

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 29 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
	阿部正太郎	札幌市保健福祉局衛生研究所
	山上 剛志	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
	木村 葉子	宮城県保健環境センター
	山田 香織	仙台市衛生研究所
	森 直子	仙台市衛生研究所
	三瓶 歩	福島県衛生研究所
	青木 順子	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・新潟ブロックでは、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 菌株を用いた IS-Printing System（TOYOBO）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。平成 29 年度は関東を中心とする EHEC O157 VT2 タイプによる事例が広域に発生し、ブロック内でも患者発生が確認された。北海道・東北・新潟ブロック内での情報共有化システム構築のための基礎的検討として、平成 29 年度に各県で分離された EHEC O157 VT2 タイプの菌株の IS-Printing System の結果を集積し、発生パターンを調査した。また、秋田県内で発生した EHEC O157 事例について、IS-Printing System による解析結果の情報共有により、行政関係機関との連携体制が構築できたので報告する。

A. 研究目的

広域的に流通する食品由来の病原体による食中毒・感染症事例では、原因病原体の検索のみならず、近年は分子疫学解析も迅速に行うことが求められてきている。

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、北海道・東北・新潟ブロック内でも食中毒等の事例対応の検査に少しずつ活用され始めている。しかし、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 の利用は依頼があった事例のみなど、限られた一部の事例の解析で終わっている施設がほとんどである。

今年度、関東を中心とする広域に食中毒患者等が発生した事例対応を契機として、感染経路や原因食品を特定するためには、近隣の自治体との迅速な情報共有が重要であることが改めて示唆された。そこで、北海道・東北・新潟ブロック内における IS コードを共有化するシステム構築のため、共通菌株を用いた各施設の精度管理を実施するとともに、各県から今年度発生した EHEC O157 VT2 タイプの IS コードを集積し、北海道・東北・新潟ブロック内に患者発生がみられる菌株の発生状況の調査を行った。

秋田県においては、IS-Printing System のデータ活用について関係行政機関との情報共有の体制の構築に向けて、県内の保健所等の担当者向けに分子疫学

解析についての研修を行った。

B. 研究方法

1. 共通菌株を用いた精度管理

1) 供試菌株配布

平成 29 年度に秋田県内で分離された EHEC O157 菌株 4 株を共通解析菌株とし、IS-Printing System (TOYOBO) の取扱説明書に従い DNA 溶液を作製し、ブロック内の地方衛生研究所 11 施設に配布した (表 1)。

2) IS-Printing System による解析

各施設で IS-Printing System を用いて、取扱説明書に従い解析を実施し、結果と画像の提出を求めた (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) (表 2)。

2. O157 VT2 タイプの IS コードの比較

北海道・東北・新潟ブロックの各施設から、平成 29 年度に分離された EHEC O157 VT2 タイプの IS コードを 5 株程度集約し、同一の IS コードを示す菌株を探索した。

3. 秋田県における IS コードの活用

秋田県内において事例発生時、できる限り迅速に解析を行い、IS コードを関係行政機関へ情報提供を行った。

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。配布した DNA 溶液の IS コードを示す (表 3)。菌株 No. 3 については、1st set 1-03 の判定結果が施設間で異なり、2 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を反映し、解析画像は若干異なっている。

2. ブロック内 O157 VT2 タイプ IS コード比較

北海道・東北・新潟ブロック内の各施設から計 35 株の EHEC O157 VT2 タイプ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 24 株の解析結果を比較した。24 株中 9 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 17 パターンに分類された。この内、6 施設一致が 1 パターンあり、この株は関東を中心に発生したタイプであった。また、3 施設一致が 1 パターンあったが、関連は不明であった。その他 15 株は他の施設とは一致しなかった。

3. 秋田県内における IS コードの活用

秋田県内においては、発生した事例の菌株が EHEC O157 と同定され、菌株が入手可能な場合、迅速に IS-Printing System による解析を行っている。結果を関係行政機関へ情報提供するにあたり、今年度は保健所等の食品衛生監視員を対象に EHEC の分子疫学的解析法に関して研修会を実施した。今後は、IS コードの一致が判明した時点で、所管の保健所へも連絡することになり、IS-Printing System の結果について疫学調査と照らし合わせ等による活用が期待される。

