であった。しかし近年 PCR による EHEC 0157 の分子疫学手法として IS-printing system 及び代表的な血清型の分子疫学解析手法として multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) が登場し、迅速性に加えデータベース化しやすい環境が整ってきた。そこで本研究では東海・北陸地方 11 施設 (地方衛生研究所、及び衛生試験所、以下各地研) において、1. 分子疫学解析法として PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況調査、2. IS-printing 精度管理、3. 地域共有データベース構築を行い、分子疫学解析の解析精度を高めると共に、地域間でのスムーズな情報共有により、diffuse outbreak などの公衆衛生上の脅威を迅速に把握するシステムの構築を目指す。

B. 研究方法

1. 分子疫学解析の実施状況調査

各地研に PFGE、IS-printing system、MLVA の実施状況をアンケート調査した。調査項目としては実施の有無および実施頻度とした。

2. IS-printing 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 3 株からカラム精製した DNA (10 ng/ μ L) を送付し、解析結果を送付してもらった。その際、解析に使用したサーマルサイクラー、電気泳動装置、アガロース、電気泳動条件についての調査を行った。なお、送付した 3 検体のうち、検体番号 ①については 1-02 と 1-03 の間、及び 1-15 より

やや大きい位置に非特異バンドが検出される株であった (図 1)。

3. 地域共有データベース

各地研におけるデータ登録及びデータ閲覧の利便性を考慮し、クラウドデータベースサービスである kintone (サイボウズ、東京) を利用した IS-printing の情報共有システム構築を行った。登録情報としては施設名称、菌株の分離年月日、IS-printing の結果、及びその他の項目として非特異バンドを入力可能とした。データ登録は各地研が Excel ファイルに入力したデータを一括登録することとした (図 2A-F)。登録したデータは直ちに反映され、各ユーザーが確認可能となる。また、IS-printing の遺伝子型は視認性向上のため、8 桁毎に 10 進法に変換したコード番号を付与した。

C. 研究結果

1. 分子疫学解析の実施状況調査

各地研における分子疫学解析の実施状況を表 1 に示す。PFGE については保健所で検査を実施している一地研を除き、全ての地研が outbreak 発生時のみ実施としていた。IS-printing については一地研を除き全ての地研が全て又は outbreak のみ実施すると回答していた。一方、MLVA は 2 施設が全株を解析していたが、他の 9 施設は実施しないと回答した。

2. IS-printing 精度管理

各地研における IS-printing system の解析結果は表 2 のとおりである。Set2 については全ての地研が正しい結果であった。一方 set1 については 3 地研のみ正しい回答が得られ、残る 7 地研については何らかの間違いが見られた。間違いの原因としては 1-02 と 1-03 の間の非特異バンドを 1-03 (+) と報告した地研が 3 カ所、hly を (-) と報告した地研が 4 カ所あった。hly を (-) と報告した地研においてもキット付属の std は全てのバンドがはっきりと確認できた。

各地研における使用機器を表 3 に示す。各地研で様々なサーマルサイクラーが使われていた。電気泳動装置については Mupid ブランドのミニゲル電気泳動装置が多かったが、一部バイオラドの Sub cell GT を使用している地研も見られ

た。アガロースについては添付文書どおりとした地研が7カ所と最も多かった。

3. 地域共有データベース

データベースの運用は平成27年10月1日から開始した。運用に当たっては各地研におけるセキュリティポリシーの確認作業が必要となる場合があり、地研によって運用開始まで日数を要することがあった。平成28年2月8日現在、4カ所の地研から39株のEHEC O157のIS-printing情報が登録されている。データベースに登録された39株は18種類のIS-printing型に分かれた。そのうち、6種類のIS-printing型では複数県からの分離が見られた。

D. 考察

1. 分子疫学解析の実施状況調査

検査を実施していない地研を除き、全ての地研でPFGEとIS-printingは実施可能であった。しかし、その多くはoutbreak発生時のみの検査であり、diffuse outbreak対応するには日頃からデータを蓄積する必要があることから、各地研の協力が重要となる。一方MLVAについては、実施している施設は2施設のみであり、地域内での情報共有は困難である。MLVAデータについては今後も感染症研究所経由での情報共有が続くとみられる。

2. IS-printing 精度管理

非特異増幅が見られる菌株で、誤判定が頻発する実態が明らかとなった。誤判定した施設の多くは電気泳動に問題があり、電気泳動のガイドラインを提示する必要があると考えられた。非特異バンドの誤判定を防ぐには、非特異バンドが出現しやすい位置に関する情報提供が必要である。また今回hlyのバンドが薄く、“-”判定とした施設が多くあった。Hlyについては従来から増幅が悪いことがあるといわれていたが、PCR環境の違いや、試薬のロット間差による増幅効率の違いに加え、精度管理用DNA調製に問題がないか総合的に判断する必要があると考えられた。

3. 地域共有データベース

運用が10月以降と、EHECシーズン終盤以降のスタートとなったことから、今年度について

は試用版として位置づけられた。データベースには必要最小限度のデータしか登録しないこととしたため、セキュリティポリシー上の問題は無いと考えている。しかし、データを登録したのは4地研にとどまっており、今後、地区の集まりを利用して説明会を開くなど、利用法について啓蒙する必要があると考えられた。クラウドデータベースによる情報共有は、データ登録さえすれば、瞬時にデータ共有でき、管理者の負担が少ないことから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

E. 結論

1. 分子疫学解析の実施状況調査

PFGE及びIS-printingはoutbreak発生時の分子疫学解析として実施されている。従ってIS-printingによるデータ共有は可能と考えられる。しかし、MLVAについては一部の地研が実施しているにとどまり、MLVAによる地域データベース作成は困難である。

2. IS-printing 精度管理

過半数の地研で非特異バンドの誤判定またはhlyの増幅不良が見られた。安定した結果が得られるよう、情報提供などが必要である。

3. 地域共有データベース

クラウド型データベースを用いたIS-printingの情報共有を試みた。データベースの活用法など啓蒙活動が必要である。

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. 山田和弘、鈴木匡弘、松本昌門ら 志賀毒素産生性大腸菌PCR-based ORF Typing (STEC-POT)法の開発 第19回腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症研究会 平成27年7月9日~10日 東京都