

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 28 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、集団発生事例の集約、精度管理 (ISPS、
PFGE) 及び ISPS エクストラバンド情報の集約—

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
研究協力者	岩佐奈津美 有川衣美 塘由香 川野みどり 江原裕子 成松浩志 福島宏暢 矢坂多佳子 水流奈己 穂積和佳 高良武俊 濱崎光宏 カール由起 岡元冬樹 西田雅博 重村洋明	福岡市保健環境研究所 北九州市環境科学研究所 佐賀県衛生薬業センター 長崎県環境保健研究センター 長崎市保健環境試験所 大分県衛生環境研究センター 熊本県保健環境科学研究所 熊本市環境総合センター 宮崎県衛生環境研究所 鹿児島県環境保健センター 沖縄県衛生環境研究所 福岡県保健環境研究所 福岡県保健環境研究所 福岡県保健環境研究所 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. ISPS で発生したエクストラバンド情報の集約の 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 28 年 12 月現在で 1602 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 229 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 224 件、平成 26 年度 206 件、平成 27 年度 204 件及び平成 28 年度 198 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 28 年度に収集された EHEC は 471 株であ

った。その内訳は、0157EHEC が 227 株、026 EHEC が 164 株、0111 EHEC が 18 株、0103 EHEC が 17 株、0121 EHEC が 9 株、091 EHEC が 6 株、0145 EHEC が 6 株、その他の血清型が 16 株及び血清型別不能が 8 株であった。九州地区は非 0157EHEC の占める比率 48.2% 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 28 年度の 0157EHEC 及び 非 0157EHEC による集団発生事例は 11 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 5 事例で、026EHEC によるものが 6 事例であった。精度管理では昨年度に引き続き ISPS、PFGE について実施した。ISPS では、エクストラバンドがある菌株で誤判定がみられた。PFGE では、泳動は概ね良好に行われていたが、11 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 1 地衛研のみであった。ほとんどの地衛研が 0~3 本相違であり、昨年度と比べると相違数が少なくなっていた。一致しなかったのは、バンドの濃淡やバックグラウンドに差がみられたこと、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）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。平成 26 年度からは、0157EHEC、026EHEC 及び 0111EHEC に対しては、迅速性と分解能の両立を目指した遺伝子型別解析方法として、Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) により情報還元が開始された。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-printing system (ISPS) 法を用いて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。本研究では、遺伝子型別法の信頼性を確保するため、PFGE 及び ISPS の精度管理を実施した。ISPS のエクストラバンドについて、九州内の各地衛研からの情報を集約した。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た。

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 (*stx₁*, *stx₂*, *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。また、得られた 36 種類の遺伝子座のコードから BioNumerics Ver. 6.1 (Applied Maths) を用いて Minimum spanning tree (MST) 解析を行った。

EHEC 検出状況、EHEC による集団発生事例及び ISPS のエクストラバンド情報の集約については、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 26 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」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。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 1)。

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 28 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 28 年 12 月現在で 1602 件 (平成 22 年度 312 件、平成 23 年度 229 件、平成 24 年度 229 件、平成 25 年度 224 件、平成 26 年度 206 件、平成 27 年度 204 件及び平成 28 年度 198 件) であり、毎年 200 件前後の登録で推移している (表 2)。

平成 22~28 年度に登録された 1602 件の 0157EHEC の IS 型別数は 289 型に分類された。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 161 株 (10.0%) が九州地区の全ての地衛研から、登録された (表 3、図 1)。また、7 年間で 20 株以下しか登録がない 0157EHEC の IS 型別数は 273 型 (94.4%)

で、それに属する株は合計 813 株 (50.7%) であった。また、MST 解析の結果から、IS 型別の 0157EHEC が分離された地域による差は認められなかったが、分離された時期による偏りは確認された (図 1.1、1.2)。

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。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 28 年 4 月から 12 月までに 471 株の EHEC 菌株が収集され (表 4)、その内訳は 0157EHEC が 227 株 (48.2%)、非 0157EHEC が 244 株 (51.8%) そのうち O 群血清型別不能 EHEC が 8 株であった。非 0157EHEC は 15 種類の O 群に型別され、その内訳は 026 EHEC が 164 株 (34.8%)、0111 EHEC が 18 株 (3.8%)、0103 EHEC が 17 株 (3.6%)、0121 EHEC が 9 株 (1.9%) などの順であった。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 及び 0121EHEC などで全体の 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。

