

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）

平成28年度 分担研究報告書

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
	高橋 洋平	青森県環境保健センター
	武差 愛美	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、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 IS-Printing System についてブロック内の地方衛生研究所 11 施設の精度管理を実施した。さらに、ブロック内での情報共有化システム構築の基礎的検討として、各県で分離された菌株の IS-Printing System のデータを集積し発生パターンを調査した。また、平成28年度は冷凍メンチカツを原因食品とする食中毒が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。その際、IS-Printing System による解析が、関係機関との情報共有に有用であったので報告する。

A. 研究目的

近年、広域的に流通する食品による食中毒の発生や全国規模の感染症の流行があり、地方においても感染経路や原因食品の特定のために病原体の検索を迅速に

行う事が求められている。

特に、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の分子疫学的解析法の一つである IS-Printing System は迅速性に優れ、従来の方法に比べ短時間で解析結果（IS コード）が得られるため、各地で食中毒等の事例対応の検査に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。広域に食中毒患者等が発生した際の事例対応においては、感染経路や原因食品を特定するためには、近隣の自治体との情報共有が重要であることから、北海道・東北・新潟ブロックで IS コードを共有化するシステムを構築するため、各施設の精度管理と IS コードを集積し、実際に広域な患者発生がみられた可能性のある菌株の有無を調査した。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

1) 供試菌株

平成 28 年度に秋田県内で分離された腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 菌株 4 株を共通解析菌株とし、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 11 施設（当センターを含む）に配布した。（表 1）

2) IS-Printing System による解析

各施設で付属の取扱説明書に従い実施した（ただし、使用機器や電気泳動条件は施設の状況により異なる）。

3) エキストラバンドの確認

1st set 1-12 バンドの確認のため、キット説明書記載の 1-12 用プライマーを用いた single PCR によりバンド検出を行った。酵素は Ex-taq（TaKaRa Bio）を用いた。反応条件は、94°C2 分、94°C30 秒・55°C30 秒・72°C30 秒 30 サイクル、72°C2 分で行った。

2. 広域患者発生菌株の探索

北海道・東北・新潟ブロックの各施設から 5 株程度の IS コードを集約し、同一の IS コードを示す菌株を探索した。

3. 食中毒事例の情報共有

冷凍メンチカツを原因食品とする広域食中毒事例の際、国立感染症研究所と隣県において検査データを共有した。

C. 研究結果

1. 共通菌株を用いた精度管理

供試菌株 4 株中 3 株の結果は 11 施設中全ての施設で一致した。菌株 No. 3 については、1st set 1-12 の判定結果が施設間で異なり、8 施設が（+）、3 施設が（-）とした。各施設の解析画像を図 1 に示す。施設間での使用機器や電気泳動条件の違い等（表 3）によって解析画像は若干異なっており、それが判定結果に影響したと考えられた。

1-12 付近のバンドが本来想定しているプライマーに由来しているかどうかの確認のため Single PCR を行ったところ、No. 3 の菌株では遺伝子増幅が認められなかった。そのため、菌株 No.3 の解析画像にある 1-12 付近のバンドはエキストラバンドと考えられた。（図 2）

2. 広域患者発生菌株の探索

ブロック内の各施設から計 49 株の解析結果が集まった。その内、施設内で同一 IS コードを示した菌株を除いた 44 株の解析結果を比較した。44 株中 24 株が他の施設に同一 IS コードを示す菌株が存在し、IS コードは 10 パターンに分類された。(表 4) この内、2 施設一致が 7 パターン、3 施設一致が 2 パターン、4 施設一致が 1 パターンとなった。

3. 食中毒事例への試行例

平成 28 年 10 月に秋田県内の医療機関から検査依頼のあった菌株が EHEC O157 VT2 と同定された。結果が判明した時点で、患者が溶血性尿毒症症候群を発症していたこともあり、すでに患者は隣県の中核市の医療機関へと転院となっており、感染症法による患者発生報告届も隣県に提出された。

隣県でも患者から菌が検出されており、その菌株を国立感染症研究所にて multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) による解析を行った。その結果、静岡県沼津市で製造された冷凍メンチカツを原因食品とする食中毒事例との関連が示唆された。秋田県で分離された菌株についても IS-Printing System による解析を行ったところ、当該事例の菌株と同一の IS コードであることが判明し、これらの解析結果を行政担当部局に情報提供した。その後の疫学的調査から、患者が利用している社会福祉施設において冷凍メンチカツの喫食歴があることが判明し、当該食中毒の患者であることが確認された。また、患者の利用していた社会福祉施設では、患者を含め 12 名がメンチカツを喫

