

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

近畿ブロックにおける食品由来感染症の病原体情報の解析および  
共有化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、坂口初美	滋賀県衛生科学センター
	木上照子、大石剛史、藤本直樹	京都府保健環境研究所
	清水麻衣、吉田有希	京都市衛生環境研究所
	齋藤悦子、荻田堅一、秋山由美	兵庫県立健康生活科学研究所
	濱 夏樹、野本竜平	神戸市環境保健研究所
	横田隼一郎	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	大阪市立環境科学研究所
	福田弘美、下迫純子、木村友美	堺市衛生研究所
	田邊純子、久野翔平、辻本真弓	奈良県保健研究センター
	西山貴士、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
	若林友騎、原田哲也、河原隆二	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

腸管出血性大腸菌 O157 の遺伝子型別法である IS-printing System (IS) 法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の信頼性確保のため精度管理を実施するとともに、近畿 IS データベースを活用して、流行株の探知や複数の自治体にまたがる事例の解析を行った。IS 法の精度管理では 11 施設中 2 施設で誤判定があり、正確な判定には、18 本の陽性対照バンドが十分な間隔で識別できる電気泳動画像と慎重な判断が必要であることを再認識した。PFGE 法の精度管理については概ね良好な結果であったが、画像によっては解析困難な部分があり、未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドの解消が課題である。近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 が急増した。ブロック内の情報交換により、一部の感染者については 7 月 2 日および 7 月 8 日に同一施設を利用しており、感染研 MLVA タイプも一致することが判明した。これまでのデータの蓄積から、IS 法は菌株によってエキストラバンドが増幅されることがわかっており、近畿 IS データベース登録株についてエキストラバンド情報を整理した。判定に影響があると考えられるサイズのエキストラバンドは、セット 1、セット 2 合わせて 22 か所に 643 本が登録されていた。特に運動性陰性株 (O157:HNM) は、セット 1 で約 800bp のエキ

ストラバンドが増幅されることが多く、1-03 との判別に注意が必要であると考えられた。

## A. 研究目的

食品由来感染症において原因菌の分子疫学解析は行政対応に必須のものであり、近畿ブロックの地方衛生研究所（地衛研）では、腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 の遺伝子型別法として、IS-printing System（IS）法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動（PFGE）法を共通の解析手法として使用している。本研究では、その信頼性を確保するため精度管理を実施し、近畿 IS データベースを活用して、流行株の探知や複数の自治体にまたがる事例の解析を行った。また、これまでのデータの蓄積から、IS 法は菌株によってエキストラバンドが増幅されることがわかっている。これが特徴となった集団事例もあったが、誤判定につながる場合もあることから、近畿 IS データベース登録株のエキストラバンド情報を整理し、情報提供資料の作成を目指した。

## B. 研究方法

### 1. 供試菌株

IS 法および PFGE 法の精度管理には、2016 年に大阪府内で分離された EHEC O157 5 株を使用し、所定の菌株搬送容器を用いて 13 か所の地衛研に送付した（表 1）。

### 2. IS 法の精度管理

IS 法は、IS-printing System Version 2（東洋紡）を使用し、表 2 の条件で実施した。判定表に、プライマーごとに増幅の有無とエキストラバンドがある場合はそのサイズを記入し、電気泳動画像とともに提出を求め

た。

### 3. 近畿 IS データベース

各地衛研で EHEC O157 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送信した。

### 4. IS 法のエキストラバンドに関する情報収集

近畿 IS データベースから「エキストラバンド欄」に記載のあるデータを抽出し、サイズごとに、登録菌株数、登録施設、IS コードを整理した。代表的な菌株について登録施設に画像提供を依頼し、「エキストラバンド集」の作成を目指した。

### 5. 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た。

画像解析は、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目視で補正した後、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%でデン

ドログラムを作成した。

(倫理面への配慮)

本研究で取り扱う菌株および感染者情報は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律に基づく調査によって得られたもので、個人情報には研究参加施設において匿名化し、厳格に管理保存する。

## C. 研究結果

### 1. IS 法の精度管理

IS 法の精度管理には 11 施設が参加し、概ね良好な結果が得られた (図 1)。菌株 4 はセット 1 でプライマー 1-02 と 1-03 の間にエキストラバンドが増幅され、施設 2 と施設 13 で「1-02 陽性」と誤判定されていた。施設 13 の電気泳動画像はバンド間隔が狭く判定困難であったが (図 2)、施設 2 の画像では明らかに 1-02 とサイズが異なっていた。施設 2 は菌株 5 のセット 2 でも画像と判定表に不一致が見られたことから、判定のやり直しを、施設 13 には電気泳動の再実施を依頼し、他施設と一致した結果に達した。