3. EHEC による集団発生事例数

平成 28 年度の EHEC による集団発生事例は

11 事例であった(表 5)。その内訳は、0157EHEC によるものが 5 事例で、026EHEC によるものは 6 事例であった。発生場所別に見ると、保育所、家庭内であった。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)

昨年と同様に ISPS の精度管理を、九州地区 12 地衛研を対象に実施した。併せて PFGE の精度管理も同 11 地衛研で行った。A は無作為に選択した菌株、B、C 及び D は ISPS が同一で PFGE が異なる菌株で ISPSにおいて 1st セットの 1-02 と 1-03 の間にエクストラバンドが現れる株を選択した。

ISPS の精度管理の結果、エクストラバンドのない A については全施設で正しく判定された。しかし、エクストラバンドを含む B、C 及び D については、3 地衛研で誤判定がみられた(図 2.1)。さらに泳動が非常に綺麗に行われないと本物のバンドとの識別は困難であり(図 2.2)、担当者により判定が異なっていた。

一方、PFGE については、泳動は概ね良好に行われていたが(図 3.1 から 3.4)、11 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 1 地衛研のみであった。ほとんどの地衛研が 0~3 本相違であった(表 6)。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。

5. ISPS エクストラバンド情報の集約

ISPS のエクストラバンド情報は、九州地区 6 地衛研から得られた。代表的な ISPS のエクストラバンドの写真を図 4.1 から 4.4 に示す。

ISPS のエクストラバンドは、6 か所報告された(表 7)。報告された 6 か所のうち、1-02 と 1-03 の間、1-14 と 1-15 の間及び 1-12 と 1-13 の間の 3 か所のエクストラバンドは、誤判定する可能性があるため注意が必要である。

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 22~28 年度に登録された 1602 株の 0157EHEC の IS 型別数は 289 型に分類され、7 年間で 21 株以上登録された 0157EHEC の IS 型別は 16 型(5.5%) でそれに属する株は合計 772 株(48.2%) であった。最も多く登録されている 0157EHEC の IS 型別は「66324257743」で 161 株(11.0%) が 12 地衛研から登録された。

九州地区 12 地衛研にて平成 28 年 4 月から 12 月までに 471 株の EHEC 菌株が収集され、その内訳は 0157EHEC が 227 株(48.2%)、非 0157EHEC が 244 株(51.8%) そのうち 0 群血清型別不能 EHEC が 8 株であった。九州地区で収集される EHEC の 0 群血清型の内訳に大きな変化は無く、0157EHEC、026EHEC、0111EHEC、0103EHEC 及び 0121EHEC などで、全体の 9 割を占めていた。

平成 28 年度の EHEC による集団発生事例は 11 事例であった。その内訳は、0157EHEC によるものが 5 事例、026EHEC によるものが 6 事例であった。発生場所別に見ると、保育所等、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、昨年度に引き続き ISPS、PFGE について行った。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、
11 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 1 地衛研のみであった。
ほとんどの地衛研が 0~3 本相違であった。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。

表1 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
菌株A	16E004	2016	保菌者	0157:H-	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	64427577418
菌株B	16E014	2016	患者	0157:H-	<i>stx</i> ₁	57733536074
菌株C	16E015	2016	保菌者	0157:H-	<i>stx</i> ₁	57733536074
菌株D	16E016	2016	保菌者	0157:H-	<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂	57733536074

表2 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	平成27年度	平成28年度	
1	112	48	61	26	28	46	29	350
2	50	53	44	24	32	42	34	279
3	30	15	12	15	38	46	10	166
4	12	12	17	52	28	15	40	176
5	23	18	11	28	26	10	25	141
6	6	5	4	8	2	7	2	34
7	13	16	24	18	11	14	31	127
8	16	10	5	30	25	0	0	86
9	5	3	7	2	4	5	3	29
10	20	17	16	4	3	4	5	69
11	19	25	21	15	8	15	16	119
12	6	7	7	2	1	0	3	26
合計	312	229	229	224	206	204	198	1602