食していたが、他に感染者は確認されなかった。当該食中毒では、原因食品が広域に流通していたことから、最終的に全国で 40 人以上の患者が発生した。

近年、個人情報保護の観点から自治体間の患者情報のやり取りは難しくなっているが、菌株の解析データの共有化は、感染経路や原因食品の特定に有用であることが改めて示された。

D. 考察

IS-Printing System の精度管理は、前年度の検討では、すべての施設で解析結果が一致していたが、平成 28 年度は 4 株中 1 株において 1-12 付近のエキストラバンドを 8 施設が (+) と判定した。解析画像をみると、いずれの施設の解析結果においてもこのバンドの照度は他のバンドとそれほど大きな差はなく、バンド位置もコントロールと差がない場合もあり、解析条件によってはエキストラバンドと判定するのは困難であった。各施設の検査精度向上のため、精度の高かった施設の解析条件等をブロック内で共有し、各施設の実情に合った条件の検討等が必要と考えられる。また、今後の解析結果の情報共有化の為には、明確な判定基準の設定に加え、エキストラバンドが存在している場合には、他の施設では判定が異なっている可能性を考慮し、IS コードのみでなくエキストラバンドの情報についても共有化することが必要と思われる。

ブロック内の各施設で分離された菌株の一部について広域患者発生の可能性がある菌株を探索したところ、複数の菌株

で IS コードの一致が見られた。今回の検討では、その他の患者情報等は収集していないため事例間の関連性は不明であるが、今後情報共有化システムが構築された際には、広域な患者発生を伴う食中毒や感染症の早期探知に IS-Printing System は有用と考えられた。実際、広域に患者発生した冷凍メンチカツの事例では、IS-Printing System や MLVA の分子疫学解析の情報的一致により、早期に秋田県内の患者が当該事例の患者である可能性を考慮することができた。

本研究の成果を踏まえ、今後のブロック内での情報共有化システムの構築に向けては、さらなる検査精度の向上を図る必要があると考えられる。

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 IS-Printing System の解析結果は、1-12 付近に出現したエキストラバンドについて判定で分かれた。IS-Printing System は、広域にわたる事例発生時の病原体情報としては迅速性と有用性が高いことから、今後も精度管理で検査技術の精度を保ち、データの集積を継続する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 EHEC O157 供試菌株

菌株番号	分離年月日	由来	病原遺伝子
1. EC 16645	2016.6.27	散発下痢症患者	VT 2 <i>eae</i>
2 EC 16670	2016.7.28	無症状保菌者	VT 1,2 <i>eae</i>
3 EC 16673	2016.8.6	無症状保菌者	VT 2 <i>eae</i>
4 EC 16689	2016.8.25	無症状保菌者	VT 1,2 <i>eae</i>

表 2 精度管理供試菌株の IS-Printing 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	1-16	1-17	1-18
No.1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
No.2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
No.3	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	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	2-17	2-18
No.1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
No.2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
No.3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0
No.4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1

表 3 各施設使用 PCR 装置及び検査条件

施設	使用機器	テンプレート	泳動時間	備考	1st set 1-12判定
A	AB Veriti 96-well	1 µl	70分	96-well	+
B	TaKaRa TP600	1 µl	27分	QIAxcel type S	-
C	AB Veriti	1 µl	55~60分		+
D	AB Veriti 200	1 µl	105分	50V5分 100V100分	-
E	AB 9600	1 µl	80分		-
F	BioRad MyCycler	1 µl	75分	3%NuSieveGTGagarose	+
G	AB 2720	1 µl	120分		+
H	BioRad PTC-0220	1 µl	90分		+
I	BioRad iCycler	1 µl	60分		+
J	AB Veriti	1 µl	150分		+
K	AB Veriti 200	1 µl	85分30秒	96-well	+