菌株 4 は 1-12 に近接したエキストラバンドも増幅され、自動電気泳動装置を使用した 2 施設では 1-12 付近に 2 本のバンドが観察されたが (図 3)、アガロース電気泳動では「1-12 が太い」と観察されるにとどまった (図 1、図 2)。

### 2. 近畿 IS データベース 2016 年分離株の傾向

2016 年は 12 施設から 266 株が登録された (表 3、2017 年 2 月 8 日現在)。IS 型は 77 タイプに分かれ、11 株以上登録されたタイ

プは 5 タイプであった (表 4)。

感染研 IS パターン番号 AA024 は、過去 4 年間の登録数は 7 株であったが、社員旅行事例や家族事例を含む 32 株が 7 月に分離されていた (表 4、図 4)。ブロック内の情報交換により、一部の感染者については推定原因施設を 7 月 2 日および 7 月 8 日に利用したことが判明した。AA063、AA023 は昨年上位 5 タイプに入っていたが、今年は登録数が減少していた (図 4)。

### 3. IS 法のエキストラバンドに関する情報収集

2017 年 1 月 8 日までに近畿 IS データベースに登録された 2,914 株のうち、591 株でエキストラバンド欄が入力されていた。このうち誤判定の可能性が考えられるサイズについて、増幅位置ごとに登録株数と IS タイプ数をまとめた (図 5)。セット 1 は 12 か所、セット 2 は 10 か所で合計 648 本のエキストラバンドが増幅されていた。

セット 1 では b と j の位置に増幅される株が多く、このうち 117 株は両方にエキストラバンドがみられた (図 6a)。b の位置は 1-03 との判別に注意が必要であり、185 株中 149 株 (81%) は運動性陰性株であった。

セット 2 では m の位置のエキストラバンドに注意が必要で、特に 2-01 陰性の株では 2-01 陽性株に比べ判定が困難であった (図 6b、図 6c)。また、n の位置にエキストラバンドが増幅される株が多く、その IS タイプは多様であったが、2-01 や 2-02 に比べて明らかに増幅が弱い傾向がみられた (図 6c、

図 6d)。

#### 4. EHEC O157 の PFGE 精度管理

PFGE の精度管理には 11 施設が参加し、このうち 6 施設は、集団事例の発生や行政依頼など精度管理以外にも PFGE を実施していた。送られてきた PFGE 画像は、概ねサイズマーカーについての条件は満たしていたが、施設 5 の画像は菌株によって未消化が疑われるバンドがみられ、特に菌株 1 のバンドパターンが他の株に比べ不明瞭であった (図 7)。施設 2 や施設 11 でも、菌株によってバンドが薄い部分がみられた。一方、マーカーの Band 6 より大きいサイズで、バンドが極端に太い、あるいはレーン幅の中央と両端で太さが異なる画像もみられた (図 7)。

画像解析にあたっては、上記の薄いバンドや極端に太いバンドのほか、バックグラウンドの汚れがバンド認識されることもあり、自動バンド認識を目視で補正した。トレランス値 1.2% でデンドログラムを作成したところ、菌株ごとにクラスターを作り、その近似度は 85.9~97.4% であった (図 8)。

#### D. 考察

近畿ブロックでは、IS 法を EHEC O157 遺伝子型別のスクリーニング法として位置づけ、2009 年から近畿 IS データベースを運用している。2016 年は近畿ブロック内で EHEC O157 による集団事例の発生はなく、近畿 IS データベースへの登録も昨年より減少した (表 3)。その中で 7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 が集中して分離され、同一感

染源であることが強く疑われた。原因究明には至らなかったが、今後の分離動向が注視される。

本データベースの品質保証のため毎年精度管理を実施しており、今年度も判定に注意が必要なエキストラバンドが増幅される株 (菌株 4) を含む 5 株を配付した。菌株 4 は 1-02 (839bp) と 1-03 (742bp) の増幅が陰性であったが、800bp よりもやや大きいサイズのエキストラバンドが増幅され、1-02 との判別に注意が必要であった (図 1)。菌株 3 および菌株 5 は 1-02 陽性であり、隣接するレーンと比較すると泳動位置が異なることがわかるが、バンド間隔が狭い電気泳動画像で誤判定がみられた。再実施された画像では明瞭に区別できたことから、各施設で泳動条件の最適化が望まれる。また、判定表への記載ミスも散見された。精度管理では電気泳動画像と判定表の提出を求めているため気づいたが、データベースへの登録時には入力後の確認をお願いしたい。昨年度の本研究で、Lot. 5001A の試薬では Template Mix で 2-09 の増幅が弱いことが明らかになったが、Lot. 6201A でも同様の傾向がみられた。IS 法は簡便で迅速性に優れた遺伝子型別法であるが、Multiplex PCR で陽性対照がすべて増幅され、正確に判定できる電気泳動を実施し、慎重に判定することが求められる。