表3 九州地区での登録数が多いIS型別（年度別、地衛研別）

順位	IS型別	登録数												合計								
		登録年度							登録地衛研													
		22	23	24	25	26	27	28	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	66324257743	22	32	4	11	33	50	9	26	18	59	7	12	1	16	6	2	5	8	1	161	
2	57733536074	3	15	23	8	16	10	27	22	23	4	16	15	11	4	2	1	4			102	
3	30671622280	33	11	1	7	11	2	2	31	5	3		11	3	2		1	6	5		67	
4	56643812046	31	14	3	13	3			19	17	7	3	6	2	8		1	1			64	
5	30653010185	9	4	4	14	6	3	2	6	5	3	3	8		2	8	5	1	1		42	
6	66457435083	6	2	9	10	1	5	9	11	7	3	3	1	1	7		1	3	5		42	
7	57733470538		2	12	1	16	5	4	12	5	0	18	2		1		1	1			40	
8	27384601163	26	3		7				8	1	4		8	6		2	3	2	2			36
9	66324192207	3	7	7	0	3	10	3	12	9	1	2	1		4			4				33
10	22081687688	12			2	16			9	7	8		3			2	1					30
10	66323217359	10	8	8	4				4	14	1	1			9		1					30

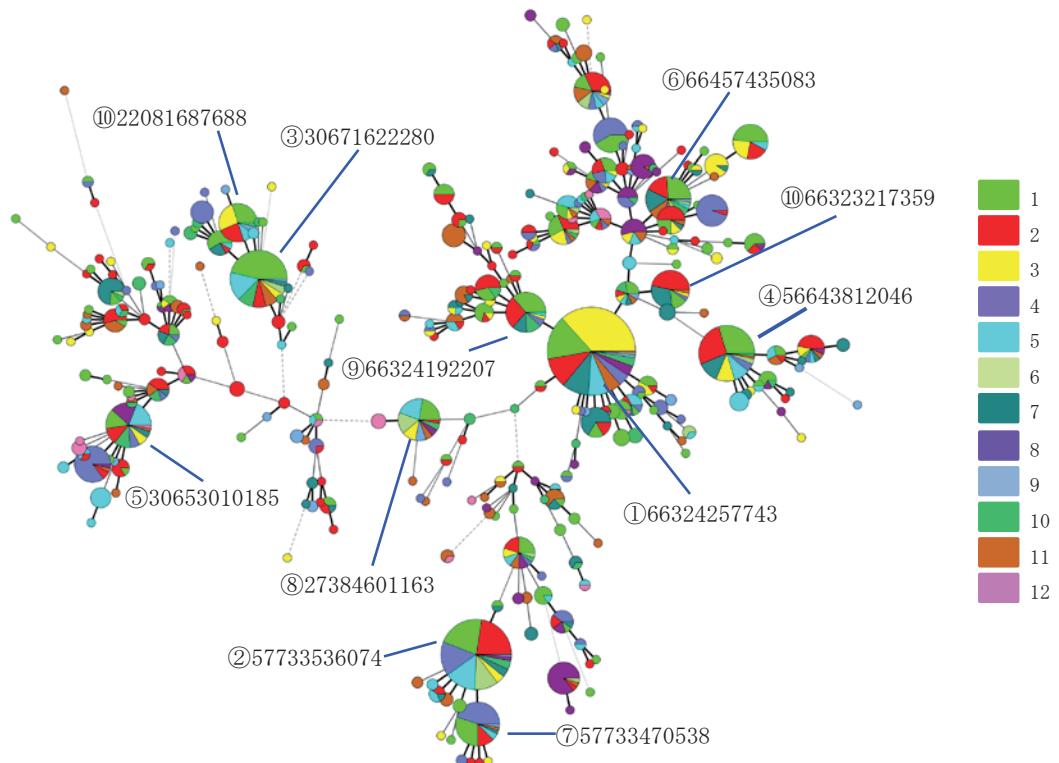


図1.1 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (地域別)