D. 考察

IS-Printing System の精度管理は、前年の検討でも、エキストラバンド判定により解析結果が不一致となっていたが、

平成 29 年度においても 4 株中 1 株において 1-02、1-03 間のエキストラバンドを 2 施設が (+) 判定した。解析画像をみると、電気泳動条件の違いもあるが、バンド位置がコントロールと少し差があり、電気泳動時間を調整し増幅産物のバンド間を十分分離することで、正しいバンド判定ができたものと思われる。各施設の検査精度向上のため、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。今年度の北海道・東北・新潟ブロックでは、担当者の変更も多くあった。マルチプレックス PCR による全てのバンドをシャープに撮影するためには、泳動するテンプレートの量の調整や希釈を行うなどの工夫も必要であり、技術の継承も今後の課題と思われる。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特徴あるものは共有化することが必要と思われる。

北海道・東北・新潟ブロック内の各施設で分離された EHEC O157 VT2 タイプの一部について広域患者発生菌株を探索したところ、2 種類の菌株で IS コードの一致が見られた。一つのパターンは、個人情報保護の観点から、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 3 施設一致、もう一つのパターンは、今年度関東を中心に発生した広域な患者発生を伴う食中毒や感染症の菌株で 6 施設の一致であった。早期に国立感染症研究所よりこの広域事例由来菌株

の IS コードの情報を得ていたため各施設においても検出した菌株と比較し、早期探知が可能であったと思われる。秋田県の場合も行政機関へ県内発生事例との比較結果を情報提供していた。広域な事例の早期探知には、疫学的な調査の科学的な裏付けとして IS-Printing System は迅速で、大変有用と考えられる。

秋田県内で発生した複数保健所にまたがる事例の際も、IS-Printing System により迅速な情報を得て、早期に秋田県内の患者が同一感染源の患者である可能性を考慮することができた。その後の国立感染症研究所による MLVA の分子疫学解析の情報からも同一感染源の患者である可能性が確認されている。今後、行政機関とも連携を深め、迅速な情報提供に努めたい。

本研究の成果を踏まえ、今後の北海道・東北・新潟ブロック内での情報共有化システムの構築に向けては、一定の検査精度を保ち、さらに各施設の条件設定の確認と担当者変更時において技術の継承の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 の精度管理における解析結果は、1-02、1-03 間に出現したエキストラバンドについて判定で分かれた。しかし、概ね良好な解析結果であり、発生事例等について解析を続けて行うことによりデータの幅広い活用の仕方が各施設で構築できると考えられる。IS-Printing System は、広域にわたる事例発生時の病原体情報と

して迅速性と有用性が高いことから、今後も精度管理による検査技術の水準を保ち、データの精度を高め、地域行政に還元していく必要がある。

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 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	EC16810	2017.5.1	散発下痢症患者	VT1,2 eae
2	EC16831	2017.7.5	散発下痢症患者	VT2 eae
3	EC16851	2017.7.20	散発下痢症患者	VT1,2 eae
4	EC16950	2017.10.19	散発下痢症患者	VT2 eae

表 2 各施設使用PCR装置 及び 電気泳動条件

NO	使用PCR装置名	テンプレート量	泳動装置	泳動時間	備考
A	AB 2720 Thermal Cycler	1μ l	ADVANCE Mupid-α	70分	135V
B	TAKARA DiceR Touch	1μ l	QIAGEN QIAxcel		
C	AB Veriti	1μ l	Mupid-exU	1st60分 2nd45分	
D	AB Veriti 200	1μ l	i-MyRun.N	115分	
E	AB 9600	1μ l	Mupid-2plus	80分	
F	BIO-RAD My Cycler	2.5or0.5μ	Mupidミニゲル泳動槽	75分	
G	AB 2720 Thermal Cycler	1μ l	MS WideMini Horizontal MT-108	120分	
H	BIO-RAD PTC-0220	1μ l	Mupid-2plus	95分	
I	Bio-RAD iCycler	1μ l	Mupid-2plus	70分	
J	AB Veriti	1μ l	Mupid-exU	150分	100V
K	AB Veriti 96-Well (Veriti200)	1μ l	ADVANCE Mupid	79分	

表 3 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	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
No.2	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
No.3	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
No.4	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	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	1	1	1	1	0	1	1	1	1
No.2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
No.3	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
No.4	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0