2016 年 8 月には沖縄県旅行者関連の EHEC O157 食中毒が探知され、患者情報とともに IS 型別結果の提供が求められた。精度管理に用いた菌株 4 は当該事例由来株であり、沖縄県が画像付きの解析結果を集約

したことから「1-02 の下にエキストラバンドがあること」「1-12 の下にエキストラバンドがでる場合があること」の 2 点を早期から情報共有できた。

このようなエキストラバンド情報の共有を目指し、近畿 IS データベース登録株について、エキストラバンドの増幅位置ごとにデータを整理した。増幅位置によっては IS タイプが多様で、すべてのタイプについて画像を確認できていないが、特に運動性陰性株 (O157:HNM) は図 5 の b の位置にエキストラバンドが増幅されることが多く、1-03 との判別には注意が必要である (図 6a)。図 5 の n の位置に増幅されるエキストラバンドのように増幅が弱い場合もあるため、できるだけ多くの菌株について画像を確認し、増幅の強弱についてのコメントを掲載した「エキストラバンド集」の作成を目指す。

PFGE 法については、「精度管理株のみ実施」との回答が 5 施設あったものの、概ね良好な結果が得られた。デンドログラムでは、菌株 1 と菌株 5 で近似度の低い画像がみられたが、それ以外は 92%以上と高い近似度を示した。菌株によって (レーンによって) バンドの強さが極端に異なる画像では、自動バンド認識でも目視補正においても、薄いバンドの解析が困難であった。未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドについて、トラブルシューティングできておらず、今後の課題である。次年度は、プロトコルどおりの実施を求めるとともに、菌株の培養条件やプラグのカットサイズなど、ステップごとに他施設の手法を学べるような方策を検討したい。

## E. 結論

IS-printing System (IS) 法の精度管理を実施することにより、正確な判定には 18 本の陽性対照バンドが十分な間隔で識別できる電気泳動画像が必要であることを再認識した。

近畿 IS データベースへの登録は昨年より減少したが、7 月には感染研 IS パターン番号 AA024 が集中して分離され、同一感染源であることが強く疑われた。

IS 法のエキストラバンドについて、近畿 IS データベース登録株の情報を整理した。特に運動性陰性株 (O157:HNM) において、1-03 との判別に注意が必要なエキストラバンドが増幅されていた。

PFGE 法の精度管理については、概ね良好な結果であったが、未消化バンドや薄いバンドあるいは極端に太いバンドの解消が課題である。

## F. 研究発表

### 1. 誌上発表

1) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T: Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2016, 7:765.

2) 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 河原隆二, 久米田裕子, 田邊純子, 福田弘美, 中村寛海, 松原弘明, 泉谷秀昌: 近畿の飲食チェーン店で発生した食中毒が疑われる腸管出血性大腸菌 O157 事例. *病原微生物検出情報* 2016, 37:89-90.

2. 学会発表

- 1) 勢戸和子, 原田哲也, 田口真澄, 伊豫田淳: Non-O157 STEC の検査法—大阪府公衛研の経験を中心に—. 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016年11月, 富山)

- 2) 田口真澄, 河原隆二, 原田哲也, 勢戸和子: 腸管出血性大腸菌の薬剤耐性動向. 第20回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (2016年11月, 富山)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1 IS-printing System および PFGE の精度管理に使用した菌株

菌株 番号	菌種(毒素型)	分離年	近畿ISデータベース		感染研 MLVA type
			ISコード		
1	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2016	154127	203855	16m0032
2	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2016	216959	84459	16m0094
3	EHEC O157:H7 (VT1, VT2)	2016	248701	125359	16m0152
4	EHEC O157:H7 (VT2)	2016	2159	114922	16m0169
5	EHEC O157:H7 (VT2)	2016	84527	182790	16m0192

表 2 IS-printing System 精度管理の実施条件

施設	ISキット Lot.	遺伝子増幅装置	電気泳動装置	泳動時間
1	6201A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	サブマリン電気泳動装置 (ゲルサイズ 12x12cm)	100V 180分
2	5001A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	Mupid-2plus	100V 60分 + 50V 15分
3	5001A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600	Mupid-2plus	50V 60分 + 100V 45分
4	6201A	Applied Biosystems Verti Thermal Cycler	Mupid-exU	100V 60分 + 50V 15分
5	6201A	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	QIAxcel (DNA High Resolution Cartridge)	5kV 35分
6	5001A	Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700	Mupid-2plus	50V 45分 + 100V 80分 + 50V 50分
8	5001A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice mini	Mupid J	135V 25分 + 50V 30分
9	5001A	BIOER Life Touch	GelMate2000	100V 120分
10	5001A	Applied Biosystems Verti Thermal Cycler	Mupid	100V 65分 + 50V 30分
11	5001A	TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice TP-600	MultiNA (DNA-1000)	
13	5001A	Agilent SureCycler 8800	Mupid-2plus	50V 60分 + 100V 50分