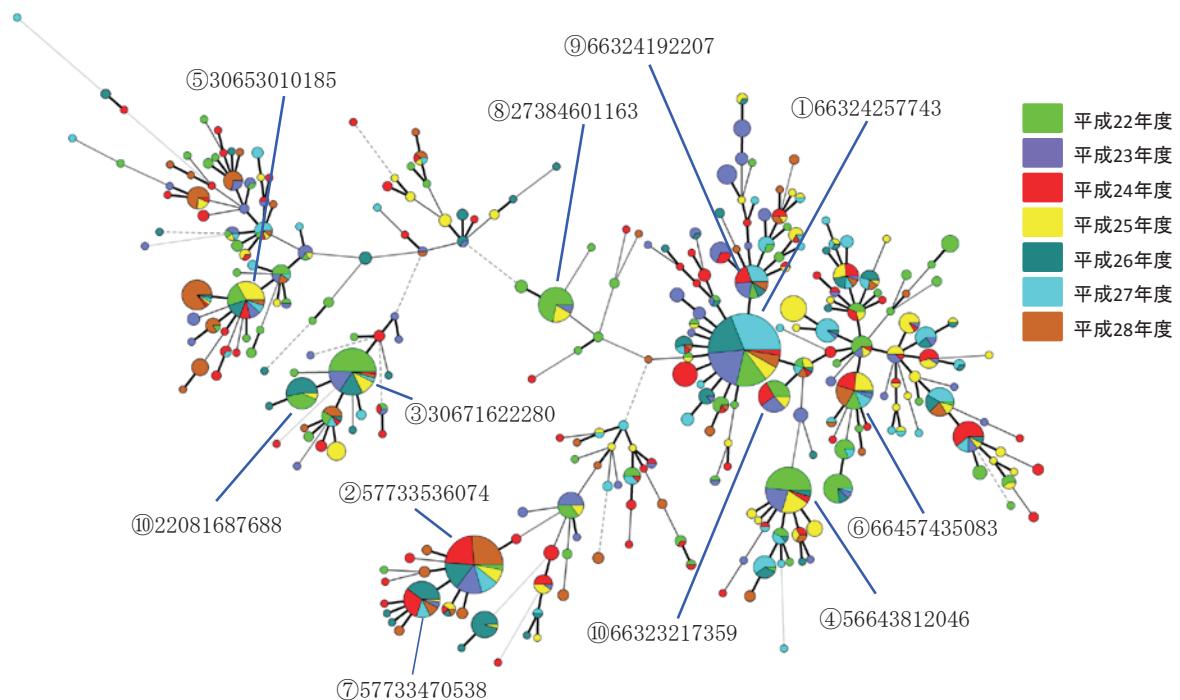


図1.2 平成22年度以降の九州地区のISPSによるMinimum spanning tree (年度別)

表4 平成28年度に九州地区地衛研で収集された腸管出血性大腸菌株数の集計

地衛研	0血清型別の分離菌株数															計	
	0157	026	0111	0103	0121	091	0145	0183	0115	0128abc	0152	04	05	0119	0165	01	OUT
1	29	57	3			2						1			1		93
2	33	7	1	2	4	3		1			2	1	1	1		1	57
3	10	1		2										1	1		15
4	72	15		3				2				1					93
5	25	40	9	2	3	1				1					1		82
6	2																2
7	31	16	1	3	1										1		53
8	4	11		2	1			1		2					1		22
9	3	2				3											8
10	1	2												1			4
11	14	10	4	3											2		33
12	3	3				3											9
合計	227	164	18	17	9	6	6	1	3	3	2	1	3	1	1	1	471

表5 平成28年度に九州地区地衛研で確認されたEHEC集団発生事例

地衛研	0血清型別のEHEC集団発生事例数			
	0157 (発生場所)	026 (発生場所)	0157 (発生場所)	026 (発生場所)
1				1 保育所
2	1 保育所			
	1 学童保育所			
3				
4	1 保育所		1 保育所	
5			2 保育所	
6				
7	1 幼稚園及び家庭		2 保育所及び家庭	
	1 保育所			
8				
9				
10				
11				
12				
合計	5		6	

