

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

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 精度管理および情報共有に関する研究

研究分担者 松本昌門 愛知県衛生研究所
研究協力者 山田和弘 愛知県衛生研究所
木全恵子 富山県衛生研究所
木村恵梨子 石川県保健環境センター
岩崎理美 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
信田充弘 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
中根千鶴 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 10 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所）に対して、1. IS-printing 精度管理、2. 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. IS-printing 精度管理

最も多く認められた誤りは検体①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエクストラバンドで 5 施設で 1-3 (+) と解釈していた。今回の検体は DNA 量が通常の倍量であったため、全体にバンドが太くスメアーとなり 4 検体でバンドの有無の確認が困難であった施設があった。また、hlyA のバンドが確認できなかった施設があった。これは試薬のロットによる増幅効率の違いが強く示唆された。今後、ブロック内の研修会等でフィードバックを行いたい。

2. 地域共有データベース

4 月から運用開始され、腸管出血性大腸菌シーズンをカバーすることができた。平成 29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。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メリットもあることから、今後の情報共有ツールとして重要であると考えられた。

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 の分子疫学法として IS-printing system（IS-PS）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 10 施設（地方衛生研究所、及び衛生試験所）に対して、1. IS-PS 精度管理、2. 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. IS-PS 精度管理

愛知県衛生研究所から各地研に EHEC 0157 5 株からカラム精製した DNA（20 ng/μL）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、電気泳動条件等についての調査を行った。なお、送付した 5 検体のうち、検体番号①については 1-03 の上に非特異バンドが検出される株であった（図 1）。

2. 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-PS 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-PS 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。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-PS 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、運用している。

（倫理面への配慮）

分離菌株についての研究を行い、患者情報は利用しない。データベース構築に当たっては患者情報を登録しない。

C. 研究結果

1. IS-PS 精度管理

各地研におけ IS-PS の解析結果は 5 検体全て正解が 3 施設、4 検体正解が 5 施設、1 検体正解、正解なしが各 1 施設であった。最も多く認められた誤りは検体①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエクストラバンドを 1-3（+）と解釈したもので 4 検体正解の 4 施設を含む 5 施設で認められた。

正解が 1 検体の施設では全体にバンドが太くスミアとなり 4 検体でバンドの有無の確認が困難であった。正解なしの施設では 5 検体全てで *hlyA* のバンドが確認できなかった。

各施設における各施設における PCR 実施環境を表 1 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。

2. 地域共有データベース

平成 27 年 10 月から開始したデータベースの運用は平成 29 年 3 月で一旦停止し、平成 29 年 4 月から再開した。平成 30 年 2 月 16 日現在、6 つの施設から 94 株の EHEC 0157 の IS-PS 情報が登録されている。

D. 考察

1. IS-PS 精度管理

最も多く認められた誤りは①の IS-PS 1-2 と 1-3 の間に出現するエクストラバンドで 5 施設で

1-3 (+) と解釈していた。このエクストラバンドは比較的頻繁に認められることからをブロック内の情報共有をすすめる必要がある。

1 施設では全体にバンドが太くスメアーとなり4 検体でバンドの有無の確認が困難であった。今回の検体は DNA 量が通常の倍量であったため、PCR 増幅量が多くなりバンドが太くなったと思われる。一部の施設では添加する検体量を半量にしたり、泳動するPCR産物を希釈する等して良好な泳動図を作成していた。今後、当該施設には平成 30 年 3 月に開催される東海・北陸微生物部会でフィードバックを行いたい。

他の 1 施設では *hlyA* のバンドが確認できなかった。*hlyA* 増幅不良はこれまで多々指摘されていた。また、他施設でも *hlyA* バンドが薄いので試薬のロットによる増幅効率の違いが強く示唆された。

2. 地域共有データベース

4 月から運用開始され、EHEC シーズンをカバーすることができた。平成 29 年度は過去 2 年間に比べより多くの株数が登録された。今後、データベースの活用法など啓蒙活動が必要であると思われる。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メリットもある

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. IS-PS 精度管理

エクストラバンド、*hlyA* 増幅不良等の認識、適切な泳動図を得るための知識を得るために継続的な精度管理が重要である。

2. 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-PS の情報共有を試みた。データベースの活用法などに課題が残る。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1 精度管理に用いた IS-PS 泳動図