表3 近畿ISデータベース登録数(2012年～2016年)

施設	2012	2013	2014	2015	2016	実施状況
1	16	28	26	32	50	全株
2	10	6	12	5	4	全株
3	26	33	23	21	23	ほぼ全株 <sup>a</sup>
4	36	56	22	43	22	全株
5	13	23	7	12	33	全株
6	3	8	25	3	11	全株
7	30	47	32	33	34	(全株) <sup>b</sup>
8	9	12	10	50	15	全株
9	13	26	19	20	20	全株
10	3	7	4	3	1	全株
11	54	42	69	94	52	全株
13	7	7	5	2	1	ほぼ全株 <sup>c</sup>
計	220	295	254	318	266	

a 同一人の服薬後検便で分離された株を除く

b テンプレートを提供し施設11で実施

c 一部の株は収集できていない

表4 2016年分離株の主なIS型

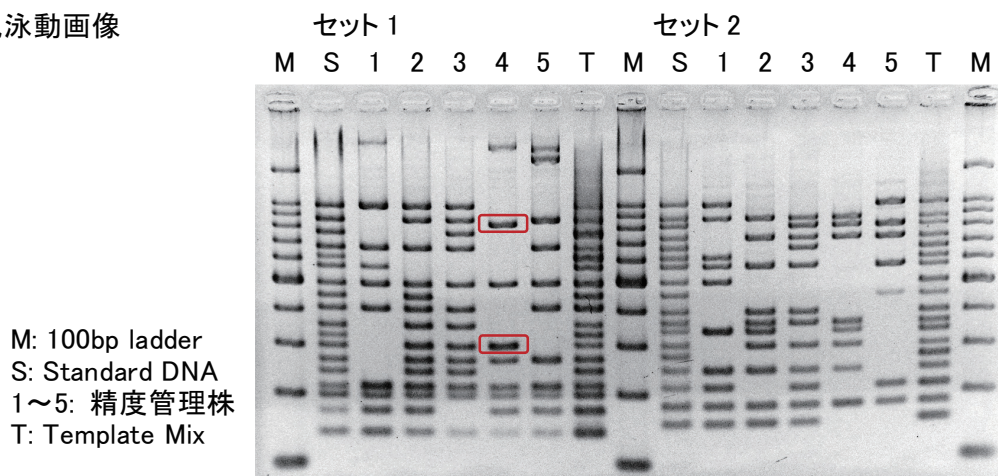
近畿ISコード <sup>a</sup>	ISパターン番号 <sup>b</sup>	登録数	登録施設数	分離時期	備考
216943	116975 AA024	33	5	5月, 7月	社員旅行事例と3つの家族事例を含む
249711	116975 AA063	19	6	5～10月	2つの家族またはグループ事例を含む
216959	84463 AA023	14	5	5～10月	3つの家族事例を含む
249727	116975 AA018	12	5	6～8月, 10月	3つの家族またはグループ事例を含む
137743	198734 AA031	11	4	6～10月	2つの家族事例を含む

a 近畿ISデータベースのISコード

b 感染研データベース(試用版)のISパターン番号



1) 電気泳動画像



2) 判定

セット 1

プライマー サイズ(bp)	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	hlyA 137	エキストラ バンド(bp)
菌株1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
菌株2	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
菌株3	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	
菌株4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	820
菌株5	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	

セット 2

プライマー サイズ(bp)	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
菌株1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
菌株2	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
菌株3	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
菌株4	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
菌株5	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0

1: 増幅あり, 0: 増幅なし

図 1 IS-printing System の精度管理実施例 (施設 3)