- 菌株A
 - 正解 12/12地衛研
- 菌株B、C、D
 - (1本のエクストラバン
ド有り)
 - 正解 9/12地衛研

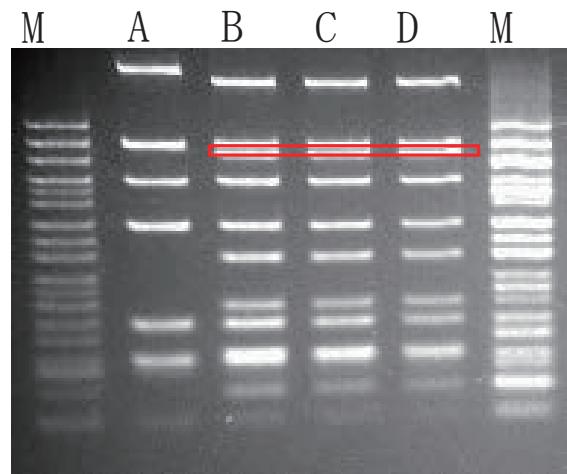


図2.1 ISPSの結果

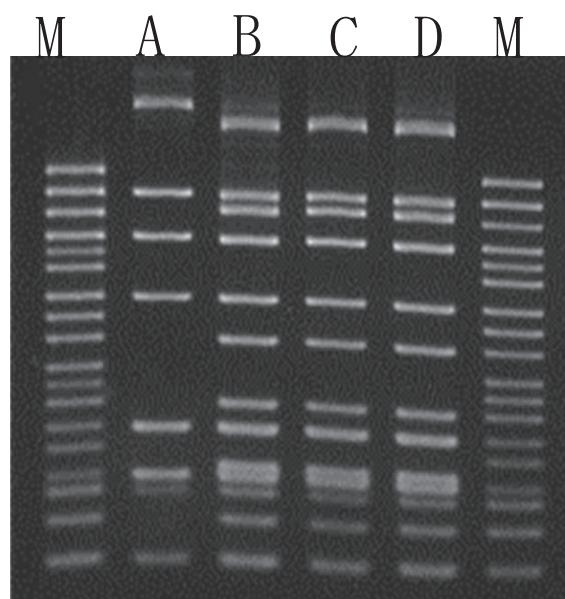


図2.2 ISPSの結果
エクストラバンドと本物のバンドが綺麗に