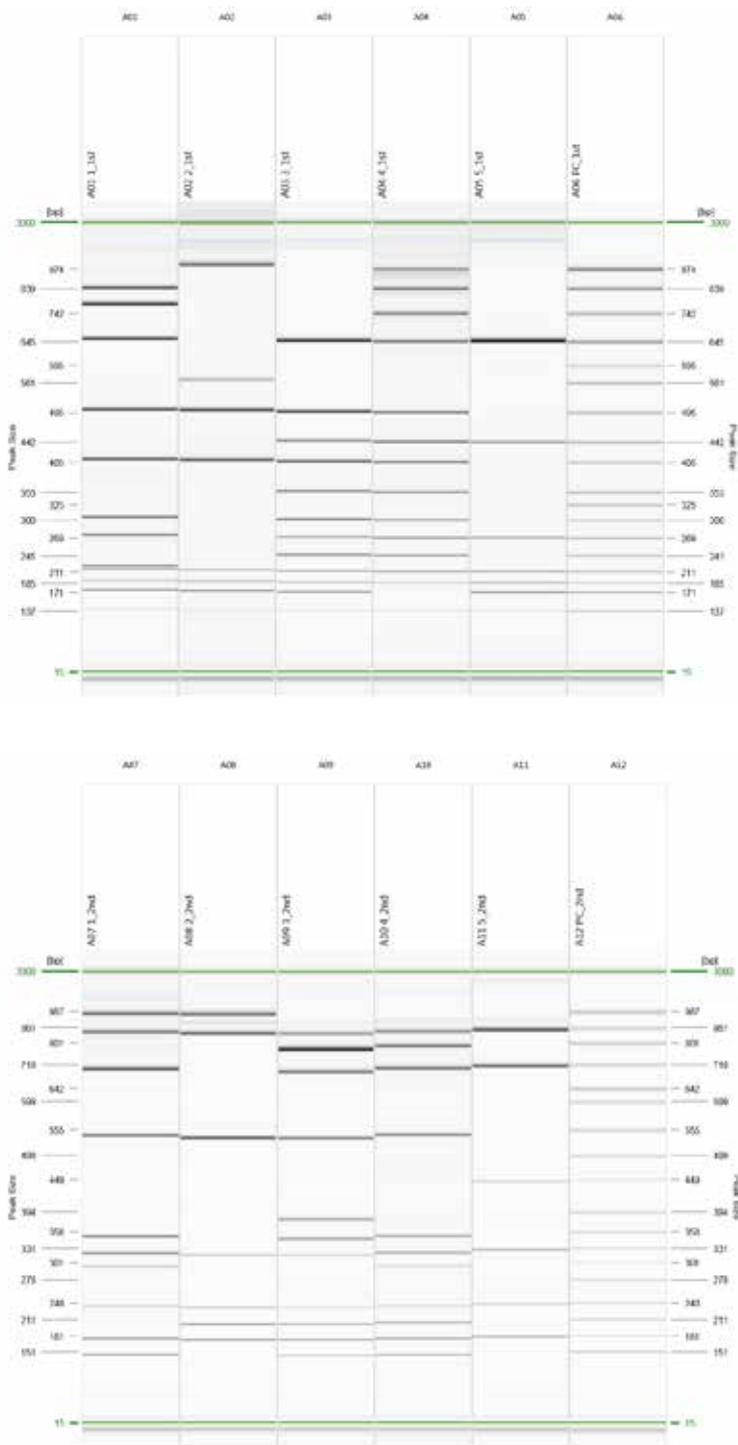


表 6 施設におけるPC実地試験					
施設	A	B	C	D	E
アンプレート作成方法	5ヶキップスで熱抽出	アルカ熱抽出(60ml Nephro-Block)	添付文書どおり	添付文書またはアルカ溶解法	添付文書どおり
サーマルサイクルの種類	Venti	T100 サーマルサイクル(ハイオク・ラジ)	Applied Biosystems Venti	2720 thermal cycler (AB)	POPシステムProFlex
IS-purifying PCの反応ボリューム	20µl	20µl L	50µl L	50µl	50µl
アガラスの種懸及び濃度	3% Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1	3% Agencore KANTO HD in 0.5x TBE	3% Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1	ゲル濃度3%	3%アガラス(Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1)
電気泳動槽の種類	Mupid ミニゲル泳動槽	i-Mupid ミニゲル泳動槽(コスモイオ)	Mupid-exu	Mupid-21 ミニゲル泳動槽(コスモイオ)	コスモイオ槽 i-MuRunII
電気泳動槽内、時間	50V 50min, 100V 90min	100V, 60分前後(Gelの泳動状況で変動)	100V 70分	100V 75min	135V 135分
泳動バッファ	0.5x TBE	0.5x TBE	0.5x TBE	0.5x TBE	0.5x TBE
その他		Takedaの8x Dyeの使用			
施設	F	G	H	I	J
アンプレート作成方法	送付されたサンプルそのままアプレートコロニーから熱抽出	アプレートコロニーから熱抽出	添付文書通り	添付文書どおり	
サーマルサイクルの種類	Applied Biosystems Venti 200	BIO-RAD C1000 Thermal Cycler	Applied Biosystems Venti	POPシステムProFlex	Applied Biosystems Venti 96 well Thermal Cycler
IS-purifying PCの反応ボリューム	50µl L	25µl	添付文書通り	50µl	20µl
アガラスの種懸及び濃度	Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1 3%	Nusieve 3:1 Agencore, 3%	添付文書通り	3%アガラス(Nusieve GTG, Seakem GTG=2:1)	Nusieve 3:1アガラス 3%
電気泳動槽の種類	Mupid	BIO-RAD MINI-SUB CELL GT	ADVANCE Mupid-exu	コスモイオ槽 i-MuRunII	CosmoBio MuRun
電気泳動槽内、時間	100V 75分	100V 40分	100V 40分	135V 135分	100V 120min
泳動バッファ	0.5x TBE	0.5x TBE	添付文書通り	0.5x TBE	0.5x TBE Buffer
その他					サンプルはほぼベンジメチンに泳動