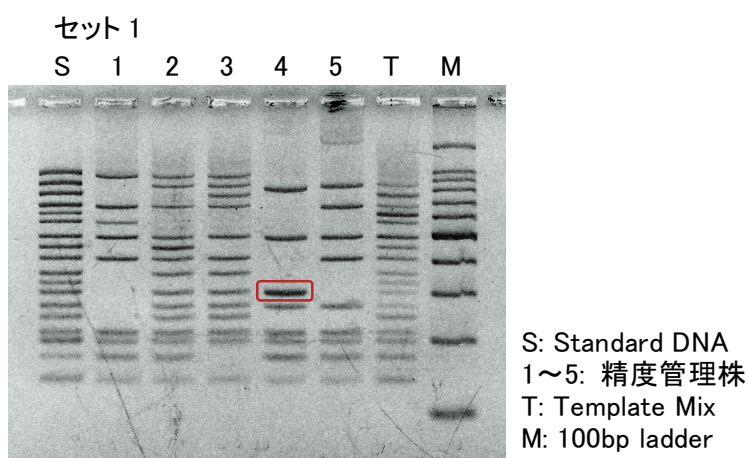


図 2 IS-printing System の精度管理実施例 (施設 13)

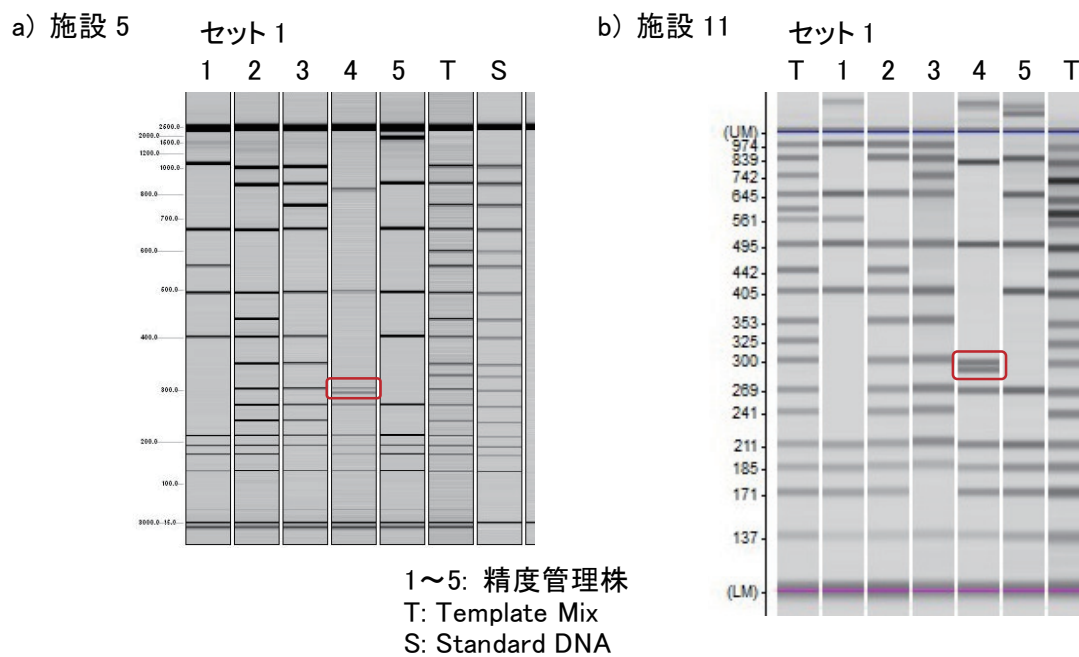


図 3 自動電気泳動装置を用いた IS-printing System 精度管理実施例

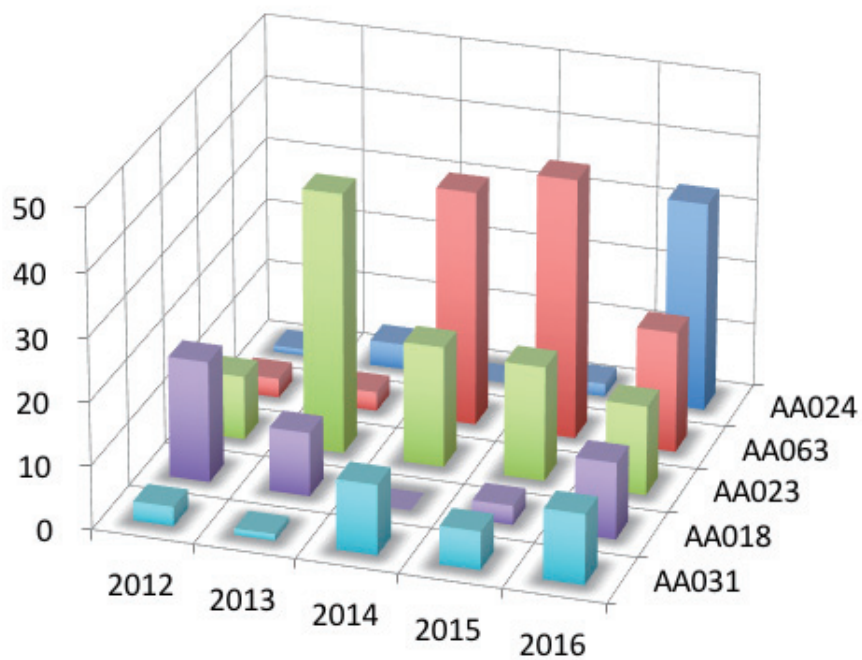
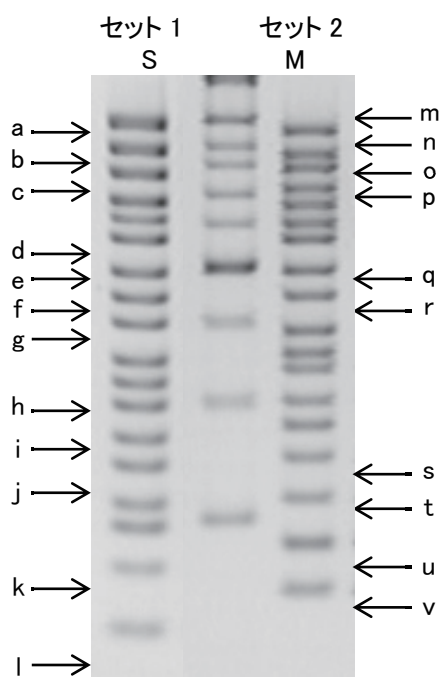