分離できなかった例

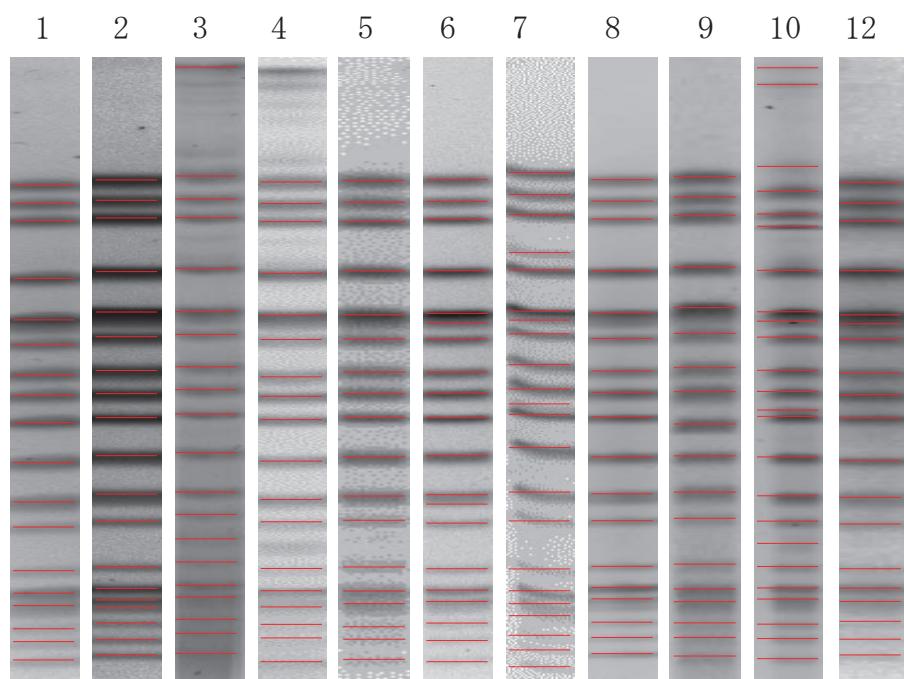


図3.1 PFGEの結果（菌株A）

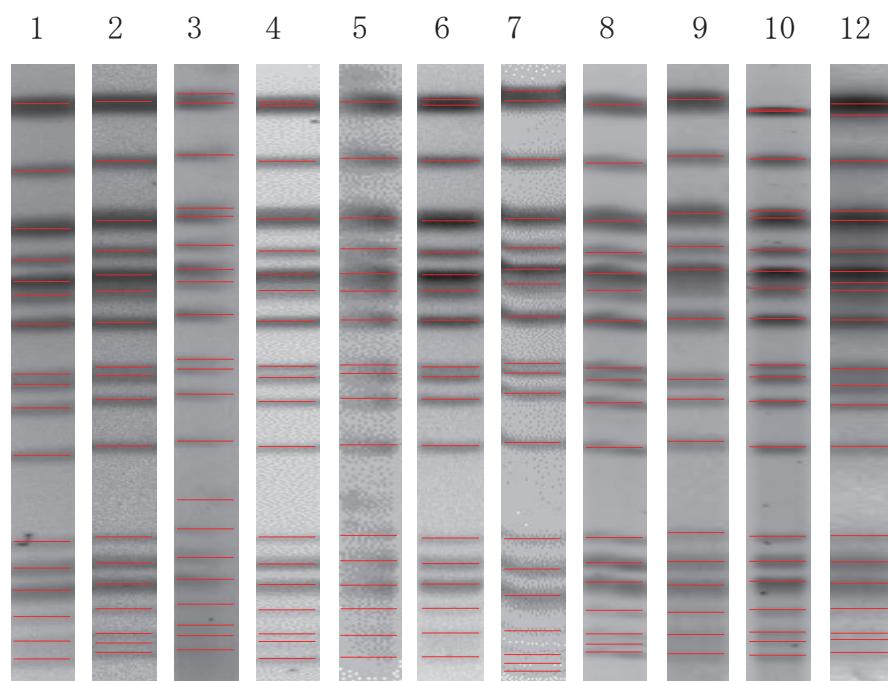


図3.2 PFGEの結果（菌株B）

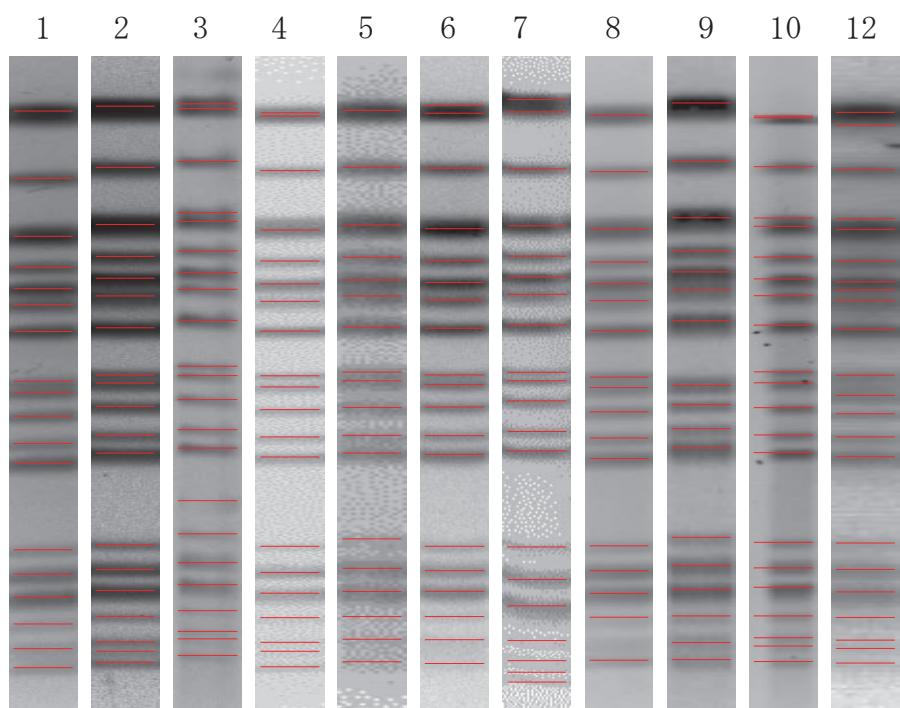


図3.3 PFGEの結果 (菌株C)