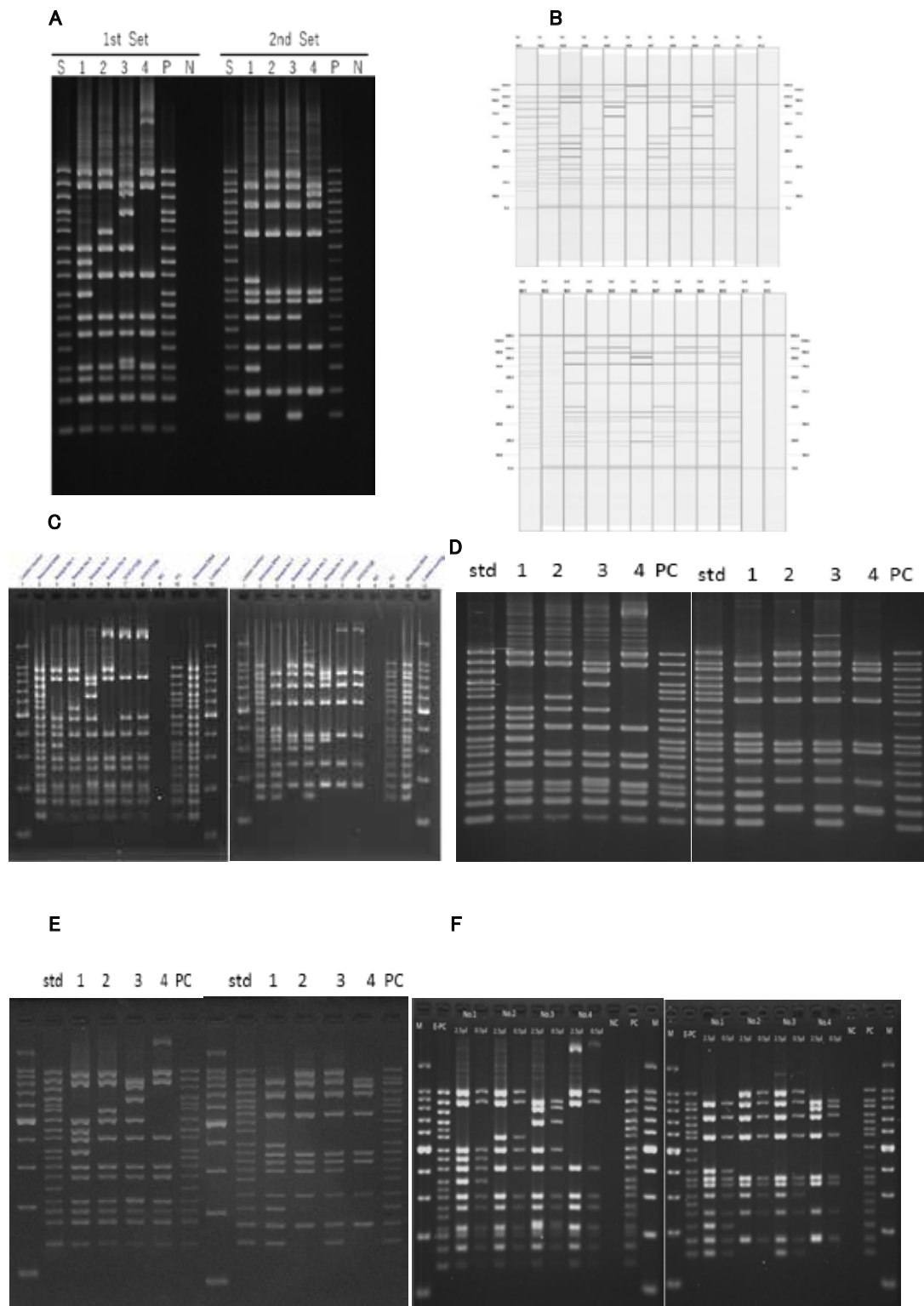


図 1 各施設の IS-Printing Systemによる電気泳動像

レーン 1 : EC16810, レーン 2 : EC16831, レーン 3 : EC16851, レーン 4 : EC16950

図 1 続き

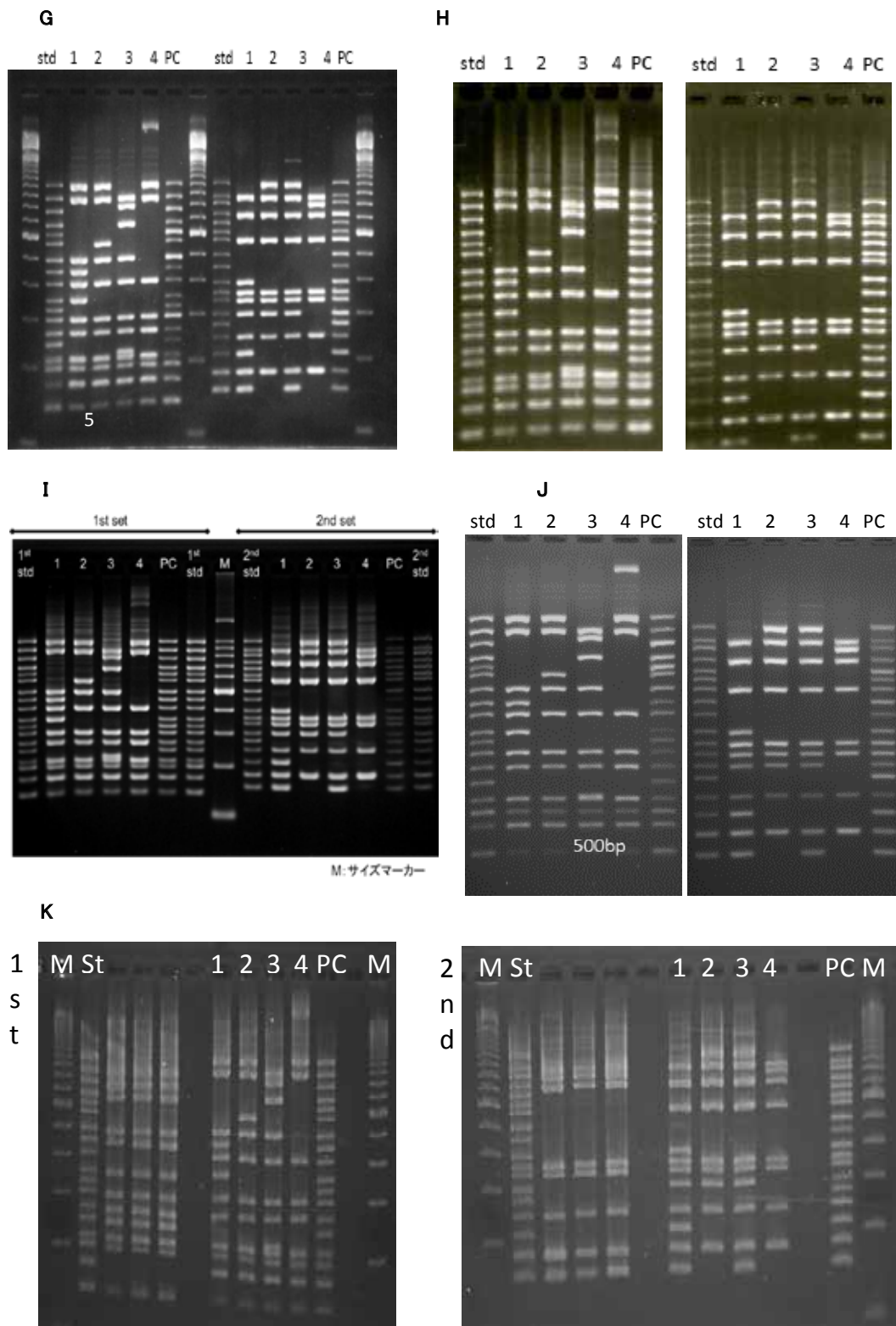


図 1 各施設のIS-Printing Systemによる電気泳動像
 レーン 1 : EC16810, レーン 2 : EC16831, レーン 3 : EC16851, レーン 4 : EC16950

表 4 北海道・東北・新潟ブロック内 O157VT2タイプ IS コード

自治体名	bp	974	839	742	645	595	561	495	442	405	353	325	300	269	241	211	185	171	137	987	861	801	710	642	599	555	499	449	394	358	331	301	278	240	211	181	151					
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	1-16	1-17	1-18	1-19	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					
G	①	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0			
D	②	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
K	③	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0		
C	④	0	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	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
D	⑤	0	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	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
G	⑥	0	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	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
H	⑦	0	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	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
D	⑧	0	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	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
J	⑨	0	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	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
ポテトサラダ		0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1/0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0		
F	⑩	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0		
H	⑪	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	
D	⑫	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
J	⑬	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	
F	⑭	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
F	⑮	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	
J	⑯	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	
H	⑰	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
E	⑱	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
K	⑲	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	
E	⑳	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	1	0	0	1	0	1	0	
D	㉑	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
E	㉒	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	
G	㉓	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0		
E	㉔	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0