図1 続き

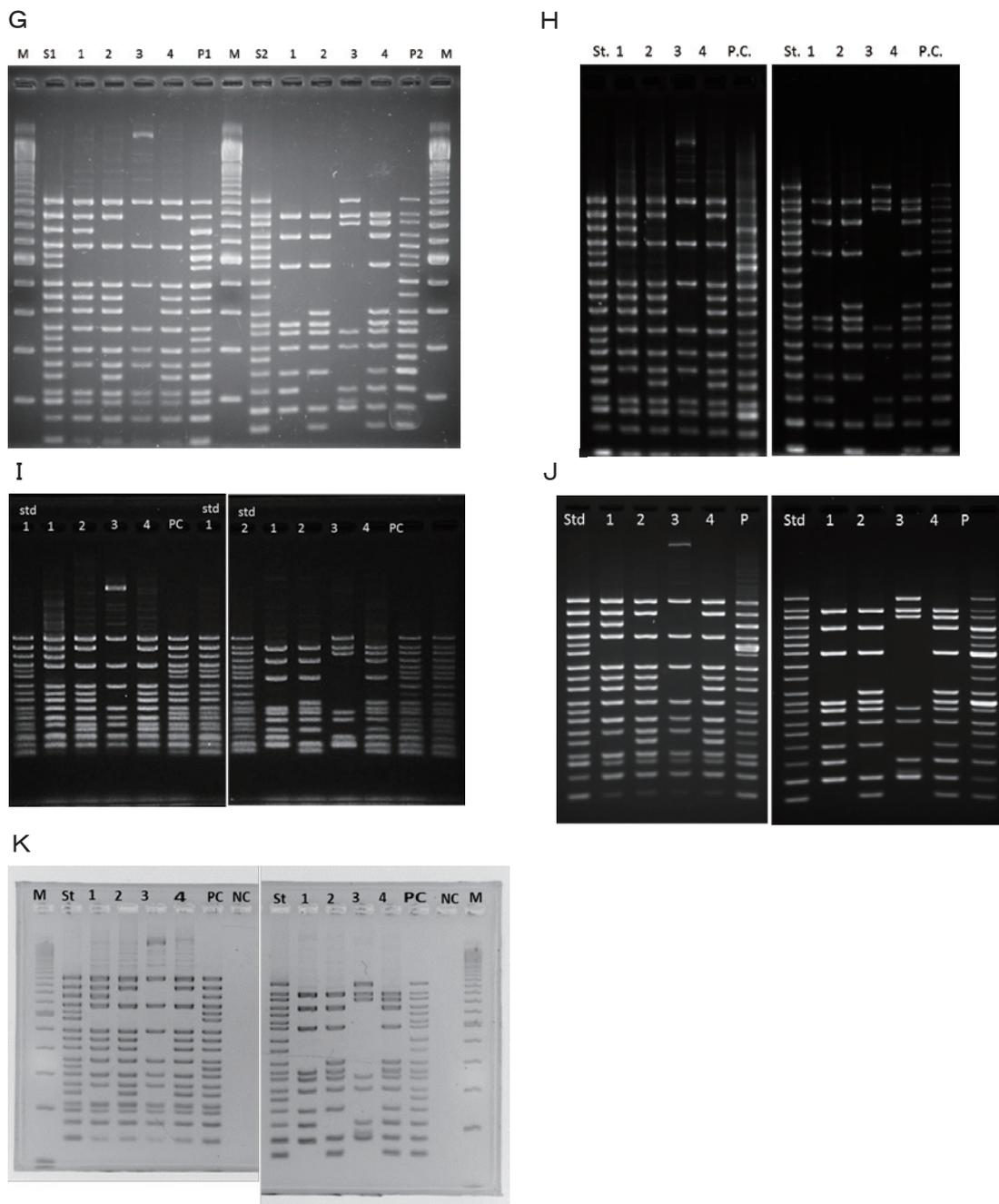


図1 各施設の IS-Printing System による電気泳動画像

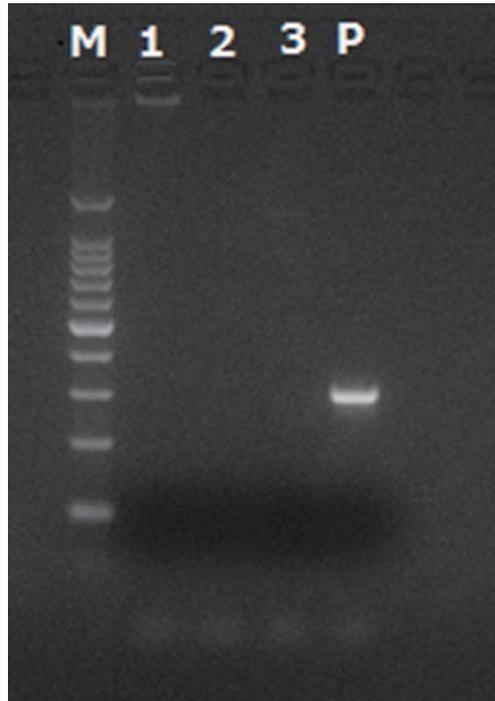


図2 エキストラバンド疑い確認のための single PCR.

レーン1：菌株 No.3 配布 DNA, レーン2：切り出し精製した No.3 1-12 疑いバンド,
レーン3：菌株 No.3 再調整 DNA, レーンP：菌株 No.2 配布 DNA.

表4 北海道・東北・新潟ブロック内他県と一致株 10 パターン

1st set

No.	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	eae	1-16	hlyA
1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
3	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
5	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
6	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
7	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

2nd set

No.	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	stx2	stx1
1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0
3	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
5	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
6	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
7	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
8	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
9	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
10	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1