図 4 主な IS 型の分離状況の推移(2012~2016 年)

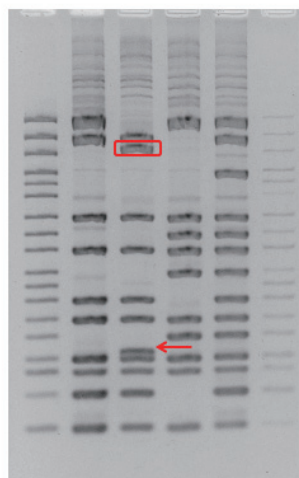


	増幅位置	登録株数	ISタイプ数
a	1-01と1-02の間	1	1
b	1-02と1-03の間	185	19
c	1-03と1-04の間	1	1
d	1-06と1-07の間	6	3
e	1-07と1-08の間	2	1
f	1-08と1-09の間	1	1
g	1-09と1-10の間	7	4
h	1-12と1-13の間	12	7
i	1-13と1-14の間	2	1
j	1-15の上	172	23
k	1-16とhlyAの間	6	5
l	hlyAの下	12	7
m	2-01のすぐ上	30	19
n	2-01と2-02の間	139	56
o	2-03と2-04の間	37	2
p	2-04と2-05の間	1	1
q	2-08と2-09の間	1	1
r	2-09と2-10の間	2	2
s	2-15と2-16の間	1	1
t	2-16とstx2の間	8	7
u	stx2とstx1の間	2	2
v	stx1の下	15	7

図 5 IS-printing System のエキストラバンド増幅位置と近畿 IS データベース登録株数

a) 1-02 と 1-03 の間、1-15 の上

• 泳動像



• 方法

- 使用機器: サブマリン電気泳動装置
- 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE  
100V 180分

• 結果

- エキストラバンドの位置
  - 1-02と1-03の間、1-15の上
- 近畿ISコード 68207-215275
- 判定表
  - Set1: 010000101001101111
  - Set2: 110100100011101011

• 実施機関

- 施設1 2013年分離株 E13038

- 備考(コメント・注意点等)
  - 1-03との誤判定に注意

図 6 判定に注意が必要な IS-printing System エキストラバンド

b) 2-01 の上

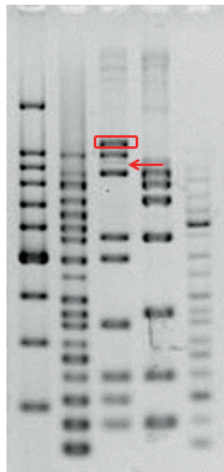
・ 泳動像



- ・ 方法
  - 使用機器: Mupid ex
  - 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE  
50V 40分 + 100V 50分
- ・ 結果
  - エキストラバンドの位置
    - ・ 2-01の上
  - 近畿ISコード 148015-68686
  - 判定表
    - ・ Set1: 100100001000101111
    - ・ Set2: 010000110001001110
- ・ 実施機関
  - 施設11 2012年分離株 PV12-017
- ・ 備考(コメント・注意点等)
  - 2-01との誤判定に注意