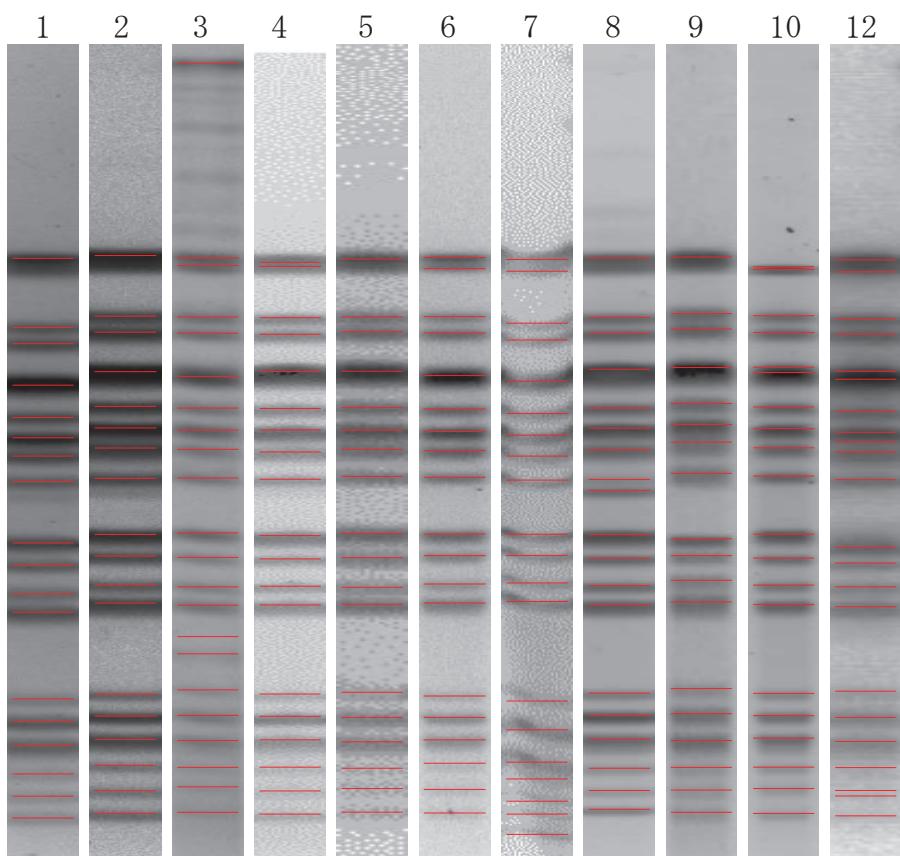
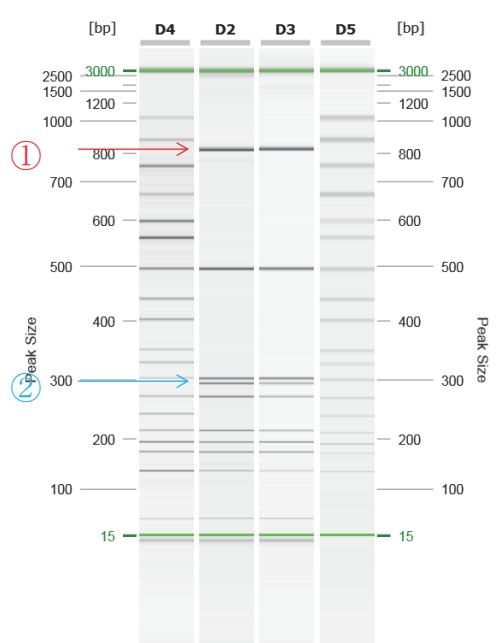


図3.4 PFGEの結果 (菌株D)

表6 PFGEの結果 (バンド数)

地衛研	菌株			
	菌株A	菌株B	菌株C	菌株D
1	18	17	18	18
2	19	18	19	18
3	20	21	22	22
4	18	19	20	19
5	18	17	18	18
6	20	18	19	19
7	22	19	20	20
8	18	18	17	19
9	18	15	17	18
10	24	20	21	20
12	19	21	22	22