c) 2-01 の上、2-01 と 2-02 の間

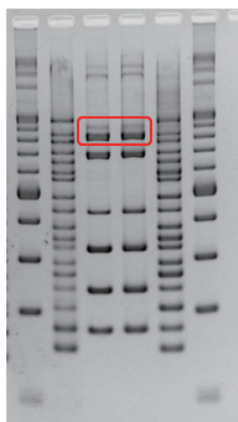
・ 泳動像



- ・ 方法
  - 使用機器: Mupid
  - 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE  
100V 60分 + 50V 40分
- ・ 結果
  - エキストラバンドの位置
    - ・ 2-01の上、2-01と2-02の間
  - 近畿ISコード 148015-199758
  - 判定表
    - ・ Set1: 100100001000101111
    - ・ Set2: 110000110001001110
- ・ 実施機関
  - 施設10 2010年分離株 10-049
- ・ 備考(コメント・注意点等)
  - 2-01と2-02の間のバンドは薄い

d) 2-01 と 2-02 の間

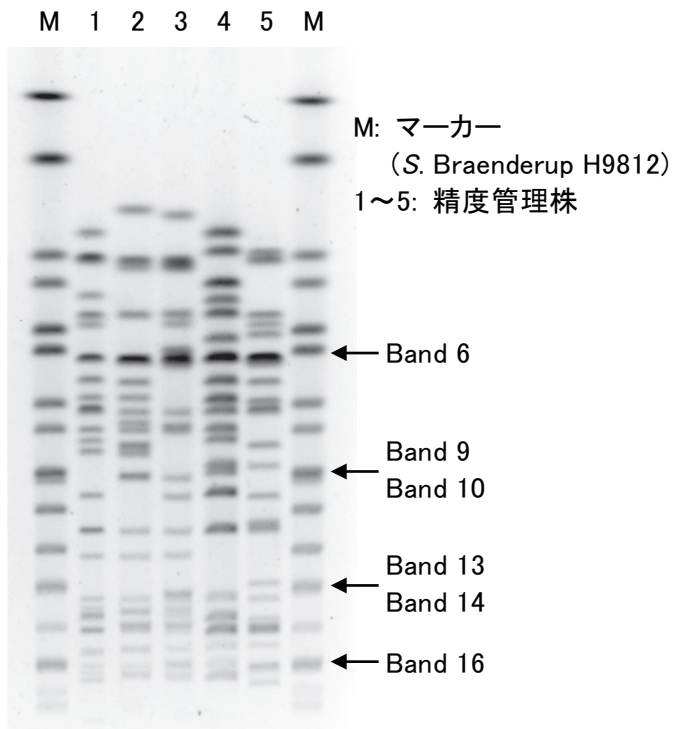
・ 泳動像



- ・ 方法
  - 使用機器: GelMate 2000(東洋紡)
  - 泳動条件: 3% agarose, 0.5xTBE  
100V 120分
- ・ 結果
  - エキストラバンドの位置
    - ・ 2-01と2-02の間
  - 近畿ISコード 17453-82506
  - 判定表
    - ・ Set1: 010100101001101111
    - ・ Set2: 011000101010001110
- ・ 実施機関
  - 施設9 2014年分離株 H26V21, H26V22
- ・ 備考(コメント・注意点等)
  - 2-02の上の薄いバンド

図 6 判定に注意が必要な IS-printing System エキストラバンド(つづき)

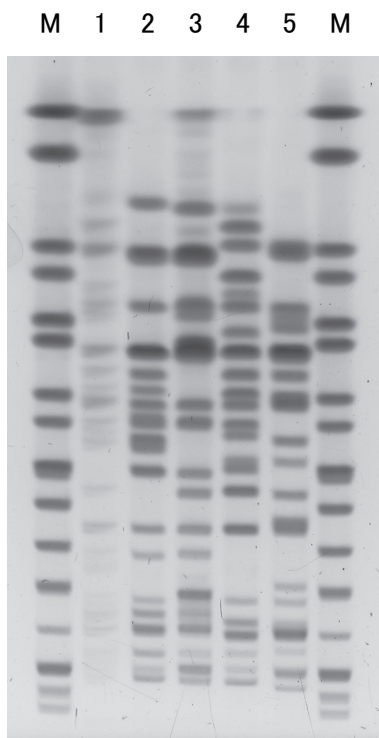
施設 8



施設 1



施設 5



施設 12

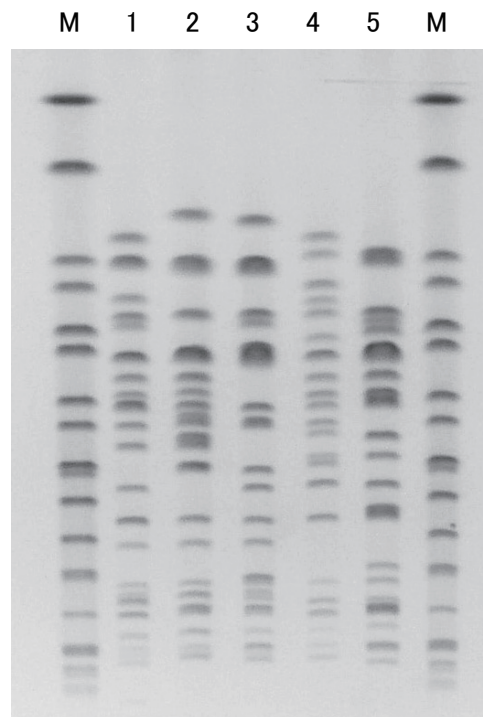


図 7 EHEC O157 精度管理株の PFGE 画像例

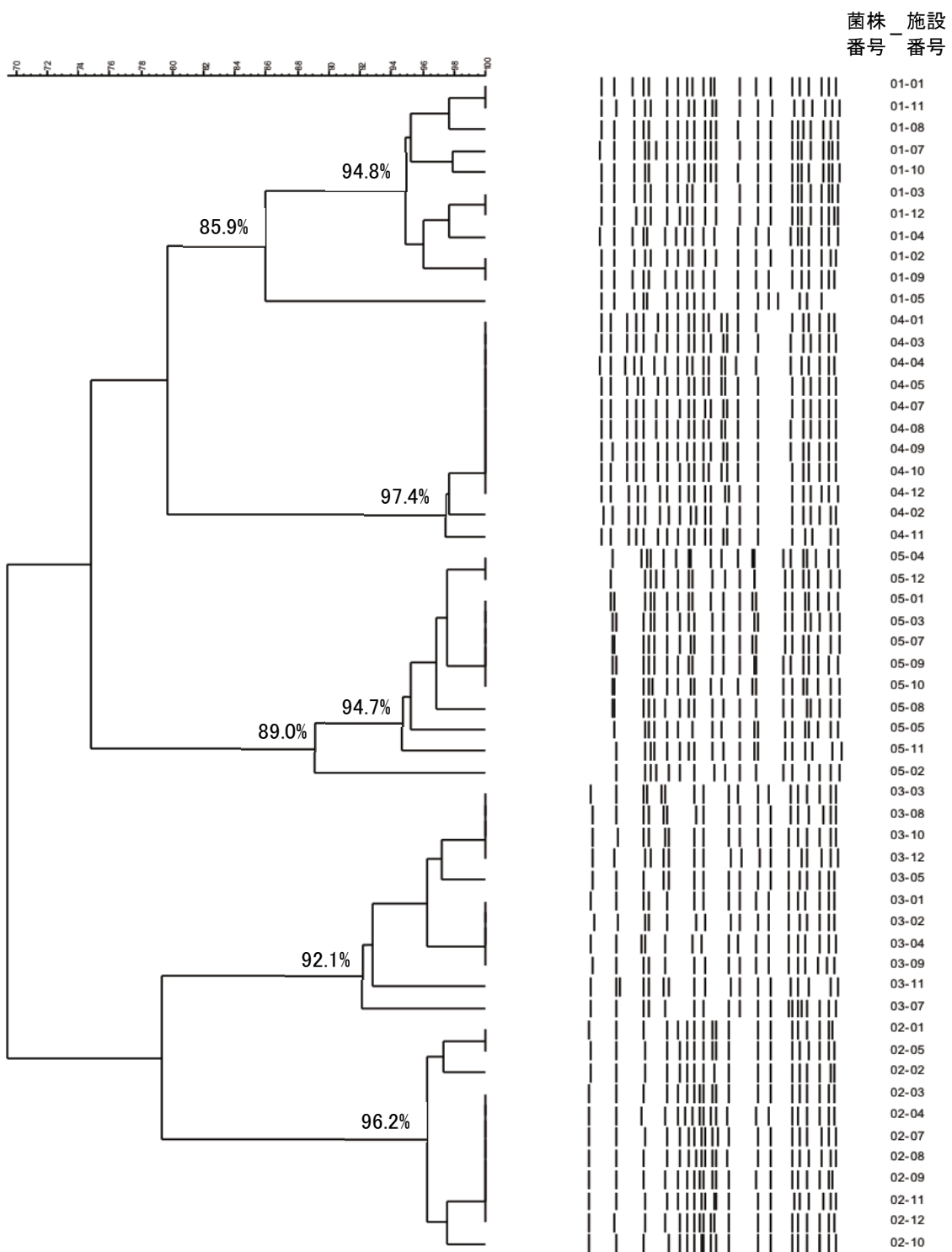


図 8 EHEC O157 精度管理株のデンドログラム