• 泳動像



• 方法

- 使用機器 : QIAxcel
- 泳動条件
 - QIAxcel DNA High Resolution Kit
 - method OM2100

• 結果

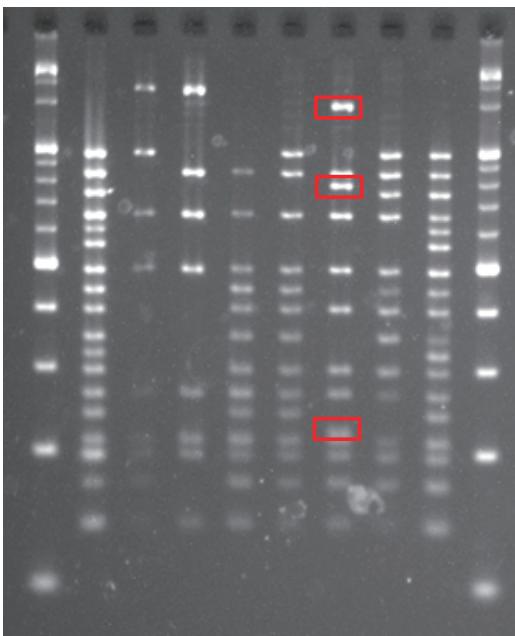
- エキストラバンドの位置
 - ①1-02と1-03の間
 - ②1-12のバンドの下
- 型名 (感染研DB)
 - MLVA Type 16m0169
 - MLVA Comp 16c027
- 判定表 (次ページに従って1/0標記)
 - Set1: 000000100001101111
 - Set2: 011100000011101010

• 備考 (コメント・注意点等)

同じMLVA Compで1000 bp以上のエキストラバンドがある株や②がない株も存在する。

図4.1 ISPSのエクストラバンド情報

- ・ 泳動像



- ・ 方法

- 使用機器 : Mupid-exu

- 泳動条件

- ゲル濃度 : 3%
- 電圧 : 100V
- 泳動時間 : 99分
- 泳動温度:室温 (26度前後)

- ・ 結果

- エキストラバンドの位置

- 1-01の上
- 1-02と03の間
- 1-14と15の間

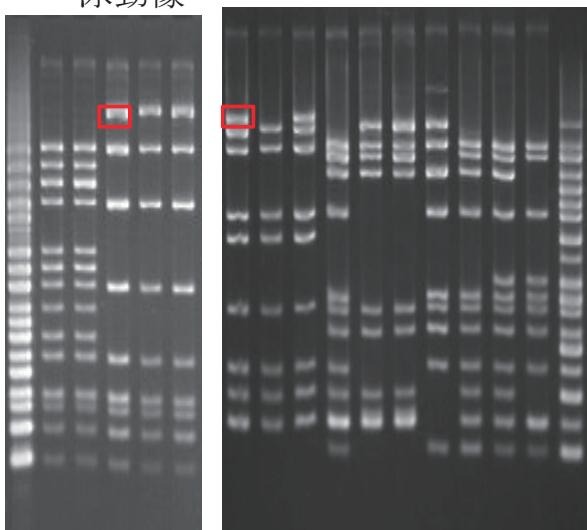
- 判定表

- Set1: 010100101001101111
- Set2: 110100100011101011

- ・ 菌株情報

- 2016年・20160610

- ・ 泳動像



- ・ 方法

- 使用機器 : M u p i d

- 泳動条件

- 3%アガロースゲル
- 100v
- 65分
- 泳動温度

- ・ 結果

- エキストラバンドの位置

- 1-01の上
- 2-01の上

- 型名 e590

- 判定表

- Set1: 100100001000101111
- Set2: 110000110001001110

- ・ 菌株情報

- 平成21年分離 21-7

図4.2 ISPSのエクストラバンド情報

- ・泳動像



- ・ 方法
使用機器 : Mupid-2plus
泳動条件 :
 ゲル濃度 : 3%
 泳動条件 : 50V, 40分 + 100V, 65分
- ・ 結果
エキストラバンドの位置
 2-stx1の下
判定表
 1st : 111100111101111101
 2nd : 011100100011100110
- ・ 菌株情報
分離年 : 2016年、NPH-STEC-1216

図4.4 ISPSのエクストラバンド情報

表7 IS-printingエクストラバンドの出現位置と報告数

エクストラバンドの位置	報告株数	報告地衛研数
1-02と1-03の間	10	5
1-14と1-15の間	5	3
1-12と1-13の間	1	1
1-01の上	20	3
2-01の上	1	1
2-stx1の下	1	1